

9823

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CİNSİYET KROMATİNİ (BARR CİSİMCİĞİ) TAYİNİ VE NON-FONKSİYONEL
X-KROMOZOMLARININ KLİNİK TANIDA KULLANILMASI VE ÖNEMİ

Yüksek Lisans Tezi

Arş.Gör. Fahri UÇAR

T. G.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Trabzon - 1990

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CİNSİYET KROMATİNİ (BARR CİSİMCİĞİ) TAYİNİ VE NON-FONKSİYONEL
X-KROMOZOMLARININ KLİNİK TANIDA KULLANILMASI VE ÖNEMİ

Fahri UÇAR

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 30 / 05 /1990
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 26 / 06 /1990

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Ahmet KARAGÜZEL
Jüri Üyesi : Doç.Dr. Orhan DEĞER
Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Nejat GACAR
Enstitü Müdürü : Prof.Dr. Celâl BAKI

Trabzon - 1990

İ Ç İ N D E K İ L E R

ÖNSÖZ

I.	GİRİŞ.....	1
II.	GENEL BİLGİLER.....	3
II.1.	Cinsiyet Kromatini İle İlgili Sitogenetik Özellikler...	3
II.2.	Lyon Hipotezi ve Memelilerde Gen Dosaj-Kompenzasyonu..	6
II.3.	Memelilerde X Kromozomu İnaktivasyonunun Mekanizması...	11
II.4.	Cinsiyet Kromozomu Anomalileri İle Cinsiyet Kromatininin İlişkisi.....	14
II.5.	X-Linked Kalıtım Şekilleriyle Cinsiyet Kromatini İlişkileri.....	16
II.6.	Cinsiyetle İlgili Kromozomal Aberasyona Bağlı Hastalıklar ve Cinsiyet Kromatini İle İlişkileri.....	18
II.7.	Kromozom Anomalileri Sıklığı ve Toplum Sağlığı.....	20
III.	MATERYAL VE METOD.....	22
IV.	BULGULAR.....	25
V.	TARTIŞMA.....	30
VI.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
	ÖZET (Türkçe-İngilizce).....	36
	KAYNAKLAR.....	38

Ö N S Ö Z

Cinsiyet kromatini tayini ve non-fonksiyonel X kromozomlarının klinik tanıda kullanılması ve öneminin araştırıldığı bu çalışma, KTÜ. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmalar; literatür, laboratuvar ve klinik araştırmalar olmak üzere, üç aşamada gerçekleştirilmiştir. Laboratuvar çalışmaları dokuz aylık bir zaman aralığında (07.02.1989 - 31.10.1989) uygulanmış ve sonuçta metodun güvenli bir şekilde rutin olarak uygulanabileceği sonucuna kesin olarak varılmıştır. Klinik çalışmalar Farabi Hastanesi'nde yürütülmüştür.

Bu çalışma sırasında her türlü kolaylığı gösteren, bana rehber olan ve bilimsel katkılarını esirgemeyen tez hocam, Sayın Doç.Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e içtenlikle teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, çalışmayı proje olarak destekleyen KTÜ. Araştırma fonuna sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Gerek ders, gerek tez aşamalarında yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım, Sayın Prof.Dr. Recep BİNGÖL, Sayın Prof.Dr. E.Edip KEHA, Sayın Doç.Dr. Orhan DEĞER'e, Pediatri Öğretim Üyelerinden, Sayın Doç.Dr. Ali BAKİ ve Sayın Doç.Dr. Yusuf GEDİK'e ve servis doktorlarına, metodun başlangıcında çalışmamıza kobay sıçanlarla katkısı olan Sayın Hocam, Yrd.Doç.Dr. Nejat GACAR'a, tezin hazırlanması sırasında emeğini esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreteri Sayın Mehmet ÇOBAN'a ve emeği geçen herkese ve hasta yakınlarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Fahri UÇAR

I. G İ R İ Ő

Genetikte 1860 lı yıllardan sonra Mendel'le birlikte başlayan yeni gelişmeler ışığında insanoğlu kendi öz yapısını araştırmaya başlamıřtır⁶. Tjio ve Levan'ın⁴⁵ 1956 yılında yaptıkları periferik kan kültürü çalışmaları ile insanın kromozom yasının 46 olduğu ortaya çıkmıştır. Bu 46 kromozondan 44 tanesi (22 çift) otozomal, 2 tanesi de (1 çift) gonozomal kromozomlardır. Gonozomal kromozomlar (cinsiyet kromozomları) dişilerde XX, erkeklerde ise XY yapısındadır⁵⁸.

Dişi memeli hücrelerinde istirahat fazında (interfazda) görülen cinsiyet kromatini ilk defa 1949 yılında kedilerin sinir hücrelerinin morfolojileri üzerine incelemeler yapan Barr ve Bertram tarafından gösterilmiřtir³. Bu araştırmacılar (daha sonra Barr cisimciği diye de anılacak olan) cinsiyet kromatininin yalnız dişi kedilerin sinir hücrelerinde bulunduğunu, erkeklerde ise böyle bir kromatinin bulunmadığını tespit etmişlerdir. Daha sonra yapılan araştırmalar cinsiyet kromatininin sadece nöron hücrelerinde değil, memelilerin diğer hücrelerinde de bulunduğunu göstermiřtir⁶¹. Günümüze kadar bu konuda yapılan araştırmalar birbirini izlemiş ancak, X kromozomunun kalıtsal fonksiyonu ve dişilerde bir adet X kromozomunun genetik olarak inaktivasyonunun nedenleri halâ çok açık olarak anlařılamamıřtır²¹. X-linked (X e bağlı) gen ürünleri yönünden her iki cinsiyetin mensupları arasında bir farkın olmayışı konuyu daha da ilginçleřtirmiřtir¹⁹. Genin düzenlenme mekanizması ve modelinin tanımlanması yönünde, memelilerde X-linked gen-dosaj kompanzasyonu günümüzde araştırmalara odak noktası olmuřtur⁶⁷.

Açık olarak bilinen, cinsiyet kromatini; normal dişilerin (46, XX) somatik hücrelerinde, hücre siklusunun interfaz aşamasında görülen özel bir kromatindir⁵⁵. Cinsiyet kromatininin orijininin iki X kromozomundan bir tanesi olduğu kesinlik kazanmıştır. Özel boyama metodlarıyla görülebilen bu cisimciğin; bulunup-bulunmamasına göre,

hacmine göre ve yüzde oranlarına göre klinik anlamları vardır. Normal erkeklerde (46, XY) bir tek X kromozomu bulunduğundan, cinsiyet kromatini görülmez, yani yoktur (cinsiyet kromatini negatif). Normal kadınlarda ise, cinsiyet kromatini vardır (cinsiyet kromatini pozitif).

Cinsiyet kromatinine bağlı olarak, insanlarda bazı genital anomalilerin teşhisinin mümkün olabileceği 1954 yılında anlaşılmıştır. Gonozomal hastalıkların teşhisinde en önemli faktörlerden birisi, hastanın genetik yönden cinsiyetinin tayin edilmesidir. Bu konuda günümüzde iki metod sıkça kullanılmaktadır. Birincisi, cinsiyet kromatini tayini (Barr body, seks kromatini, X kromatini), diğeri de kromozom analizidir. Cinsiyet kromatini tayini ve inaktif X kromozomu metodu son yıllarda Turner, Klinefelter sendromları, hermafroditizm ...vb gibi bir çok seksüel gelişme anomalilerinin pratik bir teşhis metodudur⁵⁸.

Biz bu araştırmamızda; konu ile ilgili yapılan çok sayıda araştırmayı da inceleyerek, hastanemize başvuran, cinsiyet anomalisi düşünülen ve bölümümüze cinsiyet kromatini analizi isteğiyle gönderilen hastaları, cinsiyet kromatini açısından değerlendirdik. Laboratuvarımızda çeşitli boyama metodlarını deneyip, fiziksel ve biyokimyasal parametrelerin metodoloji üzerine etkilerini araştırarak, güvenli bir analiz metodunu uygulamaya koyduk. Ayrıca, klinik tanıya yardımcı olacak periferik kan kültürü çalışmaları ve amniyosentez gibi metodların laboratuvarımızda yapılması yönünde bir başlangıç ve alt yapı oluşturmayı amaçladık.

II.GENEL BİLGİLER

Cinsiyet kromatini (Barr Body), X kromatini), dişi memelilerin soma hücrelerinde interfaz safhasında görülen özel bir kromatin olup, 0.7-1.4 μ çapında, DNA yapısında, nuklear membranın iç yüzeyine tutunmuş, koyu boyanan özel bir cisimciktir (Resim 1). Normal erkekler böyle bir cisimcik taşımazlar^{56,62}.

Cinsiyet kromatini ilk defa 1949 yılında dişi ve erkek kedilerin hypoglossal sinirlerinin elektriksel uyarımlarının araştırıldığı bir çalışmada fark edildi. Barr ve Bertram tarafından yürütülen bu çalışmada dişi kedilerin motor nukleuslarında kolayca görülebilen bir kitle dikkati çekmiştir. Çalışmalar ilerledikçe bu kitlenin erkek kedilerde bulunmadığı ve dişi kedilerin tüm soma hücrelerinde bulunduğu anlaşılmıştır. Aynı araştırmacılar cinsiyet kromatininin yapısının çekirdekçik gibi RNA değil, DNA olduğunu bulmuşlardır⁵⁸. Bugün bu araştırmacıların birinin ismine izafeten cinsiyet kromatinine Barr Body denmektedir. Moore adlı araştırmacı 1953 yılında insanların dişilerinde de aynı kromatini göstermeyi başarmıştır.

Bu yolla insanlarda genital yol hastalıklarının teşhisinin mümkün olabileceği düşünülmüş ve 1954 te Turner sendromlu (45,X0) bir hastanın normal kadınların aksine cinsiyet kromatinine sahip olmadığı ortaya konmuştur. Bir yıl sonra (1955) yanak mukozasından (buccal smear) cinsiyet kromatini elde etme metodu geliştirilmiş ve kısa bir süre sonra da Klinefelter sendromlu (47,XXY) erkeklerin hücrelerinde normal erkeklerin aksine bir adet cinsiyet kromatinine sahip oldukları bulunmuştur^{19,52}. Yanak mukozasından cinsiyet kromatini tayin metodu, geniş populasyon taramalarına ve populasyonun gonozomal kromozomlar yönünden araştırılmasına imkân vermiştir⁵⁸.

II.1. CİNSİYET KROMATİNİ İLE İLGİLİ SİTOGENETİK ÖZELLİKLER

Dişilerde görülen cinsiyet kromatini, daha önce sanıldığı gibi X kromozomlarının birleşmesi sonucu değil, yalnız birisinin kondenzasyonu sonucu meydana geldiği 1956 yılında dişi sıçanların

karaciğer dokusunda pozitif heteropiknozis gösteren -U- şekilli cisimciklerle açıklanmıştır^{21,1}. DNA'nın radyoaktif timidinle (H^3) işaretlenerek yapılan otoradyografi çalışmalarında, cinsiyet kromatinini meydana getiren X kromozomunun replikasyona diğer homologundan daha geç başladığı ve geç bitirdiği bulunmuştur^{48,29}.

Doğacak çocuğun cinsiyetinin tayininde; gonozomal kromozomlardan mayoz bölünme sonucu anneden zigota daima X kromozomu, oysa babadan ya X yada Y kromozomu verilecektir. Böylece babadan X kromozomu gelirse, doğacak çocuk kız, Y kromozomu gelirse, doğacak çocuk erkek olacaktır. Demekki; doğacak çocuğun cinsiyetinin belirlenmesi kromozomal olarak babaya aittir. Annenin ise, babasından almış olduğu X kromozomunu tercihli olarak erkek çocuklarına verebileceği tahmin edilmektedir^{12,36}.

Cinsiyet kromatini, primer oosit gibi bazı dokular hariç, hemen hemen tüm dokularda görülebilir. Dokunun kolay elde edilmesi bakımından epitel dokular tercih edilir. Özellikle yanak mukozası en çok kullanılan örneklerdir. Normal kadınların yanak mukozasından yapılan preparatlarda % 17.00-20.00 oranında cinsiyet kromatini bulunur. Bu oran hücre dinamiğiyle ilgilidir. Bilindiği gibi, interfaz + mitoz; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere beş evreli olup, bunların tümüne hücre siklusu denir. Yanak mukozası sürekli yenilenen bir doku olduğundan, her evrede hücre bulunacak ve teorik olarak her evrede hücreler % 20.00 oranında görülecektir. Bölünme bakımından sürekli istirahatta (interfazda) olan hücrelerde (örneğin, nöronlar) bu oran % 85.00 lere kadar çıkabilir. Normal erkeklerin cinsiyet kromatini değeri % 0.00 olmasına karşın, bazen boyanma hatalarından dolayı % 2.00-3.00 e varan değerler normal kabul edilir^{4,5}.

