



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN ÇİFTLERDE SAYISALVE  
YAPISAL KROMOZOM ABERASYONLARININ FISH YÖNTEMİ İLE  
İLERİ DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Hazırlayan

Diğdem Uysal

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Öztürk Özdemir

ÇANAKKALE 2014





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYBI OLAN ÇİFTLERDE SAYISALVE  
YAPISAL KROMOZOM ABERASYONLARININ FISH YÖNTEMİ İLE  
İLERİ DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

Diğdem Uysal

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Öztürk Özdemir

ÇANAKKALE 2014

## BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih :

Adı Soyadı : Diğdem Uysal

İmza :



## TEZ ONAYI FORMU

**Kurum :** Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Program :** Yüksek Lisans (X) Doktora ( )

**Anabilim Dalı :** Tıbbi Genetik

**Tez Sahibi :** Diğdem Uysal

**Tez Başlığı :** Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Çiftlerde Sayısal ve Yapısal Kromozom Aberasyonlarının FISH Yöntemi İle İleri Düzeyde Araştırılması

**Sınav Yeri :** Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

**Sınav Tarihi :** 23.01.2014

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

**Danışman**

**Kurumu**

**İmza**

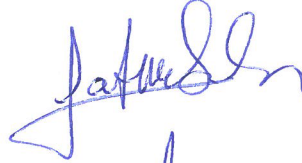
Prof. Dr. Öztürk Özdemir

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı



**Sınav Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Fatma SILAN



Yrd. Doç. Dr. Servet Özden Hacıvelioğlu



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 15/01/2014 tarih ve 2/1sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Metehan UZUN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## THESIS APPROVAL FORM

**Institute :** Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

**Programme :** Master of Science (X) Doctor of Philosophy ( )

**Department :** Medical Genetics

**Student :** Diğdem Uysal

**Title of the Thesis :** Advance Investigation of Numerical and Structural Chromosome Abnormalities in Recurrent Pregnancy Loss Patients by FISH Analysis

**Examination Place :** Çanakkale Onsekiz Mart University School of Medicine

**Examination Date :** 23.01.2014

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science Thesis.

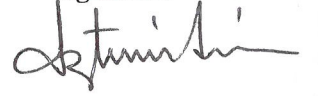
**Supervisor**

**Institution**

**Signature**

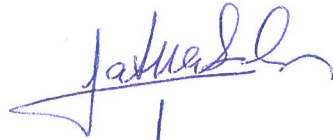
Prof. Dr. Öztürk Özdemir

Medical Genetics department

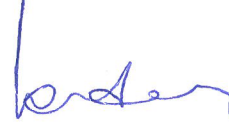


**Members of Examination Jury**

Prof. Dr. Fatma SILAN



Yrd. Doç. Dr. Servet Özden Hacivelioglu



The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Institute with decision dated 15/01/2014 and numbered 2/1

Prof. Dr. Metehan UZUN

Director of Institute of Health Sciences

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez projemin hazırlanması ve yürütülmesinin her aşamasında değerli bilgi ve önerileri ile beni yönlendirerek destek olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında beni yönlendiren, analizler sırasında benimle bilgilerini paylaşan, her konuda bana yardımcı olan hocam Prof. Dr. Fatma SILAN'a çok teşekkür ederim. Her konuda beni destekleyen Yrd. Doç. Dr. Ahmet ULUDAĞ'a çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana hem yardımcı hem de destek olan çalışma arkadaşlarım Uzman Dr. Sinem YALÇINTEPE ve Asistan Dr. Mine URFALI, Kimyager Hülya GÖVEÇ, Laboratuvar Teknisyeni Şengül TÜRÜNZ, Biyolog Özlem ALBAYRAKOĞLU, Kimyager Duygu KANKAYA, Biyolog Çisem AKURUT, Biyolog Elif ARI, Biyolog Ümit KARADELİ ve Biyolog Ebru ŞIK'a çok teşekkür ederim.

Koşulsuz sevgi ve destekleriyle her zaman ve her durumda yanımda olarak bana güç veren birtanecik eşim Kimyager Tolga UYSAL'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Kodu: TYL- 2013 -107.

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b>	<b>I</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>II</b>
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ</b>	<b>VI</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b>	<b>VII</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b>	<b>VIII</b>
<b>ÖZET</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>3</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Abortus</b>	<b>5</b>
<b>2.1.1. Spontan Abortus</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2. Habituel Abortus</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2.1. Habituel Abortusun Etiyolojik Sebepleri</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2.1.1. Genetik Nedenler</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2.1.2. Anatomik Nedenler (Uterin Anomaliler)</b>	<b>6</b>
<b>2.1.2.1.3. Endokrinolojik Nedenler</b>	<b>7</b>
<b>2.1.2.1.4. Enfeksiyöz Nedenler</b>	<b>8</b>
<b>2.1.2.1.5. Çevresel Nedenler</b>	<b>8</b>
<b>2.1.2.1.6. Trombofilik Nedenler</b>	<b>8</b>
<b>2.1.2.1.7. İmmünolojik Nedenler</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Kromozom</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1. Kromozomların Sınıflandırılması</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2. Kromozomal Polimorfizmler</b>	<b>11</b>

<b>2.3. Kromozom Anomalileri</b>	<b>12</b>
2.3.1. Kromozom anomalilerinin sınıflandırılması	12
2.3.1.1. Yapısal Anomaliler	12
2.3.1.1.1. İnversiyon	13
2.3.1.1.2. Translokasyon	13
2.3.1.1.3. Delesyon	14
2.3.1.1.4. Duplikasyon	14
2.3.1.1.5. Ring Kromozom	15
2.3.1.1.6. İzokromozom	15
2.3.1.1.7. Disentrik Kromozom	15
2.3.1.1.8. Marker Kromozom	16
2.3.1.2. Sayısal Kromozom Anomalileri	16
2.3.1.2.1. Anöploidi	16
2.3.1.2.2. Poliploidi	17
<b>2.4. Flouresan In Situ Hibridizasyon (FISH)</b>	<b>17</b>
2.4.1. Prob Çeşitleri	20
2.4.1.1. Tüm Kromozom Boyama Problemleri (Painting prob)	20
2.4.1.2. Tekrarlayan Dizi (satellit) Problemleri	20
2.4.1.3. Lokus Spesifik Prob (Tek gen problemleri)	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	
3.1. Hasta Grupları	23
3.2. Sitogenetik Analiz	23
3.2.1. Lenfosit Hücre Kültürü	24
3.2.1.1. Zenginleştirilmiş Besiyerinin Hazırlanması	24
3.2.1.2. Kromozom Eldesi İçin Kullanılan Solüsyonlar	24

3.2.1.2.1. Hipotonik	24
3.2.1.2.2. Fiksatif	24
3.2.1.3. Harvest	25
3.2.1.4. GTG- Giemsa Bantlama Tekniği	25
3.2.1.4.1. Kullanılan Solüsyonlar	25
3.2.2. Flouresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi	26
3.2.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	26
3.2.2.1.1. 20xSSC (Sodium Salin Citrat)	26
3.2.2.1.2. 2xSSC	26
3.2.2.1.3. Etanol Serileri	26
3.2.2.1.4. 0,4xSSC	26
3.2.2.1.5. 0,25xSSC	27
3.2.2.1.6. 2xSSC,%0,05 Tween 20	27
3.2.2.2. Kullanılan FISH Probları	27
3.2.2.2.1. Kromozom 16 ve 9 Alfa satellit prob	27
3.2.2.2.2. Kromozom XY Alfa satellite prob	28
3.2.2.2.3. Chromoprobe Multiprob-T Sistemi	29
3.2.2.3. Görüntüleme ve Sayım	31
<b>4. BULGULAR</b>	<b>33</b>
4.1. 9q12 Bölgesi Kontrol Grubu	35
4.1.2. 9q12 Bölgesi Çalışma Grubu	39
4.2. 16p11.1-q11.1 Bölgesi Kontrol Grubu	47
4.2.1. 16p11.1-q11.1 Bölgesi Çalışma Grubu	50
4.3. XY (alfa satellit) Çalışma Grubu	56
4.4. Subtelomerik Prob için Çalışma Grubu	62

<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>67</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b>	<b>72</b>
<b>7. EKLER</b>	<b>82</b>
7.1. Özgeçmiş	82
7.2. Etik Kurul onay belgesi	84

## KISALTMALAR

**APS:** Antifosfolipid Antikor Sendromu

**CGH:** Comparative Genomic Hybridization

**CVS:** Koryonik Villus

**DAPI:** 4-6 Diamino-2-Phenylindole

**DNA:** Deoksiribonükleik Asit

**FISH:** Floresan In Situ Hibridizasyon

**GTG:** Giemsa Tripsin Giemsa

**HbA1C:** Hemoglobin A1C

**ISCN:** An International System for Human Cytogenetic Nomenclature

**IUGR:** Intrauterin Gelişme Geriliği

**KCL:** Potasyum Klorür

**PAI:** Plazminojen Aktivatör İnhibitör

**PBS:** Fosfat Buffer Salin

**PCOS:** Polikistik Over Sendromu

**PGD:** Preimplantasyon Genetik Tanı

**PHA:** Fitohemaglutinin

**RNA:** Ribonükleik Asit

**SSC:** Sodyum Salin Sitrat

**TSH:** Tiroid Stimulan Hormon

**TKG:** Tekrarlayan Gebelik Kaybı

**MTHFR:** Metilen Tetrahidrafolat Redüktaz

**WHO:** Dünya Sağlık Örgütü



## TABLÖLAR

<b>Tablo 1.</b> Kontrol grubunda 9 numaralı kromozomun 9q12 bölgesindeki yoğunluğu ölçümleri	<b>35</b>
<b>Tablo 2.</b> Tekrarlayan düşük çiftlerini oluşturan bireylere ait 9q12 bölgesine ait kantitatif değerler ve oranları	<b>39</b>
<b>Tablo 3.</b> Tekrarlayan düşük çiftlerinde 9q12 için polimorfizm yüzdeleri	<b>40</b>
<b>Tablo 4.</b> Hasta ve kontrol grubunda saptanan polimorfizm yüzde dağılımı	<b>40</b>
<b>Tablo 5.</b> 9q12 polimorfizminin kadın hasta ve kadın kontrol grubu için elde edilen bulgularının istatistiksel hesaplamaları	<b>41</b>
<b>Tablo 6.</b> 9q12 polimorfizminin erkek hasta ve erkek kontrol grubu için elde edilen bulgularının istatistiksel hesaplamaları	<b>41</b>
<b>Tablo 7.</b> 9q12 polimorfizminin düşük çiftleri ve kontrol çiftleri ile karşılaştırılması sonucu elde edilen istatistiksel değerler	<b>42</b>
<b>Tablo 8.</b> Kontrol grubunda 16 numaralı kromozomun 16p11.1-q11.1 bölgesindeki sinyal yoğunluğu ölçümleri ve oranları	<b>47</b>
<b>Tablo 9.</b> Tekrarlayan düşük çiftlerine oluşturan bireylere ait 16p11.1-q11.1 bölgesine ait kantitatif değerler ve oranları	<b>48</b>
<b>Tablo 10.</b> Tekrarlayan düşük çiftlerinde 16p11.1-q11.1 için polimorfizm yüzdeleri	<b>51</b>
<b>Tablo 11.</b> Hasta ve kontrol grubunda saptanan yapısal ve sayısal kromozom aberasyonlarının yüzde dağılımı	<b>51</b>
<b>Tablo 12.</b> 16p11.1-q11.1 bölgesi için hasta grubu ve kontrol grubunda elde edilen sonuçların istatistiksel hesaplaması	<b>52</b>
<b>Tablo 13.</b> Tekrarlayan düşük çiftlerine oluşturan bireylere ait XY bölgesine ait oranlar	<b>56</b>
<b>Tablo 14.</b> Hasta grubunda saptanan yapısal ve sayısal kromozom aberasyonlarının yüzde dağılımı	<b>57</b>

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.</b> Yayma için kullanılacak olan 24 kareye bölünmüş lam	<b>30</b>
<b>Şekil 2.</b> 24 kareden oluşan ve herbir karede farklı kromozomların telomerlerine spesifik prob içeren Multiprob-T	<b>30</b>
<b>Şekil 3.</b> Yayma yapılmış lam üzerine Multiprob-T kapatılma işlemi	<b>31</b>
<b>Şekil 4.</b> XX bir olguya ait karyotip görüntüsü	<b>33</b>
<b>Şekil 5.</b> XY bir olguya ait karyotip görüntüsü	<b>34</b>
<b>Şekil 6.</b> 9q12, 16p11.1-q11.1 ve XY(p11.1-q11.1) bölgelerine ait ideogram	<b>34</b>
<b>Şekil 7.</b> Metafaz görüntüsündeki 9q12 bölgesindeki FISH sinyali	<b>36</b>
<b>Şekil 8.</b> Şekil 7'deki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:1 (13,530/14,038)	<b>36</b>
<b>Şekil 9.</b> Farklı interfaz görüntülerindeki 9q12 bölgesindeki FISH sinyali	<b>37</b>
<b>Şekil 10.</b> İnterfaz görüntüsündeki 9q12 bölgesindeki FISH sinyali	<b>37</b>
<b>Şekil 11.</b> Şekil 10'daki interfaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:1 (17,125/18,000)	<b>38</b>
<b>Şekil 12.</b> Farklı interfaz görüntülerindeki 9q12 bölgesi sinyalleri	<b>38</b>
<b>Şekil 13.</b> Metafaz görüntüsünde 9q12 bölgesine ait 1:2 oranındaki FISH sinyali	<b>43</b>
<b>Şekil 14.</b> Şekil 13'teki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:2 (12,000/25,000)	<b>43</b>
<b>Şekil 15.</b> Metafaz görüntüsünde 9q12 bölgesine ait 1:2 oranındaki FISH sinyali	<b>44</b>
<b>Şekil 16.</b> Şekil 15'teki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:2 (11,264/22,182)	<b>44</b>
<b>Şekil 17.</b> Metafaz görüntüsünde 9q12 bölgesine ait 2:3 oranındaki FISH sinyali	<b>45</b>
<b>Şekil 18.</b> Şekil 17'deki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 2:3 (9,100/15,805)	<b>45</b>
<b>Şekil 19.</b> İnterfaz görüntüsünde 9q12 bölgesine ait 2:3 oranındaki FISH sinyali	<b>46</b>

<b>Şekil 20.</b> Şekil 19'daki interfaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 2:3 (11,345/19,615)	<b>46</b>
<b>Şekil 21.</b> Metafaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 1:1 oranındaki FISH sinyali	<b>48</b>
<b>Şekil 22.</b> Şekil 21'deki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:1 (8,810/9,944)	<b>48</b>
<b>Şekil 23.</b> Metafaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 1:1 oranındaki FISH sinyali	<b>49</b>
<b>Şekil 24.</b> Şekil 23'teki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:1 (7,345/9,615)	<b>49</b>
<b>Şekil 25.</b> İnterfaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 1:2 oranındaki FISH sinyali	<b>53</b>
<b>Şekil 26.</b> Şekil 25'teki interfaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:2 (6,945/12,915)	<b>53</b>
<b>Şekil 27.</b> Metafaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 2:3 oranındaki FISH sinyali	<b>54</b>
<b>Şekil 28.</b> Şekil 27'deki interfaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 2:3 (7,895/11,600)	<b>54</b>
<b>Şekil 29.</b> Metafaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 2:3 oranındaki FISH sinyali	<b>55</b>
<b>Şekil 30.</b> Şekil 29'daki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 2:3 (8,760/11,956)	<b>55</b>
<b>Şekil 31.</b> XX bir olguya ait metafaz FISH görüntüsü	<b>58</b>
<b>Şekil 32.</b> XX bir olguya ait metafaz FISH görüntüsü	<b>58</b>
<b>Şekil 33.</b> XY bir olguya ait metafaz FISH görüntüsü	<b>59</b>
<b>Şekil 34.</b> XY olguya ait metafaz ve profaz FISH görüntüsü	<b>59</b>
<b>Şekil 35.</b> XXY olguya ait metafaz FISH görüntüsü	<b>60</b>

<b>Şekil 36.</b> XXY/XY metafaz / interfaz FISH görüntüsü	<b>60</b>
<b>Şekil 37.</b> İnterfaz hücresinde XXY FISH sinyali	<b>61</b>
<b>Şekil 38.</b> İnterfaz hücresinde görülen XXY FISH sinyali	<b>61</b>
<b>Şekil 39.</b> Metafaz görüntüsünde 4 numaralı kromozomun p ve q kollarındaki subtelomerik sinyal görüntüsü	<b>62</b>
<b>Şekil 40.</b> Metafaz görüntüsünde 5 numaralı kromozomun p ve q kollarındaki subtelomerik sinyal görüntüsü	<b>62</b>
<b>Şekil 41.</b> Bir metafazda 6 numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller	<b>63</b>
<b>Şekil 42.</b> Bir metafazda 12 numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller	<b>64</b>
<b>Şekil 43.</b> Bir metafazda 16 numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller	<b>64</b>
<b>Şekil 44.</b> Bir metafazda 14 numaralı kromozomun q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller	<b>65</b>
<b>Şekil 45.</b> Bir metafazda 21 numaralı kromozomun q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller	<b>65</b>
<b>Şekil 46.</b> Bir metafazda XY numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller	<b>66</b>
<b>Şekil 47.</b> Bir metafazdaki XX numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller	<b>66</b>

## ÖZET

Tekrarlayan gebelik kayıplarının en önemli etiyolojik nedeni gamet oluşumu sırasında meydana gelen kromozomal aberasyonlardır. Kromozomların bazı bölgelerinde meydana gelen artış ya da azalışları, kromozom stabilitesini sağlayan telomerik bölgelerdeki değişimleri tespit edebilmek için moleküler sitogenetik bir yöntem olan Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) kullanılmaktadır. Araştırmamız kapsamında; en az üç tekrarlayan düşüğü olan 30 çift (60 kişi) hasta grubu ve hiç düşük yapmamış, sağlıklı en az iki çocuğu olan 10 çift (20 kişi) ise kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. Karyotip analizleri normal olan çiftlerimize 9, 16 ve XY sentromerik problemleri kullanılarak ayrı ayrı FISH analizleri yapılmıştır. 9q12 ve 16p11.q11.1 bölgelerine ait sinyal boyutları ölçülerek istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiştir. Düşük sayısı 4 ve üzeri olan 5 çiftimize ayrıca subtelomerik FISH analizi de yapılmıştır. Analiz sonuçlarında; 9. kromozom için hasta grubunda %33, kontrol grubunda %0 oranında heterokromatin artışı olduğu gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonrasında 9q12 bölgesindeki artışın tekrarlayan gebelik kayıplarını 20,75 kat arttırdığı sonucu elde edilmiştir. Kromozom 16 için hasta grubunda 3 kişide heterokromatin bölge artışı gözlenmiş ancak kontrol grubunda hiç saptanmamıştır. XY FISH analizinde hasta grubunda (60 kişi) elde edilen sonuçlarda %3,3 oranında sayısal kromozom anomalisi saptanmıştır. Beş çiftimizde yapılan subtelomerik bölge analizi sonrasında bir telomerik delesyon, duplikasyon veya translokasyon saptanmamıştır, ancak analizi yapılan çift sayısının az olması nedeniyle telomerik kayıpların tekrarlayan düşük etkeni olabileceği konusu dışlanamamıştır. Daha önce farklı araştırmacılar tarafından yapılmış çalışmalarda klasik sitogenetik yöntemler kullanılmış ve net sonuçlar elde edilememiş, moleküler analiz önerilmiştir. Bu çalışma literatürde ilk kez FISH yöntemi ile kantitatif ölçümlerin yapıldığı bir çalışmadır. Elde edilen sonuçlar 9qh polimorfizminin tekrarlayan düşüklükler için önemli bir risk faktörü oluşturduğunu gösterir.

**Anahtar kelimeler:** FISH, Karyotip, Kromozomal Aberasyon, Polimorfizm, Telomer

## **SUMMARY**

### **Advance Investigation of Numerical and Structural Chromosome Abnormalities in Recurrent Pregnancy Loss Patients by FISH Analysis**

The most important etiologic causes of recurrent pregnancy losses are chromosomal aberrations that occur during gamete formation. This analysis of any insertions or deletions in some regions of the chromosomes are made with the Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) is the molecular cytogenetic method in order to determine changes on telomeric regions that providing chromosomal stability. Our project; who were included in the study 30 couples (60 patient) with at least three recurrent abortions in the patients group, and no abortion patients have at least 10 couples (20 patient) with two healthy children in the control group. FISH analyzes were performed by using 9, 16 and XY centromeric probes, couples with normal karyotype analysis. Subtelomeric FISH analysis was performed 5 of these couples, whose number of abortion 4 or greater than. Heterochromatine increase of chromosome 9 were observed 30% of patients but none of the healthy controls. Especially couples with recurrent pregnancy loss, 9q12 increase is an important etiological factor. 16th chromosome centromeric heterochromatine increased 3 patients (5%) and none of the controls. According to the results, in patients group (60 patient); X or Y chromosomal numerical abnormalities were detected at 2 patients (3.3%) XY FISH analysis. There was no subtelomeric deletions, duplication or translocations in about 5 couples after analysis of the subtelomeric regions. A clear conclusion couldn't be obtained whether the telomeric losses are effective in recurrent abortions or not because of the couples are not enough in the statistical analysis. Earlier studies conducted by different researchers using classic cytogenetic methods and molecular analysis has been suggested because of being not final resorts. This study is the first report was made by FISH technique is a study of quantitative measurements. Our results show that 9qh polymorphism is an important risk factor for recurrent miscarriage.

**Keywords:** Chromosomal Aberration, FISH, Karyotype, Polymorphism, Telomere.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Tekrarlayan gebelik kayıpları (TGK), çocuk sahibi olmayı planlayan çiftlerin sıkıntılı bir süreç geçirmelerine sebep olan bir durumdur. Tüm gebeliklerin yaklaşık %10 - %15'i ilk trimesterde spontan abortus ile sonuçlanmaktadır (Dejmek ve ark., 1992). TGK'na sebep olabilecek birçok faktör mevcuttur. Ancak bu faktörler içerisinde en sık rastlanan kromozomal aberasyonlarıdır. Birinci trimesterde görülen abortuslarda fetal kromozom anomalisi sıklığı %50-80'dir. Düşüklere sebep olan fetal kromozom anomalilerinin %75'i otozomal anöploidiler, %13'ü poliploidiler, %8'i monozomiler, %4'ü ise yapısal anomalilerdir (Benzacken ve ark., 2002; Bruno ve ark., 2006; Zarina ve ark., 2006).

