

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAC TABANLI ARRAY CGH TEKNOLOJİSİNİN VE KROMOZOM ANALİZİNİN
PRENATAL TANIDA KULLANIM ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDA EREN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (DOKTORA) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç.Dr. HAKAN SAVLI

KOCAELİ
2013

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAC TABANLI ARRAY CGH TEKNOLOJİSİNİN VE KROMOZOM ANALİZİNİN
PRENATAL TANIDA KULLANIM ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDA EREN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (DOKTORA) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç.Dr. HAKAN SAVLI

KOCAELİ
2013

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: BAC TABANLI ARRAY CGH TEKNOLOJİSİNİN VE KROMOZOM ANALİZİNİN PRENATAL TANIDA KULLANIM ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Tez yazarı:Seda EREN

Tez savunma tarihi:26.04.2013

Tez Danışmanı:Doç.Dr.Hakan SAVLI

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANL- DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Prof.Dr.Doğan Gülkaç	
ÜYE(DANIŞMAN):	Doç.Dr.Hakan SAVLI	
ÜYE:	Prof.Dr.Kürşat YILDIZ	
ÜYE:	Doç.Dr.Burçak VURAL	
ÜYE:	Yrd.Doç.Dr Naci ÇİNE	

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../200..

Prof.Dr.Tuncay ÇOLAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

BAC Tabanlı Array CGH Teknolojisinin ve Kromozom Analizinin Prenatal Tanıda Kullanım Etkinliğinin Araştırılması

Array CGH yöntemi, submikroskopik genomik değişimlerin taranmasında etkin bir metoddur. Array CGH ve konvansiyonel karyotipleme, anormal ultrason bulgusu gibi prenatal tanı vakalarında; anöplodiler, duplikasyonlar, delesyonlar ve marker kromozomların tespitinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda 141 amniyosentez materyaline konvansiyonel karyotipleme ve BAC tabanlı array CGH yöntemi uygulanmıştır. 141 amniyosentez işleminin endikasyonları, tarama testinde yüksek risk(%69), ileri anne yaşı (%11.9), anormal ultrason bulguları(%21), anomalili çocuk öyküsü(%1.4), ailede MR hikayesiydi.

Karyotip analizinde, dört hastada trizomi 21, beş hastada trizomi 18, bir hastada monozomi X ve altı hastada da başka anomaliler gözlenmiştir. BAC array CGH analizinde sayısal kromozom anomalisi olarak dört hastada trizomi 21, hastada trizomi 18, bir hastada monozomi X saptanmıştır. Yapısal anomali olarak ise bir vakada 14 numaralı kromozomda parsiyel duplikasyon gözlenmiştir.

Bu çalışmada, BAC tabanlı array CGH'in ve konvansiyonel karyotiplemenin prenatal vakalardaki tanısal değeri araştırıldı. Karyotipleme, hala prenatal tanıda kullanılan en güçlü genetik tanısal test olduğu kabul edilmektedir. Array CGH yönteminin, karyotiplemeye göre bazı limitleri bulunmaktadır. Bununla beraber, bu yöntemin tüm genom düzeyinde parsiyel duplikasyon ve delesyonların tespitindeki hassasiyeti arttıkça prenatal tanıda daha güçlü bir metod haline gelecektir.

Anahtar Kelimeler:Prenatal tanı, kromozom anomalileri, BAC array CGH, kromozom analizi

ABSTRACT

Investigation of Diagnostic Value of Chromosome Analysis and BAC based Array CGH in Prenatal Diagnosis

Array CGH is effective in screening for submicroscopic genomic imbalance. Array CGH and conventional karyotyping, for fetuses with abnormal ultrasound results, and is particularly useful in fetuses with aneuploidies, duplications, deletions and marker chromosomes.

Konventional karyotyping and BAC based array CGH were performed on 141 amniocentesis samples from referred with variety of prenatal diagnosis indications.

Indications of 141 amniocentesis procedures are hig risk in triple tests (%69), advanced maternal age (%11.9), abnormal ultrasound findings(%21), history of children with abnormalities(%1.4), history of MR in family (%0.7). In karyotype analysis, there were trisomy 21 in four patients, trisomy 18 in five patients, monosomy X in one patients and other abnormalites in six patients.

BAC array CGH detected trisomy 21 in four patients, trisomoy 18 in four patients and monosomy X in one patient as numerical chromosome abnormalities. As structural abnormality partial duplication of chromosome 14 were detected in one patient.

This study demonstrates diagnostic value of BAC based array CGH and konventional karyotyping as diagnostic tests in prenatal cases. Kayotyping is stil the most powerful genetic diagnostic test. Array CGH has various limitations according to karyotyping. At the same time, capability of genome wide detection of segmental deletions duplication in pateints maket this method a more powerful tool in prenatal diagnosis.

Key words: Prenatal diagnosis, chromosome abnormalities, BAC array CGH, chromosome analysis

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasına bilgi ve tecrübesiyle katkıda bulunan, eğitimim ve tez çalışmalarını boyunca bana yol gösteren değerli danışman hocam Doç. Dr. Hakan SAVLI'ya

Benden hiçbir konuda bilgisini, tecrübesini ve yardımını esirgemeyen, değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Naci ÇİNE'ye

Hasta teminindeki katkılarından dolayı başta Prof.Dr. Gülseren YÜCESOY ve Yrd. Doç.Dr. Yiğit ÇAKIROĞLU olmak üzere Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı'na

Tezimin deney aşamasında katkıları için arkadaşlarım Nilüfer ÜZÜLMEZ ve Duygu YAVUZ'a

Tezimin deney ve analiz aşamasında benden yardımını ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Deniz SÜNNETÇİ'ye

Berber çalıştığım, benden yardımlarını esirgemeyen, hoşgörü ve sabırlarıyla bana destek olan arkadaşlarım Buket DOĞRUOĞLU'na, Zeynep İLKAY'a, Tuğba Ünal'a, Tülin BURHANOĞLU'na, Ramis Ufuk AKKOYUNLU'ya

Ve bugüne kadar benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman her koşulda bana destek olan çok kıymetli annem Neslihan Eren'e, çok kıymetli babam Sadullah Cihan Eren'e ve biricik kardeşim Mert Caner Eren'e

Teşekkür ederim.....

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Prenatal Tanı.....	3
2.1.1 Tanım ve Amaç.....	3
2.1.2 Prenatal Tanı Yöntemleri.....	4
2.1.2.1 Non invaziv Prenatal Tanı Yöntemleri.....	5
2.1.2.2 İnvaziv Prenatal Tanı Yöntemleri.....	8
2.1.3 Prenatal Tanı Endikasyonları.....	11
2.1.3.1 İleri Anne yaşı.....	11
2.1.3.2 Habitüel Abortus.....	13
2.1.3.3 Daha önce kromozom anomalisi olan abortus veya doğum hikayesi.....	13
2.1.3.4 Tarama testinde yüksek risk.....	13
2.1.3.5 Nöral tüp defekti riski.....	14
2.1.3.6 Ebeveynlerden birinde yapısal kromozom anomalisi varlığı.....	14
2.1.3.7 Aile hikayesinde biyokimyasal veya DNA analizi ile tanı konulabilen genetik hastalık varlığı.....	14
2.1.3.8 Özgül bir prenatal tanı testinin olmadığı X'e bağlı hastalık hikayesi.....	14
2.1.3.9 Anormal Ultrason bulgusu.....	14
2.2. Genetik ve Kromozomal Anomalilerin Prenatal Taranması.....	15
2.2.1 Prenatal Dönemde Sık Gözlenen Kromozomal Hastalıklar.....	16

2.2.1.1. Otozomal Kromozomal Anomalileri.....	16
2.2.1.2. Cinsiyet Kromozom Anomalileri.....	18
2.3. Kromozom İnceleme Yöntemleri.....	20
2.3.1 Sitogenetik Yöntemler.....	22
2.3.2 Moleküler Sitogenetik Yöntmeler.....	23
2.3.3 Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon Yöntemi.....	25
2.3.3.1 Array CGH yönteminin Klinikte Kullanımı.....	28
3.GEREÇ YÖNTEM.....	30
3.1. Yöntem.....	30
3.1.1. Amniyosentez Materyalinden DNA İzolasyonu.....	31
3.1.2. DNA Kantite Tayini.....	31
3.1.3. Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizi Metodu.....	31
3.1.3.1. DNA Lekeleme.....	31
3.1.3.2. DNA' nin Pürifikasyonu.....	32
3.1.3.3. Örneklerin Kurutulması.....	32
3.1.3.4. Hibridizasyon.....	33
3.1.3.5. Yıkama.....	34
3.1.3.6. Tarama.....	35
3.1.3.7. Veri Analizi.....	37
3.2. Konvansiyonel Kromozom Analizi.....	37
3.2.1. Amniyosentez Materyali Kültürü.....	37
3.2.2. Amniyosentez Materyal Harvesti.....	37
3.2.4. GTL bantlama.....	37
3.2.3 Preparatların hazırlanması.....	37
4.BULGULAR.....	39
5.TARTIŞMA.....	49
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	57

ÖZGEÇMİŞ.....	62
----------------------	-----------

KISALTMALAR VE SEMBOLLER

aCGH	: Array-Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon
AFP	: Alfa-Fetoprotein
BAC	: Bakteriyel Yapay Kromozom
BPD	: Biparietal Çap
b-hCG	: Human Koryonik Gonodotropin
DS	: Down sendromu
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
FSH	: Folikül sitümulan hormon
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
Kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum Klorür
KS	: Kordosentez
KVÖ	: Koryon Villus Örneklemesi
LH	: Lüteinizan hormon
Mb	: Megabaz
NT	: Ense Kalınlığı
NTD	: Nöral Tüp Defekti
μE3	: Ankonjuge Östriol
PAPP-A	: Gebeliğe Özgü Plazma Proteini-A
PHA	: Phytohemaglutinin
q	: Kromozomun kısa kolu
SSC	: Sodyum Salin Citrat
QF-PCR	: Kantitatif Floresan Polimeraz Zincir Reaksiyonları
USG	: Ultrasonografi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: On üç haftalık fetüse ait ultrason görüntüsü.....	6
Şekil 2.2: Amniyosentez işlemi.....	9
Şekil 2.3:Amniyosentez işlemi.....	9
Şekil 2.4: KVÖ işlemi.....	10
Şekil 2.5: Fetal kan örneklemeşi.....	11
Şekil 2.6: Maternal yaş-kromozomal anomali görülme riski değişim grafiği.....	12
Şekil 2.7:Normal mayoz bölünme(solda) ve nondisjunction gözlenen mayoz bölünme (sağda).....	13
Şekil 2.8:46,XY karyotipli bir G-bantlı metafaz görünütüsü.....	22
Şekil 2.9: Trizomi 21 bulgusu bulunan bir G-bantlı metafaz görünütüsü.....	23
Şekil 2.11:Trizomi 21'li bir vakanın FISH görüntüsü.....	24
Şekil 2.12: Array CGH yönteminin aşamaları.....	28
Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).....	31
Şekil 3.2. Yükleme yapılan slaytlar.....	33
Şekil 3.3. HyBex İnkübatörde yıkanan slaytlar.....	34
Şekil 3.4. Tarayıcı kasete yerleştirilen slayt.....	36
Şekil 3.5. Tarayıcı karuseline yerleştirilen slaytlar.....	36
Şekil 4.1: Trizomi 21 bulgusu bulunan hastaya ait array CGH görüntüsü.....	46
Şekil 4.2: Trizomi 21 bulgusuna sahip hastaya ait array CGH analiz programının idiogramı.....	47
Şekil 4.3: Trizomi 18 bulgusuna sahip hastaya ait array CGH görüntüsü.....	48
Şekil 4.4: Trizomi 18 bulgusuna sahip hastaya ait array CGH analiz programının idiogramı.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: Prenatal tanıda kullanılan invaziv ve non invaziv yöntemler.....	4
Çizelge 4.1: Amniyosentez endikasyonlarının görülme oranı	40
Çizelge 4.2: Vakalarımızda gözlenen anormal ultrason bulguları ve gözlenen anomaliler	40
Çizelge 4.3: Anomali saptanan tüm kromozom analiz sonuçları	42
Çizelge 4.4: Amniyosentez işlemlerinde saptanan kromozomal anomalilerin dağılımı.....	43
Çizelge 4.5: Anomali gözlenen hastaların array CGH ve karyotip sonuçları.....	43

1. GİRİŞ

Doğum öncesi tanıda esas hedef mümkün olduğunca erken tanı koymak ve sonuca göre gerekli kararı verebilmektir. Esas olan kullanılan yöntemleri gebeliğin sonlandırılması için bir araç olarak görmek değil; fetüsün durumu hakkında doğru bilgi edinmek ve aileye kendi kararlarını kişisel, sosyal ve etik ilkeler çerçevesinde vermesini sağlamaktır. Prenatal tanı yöntemleri non invaziv ve invaziv yöntemler diye iki kısma ayrılmaktadır. Non invaziv yöntemlerin en önemlileri, ultrason incelemeleri ve anne kanında çalışılan biyokimyasal testlerdir. Günümüzde ikinci trimesterde (14–22. haftalarda) alfa-fetoprotein (AFP), total human koryonik gonodotropin (HCG) ve ankonjuge Estriol (μ E3) düzeylerinin tespitini içeren "üçlü test" yaygın kullanılan bir prenatal tarama testidir. Prenatal tanıda kullanılan amniyosentez ya da kordosentez (KS) gibi invaziv yöntemler sayesinde, fetal karyotip hakkında bilgi sahibi olabilmek mümkün olmuştur (Dağlar ve ark., 2011; Reçber ve Özen, 2002)

Prenatal tanı amaçlı invaziv yöntemlerin uygulanabilmesi için, medikal bir endikasyonun bulunması şarttır. Yaygın olarak kabul gören prenatal tanı endikasyonları, ileri anne yaşı, anormal ultrason bulguları, tarama testlerinde risk artışı, kromozom anomalili çocuk hikayesi, ebeveynlerden birinde dengeli kromozom anomalisi varlığıdır (Gülten ve ark., 2005).

Fetal karyotipleme amacıyla amniyosentez, koryon villüs örnekleme (KVÖ), fetal kan örnekleri kullanılmaktadır. Genetik tanı amaçlı yapılan prenatal tanıda en sık kullanılan yöntem kromozom analizidir. Bu yöntemle bütün kromozomal anöplidiler ve yaklaşık 5 Mb ya da daha büyük yapısal değişimler saptanabilmektedir. Prenatal tanıda sıklıkla tespit edilen kromozomal anomaliler, Down Sendromu, Edward Sendromu, Patau Sendromu, Turner sendromu ve Klinefelter sendromudur.

Kromozom analizi, kültür işlemi gerektiren ve analiz aşaması moleküler yöntemlere göre daha uzun süren bir yöntemdir. Sık gözlenen anöplidilerin tümü bu yöntemle saptanabilse de, raporlandırma sürecinin uzun olması daha kısa sürede sonuç verebilecek tanı yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç doğurmuştur. Bu amaçla geliştirilen başlıca yöntemler, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QF-PCR) ve Array-Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (aCGH)

yöntemleridir. Tüm genom düzeyinde tespit olanağı sağlayan aCGH yönteminin prenatal tanıda kullanımı, yaygınlaşmaya başlamıştır (Shaffer, 2007).

Amacımız, prenatal dönemde gözlenen genetik hastalıklarının tanısında kromozom analizi ve son yıllarda yaygınlaşan BAC tabanlı array CGH yöntemlerinin prenatal tanıdaki etkinliklerinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PRENATAL TANI

2.1.1. TANIM ve AMAÇ

Çocuk sağlığının intrauterin dönemde başladığı kabul edilmektedir. Dolayısıyla fetal anomalilerin ve genetik hastalıklar açısından yüksek risk taşıyan gebeliklerin incelenerek var olan olası hastalıkların prenatal dönemde saptanabilmesi önem taşımaktadır. Bu amaçla ortaya çıkan prenatal tanı kavramı, özel yöntemler kullanılarak embriyo ve fetusun gelişim ve sağlığı hakkında bilgi edinmeyi kapsamaktadır (Gülten ve ark., 2005).

Prenatal tanı, ilk kez 1966'da Steele ve Breg'in fetustaki kromozom anomalisini, amniyon sıvısındaki hücrelerin kültüründen elde edilen kromozom analizi sonucunda tespit edilmesiyle başlamıştır. İleri anne yaşı ile Down sendromu arasındaki ilişkinin bilinmesi prenatal tanının önemini ve yaygınlığını arttırmıştır (Nussbaum et al, 2004).

Prenatal tanı, embriyo ve fetusta yapılan bütün diagnostik çalışmaları kapsayan bir süreçtir. Bu süreçte; genetik danışma, tarama testleri gibi laboratuvar çalışmaları ile birlikte obstetrik, ultrason ve genetik testler uygulanarak olası hastalıklar tespit edilir ve aile bilgilendirilir (Türkyılmaz ve ark., 2007).

Prenatal tanı ile özellikle risk taşıyan gebeliklerde bebeğe henüz anne karnındayken tanı konulması mümkün olmaktadır. Aynı zamanda hastalığın, varsa doğum öncesi tedavisine, doğum sonrası gerekli önlemlerin alınmasına ve tedavi planlanmasına olanak vermektedir. Bu yöntemler ile tanısı konulan bazı hastalıklar için yasal çerçeveler kapsamında ailenin isteği doğrultusunda gebeliklerin sonlandırılması da mümkün olabilmektedir (Yüreğir ve ark., 2012).

Prenatal tanı, sadece risk altındaki fetusta olası bir genetik hastalığın bulunup bulunmadığının uygun dönemde tespit edilip, gebeliğin terminasyonunu amaçlamaz. Yüksek riskli gebeliklerde aileye geniş bilgi sunmak ve ailelerin gebeliğe dair endişelerini azaltmayı amaçlamaktadır (Nussbaum et al., 2004).

Kısaca prenatal tanının amaçları özetleyecek olursak;

- 1-Yüksek riskli ailelerde daha güvenli bir gebelik planlanması ve gebelik başlangıcına,
- 2-Yüksek riskli grup içinde olmamalarına karşın tarama testleri sırasında riskli olduğu saptanan gebelerde gerçek bir patoloji olup olmadığını saptamaya ve sonuca göre aileye seçme hakkı vermeye,

3-Devamına karar verilen gebeliklerde, aileyi yeterince bilgilendirerek, doğacak olan bireyin daha sağlıklı olabilmesi için gerekli koşulların sağlanmasına,

4-Tedavi edilebilir olgularda, tedavi planının erken dönemde yapılmasına, dolayısıyla hem hastalığın iyileşmesine hem de gecikmiş tanı nedeniyle meydana gelebilecek komplikasyonları önlemeye olanak sağlayarak, sağlıklı çocuklara sahip olma şansını artırır (Gülten ve ark., 2005; Nussbaum, 2004).

2.1.2. PRENATAL TANI YÖNTEMLERİ

Her gebelik hastalıklar açısından belli bir risk taşımakla beraber bazı gebeliklerin sahip olduğu risk toplum riskinden anlamlı derecede yüksektir. Topluma göre yüksek risk unsuru taşıyan gebeliklerde, fetüsün değerlendirilmesine yönelik direkt veya indirekt analiz yöntemleri mevcuttur. Direkt incelemede invaziv, indirekt incelemede ise non-invaziv yöntemler kullanılmaktadır (Türkyılmaz ve ark., 2007).

Non-invaziv yöntemler, fetusun ultrasonografi ile incelenmesi ya da anne kanından yapılan incelemeleri içermektedir. İnvaziv yöntemlerde ise, fetusa ait hücrelerden araştırma yapılmaktadır. Non-invaziv yöntemler her gebelikte uygulanabilirken, invaziv yöntemler için endikasyon gerekmektedir (Saatçi ve ark., 2007).

Riskli olduğu saptanan gebeliklerin takibinde, hangi invaziv yöntemlerin kullanılabilceği, tespit edilebilecek hastalıklar, varsa tedavi olanakları, başarı oranları hakkında aileye detaylı bilgi verilmelidir. Prenatal tanıda kullanılan invaziv ve non invaziv yöntemler Çizelge 2.1 de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1: Prenatal tanıda kullanılan invaziv ve non invaziv yöntemler

Non-İnvaziv Yöntemler	İnvaziv Yöntemler
Ultrasonografi	Amniyosentez
Anne serumundan yapılan tarama testleri	Koryon villus biyopsisi
Anne kanından fetusa ait hücrelerin izolasyonu	Kordosentez
	Fetal Deri Biyopsisi

2.1.2.1. NON-İNVAZİV PRENATAL TANI YÖNTEMLERİ

Bu yöntemlerin amacı, fetal sağlık problemlerini doğrudan belirlemek veya riskli gebelikleri tanımlayarak prenatal tanı programlarına sevk etmektir. Ayrıca, invaziv prenatal tanı yöntemleri belli bir komplikasyon riskine sahip oldukları için, non invaziv yöntemler sıklıkla tercih edilmektedir.