Herhangi bir hücredeki cinsiyet kromatini sayısı ile o hücrenin X kromozomu sayısı arasında bir bağıntı söz konusudur Tablo 1. Bu kural hücre için geçerli olduğu gibi, şahıslar için de geçerlidir. Şöyleki, normal bir kadında (46,XX) bir adet, 47,XXY erkeklerde bir adet cinsiyet kromatini görülür. Oysa 45,XO ve 46,XY kromozom yapılı kişilerde cinsiyet kromatini görülmez. 47,XXX (triple-X) kadınlarda, 48,XXXXY, erkeklerde ikişer adet cinsiyet kromatini görülür^{19,24}. Demekki; cinsiyet kromatini sayısı daima X kromozomu sayısından bir eksiktir. Formülle gösterirsek;

$$B = n-1$$

B = Barr Body (cinsiyet kromatini) sayısı

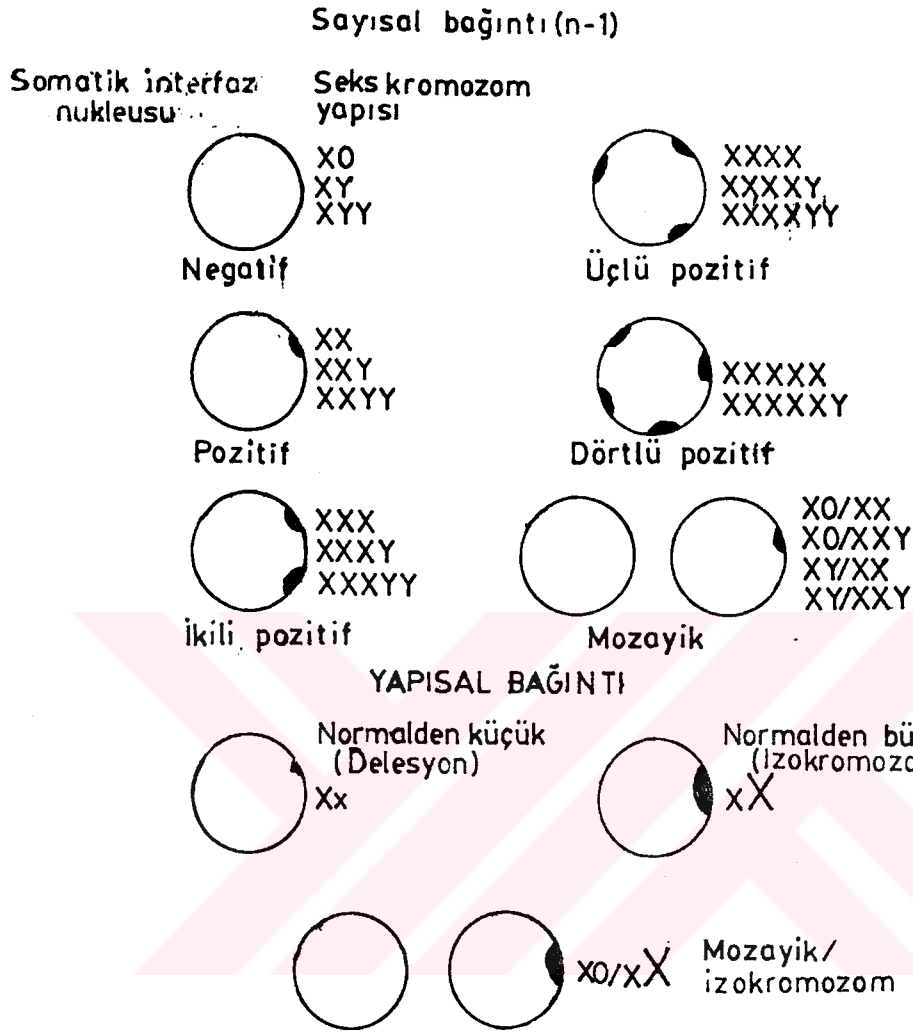
n = Total X kromozomu sayısı

dır.

Bu durum, cinsiyet kromatininin X kromozomu ile direkt ilişkili olduğunu açık bir şekilde göstermektedir. Üzerinde dikkatle durulması gereken bir durum da, cinsiyet kromozomu yönünden mozayik vakalardır. Bunlar da cinsiyet kromatini sayısı mozayikliğin derecesine göre % 0.00 ile normal değerler arasında seyrederek. Örneğin; XO/XX mozaisizmi gösteren Turner sendromlu bir vakada cinsiyet kromatini oranı genelde % 10-15 arasındadır. X kromozomu ile cinsiyet kromatini arasında sadece sayısal değil, aynı zamanda yapısal (hacimsel) bir ilişki de mevcuttur. Yapısal anomali gösteren X kromozomları genelde geç DNA sentezinde bulunurlar, dolayısıyla cinsiyet kromatinini meydana getirirler. Delesyonlu vakalarda cinsiyet kromatini küçük, izokromozom durumunda ise büyük olacaktır^{21,38} Şekil 1. Dişilerin lökositlerinde görülen "drum-stick" (davul tokmağı) inaktif X kromozomunun değişik bir görünüş biçimi olup, normal kadınlarda % 5.00 oranında görülmektedir^{55,62}.

Tablo 1. Cinsiyet Tayini ve n-1 Kuralı (V.A.Mc.Kusick, 1974)

Sendrom	Fenotip	Fertilite	Barr Body Sayısı	Cinsiyet Kromozomu yapısı
Normal erkek	Erkek	+	0	XY
Normal kadın	Kadın	+	1	XX
Turner Sendromu	Kadın	-	0	XO
Klinefelter Sendromu	Erkek	-	1	XXY
XYY Sendromu	Erkek	+	0	XYY
Triple-X Sendromu	Kadın	+	2	XXX
Triple X-Y Sendromu	Erkek	-	2	XXXY
Tetra X Sendromu	Kadın	?	3	XXXX
Tetra X-Y Sendromu	Erkek	-	3	XXXXY
Penta-X Sendromu	Kadın	?	4	XXXXX



Sekil 1. Cinsiyet kromozomlarının cinsiyet kromatini ile sayısal ve yapısal ilişkisi (Levin H. 1971 Modifiye edilerek)

II.2. LYON HİPOTEZİ VE MEMELİLERDE GEN DOSAJ-KOMPENZASYONU

II.2.1. Lyon Hipotezi

Erkek ve kadınlar arasında gonozomal yönden bir fark olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir. Kadında büyük kromozomlardan olan X kromozomundan çift doz yani iki adet bulunmasına karşın, erkekte aynı büyüklükte tek bir X, bir de küçük Y kromozomu vardır. X-linked gen ifadesi yönünden erkekler hemizigot olmasına karşın, erkek ve

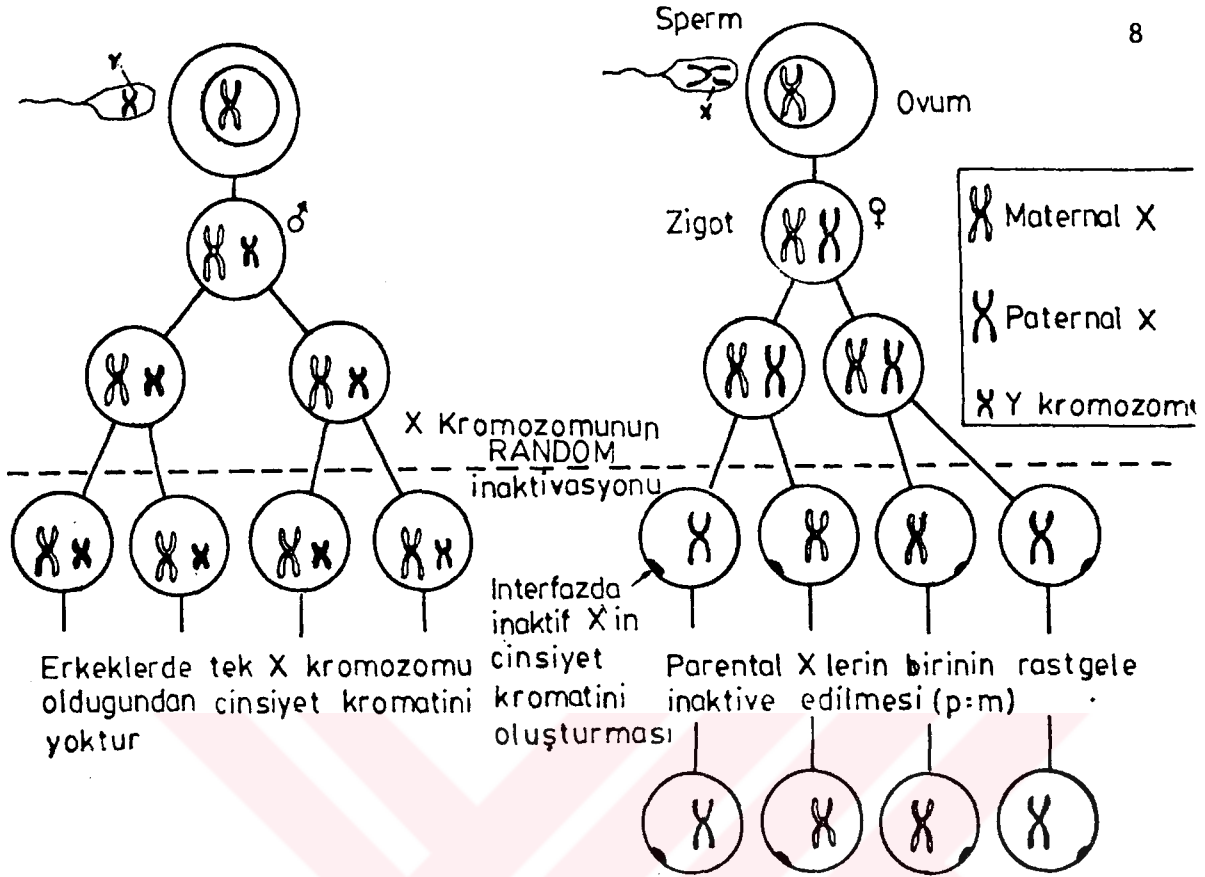
kadınlarda gonadların ayrı hormon yapmaları dışında iki cinsiyet arasında biyokimyasal yönden bir fark mevcut değildir. Daha da ilginç olanı, yapımları, X kromozomu üzerindeki genlerin kontrolü altında olan bazı proteinlerin miktarları yönünden de iki cins arasında bir farkın bulunmayışıdır. Örneğin, yapımları X kromozomu üzerindeki genler tarafından kontrol edilen Anti-hemofilik globulin (AHG) Christmas faktör (PTC) ve Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) ın kadın ve erkeklerde aynı miktarlarda olduğu bilinmektedir⁵⁸. Oysa, kadında iki, erkekte de bir X kromozomu olduğuna göre, 2:1 oranı beklenirdi⁶².

Dr. M. F. Lyon 1961 yılında farelerde X e bağlı heterozigot genlerin fenotipik etkileri üzerine açıklayıcı bilgiler verdi. Kısa bir süre sonra bu hipotezin tüm memeliler ve bunun sonucu olarak insanlar için de geçerli olduğu anlaşıldı^{38,52}.

Lyon hipotezine göre;

1. Dişilerde cinsiyet kromatini genetik olarak inaktif olan heteropiknotik X kromozomundan türemiştir. Başka bir deyişle, dişi memelilerde iki adet X kromozomundan biri genetik bakımdan inaktiftir. Bu inaktivasyon embriyoda çok erken gelişme devirlerinde meydana gelir (12-16. günde).
2. İnaktivasyon rastgele ve bağımsız meydana gelir. Böylece bazı hücrelerde maternal, bazılarında da paternal X kromozomları inaktivasyona uğrayacaktır. Sonuçta, bir dişi organizmanın soma hücrelerinin % 50.00 sinde maternal, % 50.00 sinde paternal kökenli X kromozomları inaktif X kromozomlarını meydana getirecektir ($p=m$) (son zamanlarda X kromozomlarının tercihli olarak da inaktive edildiği bilinmektedir $p \neq m$).
3. Embriyonik gelişmenin erken safhalarında (16. günde) meydana gelen fonksiyonel inaktivasyon, bir defa meydana geldikten sonra irreversible hale gelir. Yani mitozla oluşacak yeni hücrelerde hep aynı X kromozomu fonksiyonel inaktivasyona uğrayacaktır^{19,26,38} Şekil 2.

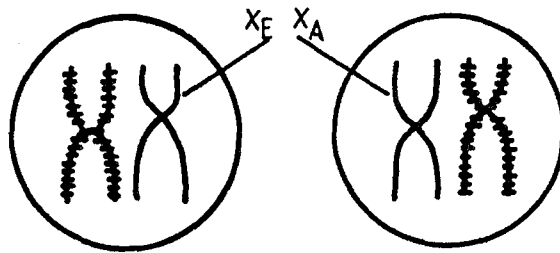
Tek aktif X kuralı veya Lyon hipotezi, dişi keseli memelilerden olan eutherianlarda % 50.00 şansla ($p=m=0,5$) ya maternal ya da paternal X kromozomlarının inaktive olmasıyla tam olarak gerçekleşir. Biz buna random (= rastgele) X inaktivasyonu diyoruz. Bu oranın eşit olmadığı durumlarda ($p \neq m$) inaktive edilecek X in seçimi yine rastgele yapıldığından, her iki grup için de random terimini kullanabiliriz⁶⁷.