Kromozom anomalileri; sitogenetik açıdan sayısal ve yapısal olarak, hastanın klinik bulgularına göre ise dengeli veya dengesiz anomaliler olarak ayrılmaktadır (Thompson ve ark., 2001). Bu anomaliler genetik materyalde artış veya azalışa sebep olabilmektedir (Benzacken ve ark., 2002). Disentrik kromozom, ring kromozom, marker kromozom, izokromozom, duplikasyon ve delesyon şeklinde görülen anomaliler genomik dengesizliğe yol açtığından fenotipide etkileyebilir ve oluşan gametler düşükle sonlanabilir. Dengeli translokasyon veya inversiyon gibi yapısal anomali taşıyan bireyler fenotipik olarak normal olsalar da, dengesiz kromozomal anomalili fetüslere sebep olarak düşük gerçekleşebilir (Tekcan ve ark., 2012). Kromozomların üzerinde tekrarlayan Deoksiribonükleik asit (DNA) dizilerinin bulunduğu, gen içermeyen heterokromatin bölgeler vardır ki bu bölgelerdeki artış veya azalışlar polimorfik olarak kabul edilmektedir. Heterokromatin bölgeler inaktiftir. 1, 9, 16. kromozomlarda ve Y kromozomunun uzun (q) kolunda bulunan bu bölgeler farklı tiplerde satellit DNA içerirler. Bu bölgelerde meydana gelen değişiklikler kişinin kendisinde fenotipik anomaliye sebep olmazken, tekrarlayan düşükler, infertilite, çocuklarında mental retardasyona sebep olabilmektedir. Kromozomların uç kısımlarında bulunan koruyucu bölgeler telomerik bölgelerdir. Telomerler TTAGGG dizisinin ard arda birçok defa tekrarlanması ile oluşur, kromozom bütünlüğünü ve stabilitesini sağlar (Thompson ve ark., 2001). Bu da uç bölgelerin replikasyonunun her kromozomun kendine özgü olmasına sebep olur.

Kromozom anomalilerinin tanısında kullanılan Giemsa-Tripsin (GTG) bantlama tekniği ile elde edilen 450-500 seviyesinde bant almış kromozomlar ile yapılacak analiz sayısal ve yapısal anomalilerin tanısı için yeterlidir. Ancak bu yöntem mikrolelesyon/duplikasyon, dūřuk oranlı mozaisizmler ve kompleks anomalilerin tanısı için yeterli olmamaktadır. Yaklaşık son 30 yıldır bu tūr anomalilerin daha iyi tespiti için FISH yōntemi ile analiz yapılmaktadır. Bu teknik, kromozomların belli bōlgelerine ōzgūn DNA/Ribonūkleik asit (RNA) dizilerinin enzimatik yolla floresan veren maddelerle işaretlendikten sonra metafaz ve interfaz kromozomlarının hibridize edilerek hedef bōlgelerin değerlendirilmesi esasına dayanır (Piper ve ark., 1995; Schuler ve ark., 2003). Bu teknik kōltūrasyon işlemi sonrasında 24 saatlik bir sūre sonunda sonuē verebilmeyi sağlayan bir tekniktir. Metafaz kromozomları dışında interfaz kromozomlarının da analizine olanak sağlar. Telomerik problemler kullanılarak yapılan analizler, bu bōlgelerde mayozun erken dōneminde oluşan hatalı eşleşmelerin varlığını tespit etmemize yardımcı olur.

ēalıřmamızda; tekrarlayan dūřuk etiyolojisinde kromozomal aberasyonların araştırılması amacıyla; dūřuk sayısı en az 3 olan ve GTG bantlı sitogenetik analizleri normal bulunan bireylerde; 9. kromozom, 16. kromozom ve X-Y kromozomlarının alfa satellit bōlgelerine spesifik problemler kullanılarak FISH yōntemi ile analizleri yapılmıştır. Bu kromozomların heterokromatin bōlgelerindeki değişiklikleri tespit etmek için homolog kromozomlar birbirleriyle karşılaştırılıp oranlama yapılmıştır. Dūřuk sayısı 4'ūn ūzerinde olan beř çiftimize ek olarak subtelomerik FISH problemleri ile analizleri yapılmış subtelomerik bōlgelerde herhangi bir delesyon olup olmadığı tespit edilmiştir.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Abortus**

Abortus; Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1977 yılında yapılan tanıma göre, 20. gebelik haftasından önce, 500 gramdan daha az olan embriyonun, tamamının ya da bir kısmının uterus dışına atılmasıdır (Cunningham ve ark., 2010).

#### **2.1.1. Spontan Abortus**

Mekanik ya da farmakolojik herhangi bir girişim olmaksızın gebeliğin 20. haftadan önce kendiliğinden sonlanmasıdır (Baek ve ark., 2007). Gebeliğin 12. haftasına kadar olan abortuslar erken abortus, 12–20. gebelik haftaları arasında olan abortuslar ise geç abortus olarak adlandırılmaktadır.

#### **2.1.2. Habituel Abortus**

Birbirini takip eden en az iki veya daha fazla gebeliğin spontan olarak sonlanması şeklinde tanımlanmaktadır.

##### **2.1.2.1. Habituel Abortusun Etiyolojik Sebepleri**

- 1) Genetik nedenler
- 2) Anatomik nedenler
- 3) Endokrinolojik nedenler
- 4) Enfeksiyöz nedenler
- 5) Çevresel nedenler
- 6) Trombofilik nedenler
- 7) İmmünolojik nedenler

##### **2.1.2.1.1. Genetik Nedenler**

Tekrarlayan gebelik kayıplarının etiyolojisinde %5 sıklıkta ebeveynlerdeki genetik nedenler sorumlu tutulmaktadır. Genetik anomaliler fetal veya maternal/paternal kaynaklı olabilmektedir. Düşük ne kadar erken oluşursa kromozomal kaynaklı olma olasılığı o kadar fazladır. 1. trimester kayıplarının %60'ı,

2. trimester kayıplarının %10-15'i, 3. trimester ölü doğumlarının ise %5'i genetik anomaliler sonucu meydana gelmektedir (Sierra ve Stephenson, 2006).

Genetik anomalileri yapısal ve sayısal olarak sınıflamak mümkündür. Gametogenezdeki kromozomal hatalar sayısal veya yapısal anomalilere sebep olabilir. Sayısal kromozomal anomaliler; haploid setin tam katları şeklinde artışı: poliploidi (triploidi, tetraploidi) veya tam kat şeklinde olmayan artış veya azalış: anöploidi (trizomi, monozomi) olarak tanımlanmaktadır.

Yapısal anomaliler ise translokasyon, delesyon, inversiyon veya ring gibi kromozomun kendisinde gerçekleşen morfolojik değişimlerdir. Yapısal kromozom anomalileri içerisinde en sık translokasyonlar; translokasyonlar içerisinde ise resiprokal veya robertsonian tipi translokasyonlar görülmektedir (Monfort ve ark., 2006; Zarina ve ark., 2006). Tek spontan düşüklerdeki fetal kromozomal anomaliler tekrarlayan düşüklerden farklıdır. Ayrılmama (non disjunction) veya translokasyona bağlı otozomal trizomi en sık rastlanan anomalidir (erken gebelik kayıplarının yaklaşık %50'si). Yapılan sitogenetik analizlerde %50 sıklıkta trizomiler, %15 sıklıkta monozomi 45,X ve değişen oranlarda poliploidi (özellikle triploidi) ile karşılaşılmaktadır (Bryne ve Ward, 1994).

#### **2.1.2.1.2. Anatomik Nedenler (Uterin Anomaliler)**

Tekrarlayan gebelik kayıplarının etyolojisinde yaklaşık %12–15 oranında anatomik nedenler sorumludur. Gebelik kaybı riskini artıran anatomik nedenler; konjenital uterin malformasyonlar, uterin myomlar ve intrauterin adezyonlardır.

Konjenital uterin malformasyonlar; unikornat, bikornat, didelfis ve septat uterus olarak sıralanmaktadır. Bu malformasyonların normalde görülme sıklığı %2 iken bu oran TGK'da yaklaşık 3 katına çıkabilmektedir (Leible ve ark., 1998).

Unikornat uterus; müller kanallarından birinin gelişim yetersizliği sonucu oluşmaktadır. Oluşan gebeliklerin yarısı düşük ile sonuçlanmaktadır. Bikornat uterus; fundus seviyesinde mülleryen kanalların yetersiz birleşmesi sonucu oluşur. Birleşik alt segmenti olan iki ayrı uterin kavite ve tek serviks vardır. Bu uterus şeklinde erken gebelik kayıp oranı %30, tüm gebeliklerde fetal kayıp oranı %40 bulunmuştur. Didelfis uterus; müller kanallarının tam olarak birleşmesi sonucu oluşur. İki serviks ve iki uterus mevcuttur. Uterus didelfisli kadınların gebeliklerinin

yaklaşık %40'ı spontan abortus ile sonuçlanmaktadır. Septat uterus; normalde birleşmesi gereken iki uterusu ayıran orta hat septumun yetersiz kaybı sonucu oluşmaktadır. En sık görülen uterin gelişim anomalisidir ve genel popülasyonda tüm major malformasyonların %80-90'ını oluşturmaktadır (Propst ve Hill, 2000). Uterin myomlar; myomların TGK'daki mekanizmalarının tümü bölgesel kan akımının yetersizliğine bağlanmasına rağmen myomların TGK'na yol açan sebepleri tam olarak netleştirilememiştir.

İntrauterin adezyonlar; endometriumu yeterince zedeleyen herhangi bir olay intrauterin adezyonlara neden olabilir. En sık görülen durum olan kürtajın spontan abortus nedeni olduğu düşünülse de intrauterin adezyonlar önce gebelik kaybı ile oluşurken daha sonra TGK'na neden olmaktadır. İntrauterin adezyonlardaki TGK'nın mekanizması, azalmış fonksiyonel uterin hacim ve endometrial fibrozis ile plasental yetersizliğe neden olabilecek inflamasyonlardır (Patton ve Novy, 1998).

#### **2.1.2.1.3. Endokrinolojik Nedenler**

Gebelik kaybı riskini artıran endokrinolojik nedenler, tiroid hastalıkları, diyabet, polikistik over sendromu (PCOS) ve luteal faz defektleridir. TGK olan kadınlarda tiroid stimulan hormon (TSH) taramasının yapılması gereklidir. Tedavi edilmemiş hipotroidi (tiroid bezinin yavaş çalışması) ve hipertroidi (tiroid bezinin fazla çalışması) düşük riskini arttırmaktadır (Abalovich ve ark., 2002). Metabolik kontrolü iyi olan diyabetik kadınlardaki gebelik kayıp riski diyabetik olmayan kadınlardan farklı değildir; fakat ilk trimesterde yüksek kan glikoz ve hemoglobin A1C (HbA1C) düzeyleri abortus riskini arttırmaktadır (Coulam ve Stern, 1994).

Ovulasyondan gebeliğin 7-9. Haftalarına kadar geçen sürede gebeliğin devamını sağlayan korpus luteumdan üretilen progesteron hormonudur. Luteal faz yetmezliği ve luteal faz defektleri belli başlı luteal fonksiyonların uygunsuzluğu ile özellikle potansiyel implantasyon bölgelerdeki endometriyum gelişiminin yetersiz olması sonucunda obstetrik sonuçlara yol açmaktadır. PCOS'lu kadınlarda hiperinsülinemi ve artmış plazminojen aktivatör inhibitör (PAI) aktivite düzeylerinin, artmış gebelik kayıp sıklığına (%30–50) neden olduğu belirtilmiştir (Okon ve ark. 1998).

#### **2.1.2.1.4. Enfeksiyöz Nedenler**

Erken gebelik kayıplarının nedeni net olmamakla birlikte servikovajinal enfeksiyonların olabileceği bildirilmektedir (Brocklehurst ve ark., 2000). Chlamydia trachomatis, Ureaplasma ve Mikoplasma enfeksiyonlarının TKG'na sebep olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca Toxoplazma gondii, Listeria monositogenez, Herpes virüs ve Sitomegalovirüs de neden olabilmektedir.

#### **2.1.2.1.5. Çevresel Faktörler**

Sigara, alkol ve aşırı kahve tüketimi, gebelik kaybına hazırlayıcı çevresel faktörler olarak bilinmektedir (Gardella ve Hill 2000). İlk trimesterde günde 10 adetten fazla sigara içenlerde abortus riskinin 1,4 kat arttığı gösterilmiştir. Anestetik gazlar, perklor etilen (kuru temizleme solventi) ve diğer organik çözücüler ile ağır metallere (civa, kurşun) maruz kalmak gebelik kayıp nedenleri olarak bildirilmiştir.

#### **2.1.2.1.6. Trombofilik Nedenler**

Trombofilik nedenler; kalıtsal trombofililer ve edinsel trombofililer olarak iki kısımda incelenebilir.

Kalıtsal trombofililer; pıhtılaşma faktörleri, antikoagulan proteinler (protein C, protein S, antitrombin III) ve fibrinolitik mekanizmalar arasındaki dengesizliği gösteren koagülasyon ve fibrinolizis arasındaki uyumsuzluk sonucu oluşmaktadır. Normal gebelik; faktör V, VII, VIII, X ve fibrinojen düzeylerinin arttığı, protein S seviyesinin azaldığı, aktive protein C'ye karşı direncin arttığı, PAI konsantrasyonunun arttığı ve trombosit agregasyonuna eğilimin arttığı bir durumdur. Birçok genetik mutasyon kalıtsal olarak tromboza eğilimi arttırmaktadır. Bunlar protein C eksikliği, protein S eksikliği, antitrombin III eksikliği, aktive protein C rezistansı, Protrombin G20210A mutasyonu, Metilen TetraHidrofolat Redüktaz (MTHFR) enziminin C667T ve A1298G mutasyonudur. Kalıtsal trombofililerden en sık görüleni Faktör V Leiden mutasyonudur. İkinci sıklıkta görülen mutasyon Protrombin G20210A mutasyonudur. Mutasyonlar homozigot ya da heterozigot olabilir. Üçüncü sıklıkta görülen diğer mutasyon MTHFR enzimini kodlayan geni etkilemektedir. Burada tromboz için bilinen bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemiye eğilim olmaktadır. Hiperhomosisteinemiye; ateroskleroz,

kardiyovasküler hastalık, arteriyel ve venöz tromboz, nöral tüp defekti ve tekrarlayan gebelik kaybı riski artar (Obut ve ark., 2013).

Edinsel trombofililerden en sık görüleni antifosfolipid antikor sendromudur. Antifosfolipid antikor sendrom (APS) sistemik otoimmün bir hastalıktır. Bu sendrom bulgularında tromboz oluşumu, plasenta yetmezliği ve tekrarlayan düşükler gözlenir. Antifosfolipid antikorların koagülasyona eğilimi artarak TGK'na neden olabileceği kabul edilmektedir. Özellikle 3 veya daha fazla 10 haftadan önce gebelik kaybı, morfolojik olarak normal bir veya daha fazla gebeliğin 10. haftadan sonra kaybı, 34. gebelik haftasından önce preeklampsi/prematürite/intrauterin gelişme geriliği (IUGR) nedeniyle kayıp yaşayan kadınlarda APS düşünülerek araştırılmalıdır (Robertson ve Greaves, 2006; Obut ve ark., 2013).

#### **2.1.2.1.7. İmmunolojik Nedenler**

Vücudun savunma mekanizması olan bu sistem; gerek dışarıdan gelen gerekse vücudun kendi içinde yer alan hastalık etkenlerine karşı koruma sağlamaktadır (Laird ve ark., 2003). Yabancı antijenlere karşı tepki yaratır, bazen hatalı olarak kendine ait antijenleride yabancı olarak algılar (otoimmün antijen). Bağışıklık sisteminin ürettiği bu antikorlar ömür boyu vücutta kalır. Bu durum bazen TGK'na sebep olabilir. Anne kendinde normalde bulunan antijene karşı antikor oluşturmaktadır.

#### **2.2. Kromozom**

İnterfaz nükleusunda bulunan DNA, RNA, histon (bazik protein) ve histon olmayan proteinlerden (asidik protein) oluşan bir yapıdır. Histon proteinleri H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B H<sub>3</sub> ve H<sub>4</sub> olmak üzere beş farklı tiptedir. DNA kendini eşledikten sonra oktomer (herbiri ikişer molekül olan H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B H<sub>3</sub> ve H<sub>4</sub> olmak üzere toplamda 8 molekül protein içerir) adı verilen yapının etrafına iki kez sarılır, H<sub>1</sub> tarafından stabilize edilir ve nükleozomu oluşturur. Nükleozomlar birbirine bağlanıp kıvrılarak selonoid yapıyı oluşturur. Bu yapı interfaz aşamasındaki kromatini meydana getirir. Kromatin ağı hücre bölünmesinin profaz aşamasına geldiğinde kalınlaşarak genetik materyali taşıyan kromozomları oluşturur.

İnterfaz evresinde çözülmeden kalan ve bu sebeple koyu boyanan bölgelere heterokromatin bölge adı verilir ve bu bölge inaktif gen bölgelerini içerir.

Heterokromatin bölge Adenin ve Timin bazları bakımından zengindir. Nükleik asitçe daha zengin olan normal ve uniform olarak boyanan iplikli kısımlara eukromatin bölge adı verilir, bu bölge aktif gen bölgelerini içerir. Eukromatin bölgeler Guanin ve Sitozin bazları bakımından zengindir. Kromozomları eşit ya da eşit olmayan iki kola ayrılan kısım sentromer'dir. Eşit olmayan kollardan kısa olan (p), uzun olan kol ise (q) koludur. Sentromerler heterokromatin yapıda özel DNA dizisi taşıyan bölgelerdir.

### 2.2.1. Kromozomların Sınıflandırılması

**Kromozomlar sentromer lokalizasyonlarına göre sınıflandırılır ;**

**a) Metasentrik Kromozomlar:** Sentromer kromozomun p ve q kollarını iki eşit parçaya bölecek şekilde tam ortada konumlanmış ise metasentrik kromozom adını alır.

**b) Submetasentrik Kromozomlar:** Sentromer merkezde değildir. p kolu q koluna oranlara daha kısa olan kromozom şeklindedir.

**c) Akrosentrik Kromozom:** Sentromer kromozomun uç kısmına çok yakın konumlanmıştır. p kolu tamamen kısalmış, satellit şeklindedir.

**d) Telosentrik Kromozom:** Sentromer kromozomun en uç noktasında bulunur. İnsanda telosentrik kromozom bulunmaz.

Bölünme anında kromozomlar kutuplara doğru çekilirken, sentromerlerinden iğ ipliklerine tutunurlar. Sentromeri herhangi bir nedenle tahrip olan veya bulunmayan bir kromozom bölünme olayına katılamadığından parçalanır.

**Kromozomlar büyüklükleri ve sentromer konumları göz önüne alınarak gruplandırılır;**

**A Grubu:** 1, 2, 3 numaralı kromozomlardır. Metasentriklerdir.

**B Grubu:** 4 ve 5 numaralı kromozomlardır. Büyük submetasentriklerdir.

**C Grubu:** 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 numaralı kromozomlardır. Bu grup kromozomlar submetasentriktir.

**D Grubu:** 13, 14 ve 15 numaralı kromozomlardır. Büyük akrosentriklerdir.

**E Grubu:** 16, 17, 18 no'lu kromozomlardır. Küçük submetasentrik grubundadır.

**F Grubu:** 19 ve 20 numaralı küçük metasentrik kromozomlardır.

**G Grubu:** 21, 22 nolu kromozomlardır ve küçük akrosentriklerdir.

Cinsiyet kromozomları olan X ve Y'den, X; C grubundadır ve submetasentrik bir kromozomdur. Y ise G grubundadır ve akrosentrik bir kromozomdur.

### 2.2.2. Kromozomal Polimorfizmler

Kromozomlar morfolojilerine göre homologları ile karşılaştırıldığı zaman belli bölgelerin oldukça değişken olduğu görülmektedir. Bu bölgeler, kromozomal varyasyonların büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Türler içinde, aynı türün bireyleri arasındaki genetik varyasyonlar polimorfizm olarak adlandırılır. Bu polimorfizmler üç grupta incelenir.

Y kromozomu uzun kol varyasyonu: En sık rastlanan polimorfizmdir. Y'nin uzun kolu transkribe olmayan tekrarlı bölgelerden oluşur. Erkeklerin yaklaşık %10'unda normalden kısa veya uzun bir q kolu bulunur. Bu polimorfik bölgeler özel floresan boyalarla tespit edilebilir (Thompson ve ark., 2001).

Sentromerik polimorfik bölgeler: 1, 9 ve 16. kromozomların sentromerlerine yakın sekonder bir bölge (qh) içerirler. Bu qh bölgeleri kromozom 9 için 9q12 ve kromozom 16 için 16p11.1-q11.1'dir. Bu bölge heterokromatin bölgesidir ve heterokromatin miktarı değişken olduğundan qh bölgesi de değişkenlik gösterebilir. Bu bölge aktif genler içermez ve bu bölgedeki farklılıklar polimorfizm olarak kabul edilir (Thompson ve ark., 2001; Neas ve ark., 2005).

Satellit polimorfizmi: Akrosentrik kromozomlardaki satellit büyüklükleri farklı olabilir. Polimorfik bölgelerdeki artışın mayoz sırasında, sinaps aşamasında yanlış eşlemelere ve eşit olmayan crossing-over'a sebep olabileceği düşünülmektedir (Thompson ve ark., 2001). Bunların dışında frajil bölgeler olarak adlandırılan, kromozomlar üzerinde bulunan kırılmaya yatkın bölgelerdeki değişikliklerde polimorfizmdir. Populasyonun yaklaşık %30'unda mevcuttur. Sadece X kromozomunun q27 bölgesindeki frajil bölge klinik olarak önemli kabul edilir (Thompson ve ark., 2001).

### **2.3. Kromozom Anomalileri**

Genetik bilginin taşındığı kromozomlar gamet hücreleri hariç 46 adettir. 46 kromozomun 22 çiftini otozomal kromozomlar, bir çiftini ise kadınlarda XX, erkeklerde XY olmak üzere cinsiyet kromozomları oluşturur. Somatik hücrelerdeki 46 kromozom “diploid” yapıdadır ve  $2n$  olarak simgelenir. Gamet hücreleri ise “haploid” sayıda ( $n$ ) yani 23 kromozom içermektedir. Kromozomların gerek sayısında gerekse yapısında oluşan değişiklikler “kromozom aberasyonu” olarak isimlendirilir. Genetik bilgiyi değiştirmeyen anomaliler klinik bulguya yol açmaz ve “dengeli kromozom anomalisi” olarak; genetik bilgiyi değiştiren ve klinik bulgulara yol açanlar ise “dengesiz kromozom anomalisi” olarak adlandırılır .

#### **2.3.1. Kromozom Anomalilerinin Sınıflandırılması**

Kromozom anomalileri, sayısal veya yapısal olabilir, tek ya da çok sayıda kromozomu, yalnızca otozom veya cinsiyet kromozomunu ya da hepsini birden içeriyor olabilir ve farklı sıklıklarla gözlenir.

Kromozom anomalileri yapısal anomaliler ve sayısal anomaliler olmak üzere iki grupta sınıflandırılır.