Ultrasonografi (USG)

İyonizan radyasyon kullanmayan bir yöntem olarak, USG'nin gebelerde ve erken çocukluk yaş grubundaki uygulamaları, modern obstetri ve neonatoloji uygulamalarını büyük ölçüde değiştirmiştir. Modern obstetride USG kullanılarak, 5-6. gebelik haftalarından itibaren embriyo ve sonraki dönemde fetüs, yakın anatomik izlemde tutulabilmekte, yaşarla bağdaşmayan yapısal ve bazı kromozomal anomaliler, erkenden teşhis edilip, obstetrik yaklaşım bu bilgilere göre şekillendirilebilmektedir. Son yıllarda teknolojiye eklenen 3 ve 4 boyutlu uygulamalar hem tanısal kolaylık sağlamakta, hem de ailelere daha anlaşılabilir görüntüler sunmaktadır. Ancak, USG ile tüm anomalilerin prenatal olarak saptanabileceğine dair, özellikle halk arasında mevcut yanlış inanış büyük beklentiler ve önemli hukuksal sorunlar yaratabilmektedir. Yapılan geniş kapsamlı çalışmalar, en iyi şartlarda bile %80'lere ulaşan prenatal patoloji saptama oranının, ortalama olarak %60-70'ler arasında olduğunu bilmek gerekmektedir (Nicolaidis et al., 1999; Timor-Tritsch et al., 1988; Goldberg et al., 2004)

Ultras ses dalgalarını kullanan bir alet yardımıyla fetusun incelenmesi ve varsa anomalilerin saptanması esasına dayanmaktadır (Şekil 2.1). Rezolüsyonu iyi, yüksek frekanslı "transducer" lerin geliştirilmesi ve bunların doppler teknolojisi ile donatılarak fetal damarlarda kan akım hızlarının ölçülmesinde kullanılması fetal tıbbı yeni boyutlar kazandırmıştır. Herhangi bir şekilde artmış bir riski olmayan hastalarda, rutin ultrasonografik taramanın optimal zamanı ise 18-20. haftalardır, çünkü bu haftalarda maternal serum tarama sonuçları elde edilmiş, erken gebelik problemleri açığa kavuşmuş, organogenez tamamlanmış, fetal hareketler başlamış ve fetusun neredeyse tamamı ekranda net olarak görülebilmektedir (Flecher et al., 1996; Nicolaidis et al., 1999).

Ultrasonografi, prenatal tanıda doğru gestasyonel yaş, çoğul gebelik, plasenta lokalizasyonu gibi obstetrik endikasyonların yanı sıra nöral tüp defektleri, abdominal/gastrointestinal sistem bozuklukları, iskelet defektleri, toraks patolojileri, renal/genitoüriner sistem anomalileri ve fetal tümörlerin tanısında güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlar (Gülten ve ark., 2005; Hawley et al., 1999).



Şekil 2.1: On üç haftalık fetüse ait ultrason görüntüsü.

Tarama testleri

Genetik bozukluklar; nesiller boyunca aktarılabilen zihinsel ve bedensel özürlere yol açabilen, sosyal ve ekonomik sorunları beraberinde getiren önemli bir hastalık grubudur. Bu hastalıkların tedavisinin mümkün olmaması ve ortaya çıkmasının önlenmesi isteği sonucu prenatal tanı çalışmaları geliştirilmiştir. Bu çalışmalardan biri de gebe kadınlara genelde 16-19 haftalar arasında yapılan ve “üçlü test” olarak adlandırılan tarama testidir. Tarama testleri, spesifik bir anomali için yüksek risk taşıyan küçük bir grup olgunun toplumun büyük bir bölümündeki sıklığını ortaya çıkarmak amacıyla kullanılan testlerdir. Risk hesaplandıktan sonra belli bir sınır (cut-off) kullanılarak yüksek risk ya da düşük risk sınıfları tanımlanmaktadır. Tarama testi pozitif olarak belirlenen grupta gerçekten pozitif olmayan vakalar da bulunabilmektedir. Bu yalancı pozitiflik oranının kabul edilebilir seviyede bulunması önemlidir, çünkü bu gruba giren gebelere invaziv testler (amniyosentez, koryon villus örnekleme) önerilmekte ve bu testler %2.4'den %5.2'ye kadar fetal kayıp, spontan abortus ve intrauterin ölüm riski bulundurmaktadır. Buna karşılık, ileri inceleme önerilen gebe kadınlarda Down Sendromu tespit etme oranı 1/25 ile 1/77 arasında değişmektedir. Testin nöral tüp defektlerini (NTD) belirleme oranı ise çok daha yüksektir. Maternal serum AFP, tarama programları gebelik haftasının belirlenmesi için çoğunlukla USG ile ölçülen biparietal çap (BPD) esas alınarak hesaplanan gebelik yaşını kullanırlar. Rakamsal risk tahmini için anne yaşının getirdiği risk ve diğer bazı faktörler de dikkate alınarak istatistiksel bir değerlendirme yapılması gerekir. Bu değerlendirme paket bilgisayar programı kullanılarak yapılmakta ve rakamsal tahmini risk değerleri belirlenmektedir. Üçlü testteki teşhis oranı maternal serum AFP ölçümü ile %33

iken, buna β -hCG ilave edildiğinde %53'e ve μ E3 ilave edildiğinde ise bu oranın %58'e yükseldiği gösterilmiştir. Irk, coğrafi dağılımlar gibi pek çok değişkenden etkilenebilen bu belirteçlerin düzeyleri birçok rutin biyokimya değerleri gibi bölgelere göre belirlenmelidir. Down sendromunda AFP MoM düzeyinin azaldığı (0.7 MoM), β -hCG serum seviyesinin ise yükseldiği (2.5 MoM), NTD'li fetüste ise AFP MoM düzeyinin yükseldiği tespit edilmiştir (3 MoM) (Akalin ve ark., 2007; Bogart et al., 1987; Cuckle et al., 2007).

Maternal yaş, AFP, β -hCG ve μ E3 gibi biyokimyasal göstergelerin beraber değerlendirilmesiyle yapılan bu tarama testi ile trizomi 21 vakaları yaklaşık olarak %60-65 oranında saptanabilmektedir. Yapılan meta analizlere göre düşük teşhis oranı (%67) ve yalancı pozitiflik oranı (%5) bu testin negatif yönleri olarak saptanmıştır (Gülten ve ark., 2005).

PRENATAL TANIDA TARAMA TESTLERİ

1. İLK TRİMESTER TARAMA TESTLERİ

1. Biyokimyasal testler

a. s-hCG

b. PAPP-A

2. Ultrasonografik tarama (NT ölçümü)

2. İKİNCİ TRİMESTER TARAMA TESTLERİ

1. Biyokimyasal testler

a. Üçlü test: AFP, s-hCG, UE3

b. Maternal serum AFP

2. Sonografik testler

- Anomali tarama ultrasonu (genetik sonogram)

3. İdrarda yapılan tarama testleri (Beta cor hCG, hiperglikoze hCG)

3. DİĞER TARAMA TESTLERİ

a. İnhibin A

b. S-100

c. SP-1

d. Eosinophylic Major Basic Protein (EMBP)

e. Anne kanında fetal hücreler (Toker, 2009)

Anne Kanındaki Fetal Hücre Analizi

Gebelik sırasında, maternal ve fetal dolaşım plasental membran ile ayrılmaktadır. Fakat plasental membran, fetus ile anne arasında çift taraflı hücre trafiğine izin verecek özelliktedir. Çalışmalar, fetal hücrelerin ve serbest fetal nükleik asitlerin annenin dolaşımında bulunduğunu göstermektedir. Gebeliğin erken dönemlerinde fetal hücrelerin analizi için ideal bir yöntemdir. İlk defa 1969 yılında Walkonwska'nın erkek fetüsü taşıyan hamile bir kadının periferik kan kültüründe XY kromozomları olan metafaz plakları gözlenmesiyle başlamıştır. O tarihten bugüne kadar maternal kanda fetal hücre tayini için pek çok çalışma yapılmış, hamile kadınların kanından gebelik ürününe ait özellikle

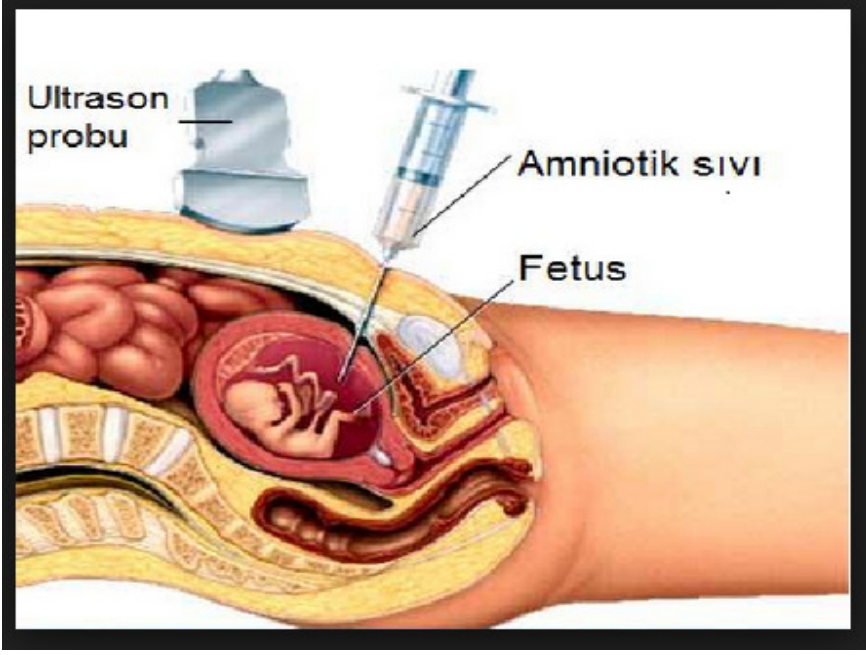
eritroblast ve serbest DNA eldesi ile ilgili çalışmalar prenatal tanıda riski çok aza indirgemiş yeni yöntemler geliştirmek amacıyla yoğun araştırma konusu haline gelmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda gebeliğin 4.-6. haftasından itibaren varlığı kesinleşmiştir (Jackson, 2003; Gülten, 2005). Anneden alınan 20-30 ml kan örneğinden, monoklonal tanecikler ve hücre ayrıştırıcıları yardımıyla 2-20 civarında fetal hücre elde edilebilmekte, bu hücrelerin moleküler sitogenetik (FISH) ve kantitatif PCR analizleri sonucu çeşitli anöploidiler ve tek gen mutasyonları tespit edilebilmektedir (Gülten ve ark., 2005; Sağ, 2009).

2.1.2.2. İNVAZİV PRENATAL TANI TEKNİKLERİ:

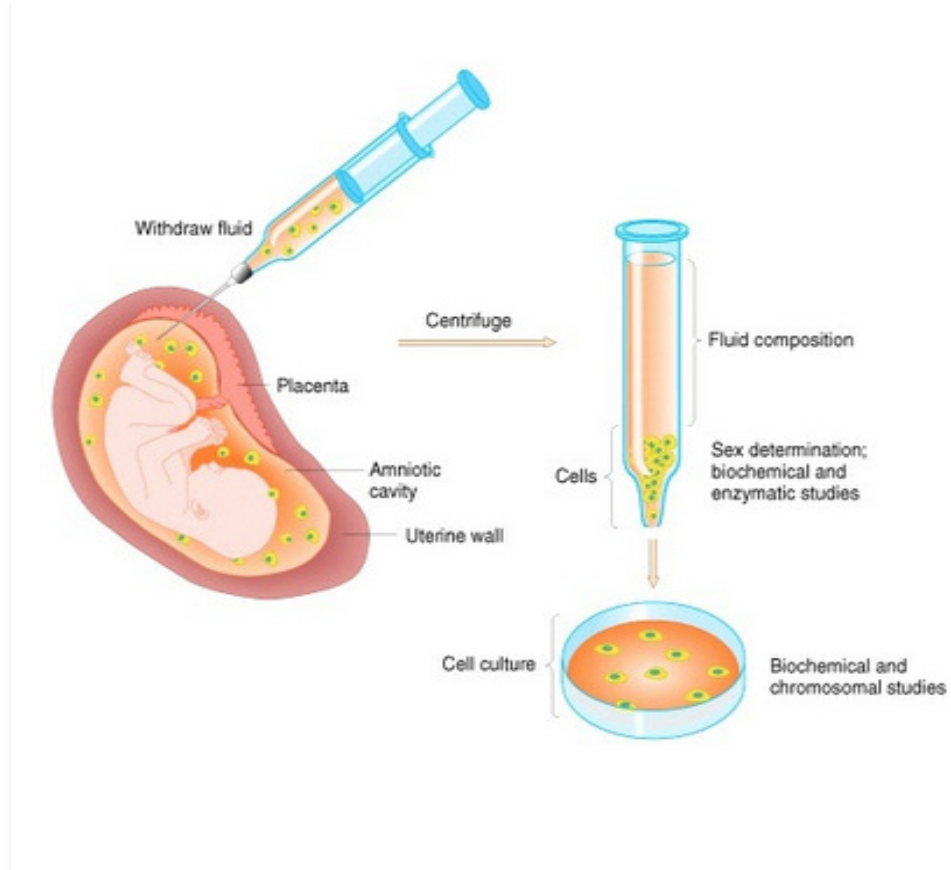
Amniyosentez

İlk uygulamaya giren invaziv prenatal tanı tekniğidir. Ultrason eşliğinde gebenin uterusundan amniyotik sıvı örneğinin iğne yoluyla alınması işlemidir (Şekil 2.2). Amniyotik sıvı, tanısal testlerde kullanılacak fetus kökenli hücreler içermektedir (Şekil 2.3). Amniyosentez genel olarak son adet tarihine göre 15.-16. gebelik haftasında uygulanır ancak bazı merkezlerde 10.-14. gebelik haftalarında erken amniyosentez, 24. gebelik haftasından sonra da geç amniyosentez uygulanabilmektedir. Fakat erken ve geç amniyosentez gerek düşük riski gerekse kültür işleminin başarısı açısından klasik amniyosenteze göre daha fazla risk taşımaktadır (Nussbaum, 2004).

Fetal hücre ve proteinlerden oldukça zengin olan amniyon sıvısı fetal kromozom analizi olmak üzere biyokimyasal (enzim analizleri) ve DNA analizlerinin yapılması için uygundur (Şekil 2.3). FISH yöntemi dışında, kromozomlar direkt olarak süratli bir şekilde analiz edilemez. Gerek kromozom gerekse biyokimyasal analiz yönünde daha güvenli olan 2-3 hafta kültüre edildikten sonra test edilmesidir. DNA analizi gerektiren durumlarda az sayıda hücre olsa bile sonuç daha hızlı olarak alınabilmektedir (Gülten ve ark., 2005).



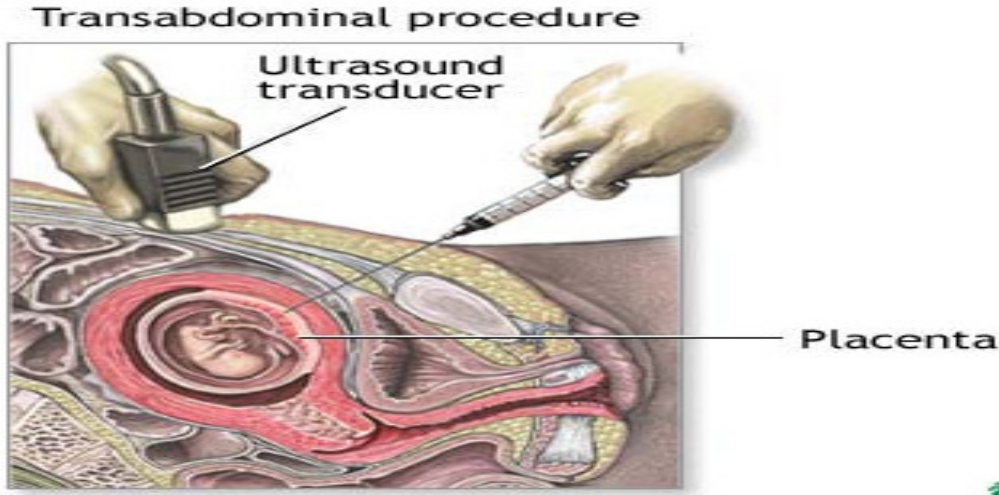
Şekil 2.2: Amniyosentez işlemi



Şekil 2.3: Amniyosentez işlemi: Amniyosentez sıvısında bulunan hücreler biyokimyasal ve kromozomal çalışmalarda kullanılmaktadır

Koryon Villus Örneklemesi (KVÖ):

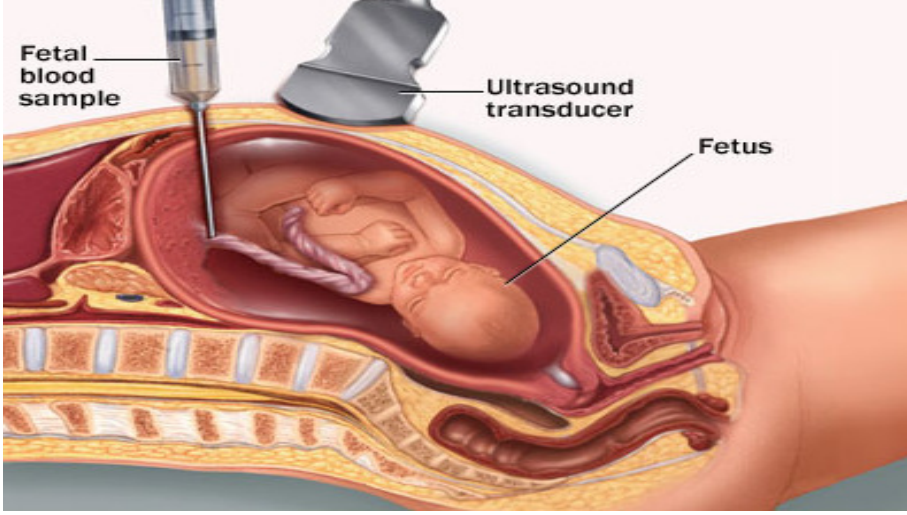
Koryonik villusler plasentanın bir parçası olup, bebekle aynı genetik yapıya sahiptir. KVÖ, plasentadan bir miktar doku alınması işlemidir. İlk olarak ultrason ile bebeğin ve plasentanın pozisyonu kontrol edilmektedir. Sonrasında ince bir iğne yardımıyla karın bölgesindeki deri ve rahim duvarından geçilerek plasentaya girilir ve istenilen doku alınır. Koryonik villuslerin ultrason eşliğinde plasentanın bir parçası olan koryonik villuslardan biyopsi ile örnek alınıp bu dokuyu kullanarak test yapılması işlemi içermektedir. KVÖ yaptıran kadınların %1- 2' si düşük yapma riski ile karşı karşıyadır. Koryon villus örnekleme işlemi 11.-14. gebelik haftaları arasında yapılmaktadır (Şen, 2002; Agarwal et al., 2012).



Şekil 2.4: KVÖ işlemi

Fetal Kan Örnekleme:

Yüksek çözünürlüklü ultrasonun gelişimi sayesinde perkutan göbek kordon kanı örnekleme “kordosentez” yapılabilir hale gelmiştir (Şekil 2.5). 18.-20. Gebelik haftalarında fetal anomali saptandığında uygulanan bu yöntem hızlı kromozom analizi için yararlıdır. Kısa dönem lenfosit kültürleri ile 48-72 saatlerde fetal kromozomlar hakkında bilgi verir (Erçal, 2002). Ayrıca çeşitli genetik geçişli kan hastalıklarının tanısı için de kullanılabilir.



Şekil 2.5: Fetal kan örnekleme

Fetal Deri Biyopsisi ve Fetoskopi

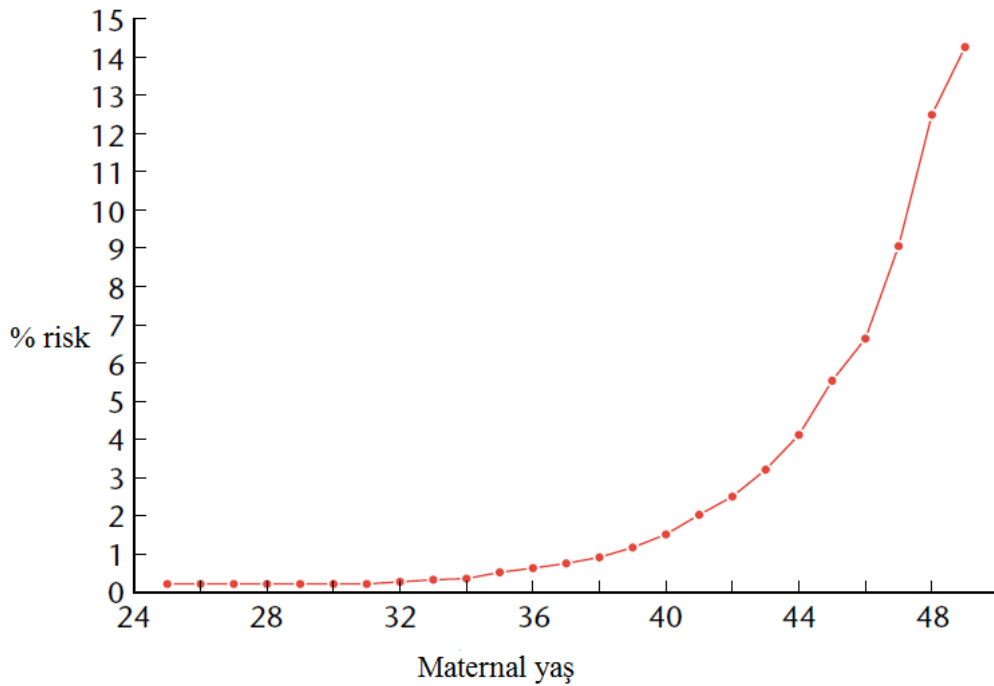
Fetoskopi 20-22. gebelik haftalarında, küçük fiberoptik bir düzenekle amniyotik kaviteye girilerek uygulanır. Bu yöntem, epidermolisis bullosa gibi hastalıklarda fetal deri biyopsisi ve bazı karaciğer patolojilerinde fetal karaciğer biyopsisi için uygulanmaktadır. Non-invaziv prenatal tanı yöntemleri içinde en sık kullanılanları ultrasonografi ve anne kanından yapılan tarama testleridir. Tarama programlarının amacı, fetal sağlık problemlerini doğrudan belirlemek veya riskli gebelikleri tanımlayarak prenatal tanı programlarına sevk etmektir. Ayrıca diğer bir neden de invaziv prenatal tanı yöntemlerinin belli bir komplikasyon hızına sahip olmalarıdır (Vogel et al., 1997; Erçal, 2002).