Şekil 2. Lyon Hipotezi: Embriyonik hayatın 12-16. günlerinden itibaren XXcinsiyet kromozomu yapılı dişilerin her bir somatik hücresinde X kromozomunun random inaktivasyonu (Harry Levine 1971)

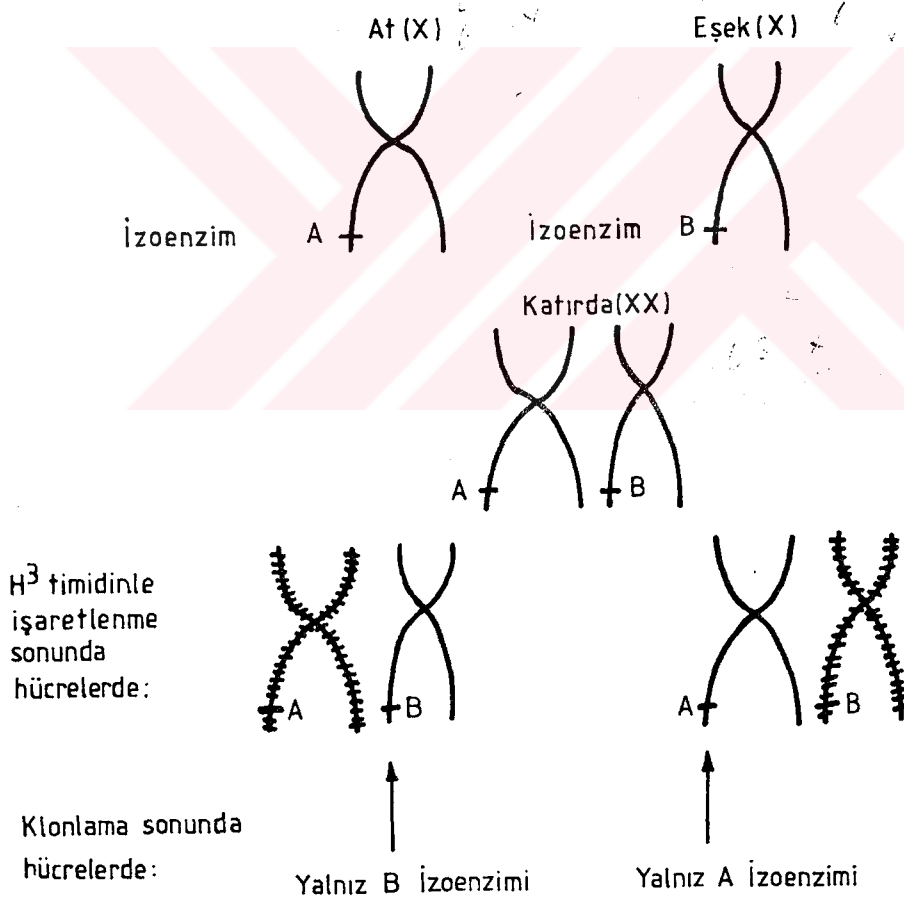
Hipotez şu sitogenetik ve genetik delillere dayanır; At ile eşeğin hibridi olan katırda morfolojik olarak farklı iki X kromozomu vardır. Timidinle (H^3) işaretlenerek yapılan otoradyografik çalışmalarda belirli bir süre sonra bu X lerden yalnız birisi işaret almıştır^{58,61}

Şekil 3.



Şekil 3. Lyon hipotezinin sitogenetik olarak ispatlanması: Katır hücrelerinden bir kısmında maternal, bir kısmında ise paternal X kromozomu inaktivasyona uğramakta ve H^3 timidin ile işaret almaktadır (X_E = eşekten gelen X kromozomu, X_A = attan gelen X kromozomu).

Genetik bulgu olarak da, heterozigot kadınların eritrositlerinde G-6-PD tayini yapılmış, G-6-PD (+) ve G-6-PD (-) olmak üzere iki tip hücre popülasyonu taşıdıkları anlaşılmıştır. Yapılan histokimyasal boyamalarda, mutant geni taşıyan X kromozomu boya almış (inaktif), normal geni taşıyan X kromozomu ise boyanmamıştır (aktif). Davidson, Nitowsky ve Childe deneylerinde G-6-PD için heterozigot kadınların derifibroblast kültürlerini yaparak karışında hem A hem de B enzim varyantını elektroforezle göstermelerine karşın, tek hücre kolonlarında ya A ya da sadece B varyantı gösterilmiştir. Hiçbir klonunda da yaptığı deneyde: sitogenetik ve genetik bulguları aynı organizmada göstermiştir Şekil 4.



Şekil 4. Sitogenetik ve genetik bulguların aynı organizmada gösterilmesi (K.Tayşi, B.Say, 1975).

Sonuçta inaktivasyonun % 50.00 eşitlikle olmadığına, bazen bu oranın % 90.00 a kadar değişebileceğine işaret etmiştir^{42,58,62}.

II.2.2. Memelilerde Gen-Dosaj Kompensasyonu

İnaktif X-kromozomu üzerindeki tanımlanmış bir gen, aktif X kromozomu üzerindeki homologundan daha az ürün vermektedir. Bu olayın oluşması X kromozomu üzerindeki bazı genlerin ifadesini değiştiren bir sınıf genetik element tarafından başarılmaktadır^{44,48}. Dosaj-kompensasyonunu sağlayan inaktif X kromozomunun; geç replike olmak, yüksek oranda kondanse olmak ve DNA metilasyon modelini değiştirmek gibi bazı karakteristikleri vardır. İnaktif X üzerinde açıklanan aktif bir gen geç S fazına kadar replike olmaz. Böylece hücre siklusunun küçük aralıklarında iki kopya olarak ifade edilecek ve dolayısıyla daha az ürün verecektir. Diğer yandan kromatin kondanse olmuşsa DNA'nın anormal metilasyonu ile transkripsiyonu yavaşlatmış olabilir. Bunun sonucu olarak; dosaj-kompensasyonu, birtek aktif X tarafından başarılı ve genlerin transkripsiyonel aktivitesinde bir yükselmeyi icap ettirir^{13,46}.

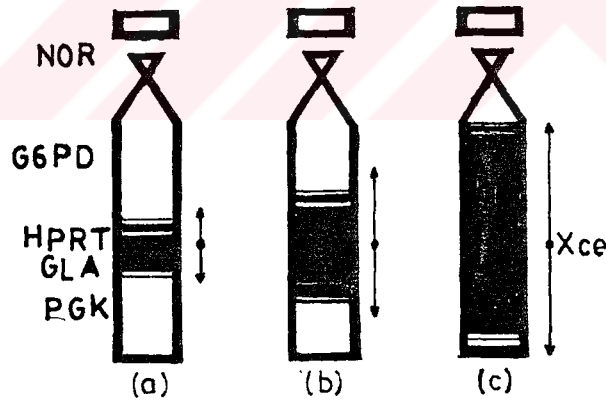
İnaktivasyonda ilginç olan bir başka durum da şudur; Eğer X lerden biri üzerinde zararlı bir mutasyon söz konusu ise daima bu X kromozomu inaktive edilir. İkisi de farklı gen bölgelerinden arızalı ise, arızası çok olan inaktive edilip yalnız sağlam kısımları aktif kalır. Buna karşılık olarak aktif X kromozomunun da arızalı kısımları inaktive edilir. Bu bulgulardan birincisi kromozomal düzeyde, ikincisi de gen düzeyinde mozayikliğin bir örneğidir^{48,58}.

İnaktif X kromozomunun durumu "S" periyodunda gerekli muameleler yapılarak metafaz aşamasında sitolojik olarak belirlenebilir. İnterfaz sırasında bir Nükleer Chromocenter gibi görünen Barr Body bu transkripsiyonel inaktivitenin bir sitolojik görünümüdür^{7,51}. İşte burada toplam hücresel düzeyde transkripsiyonel inaktivite ile geç replikasyon arasında bir korelasyon olduğu görülmekte ve geç replike olan bu kromozomlar inert olarak nitelendirilmektedir. Demekki; inaktif X kromozomunun geç replike olması, aşırı derecede yoğunlaşması ve değişik bir metilasyon kalıbı göstermesi, üzerinde taşıdığı genlerin ürün miktarı ve fonksiyonu üzerine etki etmektedir^{48,59}.

II.3. MEMELİLERDE X KROMOZOMU İNAKTİVASYONUNUN MEKANİZMASI

Gelişme esnasında X kromozomunun inaktivasyonunun meydana gelmesi ve kontrolü aşağıdaki kademelerde gerçekleşir.

Trofektoderimde 12. günde başlayan inaktivasyon 16. günde embriyoda ve tüm komplekste ise 19. günde sona erer⁴². Farelerde yapılan X-otozom translokasyon çalışmalarında; otozom içindeki X kromozomlarının segmentlerinden birisinin daha geç replike olduğu bulunmuştur⁴⁰. Bu inaktivasyon olayı X kromozomu üzerinde bir noktadan başlayıp, sonuna kadar devam eder Şekil 5. Yapılan çalışmalar sonucunda; inaktivasyon olayında X kromozomunun kendiliğinden aktivite kaybetmediği, aktivitenin kaybolması için inaktivasyon merkezinden (Xq13-Xq21) salınan sinyallere ihtiyaç olduğu ve gelen sinyallerin kromozom boyunca yayılmasıyla inaktivasyonun meydana geldiği ortaya çıkarılmıştır^{18,23,41}. Memelilerde her partikular genin inaktivasyonunun derecesi (genişliği, boyu, mesafesi) onun inaktivasyon merkezinden uzaklığı ile ilgilidir⁶⁷.



Şekil 5. Dokuya özgü inaktivasyonun yayılması ve paternal X kromozomunun uzun kolunda HPRT ve GLA locusları arasında bulunan kontrol elementi (Xce).

İnaktivasyon olayı meydana gelirken, X kromozomunda bir takım değişiklikler gözlenir. Kıvrılıp-katlanmalar meydana gelir. Bu kıvrılıp-katlanmalar, erken embriyonik hücre kademelerinde başlar ve hücrelerin bölünmesiyle, farklılaşmasıyla devam eder. Hücrelerin farklılaşmasının sonucunda, kromozomlar üzerindeki genlerde de bir

farklılaşmanın oluşması söz konusudur. Aslında bu olay, genlerde başlar, kromozomlarda devam eder ve hücrelerin farklılaşmasına sebep olur^{25,40,41}. Metafazda 46 kromozomun hepsi kısalır, kalınlaşır ve kromatin flamentleri halinde heliks olarak yoğunlaşır. Kromatinin heliks veya spiral şekle gelmesi profazda başlayan bir olay olup, metafazda en üst seviyeye ulaşır. Telofazda ise, tekrar çözülür. Tüm kromozomların yoğunlaştığı metafazda inaktif X kromozomunun Xq1 bölgesinde alınsılmışın dışında yoğun bir kıvrılıp-katlanma vardır. Homologunun Xq1 bölgesinde ise çok nadir olarak kıvrılıp-katlanma olayı görülür^{38,65}.

İnsan metafaz kromozomlarındaki bu kıvrılıp-katlanmalar ve sonuçta oluşan bantlar rastgele dağılmamışlardır¹⁷. Genel olarak kıvrılıp-katlanma, kromozom uzunluğuna, kol uzunluğuna ve sentromer pozisyonuna göre değişir. Bir kromozomun kıvrılıp-katlanmasının sıklığı kromozomların nisbi uzunluğuyla doğru, sentromer indeksi ile ters orantılıdır¹¹. Metasentriklerde daha çok, akrosentriklerde daha az kıvrım vardır. Kıvrılıp-katlanma olayı non-sentromerik bölgelerde de kol uzunluğuyla doğru orantılı olup, bu kurala inaktif X kromozomu Xq13-Xq21 bölgesi uymamaktadır. Çünkü inaktif X kromozomunun Xq13-Xq21 bölgesinde normalin üzerinde bant sayısı bulunmuştur^{17,54}. Bu nedenle, Barr cisimciğinin sitolojiksel bir fazlalığının bulunduğu tahmin edilmektedir. Adı geçen bu bölgeler (Xq13-Xq21) Barr Body yoğunlaşması için merkez olarak kabul edilmektedir. İnaktivasyon olayının da bu merkezden yönetildiğine dair ağırlıklı görüşler mevcuttur⁶⁵.

Bir tek locus olarak bulunan bu merkezin, X kromozomunun genetik inaktivasyonunu, kıvrılıp-katlanarak bantlaşmasını ve Barr Body olarak yoğunlaşmasını kontrol etmesinin mümkün olabileceğine dair ağırlıklı görüşler mevcuttur⁶⁴. Normal kadınlar ve Klinefelter erkeklerde X in birinde kıvrılıp-katlanmalar daha sıkça görülür. Oluşturdukları kavisler sentromerde evrenseldir. Kavislerin frekansı için sebep ne olursa olsun, Lyon hipoteziyle ilgilidir. Yani birisi inaktive olacak ve dosaj kompenzasyonunu sağlayacaktır⁶⁶.