##### **2.3.1.1. Yapısal Anomaliler**

Yapısal kromozom anomalileri, kromozomlarda oluşan kırılmalar sonucunda kaybolma, artma veya yeniden düzenlenmelerle ortaya çıkmaktadır. Bu değişimler tek bir kromozom veya karşılıklı iki kromozom arasında meydana gelen değişimlerdir. Yapısal kromozom anomalilerinin yeni doğandaki sıklığı yaklaşık  $1/450$ 'dir (Vaz ve Shyama, 2005). Yapısal anomaliler genetik olabilecekleri gibi, de novo da oluşabilir. De novo oluşumlar iyonize radyasyon, bazı viral enfeksiyonlar ve bazı kimyasallar gibi kırığa neden olan ajanlarla indüklenebilecekleri gibi kendiliğinden de oluşabilir (Thompson ve ark. 2001). Kromozomdaki genetik bilgide herhangi bir artış veya azalış gerçekleşmediği için dengeli kromozomal değişimlerde fenotipin etkilenmesi beklenmemektedir. Ancak, de novo oluşan kromozom anomalileri, sitogenetik olarak dengeli olarak görüldüğü halde submikroskopik düzeyde kayıp içermeleri durumunda klinik bulgulara yol açabilmektedir (prenatal tanıda saptanan de novo translokasyonların %5' i). En sık görülen dengeli yapısal anomaliler;



### 2.3.1.1.1. İnverson

Bir kromozomda, iki kırık sonucu oluşan parçanın ters dönerek, aynı bölgeye tekrar yerleşmesi ile meydana gelen kromozom içi yapısal anomaliler inversonlar olarak adlandırılır. Bu ters dönen parça sentromer içeriyorsa “perisentrik inverson”, sentromer içermiyorsa “parasentrik inverson” olarak adlandırılır. Perisentrik inversonlarda kromozomun p/q kol oranında değişim olduğundan sitogenetik olarak görmek daha kolaydır. Parasentrik inversonlar ise p/q kol oranında değişim olmadığından ancak bant yapısındaki değişim ile tanınabilirler. İnverson sonucunda dengesiz gamet oluşturma riski yüksektir.

En sık görülen inverson, 9 numaralı kromozomun p12-q12 heterokromatin bölgesini içeren perisentrik inversonudur. Bu inverson fenotipi etkilemediğinden ve ayrıca fetal kayıplar veya dengesiz karyotipe sahip bireylerin meydana gelmesine ilişkin önemli bir risk oluşturmadığından normal varyant veya polimorfizm olarak kabul edilir (Cockwell ve ark., 2003; Gardner ve Hill, 2004; Gersen ve Keagle, 2005).

### 2.3.1.1.2. Translokasyon

Bir kromozomun veya kromozom segmentinin başka bir kromozom üzerine yerleşmesi translokasyon olarak tanımlanır. Robertsonian, resiprokal ve insersiyonal olmak üzere üç ana grupta incelenirler.

Robertsonian Translokasyon: İki akrosentrik kromozomun kısa kollarını kaybederek sentromer veya sentromere yakın bölgelerinden birleşmesiyle oluşur. Akrosentrik kromozomların (13, 14, 15, 21, 22 ) kısa kollarında, p11 bölgesinde satellit DNA’lar I, II, III, IV, ve  $\beta$ ; p12 bölgesinde 18S ve 28S ribozomal RNA’yı kodlayan genlerin tekrar dizileri; ve p13 bölgesi  $\beta$ -satellit DNA ve telomerik diziler ile sonlanmaktadır (Page ve ark., 1996; Bandyopadhyay ve ark., 2001). Dengeli robertsonian tipi translokasyon taşıyıcılarında total kromozom sayısı 45’tir. Genel popülasyonda görülme sıklıkları 1/1000’dir. Dengeli robertsonian tipi translokasyon taşıyıcıları dengesiz gamet verme olasılıkları yüksektir; trizomik ve monozomik zigotlar ortaya çıkar (Shaffer ve Lupski, 2000).

Resiprokal Translokasyon: Homolog olmayan iki kromozom arasında karşılıklı parça değişimi “resiprokal translokasyon” olarak tanımlanır. Genellikle en az iki kromozom arasında, iki kırık oluşumu ile meydana gelir ve toplam kromozom sayısı değişmez. Resiprokal translokasyonlarda dengesiz gamet oluşturma riski %85 gibi yüksek bir oran olduğundan TGK ve mental retardasyon öyküsü gözlenir (Gardner ve Sutherland, 2004).

İnsersiyonel Translokasyon (Transpozisyon): Homolog olmayan iki kromozomdan birinde iki noktadan, diğerinde bir noktadan kırılma gerçekleşir. İki kırık arasında kalan parça homolog olmayan diğer kırık kromozoma giderek eklenir. Bu tip resiprokal (karşılıklı) olmayan translokasyona insersiyonel tip translokasyon denir. Bu tip mutasyonlar 3 kırık gerektirdiği için nadir görülür (Gardner ve Sutherland, 2004).

#### **2.3.1.1.3. Delesyon**

Delesyon bir kromozom parçasının kaybı ile kısmi monozomi oluşmasıdır. Klinik etkileri genellikle, delesyona uğrayan parçanın büyüklüğü ve bu parçadaki genlerin sayısı ve işlevine bağlıdır. Çok büyük delesyonlar, özellikle total genomun %2'sinden fazlasının kayba uğradığı kromozom anomalileri genellikle yaşama bağdaşmaz ve düşük ile sonlanırlar. Sitogenetik olarak görülebilen otozomal delesyonların yeni doğandaki sıklığı yaklaşık olarak 1/7000'dir (Müeller ve Young, 1995; Thompson ve ark., 2001). Delesyonlar, terminal veya intersisyel olabilir. Delesyonlar, basit olarak kromozom kırılması ve asentrik kısmın kaybolması ile ya da homolog kromozomlar veya kardeş kromatidler arasında eşit olmayan crossing-over sonucu oluşabilirler. Dengeli translokasyon veya inversiyon taşıyıcılarının verdiği dengesiz gametlerde de delesyonlar ortaya çıkabilir.

#### **2.3.1.1.4. Duplikasyon**

Homolog kromozomlar arasında gerçekleşen bir transpozisyon sonucu oluşur. Homolog kromozomlardan birinde iki kırık, diğerinde tek kırık oluşur. İki kırık arasında kalan parça, homolog kromozomdaki tek kırıklı bölge arasındaki kalan kısma yerleşir. Daha çok mayoz bölünme sırasında görülür, bir kromozom parçasının iki kopya halinde bulunmasına yol açar. Somatik hücrelerde her kromozomdan iki

adet bulunması kendiliğinden olan bir dublikasyondur. Dublikasyonlar, delesyonlara göre daha sık görülmesine rağmen, delesyonlar kadar zararlı değildir (Gersen ve Keagle, 2005). Bazı durumlarda bir gamette dublikasyon olması kromozomal dengesizlik (parsiyel trizomi)'le sonuçlanabilir.

#### **2.3.1.1.5. Ring Kromozom**

Bir kromozomun iki kolunun terminal kısmında oluşan iki kırık noktasının birleşmesiyle oluşan halka şeklinde kromozomlardır. Sonuç olarak her iki kolunda terminal uçlarının delesyonu söz konusudur ve delesyona uğrayan bu uç kısımlar kaybolur (Gersen ve Keagle, 2005). Eğer halka kromozom bir otozomal kromozomda oluşursa klinik tablo ağır, fakat cinsiyet kromozomları ile ilgili ise daha hafif bulgular gözlenir. Ring (halka) kromozom en sık X kromozomunda görülmektedir.

#### **2.3.1.1.6. İzokromozom**

Mayoz II esnasında gerçekleşen, sentromerin her iki tarafında aynı kromozom kolunun gözleendiği kromozomlardır. Yapısal görüntü kromozomun kollarından birinin olmaması, diğerinin ise duplikasyonu biçimindedir (Gersen ve Keagle, 2005). Kromozom çiftinde fazla olan kromozom kolu için trizomik, eksik olan kromozom kolu için monozomik olduğundan daima fenotipik değişiklik ile birlikte görülür. En sık görülen izokromozom, X kromozomunun uzun koluna ait olan i(Xq)'dur. Turner sendromuna neden olmaktadır.

#### **2.3.1.1.7. Disentrik Kromozom**

Disentrik kromozomlar, sentromer içeren iki kromozom parçasının (farklı kromozomlardan veya bir kromozomun iki kromatidinden) sentromeri bulunmayan parçalarını kaybederek uç uca eklenmesiyle oluşan nadir görülen bir kromozom anomalisidir. Bu kromozomlar, parasentrik inversiyon taşıyıcılarının dengesiz ürünlerinde de görülebilirler. Disentrik kromozomlar iki sentromeri olmasına rağmen, bir sentromerin inaktif olması veya kromozomların kutuplara çekilmesi sırasında birbiri ile uyumlu bir şekilde kutuplara gitmesi durumunda bu

kromozomlara psödodisentrik kromozomlar denir (Thompson ve ark., 2001). En fazla cinsiyet kromozomları ve akrosentrik kromozomlarda görülür.

#### **2.3.1.1.8. Marker Kromozom**

Marker kromozomlar, normal kromozom çiftine ek ve çoğunlukla mozaik olarak bulunan, klasik sitogenetik yöntemlerle tanınmayan kromozomlardır. Genel popülasyonda görülme sıklıkları yaklaşık olarak 2000 kişide 1'dir (Starke ve ark., 2003). Marker kromozomlar bireylerde fenotipik bulgu saptandığı gibi normal fenotipli bireylerde de görülmektedir. Sentrik heterokromatinden oluşan marker kromozomlar fenotipi etkilemez. Eukromatin materyali taşıyanlar ise ağır klinik bulgulara neden olmaktadır. Bu nedenle marker kromozomların kökenlerinin belirlenmesi ve eukromatin materyal taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi son derece önemlidir. Marker kromozomlar, X/Y ya da otozomal kromozomlardan köken alabilir. Otozomal kökenli markerlar içinde en sıklıkla (~ %40) görülen 15'inci kromozom kökenli olan disentrik kromozomlardır (Kochhar ve Ghosh, 2013).

#### **2.3.1.2. Sayısal Kromozom Anomalileri**

Genellikle gamet hücrelerinde oogenez veya spermatogenezde I. ya da II. Mayoz bölünme sırasında, nadir olarak görülen postzigotik mitotik bölünme sırasında oluşan hatalar (nondisjunction veya anafaz lag) sonucunda, kromozom sayısında artış ya da azalma ile kendini gösteren anomaliler "sayısal kromozom anomalisi" olarak tanımlanır (Gersen ve Keagle, 2005). Bunlar;

##### **2.3.1.2.1. Anöplöidi**

Diploid bir hücrede tek bir kromozomun sayısının artması ( $2n+1$ =trizomi) ya da eksilmesi ( $2n-1$ = monozomi) ile oluşur (Gersen ve Keagle, 2005). Klinik olarak gösterilmiş gebeliklerin en az %3 ile %4'ünde anöplöidi olduğu bildirilmektedir. Moleküler genetik çalışmalar, trizomilerin mayoz I ve II'de meydana gelen nondisjunction, monozomilerin ise anafazda geri kalma ile oluştuğu gösterilmiştir. Hücrelerdeki kromozom sayısına göre,  $2n+1$  trizomi,  $2n+2$  tetrazomi,  $2n-1$  monozomi,  $2n-2$  nüllüzomi şeklinde tanımlanır. Anöplöidi nedenleri iki farklı şekildedir;

Non-disjunction (Kromozomların Ayrılmaması): I. veya II. mayoz bölünme sırasında kromozom veya kromatidlerin sentromerlerinden ayrılarak birer kutba gitmesi gerekirken, kromozomlar sentromerlerinden ayrılmayarak sadece bir kutba giderler. Bu olaya kromozom ayrılmaması denir (Gersen ve Keagle, 2005). Sonuçta oluşan hücrede birinde aynı kromozomdan iki tane bulunurken, diğer hücrede o kromozomdan bulunmaz. Aynı kromozomdan iki tane bulunan gamet hücresi normal kromozom kurulumuna sahip bir gamet ile birleşecek olursa, oluşacak olan yeni gamet hücresi kromozomdan iki yerine üç adet bulunduracağından trizomik (örn; Down sendromu-46,XX/XY+21, Klinifelter sendromu-46XXY) olacaktır. Kromozomu hiç taşımayan gamet, normal kromozomlu gametle birleşecek olursa, oluşacak olan gamette bir adet eksik kromozom olacağından monozomik (örn: Turner sendromu-45,X) olacaktır.

Anafaz Lag: Kromatidler sentromerlerinden ayrılıp zıt kutuplara çekilirken herhangi bir hata sebebiyle biri anafazda geri kalır. Geride kalan kromozom çekirdek içine katılmaz sitoplazmada kalır. Eğer zigot oluştuğundan sonraki mitoz bölünmeler arasında anafazda geri kalma olursa, mozaik yapıda birey oluşacaktır. Anafaz gecikmesi sonucunda oluşacak hücreler; ya yarısı normal, diğer yarısı monozomik ya da yarısı trizomik, diğer yarısı monozomik olacak şekilde mozaikizm gösterirler.

#### **2.3.1.2.2. Poliploidi**

Kromozom haploid sayısının ( $n=23$ ) katları halinde artışı ile ortaya çıkan (triploidi= $3n$ , tetraploidi= $4n$ ) sayısal kromozom anomalilerine poliploidi denir. Poliploidiler, daha çok spontan abortus materyallerinde görülmektedir (Gersen ve Keagle, 2005).

#### **2.4. Flouresan In Situ Hibridizasyon (FISH)**

FISH yöntemin ortaya çıkışı 1969 yılında birbirlerinden bağımsız çalışan Gall ve Pardue'nin yapmış oldukları ribozomal problemlerini *Xenopus Laevis* nükleusundaki DNA'ya hibridize etmeleri ile başlamıştır (Gottfredson, 1999). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, radyoaktif izotoplarla işaretlenmiş problemlerini, denatüre edilmiş sitolojik preparatlarda hedef hücre DNA'sı ile hibridize etmişler ve otoradyografiden sonra hibridizasyon bölgelerinin gümüş partiküllerle işaretlendiğini göstermişlerdir.

$^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$  gibi radyoizotoplar tekniği ilk dönemlerde problemlerin işaretlenmesinde kullanılmaktaydı, ancak radyoizotoplar birçok açıdan dezavantaja sahiptir. Radyoaktif moleküllerin hibridizasyon alanı dışına saçılmaları, zararlı olmaları, ömürlerinin kısa olması ve radyoaktif işaretlemenin uzun zaman alması araştırıcıları yeni işaretleme tekniklerinin geliştirilmesine yönlendirmiş ve nükleik asitlerin işaretlenmesinde nonizotopik floresan ve enzimatik özellikli moleküller kullanılmaya başlanmıştır. 1980'li yılların sonlarında ise, problemlerin işaretlenmesi için yeni teknikler bulunması ile FISH yöntemi geliştirilmiş ve yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Piper ve ark., 1995; Gottfredson, 1999).

Sitogenetik ile moleküler genetik arasında bir köprü görevi yapan FISH tekniği sitogenetik tanıda önemli bir yerdedir (Bruno ve ark., 2006). Moleküler genetikteki ilerlemeler çok sayıda özgün DNA dizilerinin klonlanmasına olanak sağlamış ve bu sayede belirli bölgelere özgün tek iplikli DNA oligonükleotidleri (prob) elde edilmiştir (Levsky ve Singer, 2003). Bu problemlerin, metafaz kromozomlarında ya da interfaz nükleus DNA'sına hibridizasyonu sayesinde özgün bölgeler görüntülenebilmiştir. FISH, standart bantlama teknikleri ile tanımlanamayan 5mb dan küçük kromozom anomalilerinin (submikroskopik delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar, inversiyonlar ve marker kromozomlar) aydınlatılmasında sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Genomda istenilen hedef DNA bölgesinin floresan veren DNA veya RNA problemleri ile boyanarak "in situ" olarak gözlenmesine imkan sağlamaktadır. Bu yöntemin temelinde, görüntülenmesi hedeflenen DNA bölgesine komplementer florokromlarla işaretlenmiş olan tek iplikçikli Timidin içeren oligonükleotid adını verdiğimiz DNA dizileri kullanılır. Florokrom ile işaretlenmiş DNA dizilerine prob adı verilir. Kullanılan bu oligonükleotid problemler sayesinde submikroskopik delesyonların varlığı tespit edilebilmektedir. Floresan işaretili prob hibridize olduğu zaman kromozomlar floresan boyadan yayılan ışığın belirli dalga boyunda absorblanması ile görünür hale geliyor. Tek iplikli nükleik asit moleküllerinin tamamlayıcı diziler ile uygun koşullarda eşleştirilerek çift iplikli hale getirilmesi için gerçekteştirilen reaksiyon hibridizasyondur. Hibridizasyon, sinyalin ve prob ile hibridize olan DNA segmentinin lokalizasyonu mikroskop altında belirgin hale getiriyor.

FISH çalışması yapılabilen örnekler; periferik ve fetal kan hücreleri, doku ve cilt biyopsisi, amniyon sıvısı, koryonik villus (CVS), tahliye materyali, sperm ve embriyo hücresidir. Bu örnekler farklı işlemler kullanılarak bir hazırlık aşamasından geçirildikten sonra yaymaları yapılıyor ve uygun prob lar yardımı ile analize hazır hale getiriliyor. Basit olarak FISH çalışma basamakları şu şekildedir;

- Hedef DNA (metafaz kromozomu ya da interfaz nükleusu) ve prob hazırlanır.
- Hedef DNA ve prob yüksek ısıda denatüre edilir. Böylece DNA'nın çift zincirli yapısı açılarak tek zincirli konuma gelir.
- Hedef DNA ve prob 37°C'de hibridize olur. (hibridizasyon süresi çalışılan proba göre değişmektedir.) Bu aşamada prob lar hedef kromozom üzerindeki komplementeri oldukları bölgeye ya da bölgelere bağlanır.
- Hibridizasyon süresi bitiminde non-spesifik bağlanmalardan ve artefaktlardan kurtulmak için çeşitli sıcaklık ve yoğunluklardaki tuz veya deterjan türevi maddelerle yıkama işlemi gerçekleştirilir. (Post- hibridizasyon)
- Kromozomlar kontrast oluşturan renklerle (DAPI- 4-6diamino-2-phenylidole/ Antifade) boyanarak görünür hale getirilir.
- Floresans mikroskop yardımı ile incelenir.

### **Tanısal Amaçlı kullanılan FISH**

- Klinik sitogenetik
  - PGD, PCS, CGH.
  - İnterfaz nükleusu ve metafaz kromozomları
  - Mikrodelesyon sendrom tanısı
  - Kanser sitogenetiği
- Dokuda enfeksiyon ajanların tespiti
- Dokuda mRNA analizi

## Araştırma Amaçlı kullanılan FISH

- Gen haritalaması
- Onkogen, tümör supresör gen analizi
- Mikrobiyoloji / viroloji
- Gen ekspresyon analizi
- Somatik hücre hibrit analizi
- Mayoz / Mitoz analizi
- Hücre tanımlaması

### 2.4.1. Prob Çeşitleri

Hedef kromozom ya da kromozom bölgesine ve kullanım amacına bağlı olarak farklı prob çeşitleri vardır. Bunlar;

**2.4.1.1. Tüm Kromozom Boyama Problemleri (painting prob):** Bir kromozomun tümünü kapsayacak şekilde farklı bölgelerine özgün DNA dizilerinden oluşturulan prob karışımı ile kromozomun p terminalinden q terminaline kadar olan bölgenin boyanması sağlanır. Her kromozom kolunu ayrı renkte boyayabilen “arm spesifik problemler” ya da kromozomların belli bantlarını veya tüm bantlarını ayrı renkte boyayabilen “bant spesifik problemler” bulunmaktadır. Kromozom ya da kromozom kollarının rahatlıkla tanımlanmasını sağlayan problemlerdir (Manuelidis, 1981).

**2.4.1.2. Tekrarlayan Dizi (satellit) Problemleri:** İnsan DNA’sı büyük ölçüde tekrarlayan diziler içermektedir. Bu tekrar dizileri ve satellit bölgeleri total genomun %10-20’sini oluşturmaktadır. Kromozomların sentromerik ya da perisentromerik bölgelerinde  $10^5$ – $10^6$  baz çifti uzunluğunda tekrar dizileri vardır. Bunlar alfa-satellit, beta-satellit ya da diğer satellit DNA dizilerinden oluşur ve her kromozom için spesifiktir (Manuelidis, 1981).

Tekrarlı dizilere özgün problemler; “sentromerik”, “beta satellit”, “klasik satellit” ve “telomerik” problemler olarak gruplandırılır. Sentromere yakın bulunan alfa-satellit



probları genellikle güçlü sinyaller verirler. Çünkü kromozomun sentromer bölgesinde çok yoğun tekrarlayıcı DNA dizileri vardır. Kromozomların numaralandırılması, monozomiler, trizomiler, cinsiyet kromozomları ve fetal anöploidilerin hızlı tanısı için kullanılır. Beta satellit problemler, perisentrik heterokromatin bölgelere, akrosentrik kromozomlara ve 9. kromozoma lokalizedir. Klasik satellit problemler, AATGG tekrar dizileri ile bağlantılı olarak 1, 9, ve 16. kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerine ve Y kromozomunun uzun koluna özgü DNA dizilerinden oluşur (Willard, 1990).

Telomerik problemler ise kromozomların terminal bölgelerinin tanımlanmasını sağlayan problemlerdir. Telomer bölgeleri, GTG bantlama ile açık renk boyanan uç bölgelerdir ve bu nedenle olası bir parça değişiminin tanınması oldukça zordur. Telomerlerin yapısında tekrar bölgelerinin kromozoma özgün ve işlevsel genler açısından zengin subtelomerik bölgeler bulunmaktadır. Hücre yaşlanması, kromozomal yeniden düzenlemeler ve delesyonlar için bu problemler kullanılır. Her kromozoma özgü telomerik prob bulunmaktadır.

**2.4.1.3. Lokus Spesifik Prob (Tek gen problemleri):** Mikrodelesyon ya da duplikasyonları (DiGeorge Sendromu, Miller-Dieker Sendromu, Prader Willi/Angelman Sendromu vb.) tespit etmek ve gen lokalizasyonunu belirlemek için kullanılan bir gen/lokus bölgesi problemlerdir. Tümör genetiğinde de sıklıkla kullanılan prob çeşididir.

Sitogenetikte kullanılan FISH tekniğinin bazı avantaj ve dezavantajları vardır (Yakut ve ark., 2002). Avantajları;

- İyi kalitede, hızlı ve güvenilir sonuç elde edilebilir.
- DNA veya RNA'nın yapısının bozulmadan incelenmesine olanak sağlar.
- Mozaisizm tanısının konmasında etkili bir yöntemdir.
- Bölünmeye hazırlık evresinde (interfaz) olan bir hücreden sonuç elde edebilme kolaylığı sağlamaktadır.

Dezavantajları ise;

- Tespit edilen anomaliler seçilen prob ile sınırlıdır.
- Birden fazla anomaliyi aynı anda tespit etme olanağı sağlamaz.
- Parafin kesitler ya da solid dokularda daha zor sonuç elde edilebilir.
- Denatürasyon aşamasında uygun sıcaklık kullanılmadığı takdirde parçalı sinyal elde olasılığı vardır. Bu durum doğru bir analiz yapmayı zorlaştırabilir.
  - D ve G grubu kromozomlarda satellit DNA olduğundan kısa kollarında her zaman net sinyaller alınmayabilir.
  - Uniparental isodizomi ve ince subtelomerik tandem tekrarları gözden kaçabilir.
  - Analiz için karanlık ortam ve flouresan ataşmanlı mikroskop olması gereklidir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hasta Grupları

Projemiz Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi tarafından TYL-2013-107 numaralı proje ile desteklenmiştir. Ayrıca Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 28/02/2013 tarihinde alınan EK-2013-28 nolu izin ile başlatılmıştır.