2.1.3. PRENATAL TANI ENDİKASYONLARI

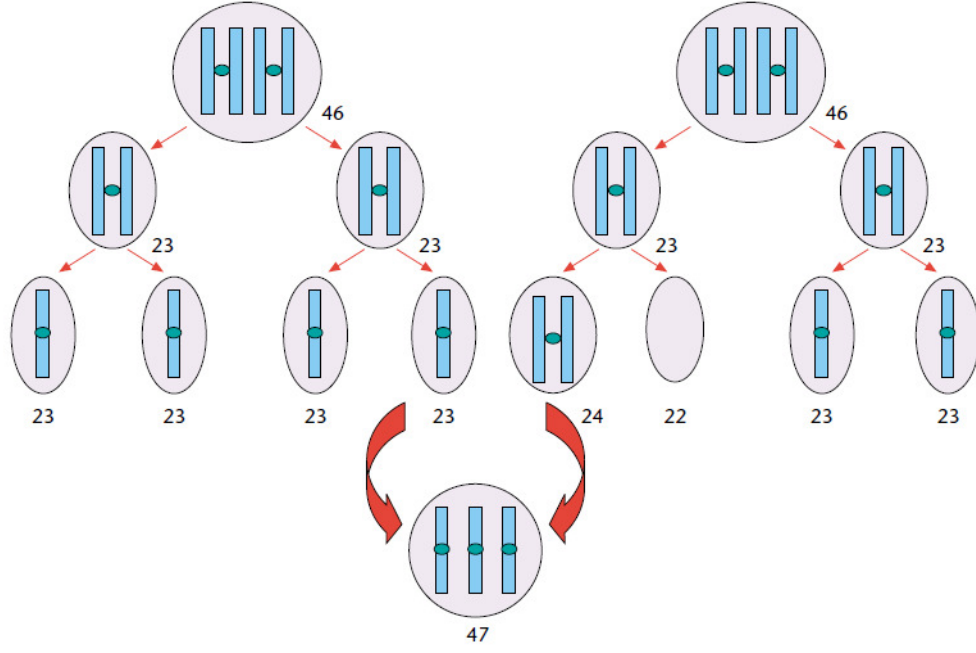
2.1.3.1. İleri anne yaşı:

İleri anne yaşı tanımı, prenatal tanı merkezlerine göre değişkenlik göstermekle birlikte genellikle gebelik anında 35 yaş olarak kabul edilmektedir. Prenatal tanı endikasyonları içerisinde en geniş grubu oluştururlar (Binns et al., 2002; Ferguson et al., 1996). Mayoz sırasında oluşan nondisjunction ihtimalinin 35 yaşın üstündeki annelerde arttığı belirlenmesi ileri anne yaşının, doğum öncesi sitogenetik tanı için geleneksel ve vazgeçilemez bir kriter olmasını sağlamıştır. Amniyosentez sonunda işleme bağlı fetal kayıp ihtimali (1/200) bu yaş grubundaki Down sendromu riskine eşit ya da daha az olması nedeni ile amniyosentez 35 yaşın üzerindeki tüm gebelere uygulanmaktadır (Coşkun, 2008).

Bir kadının hayatı boyunca ürettiği tüm yumurtaları daha doğumdan itibaren ovaryumlarında primitif olarak bulunmaktadır. Yıllar geçtikçe, dolayısıyla bu ilkel yumurtalar yaşlandıkça, bunlara ait kromozomal anormalliklerin oluşması olasılığının arttığına inanılmaktadır. Genel olarak yanlış bir değerlendirme; ilerlemiş anne yaşının sadece Down sendromu için risk faktörü olduğunun düşünülmesidir. Gerçekte Down sendromu karyotipi bu endikasyon ile yapılan amniyosentezlerin yarısındaki risk faktörüdür. Diğer yarısındaki riskler ise trizomi 18, trizomi 13 gibi otozomal ve 47,XXY ve 47,XXX kuruluşları olan seks kromozomal anöplidileridir. Fakat XYY olgularında ileri anne yaşı ile bir ilişki belirlenmemiştir (Coşkun, 2008).



Şekil 2.6: Maternal yaş-kromozomal anomali görülme riski değişim grafiği



Şekil 2.7: Normal mayoz bölünme(solda) ve nondisjunction gözlenen mayoz bölünme (sağda).

2.1.3.2. Habitüel abortus:

Spontan abortus; 20. gestasyon haftasından önce veya fetal ağırlığın 500 gramın altında olduğu durumlarda gebeliğin sonlanması olarak tanımlanmaktadır. Habituel abortus tanımı ise, ardışık 3 veya daha fazla spontan abortus için kullanılmaktadır. Erken spontan abortus materyallerinin %25-60'ında anöploidi gözlenmektedir. Habituel abortusu hikayesi olan gebelerde fetüste saptanan kromozomal anomali oranı %1 olup, bu oran 38 yaşındaki bir kadının kromozomal anomalili bebek doğurma riskine eşdeğerdir. Bu nedenle, herhangi bir sebeple açıklanamayan tekrarlayan düşükleri olan çiftlere gebelik durumunda prenatal tanı yapılması gerekmektedir (Coşkun, 2008).

2.1.3.3. Daha önce kromozom anomalisi olan abortus veya doğum hikayesi:

Kromozom anomalili çocuk sahibi olan çiftlerin kendi kromozom yapıları normal olmasına karşın, bazı durumlarda sonraki çocukta kromozom anomalisi görülmesi ihtimali %10-15'lere çıkmaktadır. Bu gruptaki gebelere anne yaşı bakılmaksızın invaziv prenatal tanı teknikleri uygulanmalıdır (Coşkun, 2008).

2.1.3.4. Tarama testinde yüksek risk:

Düşük riskli gebeliklerde anne serumu taraması veya fetal ultrasonografi ile fetal anomaliler saptandığında, daha ileri genetik değerlendirme ve testler önerilmektedir. Maternal kanda yükselmiş AFP düzeyleri başta nöral tüp defektleri olmak üzere, spontan

intrauterin ölüm, omfalosel, gastroşizis, nefroz, sakrokoksigeal teratom, mesane ekstrofisi, bazı deri defektleri ve Meckel sendromu gibi patolojilere işaret ederken, düşük AFP düzeyleri Down sendromu için bir göstergedir (Gülten ve ark.,2005).

2.1.3.5. Nöral tüp defekti riski:

Nöral tüp defektli kişilerin birinci dereceden akrabaları artmış nöral tüp defektli bebek doğurma riski nedeniyle amniyosentez için adaydır (Nussbaum, 2004).

2.1.3.6. Ebeveynlerden birinde yapısal kromozom anomalisi varlığı:

Bu durumda, çocukta kromozom anomalisi riski, anomalinin tipine ve taşıyıcı ebeveynin kim olduğuna göre değişmektedir. En büyük risk (Down sendromu için %100) ebeveynlerden birinin 21q21q Robertsonyan tipi translokasyon veya izokromozom taşıdığı durumda gerçekleşmektedir (Nussbaum, 2004).

2.1.3.7. Aile hikayesinde biyokimyasal veya DNA analizi ile tanı konulabilen genetik hastalık varlığı:

Bu gruptaki hastalıkların çoğu tek gen hastalıkları olup %25 veya %50 tekrarlama riskine sahiptir. Daha önceden hasta çocuk sahibi çiftler dışında, toplum taramaları ile taşıyıcı olduğu belirlenen çiftler de bu kategoridedirler. DNA analizlerinin mümkün olmasından önce de birçok biyokimyasal bozukluk prenatal olarak tanınabiliyordu, DNA analizi yöntemiyle (mutasyon analiz veya bağlantı analizi) prenatal tanı yapılabilen tek gen hastalıkları bulunmaktadır (Nussbaum, 2004).

2.1.3.8. Özgül bir prenatal tanı testinin olmadığı X'e bağlı hastalık hikayesi:

Başka bir alternatif olmadığı durumda, daha önceden X'e bağlı hastalığı olan erkek çocuk sahibi çiftler, bir sonraki gebeliği sonlandırma kararını vermekte fetal cinsiyet tayininden yararlanabilirler. Duchenne musküler distrofi, hemofili A ve B gibi DNA analiz yöntemi ile prenatal tanısı mümkün olan X'e bağlı hastalıklarda da öncelikle fetal seks tayini yapıp eğer bebek erkekse diğer testlere geçilir. Belirtilen her iki durumda da preimplantasyon genetik tanı, sadece söz konusu hastalıktan etkilenmemiş embriyoların uterusu transferini sağlama için kullanılacak bir yöntem olabilir (Nussbaum, 2004).

2.1.3.9. Anormal Ultrason Bulgusu:

Ultrasonografik incelemelerde saptanan artmış ense deri kalınlığı, ekojenik barsak, kısa femur, piyelektazi, nazal kemik, koroid pleksus kisti, kistik higroma, ekojenik intrakardiak fokus gibi belirteçler, Down sendromu ve diğer anöplidiler ile ilişkilidir.

Down sendromu tanısı için yapılan prenatal tarama testleri, 2. trimester ultrasonografik tarama testlerinden daha değerlidir. Yapısal anomalilerde daha fazla kromozom bozukluğu izlenirken ultrasonografik belirteçler saptandığında amniosentez gereksinimi artmakta bu da abortus oranını az da olsa arttırmaktadır (Taner ve ark., 2009).

Nukal kalınlık (NT), fetal boynun arkasındaki subkutan sıvı toplanmasının ultrasonografik görünümüdür. İlk trimesterde fetal NT terimi sıvı toplanmasının septalı olup olmadığına, boyunda sınırlı olup olmadığına ya da tüm fetüsü kaplayıp kaplamadığına bakılmaksızın kullanılır. Artmış NT kalınlığı patofizyolojisini irdeleyen birçok hipotez mevcuttur ve bu sonografik belirteçle ilgili eşlik eden tüm anomalilerin altında tek bir ortak etyolojinin yatması olası değildir. Fetal NT ölçümü için en uygun gebelik yaşı 11. hafta ile 13. hafta+6 gün arasındadır. Son zamanlarda birçok çalışma fetal NT'nin, fetal anöploidinin çok güçlü bir potansiyel habercisi olduğunu göstermiştir. Dokuz yüz adet trizomi 21'li fetüs içeren 200,000 gebe üzerinde yapılan çalışmalar NT taramasının, trizomi 21 ve diğer majör kromozom anomalili fetüslerin %75'ini ayırt edebildiğini göstermiştir. Fetal kromozom anomalilerinin çok güçlü birer habercisi olma potansiyelleri olan; nukal saydamlık, nazal kemik ve nukal cilt katlantısı kalınlığı gibi başlıca prenatal fetal sonografik belirteçleri olarak kabul edilmektedir (Tamsel ve ark., 2007).

Fetal nazal kemik, ultrasonografiyle gebelik boyunca görüntülenebilmektedir. Son zamanlarda çıkan yayınlar; birinci ve ikinci trimesterlerde nazal kemiğin olmayışı veya hipoplazisinin anöploidi için bir belirteç olduğunu, nazal kemik yokluğunun NT kalınlığıyla bağlantılı olmadığını, ancak trizomi 21 taramasında her iki parametreye birden bakılmasının daha etkili bir tanı yöntemi olacağını savunmaktadır. Bir çok çalışma 11. ila 14. haftalar arasında izlenen nazal kemik yokluğuyla, trizomi 21 ve diğer kromozom anomalileri arasında güçlü bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre nazal kemik yokluğu kromozom anomalisi olmayan normal fetüslerde %1.4 oranında görülürken, trizomi 21 vakalarında bu oran %69'dur. İkinci trimesterde, ultrason taramasıyla tespit edilen nazal kemik hipoplazisi daha fazla Down sendromlu fetüsün ortaya konabilmesine yardımcı olur (Tamsel ve ark., 2007).

2.2. Genetik ve Kromozomal Anomalilerin Prenatal Taranması

Anormal kromozom yapısı perinatal mortalite ve morbiditeye yol açtığı gibi önemli oranda fetal kayıpla sonuçlanan gebeliklere de yol açmaktadır. Kromozom anomalilerin %50'si spontan abortusla, bunların sadece %5'i 28. gebelik haftasından sonra ölü olarak

doğmaktadır. Erken gebelik döneminde daha fazla çeşitte kromozom anomalisi tespit edilebilirken, ilerleyen haftalarda tespit edilen çeşitlilik oranı azalmaktadır. Çünkü etkilenen fetüslerin büyük bir kısmı birinci trimesterin sonuna kadar tutunamamaktadır. Trizomi 21'li fetüsler viabl olmalarına karşın gebelik haftasının ilerlemesiyle fetal kayıp oranı artmaktadır. Gebeliğin 15 ile 20. haftaları arasında yapılan fetal karyotiplemede Down sendromu sıklığı, doğumdaki Down sendromu sıklığından %30 daha fazladır. Gebeliğin 9 ile 14. haftalarında yapılan fetal karyotiplemede Down sendromu sıklığı doğumdaki Down sendromu sıklığından %48-50 daha fazladır. Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde belli başlı olarak trizomi 13, 18, 21, cinsiyet kromozomu anomalileri ve yapısal düzensizlikler görülür. Anöploidinin bebek ve çocuk ölümlerinin %5-7'sinin ve gelişim gecikmelerinin %10'unun nedeni olduğu tahmin edilmektedir. Bu tahminler gelişmiş ülkelerde 1970'li yılların ortalarında toplanmış olan verilerden elde edilmiştir. Down sendromu, uzun dönem morbidite riskiyle ilişkili olan en yaygın kromozom anomalisidir. Canlı doğanların 1.21/1000'inde görülür. Intrauterin ya da doğumdan sonraki ilk beş yılda ölümcül olabilen trizomi 18 (0.15/1000) ve trizomi 13 (0.08/1000) ise daha az sıklıkla görülür. Prenatal tarama programlarının çoğu, Down sendromu tespiti için kullanılmaktadır. Ancak bunun yanında infertilite ile ve bazen geç gelişimle de ilgili olabilen cinsiyet kromozomlarındaki anomalileri de belirler (Coşkun, 2008).

Sonuç olarak geçmiş son 30 yıl içinde prenatal tanı için ana endikasyon fetal kromozom anomalisi riski olmuştur. Bu anomalileri saptamak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. 1960'larda kromozom analizi, 1994 yılında FISH tekniği ile interfazda anöploidi, 1997 yılında kromozoma özgü DNA problemleri ile mikrodelyasyon sendromları ve QF-PCR ile trizomiler ve 2007 yılından bu yana aCGH yöntemleri ile delesyon/duplikasyon ve triplet artışlarını saptamada gelişmeler yaşanmıştır (Yüreğir, 2012).

2.2.1. Prenatal Dönemde Sık Gözlenen Kromozomal Hastalıklar

2.2.1.1. Otozomal Kromozomal Anomalileri

Trizomi 21-Down Sendromu

Otozomal anöploidi sendromlarının en yaygın görüleni olan Down sendromu (DS), klinik olarak ilk kez 1866 yılında J.Langdon Down tarafından tanımlanmış, kromozomal temeli olduğu ise 1959 yılında Lejeune ve arkadaşlarınca rapor edilmiştir. Orta derecede zekâ geriliklerinin en sık rastlanan genetik nedeni olan DS'nun canlı doğumlar arasındaki

sıklığının 1/800 dolaylarında olduğu, sıklığın anne yaşına bağlı olarak arttığı belirtilmektedir. Olguların yaklaşık %95'inde DS, 21. kromozom çiftinin mayotik nondisjunction'dan (kromozom ayrılamaması) kaynaklanan 21. kromozomun trizomisi şeklindedir (regüler tip DS). Trizomiden sorumlu mayotik hata olguların %90'ında maternal mayoz I evresinde oluşmaktadır. %1-2 sıklıkta görülen mozaik tipi postzigotik mitotik hatalarla oluşurken, hastaların %3-4'ünü oluşturan translokasyon tipi de novo ya da ailevi taşıyıcılıklar sonucu ortaya çıkmaktadır. Sitogenetik olarak regüler tip, translokasyon tipi ve mozaik tipi olmak üzere üç ana grupta değerlendirilen bu sendromda, sitogenetik sonuçlar, özellikle tekrarlama riskleri açısından önemli farklar oluşturduğundan genetik danışmada yönlendirici olmaktadır. Regüler tip DS'nun tekrarlama riski, aile böyle bir çocuğa sahip olduktan sonra, genel olarak %1'dir. Otuz yaşından genç anneler için tekrarlama riski % 1.4, daha yaşlı anneler için risk yaşa bağımlı risk ile aynıdır. Anne ve baba normal, çocuk mozaik ise ailenin diğer çocuklarındaki tekrarlama riski %1 kadardır. Yirmi bir numaralı kromozoma ilişkin Robertson tipi translokasyon taşıyıcısı olan annelerin dengesiz translokasyonlu çocuk doğurma riski çok yüksektir. Translokasyon alt tipleri arasında en sık görülen 14/21 translokasyonu bakımından annenin taşıyıcı olması durumunda fetusun DS olma riski %10-15 dolaylarında iken, baba taşıyıcı olduğu zaman bu risk % 1-2 dir. 21/21 translokasyon taşıyıcısı olan ebeveynde dengesiz translokasyon tekrarlama riski %100 dür (Alp, 2007).

Trizomi 18 (Edwards Sendromu)

Trizomi 18 (Edward's Sendromu) sendromu, canlı doğumlar arasında sık görülen kromozomal bir bozukluktur. Farklı çalışmalarda yeni doğanların 3/10000'ünde görüldüğü belirtilmiştir. Kız çocuklar erkek çocuklara göre 3 kez daha sık etkilenir. Olguların %5'inde mozaizm görülür. Mozaik olguların klinik bulguları daha hafif seyreder. Edward sendromlu bebeklerin çoğunun en karakteristik özellikleri intrauterin gelişme geriliği, mikrosefali, mikrognati, düşük kulaklar, ekstremitte anomalileri gibi özelliklerdir. Yapılan incelemelerde bu bebeklerin %90'ından fazlasında kalp anomalileri ve yine önemli bir kısmında böbrek ve sindirim sistemi patolojileri saptanmıştır. Edward sendromu ağır bir klinik seyir gösterir, bebeklerin %80'i doğumdan sonraki ilk haftada, geri kalanların çoğu ilk yılında kaybedilir. Yaşayan olgularda ciddi düzeyde mental retardasyon mevcuttur (Karaman, 2012).

Trizomi 13 (Patau Sendromu)

Trizomi 13, sitogenetik olarak ilk defa Patau ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Klinik fenotipi ise Smith tanımlamıştır. Trizomi 13 yaklaşık olarak 10.000 canlı doğumda bir görülür. Anne yaşındaki artışla birlikte görülme sıklığı artar. Trizomi 13 genel olarak spontan abortusla sonuçlanır. Abortus erken gebelikte olabileceği gibi 20. haftaya kadar gecikebilir ya da erken doğum olabilir. Trizomi 13'lü 200 canlı doğan infantın izlendiği geniş serili bir çalışmada; %28'inin yaşamın ilk haftasında, %44'ünün ilk ayında, %73'ünün ilk 4 ay içerisinde öldükleri bildirilmiştir. Bu bebeklerde en belirgin anormallikler beyine ve yüze ait olanlardır. Holoprozonsefali de beynin ön kısmı ve orta hat yüz yapılarının gelişimi bozulmuştur. En ileri şekli olan siklopide, orta hatta yalnız bir tane göz bulunur. Trizomi 13' de diğer trizomilerde olduğu gibi kalp, sindirim sistemi ve diğer sistemlere ait anormallikler yüksek oranda bulunur. Abdominal malformasyonlardan en sık oranda omfalosel görülür (Reçber, 2005; Balkan, 2008).

2.2.1.2. Cinsiyet Kromozom Anomalileri

Cinsiyet kromozom anomalileri otozomal anomaliler gibi, sayısal ya da yapısal, komplet ya da mozaik formda olabilirler. Ancak otozomal trizomilerin aksine cinsiyet kromozom anomalileri, klinik açıdan göreceli olarak daha hafif bulgular taşırlar ve ender olarak ciddi mental retardasyon gösterirler. Yine otozomlara kıyasla daha az oranda gen taşırlar. Gonadal, genital gelişim ve infertilite ile ilgilidirler. X ve Y kromozom anomalileri göreceli olarak sık görülürler (1/400-1/500). XXY, XXX ve XYY trisomileri post natal yaşam da en sık görülen cinsiyet kromozom anomalileridir ancak abortus da seyrek raporlanırlar. Aksine monozomi X, yeni doğanda daha az sıklık da görülür ancak tekrarlayan düşükler de en sık görülen anomalidir. Moleküler çalışmalar erkek infertilitesinde Yq delesyonlarının da önemli rolü olduğunu belirlemiştir (Oğur, 2011).