İnaktivasyonun nasıl yayıldığını anlamak için metilasyon analizi iyi bir yoldur. Yapılan çalışmalar, izlenen yollar sonucunda; X in kendi kendini tanıdığı ortaya çıkmıştır⁴². Metilasyon çalışmalarıyla inaktivasyonun çeşitli görünümleri (başlaması, yayılması, kendi kendini tanıması ve reaktivasyonu) daha iyi açıklanmıştır. Çünkü, antimetil ajanlardan olan 5-azacytidin ve benzerleriyle inaktif X kromozomu

muamele edilirse, fazla metillenmekten kurtulacak ve aktif hale gelebilecektir (5-azacytidin inaktif X in represyonunu tamamen gideremez). DNA metilasyonunun özel bir modelini gösteren inaktif X kromozomu üzerindeki bazı kısımlar oldukça iyi metillenir⁴². HPRT, G-6-PD ve PGK enzimleri X e bağlı genlerden üretilirler. Bu üç enzimin genlerinin metilasyon analizleri sonucunda, bir kromozomun ~~hatta~~ genin hipermetilasyonu ile inaktivasyonu arasında bir korelasyon ortaya çıkmıştır⁴⁰. Gerek otozomlarda ve gerekse gonozomlarda bir kromozom üzerindeki herhangi bir bölge metillenmişse, o bölge inaktif demektir. Eğer kromozomun büyük bir kısmı metillenmişse, total inaktivasyondan söz edilebilir. İnaktif X kromozomu üzerinde yapılan metillenme işleminde guanin-sitozince zengin bölgeler ile 5' ucunun aşırı metillendiği bulunmuş, buradan da G-C ce zengin bölgelerin 5' ucunda yer aldığı ortaya çıkmıştır^{15,40}.

Özel metilasyon kalıbı gösteren inaktif X kromozomu üzerindeki bazı genler (STS, MIC2X ve ARC...gibi) inaktivasyondan kaçarak dişilerin soma hücrelerinde her iki X kromozomu üzerinde de daima ifade edilirler^{25,50}. X kromozomları üzerinde bulunan nukleus organizier bölgenin (NOR) sürekli aktif olduğu ve metilasyonunun farklı olduğu da bilinen deliller arasındadır^{35,53}.

Sonuç olarak; eğer bir gen veya kromozomun büyük bir bölümü metillenmişse, inaktif, tersi durumlarda da aktif sayılır. Bu olayın stabil hale gelmesi; hangi genin aktif, hangisinin inaktif olacağı ise, otokontrol mekanizmalarıyla başarılır^{21,42,70}.

Canlıların kendi kendini tanımasında, homolog kromozomlar gelişimleri sırasında anne-baba orijinlerine göre farklı davranırlar. İlk günlerde aktif olan her iki X kromozomundan babadan gelenler tercihli olarak inaktive edilirken, anneden gelenler adeta inaktivasyona rezistan hale gelirler³². Tercihli inaktivasyondan kasıt, dişilerde inaktivasyon merkezinden gelen sinyallere göre paternal X kromozomlarının inaktive veya elimine edilmesidir. Farklı canlı gruplarında farklı inaktivasyon veya eliminasyon modelleri söz konusu olup, bunlar; keseli memelilerin Eutherianlarında random ($p=m$)^{30,67,73}. Marsupiallerinde non-random, ($p \neq m$) insanlarda daha çok non-random inaktivasyon, uçan Sciara'da paternal X kromozomları, Coccidlerde de tüm

paternal kromozomlar elimine edilirler^{32,43}.

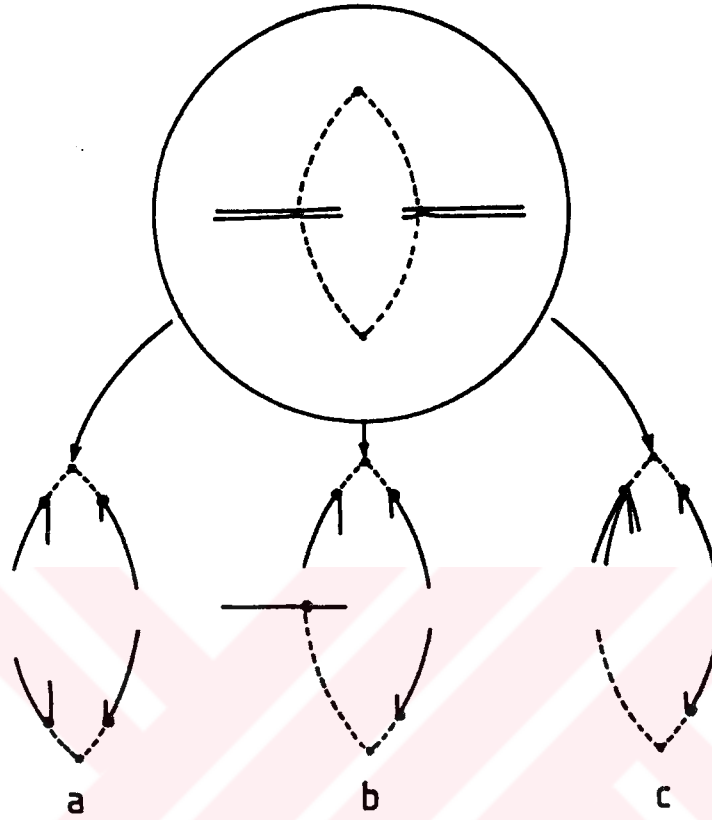
Muscular distrofili hastalarda bazen normal X kromozomu tercihli olarak inaktive edilir. Çünkü, aktif X kromozomu üzerindeki gen mutant olduğundan, bunun yerine, inaktif X kromozomu üzerindeki sağlam locus aktif olarak kalır. Bu örneğe XLA ve SCID genleri de dahil edilebilir^{16,22,58}. Kısaca tercihli inaktivasyon, otokontrol mekanizmalarıyla başarılan irreversible bir olaydır^{29,57}.

İnaktif X kromozomu zamanla (yaş ilerledikçe veya taze mutasyon gibi bazı etkenlerle) aktivite kazanabilir. Bu aktivite kazanma olayına reaktivasyon denir. Reaktivasyon olayı yapay olarak meydana gelebileceği gibi, doğal koşullarda da spontan olarak meydana gelebilir⁶⁷. Reaktivasyonun oluşabilmesi, özel gelişme sinyallerine ihtiyaç duyar ki, bu sinyaller de "aktivasyon merkezinden" salınırlar⁴². Böylece inaktif X kromozomu üzerinde inaktivasyon merkezinden başka bir de aktivasyon merkezinin olduğu anlaşılmaktadır⁴⁷.

Sonuç olarak; X kromozomu inaktivasyon mekazinması, inaktivasyonun başlaması, yayılması, X kromozomunun özel metilasyon kalıbı ve tercihli inaktivasyonuyla kendi kendini tanınması ve reaktivasyon kademelerinde meydana gelmektedir.

II.4. CİNSİYET KROMOZOMU ANOMALİLERİ İLE CİNSİYET KROMATİNİNİN İLİŞKİSİ

Kromozomlarda çeşitli anomaliler görülmesine rağmen, bunlar temelde ya yapısal yada sayısal olmak üzere iki grupta toplanırlar. Bunlardan ayrı birde aynı zigottan türeyen farklı kromozom yapısının bir organizmada bulunduğu mozaikizm vardır⁵⁸. Yapısal anomaliler, delesyon, translokasyon, duplikasyon, inversiyon, izokromozom ve ring kromozom gibi değişik şekillerde görülebilir. Sayısal kromozom anomalileri ise; diploid kromozom sayısından bir veya birkaç kromozomun eksilmesi yada artmasıyla meydana gelirler. Sayısal anomalilerin oluşum mekanizması, gametogenez esnasında kromozomların birbirinden ayrılmaması (non-disjunction) veya anafazda kutuplara çekilmede geç kalma (anafaz-lagging) ilkesine dayanır. Sonuçta bir gamete normal veya fazla kromozom giderken, diğerine aynı kromozomdan hiç gidemeyecektir Şekil6. Bir hücre (zigot) 45,X0 olurken, diğeri normal veya 47,XXY, 47,XXX gibi trizomik olabilecektir Tablo 2.



Şekil 6. Kromozomların; a) Normal ayrılma, b) non-disjunction ve c) Anafaz-1'de olayları (K.Tayşi, B.Say, 1975).

Tablo 2. Cinsiyet Kromozomlarında Muhtemel Non-disjunction Tipleri (Roberts JAF, Pembrey, M.A., 1985)

Normal Yumurta	Anormal Sperm	Zigotun Seks Kromozomu	Sendrom
X	XY	XXY	Klinefelter (47,XXY)
X	XX	XXX	Triple - X(47,XXX)
X	YY	XYY	XYY (47,XYY)
X	O	XO	Turner (45,XO)
Anormal Yumurta	Normal Sperm		
XX	Y	XXY	Klinefelter(47,XXY)
XX	X	XXX	Triple - X(47,XXX)
O	X	XO	Turner (45,XO)
O	Y	OY	Yaşayamayacak (45,Y)

Sayı anomalileri euploidi ve aneuploidi olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Euploidi; kromozom sayısının haploid sayının tam katları şeklinde artmasına denir. Örneğin, insan için haploid sayı 23 tür. 46,XX, 46,XY diploid (normal), 69,XXX, 69,XXY...triploidi... vb. durumlar ise anormal olacaktır. Aneuploidi ise, diploid kromozom sayısından bir veya birden fazla kromozomun eksilmesine veya artmasına verilen genel bir addır. 45,X0 monozomiye, 47,XXX, 47,XXY de trizomiye bir örnek teşkil ederler^{6,52}.

Euploidi

- a. Haploidi-n
- b. Diploidi-2n
- c. Triploidi-3n
- d. Tetraploidi-4n

Aneuploidi

- a. Hipoploidi (2n-1, 2n-2)
- b. Hiperploidi (2n+1, 2n+2) gibi

Yapı ve sayı anomalilerinden başka cinsiyet kromozomlarında sıkça görülen mozaikizm, aynı zigotun erken dönemlerinde hücreler bölünürken, bir hücreye eksik, diğerine normal veya fazla kromozom gitmesi ile oluşabilen, anafaz-log ve non-disjunction'la meydana geldiği tahmin edilen bir anomali çeşididir^{45,61}. Örneğin; 45,X0/46,XX gibi.

Tablo 3 de Sık görülen cinsiyet anomalileri verilmiştir.

II.5.X-LINKED KALITIM ŞEKİLLERİYLE CİNSİYET KROMATİNİ İLİŞKİLERİ

X-Linked kalıtım, X kromozomunun üzerinde taşıdığı genlerle dominant ve resesif olmak üzere iki tiptir^{2,71}. Hemofili, renk körlüğü, Norrie hastalığı G-6-PD noksanlığı, SCID,XLA, Darier hastalığı...vb. hastalıklar X-Linked resesif gruba girerler. Böyle durumlarda özellikle taşıyıcılarda ve hasta mozaiklerde, mutant geni taşıyan X-kromozomu tercihli olarak inaktive edilmeye çalışılır. Böylece Barr Body oluşturularak, olması muhtemel bir anomali ortadan kaldırılmış olur^{22,34,58}.

X-Linked resesif ve dominant genlere bağlı sendromlar dışında dominantlık ve resesifliğin sözkonusu olmadığı ve X in fragile bölgelerine bağlı olarak gelişen mental retardasyonlar görülür. Fragile bölgelerin oluşumu:

Tablo 3. Sık Görülen Cinsiyet Anomalileri

Sendrom	Kromozom yapısı	Cinsiyet	Ebeveyn Yaşının etkisi	Defekt	Cinsiyet Kromatini(+,-)	Barr Body Sayısı	İnsidans
TURNER	45,XO ve varyantları	♀	Yok	1 tane X kromozomu eksik	Negatif	-0-	1/4500 (ortalama)
TRIPLE-X	47,XXX	♀	Var, ileri yaş	1 tane fazla X kromozomu	Pozitif	-2-	0.8/1000
TETRA-X	48,XXXX	♀	Var, ileri yaş	2 tane fazla X kromozomu	Pozitif	-3-	?
PENTA-X	49,XXXXX	♀	Yok	3 tane fazla X kromozomu	Pozitif	-4-	?
KLİNEFELTER	47,XXY ve varyantları	♂	Var, ileri yaş	1 tane fazla X kromozomu	Pozitif	-1-	1/500, geri zekalarında % 1, infer - tiplerde % 3
FRAGILE-X	46,XY	♂	Var, ileri yaş	X _q 27-q28 de kayıp	Negatif	-0-	Erkeklerde 1/1000 ?
NORMAL ♀	46,XX	♀	-	Yok	Pozitif	-1-	
NORMAL ♂	46,XY	♂	-	Yok	Negatif	-0-	

1) DNA spiralizasyonu, 2) Viral DNA modifikasyonu, 3) DNA sentezi sırasında timidin monofosfat (TMP) oluşumuna bağlıdır. Fragile taraf X kromozomunun X_q 27,3 segmentinde oluşmaktadır. Bu bölgede bir ek (gap) veya bir kırık olarak görülmektedir. Sonuçta, X kromozomu iki satellitli bir konfigürasyonda görülmektedir. Mental retardasyonlu erkeklerde % 2.00-10.00 arasında bulunduğu rapor edilmiştir⁸.

Fragile-X, etkilenmiş erkeklerin hücrelerinin % 35.00 inde görülür. Anneleri ise genelde taşıyıcıdır⁶⁹, Eğer fragile X taşıyıcısı kadınlarda otokontrol mekanizması çalıştırılıp, ek kısmı taşıyan X kromozomu tercihli olarak inaktive edilirse, bir problem oluşmaz. Şayet, fragile X değilse, sağlam X inaktive edilirse, mental retardasyon oluşur^{20,33}. Sonuç olarak X-linked resesif genin veya fragile X in inaktive edilmesiyle inaktivasyon oranına göre klinik problemler ortaya çıkar^{43,68}.