Çalışmamıza 30 tekrarlayan düşük çifti (30 kadın 30 erkek toplamda 60 kişi) ve kontrol grubu için 10 çift (10 kadın 10 erkek toplamda 20 kişi) olmak üzere 80 olgu dahil edilmiştir. Hasta grubumuz için tekrarlayan düşük endikasyonu ile gelen en az üç tekrarlı düşük öyküsü olan bireyler, kontrol grubu hastalarımız için ise sağlıklı en az iki çocuk sahibi olan hiç düşük öyküsü bulunmayan bireylerden oluşan çiftler seçilmiştir. Bu hastalarımızın poliklinik doktorumuz tarafından bilgileri alınmış, pedigrileri çizilmiş ve hasta bilgi formları doldurulmuştur. Hastaların yaşı, gebelik sayısı ve bu gebeliklerinden kaçının düşük ile sonlandığı, eşlerin ailelerinde düşük öyküsü olan bireylerin yakınlık dereceleri ve eşler arasında akraba evliliği olup olmadığı bilgi formlarına eklenmiştir. Tüm bireylere öncelikle kromozom analizleri ardından FISH analizleri yapıldı. Hasta ve kontrol grubuna dahil edilen tüm bireylere çalışma hakkında bilgi verilerek onamları alındı.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı'na gelen tüm kan örneklerinden FISH yöntemi ile 9 alfa-satellit prob, 16 alfa-satellit prob, XY alfa-satellit prob ve Subtelomerik prob kullanılarak çalışılmaları yapılmıştır.

#### 3.2. Sitogenetik Analiz

Tekrarlayan düşükleri olan çiftlerimizden ve sağlıklı kontrol grubunu oluşturan çiftlerimizden 5 ml heparinize enjektör ile periferik kan örnekleri alınarak sitogenetik analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları normal çıkan hastalarımıza olası sayısal ve yapısal kromozom aberasyonlarının tespit edilebilmesi amacı ile FISH yöntemi uygulanarak analizleri yapıldı.

### **3.2.1. Lenfosit Hücre Kültürü**

Sitogenetikte kromozom eldesi için en sık kullanılan yöntem kısa süreli lenfosit hücre kültürü yöntemidir. Periferik kan hücreleri, üretilmek üzere kültür ortamlarına alındıktan sonra 72 saatlik süre sonunda harvest'e alınır. Daha sonra elde edilen lenfosit hücreleri preparat haline getirilir ve GTG bantlama işlemi sonrası değerlendirmeye alınır.

#### **3.2.1.1. Zenginleştirilmiş Besiyerinin Hazırlanması**

100 ml RPMI 1640 (Wisent Inc.) içerisine; kültür ortamını zenginleştirmek ve hücrelerin çoğalmasına olanak sağlamak amacıyla 20 ml fetal bowin serum (Biological Industries), besiyerini desteklemek amacıyla 2 ml L-Glutamine (Wisent Inc.), lenfosit hücrelerini mitoz'a yönlendirmek için 1 ml fitohemaglutinin (Biological Industries) ve herhangi bir kontaminasyon olasılığını ortadan kaldırmak için 2 ml penisilin-streptomisin (Biological Industries) eklenerek hazırlanır.

Her olgudan steril, heparinle yıkanmış 5 ml enjektöre alınmış periferik kan örnekleri, içerisinde 5 ml medyum bulunan steril kapaklı falkon tüpleri içerisine 5-6 damla ilave edilerek ekimleri yapılır. Hafif karıştırıldıktan sonra eğik bir şekilde 72 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılır.

#### **3.2.1.2. Kromozom Eldesi için Kullanılan Solüsyonlar**

##### **3.2.1.2.1. Hipotonik**

0,075 M potasyum klorür (KCl) (Merck KGaA) olacak şekilde 2,8 gr KCl tartılarak 500 ml distile suda çözülerek stok solüsyon hazırlandı ve harvest sırasında kullanılmak üzere 37°C etüv'de bekletildi.

##### **3.2.1.2.2. Fiksatif**

1/3 glacial asetik asit %100 (Merck)/methanol %100 (Merck) ilave edilerek hazırlandı. Solüsyon kullanılmadan önce ve çalışma aralarında -20°C'de saklandı. Bu solüsyon her harvest işlemi öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

### 3.2.1.3. Harvest

Üremeleri için 37°C etüvde bırakılan kültür tüplerine harvestten 1,5 saat önce 100 µg/ml kolsemid (Biological Industries) eklenmiş, hafifçe karıştırılıp tekrar 37°C etüv'e yerleştirilmiştir. 72 saatlik süre sonunda kültür tüpü 1200 devirde 8 dakika santrifüje edilip supernatant bir pastör pipeti yardımı ile atılmış, dipte kalan pellet ve üzerindeki 1 ml'lik sıvı vorteksenerek üzerine toplam hacim 10 ml olacak şekilde daha önceden hazırlanmış olduğumuz hipotonik (0,075 M KCL) solüsyonu eklenmiştir. Tüpler 45-60 dakika arası 37°C'de etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 1200 devirde 8 dakika santrifüje edilip, supernatant atılmıştır. Tüp vorteksenerek yavaş bir şekilde fiksatif ilave edildi. Bu fiksatif işlemi tüp içerisindeki pellet berraklaşınca kadar tekrarlandı. İşlem tamamlandığında üzerinde hasta adı ve kod numaralarının yazılı olduğu lam üzerine cam pastör pipeti ile alınan pellet eğik bir açı ile damlatılarak yayıldı. Lamalar 1 gece oda sıcaklığında, ertesi gün 30 dakika 65°C hotplate üzerinde yaşlandırılmak üzere bekletildi.

### 3.2.1.4. GTG- Giemsa Bantlama Tekniği

Her kromozom kendine özgü heterokromatin yoğunluğuna göre değişen açık ve koyu bant bölgeleri içerir. Bu bölgeler premetafaz ve metafaz kromozomlarında sayıca farklılık gösterir. Kromozomların ilk defa 1971 Paris Kongresi'nde ideogramları belirlenmiş, 1985 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)'de yayınlanmıştır (Felix, 1995).

#### 3.2.1.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

Phosphate Buffer Saline (PBS): 10x'lik PBS (Snp biyoteknoloji) solüsyonu her bant işlemi öncesinde 10 ml PBS üzerine 90 ml distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 1x olacak şekilde hazırlanır.

Tripsin: Balon joje içerisinde hazırlanan 100 ml PBS solüsyonundan 20 ml eksilttikten sonra üzerine 0,15 gr toz tripsin (Biological Industries) eklenip çalkalanarak karıştırılır.

Giemsa: Gurr Buffer (Biological Industries) stok solüsyonu; 1 litre distile su içerisine 1 adet gurr buffer tablet ilave edilerek hazırlanır. 4 ml Giemsa (Merck KGaA), stok solüsyondan 96 ml ilave edilerek 100 ml'ye tamamlanır.

Preparatlar yaşlandırma işlemi sonrası oda ısısındaki tripsin içerisine yerleştirilir, 20-30 saniye arası bekletilip PBS-distile (tripsinin aktivasyonunu sonlandırmak için) su karışımında yıkanır ve %4'lük Giemsa solüsyonu içerisinde 1 dakika bekletilir. Süre sonunda distile su'dan geçirilerek kurutma işlemi yapılır.

Hazırlanan preparatlar, 100x objektifle immersiyon yağı damlatılarak Leica marka mikroskop ile 20 metafaz plağı kromozomal anomalileri açısından incelendi ve görüntüleri Cytovision programı kullanılarak bilgisayar ortamında kaydedildi. Analiz sonuçları normal çıkan hastalarımızın FISH yöntemi ile analizleri yapılmak üzere ikinci bir işleme alındı.

### **3.2.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi**

#### **3.2.2.1. Kullanılan Solüsyonlar**

##### **3.2.2.1.1. 20xSSC (Sodium Salina Citrat)**

20xSSC buffer (Appllichem GmbH), 1 litrelik ambalajda stok solüsyon olarak kullanılmıştır.

##### **3.2.2.1.2. 2xSSC**

20xSSC stok solüsyondan 10 ml alınıp, üzerine 90 ml distile su ilave edilerek, hacim 100 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH ölçümü yapılarak, pH: 7.0 olmasına özen gösterilmiştir. Kullanım esnasında solüsyonun, oda sıcaklığında olmasına dikkat edilmiştir.

##### **3.2.2.1.3. Etanol Serileri**

Preparatı dehidrate etmek amacı ile; %70, %85 ve %100'lük etanol serileri hazırlandı.

##### **3.2.2.1.4. 0,4xSSC**

20xSSC stok solüsyondan 2 ml alınıp, 98 ml distile su ilave edilerek, hacim 100 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH: 7.0 olmasına dikkat edilmiştir.

### **3.2.2.1.5. 0,25xSSC**

20xSSC stok solüsyonundan 1,3 ml alınıp 98,7 ml distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Solüsyonun pH: 7.0 olmasına dikkat edilmiştir.

### **3.2.2.1.6. 2xSSC, %0,05 Tween 20**

20xSSC stok solüsyonundan 10 ml alınıp, 90 ml distile su ilave edilerek, hacim 100 ml'ye tamamlandı. Bu solüsyona, 50 µl Tween-20 (Sigma) ilave edilerek hazırlandı.

## **3.2.2.2. Kullanılan FISH Probları**

### **3.2.2.2.1. Kromozom 16 ve 9 Alfa satellit prob**

Kromozom 9 (cytozell aquarius) ve kromozom 16 (cytozell aquarius) probları; kromozomların sentromerik, perisentromerik veya heterokromatik bölgelerine özgü problardır. Kromozom 9 (LPE 009R/G) pobu; 9q12 bölgesi D9Z3 lokusu için, kromozom 16 (LPE 016R/G) probu; 16p11.1-q11.1 bölgesi D16Z2 lokusu için kullanılan problardır. FISH çalışması yapılacak olan örneklerin interfaz veya metafaz aşamasındaki kromozomların satellit bölgelerinin kırmızı veya yeşil sinyalle rahatlıkla analiz edilmesine olanak sağlar.

Preparatların Hazırlanması: Olgulara rutin kromozom eldesi yöntemi uygulanarak son aşamasında 3 kez fiksatiften geçirilen periferik kan kültürleri, bir kez daha 1200 devirde 8 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı atılarak kalan 1 ml kadar pellet vortekslenir. Daha sonra temiz ve üzerinde hasta adı ile kodların yazılı olduğu lamlar üzerine mikropipet yardımı ile yayma yapılır. Lamlar oda sıcaklığında kuruduktan sonra hücreleri lam üzerine tespit etmek ve hücre kaybını önlemek için 2 dakika 2xSSC (pH: 7.0) solüsyonunda bekletilir. Daha sonra dehidratasyon için %70, %85 ve %100'lük alkol serilerinin her birinde, sırası ile 2'şer dakika bekletildi. Alkol serisi lam üzerindeki artefaktları yok etmek ve hücre içindeki fazla sıvıyı alarak probun etkisini arttırmak amacıyla uygulanır. Bu işlem sonrasında çıkarılan lamlar oda sıcaklığında kurutulur.

Pre denatürasyon: 3µl prob ile 7µl hibridizasyon solüsyonu bir mikrosantrifüj tüp içerisinde pipetaj yaparak karışım şeklinde hazırlanır ve ısınması için 37°C etüvde bekletilir. Kuruyan lamların herbirinin üzerine 10µl hazırlanan karışımdan

damlatılarak 24x24 mm boyutunda lamel ile üzeri kapatılır. Daha sonra lamelin etrafı rubber cement yapıştırıcı ile dışarıdan hava almaması için kapatılır.

Denatürasyon Aşaması: Hazırlanan preparatlar 75°C (+/-1°C) hotplate üzerinde ve 2 dakika bekletilir.

Hibridizasyon Aşaması: Denatürasyon işlemi tamamlandıktan sonra içerisinde nemli bir gazlı bez bulunan hibridizasyon kutusuna preparatlar yerleştirilir. Kutunun kapağı kapatılarak etrafı parafilm ile çevrilir. Hibridizasyon için, over-night 37°C etüv içerisinde inkübasyona bırakılır.

Post Hibridizasyon Yıkamalar: Hibridizasyon işlemi sonrası lamel etrafındaki rubber cement dikkatli bir şekilde alınır ve lamın üzerinden lamel yavaş bir şekilde kaldırılır. 72°C'ye (+/-1°C) ayarlanan su banyosuna yerleştirilen şale içerisinde 0.25xSSC (pH: 7.0) solüsyonu hazırlanır, solüsyon sıcaklığının 72°C (+/-1°C) olması beklenir, lamlar bu solüsyon içerisine yerleştirilerek 2 dakika bekletilir. Süre sonunda preparatlar; oda sıcaklığındaki 2xSSC/%0,05 Tween-20 solüsyonu içerisinde 30 saniye yavaşça karıştırılarak bekletilir. Solüsyondan çıkarılan lam üzerindeki fazla solüsyonun uzaklaştırılması sağlanır. Ancak lamın tamamen kurumamasına özellikle dikkat edilir. Lamın üzerine 10 µl 4-6 diamino-2-phenylinodole (DAPI-Antifade) solüsyonu damlatılır. Lam, 24x24 mm boyutlarındaki lamel ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılır. Daha iyi sinyal alınabilmesi için lam, floresan mikroskopunda inceleme yapmadan önce hibridizasyon kutusuna konularak +4°C'de 10 dakika kadar bekletilir.

#### **3.2.2.2.2. Kromozom XY Alpha satellit**

Kromozom X (Cytocell aquaris)(LPE 0XR/G) alfa satellit probu Xp11.1-q11.1 bölgesi DXZ1 lokusuna spesifik bir probdur. Kromozom Y (Cytocell aquaris)(LPE 0YcR/G) alfa satellit probu Yp11.1-q11.1 bölgesi DYZ3 lokusu için spesifik bir probdur.

Preparat hazırlama: Santrifüj sonrası süpernatantı atılan pellet lam üzerine mikropipet yardımı ile yayılır. Oda sıcaklığında kurutulan lam 2xSSC (pH: 7.0) içerisinde 2 dakika, daha sonra %70, %85, %100'lük etanol serisinde 2'er dakika bekletilerek geçirilir. Oda sıcaklığında kurutulur.



Pre denatürasyon: Hazır karışım şeklinde olan prob içerisinde 10 µl lamın üzerine damlatılıp 24x24 lamel ile kapatılır. Lamel etrafı rubber cement yapıştırıcı ile kapatılır.

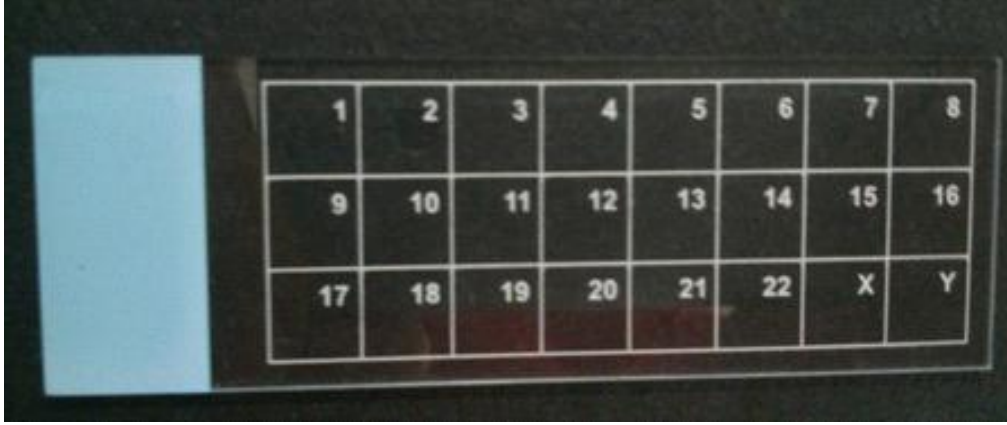
Denatürasyon: Hazırlanan preparatlar 75°C (+/-1°C) hotplate üzerinde ve 2 dakika bekletilir.

Hibridizasyon: Nemli hibridizasyon kutusu içerisine lamlar yerleştirilip kapağı kapatılarak 37°C (+/-1°C) etüv'de over-night bekletilir.

Post Hibridizasyon: Hibridizasyon süresi sonrasında lamın üzerindeki rubber cement kaldırılarak lamel alınır. 72°C'ye (+/-1°C) ayarlanan su banyosuna yerleştirilen şale içerisinde 0,4xSSC (pH: 7.0) solüsyonu hazırlanır, solüsyon sıcaklığının 72°C (+/-1°C) olması beklenir, lamlar bu solüsyon içerisine yerleştirilerek 2 dakika bekletilir. Preparatlar oda sıcaklığındaki 2xSSC/%0,05 Tween-20 solüsyonu içerisinde 30 saniye yavaşça karıştırılarak bekletilir. Süre sonunda lamın tamamen kuruması beklenmeden 10 µl DAPI-Antifade eklenip üzerine lamel kapatılır. 10 dakika +4°C'de bekletilir.

### **3.2.2.2.3. Chromoprobe Multiprob-T Sistemi**

Subtelomer spesifik proplar, kromozomların uç bölgelerindeki DNA dizilerine spesifik proplardır. Her kromozomun p ve q kollarının telomerik bölgelerini farklı iki renkte etiketleyerek tanımlanmasına yardımcı olur. p telomerik bölge için yeşil sinyal, q telomerik bölgeler için ise kırmızı sinyal alınarak analiz yapılmaktadır. Bu yöntemde; daha etkili bir hibridizasyona olanak sağlayan 23+XY olarak hazırlanmış, toplamda 24 kareye bölünmüş bir lam kullanılır. Ayrıca 24 kareye bölünmüş ve her bir karede farklı kromozomlara spesifik prob bulunan bir Multiprob-T sistemi kullanılmaktadır.



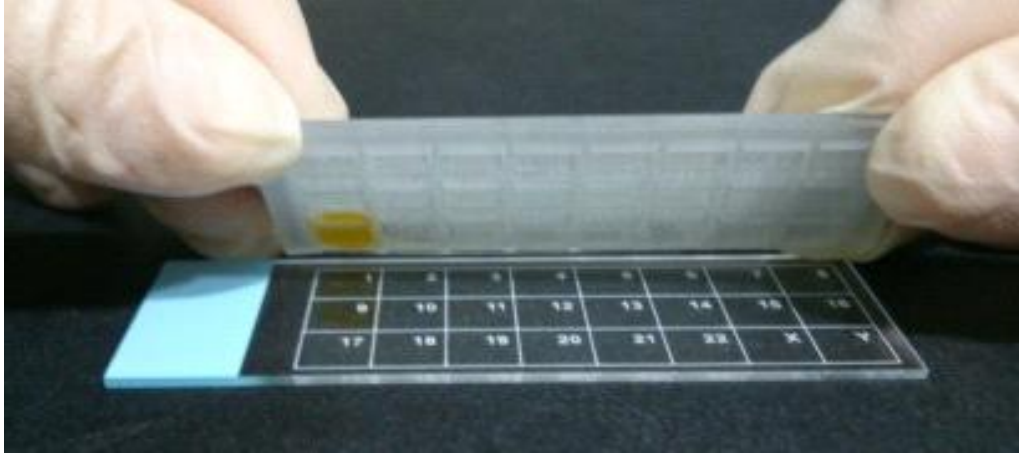
**Şekil 1.** Yayma için kullanılacak olan 24 kareye bölünmüş lam.



**Şekil 2.** 24 kareden oluşan ve herbir karede farklı kromozomların telomerlerine spesifik prob içeren Multiprob-T.

Preparat hazırlama: Kültürasyon aşamasından sonra üçüncü fiksatiften geçirilip süpernatantı atılarak elde edilen 1 ml'lik pellet vortekslenerek mikropipet yardımı ile karelere bölünmüş lam üzerine, her kareye 2 µl olacak şekilde yayma yapılır. Oda ısısında kuruyan lam 2 dakika 2xSSC'de bekletilir. Sonrasında lam her birinde 2'şer dakika olacak şekilde etanol serisinden (%70, %85, %100) geçirilir ve kurutulur.

Pre denatürasyon: Öncede ısıtılmış olan hibridizasyon solusyonundan her kareye 1 µl damlatılır. Daha sonra Multiprob-T, sarı renkli işaretlenmiş 1 numaralı kromozoma ait prob içeren kısmı lam üzerindeki 1 numaralı karenin üzerine gelecek şekilde dikkatli bir şekilde kapatılır.



**Şekil 3.**Yayma yapılmış lam üzerine Multiprob-T kapatma işlemi.

Denatürasyon: Hazırlanan preparat 75°C (+/-1°C) hotplate üzerinde ve 2 dakika bekletilir.

Hibridizasyon: Kapalı bir kutu içerisine preparat yerleştirilip kapağı kapatılarak 37°C (+/-1°C) su banyosunda over-night bekletilir.

Post Hibridizasyon: Hibridizasyon süresi sonrasında Multiprob-T yavaş bir şekilde lamın üzerinden alınır. 72°C'deki (+/-1°C) su banyosu içerisine yerleştirilen şaleye 0,4xSSC (pH: 7.0) solüsyonu ilave edilir, solüsyon sıcaklığının 72°C (+/-1°C) olması beklenir, lamlar bu solüsyon içerisine yerleştirilerek 2 dakika bekletilir. Preparatlar oda sıcaklığındaki 2xSSC/%0,05 Tween-20 solüsyonu içerisinde 30 saniye yavaşça karıştırılarak bekletilir. Sonrasında lamın tamamen kuruması beklenmeden 20 µl DAPI-Antifade eklenip üzerine 24x60 ebatlarındaki lamel kapatılır. 10 dakika +4°C'de bekletilir.

### **3.2.2.3. Görüntüleme ve Sayım**

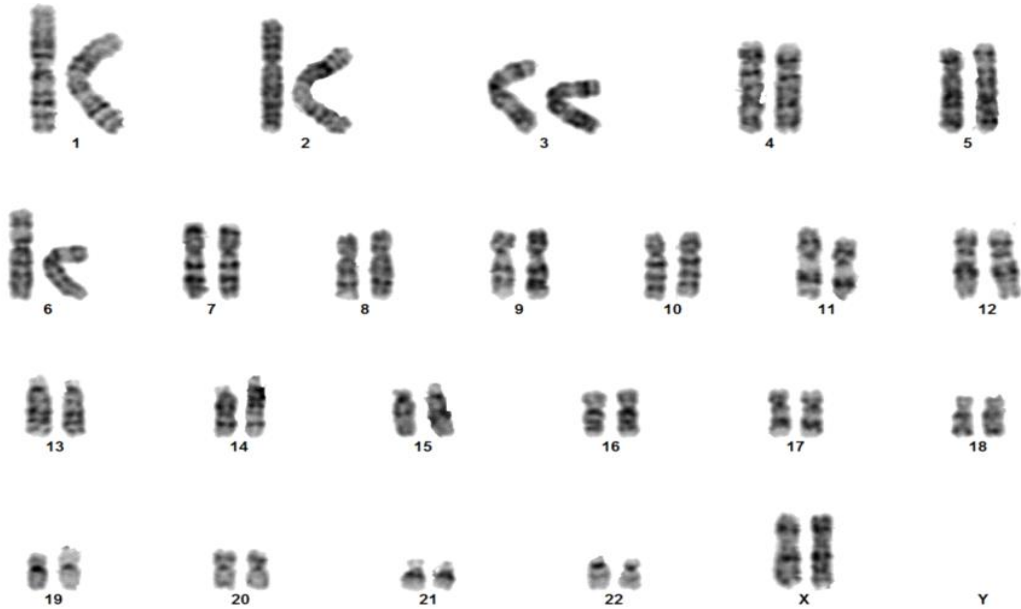
Sinyal netliğini arttırmak amacıyla +4°C'te bekletilen lamlar üzerine immersion-oil damlatılıp, Leica marka floresan mikroskopunda uygun filtreler kullanılarak taraması yapıldı. Cytovision sistemi kullanılarak metafaz ve interfaz hücre görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılarak analizleri yapıldı.