Turner Sendromu

Turner sendromu yalnızca kız çocuklarını etkileyen anöploidi şeklindeki bir kromozom düzensizliğidir. Turner sendromu ilk kez 1938'te Henry Turner tarafından göğüs gelişimi, menstruasyon ve genital kıllanma gibi sekonder seks karakterleri yönünden gelişmemiş ve düşük kilolu bir kadında tanımlanmıştır. Daha sonra bu hastalığın, X kromozomunun tamamı ya da bir kısmının kaybolması sonucu ortaya çıktığı anlaşılmıştır. Konsepsiyondaki sıklığı çok yüksek olmasına karşın (1/50–1/200), yaklaşık %95'i intrauterin mortalite ve kayıpla sonuçlanmakta, %5'i ise canlı doğmakta ve

yaşayabilmektedir. Canlı doğan kız bebekler arasındaki Turner sendromunun sıklığı yakalaşık olarak 1/5000 dir. Turner sendromlu bütün olgular arasında 46, XX, i(Xq) genotip sıklığı ise %10'dur. Hastalıktaki semptomlar, X kromozomunun eksilme oranına ve mozaizm durumuna göre çok değişiklik göstermektedir. Kardinal bulgular şöyle sıralanabilir: kısa boy (genellikle 150 cm'den kısa), disgenetik gonadlar (streak gonad), seksüel immaturite, primer amenore, yele boyun, kalkan göğüs, meme uçlarının normale göre daha açık aralıklı olması; kubitüs valgus (kolların taşıma açısının artması), kardiyovasküler ya da renal anomaliler ve diğer somatik anomaliler. Klasik turner [45,X] ve mozaik Turner'lerin [45,X/ 46,XX gibi] yanında yapısal düzensizlik gösteren [46,X,i(Xq), 46,X,r(Xq), 46,X,del(Xp), 46,X, t(X;Y)] ve daha az sıklıkla gözlenen kromozom kuruluşları da bu sendromda klinik olarak önemlidir. Xp delesyonlu hastalarda kısa boy ve doğumsal anomaliler izlenirken, Xq delesyonlu hastalarda sadece gonadal disfonksiyonu gözlenir. Buna karşın izokromozom Xq'lu [i(Xq) karyotipli] hastalar ise klinik olarak klasik 45,X karyotipli hastalara benzemektedir (Balkan, 2005) .

Klinefelter Sendromu

Klinefelter sendromunun Turner sendromunun aksine yeni doğan dönemin de tanınması güçtür. Ender olarak kriptorşidi nedeni ile kromozom analizi sonucu saptanabilirler. Puberte ve sonrasında klasik bulgular belirir. Ana sorun infertilitedir; primer testiküler yetersizlik nedeni ile testesteron yetersizdir; hastalar azospermikdir. FSH ve LH yüksektir ve hipergonadotropik hipogonadizm mevcuttur. İnfertil erkeklerde %3, oligo-azospermide %5-10 oranında 47,XXY yapısı saptanır. İlk tanımlanan cinsiyet kromozom anomalisidir ve en sık görülendir. 1/1000 erkek yeni doğan sıklığında görülür. 47,XXY yapısı olan erkek hastalarda ekstra X kromozomu paternal ya da maternal kaynaklı olabilir. Maternal kaynaklı olanlar da anne yaşının etkisi kabul edilmektedir. Fetal yaşamda özgün bir bulgusu yoktur ve etkilenmiş fetuslar terme dek yaşar. Postnatal dönemde, Klinefelter sendromu, hipogonadizm ve azosperminin en sık nedenidir. Testisler ufaktır ve sekonder seks karakterleri gelişmemiştir. Hastaların çoğu infertildir. Normal bir cinsel yaşama sahip olabilirler ancak libido azalmıştır. Hastalar uzun boyludur, %30'un da jinekomasti görülür. Bu nedenle hastalar meme kanseri açısından da yaklaşık x20 artmış riske sahiptirler. Seyrek sakal ve bıyık, dişi tipte pubik kıllanma ve dişi tarz da uzun bacak boyu (önikoid yapı) görülür. Osteoporoz, otoimmün hastalıklara yatkınlık, genel topluma göre kardiyovasküler hastalıklar da 6 kat artmış risk, ender olarak hafif mental retardasyon

ve öğrenme güçlüğü görülebilir. Hastalar arasın da klinik farklılıklar olmasına karşın, konuşma ve okuma güçlüğü ve sosyal uyumda zorluk pek çok Klinefelter hastası için geçerli sorunlardır. Olguların yaklaşık %15'i mozaik forma sahip tir (46,XY/47,XXY). Mozaik formlarda klinik değişkendir ve ender olarak fertil olabilirler. 48,XXYY, 48,XXXXY, 49,XXXXXY varyantları görülebilir. Klinik olarak Klinefelterden oldukça farklı bir spektrum çizerler. Ağır mental retardasyon, dismorfizm ve seksüel gelişim bozuklukları görülür (Oğur, 2011).

2.3. KROMOZOM İNCELEME YÖNTEMLERİ

Kalıtsal bilgiyi taşıyan DNA molekülü ökaryotlar da nukleusta bulunmaktadır. Hücre interfaz aşamasında iken bu materyal, histon ve histon olmayan proteinlerle kromatin yapıyı oluşturur. Hücre bölünürken kromatin yapı kısalıp kalınlaşarak kromozomları meydana getirir. Kromozomlar metafaz safhasında incelemeye uygun hale gelirler (Branch, 1997).

Karyotipleme; kromozomların yapısal olarak incelenmesi, anomalilerinin belirlenebilmesi için yapılan işleme karyotipleme denir. Kromozomların yapısını fonksiyonlarını, davranışlarını ve patolojilerini inceleyen bilim dalı sitogenetiktir. Geniş bir uygulama alanı bulunsa da sitogenetik analizinin gerektiren koşullar olmalıdır. Karyotipleme, tanı ve takibinde belirleyici kromozom anomalilerinin görüldüğü kanserler, özellikle hematolojik kanserlerin belirlenmesi için uygulanmaktadır (Marilyn, 2006; Branch, 1997).

Nukleusu olan ve bölünebilme yeteneğini kaybetmemiş tüm dokulardan kromozom elde edilebilir. Kromozom analizi için en çok kullanılan dokular; perifer kanı, deri, kemik iliği, amniyositler ve koryon villus dokusudur. Metafaz kromozomlarının eldesi için temel olarak iki yöntem kullanılır;

1- Direkt yöntem: Kemik iliği, lenf nodülü, testis, koryon villus gibi kendiliğinden bölünen hücreye sahip olan dokulara uygulanır.

2- Kültür yöntemi: Çalışılacak materyaldeki hücreler spontan olarak bölünmüyorsa, kültür yapılması gerekmektedir. Perifer kan lenfositleri, amniyositler, deri fibroblastları, gonad dokularına uygulanmaktadır. Bu amaçla protein, vitamin, hormon ve minerallerle zenginleştirilmiş besi ortamları (medyum) kullanılır. Kullanılacak materyal besi ortamı seçiminde ve kültür süresinde etkilidir. Kısa süreli (örneğin perifer kan lenfosit

kültürü için 72 saatlik) veya uzun süreli(örneğin; amniyosit kültürleri birkaç hafta veya solid tümör örnekleri birkaç ay) olmak üzere sınıflandırılmıştır (Moorhead, 1960).

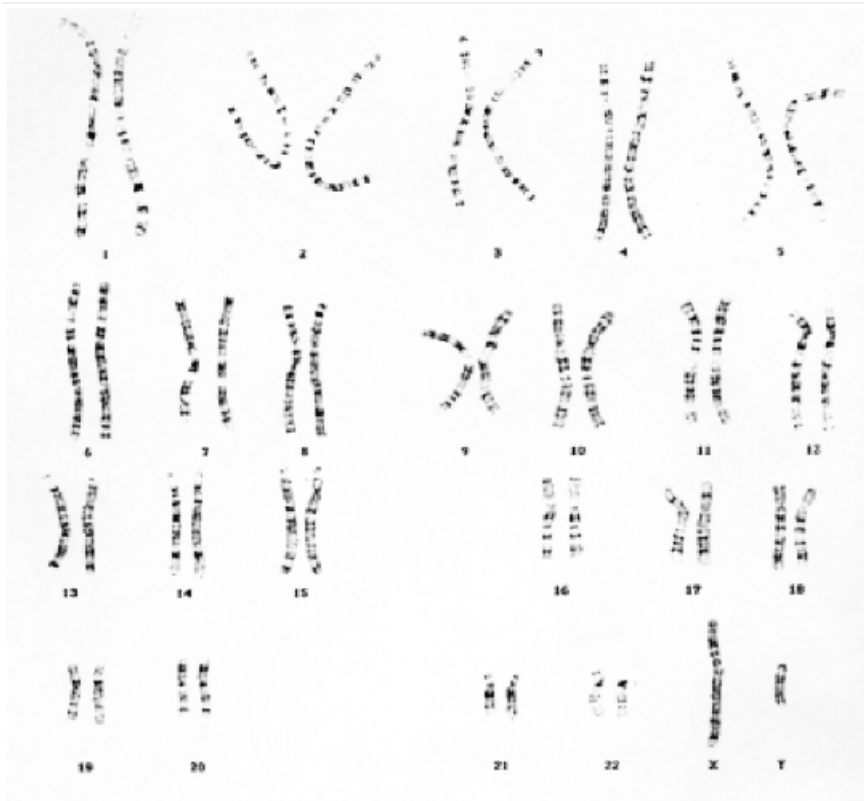
Postnatal kromozom anomalilerini tespit etmek için kullanılan perifer kan çalışmalarında, öncelikle heparinli steril enjektör veya vakumlu tüpler içine örnek alınır. Örnekler taşıma ve bekleme süresinde kesinlikle dondurulmamalı, oda ısısında veya +4°C'de tutulmalıdır. Kültür ortamında, mikroorganizmaların çoğalmasını önlemek için Penisilin/Streptomisin gibi antibiyotikler ve nistatin vb fungusitler bulunmalıdır(Branch, 1997).

Spontan olarak bölünmeyen bazı hücreleri (örneğin olgun lenfositleri) bölünmeye teşvik etmek için ortama mitojen ajan koymak gerekir. Bu amaçla PHA (phytohemaglutinin) ilave edilir. Perifer kanı lenfositleri için kültür süresi 72 saat, kemik iliğinden elde edilen lenfositler için 24 saattir. Kültürler 37°C'de inkübe edilir ve kültür süresi örnek çeşidine göre değişir. Direk yöntem ve kültür yöntemiyle çalışılan örneklerden, metafazları saptamak için çıkış işlemlerinin yapılması gerekir. Burada ilk adım hücre bölünmesinin metafaz aşamasında hücrelerin durdurulmasıdır. En sık kullanılan mitoz durdurucusu kolşisindir ve etkisini iki yavru hücreye ayrılan kardeş kromatidlerin zıt kutuplara çekilmesini sağlayan iğ iplikçiklerinin oluşumunu engelleyerek gösterir. Sonuç olarak kromozomların kutuplara çekilmesi önlenerek metafaz plağında birikmeleri sağlanır. Çıkış işlemlerinde ikinci temel basamak hücre hacmini arttırmak için hipotonik solüsyon uygulanmasıdır. Hipotonik solüsyonlar sitoplazmik membrana karşı bir konsantrasyon gradienti oluşturur ve aktif transportla su hücre içine girer, hücreler şişer ve kromozomlar yayılacak alan bulurlar. Bu amaçla hipotonik 0,075M KCl solüsyonu kullanılır. Kromozom elde etme yönteminde üçüncü temel basamak hücrelerin fiksasyonudur. Fiksatif olarak 3:1 oranında metanol:asetik asit solüsyonu kullanılır. Fiksasyon uygulanması hipotonik solüsyonun etkisini durdurur, şişen hücreler sabitlenir ve ayrıca eritrositleri parçalar. Çıkış işlemlerinin son basamağı lam üzerine damlatılarak yayma yapılmasıdır. Daha sonra boyama ve bantlama işlemleri gerçekleştirilerek mikroskopta incelenir (Moorhead, 1960).

Kromozom inceleme yöntemleri; sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemleri içermektedir.

2.3.1. Sitogenetik yöntemler

Kromozomlarda meydana gelen yapısal ve sayısal anomalileri tespit etmek için her kromozomu tanımlamak amacıyla çok sayıda kromozom bantlama yöntemi geliştirilmiştir. Rutin incelemelerde genelde 450-550 band düzeyindeki metafazlar kullanılmaktadır. Band rezolüsyonu, X kromozomunu içeren bir haploid sette görülen açık ve koyu renk bölgelerin toplam sayısını ifade etmektedir. Band düzeyleri, küçük kromozom parçalarının kayıp ve artışlarının saptanmasında yeterli olmayabilir. Bu durumda daha yüksek band seviyelerinde (550-850) inceleme yapılması gerekmektedir. Genel olarak G bantlama yöntemiyle inceleme yapılır, amaca yönelik olarak Q, R, C, HRB gibi yöntemler de kullanılmaktadır (Moorhead, 1960; Branch, 1997).



Şekil 2.8:46,XY karyotipli bir G-bantlı metafaz görünütüsü



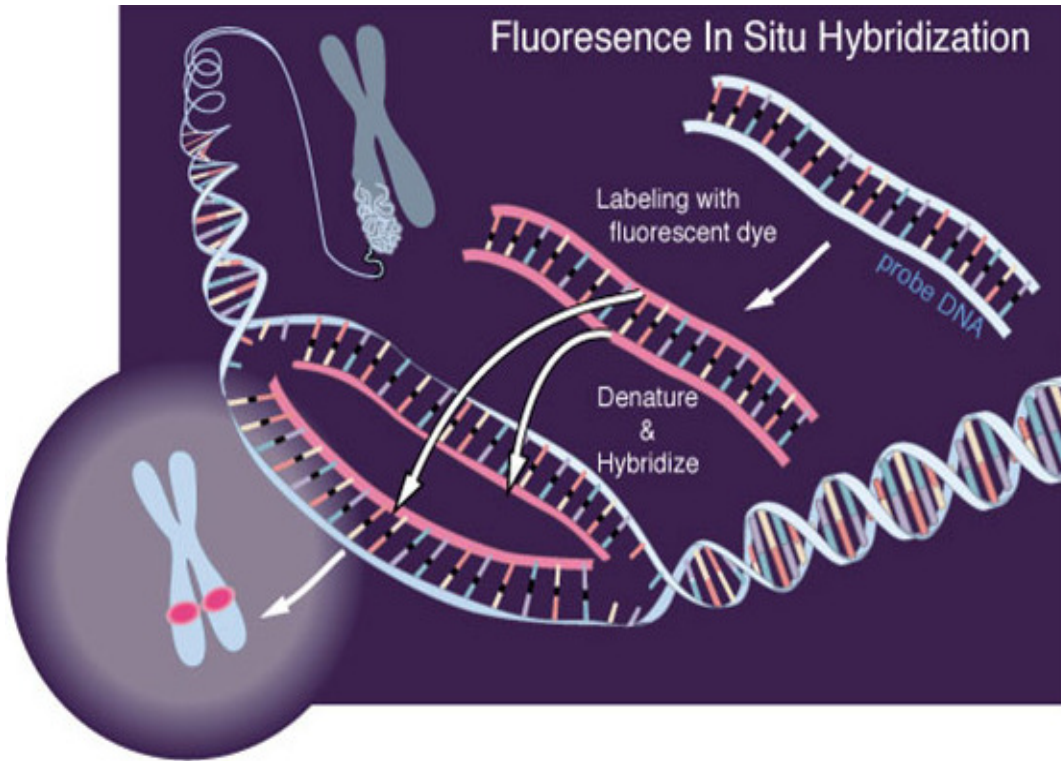
Şekil 2.9: Trizomi 21 bulgusu bulunan bir G-bantlı metafaz görünütüsü

2.3.2. Moleküler Sitogenetik Yöntemler

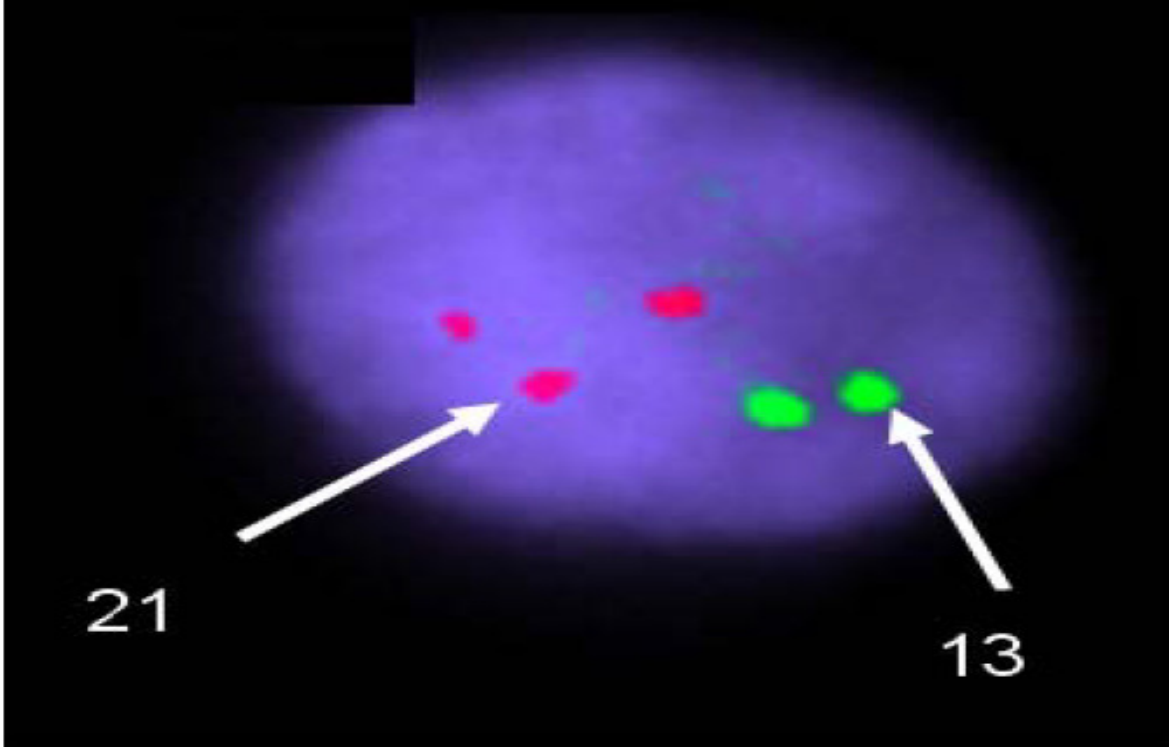
FISH

Klasik yöntemlerle uygulanmakta olan fetal karyotip elde etme süresi 10-17 gün arasında sürmektedir. Bu bekleme süresi içinde aile, önce amniyosentez işlemi sırasında bir stres yaşamakta buna ek olarak bekleme süreci boyunca stresi artmaktadır. Son yıllarda bu süreyi kısaltmak için yoğun çabalar vardır. Bunlardan birisi de gelişmiş ülke laboratuvarlarında klasik yöntemin yanı sıra, anöploidi taraması için rutin olarak uygulanmakta olan FISH ile kültür yapılmamış amniyon hücrelerinde anöploidi aranması yöntemidir. FISH yönteminde klasik sitogenetik yöntemde görülen kromozomların yerine, genetik materyal olarak hücre içinde bulunan yoğunlaşmamış kromatin yapısı kullanılmaktadır. Prenatal tanı anöploidi taraması sırasında 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarına ait anöploidiler sık rastlanıldığı için bu kromozomları yansıtan problr daha sık kullanılır. Genelde bu kromozomların dışında olan anöploidiler, gebeliğin erken haftalarında kaybedilmektedir. Bu nedenle 14-17' inci haftalara ulasan bir hamilelikte diğer kromozom anöploidilerini pek görmüyoruz. Prenatal tanıda FISH yönteminin kullanılma sebebi, amniosentezden karyotipleme işleminde kullanılan klasik yöntemdeki sürenin daha kısa hale getirilmek istenmesidir ve bu şekilde sık rastlanılan anöploidilere oldukça güvenilir bir şekilde tanı konulmaktadır. Rapid FISH'in prenatal tanıda sadece

sayısal anomalileri göstermesi, yöntemin bir kısıtlılığı olarak bilinmektedir. Bu nedenle diğer kromozom anomalilerini elimine etmek için bu olgularda klasik karyotipleme de yapılmaktadır. Ayrıca FISH çalışmalarında maternal kontaminasyon üzerinde durulması gereken bir durumdur. Yöntem, kendi içindeki sınırlılıklarına rağmen güvenilirliği kanıtlanmış bir ön tarama ve tanı yöntemidir. FISH ile sonuca ulaşma süresi 24 saat sürmekte ve çabuk verilen ön-sonuç aileyi oldukça rahatlatmaktadır (Çankaya, 2006). FISH yönteminin temel basamakları Şekil 2.10 da gösterilmiştir.



Şekil 2.10: FISH yönteminin basamakları



Şekil 2.11:Trizomi 21’li bir vakanın FISH görüntüsü:13. kromozoma (yeşil) ve 21. kromozoma (kırmızı) özgü LSI problemleriyle yapılan hibritlenmiş amniyosit hücrenin interfaz çekirdeği görünümü (21. kromozoma ait 3 adet kırmızı sinyal ve 13. kromozoma ait 2 adet yeşil sinyal).

2.3.3. Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) Yöntemi,

DNA kopya değişimlerini tüm genom seviyesinde, tarama imkanı sağlayan ilk etkili yöntemdir. CGH tekniği, örnek ve referans total DNAsı izole edilip, farklı renklerde işaretlenip metafaz kromozomlarıyla hibritlenme esasına dayanmaktadır (Park, 2011).

Sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerin dayandığı teknolojiden kaynaklanan bazı sınırlamaları ortadan kaldıracak bir moleküler genetik/sitogenetik yöntem olarak “karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ortaya çıkmıştır. CGH yöntemi, hem klasik sitogenetik yönteminin sahip olduğu tüm kromozomları bir arada inceleyebilme, başka bir deyişle tüm genom perspektifinde analiz özelliğini daha detaylı bilgi sahibi olunacak şekilde geliştirmekte, hem de FISH yönteminin kullandığı floresans işaretleme ile FISH kadar detaylı olmamakla birlikte anomali saptanan kromozom bölgesinin yeri hakkında daha net bilgi verebilmektedir (Eker, 2010).

CGH tekniği; temeli FISH’e dayanan, farklı floresan boya ile boyanmış test (hasta) ve referans DNA örneklerinin normal kromozomlara bağlanması ile elde edilen floresan renk farklılıklarını gösteren bir sitogenetik yöntemdir. Yöntem ile hasta DNA’ sında kromozomal kayıp (loss) veya belli bir bölgenin amplifikasyonu (gain) gösterilir (Rickman, 2005; Park, 2011).