II.6. CİNSİYETLE İLGİLİ KROMOZOMAL ABERASYONA BAĞLI HASTALIKLAR VE CİNSİYET KROMATİNİ İLE İLİŞKİLERİ

Cinsiyetin oluşumu ve fenotipik yansıması çok yönlü ve biraz da karmaşık bir olaydır. Olayın psikolojik ve sosyal boyutları da vardır. Bu açıdan bakıldığında, göz önüne alınması gereken faktörleri şöyle sıralayabiliriz.

- a. Dış genital yapılarının görünümü
- b. İç duktus sisteminin gelişimi
- c. Gonadal cinsiyet
- d. Endokrinolojik cinsiyet
- e. Genetik cinsiyet
- f. X-kromatini sonucu cinsiyet
- g. Kromozomal cinsiyet
- h. Psikolojik cinsiyet
- i. Sosyal cinsiyet

Bütün bu faktörler incelendiğinde; muhakkak ki, olayın genetik yani, kromozomal yönü en baskın faktörlerin başında gelir ve diğer faktörleri de etkiler. Polikliniklere gelen hastalardan cinsiyet anomalisi yönünden şüpheli olanlarda ilk başvurulacak tetkiklerden birisi cinsiyet kromatini analizidir. Cinsiyet kromatini analizinin sonucu, eğer gerekirse kromozom analizi ile desteklenir. Hastanın tıbbi ve psikolojik değerlendirilmesinde bu analizlerin sonucu ışık tutucu niteliktedir.

Hastalarda aşağıdaki endikasyonlar cinsiyet kromatini analizini gerektirir^{6,58}.

- a. Yeni doğan kız bebeklerinde el ve ayaklarda izah edilemeyen ödem
- b. Kısa boylu kız bebekler ve çocuklar
- c. Kızlarda inguinal herni
- d. Primer amenore
- e. İnterseks halleri (Vahim epispadiyas ve hipospadiyas dahil)
- f. İnmemiş testislerin olduğu vakalar
- g. Erişkin erkeklerde uzun boy ve önkoidizm
- h. Erişkin kadın ve erkeklerde infertilite

II. 6.1. Cinsiyet Kromatinin Pozitif Olduğu Vakalar

Klinefelter, Triple-X, Penta-X sendromları ...vb. gibi vakaların yanında gerçek hermafrodit, karmagonadal disgenezis, erkek pseudohermafrodit ve kadın pseudohermafrodit gibi fetal endokrin bozuklukları grubuna giren hastalıklar da pozitif sonuçlar verebilir. Gerçek hermafroditizmde kromatin pozitif oranı % 80.00 dir. Yani vakaların % 80.00 inde kromatin pozitifdir. Bütün kadın pseudohermafroditlerde kromatin pozitif sonuç verirler ve 46,XX kromozom yapısında olmakla beraber, bunların 46,XX/46,XY kromozom yapısında olanları da bilinmektedir. Kromatin analizi ve kromozom analiziyle teşhis konamazsa, laporatomı yapılmalıdır^{37,58}.

II. 6.2. Cinsiyet Kromatinin Negatif Olduğu Vakalar

Bu grubun en önemli vakası Turner sendromudur. Bundan başka diş genitalleri anormal ve cinsiyet kromatini analizi sonucu negatif olan hastalarda; karma gonadal disgenezis, erkek pseudohermafroditizm, gerçek hermafroditizm ve erkek Turner sendromu düşünülür.

Bu grupta ayırıcı teşhis kromatin pozitif gruba göre daha zordur. Yalnız bu hastaların çoğu infertil olacağı için, sonuca kolay gidilir. En önemli teşhis kriteri; Turner sendromunda boyunda yelelenme, kubitus valgus, saç çizgisinin düşüklüğu, kısa boy...vb. diğerlerinde ise, gonadların skrotumda bulunup-bulunmamasıdır. Bütün ailevi pseudohermafroditler 46,XY karyotipinde iken, karma gonadal disgenezisde XO veya Y kromozomu ihtiva eden mozayiklik söz konusudur^{5,58}.

II. 7. KROMOZOM ANOMALİLERİ SIKLIĞI VE TOPLUM SAĞLIĞI

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar; kromozom anomalilerinin sıklığının klinikte görülenin çok üzerinde olduğu şeklindedir. Hamileliğin ilk 3 ayı içindeki spontan düşüklüğün % 15.00 civarında olduğu ve bunların % 50.00 sinin kromozom aberasyonu yüzünden düştüğü belirlenmiştir. Yeni doğan bebeklerin ancak % 0.5.00 inde kromozom anomalisinin görülmesi, genetik özürü olan fötusların intrauterin devrede kaybedildiğinin işaretidir. Hele kırsal alanda nüfusu fazla olan ve doğumların evlerde yapıldığı alanlarda, kültür düzeyinin düşüklüğü, sağlık şartlarının yetersizliği ve akraba evlilikleri gözönüne alınırsa, kromozom anomalisi insidansının gerçekten çok daha fazla olduğu düşünülebilir.

Spontan düşük materyallerinde en sık görülen cinsiyet anomalisi Turner sendromudur. Çıkan sonuca göre Turner sendromu olgularının % 95.00 i intrauterin hayatta kaybedilirken, tespit edilebilenler ancak gerçek sayının % 5.00 i kadardır. Ayrıca, cinsiyet kromozomu trizomilerinin (XXX, XXY, XYY...gibi) intrauterin hayatta kaybedilme oranları da düşüktür ki, bu sebeple kliniklerde cinsiyet kromozomu trizomisi vakaları sıkça görülmektedir.

Genel kromozom anomalileri (Gonozomal+Otozomal) populasyonda % 0.5.00 oranında görülmekte ve % 50.00 si hiçbir klinik bulgu vermemektedir. Bulunan bu anomalilerin yarısını cinsiyet, diğer yarısını da otozomal kromozom anomalileri oluşturmaktadır. Bir organizmada (insan) 22 çift otozomal, 1 çift de gonozomal kromozomun bulunuşu oran olarak düşündürücüdür. Organizmada en sık görülen cinsiyet kromozomu sayı anomalileri 47,XXY, 47,XYY ve 45,XO sendromlarıdır. Yapı anomalileri olarak da izokromozom, ring kromozomu ve translokasyonlar ağırlıktadır. Triple-X 1/1.000, Klinefelter 1/500, Turner 1/4.500 ve Fragile-X erkek doğumlarda 1/1.000 oranında görülür^{31,49,58}.

Toplum sağlığı açısından kromozom anomalilerinin önlenmesi; anomali gösteren zigot sayısının azaltılmasıyla mümkündür. Annenin hamileliği dönümünde fötusda herhangi bir hastalığın olup-olmadığı araştırılır. Eğer tedavi edilemeyecek bir hastalık teşhis edilirse, anneye terapotik düşük şansı sağlanmalıdır³¹. Artık günümüzde tıp koruyucu tedaviye yönelmiştir⁴⁹.

Hamilelik esnasında ftusun herhangi bir genetik anomali taşıyıp taşımadığı konusunda son yıllarda dikkate değer çalışmalar yapılmaktadır. Tüm bu çalışmalar, insan genetiğinde klinik yönden "prenatal teşhisi" ön plana çıkarmıştır. Bu konuda yapılan çalışmaları şu başlıklar altında toplamak mümkündür;

1. Koryon villus örneklemesi (CVS)
2. Amniyosentez
3. Fetal kan örneklemesi
4. Ultrasonografi

Kromozom anomalilerinin oluşum nedeni, halen açıkça bilinmediği için, bu işin kolay olmayacağı açıktır. Elimizde virus enfeksiyonları, non-disjunction, anafaz-lagging, ilaçlar, otoantikolar ve iyonize radyasyonların sorumlu olduğunu tutan destekleri kuvvetli hipetozler mevcuttur^{49,58}.

III. MATERYAL VE METOD

III.1. KULLANILAN MATERYALLER

III.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- a. Etil alkol - Tekel
- b. HCl - Merck
- c. Eter - Birpa
- d. Ksilol - Sp/Malinckrodit
- e. Kanada Balzamu - Merck

III.1.2. Kullanılan Kimyasal Boyalar

- a. Cresyl violet asetat - Sigma
- b. Cresyl fast violet - Merck

III.1.3. Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar

- a. % 70, 95, 96 ve absolü etil alkol serileri
- b. % 5 lik HCl
- c. Saf eter - % 95 lik etil alkol karışımı (1:1) tespit solüsyonu (fikzatif)
- d. % 0.5 lik Cresyl violet asetat ve Cresyl fast violet boyası (0.5 gr. 100 ml dH₂O da çözülür)

III.1.4. Kullanılan Cam ve Diğer Malzemeler

- a. Lâm (76x26 mm)- Munelglaser
- b. Lamel (18x24 mm)-Deckglaser
- c. Şale (Coplinjar)-Şişecam
- d. Abeslang (tahta spatül)
- e. Işık mikroskobu - Olympus (CH₂, BHT)

III.2. NUMUNENİN (EPİTEL HÜCRELERİ) ELDE EDİLMESİ

Cinsiyet kromatini, kuramsal olarak tüm vücut hücrelerinde gösterilebilir. Ancak, elde edilmesinin kolaylığı bakımından epitel hücreleri tercih edilir. Bu yüzden çalışmamızda yanak mukozası (Buccal smear) kullanılmıştır.

Numunenin alınmasından önce fikzatif olarak saf eter+% 95 lik etil alkol (1:1) solüsyonu bir şale içinde hazırlanmıştır. 4-5 adet lâm alınmış ve işaretlenmiştir. Steril abeslanglar (spatül) daha önce hazırlanmıştır. Hastanın ağızı temizlettirilmiş ve daha sonra nazik bir hareketle yanak mukozası hafif daireler çizilerek kazınmıştır. İnce bir tabaka halinde çok sayıda epitel hücresi elde etmek amaçlanmıştır.

III.3. FİKZASYON VE BOYAMA

Lamlar hazır olan fikzatifte kommuş ve en az 1 saat bu fikzatifte bekletilmiştir. Böylece numune boyanmaya hazır hale getirilmiştir.

Cinsiyet kromatini; cresyl violet, orcein, thiosiyanin, pinaciyanol, gallocyanin, bazik fuksin ve metil green gibi bazik DNA boyalarıyla boyanır. Bu boyalar nukleik asitlerin fosfatlarına bağlanabilen boyalardır³⁹.

Boyama Metodu

Laboratuvarımızda yaptığımız boyama denemelerinde en iyi sonuç cresyl violet boyası ile elde edilmiş olduğundan, yalnız cresyl violet boyama metodu verilmiştir.

Boyama

1. (1:1) oranında alkol-eter karışımında fikse edilen lâmlar % 70 lik etil alkolde yıkanır.
2. Adı suda yıkanır (çeşme suyu)
3. % 5 lik HCl de 5 dakika bekletilip, hidroliz edilir.
4. Adı suda yıkanır
5. % 0.5 lik cresyl violet boyasında 10 dakika boyanır.
6. Adı suda yıkanır.
7. % 70 lik etil alkolden geçirilir.
8. Ksilolden geçirilir.
9. Kurutulur.
10. Kanada balzamu damlatılıp lamel kapatılır.

III.4. BOYANAN HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Boyanan en az dört preparatta her preparat için 100, toplam $100 \times 4 = 400$ hücre değerlendirilmiştir. Cinsiyet kromatini (Barr Body) sayısı eğer % 0 - % 2-3 oranında ise sonuç (-) tir. Burada görülen % 2-3, Barr Body, boyama sırasında oluşan artefaktlar olarak değerlendirilir. % 17 ve daha üstü ise, cinsiyet kromatini pozitif (+) olarak kabul edilmiştir.

% 2-3 ün üzerinde ve % 17 nin altında elde edilen sayılar mozayik bir vakayı düşündürülebilir. Bu durumda daha güvenilir bir sonuca gitmek için numune alma işi yeniden tekrarlanır.

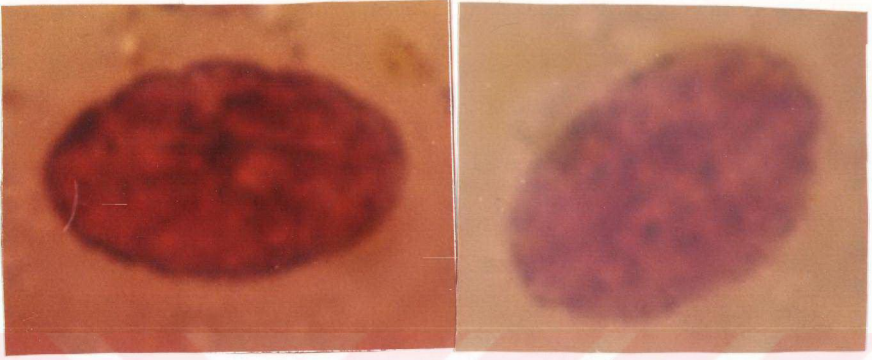
Yukarıda belirlenen sayılar her hücre için 1 adet Barr Body hesabıdır. Ancak, bazen bir hücrede 2 veya daha fazla Barr Body bulunabilir. Böyle durumlarda da yüzdelerin değerlendirilmesinde her hücre için 1 adet Barr Body hesabıyla değerlendirme yapılır.