Kromozom 9 classic prob için spektrum green, kromozom 16 alpha-satellite prob için spektrum red ve kromozom XY alpha satellite probta ise X için spektrum green, Y için ise spektrum red uyumlu filtreler kullanılarak sinyaller değerlendirildi.

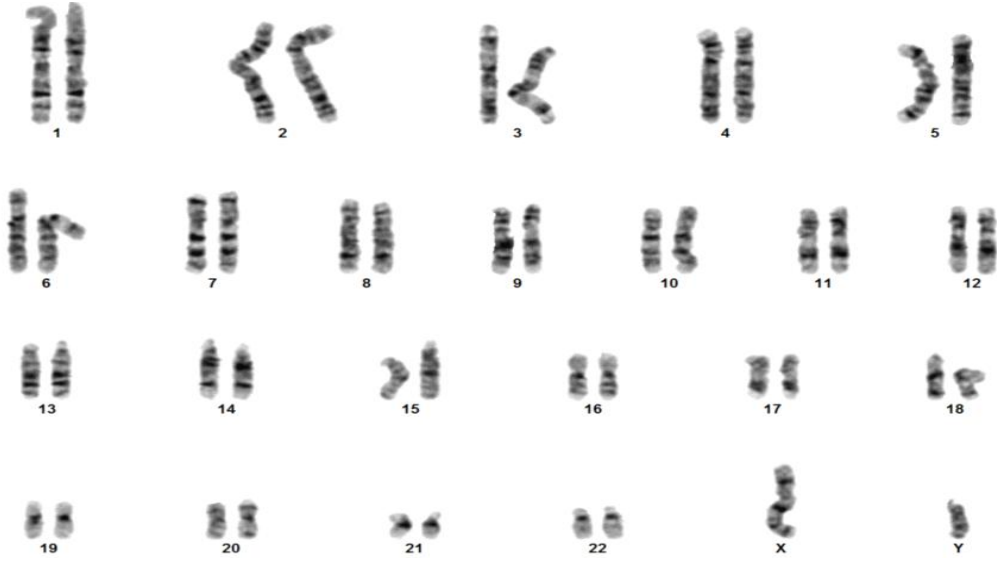
Ayrıca subtelomerik FISH çalışmalarının taranması sırasında q telomerik bölge için spektrum red ve p telomerik bölge için spektrum green uyumlu filtre kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen en az üç tekrarlı düşük öyküsü olan 30 çiftimizden (60 kişi) kadınların (30 kişi) yaş ortalaması 33,8 (29-36) iken erkeklerin (30 kişi) yaş ortalaması ise 36,1 (33-39)'dir. Hasta grubumuzu oluşturan 30 çiftin (60 kişi) toplamda yaş ortalaması ise 34,95 (29-39) 'tir. Kontrol grubu kapsamında çalışmaya dahil edilen ve herhangi bir düşük öyküsü olmayan, en az iki sağlıklı çocuk sahibi olan 10 çiftimizin (20 kişi) yaş ortalaması ise 38,2'dir. Tekrarlayan düşük çiftlerimizin poliklinik doktorumuz tarafından çıkarılan pedigrilerine göre çiftlerden kadınların 9'unun annesinde tekrarlı düşük öyküsü olduğu, 2'sinin ise ölü doğum öyküsü olduğu tespit edilmiştir. Geriye kalan 49 kişinin ise aile öykülerinde herhangi bir endikasyon olmadığı görülmüştür. FISH yöntemi ile kromozom spesifik proplar kullanılarak her bir olgunun analizini yapmadan önce 72 saatlik PHA uyarılmış lenfosit hücre kültürü yapılmış, GTG bantlama uygulanarak sitogenetik analizleri yapılmıştır. Sitogenetik analiz sonrası; 30 kadın olguda 46,XX ve 30 erkek olguda 46,XY normal karyotipe sahip olduğu gözlenmiştir.

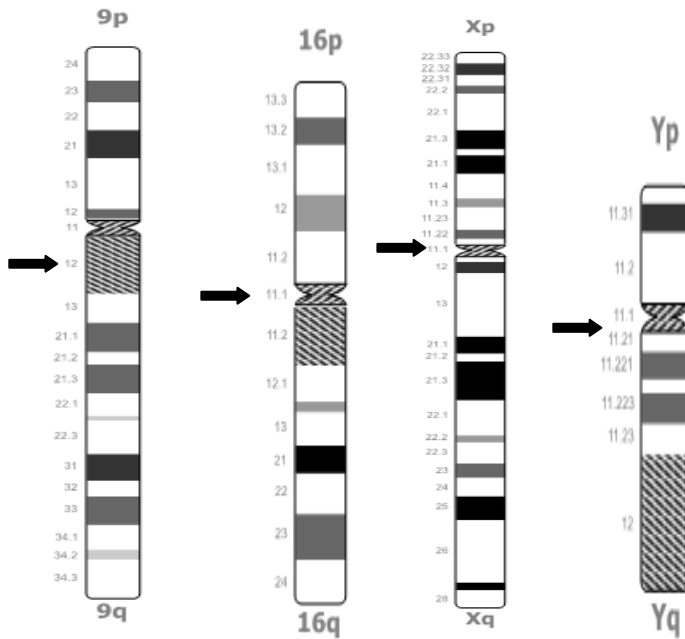


Şekil 4. XX bir olguya ait karyotip görüntüsü.



Şekil 5. XY bir olguya ait karyotip görüntüsü.

Kromozom 9'un D9Z3 lokusu 9q12 ( $\alpha$ -satellit) bölgesi, 16 numaralı kromozomun D16Z2 lokusu 16p11.1-q11.1 ( $\alpha$ -satellit) bölgesi, X kromozomunun DXZ1 lokusu Xp11.1-q11.1 ( $\alpha$ -satellit) bölgesi ve Y kromozomunun DYZ1 lokusu Yp11.1-q11.1( $\alpha$ -satellit) bölgeleri için spesifik problar ile subtelomerik problar kullanılarak FISH yöntemiyle analizleri yapılmıştır.



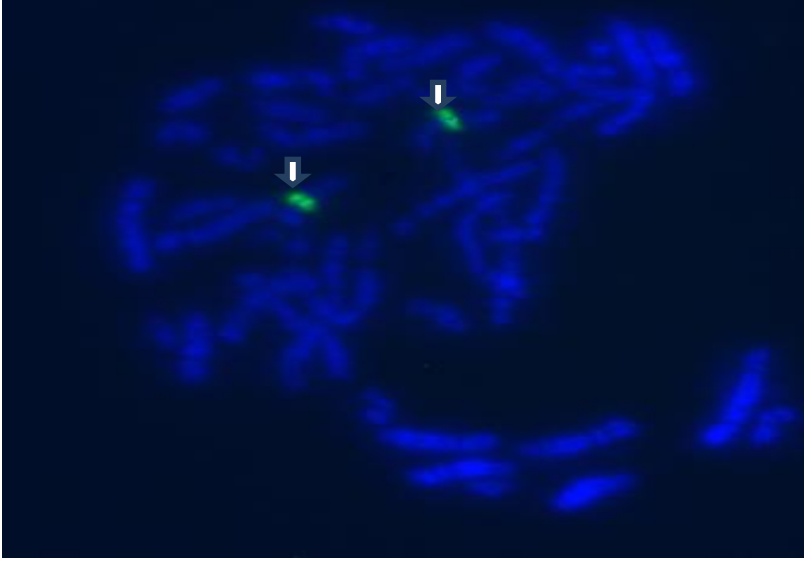
Şekil 6. 9q12, 16p11.1-q11.1 ve XY(p11.1-q11.1) bölgelerine ait ideogram.

#### 4.1. 9q12 Bölgesi Kontrol Grubu

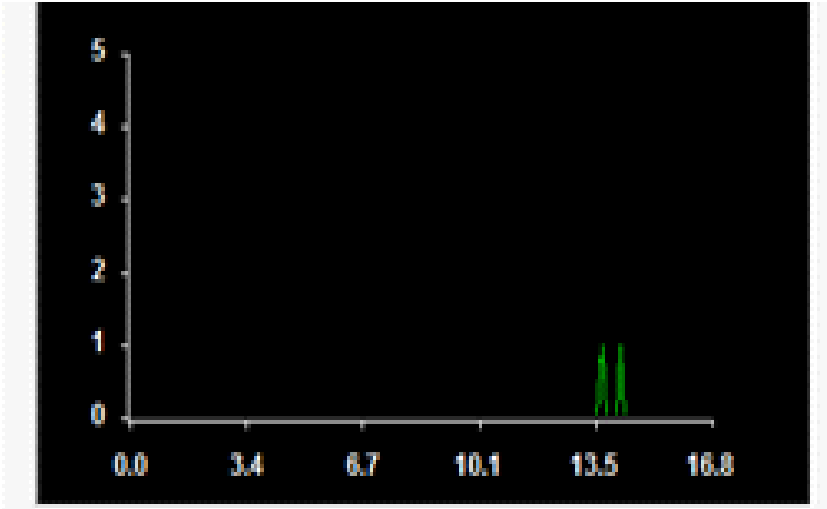
**Tablo 1.** Kontrol grubunda 9 numaralı kromozomun 9q12 bölgesindeki sinyal yoğunluğu ölçümleri ve oranları.

Çiftler	Olgular	D9Z3 lokusu 9q12 bölgesi
1.Çift	Kadın	1:1 (10,600/11,000)
	Erkek	1:1(15,800/15,940)
2.Çift	Kadın	1:1 (19,500/20,000)
	Erkek	1:1 (19,000/19,646)
3. Çift	Kadın	1:1 (22,000/23,000)
	Erkek	1:1 (19,160/19,900)
4.Çift	Kadın	1:1 (21,000/21,012)
	Erkek	1:1 (19,700/19,966)
5.Çift	Kadın	1:1 (19,046/20,430)
	Erkek	1:1 (18,300/19,010)
6.Çift	Kadın	1:1 (19,680/20,000)
	Erkek	1:1( 21,750/21,800)
7.Çift	Kadın	1:1 (19,840/20,946)
	Erkek	1:1 (17,700/18,430)
8.Çift	Kadın	1:1 (18,600/19,444)
	Erkek	1:1(16,500/17,900)
9.Çift	Kadın	1:1 (19,639/21,856)
	Erkek	1:1 (19,000/19,780)
10.Çift	Kadın	1:1 (21,036/21,908)
	Erkek	1:1 (22,400/23,106)

Kontrol grubu dahilinde her bir olguya ait sentromerik sinyal yoğunluklarının ölçümleri doğrultusunda analizleri yapılmıştır. Her olgudan 9 numaralı kromozom çiftinin 10 metafaz veya interfaz hücresindeki sinyal yoğunluk ölçüm sonuçlarından elde edilen sayısal değerler birbirleri ile oranlanarak kaydedilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan olgularda D9Z3 lokusu 9q12 bölgesi için herhangi bir heterokromatin bölge polimorfizmi tespit edilmemiştir.

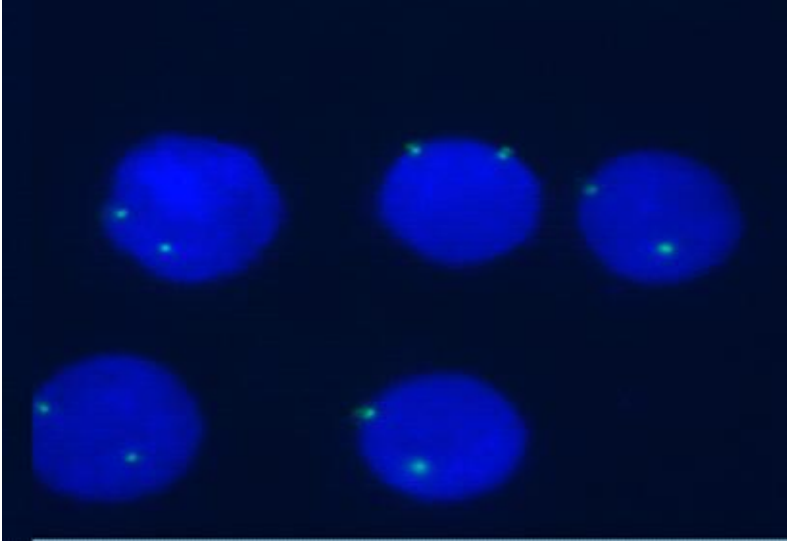


Şekil 7. Metafaz görüntüsünde 9q12 bölgesindeki FISH sinyali.

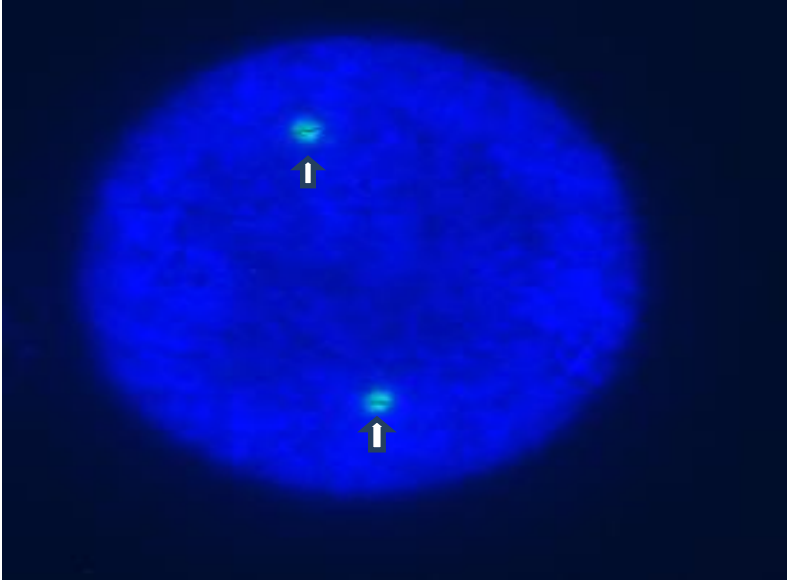


Şekil 8. Şekil 7'deki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:1 (13,530/14,038).

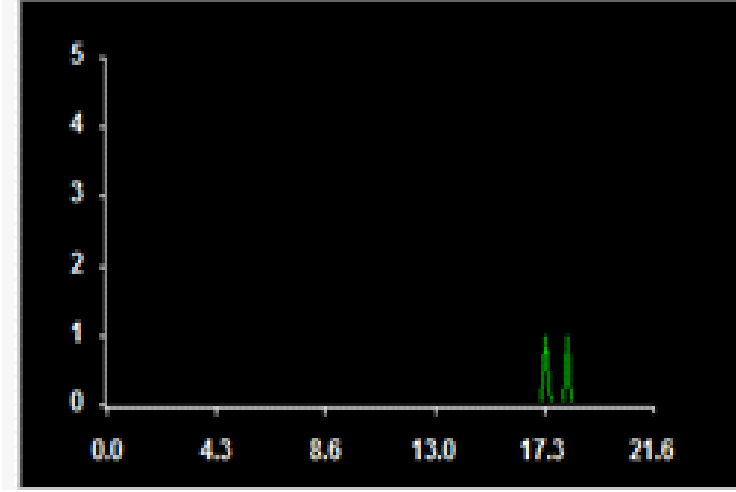




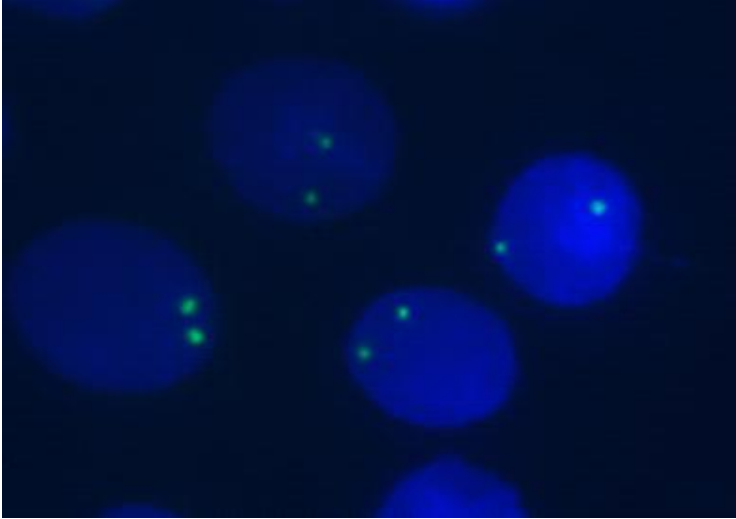
**Şekil 9.** Farklı interfaz görüntülerinde 9q12 bölgesindeki FISH sinyali.



**Şekil 10.** İnterfaz görüntüsünde 9q12 bölgesindeki FISH sinyali.



**Şekil 11.** Şekil 10'deki interfaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:1 (17,125/18,000).



**Şekil 12.** Farklı interfaz görüntülerindeki 9q12 bölgesi sinyalleri.

#### 4.1.2. 9q12 Bölgesi Çalışma Grubu

Kontrol grubunun ardından 30 çiftten oluşan tekrarlayan düşük çiftlerine kromozom 9'un alfa satellite bölgesine ait prob ile FISH çalışmaları yapılmıştır.

**Tablo 2.** Tekrarlayan düşük çiftlerini oluşturan bireylere ait 9q12 bölgesine ait kantitatif değerler ve oranları.

ÇİFTLER	Kromozom 9q12 (alfa satellite)	
	Kadın	Erkek
1. Çift	2:3 (9,100/15,805)	1:1 (19,710/19,895)
2. Çift	2:3 (11,345/19,615)	1:2 (12,000/25,000)
3. Çift	1:1 (16,000/16,556)	2:3 (8,010/14,000)
4. Çift	1:1 (13,530/14,558)	2:3 11,345/19,615)
5. Çift	1:1 (17,000/17,496)	1:1 (16,540/17,000)
6. Çift	1:1 (9,280/9,246)	1:1 (16,830/17,010)
7. Çift	1:1 (10,900/11,000)	1:1 (13,600/14,730)
8. Çift	1:1 (11,000/11,000)	1:1 (18,000/18,550)
9. Çift	1:2 (11,264/22,182)	1:1 (19,000/19,550)
10. Çift	1:1 (10,650/11,780)	2:3 (10,440/15,810)
11. Çift	1:1 (17,890/18,660)	1:1 (14,358/15,800)
12. Çift	1:2 (16,296/32,000)	2:3 (11,645/17,000)
13. Çift	1:1 (18,400/19,000)	1:1 (13,650/14,128)
14. Çift	1:1 (17,125/18,000)	1:1 (14,000/14,680)
15. Çift	1:1 (19,000/19,430)	1:1 (10,220/11,256)
16. Çift	1:1 (22,190/23,136)	1:1 (11,200/11,250)
17. Çift	1:1 (20,100/20,844)	1:1 (18,800/19,670)
18. Çift	2:3 (9,600/ 15,000)	1:2 (9,600/19,654)
19. Çift	1:1 (19,000/20,654)	1:1 (18,900/20,500)
20. Çift	1:1 (11,0646/12,000)	1:2 (11,639/23,950)
21. Çift	1:1 (9,010/9,550)	1:2 (14,800/29,000)
22. Çift	2:3 (12,500/18,405)	1:2 (9,700/18,580)
23. Çift	1:1 (11,000/11,000)	1:1 (19,334/19,780)
24. Çift	1:1 (18,400/18,940)	1:1 (19,000/19,840)
25. Çift	1:1 (20,600/21,210)	1:2 (10,630/11,570)
26. Çift	1:1 (19,730/19,800)	1:2 (14,700/28,400)
27. Çift	1:2 (15,400/31,280)	1:1 (19,670/19,936)
28. Çift	2:3 (16,500/22,840)	1:1 (18,500/18,950)
29. Çift	1:1(18,949/18,000)	1:1 (20,800/21,012)
30. Çift	1:1 (21,600/21,980)	1:2 (22,610/22,782)

**Tablo 3.** Tekrarlayan düşük çiftlerinde 9q12 için polimorfizm yüzdeleri

<b>Kromozom 9q12</b>			
<b>Olgular</b>	<b>1:1 (%)</b>	<b>1:2 (%)</b>	<b>2:3 (%)</b>
Kadın (30 kişi)	73,3	10	16,7
Erkek (30 kişi)	60	26,7	13,3
Toplam (60 kişi)	66,7	18,3	15

30 çiftten (60 kişi) oluşan çalışma grubumuzu oluşturan olguların 9q12 bölgesi için yapılan analiz sonuçları; 30 kadında yapılan sentromerik heterokromatin bölge polimorfizm yoğunluk ölçümlerine göre 1:2 oranlı heterokromatin bölge artışı olan 3 olgu (%10), 2:3 oranlı heterokromatin bölge artışı olan 5 olgu (%16,7), 1:1 (normal) oranlı sonucu olan 22 olgu (%73,3) tespit edilmiştir. Erkeklerde ise sentromerik heterokromatin bölge yoğunluk ölçümlerinde; 8 olguda (%26,7) 1:2 oranında heterokromatin bölge artışı , 4 olguda (%13,3) 2:3 oranında heterokromatin bölge artışı, 18 olguda (%63,3) 1:1(normal) oranlı bulgular elde edilmiştir. Toplamda 60 kişideki polimorfizm yüzdeleri; 1:2 oranı için %18,3, 2:3 oranı için %15 olarak hesaplanmıştır. 1:1 oranlı normal sonuca sahip olgular için ise %66,7 olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 4.** Hasta ve kontrol grubunda saptanan polimorfizm yüzde dağılımı.

<b>Gruplar</b>	<b>Normal (%)</b>	<b>9. kromozom heterokromatin polimorfizmi (%)</b>
Hasta (n=60)	66,6	33,4
Kontrol (n=20)	100	-
Toplam	75	25

**Tablo 5.** 9q12 polimorfizminin kadın hasta ve kadın kontrol grubu için elde edilen değerlerinin istatistiksel hesaplaması.

	<b>9q12 polimorfizmi</b>	<b>Normal</b>
Kadın hasta	8	22
Kadın kontrol	0	10

Tablodaki değerler dikkate alınarak yapılan istatistiksel hesaplamada;

Odss ratio: 7,95

%95 CI: 0,41-150,7

p: 0,1681 değerleri elde edilmiştir.

Kromozom 9q12 polimorfizminin tekrarlayan düşüklere olan etkisinin araştırılması için kadınlarda yapılan FISH çalışması sonucunda p değeri 0,1681 olarak hesaplanmıştır (Szumilas, 2010).

**Tablo 6.** 9q12 polimorfizminin erkek hasta ve erkek kontrol grubu için elde edilen değerlerin istatistiksel hesaplaması

	<b>9q12 polimorfizmi</b>	<b>Normal</b>
Erkek hasta	12	18
Erkek kontrol	0	10

Tablodaki değerler dikkate alınarak yapılan istatistiksel hesaplamada;

Odss ratio: 14,18

%95 CI: 0,76-264,7

p: 0,0756 değerleri elde edilmiştir.