CGH yönteminde, araştırılan örneğe ait DNA (test DNA) ile normal olduğu bilinen bir DNA örneği (referans DNA) farklı renklerde florokromlarla işaretlenerek yine normal olduğu bilinen insan kromozomları (metafaz plakları) üzerine birlikte hibridize edilmektedir. 72 saat süren hibridizasyon süresini takiben floresan mikroskop ile önce metafaz plakları bir görüntü analiz sistemi yardımıyla kaydedilmekte, sonra bu metafaz plaklarındaki kromozomlar özel bir CGH yazılımı aracılığıyla sıraya dizilmektedir. Her bir kromozom üzerindeki, olması gereken karışım renkten florokromlardan birisi lehine sapmalar aynı yazılım tarafından değerlendirilerek o kromozom bölgesine ait test DNA sındaki kopya sayısı artışı (amplifikasyon) ya da eksilmesini (delesyon) göstermektedir (Breman, 2009; Rickman, 2005)

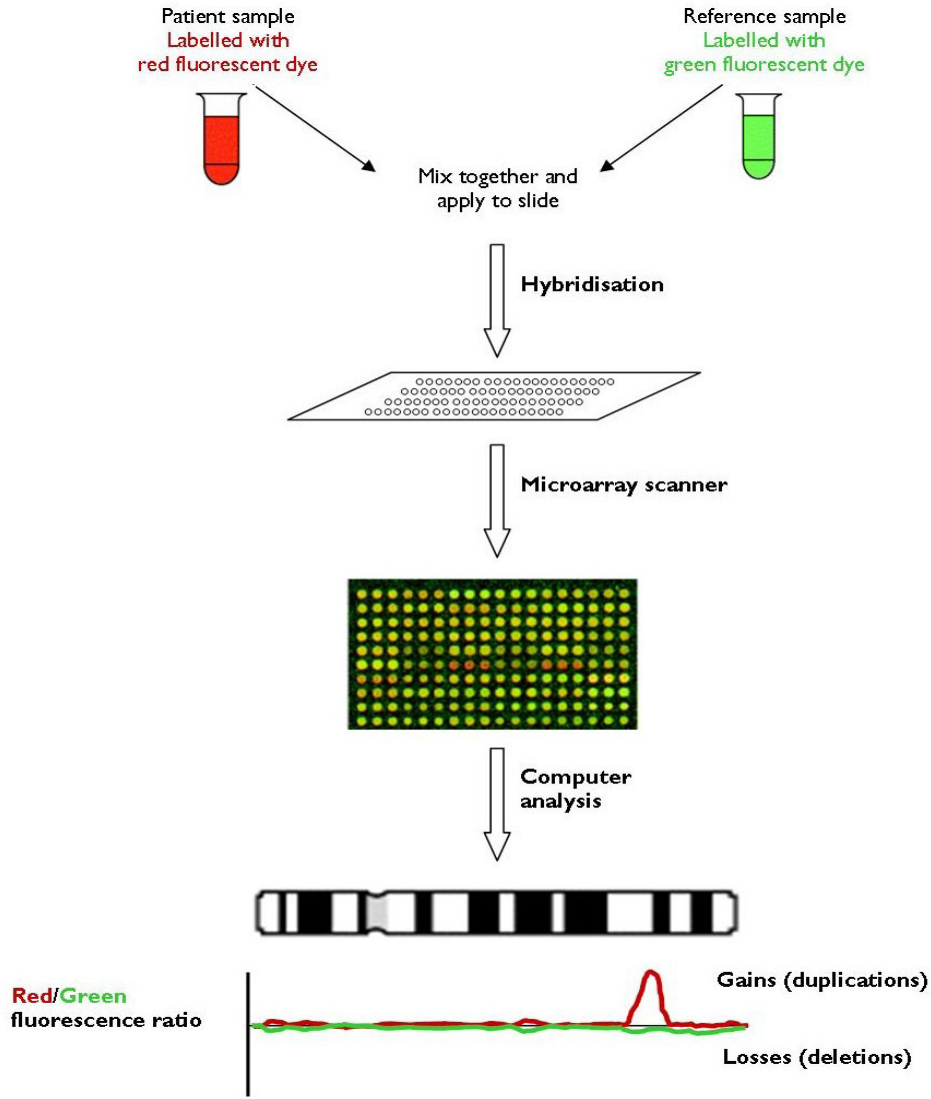
Aynı sonucun değerlendirilen diğer metafaz plaklarında da gözlenmesi bulgunun doğruluk değerini yükseltmektedir. Ancak klasik CGH yöntemi zorluğu ve değerlendirme kriterlerinin güçlüğü nedeniyle pratik uygulamada yaygınlaşmamıştır. Her iki yöntem de tüm genom perspektifinde inceleme olanağı sağlamaktadır (Eker, 2010).

Her iki yöntemde de test ve referans DNA lar farklı renklerde florokromlarla işaretlenmektedir. CGH yönteminde hibridizasyon normal insan metafaz plakları üzerine yapılırken, mikroarray CGH yönteminde bu işlem özel olarak tasarlanmış ve arzu edilen DNA parçaları arzu edilen sayılarda spot edilmiş array'ler üzerine yapılmaktadır (Eker, 2010). CGH yönteminde hibridizasyon süresi 72 saat iken mikroarray CGH yönteminde 16 saattir. CGH yönteminin analizinde bir floresan mikroskop ve gerekli filtrelelere, bir kamera ve görüntü analiz sistemine ve CGH analiz yazılımına gereksinim vardır. MikroArray CGH için yalnızca bir mikroarray tarayıcıya ve mikroarray analiz yazılımına ihtiyaç vardır(Eker, 2010). CGH yöntemini doğru analiz edebilmek için özel eğitilmiş personele, metafaz plaklarından kromozomları doğru olarak dizmeye, pek çok metafaz plağını ayrı ayrı değerlendirip sonra tüm sonuçları karşılaştırmaya yani saatler süren bir analiz süresine gerek vardır. mikroarray CGH yönteminin değerlendirilmesi tam otomatik olarak yapıldığından özel eğitime ihtiyaç göstermediği gibi analiz süresi dakikalarla sınırlıdır (Wiess, 1999).

Array CGH Yöntemi

CGH yöntemi, zorluğu ve değerlendirme kriterlerinin güçlüğü nedeniyle pratik uygulamada yaygınlaşmamıştır. Günümüzde hem daha hızlı sonuç alınabilen, hem de analiz aşamasının tam otomatik olarak gerçekleştirilebildiği mikroarray CGH yöntemi araştırmacıların çalışmalarını yoğunlaştırdıkları bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır.

Delesyon ve duplikasyon gibi kromozom anomalileri, normal gen dozajındaki dengesizlikten dolayı spesifik ve kompleks fenotiplerle sonuçlanır. Rutin kromozom bantlaması 5-10 Mb'dan küçük kromozomal değişimleri belirlemede yeteri kadar hassas değildir. CGH, test örneği ile kontrolü DNA içerik farklılıklarına göre karşılaştırarak tüm genomu taramak için geliştirilmiştir (Rickman, 2006). Son zamanlarda, hibridizasyon için hedef olarak boyutu büyük DNA parçalı genomik klonları (Bakteriyal yapay kromozomları / P1 yapay kromozomları) (BACs/PACs) ya da daha küçük PCR ürünlerini içeren DNA mikroarrayleri geliştirilmiştir. Array-temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (array CGH), kromozomal dengesizliklerin yüksek çözünürlükte belirlenmesine olanak tanıyan güçlü bir yeni teknolojidir. Farklı işaretlenmiş test ve kontrol DNA'larının genomik klonları içeren bir mikroarray üzerine birlikte hibridize edildiği bir yöntemdir (Jeuken, 2002)



Şekil 2.12: Array CGH yönteminin aşamaları

2.3.3.1. Array CGH Yönteminin Klinik Genetikte Kullanımı

1960’larda kromozom bantlama metodlarının geliştirilmesinden bu yana 30 yıldır prenatal tanıda konvansiyonel kromozom analizi altın standart konumundadır. Bu tip sitogenetik analizin kromozom kopya değişikliklerini (anöploidi), dengeli ve dengesiz translokasyonlar, inversiyonları, marker kromozomları, mikroskobik olarak gözlenebilen büyük delesyon ve duplikasyonları tespit etme kapasitesi bulunmaktadır, ancak daha küçük kromozom anomalileri (5-6Mb dan küçük) tespit edilememektedir. Bu kısıtlama en çok normal kan kromozom bantlama karakteristiğinden farklı olan prenatal kromozom vakalarında önem kazanmaktadır (Bremar, 2009; Fiorentino, 2011). Günümüzde artık biliniyor ki pek çok konjenital dismorfizmlerin, gelişim geriliğinin ve diğer genetik

hasarların temelinde submikroskopik delesyon ve duplikasyonlar yatmaktadır. Sendromik ve nonsendromik mental retardasyonlara sahip hastaların %20 sinde submikroskopik sayı değişiklikleri tespit edilmiştir. Bu sebeplerle genetik hastalıkları tanımlamada yüksek rezolüsyonlu tekniklerin geliştirilmesi elzem olmuştur. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizi yaygın anöploidileri hızlıca tespit etmek ve sitogenetik analizlerin çözünürlüğünü artırmak amacıyla geliştirilmiştir. Ancak FISH tekniğinde gerekli olan çalışılan bölgenin dizisinin bilinmesidir (Breman, 2009).

Son yıllarda, konvansiyonel sitogenetik testler array temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yönteminin geliştirilmesi ile (array CGH-array-based comparative genomic hybridization) daha da genişlemiştir. Bu teknikte mikroskopik ve submikroskopik kromozomal dengesizlikler genom çapta boyutta analiz edilebilmektedir. Mikrodelesyonlar, mikroduplikasyonlar ve tüm anöploidileri 100kb dan daha küçük çözünürlükte tespit edebilen test yöntemidir. Konvansiyonel ve FISH analizlerinde bulunan tüm kısıtlamaların üstesinden gelen bir tekniktir. Prenatal ve postnatal tanıda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Breman, 2009; Breman, 2012).

Konvansiyonel kromozomal analiz ile karşılaştırıldığında array-CGH tekniğinin çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Direkt fetal ve kan örneklerinde çalışılabilir bu sayede hücre kültür tekniklerini elimine eder ve sonuç alma süresini kısaltmaktadır. Ayrıca bu teknik daha hassastır ve otomatize bir yöntem olduğundan kromozom analizine kıyasla daha az emek harcanmaktadır. Array-CGH analizinin belki de en önemli avantajı genomik kopya sayısı değişikliklerini standart kromozom analizinden çok daha iyi çözünürlükte tespit edebilmesidir (Fiorentino, 2011, Hillman, 2011). Pek çok yeni sendromların tespit edilmesine aracılık edebilmektedir ve kopya sayısı değişikliklerinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Array-CGH prenatal tanıda kopya sayısı değişikliklerinin tespit edilmesi amaçlı valide edilmiştir (Breman, 2009; Bui, 2011).

3. GEREÇ-YÖNTEM

3.1. Yöntem

Çalışmada, 2011-2012 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik laboratuvarına rutin tanı amaçlı yönlendirilen, prenatal tanı endikasyonuna sahip 141 adet amniyosentez örneğine yapılan kromozom analizi ve BAC tabanlı array CGH analizi bilgileri retrospektif olarak değerlendirildi.

Tüm gebeler ve eşler kromozom analizi işleminin kapsamı ve genetik tanı hakkında bilgilendirilerek yazılı onam formu imzalatıldı. Aileye ait gebelik haftası, anne yaşı, ultrason bulgusu ve obstetrik öykü sorularak anamnez alındı.

Amniyosentez örnekleri uygun gebelik haftalarında 15-24 ml olacak şekilde iki ayrı enjektörde teslim alındı. Olası maternal kontaminasyon azaltmak için 2ml'lik ayrı çekilen enjektör kullanıldı. Teslim alınan materyale, kromozom analizi için hücre kültürü, BAC tabanlı array CGH işlemi için DNA izolasyonu yapıldı.

Kromozom analizi işlemi için öncelikle amniyosentez materyali 12-15 gün uygun besiyerlerinde hücre kültürüne tabi tutulmuştur. Hücre kültürünün ardından pellet elde edilip preperasyon, bantlama işlemlerinden sonra hasta başına en az 20 metafaz incelendi.

DNA izolasyonu için MagNA Pure Compact Nukleik Asit İzolasyon Kiti I(Roche Diagnostic GmbH Germany) kullanıldı. DNA kantitesi ise spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) kullanılarak tayin edildi. Yüksek Çıktılı BAC tabanlı moleküler FISH analizi platformu olarak CytoChip (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) slaytı kullanıldı. Yeterli kalite ve kantiteye sahip hasta DNA'sı ve referans DNA (Human Genomic DNA: Male/Female; Promega Corporation, Madison, USA) CytoChip protokolüne uygun olarak lekelenildi. Lekelenen hasta DNA'sı ile referans DNA birleştirildi ve protokole uygun olarak CytoChip Focus High Throughput FISH analysis (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) formatındaki slaytlar ile 47°C'lik su banyosunda (GFLR, 1003, Germany) 16-21 saat hibridizasyona bırakıldı. Hibridizasyon süresi sonunda CytoChip protokolüne uygun olarak yıkanan slaytlar, Agilent Mikroarray G2505B tarayıcı (Agilent Microarray Scanner; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) ile tarandı. Görüntü yoğunluğu verileri kaydedildi ve BlueGnome'un BlueFuse Multi v2.0 (BlueGnome Limited, Cambridge, UK) analiz programı kullanılarak analiz edildi. Analiz sonrası elde edilen görüntü ve gen listesi kaydedildi. kantitesi spektrofotometre (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) kullanılarak tayin edildi.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulu tarafından değerlendirildi ve onaylandı.

3.1.1. Amniyosentez Materyalinden DNA İzolasyonu

Toplanan örneklerden, MagNA Pure Compact Instrument cihazı kullanılarak magnetik yöntem ile DNA elde edildi. Çalışmada DNA eldesi için MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kit I (Roche. Diagnostics GmbH, Germany) kullanıldı. İzolasyon kitinin kartuşu cihazın yuvasına yerleştirildikten sonra hastanın 500 µl örneği 2 ml'lik ependorf tüpe konularak cihazda ilgili yerlere yerleştirildi. Son olarak DNA toplanacak (elution) tüpler cihaza yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılarak 25 dakika içinde 100 µL izole edilmiş DNA elde edildi. 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanslar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000) kullanılarak ölçüldü. A260/A280 oranı 1,7 ile 2,0 arasında olan DNA'lar çalışmaya alındı.

3.1.2. DNA Kantite Tayini

DNA kantitesi NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) cihazında DNA için DNA-50, opsiyonu kullanılarak yapıldı. DNA'ların 260/280 oranlarının 1,8-2,0 arası; 260/230 oranlarının ise 2,0 ve üzeri olmasına dikkat edildi.



Şekil 3.1. NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)

3.1.3. Yüksek Çıktılı BAC Tabanlı Moleküler FISH Analizi Metodu

3.1.3.1. DNA Lekeleme

1. 0,2 ml'lik PCR tüplerine DNA miktarı 50 µl de 400 ng olacak şekilde nükleaz içermeyen su ve genomik DNA konuldu. DNA ve nükleaz içermeyen su miktarı 23 µl olacak şekilde ayarlandı.

2. Lekeleme karışımı aşağıda verildiği gibi hazırlandı ve genomik DNA üzerine eklendi.

Lekeleme Karışımı	Miktar
Reaction buffer	10 µl
Cy3-dCTP veya Cy5-dCTP	1 µl
Primer solution	10 µl
dCTP-Labeling Mix	5 µl
Toplam Hacim	26 µl

3. Örnekler 94 C°'de 5 dakika inkube edilip, süre sonunda buz üstünde 5 dakika bekletildiler.
4. Karışımın üzerine 1 µl Klenow enzimi eklendi.
5. 2000 g' de 30 saniye santrifüj edildi.
6. Karışım 37 C°'de 16-20 saat inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrası karışıma 5 µl EDTA solusyonu pipetlendi.
8. 2000 g' de 30 saniye santrifüj edildi.

3.1.3.2. DNA' nin Pürifikasyonu

Pürifikasyon aşamasının ilk basamağını Autoseq™ G50 kolonlarının hazırlanması işlemi oluşturdu.

1. Kolonlar vortekslendi.
2. Kolonların kapakları oranında açılıp dip kısımdaki kapak kırıldı.
3. Kolonlar 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilip 2000 g' de 1 dakika santrifüj edildiler.
4. Toplama tüpleri atıldı. Kolonlar 1,5 ml'lik eppendorf tüplere yerleştirildi.
5. Örnekler kolonlara yüklenip 2000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Kolonlar atıldı. Pürifiye olmuş örnekler NanoDrop, ND-1000 cihazı kullanılarak A260nm (DNA), A550 (Cy3) ve A650 (Cy5) absorbans değerleri ölçüldü. DNA miktarının 180-325 ng/ µl ve boya katılım miktarının 6-15 pmol / µl olmasına dikkat edildi.

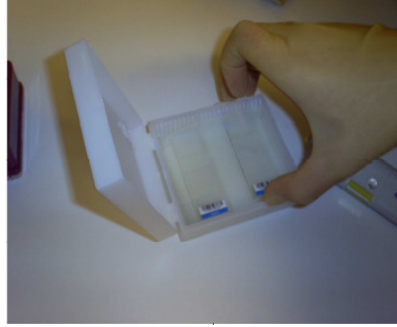
3.1.3.3. Örneklerin Kurutulması

1. Her bir hasta DNA'sı ile Referans DNA'sı aynı tüpte birleştirildi.
2. Birleşimin üzerine 25 µl COT-I Human DNA eklendi.
3. 60 C°'de, yüksek vakumda, 60 dakika örnekler kurutuldu.

3.1.4.4. Hibridizasyon

Hibridizasyon işlemine geçmeden önce 20XSSC (Sodyum Salin Sitrat) ve 2XSSC +%50 formamid karışımı hazırlandı. 20XSSC; 175,3 gr NaCl (3M'lik) ve 88,2 gr Sodyum Sitratın tartılıp 1000 ml'ye kadar deiyonize suyla tamamlanmasıyla hazırlandı. Bu karışımın çözünmesi magnetik karıştırıcı kullanılarak sağlandı. Elde edilen 20XSSC'nin pH'ı 7 olarak ayarlandı. 2XSC + %50 formamid karışımı; 1ml 20XSSC (pH: 7), 5 ml formamid ve 4 ml deiyonize su konularak hazırlandı. Daha sonra slayt kutusu içerisine kurutma kağıtları yerleştirildi ve 2XSSC + % 50 formamid karışımı ile kurutma kağıtlarının çok iyi ıslanması sağlandı. Bu ön hazırlıklardan sonra aşağıdaki basamaklara geçildi.

1. Kurutulan örnekler üzerine 75°C'de ısıtılmış Dekstran Sulfat (DS) Hibridizasyon solüsyonundan 21 µl eklendi.
2. Örnekler 75°C'de 10 dakika denatüre edildi. Pelletin iyice çözünmesi elle karıştırılarak sağlandı.
3. Örnekler tekrar 75 °C'de 10 dakika denatüre edildi.
4. Her örnekten 19 µl CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytlarına yükleme yapıldı.
5. Yükleme yapılan slaytlar önceden hazırlanmış olan slayt kutusunun içerisine yerleştirildi ve slayt kutusu parafinle sarıldı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Yükleme yapılan slaytlar

6. İçerisinde yükleme yapılan slaytlar olan slayt kutusu 47 °C' lik su banyosunda 16-21 saat hibritlenmeye bırakıldı.

3.1.3.5. Yıkama

Yıkama işlemine geçmeden önce aşağıda gösterilen solüsyonlar hazırlandı.

2XSSC + %0,05 Tween20 Karışımı Hazırlanışı

- 100 ml 20XSSC (pH =7)
- 0,5 ml Tween20 → 1000 ml' ye tamamlandı

1XSSC Hazırlanışı

- 25 ml 20XSSC (pH=7) → 500 ml' ye tamamlandı.

0,1XSSC Hazırlanışı

- 5 ml 20XSSC (pH=7) → 1000 ml' ye tamamlandı.

1. 3 adet 1000 ml'lik cam kap ve 1 adet şale çıkarıldı.
2. Yıkama işlemine geçmeden önce HYBEX inkübatör içerisine 0,1XSSC solüsyonu koyulup sıcaklığın 60 C°'ye çıkması sağlandı.
3. Yıkama işlemi aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirildi.

	Yıkama Solusyonu	Koşul	İşlem
Şalede	2xSSC + %0,05 Tween 20	Oda sıcaklığı	2 dakika içerisinde lamellerin düşmesi sağlandı
1.Kap	2xSSC + %0,05 Tween 20	Oda sıcaklığı 10 dakika manyetik karıştırıcı ile	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı

2.Kap	1xSSC	Oda sıcaklığı 10 dakika manyetik karıştırıcı ile	CytoChip Focus HighThroughput FISH analysis slaytları yıkandı
HYBEX Inkubator	0,1x SSC	HYBEX Inkubator icerisinde 5 dakika bekletildi	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı
3.Kap	0,1xSSC	Oda sıcaklığında 1dakika bekletilir	CytoChip Focus High Throughput FISH analysis slaytları yıkandı



Şekil 3.3. HyBex İnkübatörde yıkanan slaytlar

4. Yıkanan slaytlar falkon tüpe yerleştirildi.
5. 200 g'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra hızlı bir şekilde çıkartılıp, tarama işlemine geçildi.