IV. BULGULAR

Bu araştırma KTÜ. Farabi Hastanesinin Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Kadın Doğum ve Üroloji polikliniklerine başvuran hastalar üzerinde yapıldı. Dokuz aylık bir zaman aralığında (07.02.1989 - 31.10.1989) bu polikliniklere başvuran 2070 hastadan poliklinik muayenelerinde herhangi bir cinsiyet anomalisi düşünülen 12 hasta anabilim dalımıza cinsiyet kromatini analizi isteğiyle gönderildi.

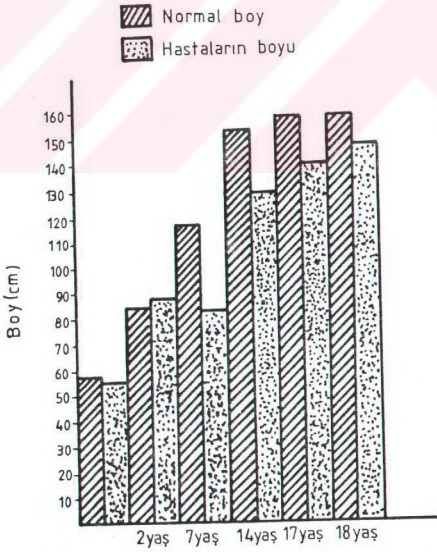
Cinsiyet kromatini analizi açısından incelemeye alınan bu 12 hasta ile ilgili bulguları şöyle sıralayabiliriz;

1. Yapılan cinsiyet kromatini analizlerinin sonuçları kurulan analiz metodunun sonuçlarının güvenilir olduğunu ve metodun rutin olarak kullanılabilceğini göstermiştir (Resim 1.2).
2. Bu hastaların erkeklerde inmemiş testis olgusu, kızların ise boy kısalığı, gelişme geriliği, cubitus valgus ve primer amonere, psikolojik bozukluklar vb. gibi şikayetlerle polikliniklere başvurduğu tespit edilmiştir.
3. Cinsiyet kromatini açısından taranan 2070 hastadan 1010 tanesi fenotip olarak erkek, 1060 tanesi ise kızdır. İncelediğimiz 12 hastanın fenotip olarak 7 tanesi erkek (% 58,3), 5 tanesi de kızdır (% 41,66).
4. Bu 12 hastada yapılan cinsiyet kromatini analizlerinde 5 adet kız hastada poliklinikçe düşünülen cinsiyet anomalisi doğrulanmıştır. Bunlardan 4'ü Turner sendromu, 1 tanesi de mozayik olarak düşünülmüştür. Bunlardan ovulasyon yaşında olan 4'ünde infertilite söz konusudur. Turner sendromlu hastalarda sendromun tipik belirtileri olan gelişme geriliği tespit edilmiştir (Şekil 7).
5. Klinik bulgulara göre anomali belirlenen 12 hasta ve cinsiyet kromatini açısından anomali belirlenen 6 hasta akraba evliliği, anne-baba yaşı ve doğum sayısı açısından değerlendirilmiş, bu hastalardan 9 tanesinin akraba evliliği sonucu doğduğu dikkati çekmiştir. Anomali doğrulananan 6 hastanın 4.



Resim 1. Cinsiyet kromatini (+) hücreler (Cresyl violet boyası, 100x10 büyütme)

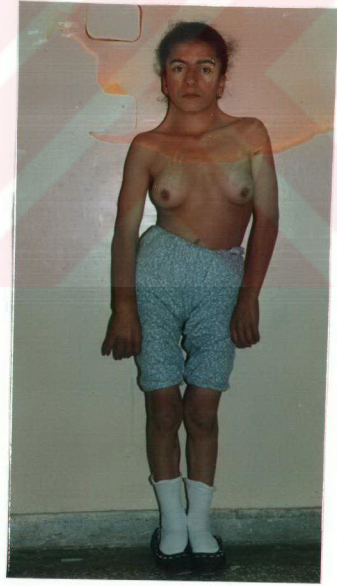
Resim 2. Cinsiyet kromatini (-) hücreler (Cresyl violet boyası, 100x10 büyütme)



Şekil 7. 5 adet kız, 1 adet erkek hastada; normal boy değerleriyle, hastaların boy değerlerinin karşılaştırılması.

tanesi akraba evliliği sonucu doğan çocuklardır. Hastaların ailenin kaçınıcı çocuğu olduğuna bakıldığında, cinsiyet anomalisi doğrulanan 6 hastanın da 5. veya daha sonraki doğumlarda doğdukları belirlenmiştir. Bu 6 hastanın anne-baba yaşlarının anlamlı olarak büyük olduğu da bir başka önemli faktör olarak görülmüştür (Anne yaşı ortalaması: 34.8, baba yaşı ortalaması: 37.8).

6. Turner sendromlu hastalarda; gelişme geriliğinin yanında, sendromun tipik fenotipik görünümü olan boyunda yelelenme, meme uçlarının uzak oluşu, bebeklerde el ve ayakta izah edilemeyen ödem ve ovulasyon şikayetleri bu sendromun tipik bulguları olarak bulunmuştur (Resim 3,4).



Resim 3,4 Turner sendromlu iki ayrı vakanın fenotipik görünümü (Gelişme geriliği, Cubitus valgus, boyunda yelelenme).

7. Kız hastalardan bir tanesinde cinsiyet kromatini % 7.00 olarak belirlenmiştir. Bu durumda, bu hastanın mozayik olduğu düşünülmektedir. Ancak, bu bulgunun doğrulanabilmesi için hastanın periferik kan kültürü yapılacaktır.
8. Klinikçe cinsiyet anomalisi düşünülen 12 hastadan diğer 6 tanesinin de yapılan cinsiyet kromatini analizleri en azından bu anomalilerin cinsiyet kromatinine bağlı olmadığını göstermektedir. Muhakkak ki, bizim çalışma konumuzun çerçevesi dışında kalan ve anomaliye neden olabilecek diğer faktörleri göz ardı etmemek gerekmektedir.

Tablo 4 de hastalara ait bulgular verilmiştir.



1	B.B.	♂, 31/365	50 cm, 4200 gr 54,5cm, 4800 gr *	24 y	27 y	Var, hala dayı çocukları	2. çocuk	(-), % 0.00	Mikropenis, labioskrotal füzyon düşük saç çizgisi, kubitus valgus Erkek Turner SND.?
2	U.D.	♂, 2 y	83 cm, 13,5 kg 84.7-12.360 kg	24 y	24 y	Var, hala, dayı çocukları	1. çocuk	(-) % 0.00	Mikropenis, bilateral asiyopeksi Cirsümisyon. Sağlam çocuk.
3	M.K.	♂, 2 y	82 cm 15 kg 84.7cm-12360 gr	27 y	30 y	Var	5. çocuk	(+), % 20.00	İmmemiş testis. Ameliyat yapıldı. Rudimenter uterusu var. Hermafrodit.
4	F.E.	♂, 2,5 y	84 cm, 12 kg 89.2, 13.279 kg	26 y	29 y	Yok	3. çocuk	(-), % 3.00	Muayene sırasında gördüğü tedavi sonucu testisleri indii. Sağlam çocuk.
5	B.K.	♂, 10/365	47 cm, 2500 gr 51 cm, 3800 gr	30 y	30 y	Var, Hala-dayı çocukları	6. çocuk	(-), % 1.00	İmmemiş testis, Labioskrotal füzyon. Adrenogenital SNO.?
6	S.S.	♂, 5 y	101 cm, 15 kg 106cm, 17860 kg	34 y	34 y	Var, Amca çocukları	3. çocuk	(-) % 0.00	Bilateral kriptorşidizm, Ameliyat yapıldı. Testisleri bulundu. Sağlam çocuk
7	P.B.	♂, 14/365	40 cm, 3600 gr 52cm, 3900 gr	21 y	26 y	Var, Amca çocukları	2. çocuk	(-), % 2.00	Hypogonadizm, yarık damak (+) kol ve bacaklarda kasılma. Erkek Turner SND.?
8	F.A.	♀, 7 y	83 cm, 12 kg 117cm, 21.450 kg	30 y	29 y	Var, Amca çocukları	7. çocuk	(-), % 0.00	Kubitus valgus, ptosis, boyunda yeleleme, saç çizgisi düşük saç çizgisi Turner SND.
9	H.S.	♀, 2/12 ay	56 cm, 12 kg 56,7cm, 5090 gr	35 y	42 y	Yok	5. çocuk	(-) % 0.00	Ayaklarında ödem, boyu kısa meme başları uzak, saç çizgisi düşük. Turner SND.
10	E.K.	♀, 18 ay	147cm, 33,5 kg 160cm, 53.400 kg	42 y	48 y	Yok	10. çocuk	(+) % 7.00	Kısa boy, kubitus valgus, meme oluğunu yetersiz, saç çizgisi düşük, primer amenore. Mozayik Turner SND.
11	R.D.	♀, 17 y	140 cm, 39 kg 159 cm, 51900 gr	40 y	43 y	Var, Hala dayı çocukları	6. çocuk	(-), % 0.00	Meme başları uzak, boy kısa, pubik kıllanma yok. USG'de uterüs hipoplazik, Kubitus valgus. Turner SND.
12	A.T.	♀, 14 y	130 cm, 34,5 kg 153.5cm, 46.090 kg	35 y	35 y	Var, Dayı Teyze çocukları	6. çocuk	(-), % 3.00	Büyüme geriliği, boyunda yeleleme Kubitus valgus, göğüsleric gelişimi tedaviye bağlı. Turner SND.

* Yaşa göre normal boy ve ağırlık değerleri

V. TARTIŞMA

Bu araştırmada, elde edilen materyallerde boyama ile net şekilde gösterilmiş olan cinsiyet kromatini, kadınlarda bulunan X kromozomlarından bir tanesinden meydana geldiği ve hücre siklusunun interfaz fazında gösterilebildiği tartişmasız bir bulgudur ve yapılan çok sayıdaki araştırma da bunu destekler niteliktedir^{3,4}.

Cinsiyet kromatininin yalnız interfaz nükleuslarında görülebilmeleri, diğer fazlarda görülememeleri ilk bakışta bu yapıları esrarlı oluşumlar gibi göstermesine rağmen, hücre siklusunda kromatin materyalin şekil değiştirmesi düşünöldüğünde, bu mekanizma daha anlaşılır hale gelecektir. Erken metafaz hücrelerinde yapılan araştırmalarda Xq1-Xq21 bölgeleri arasında (yani X in uzun kolunda) replikasyonda oluşabilecek bir gecikme, bir kondenzasyona yani yoğunlaşmaya neden olacaktır^{9,65}. Mitoz sonucunda telofazda kromozomu oluşturan segmentlerin dolayısıyla DNA+histon proteinlerin yeniden açılarak nükleusa amorf ve yaygın bir yapı olarak dağılması sırasında X in bazı bölgelerinin bu oluşuma katılmadıklarını düşünmekteyiz. Replikasyon mitozun "S" (Sentez) fazında gerçekteştiğine göre, aktif X üzerindeki bir gen "erken S" fazında replike oluyorsa, inaktif X üzerindeki aktif genler "geç S" fazında replike olacaklardır. Dolayısıyla hücre siklusunun genişçe bir bölümünde genin erken replike olan homologundan bir tek doz mevcut demektir. Böylece S fazının 10 saat olduğu bilindiğine göre, ilk iki saati sonunda tamamen replike olan aktif X in üzerindeki gen 20 saatlik hücre siklusunun 8 saatinde tek doz olarak (G₁ fazı 6 saat+S fazının 2 saatlik bölümü) ifade edilirken, 12 saatlik dilimde ise, çift doz olarak ifade edilecektir. Geç replike olan X, 16. saatte (G₁ fazı 6 saat + S fazı 10 saat) kendini tamamlayacağı için, üzerindeki aktif genler yalnız 4 saat çift doz olarak ifade edilecektir^{14,27,48}. Bu duruma göre şu sonucu çıkarabiliriz; geç replike olan X in erken replike olana göre % 75.00 daha az fonksiyonel olduğu ortaya çıkmaktadır. Total gen ürününün miktarı ile S fazının uzunluğu arasında bir pozitif ilişki olduğu bilindiğine göre, DNA nın hücre siklusunda

şekillenmesinde önemli rolü olan histon tipinde proteinlerin de yeteri kadar sentezlenememesi inaktivasyonun bir başka nedenidir. Yapılan araştırmalar inaktivasyon olayının bir mekrezden yönetildiği ve bu merkezin insanlarda $X_{q13} - X_{q21}$ bölgeleri arasında olduğunu gösterir niteliktedir^{64,72}. Buradan; inaktivasyon olayının pozitif bir proje olduğunu ve hücre siklusunun farklı kademelerinde meydana gelen değişikliklerden etkilenmeyen, daima aynı kararlılıkta kalmayı başaran inaktif X kromozomunun sitolojikselsel bir fazlalığının var olduğunu anlamaktayız. Hatta, bu konuda inaktivasyona uğrayan genlerin nedenleri açık olarak bilinmeyen sebeplerden tekrar reaktive olduğunu iddia eden araştırmalar vardır^{28,60}. Bu olayın yaşlanma ile ilgili olabileceği ve birtakım patolojik olaylara (kanser gibi) neden olduğu da bazı araştırmacılar tarafından iddia edilmektedir^{1,42,47}. Biz de; reaktivasyonla birlikte cinsiyet kromatini oranının azalacağını tahmin etmekteyiz. Nitekim, yaşlı kadınlarda cinsiyet kromatini oranının düşmesi bü yüzdendir.