Kromozom 9q12 polimorfizmi için erkek olgularda yapılan FISH çalışması sonrasında elde edilen bulgulara göre yapılan hesaplamalarda p değeri 0,0756 olarak saptanmıştır (Szumilas, 2010).

**Tablo 7.** 9q12 polimorfizminin düşük çiftleri ve kontrol çiftleri ile karşılaştırılması sonucu elde edilen istatistiksel değerler.

	<b>Kromozom 9 alfa satellite</b>	
	<b>9q12 polimorfizmi</b>	<b>Normal</b>
Kadın hasta (a)	<b>8</b>	<b>22</b>
Erkek kontrol (b)	12	18
Kontrol	0	20

**(a); Odds ratio:** 15,48

**(b); Odds ratio:** 27,7

**%95 CI** : 0,84-285,5

**%95 CI** : 1,53-501,3

**p** : 0,0654

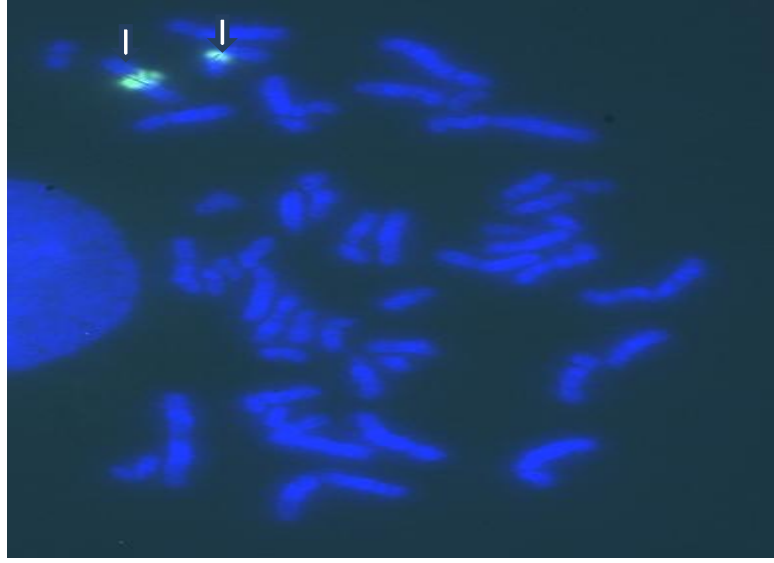
**p** : 0,0246

Cinsiyet ayırımı olmadan yapılan hesaplamalarda ise;

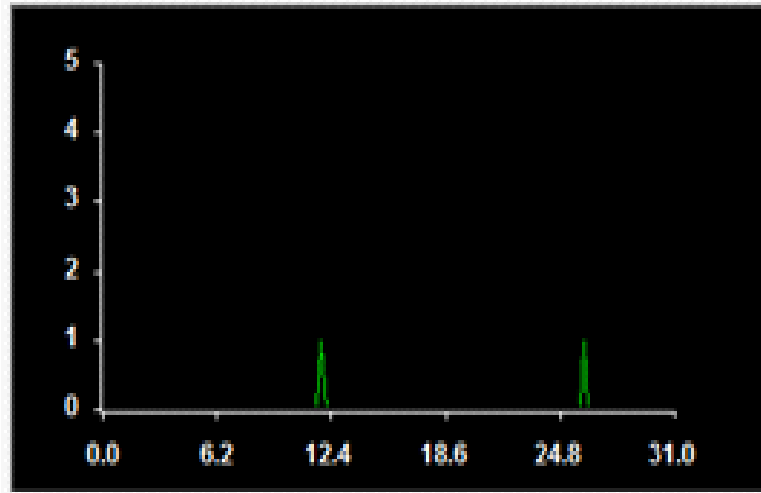
**Odds ratio:** 20,75

**%95 CI** : 1,19-360

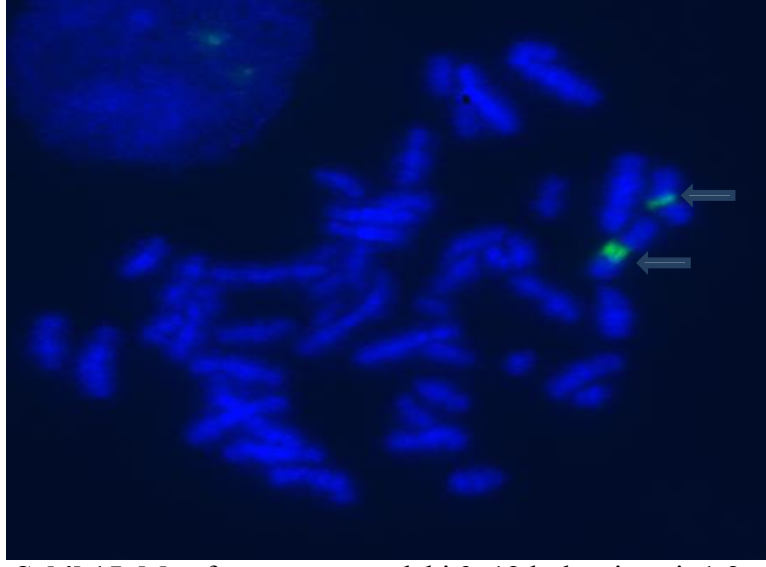
**p** : 0,0374 olarak saptanmıştır (Szumilas 2010).



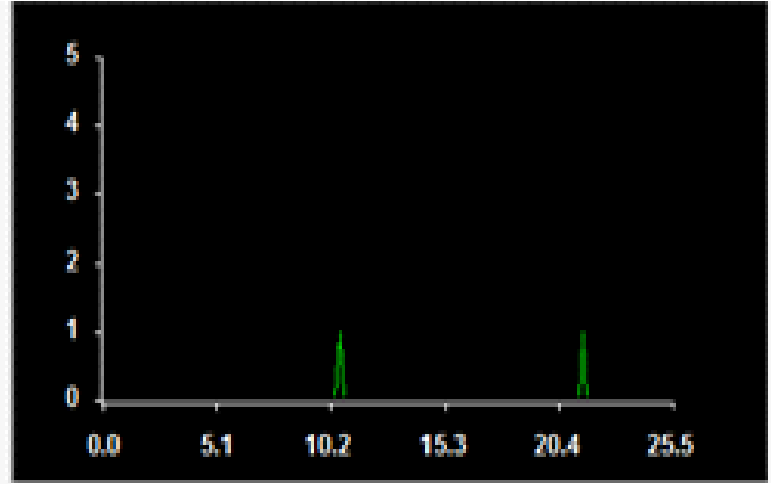
**Şekil 13.** Metafaz görüntüsündeki 9q12 bölgesine ait 1:2 oranındaki FISH sinyali.



**Şekil 14.** Şekil 13'teki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:2 (12,000/25,000).

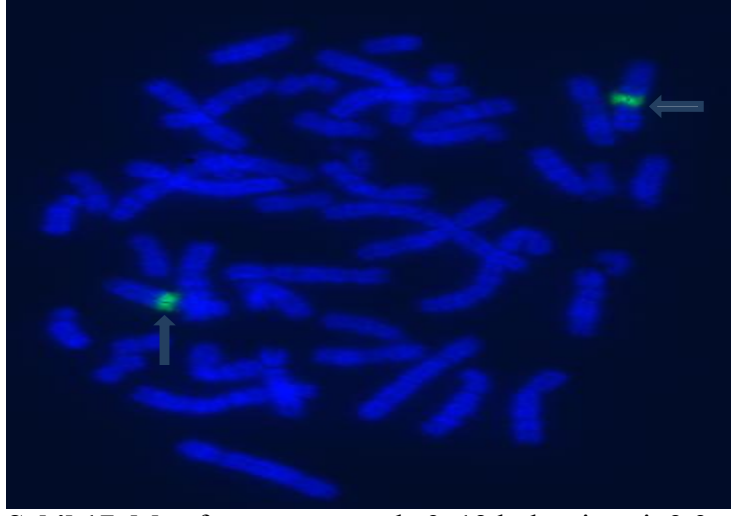


**Şekil 15.** Metafaz görüntüsündeki 9q12 bölgesine ait 1:2 oranındaki FISH sinyali.

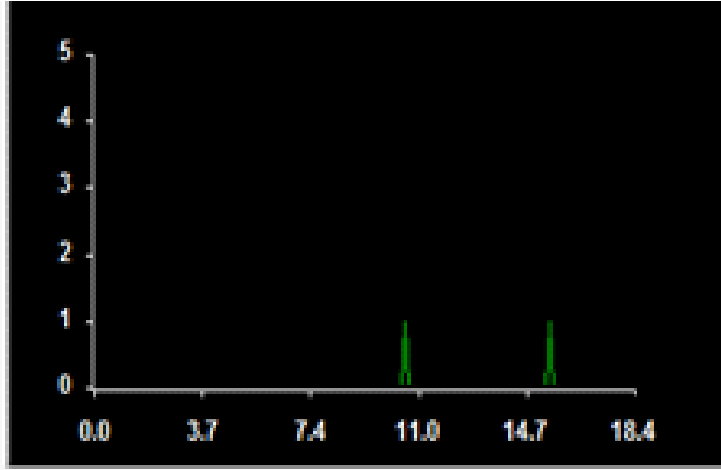


**Şekil 16.** Şekil 15'teki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:2 (11,264/22,182).

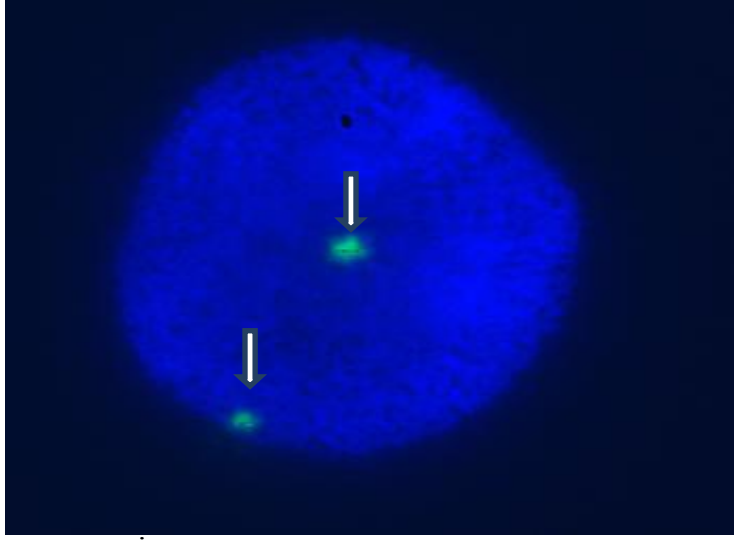




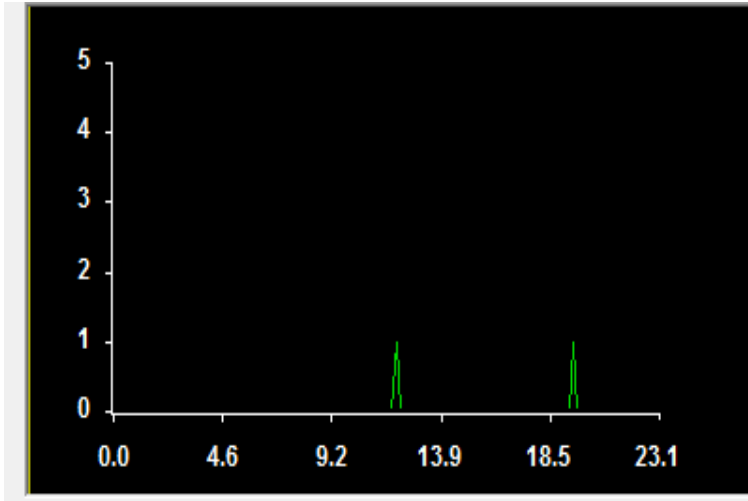
**Şekil 17.** Metafaz görüntüsünde 9q12 bölgesine ait 2:3 oranındaki FISH sinyali.



**Şekil 18.** Şekil 17'deki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 2:3 (9,100/15,805).



**Şekil 19.** İnterfaz görüntüsünde 9q12 bölgesine ait 2:3 oranındaki FISH sinyali.



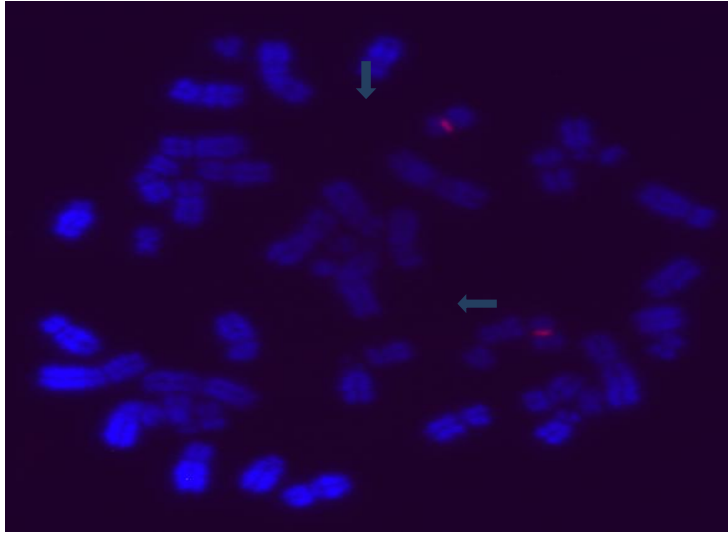
**Şekil 20.** Şekil 19'daki interfaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 2:3 (11,345/19,615).

#### 4.2. 16p11.1-q11.1 Bölgesi Kontrol Grubu

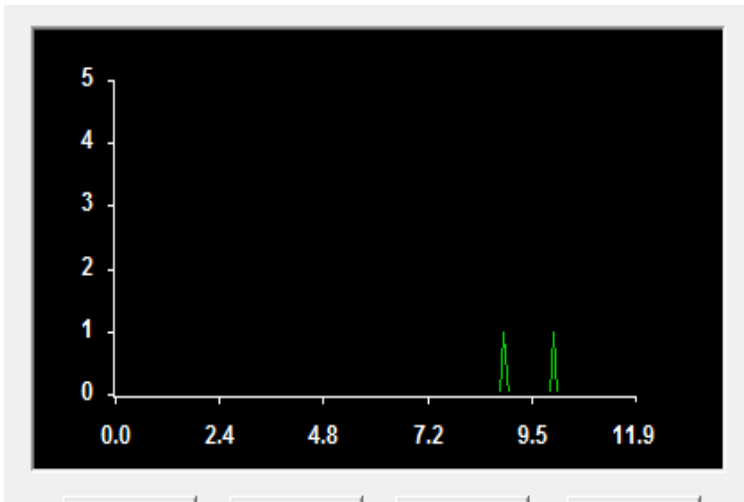
**Tablo 8.** Kontrol grubunda 16 numaralı kromozomun 16p11.1-q11.1 bölgesindeki sinyal yoğunluğu ölçümleri.

Çiftler	Olgular	D16Z2 lokusu 16p11.1-q11.1 bölgesi
1.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
2.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
3. Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
4.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
5.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
6.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
7.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
8.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
9.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1
10.Çift	Kadın	1:1
	Erkek	1:1

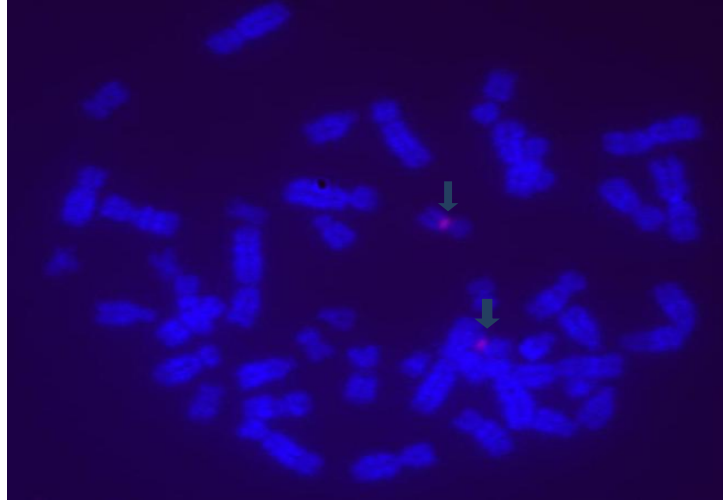
Kontrol grubundaki 10 çifte 16 numaralı kromozom için alfa-satellit probu kullanılarak FISH çalışması yapılmış ve elde edilen görüntülerdeki sinyal yoğunlukları ölçülerek sayısal değerler birbirleri ile oranlanmıştır. Analiz sonucunda herbir olguda 1:1 oranında normal sonuçlar bulunmuştur. Kontrol grubunda D16Z2 lokusu 16p11.1-q11.1 bölgesinde herhangi bir heterokromatin bölge polimorfizmi saptanmamıştır.



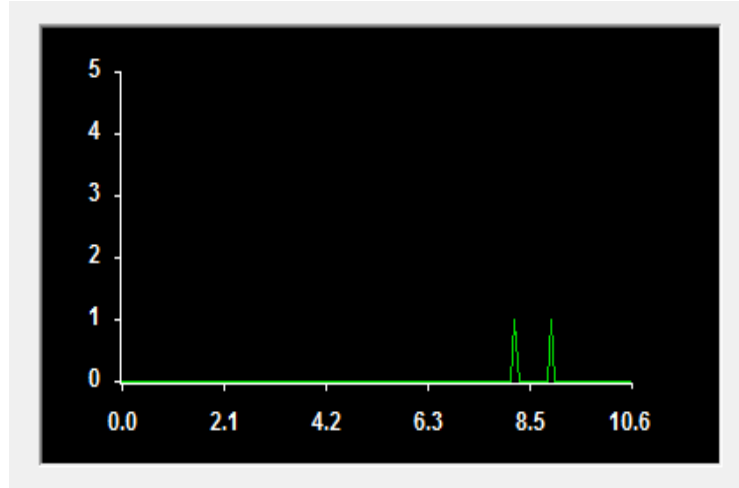
**Şekil 21.** Metafaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 1:1 oranındaki FISH sinyali.



**Şekil 22.** Şekil 21'deki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:1 (8,810/9,944).



**Şekil 23.** Metafaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 1:1 oranındaki FISH sinyali.



**Şekil 24.** Şekil 23'teki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:1 (7,345/9,615).

#### 4.2.1. 16p11.1-q11.1 Bölgesi Çalışma Grubu

Çalışma grubu dahilindeki 30 çift 16p11.1-q11.1 bölgesine spesifik prob kullanılarak FISH analizleri yapılmıştır.

**Tablo 9.** Tekrarlayan düşük çiftlerine oluşturan bireylere ait 16p11.1-q11.1 bölgesine ait kantitatif ölçümler ve oranları

ÇİFTLER	Kromozom 16p11.1-q11.1	
	Kadın	Erkek
1. Çift	1:1 (9,000/9,620)	1:1 (9,016/9,446)
2. Çift	1:1 (9,066/9,780)	1:1 (9,000/9,670)
3. Çift	1:1(8,500/9,160)	1:1 (9,200/9,630)
4. Çift	1:1 (8,810/9,944)	1:1 (8,600/9,000)
5. Çift	1:1 (9,062/9,211)	1:1 (9,000/9,656)
6. Çift	1:1 (9,000/9,606)	1:1(8,800/9,046)
7. Çift	1:1 (10,220/10,616)	1:1 (8,890/9,806)
8. Çift	1:1 (9,700/10,000)	1:1 (9,062/9,062)
9. Çift	1:1 (8,860/8,906)	2:3 (7,890/11,600)
10. Çift	1:1 (11,706/11,900)	1:1 (11,000/11,756)
11. Çift	1:1 (11,000/11,006)	1:1 (10,660/11,150)
12. Çift	1:1 (9,660/10,650)	1:1 (9,060/9,900)
13. Çift	1:1 (9,000/9,602)	1:1 (9,902/10,706)
14. Çift	1:1 (10,006/10,500)	1:1 (9,900/9,906)
15. Çift	1:1 (10,806/11,300)	1:1 (12,000/12,600)
16. Çift	1:1 (9,680/9,906)	1:1 (9,012/9,206)
17. Çift	1:1 (11,808/12,056)	1:1 (8,096/8,806)
18. Çift	1:1 (13,700/13,716)	1:1 (9,016/9,560)
19. Çift	1:1 (8,800/8,806)	1:1 (12,000/12,906)
20. Çift	1:1(11,060/11,902)	1:1 (10,004/10,807)
21. Çift	1:1 (12,065/12,606)	1:1 (9,008/9,540)
22. Çift	1:1 (10,050/10,602)	1:1 (10,600/10,646)
23. Çift	1:1 (8,802/9,012)	2:3 (8,760/11,956)
24. Çift	1:1 (9,016/9,656)	1:1 (12,686/12,900)
25. Çift	1:1(12,300/12,056)	1:1 (9,990/10,646)
26. Çift	1:1 (10,650/10,700)	1:1 (8,840/9,010)
27. Çift	1:2 (6,945/12,915)	1:1 (11,042/11,682)
28. Çift	1:1 (11,706/11,908)	1:1 (10,600/10,846)
29. Çift	1:1 (11,056/11,756)	1:1 (9,560/10,002)
30. Çift	1:1 (10,700/10,958)	1:1 (110,704/11,908)

**Tablo 10.** Tekrarlayan düşük çiftlerinde 16p11.1-q11.1 için polimorfizm yüzdeleri.

<b>Kromozom 16 Sentromer</b>			
<b>Olgular</b>	<b>1:1 (%)</b>	<b>1:2 (%)</b>	<b>2:3 (%)</b>
Kadın (30 kişi)	96,4	3,3	-
Erkek (30 kişi)	93,3	-	6,7
Toplam (60 kişi)	95,0	1,7	3,3

Çalışma grubundaki 30 çiftten (60 kişi) oluşan olgunun 16p11.1-q11.1 bölgesi için yapılan analiz sonuçları; 30 kadında yapılan sentromerik heterokromatin bölge yoğunluk ölçümlerine göre; 1:2 oranlı heterokromatin bölge artışı olan 1 olgu (%3,3) saptanmış, 2:3 oranlı heterokromatin bölge artışı gözlenmemiştir. 1:1 (normal) oranlı sonucu olan 29 olgunun (%96,4) analizi yapılmıştır. Erkeklerde ise sentromerik heterokromatin bölge yoğunluk ölçümlerinde; 2 olguda (%6,7) 2:3 oranında heterokromatin bölge artışı tespit edilmiş, 1:2 oranında heterokromatin bölge artışı gözlenmemiştir. 28 olguda ise (%93,3) 1:1 (normal) oranlı bulgular elde edilmiştir. Toplamda 60 kişideki polimorfizm yüzdeleri; 1:2 oranı için %1,7, 2:3 oranı için %3,3 olarak hesaplanmıştır. 1:1 oranlı normal sonuca sahip olgular için ise %95,0 olarak hesaplanmıştır ve bu bulgular tekrarlı düşük çiftleri için polimorfizm olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 11.** Hasta ve kontrol grubunda saptanan yapısal ve sayısal kromozom aberasyonlarının yüzde dağılımı.