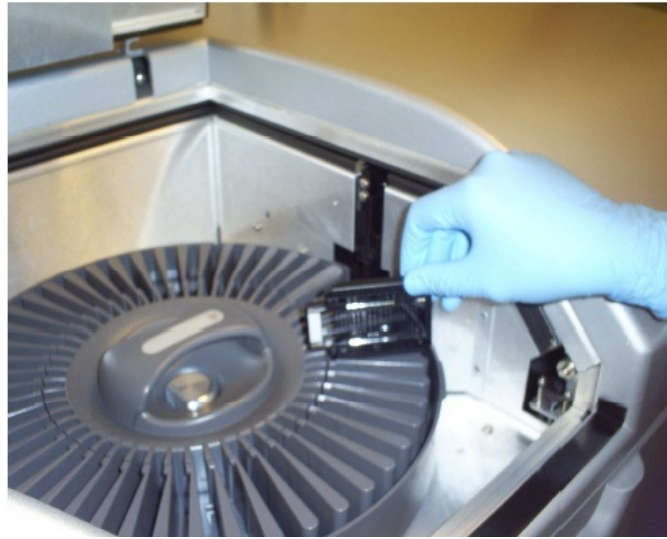
3.1.4.6. Tarama

1. Slaytlar Haematology kısımları üste gelecek şekilde tarayıcı kasetlerine yerleştirildi.



Şekil 3.4. Tarayıcı kasete yerleştirilen slayt

2. Tarayıcı karuselinde “Home” pozisyonu haricindeki numaralı her yere slayt’lar yerleştirilebilir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Tarayıcı karuseline yerleştirilen slaytlar

3. Agilent tarayıcı yazılım programı, masa üstündeki “Agilent Scan Control” ikonu yardımıyla açıldı.

4. Tarama işlemi aşağıdaki ayarlara göre yapıldı.

Slayt	Slayt’lar karusel üzerinde kaç numaralı pozisyonlarda yerleştirilmişse işaretlendi
Tarama alanı (Scan Region)	52 x 19.50 mm
Channels (Kanallar)	Red&Gren
Resolution (Rezolüsyon)	10 um
TIFF	16 bit
PMT	%100
XDR	İşaretlenmeyecek
Browse	Tarayıcıdan çıkan görüntünün kayıt yeri seçildi

5. Ayarlama işlemi bitince “Scan Slot” ikonuna basıldı ve tarama işlemi başlatıldı.

3.1.3.7. Veri Analizi

Tarama işleminden sonra elde edilen veriler TIF uzantılı dosyalardır. Bu dosyadan, Feature Extraction yazılım programı ile txt, xml, pdf gibi uzantısı olan ve slayt hakkında çeşitli bilgiler içeren dosyalar oluşturuldu. Bu dosyalardan pdf uzantılılar, kalite kontrol (QC-Quality Control) dosyaları olup hibridizasyonun kalitesi hakkında çeşitli parametreler sunmaktaydı. Sonuçların doğruluğu için kalite kontrol dosyalarındaki parametreler kontrol edildi. Veriler BlueFuse Multi v2.0 analiz programı aracılığıyla analiz edildi. Analiz aşamasından sonra elde edilen görüntü ve gen listesi kaydedildi.

3.2. Konvansiyonel Kromozom Analizi

3.2.1. Amniyosentez Materyali Kültürü

1-Enjektör içindeki amniyon sıvısı 15ml'lik falkonlara boşaltılıp 1500rpm'de 8 dk santrifüj edildi.

2- Süpernatant atılarak her tüpten 5'er damla materyal flasklara kondu.

3-Ardından flasklara 3 cc besiyeri(Amcell, A-10) eklendi

4-Flasklar 37°C'lik etüvde 1 hafta inkübasyona bırakıldı.

5-Sekizinci günden sonra flasklardaki hücre yoğunluğu izlenerek sırasıyla 1cc besiyeri ekleme işlemi, kendi içinden pasaj alma işlemi uygulandı.

3.2.2. Amniyosentez Materyal Harvesti

1-Flaska yapışmış olan hücreler Tripsin EDTA ile kaldırılarak falkonlara aktarıldı.

2-1500 rpm'de 8 dk santrifüj edildi.

3-Süpernatant atıldı.

4-Hipotonik şok solüsyonu eklendi.

5-25 dk etüvde bekletildikten sonra carnoy fiksatif ile fiksasyon işlemi uygulandı.

6-4 defa carnoy fiksatif ile yıkama işlemi yapıldı.

3.2.3 Preparatların hazırlanması

1-Son yıkamayı takiben santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant atıldı

2-Dipte kalan pelletten birkaç damla temiz lama damlatıldı.

3-Sonra üstüne 1-2 damla fiksatif damlatılıp havada kurumaya bırakıldı. Preparatlar kuruduktan sonra 90°C'lik ısıtıcı üstünde 2 saat yaşlandırıldı.

3.2.4. GTL bantlama

1-Yaşlandırılan preparat sırayla tripsin, PBS ve tampon çözeltilerinden geçirildi.

2- Her bantlama işleminde tripsin süresi yeniden düzenlendi.

3-En son tampondan çıkarılan preparat yaklaşık 90 sn leishman boyası kullanım solüsyonu ile boyandı.

Kromozom Analizi

Hazırlanan preparatlar, Olympus BX51 ışık mikroskopunda incelendi. Analiz edilen metafazlar ISCN 2008'e göre değerlendirildi. Metafazlar otomatik görüntüleme (Cytovision) sisteminde fotoğraflandı. Bu çalışmada her hastadan en az 20 metafaz değerlendirmek amaçlanmıştır.

4.BULGULAR

Hasta grubumuz, 2011-2012 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik laboratuvarına rutin tanı amaçlı yönlendirilen, prenatal tanı endikasyonuna sahip, 141 gebeden alınan amniyosentez örneğinden oluşmaktadır.

Çalışma grubumuz prenatal tanı endikasyonlarından en az birine sahip olan gebelerden oluşmaktadır.

Çalışma grubumuzun sahip olduğu endikasyonlar; İleri anne yaşı(%19), artmış ikili-üçlü tarama testi riski(%69), anormal ultrason bulguları(%21), anomalili çocuk öyküsü(%1.4), ailede MR hikayesi(%7), kromozom anomalili çocuk hikayesi(%0.7) olarak 'de belirtilmiştir (Çizelge 4.1).

Amniyosentez yapılan gebelerin gebelik haftası 12-28 arasında değişmekle beraber ortalama 20 olarak hesaplandı. Anne adaylarının yaşları 18-46 arasında olup ortalama anne yaşı 32 idi.

Hasta grubumuza ait anormal ultrason bulguları Çizelge 4.2 de listelenmiştir.

Amniyosentez serisinde hücre kültürü elde etme başarısı (136/141) %96.4, prenatal tanı sonucu verebilme başarısı (139/141) %98.5 olarak belirlendi. Hücre kültüründen değerlendirilecek metafaz elde edilemeyen vakaların 3'ünde BAC tabanlı array CGH'in yanında 13, 21 numaralı kromozomlara spesifik FISH yöntemi uygulandı. Ancak kanlı şekilde teslim edilen 2 materyalde hiçbir yöntemle analiz gerçekleştirilemedi.

Prenatal tanı için sitogenetik çalışma yapılan ve sonuç verilen 141 olgunun 15 (%10.6)'inde kromozom anomalisi saptanmıştır. Bu kromozom anomalilerinin 12 (%80) tanesi sayısal anomali iken, 3 (%20) tanesi yapısal anomalidir (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4). Sayısal anomaliler içinde en sık görülen karyotip trizomi 21 ve trizomi 18 iken yapısal anomaliler eşit oranda gözlendi.

BAC array CGH ile yapılan analizinde 4 olguda trizomi 21, 4 olguda trizomi 18, 1olguda monozomi X saptanmıştır. Kromozom analizi ile gözlenen diğer mozaik sayısal/yapısal anomaliler ve dengeli kromozom anomalisi BAC array CGH ile tespit edilememiştir. Anomali gözlenen hastalardaki BAC array ve kromozom analizi sonuçları Çizelge 4.5 de listelenmiştir.

Çizelge 4.1: Amniyosentez endikasyonlarının görülme oranı

Endikasyon	%(yüzde)	n(kişi sayısı)
İleri maternal yaş	11.9	17
Tarama testinde yüksek risk	69	98
Anormal ultrason bulgusu	21	30
Kötü obstetrik öykü	0.7	1
Anomali çocuk hikayesi	1.4	2
Ailede MR hikayesi	0.7	1
Kromozom anomalili çocuk hikayesi	0.7	1

Çizelge 4.2: Vakalarımızda gözlenen anormal ultrason bulguları ve gözlenen anomaliler

Anormal Ultrason Bulgusu	Gözlenen Vaka Sayısı(N)	Sonuç
Fetal Hidrotoraks	1	N[1]
Artmış NT	1	Tri21[1]
Multipl Fetal Anomali	1	N[1]
Pelvikaliyektazi	1	N[1]
Hidrocefali	2	N[2]
Koroid Pleksus Kisti	7	N[7]
Hiperekojen Barsak	4	N([3],tri 18[1])
Hiperekojen Kalp	1	N[1]
Kistik Hiyroma	3	N[3],monozomi X[1]
Ventrikülomegali	4	N[4]
Anensefali	1	-
Skolyoz	1	-
Batında Asit	1	-

Talipes	2	N[1]
Diafragma Hernisi	2	N[2]
Retrokoryonik Hemoraji	1	N[1]
Retroplasental Hematom	1	N[1]
Ayakta Oligodaktili	1	tri 18(49)
Sindaktili(Rocker Bottom Feet Malformasyonu)	1	tri 18(49)
Eller Fleksiyon Halinde	1	tri 18[1]
VSD	2	tri 18[1], tri 21[1]
Aort Ve Pulmoner Truncus Çap Genişliği	1	tri 18[1]
Trombositopeni	1	tri 18[1]
Ense Kökü Ve Karaciğerde Su Toplanması	1	N[1]
Komplet AV Septal Defekt	1	tri 21[1]
Kraniyal Ve Spinal Defekt	1	tri 21[1]
Endokardiyal Yastık Defekti	1	tri 21[1]
Kısa Sol Ulna	1	N[1]
Polihidroamnios	3	N[1]
Parsiyel Serebellar Vermis Hipoplazisi	1	N[1]
Kafa Tabanına Meningosel Kesesi	1	N[1]
Çift çıktılı sağ ventrikül	1	-
Sol kalp hipoplazi	1	N[1]
Oligohidroamnios	2	N[2]
İUGR	1	N[1]
Kraniyumda periventriküler kalsifikasyon	1	N[1]
Fetal multistikistik displastik böbrek	1	N[1]
Gastroşizis	2	N[2]
Minimal Perikardiyal Efüzyon	1	N[1]

Nazal Kemik Yokluğu	1	tri 18[1]
---------------------	---	-----------

Çizelge 4.3: Anomali saptanan tüm kromozom analiz sonuçları

Karyotip	Anne Yaşı	Endikasyon	Gebelik Haftası
47,XX,+21[20]	40	Tri 21 riski 1/50	18w
47,XY,+18[30]	44	İleri anne yaşı, Fetal Anomali	25w
mos 47,XY,+18[2]/46,XY[53]	37	Tri 21 riski 1/220	18w
47,XX,rob(21;21)(q10;q10)[20]	42	İleri anne yaşı	16w
47,XY,+18[20]	38	Tri 18 riski 1/17	23w
46,XY[20],46,XX[2]	35	Trizomi 21 riski 1/123	16w
47,XY,+21[20]	22	Trizomi 21 riski 1/62	18w
47,XX,+2[9]/46,XX[30]	32	Tri 21 riski 1/57	22w
46,XY,del(1)(q23)[2]/46,XY[98]	19	Tri 21 riski 1/108	20w
47,XY,+18[85]/46,XY[3]	38	Tri 21 riski yüksek, hiperekojen barsak	18w
47,XX,+18[20]	36	Tri 21 risk artışı	24w
46,XY,inv(4)(p13q21)	24	Trizomi 21 riski 1/57	17w
47,XX,+21[20]	38	Tri 21 riski 1/50	18w
45,X	41	Kistik Higroma	13w
47,XY,+der(14)t(7;14)(q36.?:q11.2)	31	Anomali çocuk öyküsü	19w

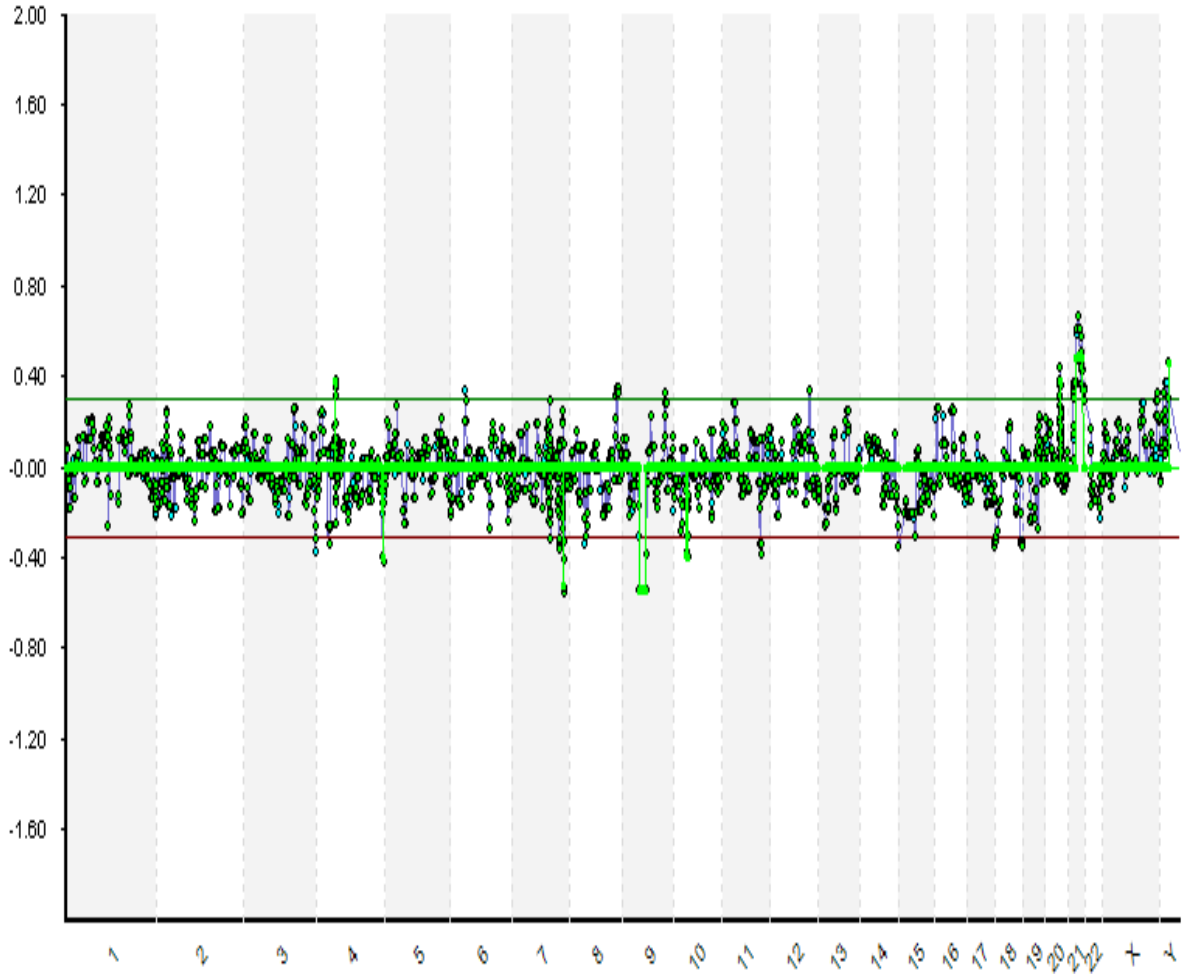
Çizelge 4.4: Amniyosentez işlemlerinde saptanan kromozomal anomalilerin dağılımı

Endikasyon	Normal (n)	Tri 21 (n)	Tri 18 (n)	45,X (n)	Yapısal Anomaliler (n)	Diğer Sayısal Anomaliler (n)
İleri maternal yaş	14	3	-	-	1	-
Tarama testinde yüksek risk	90	1	5	-	2	1
Anormal ultrason bulgusu	20	-	-	1	-	-
Kötü obstetrik öykü	1	-	-	-	-	-
Anomali çocuk hikayesi	1	-	-	-	1	-
Ailede MR hikayesi	1	-	-	-	-	-
Kromozom anomalili çocuk hikayesi	1	-	-	-	-	-

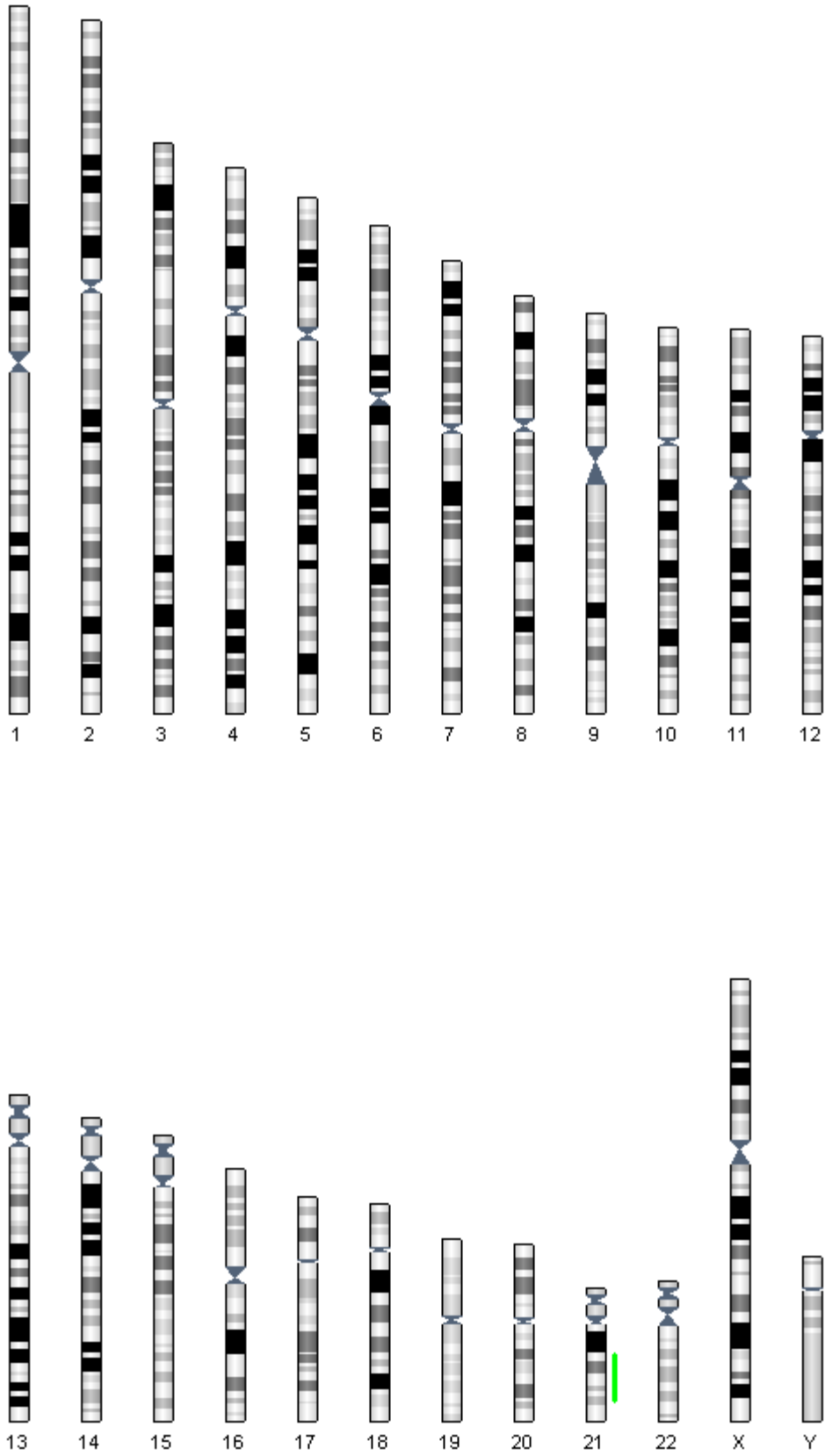
Çizelge 4.5: Anomali gözlenen hastaların BAC array CGH ve karyotip sonuçları

Endikasyon	Karyotip	BAC array CGH Sonucu
Tri 21 riski 1/50	47,XX,+21[20]	Tri 21
İleri anne yaşı, Fetal Anomali	47,XY,+18[30]	Tri 18
Tri 21 riski 1/220	mos 47,XY,+18[2]/46,XY[53]	Normal
İleri anne yaşı	47,XX,rob(21;21)(q10;q10)[20]	Tri 21
Tri 18 riski 1/17	47,XY,+18[20]	Tri 18