Bugün inaktivasyon konusunda geçerli olan Lyon hipotezinin açıklayamadığı birçok bilinmeyenler vardır. Örneğin;

1. X kromozomunun birden fazla olduğu hallerde, biri hariç diğerleri inaktif hale geleceğinden, XXX veya XXXX genomdaki şahıslarda niçin anomali oluşmaktadır? İlginç olarak X kromozomu sayısı arttıkça, anomali de artmaktadır.
2. Normal kadınlarda 2X kromozomundan birisi inaktif olacağından, tek fonksiyonel X kromozomu kalacaktır. Turner sendromunda (XO) tek aktif X olduğu halde, niçin anomali mevcuttur?
3. XXY genomdaki Klinefelter sendromu normal erkeklerden (XY) farklıdır. Bu fark, XXXY gibi X kromozomu sayısının arttığı hallerde niçin daha fazla belirginleşmektedir?

Bu tartışmalı sorulara, bugün çok açık sonuçlar verilememesinin nedeni, bugün insan genomunun gen seviyesinde tamamen tanınamamasının bir sonucudur. Bilindiği gibi, insan genomunda 6×10^9 baz çifti vardır. Bugün ise, tanınan genetik markerlerin (Primer) sayısı birkaç bindir. Bu konuda yapılan gen haritaları (=gen mapping=gen library) çalışmaları sonucu bu sorulara daha tatminkar cevapların verilebileceğini düşünmekteyiz. Bu konular ise, bizim araştırmamızın sınırlarını aşmaktadır.

Araştırmamızda belirlediğimiz cinsiyet kromatini oranları (erkekler için negatif, % 0.00 - % 3.00, dişiler için pozitif, % 17.00 - % 20.00) birçok laboratuvarın ve araştıracının kabul ettiği oranlara paraleldir^{2,6,58}. Ayrıca, cinsiyet kromatininin metoduna düşük ısıların etki ettiğini (az boyanma veya hiç boyanmama gibi) gözlemlemiş bulunmaktayız.

Cinsiyet kromatininin görülme oranlarına, hastanın yaşı, kullandığı ilaçlar ve menstrual siklusu etki etmektedir. Hayatın ilk birkaç gününde cinsiyet kromatini oranının normalin çok altında olmasına, bu kız bebeklerinde östrojen hormonunun yüksek seviyede oluşu sebep gösterilmektedir. Cinsiyet kromatini oranı, hayatın 9-10 uncu gününden sonra normal seviyeye ulaşır. Yaşlı kadınlarda ise, bu oran tekrar düşer^{38,39}. Migeon BR. ve arkadaşlarına göre X kromozomunun aktif veya inaktifliğini östrojen seviyesinin etkilediği anlaşılmaktadır⁴⁶. Hayatın ilk birkaç gününde bu düşük oranları laboratuvarımızda gözlemlemiş bulunmaktayız ve kesin sonuç için hastaların en az 10 günlük olmalarını önermiştik.

Normal kadınlara östrojen, prednisone, ACTH, testesteron ve progesteron gibi terapötik ajanlar verildiği zaman, cinsiyet kromatini insidansı baskılanır. Dietilstilbestrol ise, bu oranı yükseltir. Antibiyotikler de cinsiyet kromatinini şekil yönünden bozar, hatta ikiye ayırır. Örneğin; Actinomycin - D . Kadınların 19-38 yaşları arasında (üretken yaşlarda) menstrual sikluslarının 9-12. günlerinde cinsiyet kromatini yüzdesi düşük çıkmaktadır^{21,38,39}. Bize göre, sözü edilen bu etkenlerden hormonların yüzdeyi düşürdüğü, fakat etki mekanizmasının nasıl olduğu kesinlikle bilinmemektedir. Antibiyotikler, protein sentezi, DNA replikasyonu ve hücre zarını etkilediği için, DNA yapısında olan Barr Body yi de etkilemiş olacaktır. Menstrual siklusun 9-12. günlerinde hormonların yükselmesi(prednisone) ve diğer biyokimyasal metabolik olayların bu oranı etkileyebileceği düşünülmektedir.

Total kromozom anomalilerinin toplumdaki yaşayan fertlerde görülme insidansı % 0.5.00 dir. Bunun aşağı-yukarı yarısı cinsiyet anomalileridir (% 0.25.00). Bizim araştırmamızda, polikliniklere başvuran 2070 hastadan 12 hastada cinsiyet anomalisi düşünülmüştür. Burada görülme sıklığı % 0.57.00 dir. Bu sonuç, genel popülasyona göre yüksektir. Kanımızca bunun nedeni, polikliniklere başvuranlar

herhangi bir sağlık nedeniyle başvurmuştur ve burada bir yığılma söz konusudur. Çünkü, araştırma bir populasyon taraması değildir. Diğer yandan, cinsiyet kromatini endikasyonu tesbit edilen hastaların 6 adet olduğu düşünülürse, bu oran, % 0.30.00 çıkacaktır. Böylece, genel populasyondaki insidans ile bir uyum söz konusudur. Ancak, incelediğimiz 12 vakanın daha güvenli istatistikî sonuçlara varmak için yetersiz olduğunu düşünmekteyiz. 9 aylık araştırma peryodunda polikliniklere başvuran 2070 hastadan cinsiyet anomalisi düşünülen hastaların sayısı vaka sayımızı sınırlamıştır. Bununla birlikte, elde edilen oranlar diğer araştırmalarda verilen oranlara yakındır (Genel % 0.25.00, Bulgumuz % 0.30.00).

Kromozom anomalilerini oluşturan etkenler arasında akraba evlilikleri önemli bir yer tutar. Bölgemizde akraba evliliklerinin Türkiye ortalamasının üzerinde olduğu (Türkiye ortalaması % 21.00, Karadeniz Bölgesi % 26.00) bilinmektedir⁶³. Yukarıda belirtilen insidansın yüksek oluşunun nedenlerinden birisi de akraba evlilikleri olabilir. Çünkü, cinsiyet anomalisi düşünülen 12 hastanın 9 tanesi akraba evliliği yapmış ailelerin çocuklarıdır.

Cinsiyet kromatini analizi hastanın cinsiyetinin belirlenmesinde tek başına kesin bir yol değildir. Ancak, cinsiyetin belirlenmesinde ve cinsiyet anomalilerinin teşhisinde öncelikle başvurulacak en pratik ve güvenilir yollardan birisidir. Alınacak sonuca göre, teşhis, diğer tetkiklerle de (örneğin; kromozom analizi, hormonal tetkikler, dermatoglifik bulgular...vb.) desteklenmelidir.

Bu araştırmada gelen vakalara sitogenetik bulgular açısından yaklaşılmış ve analiz sonuçları ilgili kliniklere gönderilmiştir. Teşhis konusundaki son kararı vermek bizim araştırma alanımız dışındadır. Ancak, olayın teknik yönü ile klinik yönünün karşılıklı bilgi aktarımı ile birlikte değerlendirilmesinde yarar gördüğümüzü açıklamakta fayda görmekteyiz.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dokuz aylık zaman periyodunda (07.02.1989 - 31.10.1989) KTÜ. Farabi Hastanesinin Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Üroloji ve Kadın Doğum polikliniklerine başvuran 2070 hastanın 1010 tanesi erkek, 1060 tanesi kızdır. Bunların 12 tanesinde (7 erkek, 5 kız) cinsiyet anomalisi düşünülmüş ve bölümümüze cinsiyet kromatini analizi isteğiyle gönderilmiştir. Yapılan cinsiyet kromatini analizleri ve klinik araştırmaların sonuçları aşağıda sunulmuştur.

1. Cinsiyet kromatini (Barr Body) tayini için farklı boyalar denenmiş, en iyi sonucu veren boyanın cresyl violet boyası olduğuna ve metodun rutin olarak güvenli bir şekilde uygulanabileceğine karar verilmiştir.
2. 12 hastanın 6 tanesinde cinsiyet kromatini anomalisi kesin olarak gösterilmiştir. Diğerlerinde ise, kromozomal aberasyon şüphesi olduğundan, kromozom analizi önerilmiştir.
3. Analizler sonucunda 5 kız hastanın 4 tanesinde cinsiyet kromatini negatif % 0.00, bir tanesinde pozitif % 7.00 olarak bulunmuştur. Poliklinikçe düşünülen Turner sendromu bu dört tanesinde kesinleşmiş, diğeri de mozayik olarak düşünülmüştür. Bu dört hastanın infertil olduğu belirlenmiştir.
4. Erkek hastalardan bir tanesi cinsiyet kromatini pozitif % 20.00 olarak bulunmuş, hermafrodit (interseks) olabileceği düşünülmüş ve yapılan cerrahi müdahale ile doğrulanmıştır.
5. Cinsiyet anomalisi düşünülen 12 hastadan 9 tanesinin akraba evlilikleri sonucu doğduğu anlaşılmıştır. Bu sonuç kromozom anomalilerinin oluşumunda akraba evliliklerinin insidansı artırıcı önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Ülkemizde sosyal ve genetiksel bir sorun olan akraba evliliklerinden kaçınmanın toplumu aydınlatmak ve eğitimle önlenebileceği kanısındayız.

6. Hastaların ailenin kaçınıcı çocuğu olduğuna bakıldığında, cinsiyet anomalisi doğrulanan 6 hastanın da 5. veya daha sonraki doğumlarda doğduğu anlaşılmıştır. Bu hastaların ebeveyn yaşı ortalamaları da yüksek bulunmuştur (anne 34.8, baba 37.8), M¼mk¼nse ileri yaşlarda (¼zellikle 35 yaşından sonra) doğum yapılmamalıdır. B¼yle durumlarda prenatal teşhis merkezlerine başvurulmalıdır.
7. Yenidoğanlarda cinsiyet kromatini analizi 10 g¼nl¼k bebeklerden daha k¼¼klerde yapılmamalıdır. Ovulasyon yaşında olanların ise menstrual sikluslarının kaçınıcı g¼n¼nde oldukları ve ila¼ kullanıp-kullanmadıkları sorulmalıdır.
8. Boyama yapılırken, ortam sıcaklığına dikkat etmeli ve oda ısısının altındaki ısılarda boyama yapılmamalıdır.
9. Cinsiyet kromatini analizinde daima kontrol bulundurulmalı ve her preparatta en az 100 h¼cre sayılmalıdır.
10. Sayım sırasında nukleusun kenarındaki kitleye ¼ok iyi dikkat edilmelidir. Barr Body (cinsiyet kromatini) kabul edilebilecek kitleler, ¼çgen veya planokonveks şeklinde olmalı ve asla r¼fle vermemelidir. Işığa karşı r¼fle verenler ya bakteri yada boya artefaktları olarak değerlendirilmelidir.
11. Sitogenetik olarak cinsiyet kromatini analiz sonu¼ları yorumsuz olarak verilmeli ve Barr Body'nin normal ¼l¼¼ler dışındaki ¼zellikleri not edilmelidir.
12. Boyama sonucu elde edilen preparatlar arşivlenmeli , m¼mk¼nse fotoğrafları ¼ekilmeli ve gelen hastanın protokol bilgileri eksiksiz kaydedilmelidir.

Ö Z E T

Bu araştırma, 9 aylık bir periyotta KTÜ. Farabi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Üroloji ve Kadın Doğum Polikliniklerine başvuran 2070 hastadan cinsiyet anomalisi şüphesiyle anabilim dalımıza gönderilen 12 hasta üzerinde yapılmıştır.

Yapılan metodolojik çalışmalar sonucunda laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan cinsiyet kromatini (Barr Body) yönünden hastalar incelenmiştir. Bu hastalardan 6 adedinde cinsiyet anomalisi, cinsiyet kromatini yönünden doğrulanmıştır. Bu hastalardan 5 adet kız hastadan 4 ü X-kromatini negatif (% 0.00). Turner sendromu, 1 adedi (% 7.00) mozayik ve 7 adet erkek hastadan 1 adedi (% 20.00) interseks olarak belirlenmiştir. Diğer 6 hasta için ise, diğer etkili faktörleri belirlemek için kromozom analizi önerilmiştir.

Gelen hastalardan 9 adedinin akraba evliliği sonucu doğduğu ve anne-baba yaşlarının yüksekliğinin anomali oluşumunda etkili faktörler olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler :Cinsiyet kromatini (Barr Body), X-kromatini), X-kromozomu inaktivasyonu, Lyon hipotezi, Dosaj-kompenzasyonu

S U M M A R Y

In this study, sexual abnormalities and X-chromatins of patients who were researched with Barr Body analysis which was developed from Barr and Bertram.

The studies included 1060 females and 1010 males with a total of 2070. Total patients were 12 (5 females, 7 males). Results of the incidences of X chromatin abnormalities as follows;

Four of five female patients were Turner Syndrome (X-chromatin negative) and one female patient has mosaic Turner syndrome. One of seven male patients was intersex person (20 % X-chromatin).