<b>Gruplar</b>	<b>Normal (%)</b>	<b>16. kromozom heterokromatin polimorfizmi (%)</b>
Hasta (n=60)	95	5
Kontrol (n=20)	100	-
Toplam	96,25	3,75

**Tablo 12.** 16p11.1-q11.1 bölgesi için hasta grubu ve kontrol grubunda elde edilen sonuçların istatistiksel hesaplaması.

<b>Kromozom 16 alfa satellit</b>		
	<b>16q1216p11.1-q11.1 polimorfizmi</b>	<b>Normal</b>
TGK Kadın (a)	1	29
TGK Erkek (b)	2	28
Kontrol	0	20

**Odds ratio:** 2,084

**(b) Odds ratio:** 3,59

**%95 CI** : 0,808- 53,76

**%95 CI** : 0,16-78,9

**p** : 0,6577

**p** : 0,4167

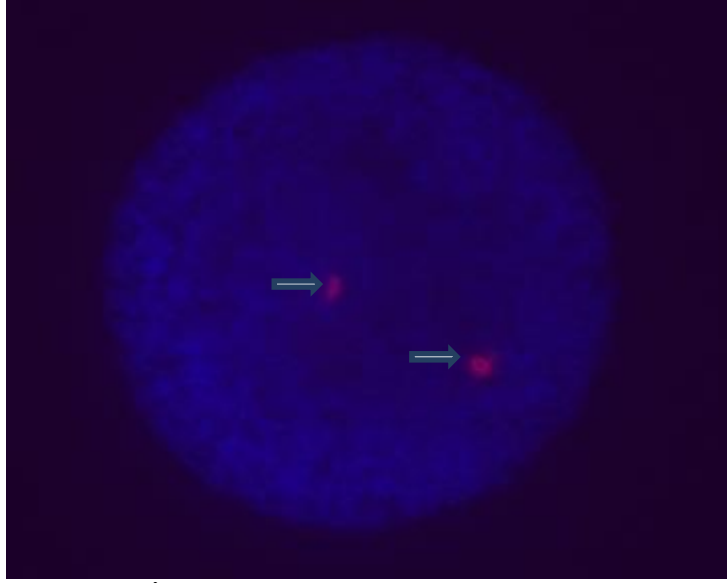
Cinsiyet ayırımı olmadan yapılan hesaplamalarda;

**Odds ratio** : 2,49

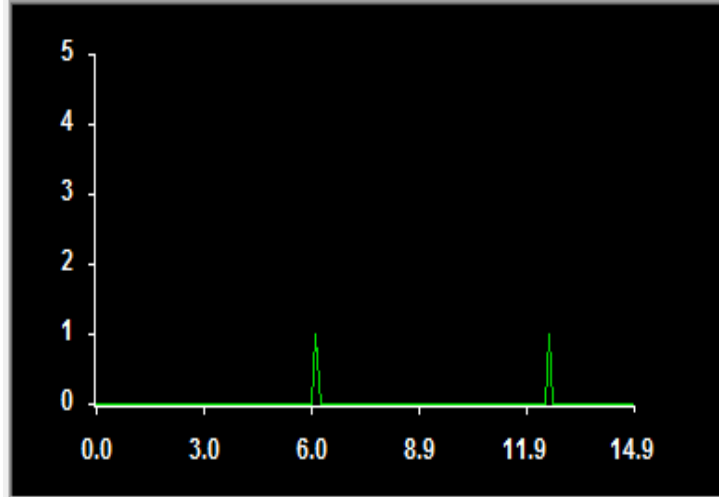
**%95 CI** : 0,12-50,41

**p** : 0,5509 olarak saptanmıştır (Szumilas 2010).

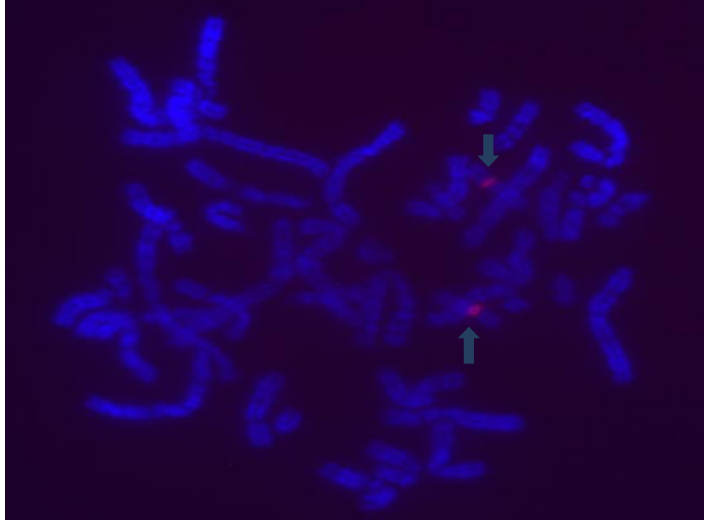




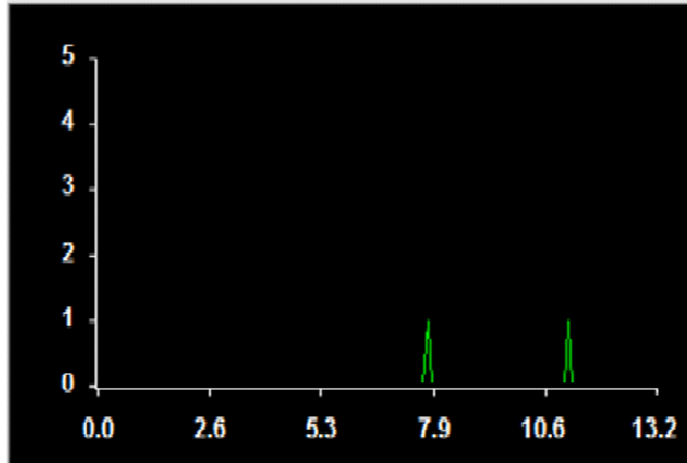
**Şekil 25.** İnterfaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 1:2 oranındaki FISH sinyali.



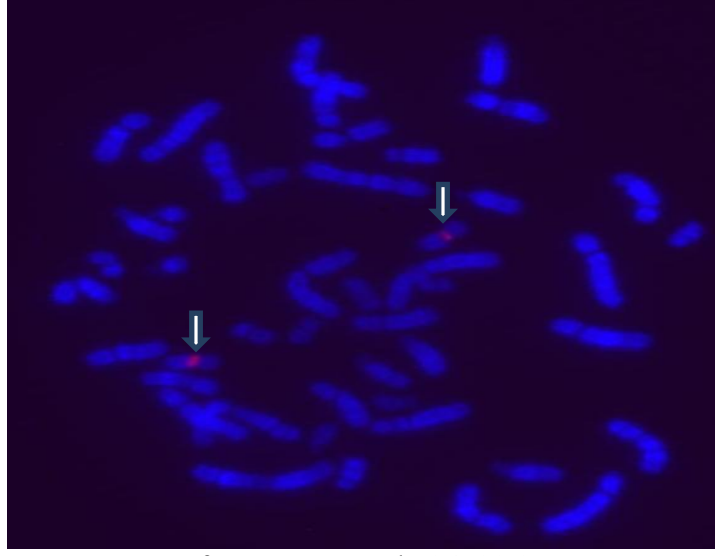
**Şekil 26.** Şekil 25'deki interfaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 1:2 (6,945/12,915).



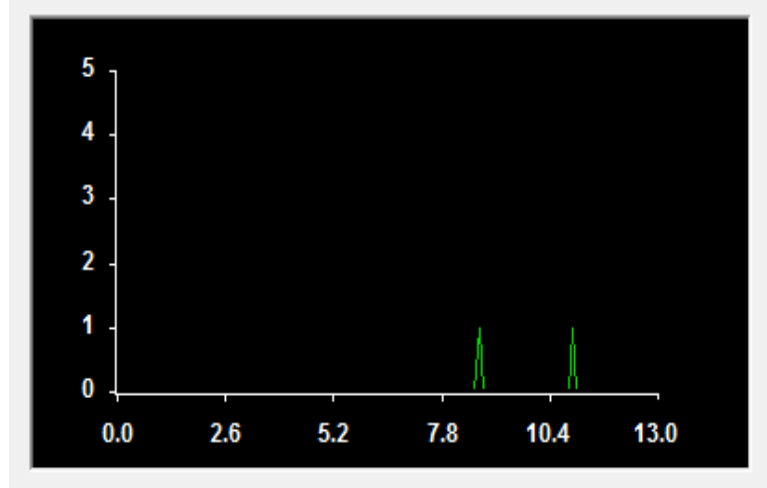
**Şekil 27.** Metafaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 2:3 oranındaki FISH sinyali.



**Şekil 28.** Şekil 27'deki interfaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 2:3 (7,895/11,600).



**Şekil 29.** Metafaz görüntüsünde 16p11.1-q11.1 bölgesine ait 2:3 oranındaki FISH sinyali.



**Şekil 30.** Şekil 29'daki metafaz görüntüsüne ait sinyal yoğunluk ölçüm grafiği 2:3 (8,760/11,956).

### 4.3. XY (alfa satellite) Çalışma Grubu

Tekrarlayan gebelik kayıpları olan 30 çiftimize projemizde kullanılan üçüncü ve son sentromerik probumuz Xp11.1-q11.1 ile Yp11.1-q11.1 bölgesine spesifik olan XY alfa satellite probtur.

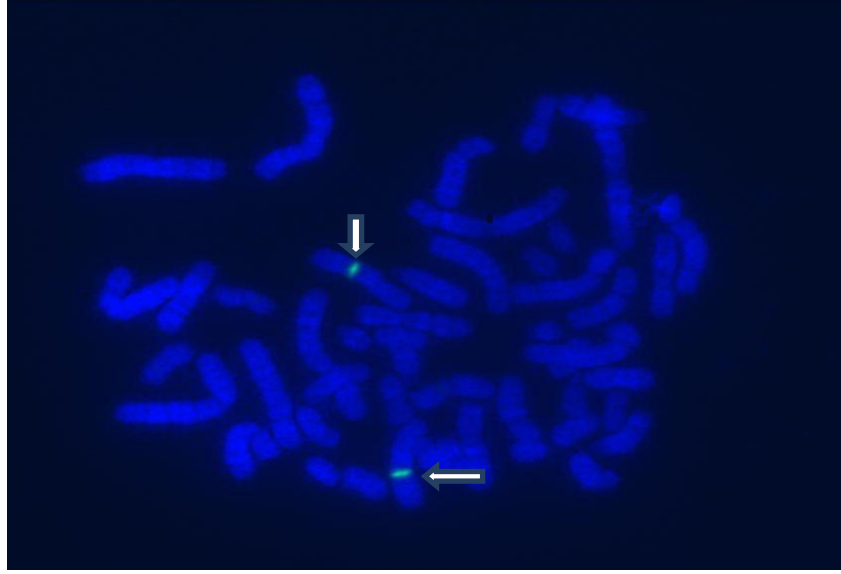
**Tablo 13.** Tekrarlayan düşük çiftlerine oluşturan bireylere ait XY bölgesine ait oranlar.

ÇİFTLER	Kromozom XY alfa satellit	
	Kadın	Erkek
1. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
2. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
3. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
4. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
5. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
6. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
7. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
8. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
9. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
10. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
11. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
12. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
13. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
14. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
15. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
16. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
17. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
18. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
19. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
20. Çift	X/X 1:1	X/X/Y 1:1:1
21. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
22. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
23. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
24. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
25. Çift	X/X 1:1	X/X/Y 1:1:1
26. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
27. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
28. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
29. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1
30. Çift	X/X 1:1	X/Y 1:1

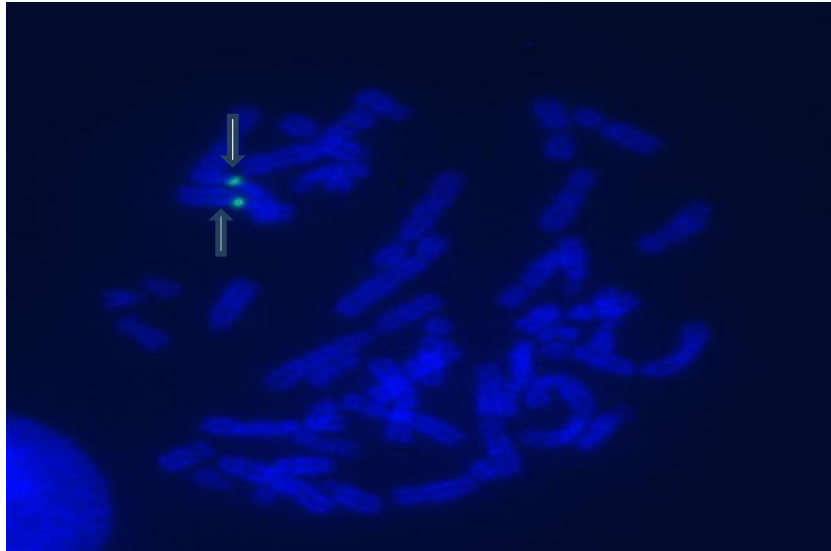
**Tablo 14.** Hasta grubunda saptanan yapısal ve sayısal kromozom aberasyonlarının yüzde dağılımı .

Gruplar	Kromozom XY alfa satellit		
	Normal (%)	Yapısal Anomaliler (%)	Sayısal Anomaliler (%)
Hasta (n=60)	96,6	-	3,4

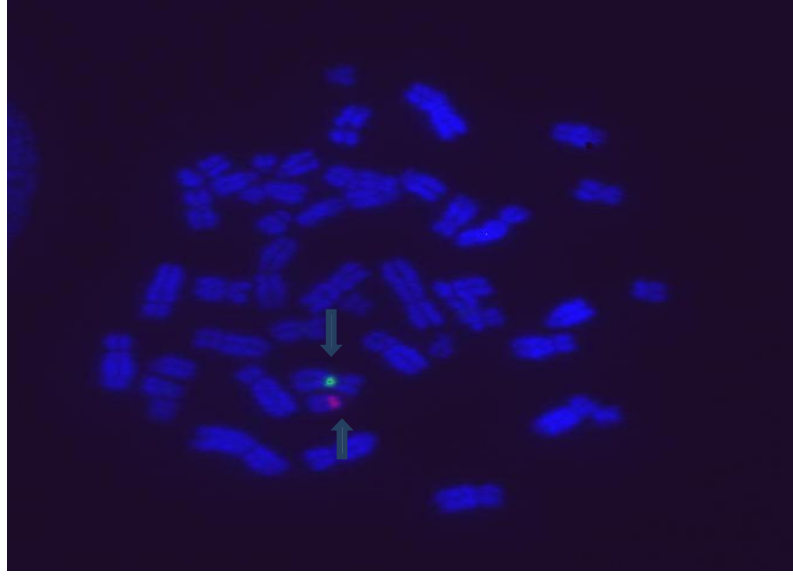
FISH analizleri sonrasında elde edilen yukarıdaki tabloda elde edilen verilere baktığımızda kadın olgularda X/X oranlarında herhangi bir sorun olmadığı sentromerik bölge yoğunluk oranlarının 1:1 şeklinde olduğu görülmektedir. Erkek olgulara baktığımızda X/Y sentromerik yoğunluk oranlarının 1:1 olduğu ancak 2 olguda düşük oranlı Klinifelter sendromu mozaisizmi olduğu tespit edilmiştir. Olgulardan birinde toplamda (metafaz ve interfaz) 100 hücre sayımı yapılmış ve 3 tanesinde XXY olduğu ve %3 Klinifelter mozaisizmi olduğu gözlenmiştir. Bu mozaisizm 1sh(DXZ1x2)(DYZ1x1)[3](DXZ1x1)(DYZ1x1)[97] şeklinde ifade edilir. Diğer olguda ise toplam 100 metafaz ve interfaz hücresi sayılarak 5 tanesinde XXY olduğu ve %5 Klinifelter mozaisizmi olduğu tespit edilmiştir. Bu mozaisizm 1sh(DXZ1x2)(DYZ1x1)[5](DXZ1x1)(DYZ1x1)[95] şeklinde ifade edilir. Elde edilen bu sonuçlar FISH analizinin düşük oranlı mozaisizmler için etkili bir yöntem olduğu görülmüştür. TKG'da sayısal anomalilerin sebep olabileceği görülmüştür.



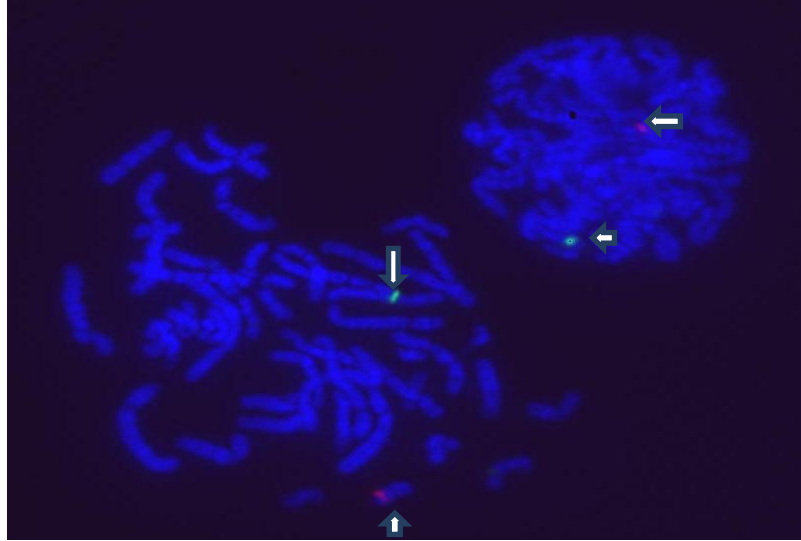
Şekil 31. XX bir olguya ait metafaz FISH görüntüsü.



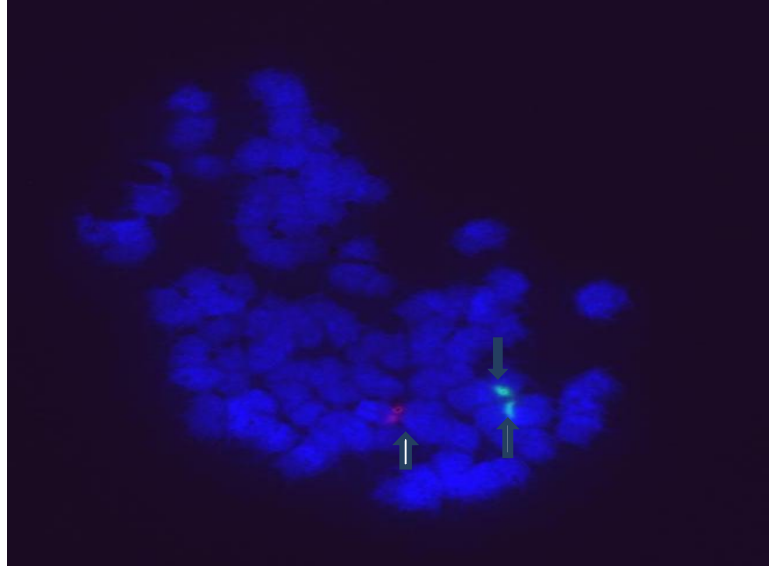
Şekil 32. Farklı bir XX olguya ait metafaz FISH görüntüsü.



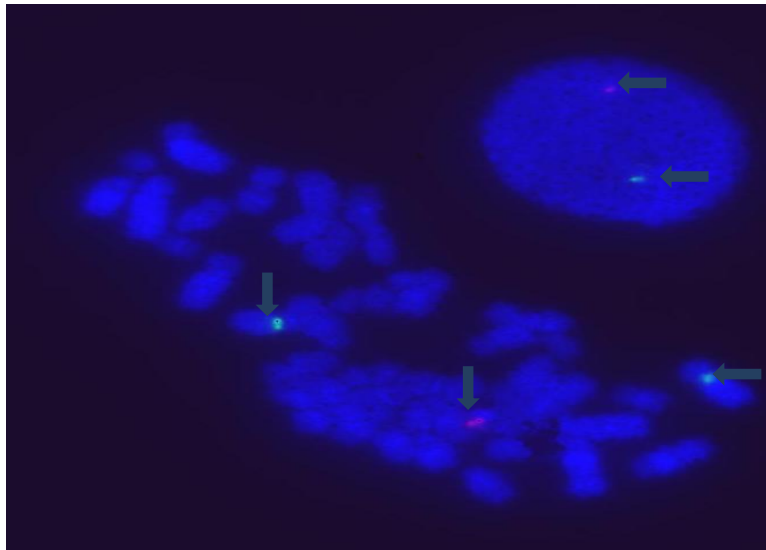
Şekil 33. XY bir olguya ait metafaz FISH görüntüsü



Şekil 34. XY olguya ait metafaz ve profaz FISH görüntüsü.

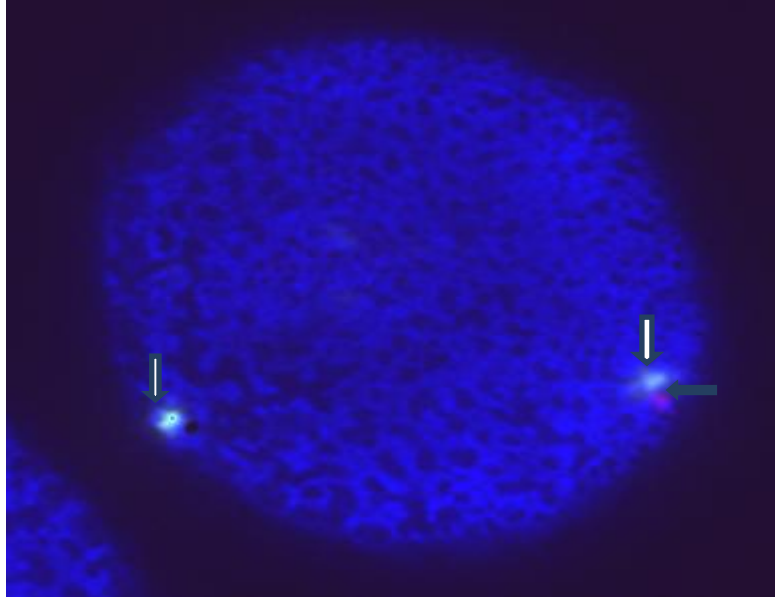


Şekil 35. XXY olguya ait metafaz FISH görüntüsü.

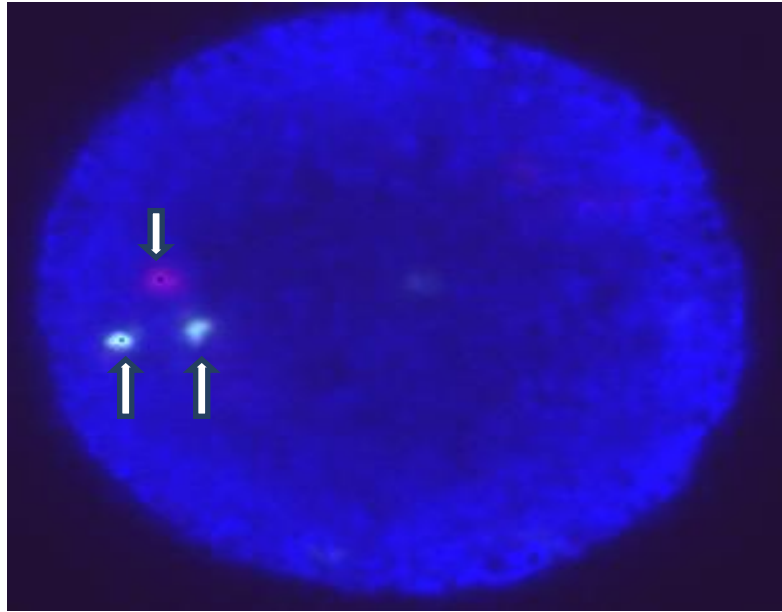


Şekil 36. XXY/XY metafaz/interfaz FISH görüntüsü.