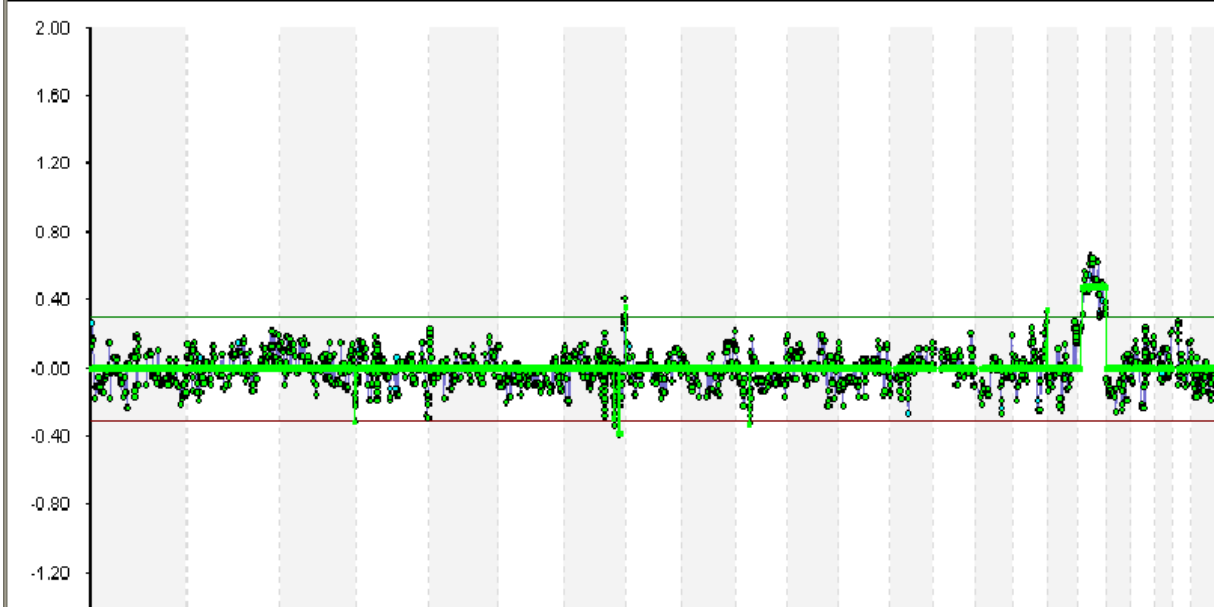
Trizomi 21 riski 1/123	46,XY[20],46,XX[2]	Normal
Trizomi 21 riski 1/62	47,XY,+21[20]	Tri 21
Tri 21 riski 1/57	47,XX,+2[9]/46,XX[30]	Normal
Tri 21 riski 1/108	46,XY,del(1)(q23)[2]/46,XY[98]	Normal
Tri 21 riski yüksek, hiperekojen barsak	47,XY,+18[85]/46,XY[3]	Tri 18
Tri 21 risk artışı	47,XX,+18[20]	Tri 18
Trizomi 21 riski 1/57	46,XY,inv(4)(p13q21)	Normal
Tri 21 riski 1/50	47,XX,+21[20]	Tri 21
Kistik Higroma	45,X	Monozomi X
Anomalili Çocuk Hikayesi	47,XY,+der(14)t(7;14)(q36.?:q11.2)	Dup 14q11.2



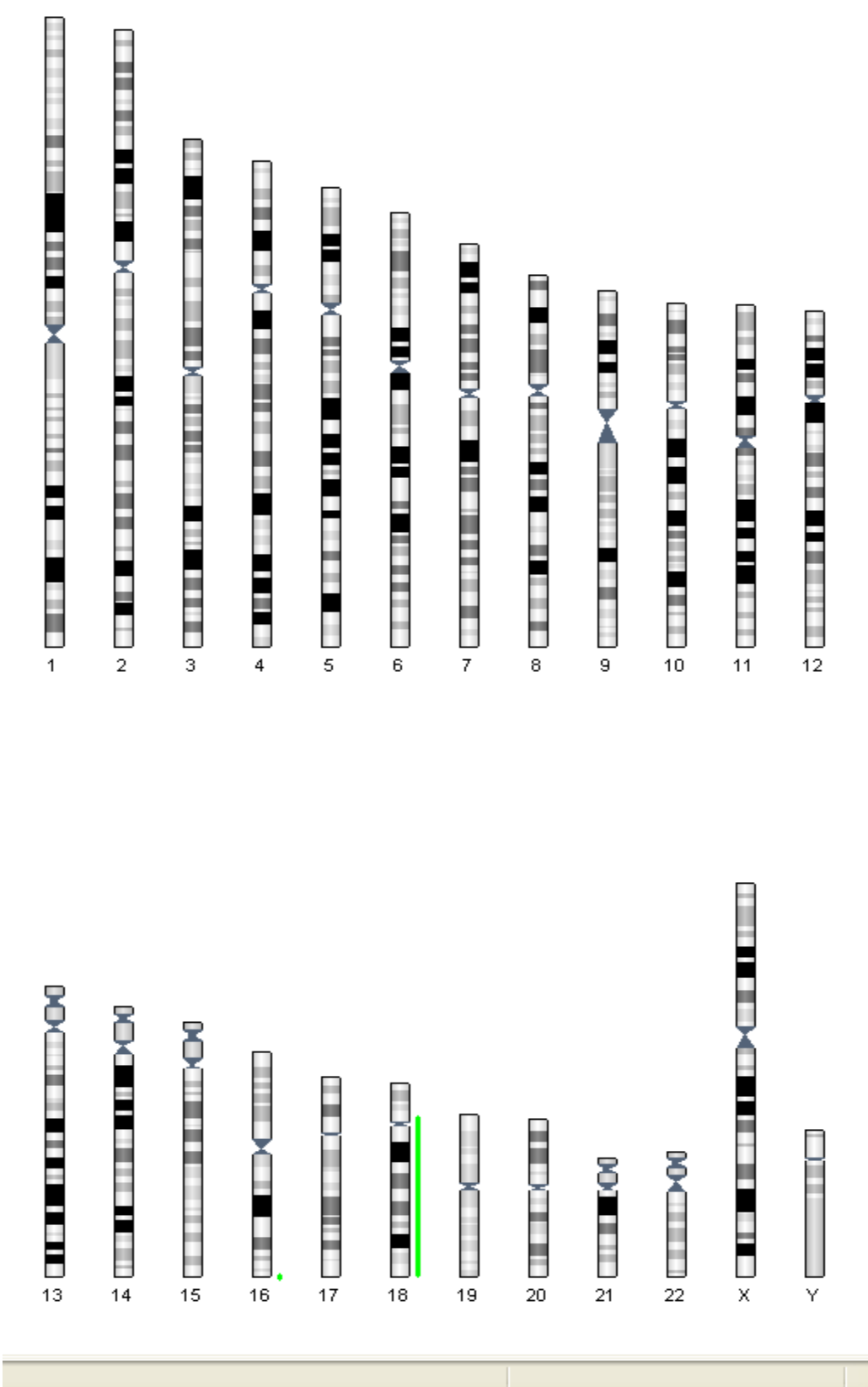
Şekil 4.1: Trizomi 21 bulgusu bulunan hastaya ait array CGH görüntüsü



Şekil 4.2: Trizomi 21 bulgusuna sahip hastaya ait array CGH analiz programının idiogramı



Şekil 4.3: Trizomi 18 bulgusuna sahip hastaya ait array CGH görüntüsü



Şekil 4.4: Trizomi 18 bulgusuna sahip hastaya ait array CGH analiz programının idiogramı

5.TARTIŞMA

Konjenital hastalıkların tespiti, halen tüm dünyada tıbbi, sosyal ve ekonomik yönden önemli bir problemdir. Günümüzdeki biyokimyasal ve genetik tanı yöntemdeki hızlı gelişmeler, ultrasonografi teknolojisindeki gelişmeler sonucunda, tarama testlerinin kullanımı yaygınlaşmış olup buna paralel olarak gelişen genetik tanı yöntemleri ile fetal kromozomal anomalilerin tanısı mümkün hale gelmiştir (Erdemoğlu ve ark.,2007).

İnvaziv prenatal tanı tekniği olan amniyosentez, genetik hastalıkların tespiti amacıyla sıklıkla uygulanan bir girişimdir. Genetik amaçlı yapılan amniyosentezin gebelik üzerinde olan etkileri ile ilgili olarak fetal kayıp, erken membran rüptürü gibi sonuçlara sebep olabilmektedir. Risk taşıyan bu işlem, ancak prenatal tanı endikasyonu varlığında yapılmalıdır.

Genetik amaçlı yapılan amniyosentezin endikasyonları; ileri anne yaşı, tarama testinde artmış risk, anormal ultrason bulguları, ailede kromozom anomalili bireylerin bulunması, dengeli kromozom anomalisi taşıyıcılığı ve tekrarlayan düşük hikayesi olarak özetlenebilir.

Çalışmamızda bulunan bütün vakalarda, en az bir tane prenatal tanı endikasyonu bulunmaktadır. Gözlenen endikasyonlar; ileri anne yaşı, tarama testinden artmış risk, anormal ultrason bulguları, ailede kromozom anomalili bireylerin bulunması, tekrarlayan düşük olduğu gözlenmektedir. En sık gözlenen endikasyon tarama testinde artış risk(%69) olarak karşımıza çıkmakta olup, anormal ultrason bulguları (%21) ikinci sıradadır. İleri maternal yaş ise %11 ile üçüncü sırada yer almaktadır. Yapılan çalışmalar, gerek görülme oranı gerekse sıralama Türkiye’de ve diğer ülkelerdeki genetik tanı merkezlerinde farklılık olduğunu göstermektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, bizim çalışmamızdakinden farklı olarak (Erdemoğlu M. ve ark.,2007) tarama test yüksekliği %54.9, ileri anne yaşı %20 ve anormal USG bulguları %16 oranında bulunmuştur. Tongsong ve ark. 1998’de yaptıkları çalışmada ise ileri anne yaşı dramatik bir farklılık göstermekte olup %86 olarak bildirilmiştir. Zaman içinde ileri anne yaşının endikasyon olarak kabul edilme oranının azalıp, tarama testlerinin ve ultrason bulgularının prenatal tanıya yönlendirdiği dikkat çekmektedir. Bu konuyla ilgili olarak Dommergues ve ark. yaptıkları çalışmada ileri anne yaşına sahip kadınlarda amniyosentezin rutin bir işlem olarak değil, non invaziv tarama testlerinin sonuçlarına göre selektif bazda önerilmesi gereken bir işlem olması gerektiği sonucuna varmışlardır. Çalışmalarında, 38-47 yaşları arasında 3659 hastadan, üçlü tarama

test riski 1/250'nin altında olan, birinci trimester taramada ense kalınlığı 3 mm'nin altında olan ve normal ikinci trimester ultrasonografiye sahip hiçbir kadın kromozomal anomalili bir bebek doğurmadığı gösterilmiştir (Oluş A ve ark, 2009). Bu veriler gösteriyor ki; ilerleyen zamanlarda ileri anne yaşı prenatal tanı endikasyonlarındaki önemini ve sıralaması geri planda kalacaktır.

Çalışmadaki ileri anne yaşı nedeniyle amniyosentez uygulanan 17 olgudan 3'ünde (%17) hem karyotipleme hem de BAC tabanlı array CGH ile yapılan analizde kromozom anomalisi saptanmıştır. Yüce H. ve ark. yaptıkları 356 olgudan oluşan çalışmada ileri anne yaşı ile amniyosentez yapılan 158 olgunun %1.2'sinde kromozom anomalisi bulunduğu bildirilmektedir. Api ve ark. çalışmasında bu oran %2.7 olarak bulunmuştur. Çalışmamızdaki oranın benzer çalışmalardaki oranlara göre yüksek olmasını ileri anne yaşı endikasyonu ile birlikte tarama testi yükseliği ve fetal anomalilerin de eşlik etmesi, kromozom anomalisi görülme sıklığına etkisi olduğu düşünülmektedir.

Ultrasonografi, non invaziv tanı tekniklerinin önemli bir parçasıdır. İlk trimester ve ikinci trimester da fetal anomalilerin saptanması invaziv tekniklerin yardımıyla olası anomalinin prenatal dönemde tespitine olanak sağlamaktadır. Fetal kromozom anomalilerinde sıklıkla gözlenen ultrason bulguları; NT'de artış, nazal kemik yokluğu, koroid pleksus kisti, kistik higroma olarak sıralanabilir. Çalışma grubumuzda en sık gözlenen ultrason bulgusu koroid pleksus kistidir. Ancak koroid pleksus kist bulgusu olan vakalarda kromozom anomalisine rastlanmamıştır. Kistik higroma, ventrikülomegali, hiperekojen barsak, kistik higroma, VSD çalışma grubumuzda bulunan diğer sık gözlenen ultrason bulgularıdır. Kistik higroma gözlenen üç olgunun birinde 45,X karyotipi gözlenmiştir. Ayrıca VSD gözlenen iki olguda da kromozom anomalisine rastlanmıştır. Trizomi 21 saptanan olguda sadece VSD gözlenirken, trizomi 18 gözlenen olguda VSD ye ek olarak ayakta oligodaktili, sindaktili(Rocker Bottom Feet Malformasyonu, trombositopeni ve fleksiyon halinde el gözlenmiştir. Trizomi 18 bulgusu dördü regüler tip biri ise mozaik olarak toplam 5 olguda tespit saptanmıştır. Regüler tipte olan olguların kromozom analizi ve BAC array sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuştur.

Bütün ultrason bulguları göz önünde bulundurulduğunda sadece anormal ultrason bulgusu ile başvuran olguların %5'inde kromozom anomalisi gözlenmiştir. Ancak ultrason anomalisinin eşlik ettiği endikasyonlarla amniyosentez yapılan olgularda ise %16.6 'ya

yükselmektedir. Rizzo ve ark. bizim çalışmamıza uyumlu olarak anormal ultrason bulgusu ile başvuranlarda %16.8 oranında kromozom anomalisi buldukları bildirilmektedir.

Tarama testinde yüksek risk nedeniyle 98 olguya amniyosentez uygulandı ve 9(%10) olguda sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalisi tespit edilmiştir. Yüce H. Ve ark yaptıkları çalışmada bu oran %3 olarak bildirilmiştir.

Yüksek riskli gebeliklere çok yüksek oranlarda sitogenetik inceleme yapılmaktadır. Fakat bu sayının büyük çoğunluğu normal bir karyotipe sahip olup ancak %5-10'luk küçük bir kısmında mikroskobik düzeyde kromozomal değişimler gözlenmektedir. Bizim çalışmamızda bu oran bu veriye uyumlu olarak %10.6 bulunmuştur.

Kromozom anomalileri mental retardasyon, doğum defektleri gibi çeşitlilik gösteren kompleks fenotiplerden sorumlu tutulmaktadır. Yenidoğanlarda gözlenen kromozom anomalilerin, %80 nini tri21, tri18, tri13 anoploidileri oluştururken geri kalanını Turner Sendromu, Klinefelter Sendromu gibi cinsiyet kromozom anomalileri oluşturmaktadır.

Down sendromu prenatal tanıda en sık gözlenen kromozom anomalisidir. Çalışma grubumuzda dört olguda trizomi 21 bulgusuna rastlanmıştır. Bu bulguların hepsi kromozom analizi ve BAC array ile tespit edilmiştir. Bunların üçü regüler tip, biri ise robertson tipi translokasyondur. Robertson tipi trizomi 21 gözlenen olguda yapılan parental kromozom analizinde fetusda gözlenen bulgunun de novo olduğu gösterilmiştir.

Genetik test amaçlı alınan amniyon sıvısındaki tüm hücrelerin canlı olmamasından dolayı canlı hücrelerin çoğaltılması için hücrelere kültür ortamı gerekmektedir. Kültür işleminden geçirilen materyal uygun zamanda harvest işlemi yapılmaktadır. Bantlama teknikleri takiben elde edilen metafazlar incelenmektedir. Bu işlem takribi 10-15 gün sürmektedir. Bu süreçte amniyosentez yaptıran anne adayının anksiyetesi artmaktadır. Ayrıca ileri gebelik haftasında amniyosentez uygulandığı takdirde olası anomali durumunda terminasyon zorlaşacağından bu dönemde zamanla yarışılmaktadır. Bu sebeple daha hızlı sonuç alınabilecek teknikler geliştirilmiştir (özellikle riskli gebelikler için.) bu hedeflenen sürede sonuç elde edebilmek için prenatal tanı testlerinde, mikroskobik karyotip analizine göre daha hızlı, daha az emek gerektiren yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Prenatal tanıda karyotipleme getirdiği sınırları aşabilmek amacıyla özellikle anöploidilerin tespit için QF-PCR ve FISH yöntemleri başarıyla kullanılmaktadır. QF-PCR da kromozom spesifik ve poliformik diziler olan STR'lerin amplifikasyonu sağlayan primerlerle kullanılmaktadır. Bu metodla sık gözlenen trizomilerin ve sex kromozom anomalilerin aynı reaksiyonda eş zamanlı olarak belirlenmesi mümkün olmaktadır.

Geniş çaplı araştırmalarda bu yöntemin güvenilir olduğu az sıklıkta yanlış negatif ya da pozitif sonuç elde edildiği bildirilmiştir. QF-PCR yönteminde hücre kültürüne ihtiyaç olmayıp rapor verme süresini kısaltması yönüyle avantajlı bir yöntemdir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı karyotiplemeye göre prenatal dönemde sıklıkla gözlenen anomalileri tespit edebilmesine rağmen, %1-2 lik bir kısmını oluşturan yapısal kromozom anomalilerini tespit edememesidir. Bu sebeple, bu yöntem tam anlamıyla konvansiyonel sitogenetiğin yerini alamayacağı kabul edilmektedir.

Anormal bir ultrason bulgusu veya tarama testi riski bulunduğu durumlarda FISH teknolojisi uygulanabilmektedir. Ayrıca tüm sayısal kromozom anomalileri de tespit edilebilmektedir. Bu teknik floresan işaret DNA problemleriyle ilgili bölgenin hibridizasyonu temeline dayanan bir işlemdir. FISH uygulaması kültür işlemine gerek olmadan sık gözlenen anöploidilerin taranmasında ve sık gözlenen mikrolezyonların belirlenmesinde etkindir. Ancak bu işlem anomaliye spesifik olduğundan, uygulanabilmesi için doğru bir ön tanıya ihtiyaç duyulmaktadır.

Prenatal tanıda kullanılan interfaz hücrelerine uygulanabilen FISH problemleri 13, 21, 18, X, Y kromozomlarının sadece anöploidilerini tespit edebilmektedir. Diğer kromozomların sayısal ve/veya yapısal anomalilerini tespit etmekte yetersizdir. Sıklıkla anöploidi açısından yüksek risk olduğuy veya hücre kültüründen verim alınamadığı durumlarda kullanılmaktadır.

Genom düzeyinde kopya sayısı değişimi ile ilişkili yapısal kromozom anomalilerin araştırılması için array CGH teknolojisi prenatal tanıda kullanılabilecek bir metottur. Array-CGH teknolojisinin arkasındaki prensip, kromozomal delesyon ve duplikasyonların eşit miktarda genomik DNA içeren hasta ve sağlıklı örneklerinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır.

Kültür işlemine gerek duymaksızın, kısa bir sürede ve eş zamanlı olarak tüm kromozomların anöploidileri, kopya sayısında değişikliğe neden olan dengesiz kromozomal anomaliler array CGH yöntemi ile tespit edilebilmektedir.

Amniyon hücre kültürü hem uzun sürmekte hem de her zaman başarıyla sonuçlanmamaktadır. Her laboratuvarın karşılaştığı kültür başarısızlığı riski beklemekte olan ailenin anksiyetesini daha da arttırmaktadır. Çünkü böyle bir durumda invaziv bir işlemin daha yapılması gerekebilme ve girişimin getirdiği riskler tekrarlanmaktadır.

Bizim çalışmamızda kültür başarıları %96.4 olup, prenatal tanı sonucu elde etme başarılarımız ise %98.5'tir. Bu iki oranın arasındaki farkın sebebi; metafaz elde edilemeyen olgularda FISH ve BAC tabanlı array CGH yapılarak hastaya anöploidiler hakkında bilgi verilebilmiştir. Hiç sonuç elde edemediğimiz materyaller kanlı teslim edilmiş olup, moleküler testler için uygun olmadığından herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

Mozaisizm yani aynı hücre grubunda farklı kromozom yapılarının gözlenmesi belki de prenatal tanıda karşılaşılabilecek problemlerin en başında gelmektedir. Çünkü bulunan karyotipin fenotipik etkisini tahmin etmek oldukça zordur. Çalışma grubumuzda 4 farklı mozaik olgu bulunmaktadır. İlki artmış tarama testi riski ile başvuran vakada incelenen 55 metafazın ikisinde trizomi 18 saptanmıştır. Sayıca az olmasına rağmen bu bulgunun çalışılan iki kültür kabında da gözükmesi yalancı mozaik olasılığından uzaklaştırmıştır. Bu yüzden FISH yöntemi uygulanarak daha fazla hücre incelenmiştir. FISH analizinde ise %6 oranında trizomi 18 bulgusuna rastlanmıştır. Ancak bu vakaya ait CGH analizinde bu bulgu saptanmamıştır. Çünkü mozaik oranı %10'un altında olduğundan CGH yöntemi ile yakalanamamaktadır. Diğer mozaik trizomi 18 vakasında ise incelenen 89 metafazın 85'i trizomi 18, 3'ü ise 46,XY karyotipi gözlenmiştir. Bu vakada CGH sonucu trizomi 18 bulgusunu doğrulamıştır ancak mozaik yapı hakkında bilgi vermemiştir.

Son mozaik vakamızda yüksek trizomi 21 riski ile başvurmuş olup incelenen 39 metafazın dokuzunda trizomi 2 saptanmıştır. Ancak trizomik metafazların aynı kültür kabından olması ve bulunan sonucun endikasyonla uyum göstermemesi sebebiyle kültür artefaktı olarak düşünülmüştür. Ancak olası riskler için hastaya genetik danışma verilmiştir. BAC array CGH sonucu bu anomaliyi desteklememektedir.

BAC array CGH %10'nun altındaki mozaisizmleri tespit edebilmekte yetersiz bir tekniktir. Ancak kültür işlemi yapılmadan kullanılan DNAda yalancı genomik değişiklikler olmadığından kültür artefaktlarını tespit etmemektedir (Park, 2011).