These X-chromatin and sexual abnormalities have thought to be depended on consanguinity, genetic factors and high parental age.

Key words : X-chromatin (Barr body), inactivation of X chromosome, Lyon hypothesis, dosage-compensation.

K A Y N A K L A R

1. Abe, K., Tagaki.N. and Sasaki.M.: Non-histon nuclear proteins specific to mouse embrional carcinoma cells having an inactive X chromosome. Genome 30 suppl. 1 p.187, 1988.
2. Ahmad, M., Abbas.H., Haque.S. et al: X-Chromasomally inherited split-hand/split-foot anomaly in a Pakistani kindred. Hum Genet 75: pp. 169-173, 1987.
3. Barr.M.L. and Bertram. E.G.: A morphological distinction between neurones of the male and female and behaviour of the nucleolar saellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature, 163:676, 1949.
4. Barr.M.L. Sex chromatin techniques. In Yunis.JJ.(ed): Human chromosome methodology. New York. Academic Press 1965, pp.1-16.
5. Barr.M.L. Buccal smear for sex chromatin. In Yunis.JJ.(ed): Human chromosome methodology, New York, 1974 pp, 73-93.
6. Başaran.N. Tibbi Genetik 3. Baskı, İstanbul: Bilim Teknik Yayın evi, 1985.
7. Belmont, A.S., Bignone, F. and Ts'o.P.O.P.: The relative intranuclear positions of Barr bodies in XXX non-transformed human fibroblasts. Exp Cell Res 165: pp, 165-179, 1986.
8. Blumquist.H.K., Gustavson, K.H., Norderson, I., et al: Fragile site X chromeromes and X-linked mental retardation is severely retarded boys in a northern Swedish country. A prevalence study Clin Genet 21: 209, 1981.
9. Boer, H.P. and Mc Burney, M.W.: DNA binding Proteins associating with the promoter of the mouse X-linked Pgk-1 gene Genome, Vol 30 suppl 1 pp, 187, 1988
10. Brown, C.J., Munroe, D.L., Sheinin, R. et al.: Localization of a human gene complementing a mouse tsDNA synthesis mutation to the X-chromosome. Genome Vol 30 suppl. 1 p, 187, 1988

11. Butler, M.G., Joseph, G.M. and Dev. V.G.: Metaphase chromosome folds and X-inactivation Am.J. Med. Genet 26: pp, 565-568, 1987.
12. Chandara, H.S.: Is human X chromosome inactivation a sex-determining device? Proc. Natl. Acad Sci USA Vol 82 pp. 6947-6949, 1985.
13. Chandara, H.S.: X chromosome and dosage compensation Nature vol 319, p.18, 1986.
14. Davies, K.E.: Molecular genetics of the X chromosome J. Med Genet, 22, pp 243-249, 1985.
15. Delong, L., Casson, L.P. and Meyer, B.J.: Assessment of X chromosome dosage compensation in *Caenorhabditis elegans* by phenotypic analysis of *lin-14* Genetics 117: pp 657-670, 1987.
16. Fearon, E.R., Winkelstein, J.A, Civin, C.I., et al: Carrier detection in X-linked agammaglobulinemia by analysis of X-chromosome inactivation New Eng. J. Medicine 316, pp 427-431, 1987.
17. Flejter, W.L., Van Dyke, D.L. and Weiss, L.: Bends in human mitotic metaphase chromosomes. Including a bend marking the X inactivation center. Am.J. Hum Genet 36: pp, 218-226, 1984.
18. Flejter, W.L., Van Dyke, D.L. and Weiss, L.: Location of the X inactivation center in primates and other mammals. Hum. Genet, 74: pp, 63-66, 1986.
19. Ford, E.R.: Human chromosomes. London Academic Press 1973 pp, 140-151.
20. Fryns, J.P. and Van der Berghe, H.: Inactivation pattern of the fragile X in heterozygous carriers. Am.J. Med. Genet, 30: pp, 401-406, 1988.
21. Gartler, S.M. and Andina, R.J.: Mammalian X chromosome inactivation. In Harris, H. and Harschnorn, K. (ed). Advanced in Human Genetics Vol 7 New York, London, 1976, Plenum Press.
22. Goodship, J., Malcolm, S., Lau, Y.L., et al.: Use of X chromosome inactivation analysis to establish carrier status for X-linked severe combined immunodeficiency. Lancet 8588, pp 729-732, 1988.
23. Graves, J.A.M. and Dawson, G.W.: The relationship between position and expression of genes on the kangaroo X chromosome suggests a tissue-specific spread of inactivation from a single controlsite, Genet Res. Camb 51: pp 103-109, 1988.

24. Günalp, A., Ayter, Ş. Lüleci G ve diğerleri., Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı, Ankara: 1. Baskı, Meteksan Yayınları No.17, 1986
25. Haaf, T. Ott, G. an Schimid, M.: Inhibition of condensation in the late replicating X chromosome induced by 5-azadeoxyeytidine in human tymphocyte cultures Hum Genet 79: pp. 18-23, 1988.
26. Happle, R., Lyomzation and the lines of Blaschko Hum Genet, 70: pp.200-206, 1985.
27. Herr, H.M., Horton, S.J. and Scott JR, C.I.: De novo paracentric Inversion in an X chromosome J.Med. Genet 22: 140-153, 1985.
28. Haliday, R., X-chromosome reactivation. Nature 2 June 327: 661-662, 1987.
29. Horsman, D.E., Dill, F.J., McGulivray, B.C., et al.: X-Chromosome aneuploidy in Lymphocyte cultures from women with recurrent spontaneous abortions. Am. J. Med Genel, 28: 981-987, 1987.
30. James, W.H., Anomalous X-Chromosome inactivation. J.Med Genet.25: 213-216, 1988.
31. Karagüzel, A., Genetik hastalıkların prenatal teşhisi için amniotik sıvı ve amniosentez, Doğa Sağlık Bil. Dergisi, 13: (2): 146-152, 1989.
32. Kelly, T.E., Inactivation of the mammalion X-Chromosome in spermatogenesis (letter to editor) Am.J.Hum. Genet 40: (3), 788-89, 1987.
33. Laird, C.D., and Lamb, M.M., Intercalary heterochromation of Drosophila as a potential modul for human frapile Srtes. Am.J.Med. Genet 30: 689-691, 1988.
34. Laird, C.D., Fragile-X mutation proposed tobloch complete reactivation in females of an inactive X-chromosomes. Am.J. Med. Genet 30: 693-696, 1988.
35. La Frenie, R.M., Yen, P.H., Chang, P.L, et al. Thé Fand S isozymes of human Arylsulfatase-C coded from distinet Genes on the X-Chromosome Genome 30 suppl. 1, p. 187, 1988.
36. Lancet, JH, X-chromosome and sex determination the lancet 8592: p, 973-974., 1988.
37. Lancet, Klinefelter's sendrome. The lancet 8598: 1316-1317, 1988.
38. Levine, H., Human X-Chromosomes. Boston: Little Brown X Comp Press, 1971

39. Liao, P.Y., A hand book of human cytogenetics Taiwan-New York: Sec. ed. 1987.
40. Lyon, M.F., and Raston, S. Prenatal source of chromosome imprinting and its relevance for X-chromosome inactivation *Differentiation* 26: 63-67, 1984.
41. Lyon, M.F., X-chromosomes and dosage compensation *Nature* 327: 313, 1987.
42. Lyon, M.F. X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked Genes. *Am. J. Hum Genet* 42: 008-016, 1988.
43. Mandel J.L., Arvieler, B., Camerino, G., et al. Genetic Mapping of the human X-chromosome. Linkage analysis of the 926-928 region that includes the fragile X locus and isolation of expressed sequences. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative biology*. 11: p, 195-203, 1986.
44. Maroni, G.P., X-chromosomes and dosage compensation (letter) *Nature* 317: 22, 1985.
45. McKusick, V.A., *Human Genetics*. New Jersey Sec. ed. Prentice-Hall Inc., 1969.
46. Migeon, B.R., Wolf, S.F., Axelman, J., et al. Incomplete X-chromosome dosage compensation in chorionic villi of human placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3390-3394, 1985.
47. Migeon, B.R., Schmidt, M., Axelman, J. et al. Complete reactivation of X-Chromosomes from human Chorionic villi with a switch to early DNA replication *Proc Natl. Acad. Sci USA* 83: 2182-2186, 1986.
48. Miller, O.J., Dosage compensation in mammals: Why does a gene on the inactive X yield less product than one on the active X? *Hum Genet* 69: 97-101, 1985.
49. Milunsky A. (ed). *Genetic disorders and the fetus* New York Sec. ed. Plenum Press, 1986.
50. Mondello, C., Goodfellow, P.J., and Goodfellow P.N., Analysis of methylation of a human X located gene which escapes X inactivation. *Nucleic Acids Research* 16:(14) 6813-6824, 1988.
51. Motulsky, V., *Human Genetics: Problems and Approaches* Berlin Springer-verlag, pp 69-74, 1982.
52. Nora, J.J., Fraser, C.F., *Medical Genetics: Principles and Practice*. Philadelphia: First ed. Lea & Febiger, 1974.

53. Prantera, G., and Ferraro, M., DNA methylation of active and inactive human X-chromosomes analysed by insitu nick-translation. *Genome* 1988, Vol 30 suppl. 1, p.187
54. Read, A.P., Update on the X-chromosome *J. Med. Genet*, 24: 188-189, 1987.
55. Roberts, J.A.F., Pembrey, M.E., *An introduction to Medical Genetics* Oxford : 8th ed. ELBS 1985.
56. Rowley, J.D. *Identification of Human Chromosomes in Methology* New York London,. Academic Press p. 25-34, 1974.
57. Sorto, G.E., Kuhn, E.M., and Therman E., Segregation after mitotic crossing over in isodcentric X-Chromosomes. *Cytogenet cell Genet* 45: 191-195, 1987.
58. Say, B., Tayşi, K., *Tıbbi Genetik Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A/12*, 1975.
59. Smith, D.A., Dosage compensation and X-chromosome inactivation (letter) *Nature*, 315, pp.103, 1985.
60. Somalow, P.B., Ford, A.L., Johnston P.G., et al Expression of X linked Gpd ang P_{gk}-A metatherian fibroblasts. *Genome* 130: Suppl. 1, p.187, 1988.
61. Şaylı, B.S., *Medical Sitogenetik. Ankara : Yargıçoğlu Matbaası*, 1986.
62. Thompson, J.S., Thompson, M.W. *Genetics in Medicine*
63. Tunçbilek, E. *Türkiyede Akraba evlilikleri, Katkı 6 (2), s. 129-136*, 1985.
64. Van Dyke, D.L., Flejter, W.L., Worsham M.J., et al. Apractical metaphase marker of the inactive X-Chromosome *Am.J. Hum Genet* 39: 88-95, 1986.
65. Van Dyke, D.L., Worsham, M.J., and Weiss, L. The human inactivated X-Chromosome folds in early metaphase, prometaphase and prophase. *Hem Genet* 77: 57-59, 1987.
66. Van Dyke, D.L., Isochromosomes and intestitial tandem direct an inverted duplication. In the cytogenetics of mammalian autosomal rearrangements Alan. *Riss.. Inc.* pp, 635-665, 1988.
67. Vande Berg, J.L., Robinson, E.S., Somollow P.B. et al. X-Linked gene expression and X-Chromosome inactivation: Marsuprals, Mouse and man compared. *Current topics in Biological and Medical Research* pp 225-253, 1988.

68. Vargas-Arenas, J., Lack of correlation between fragile X expression and age in human heterozygote female carriers. *Genome* 30, suppl 1, p, 187, 1988.
69. Veenema, H., Beverstocak, G.C., DeKoning, Th. et al. The fragile X-chromosome: an evaluation of the results in a routine cytogenetic laboratory in the period *Clinical Genetics* 33: 410-417, 1988
70. Viegas-Pequignot, E., Dutrillaux, B, and Thomas G. inactive X-Chromosome has the highest concentration of unmethylated Hha I sites *Prof.Natl. Acad. Sci USA*, 85: pp, 7657-7660, 1988.
71. Weissenbach, J., Levilliers, J. Petit, C., et al. Normal and abnormal interchanges between the human X and Y chromosomes. *Development* 101 supplement, 67-74, 1987.
72. Wolpert, L., DNA and its message. *The lancet*, October 13, 853-856, 1984.
73. Zakian S.M., Kulbakina, N.A., Meyer N.M., et al. Non-random inactivation of the X-chromosome in interspecific hybrids *Genet Res Cam*, 150: pp, 23-27, 1987.

Ö Z G E Ç M İ Ş

Fahri UÇAR; 14.10.1966 yılında Trabzon ili Şalpazarı ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Kasımağzı köyü ilkokulunda, 1982 yılında Ortaöğrenimini Şalpazarı Lisesi'nde tamamladı. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdi ve 1986 yılında bu bölümden Biyolog ünvanı ile mezun oldu.

Yüksek Lisans öğrenimine 1986 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında başlayan Fahri UÇAR, 1988 yılından beri aynı enstitüde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

T. G.
Yükseköğretim Kurulu
Doğum Kayıt Merkezi