Çalışma grubumuzda sadece bir olguda dengeli kromozom anomalisi saptanmıştır. Trizomi 21 risk yükseliği ile başvuran vakada kromozom analizinde inv(4)(p13q21) gözlenmiştir. Array CGH sonucu ise normal bulunmuştur. Çünkü dengeli kromozom anomalileri bu yöntemle tespit edilememektedir (Van den Veyver, 2012). Yapılan parental kromozom analizinde de novo olduğu anlaşılmış olup gerekli literatür taraması yapılarak bunun bir dengeli kromozom anomalisi olduğu belirtilmiş fakat mikroskobik düzeyde gözlenemeyecek küçüklükteki değişimlerin dışlanamayacağı anlatılarak risklerden bahsedilmiştir.

Marker kromozomlar, orijini bilinmeyen kromozom parçalarından oluşmaktadır. Artış gösteren genetik materyalin kökeninin bilinmemesi fenotipik etkiyi tahmin edilmez kılmaktadır. BAC tabanlı array CGH genom düzeyinde analiz imkanı olduğundan, marker kromozomların identifikasyonu, dolayısıyla artış gösteren genlerin tespiti mümkün olmaktadır. Çalışma grubumuzda anomalili çocuk öyküsü endikasyonu ile amniyosentez materyaline yapılan kromozom analizinde marker kromozom saptanmıştır. Aynı anda BAC array CGH ile fazla kromozom parçalarının kökeninin 14q11 bölgesine ait olduğu belirlenmiştir. Yapılan parental kromozom analizi sonucunda anne adayının t(7;14) bulgusuna sahip olduğu ve marker kromozom olarak görünen kromozom parçasının derivatif 14 numaralı kromozom olduğu anlaşılmıştır.

BAC array CGH yöntemi genom düzeyindeki kopya sayısı değişimlerini tespit etmektedir (Neil, 2010). Kopya sayısı değişimleri klinik etkisi bilinen ya da tahmin edilen patolojik grup, klinik etkisi olmayacak ya da bilinmeyen benign grup olarak sınıflandırılmaktadır. Bu yöntemle, hem patolojik hem de benign gruptaki kopya sayısı değişimleri tespit edilmektedir (Maya, 2010). Çalışma grubumuzda fenotipik etkisinden şüphe ettiğimiz bir kopya sayısı değişimine rastlanmamıştır. Ancak bu konuda yapılan çalışmalarda, kromozom analizi ile saptanmayacak küçüklükte, prognozu belli olmayan, belli bir sendromla uyuşmayan değişimlerin tespitinin özellikle prenatal tanı sürecinde raporlandırma ve genetik danışmada zorlukları beraberinde getirebileceği bildirilmiştir. Özellikle yüksek rezolüsyona sahip örneğin oligo tabanlı array platformlarında böyle

benign gruptaki kopya sayısı değişimleri ile karşılaşma olasılığı BAC tabanlı array platformuna göre daha yüksektir (Evangelidou, 2010).

Genetik amaçlı prenatal tanı, çok aşamalı ve çok yönlü bir süreçtir. Amaç en kısa zamanda en doğru bilgiye ulaşmak ve bunu hastaya uygun bir şekilde aktarabilmektir.

Elli yılı aşkın süredir prenatal tanıda altın standart olan kromozom analizinin yetersiz kaldığı durumları tamamlayabilmek ve daha kısa zamanda raporlandırma amacıyla uygulabilecek en etkin metod array CGH'tir. Bu yöntemin de kendi içinde sahip olduğu dezavantajlar göz önünde bulundurulduğunda; prenatal tanıda etkin kullanımı için test öncesi genetik danışmada, yapılacak testlerin bilgi vericiliği, sınırları detaylı bir şekilde anlatılmalıdır.

6-SONUÇ VE ÖNERİLER

Genetik amaçlı uygulanan prenatal tanı, çok aşamalı ve çok yönlü bir süreç olup, amaç en kısa zamanda en doğru bilgiye ulaşım ve bunu hastaya uygun bir şekilde aktarabilmektir.

Bu amaçla uygulanmakta olan kromozom analizi hala altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde bazı limitlerini bulunduğundan, bu sorunları aşım amacıyla geliştirilen bir metod olan BAC tabanlı array CGH, prenatal tanıda yerini almaya başlamıştır. Yöntem hassasiyet anlamında karyotiplemeden daha yüksek olsa da tanısal anlamda geliştirilmesi gereken yönleri bulunmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaların ve hasta popülasyonunun artılarak tanısal etkinliğini arttırmak amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Agarwal, K., Alfirovic, Z. (2012) Pregnancy loss after chorionic villus sampling and genetic amniocentesis in twin pregnancies: a systematic review *Ultrasound Obstet Gynecol*, 40: 128–134

Alp, M. N.Oral, D. Budak, T.(2007) Down Sendromu Ön Tanılı 584 Olguda Sitogenetik Çalışma. *Dicle Tıp Dergisi*, 34(4):283-289

Api, O., Özyapı, A.G., Cengizoğlu, B.,Ünal, O., Turan, M.C. (2009) Yedi Yıllık İkinci Trimester Genetik Amniyosentez Sonuçlarımız. *Perinatoloji Dergisi*, 17(1).

Akalın, N., Arıkan, S. (2007) Üçlü test tarama belirteçlerinin bölgemize ait medyan Değerlerinin Belirlenmesi *Perinatoloji Dergisi*, 15(1):12-19.

Balkan, M., Erdemoğlu, M., Alp, M.N., Budak, T.(2008) Patau Sendromlu Bir Prenatal Tanı Olgusu. *Dicle Tıp Dergisi*, 35(2): 145-14.

Balkan, M., Alp, N., Yalınkaya, A., İsi, H., Budak, T. (2005) 46,X, i(Xq) Karyotipli Varyant Turner Sendromlu: Olgusu *Dicle Tıp Dergisi*, 2005 Cilt:32, Sayı:3, (149-152)

Branch, MJ, Knutsen, T, Spurbeck, JL.(1997) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Ed. 3rd ed Lippincott-Raven; USA,

Breman, A., Pursley, A.N., Hixson, P., Bi, W., Ward, P., Bacino, C.A., Shaw, C., Lupski, J.R., Beaudet, A., Patel, A., Cheung, S.W., Van den Veyver, I. (2012) Prenatal chromosomal microarray analysis in a diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenatal Diagnosis*, 32: 351–361.

Breman, A., Wei-min, B.I., Cheung S.W. (2009) Prenatal Diagnosis by array-based comparative hybridization the clinical laboratory settings. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 41(4);500-504

Binns, V., Hsu, N.(2002) *Encyclopedia Of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group Washington, USA

Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn*, 1987; 7: 623-30.

Bui, T.H., Vetro, A., Zuffardi, O., Shaffer, L.G. (2011) Current controversies in prenatal diagnosis 3: is conventional chromosome analysis necessary in the post-array CGH era. *Prenatal Diagnosis*, 31: 235–243.

Çankaya, T., Gündüz, C., Özkınay, F., Çoğulu, Ö., Sağol, S., Özkınay, C. (2006) İnterfaz hücrelerinde Flüoresan In-situ Hibridizasyon yöntemiyle anöploidi aranması. Ege Tıp Dergisi 45(3): 149-154.

Coşkun, Z. (2008) Amniyosentez Uygulanan 615 Olgu Sonuçlarının Değerlendirilmesi Tez(Uzmanlık). Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Cuckle, H. (2000) Biochemical screening for down syndrome. Eur J Obstet Gyneco Reprod Biol, 92(1): 97-101.

Dağlar, H.K., Kaya, B., Şahin, H.Ö., Pınar, M.F., Akıl, A. (2011) Gaziantep İli Doğum Hastanesi'nde Karyotip Analizi Amacı ile Amniyosentez ve Koryon Villus Örnekleme Yapılan 268 Olgunun Retrospektif Analizi. Perinatoloji Dergisi, 19(3):130-136.

Dommergues, M., Audibert, F., Benartter, C., Gomel, V., Frydman R.(2001) Is routine amniocentesis for advanced maternal age stil indicated?. Fetal Diagn Ther, 16:372-376

Eker, C., (2010) Prematür ovaryum yetmezliği(POY) tanısına yönelik mikro dizin bazlı karşılaştırılmalı genomik hibridizasyon kiti geliştirilmesi. Tez(Yüksek Lisans) İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Erçal, MD. (2002) Prenatal Sitogenetik, Moleküler Genetik Tanı ve Yenilikler. T klin Jinekoloj Obst; 12:320-324

Erdemoğlu, M., Kale, A. (2007) Genetik Amaçlı Amniyosentez Uygulanan 183 Olgunun Prospektif Analizi. Dicle Tıp Dergisi, 34(3):170-175.

Evangelidou, P., Sismani, C., Ioannides, M., Christodoulou, C., Koumbaris, G., Kallikas, I., Georgiou, I., Velissariou, V., Patsalis, P.C. (2010) Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. Molecular Cytogenetics, 3(24).

Ferguson,S. RW (1984) Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative European study on 52 965 amniocenteses. Prenatal Diagnosis 4 (Spec. No.): 5–44.

Fiorentino, F., Caiazzo, F., Napolitano, S., Spizzichino, L., Bono, S., Sessa, M., Nuccitelli, A., Biricik, A., Gordon, A., Rizzo, G., Baldi, M. (2011) Introducing array comparative genomic hybridization into routine prenatal diagnosis practice: a prospective study on over 1000 consecutive clinical cases Prenatal Diagnosis, 31: 270–1282.

Goldberg, JD.(2004) Routine screening for fetal anomalies: expectations.Obstet Gynecol Clin North Am, 31(1):35-50.

Gülten T, Erçal D.(2005) Çocuk Sağlığı ve Prenatal Tanı. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci, 1(2):68-72

- Hillman, S.C., McMullan, D.J., Williams, D., Maher, E.R., Kilby, M.D. (2012) Microarray comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 40: 385–391.
- Hillman, S.C., Pretlove, S., Coomarasamy, A., McMullan, E. V. Davison, Maher E. R., Kilby M. D. (2011) Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 37: 6–14.
- Jackson, L. (2003). Fetal cells and DNA in maternal blood. *Prenatal Diagnosis*, 23:837-846
- Jeuken, J.W.M., Sprenger, S.H.E. Ve Wesseling, P. (2002) Comparative Genomic hybridization: practical guideline. *Diagn. Mol. Pathol*, 11(4):193–203.
- Karaman, A., Kahveci, H., Laloğlu, F. (2012) Trizomi 18 Sendromu: Olgu Sunumu. *Bakırköy Tıp Dergisi*, 8(1):44-46.
- Marilyn, L., Daniel, P. (2006) Clinical cytogenetics and molecular cytogenetics. *J Zhejiang Univ* 7:162-163.
- Maya, I., Davidov, B., Gershovitz, L., Zalzstein, Y., Taub, E., Coppinger, J., Shaffer, L.G., Shohat, M. (2010) Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. *Prenatal Diagnosis*, 30:1131–1137.
- Moorhead, PS., Nowell PC., Mellman., WJ, Battips., DM, Hungerford DA. (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp Cell Res*, 20: 613-616.
- Neil, J.N., Torchia, S.B., Bejjani A.B., Shaffer, L.G., Ballif, C.B. (2010) Comparative analysis of copy number detection by whole-genome BAC and oligonucleotide array CGH. *Molecular Cytogenetics*. 3:11.
- Nussbaum, RL., Thompson and Thompson *Genetics in Medicine*. 6th rev. ed. Saunders, USA
- Nicolaidis, KH. (1999) Clinical findings in chromosomal anomalies. in: *Prenatal diagnosis of Fetal Anomalies: 18-23 weeks ultrasound* Nicolaidis KH. ed. Parthenon, New York
- Park, J.H., Woo, J.H., Shim, S.H., Yang, S.J., Choi, Y.M., Yang, K.S., Hyun, C.D. (2010) Application of a target array Comparative Genomic Hybridization to prenatal diagnosis. *BMC Medical Genetics*, 11:102.
- Park, S.J., Jung, E.H., Ryu, R.S., Kang, H.W., Ko, J.M., Kim, H.J., Cheon, C.K., Hwang, S.H., Kang, H.Y. (2011) Clinical implementation of whole-genome array CGH as a first-tier test in 5080 pre and postnatal cases. *Molecular Cytogenetics*, 4:12.
- Reçber, D., Özen, S. (2005) Trizomi 13, Patau Syndrome: Bir Olgu Sunumu. *Van Tıp Dergisi*. 12(1):29-31.

Rickman, L., Fiegler, H., Shaw-Smith, C., Nash, R., Cirigliano, V., Voglino, G., Ng, B. L., Scott, C., Whittaker, J., Adinolfi, M., Carter, N.P., Bobrow, M. (2006) Prenatal detection of unbalanced chromosomal rearrangements by array CGH. *Journal of Medical Genetics*, 43:353–361.

Rickman, L., Fiegler, Carter, N.P., Bobrow, M.(2005) Prenatal Diagnosis by array CGH

Rizzo, N., Pittalis M.C., Pilu, G., Orsini L.F., Perola A, Bovicelli, L.(1990) Prenatal karyotyping in malformed fetuses. *Prenat Diagn*, 10:17-23

Saatçi, Ç, Özkul, Y., Taşdemir, Ş., Kiraz, A., Müderris, İ., Taşcıoğlu, N, Çağlayan, O., Dündar, M. (2007) İnvazif prenatal tanı yöntemleri uygulanan 2295 olgunun retrospektif analizi. *Perinatoloji Dergisi*,15(3).

Sağ, Ş., Gülten, T., Karkucak, M., Yakut, T., Kimya, Y., Evke, E., Yiğit, B., Cengiz, C. (2009) Prenatal Tanıda Konvansiyonel Sitogenetik ve FISH Analiz Sonuçlarının Sayısal Kromozomal Anomaliler ve Endikasyonlar Açısından Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 35(2): 83-87, 2009

Şen, C. (2002) Amniosentez ve Koryon Villus Örnekleme. *Perinatoloji Dergisi*,10(2):55-58

Tamsel, S., Özbek, S., Demirpolat, G. (2007) Ultrasound evaluation of fetal chromosome disorders. *Diagnostic and Interventional Radiology*,13(2):97-100.

Taner, C.E., Aygören, M.O., Kayar, I., Derin, G. (2009) Down Sendromlu Olgularda Ultrasonografik Bulgular. *Perinatoloji Dergisi*,17(2).

Timor-Tritsch IE., Bar Yam, Y., Ronem, S.:(1988) ;The technique of transvaginal sonography with the use of a 6.5 MHz probe.*AmJ Obstet Gynecol*. 158: 1018-1019.

Toker, F. (2009) Yüksek Riskli Gebe Populasyonunda Ultrasonografik,Laboratuar ve Anamnestik Risk Faktörlerinin Aneuploidi Öngörüsündeki Etkinlikleri Tez (Uzmanlık). Süleymaniye Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Tongsong, T.,Wanapirak C, et al. (1998) Amniocentesis-related fetal loss; a cohort study, *Obstet Gynecol* 92:64-67

Türkyılmaz, A., Alp, M.N., Budak, T., (2007) 481 Amniyosentez, Koryon Villus Biyopsisi ve Kordosentez Örneğinin Prenatal Genetik Tanısı. *Dicle Tıp Dergisi*, 34(3): 187-190.

Van den Veyver, I.B., Patel, A., Shaw, C.A., Pursley, A.N., Kang, S.H.L., Simovich, M.J., Ward, P.A., Darilek, S., Johnson, A., Neill, S.E., Bi, W., White, L.D., Eng, C.M., Lupski, J.R., Cheung, S.W., Beaudet, A.L. (2009) Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenatal Diagnosis*, 29: 29–39.

Vogel, F., Motulsky AG.(1997)Editors Human Genetics. 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin Weiss, M.M., Hermsen, M.A., Meijer, G.A., Van Grieken, N.C., Baak, J.P., Kuipers, E.J., Van Diest, P.J., (1999), Comparative Genomic Hybridisation. *Mol Pathol*, 52(5) 243-251.

Yüce, H., Çelik, H., Gürateş, B., Erol, D., Hanay, F., Elyas, H. (2006) Karyotip Analiz Amacıyla Genetik Amniyosentez Uygulanan 356 Olgunun Retrospektif Analizi. Perinatoloji Dergisi, 14:2.

Yüreğir, Ö Ö, Büyükkurt, S., Koç, F., Pazarbaşı A. (2012) Prenatal Diagnosis. Archives Medical Review Journal, 21(1): 80-94

<http://www.umm.edu/graphics/images/en/19166.jpg>-koryon villus örneklemesi resmi

http://www.riversideonline.com/source/images/image_popup/pr11_percutaneous_umbilical_blood_sampling.jpg

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Seda EREN
- Doğum yeri ve tarihi: Kadıköy/04.02.1984
- Uyruğu.T.C.
- Medeni Durumu:Bekar
- Askerlik Durumu.-
- Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
- İletişim Adresi ve telefonu: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası
Tıbbi Genetik A.D. 41380 İzmit-KOCAELİ Tel: 0(262) 303 88 40

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

- İ.Ü.Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı-Yüksek Lisans (2006-2009)
- İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü-Lisans (2002-2006)
- Haydarpaşa Anadolu Lisesi-Lise(1998-2002)
- Yabancı dili
İngilizce

2. Unvanları

- Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D-Uzman Tıbbi Biyolog(2009-2010)
- Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.D-Araştırma Görevlisi(2010-)

3. Mesleki Deneyimi

- Periferik Lenfosit Kültürü
- Kemik İliği Kültürü

- Amniyon Kültürü
- Postnatal-Prenatal Kromozom Analizi
- Hematoloji-Onkoloji Sitogenetiği
- FISH
- Array CGH

5. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

6. Bilimsel Etkinlikler

- **S Eren**, B Doğruoğlu, Z İlkay, R U Akkoyunlu, E Gümüştü ,N Çine, D Sünnetçi, H Savlı. İnverson 9'un Klinik Önemi(poster sunumu). 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2012- Bursa
- **S Eren**, N Çine, B Doğruoğlu, Z İlkay, R U Akkoyunlu, E Gümüştü , D Sünnetçi, H Savlı. Incidence And Clinical Significance Of Pericentric Inversion Of Chromosome 9.(Supp.) ESHG-2012-Nürnberg/Almanya
- E. Gumuslu, N. Cine, D. Sunnetci, B. Kara, R. Akkoyunlu, **S. Eren**, H. Savli. Phenotypic Evaluation of 8q11.1-q11.23 Deletion In a Mental Retardation Patient. European Human Genetics Conference, June 23-26 2012, Nurnberg, Germany (poster bildiri)
- D Sunnetci, N Cine, B Kara, E Gumuslu, RU Akkoyunlu, **S Eren**, B Dogruoglu, N Uzulmez, H Savli. Mental retardasyonun molekuler tanisinda array cgh'in yeri. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19 - 23 Aralık 2012, Bursa (**poster bildiri**)
- E Gümüştü, N Çine, D Sünnetçi, RU Akkoyunlu, S Eren, H Savlı. 8q11.1-q11.23 delesyonlu dismorfik olgunun fenotip ve moleküler karyotip özelliklerinin değerlendirilmesi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19 - 23 aralık 2012, Bursa (**poster bildiri**)

- **S Eren**, B Doğruoğlu, Z İlkay, R U Akkoyunlu, E Gümüşlü, N Çine, D Sunnetçi, **H Savli**. İnversiyon 9'un klinik önemi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19 - 23 Aralık 2012, Bursa (**poster bildiri**)
- H Savli, D Sunnetci, N Uzulmez, E Gumuslu, D Yavuz, **S Eren**, B Enguzel, R Akkoyunlu, Z İlkay, N Cine. Yüksek Çıktılı FISH Paneli (High Throughput FISH Analysis) Analizleri: Hematolojik Malignite Analizinde Hassas Yeni Bir Tarama Seçeneği. (Poster Sunum) 36. Ulusal Hematoloji Kongresi-2010-Antalya 79
- D Yavuz, N Cine, Z İlkay, B Dal, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, **S Eren**, R Akkoyunlu, H Savli. Mutations frequency of the thrombosis risk factor genes in habituel abortus patients in the region of Kocaeli. (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- Z İlkay, N Cine, D Yavuz, B Dal, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, **S Eren**, RU Akkoyunlu, H Savli. Detection of MEFV gene mutation frequency patients Familial Mediterreanean Fever (FMF) in Kocaeli region. (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- N Cine, N Uzulmez, D Sunnetci, E Gumuslu, B Enguzel, S Eren, Z İlkay, D Yavuz, R Akkoyunlu, H Savli. High-throughput FISH analyses (HTFA): A new sensitive approach to screen hematological malignancies. (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- B Enguzel, N Cine, S Eren, D Sunnetci, E Gumuslu, Z İlkay, D Yavuz, N Uzulmez, RU Akkoyunlu, H Savli. Comparison of a-CGH and conventional cytogenetics in a primary amenorrhea case. (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- B Enguzel, N Cine, S Eren, D Sunnetci, E Gumuslu, Z İlkay, D Yavuz, N Uzulmez, RU Akkoyunlu, H Savli. Diagnostic value of a-CGH method for recurrent miscarriage and implantation failures. (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- N Cine, RU Akkoyunlu, E Gumuslu, D Sunnetci, N Uzulmez, B Enguzel, S Eren, D Yavuz, Z İlkay, H Savli. Value of array CGH in the evaluation of microdeletion syndromes. (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul
- E Gumuslu, N Cine, B Kara, D Sunnetci, N Uzulmez, B Enguzel, S Eren, R Akkoyunlu, Z İlkay, D Yavuz, H Savli. Application of array CGH method in two

18q21.31-q23 deletion patients. (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

- H Savli, D Sunnetci, N Uzulmez, E Gumuslu, D Yavuz, S Eren, B Enguzel, R Akkoyunlu, Z Ilkay, N Cine. Diagnostic use of targeted array CGH platforms: 2009-2010 Kocaeli University experience. (Poster Sunum) 9. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi-2010- İstanbul