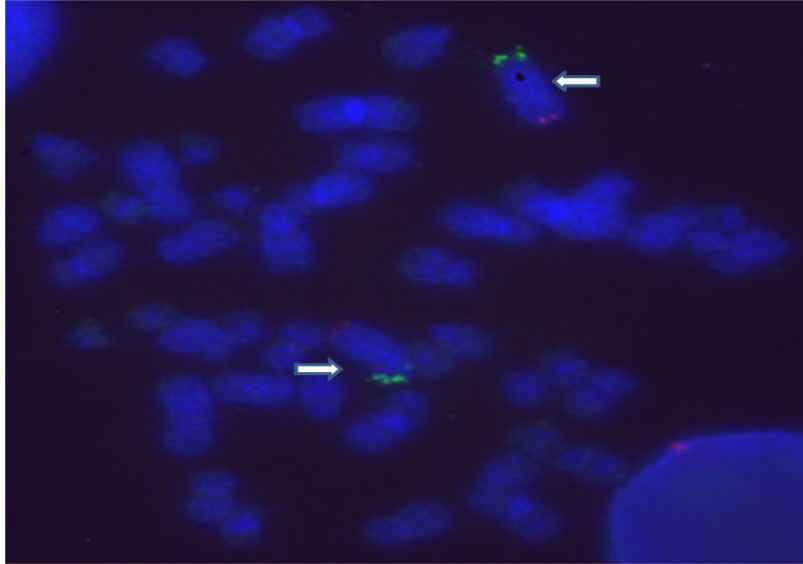
Şekil 37. İnterfaz hücresindeki XXY FISH sinyali.



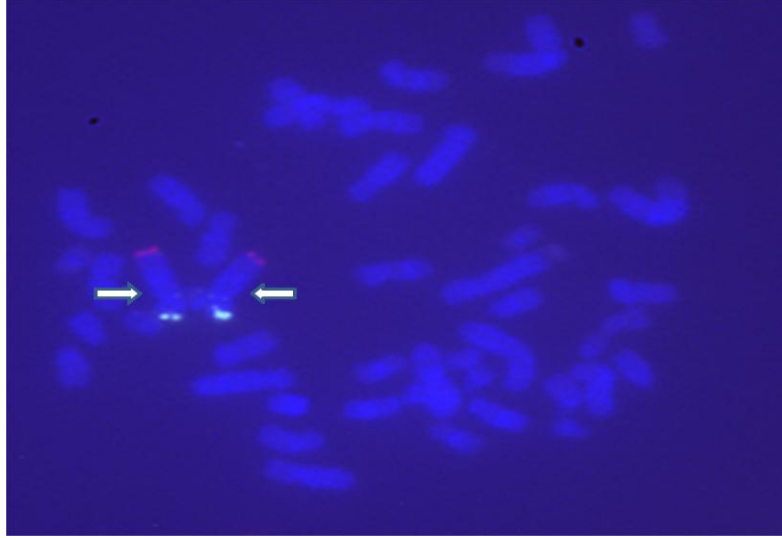
Şekil 38. İnterfaz hücresinde görülen XXY FISH sinyali.

#### 4.4. Subtelomerik Prob için Çalışma Grubu

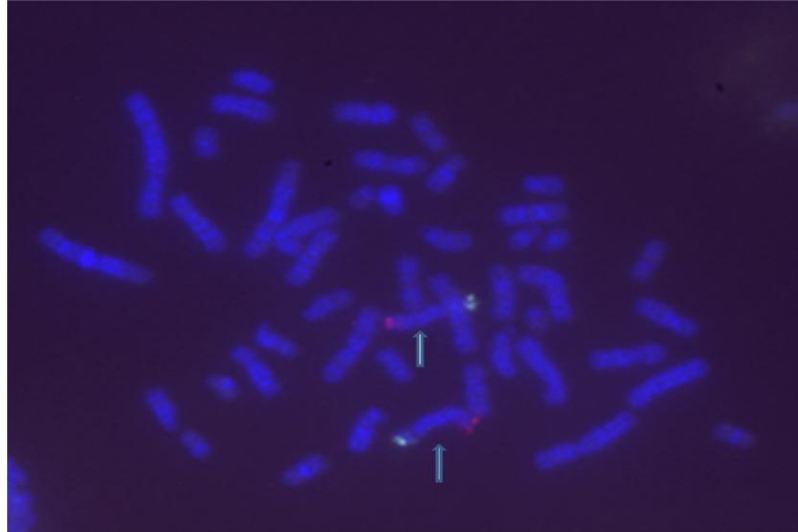
Tekrarlayan gebelik kayıplarına kromozomlarda meydana gelen telomerik kayıplarının etkisini tespit edebilmek için 5 çiftimize subtelomerik FISH yöntemi ile analiz yapılmıştır. Çalışmamıza aldığımız kadın olguların yaş ortalaması 35,8 (34-38), erkek olguların ise 38,4 (37-40) şeklindedir. Toplamda 5 çiftimize (n=10) yapılan analiz sonrasında tüm sonuçların normal olduğu herhangi bir delesyon, translokasyon, telomerik bölgelerde herhangi bir artış ya da azalış gözlenmemiştir. Tekrarlayan gebelik kaybı nedeni olabilecek bir kromozomal değişimin tespit edilememesi hasta sayısının az olması ile orantılı olabilir.



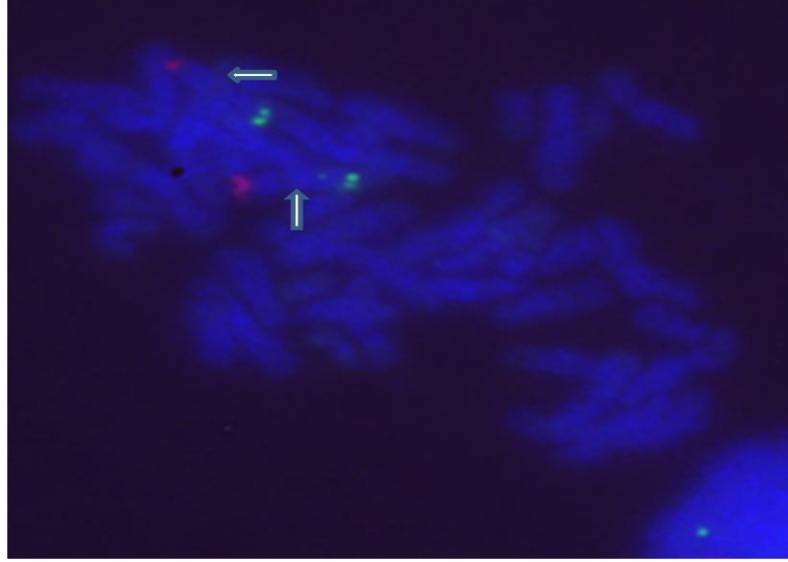
**Şekil 39.** Metafaz görüntüsünde 4 numaralı kromozomun p ve q kollarındaki subtelomerik sinyal görüntüsü.



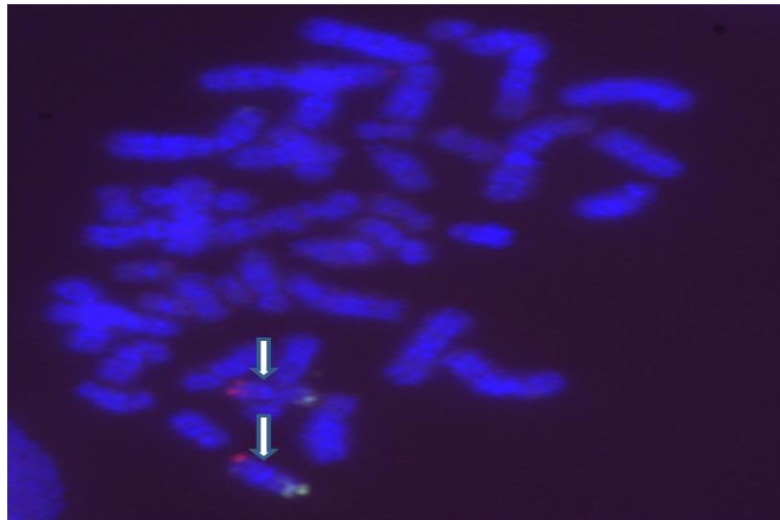
**Şekil 40.** Metafaz görüntüsünde 5 numaralı kromozomun p ve q kollarındaki subtelomerik sinyal görüntüsü.



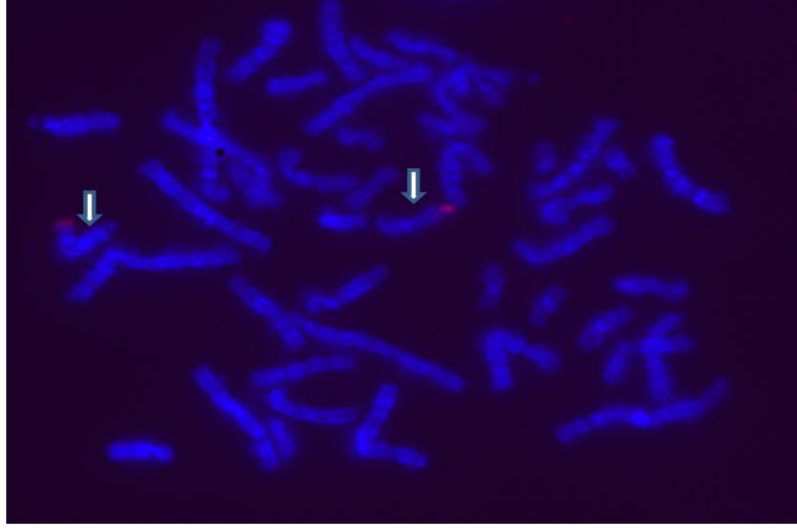
**Şekil 41.** Bir metafazdaki 6 numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller.



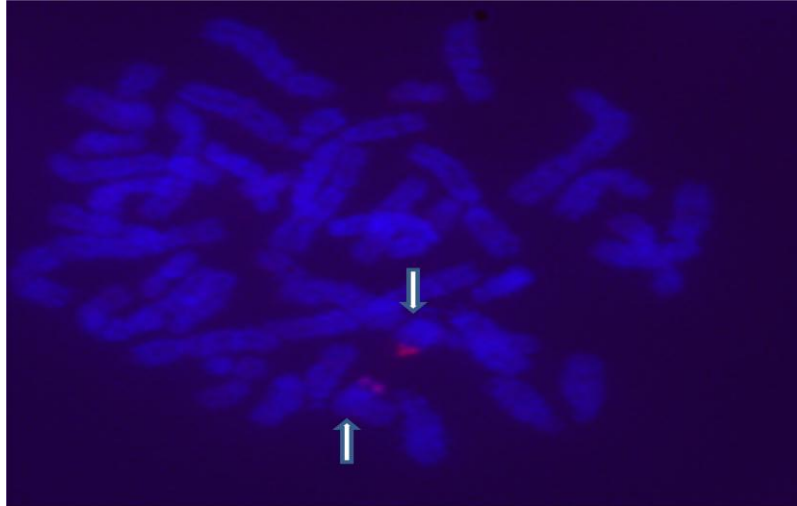
**Şekil 42.** Bir metafazdaki 12 numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller.



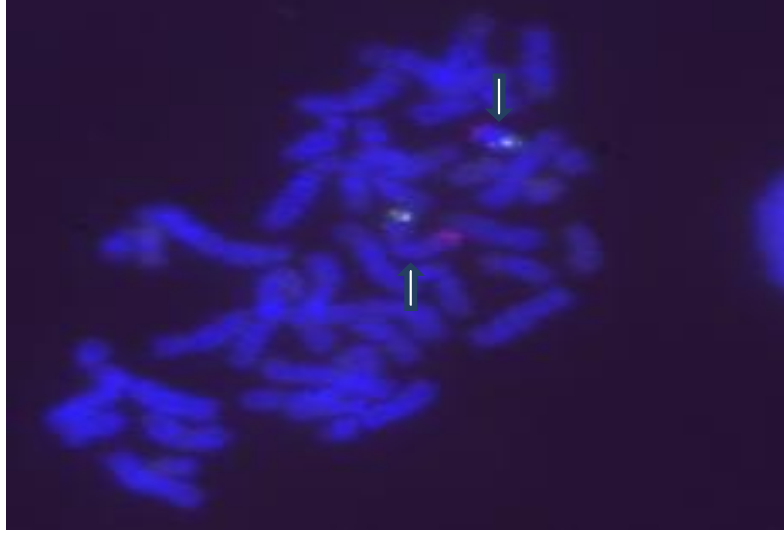
**Şekil 43.** Bir metafazdaki 16 numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller.



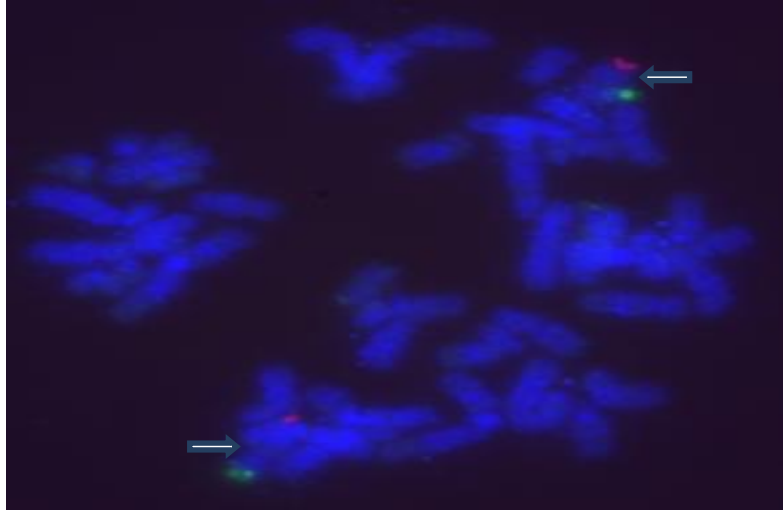
**Şekil 44.** Bir metafazdaki 14 numaralı kromozomun q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller.



**Şekil 45.** Bir metafazdaki 21 numaralı kromozomun q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller.



**Şekil 46.** Bir metafazdaki XY numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller.



**Şekil 47.** Bir metafazdaki XY numaralı kromozomun p ve q subtelomerik bölgelerine ait sinyaller.

## 5. TARTIŞMA

Tekrarlayan gebelik kayıpları, birbirini takip eden en az üç gebeliğin düşük ile sonuçlanması durumudur. Bu kayıplar genellikle gebeliğin 20. haftasından önce meydana gelen ve çocuk sahibi olmak isteyen çiftleri her açıdan olumsuz etkileyen bir olaydır. Tekrarlayan düşüklere nedenlerinin önemli kısmını kromozomal aberasyonlar oluşturmaktadır. Kromozomal değişimler sayısal veya yapısal olarak farklı şekillerde meydana gelmektedir. Gamet oluşumu sırasında gerçekleşen anomaliler eğer fenotipe yansıyor ise gebelik düşük ile sonlanabilir. Telomerik bölge olarak adlandırdığımız ve çoklu tekrar dizileri taşıyan kromozomların uç bölgelerinde meydana gelen farklılıklar anomali sebeplerindedir. Kromozomlarda heterokromatin bölge olarak adlandırılan bölgelerde de bazı artış veya azalışlar görülebilir. Bu bölgede genellikle tekrarlı DNA dizileri olduğundan meydana gelen değişiklikler polimorfizm olarak nitelendirilir ve fenotipe yansımaz. Tekrarlayan düşüklere olan çiftlerde %3-5 oranında yapısal kromozom anomalisi görülmektedir. En sık rastlanan şekli resiprokal translokasyondur. Bunların gebelikleri %61-72 oranında düşükle sonuçlanır. Daha az rastlanan kromozomal anomaliler robertsonian translokasyon, inversion, sayısal anomalilerdir. Tekrarlayan düşüklere sebep olabilecek herhangi bir kromozomal aberasyon varlığının araştırılması amacı ile projemiz kapsamındaki çalışmalarımız tamamlanmıştır. En az üç veya daha fazla tekrarlı düşük öyküsü olan 30 çift (n=60) ile birlikte sağlıklı en az iki çocuğu olan ve daha önce hiç düşük yapmamış 10 çift (n=20) projeye dahil edilmiştir. Sitogenetik analiz sonuçları normal çıkan hastalarımıza 9, 16, XY satellit bölgelerine spesifik prob ve subtelomerik proplar ile FISH yöntemi kullanılarak analizleri yapılmıştır. Hasta grubunu oluşturan kadın olguların (n=30 kişi) yaş ortalaması 33,8 (29-36) iken erkek olguların (n=30 kişi) yaş ortalaması ise 36,1 (33-39)'dir. 30 çiftin (n=60) toplamda yaş ortalaması 34,95 (29-39) 'tir. Kontrol grubundaki 10 çiftimizin (n=20 kişi) yaş ortalaması ise 38,2'dir.

Hasta grubu ve kontrol grubundan oluşan olgulara 16p11.1-q11.1 bölgesi için sinyal yoğunluk ölçümleri yapılmış ve toplamda (80 kişi), elde edilen ölçüm sonuçlarında %3,75 oranında 16qh+'lığı olduğu saptanmıştır. Bu sonuç heterokromatin bölge polimorfizmi olarak belirlenmiştir.

Kromozom 9q12 bölgesi için yapılan FISH sinyal yoğunluk ölçüm sonuçlarında toplamda (n=80), %25 olguda 9qh+ olarak saptanmıştır. Bu sonuç oransal olarak değerlendirildiğinde göz ardı edilmemesi gereken bir yüzde olduğu düşünülmektedir. Metafaz kromozomları ve interfaz hücrelerinde 9q12 bölgesi homoloğu ile karşılaştırıldığında alınan yoğun sinyal tekrarlayan düşüklere sebep olabilecek bir kromozomal değişim olarak nitelendirilebilir. Kromozom Xp11.1-q11.1 ve Yp11.1-q11.1 alfa satellit bölgeleri için yapılan analiz sonrasında kadın olgularda (n=30 kişi) herhangi bir sayısal anomali saptanmaz iken erkek olgularda (n=30 kişi) %6,7 oranında sayısal anomali tespit edilmiştir. Toplam elde edilen sayısal anomali oranı %3,4'tür. Saptanan bu anomali düşük oranlı mozaisizm gösteren (bir olgu için %3, diğer olgu için %5) Klinefelter sendromu'dur. Bu sendrom genellikle infertiliteye sebep olmaktadır. Ancak düşük oranlı bir mozaisizm olarak görülmesi bireylerin fertil olabileceği ancak tekrarlayan düşük etkeni olabileceğini göstermektedir. Bu çiftlerin preimplantasyon genetik tanı ile embriyo seçimi yapılarak sağlıklı embriyolar ile sağlıklı bir gebelik süreci geçirmeleri önerilir. Subtelomerik prob ile 5 çifte (10 kişi) yapılan analiz sonrasında kromozomların stabilitesini sağlayan telomerik bölgelerde herhangi bir artış, azalış, delesyon veya translokasyon görülmemiştir. Bu analiz hasta sayımızın az olması sebebi ile bizi tekrarlayan düşük etkeni olabilecek yönlendirici bir sonuca ulaştırmamıştır. Daha spesifik sonuçlar için hasta sayısı arttırılmalıdır.

Tekrarlayan gebelik kayıpları olan 57 çiftin (114 kişi) dahil edildiği bir çalışmada her bir olgunun kromozomal subtelomerik bölge için FISH yöntemi ile analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda %6,1 oranında hatalı eşleşmelerin olduğu saptanmış, kromozomal telomerik kayıplar tespit edilmemiştir. Ancak subtelomerik kayıpların tekrarlayan düşüklere çok mental gerilik ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür. (Benzacken ve ark., 2002). Diğer yandan yine tekrarlayan gebelik kayıpları olan 5 çiftin (10 kişi) dahil edildiği çalışmada klasik sitogenetik yöntemler ile çalışma tamamlanmış ve 2 subtelomerik bölge değişimi tespit edilmiştir. Eğer subtelomerik FISH ile analizleri olsa idi tespit edilen anomali sıklığı veya telomerik kayıp oranı daha fazla olabilirdi. Ayrıca bu çalışma ile tespit edilen anomalinin mikroskobik olarak net görülebilirliği ispatlanmamıştır (Yakut ve ark., 2002).



Subtelomerik translokasyonların tekrarlayan gebelik kayıplarında etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, subtelomerik translokasyonların daha çok mental retardasyon ve konjenital anomalilere neden olduğu daha çok bu hasta gruplarında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Monfort ve ark., 2006). Tekrarlı düşük öyküsü olan 70 çifti (140 kişi) kapsayan subtelomerik FISH çalışması sonrası yapılan analiz sonuçlarında, herhangi bir translokasyon, telomerik artış veya azalış tespit edilememiştir (Durak ve ark., 2010). Klasik sitogenetik bant yöntemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada 16qh bölgesinde meydana gelen artışların tekrarlayan gebelik kayıpları ve infertiliteye sebep olabileceği ileri sürülmüştür (Chatzimeletiou ve ark., 2006). İnfertilite ve tekrarlayan düşük çiftlerine (842 çift) heterokromatin polimorfik varyant oranlarının tespiti için klasik sitogenetik yöntemlerle yapılan çalışmada erkeklerde %28,82 ve kadınlarda %17,19 oranlarında heterokromatin polimorfizm tespit edilmiştir. Bu oranların tesadüfi olmadığı ve özellikle infertiliteye sebep olabileceği açıklanmıştır (Madon ve ark., 2005). Toplam 434 çiftin dahil edildiği bir başka araştırmada sitogenetik analizleri yapılmış, sayısal ve yapısal kromozom anomaliler incelenmiş ve %23,7 kadın olguda, %17,5 erkek olguda 9. kromozomun heterokromatin bölgelerinde qh pozitifliği saptamışlardır. Bu polimorfizm olarak değerlendirilmiştir. Bu tür varyasyonların tekrarlayan düşük çiftleri ve infertilite çiftlerinde sık rastlanabilecek bir polimorfizm olabileceği öne sürülmüştür (Alp ve Oral, 2006). Heterokromatik polimorfik varyasyon taşıyıcılarının tekrarlayan gebelik kaybı olan olgularda önemli olmadığı yapılan bir başka çalışmada ileri sürülmüştür (Blumberg ve ark., 1982). 114 tekrarlı düşük öyküsü olan çiftin çalışma kapsamına alındığı bir çalışmada klasik sitogenetik bant teknikleri kullanılarak analiz yapılmıştır. Analiz sonrasında %34,2 oranında 9qh heterokromatin polimorfik artış saptanmıştır. Bu artışın polimorfik mi ya da tekrarlayan gebelik kaybı ile mi ilişkili olduğunu anlamak için ileri tetkik önerilmiştir (Obut ve ark., 2013).

Subtelomerik bölge için yapılan çalışmalarda tekrarlayan düşük sebebi olabilecek herhangi net bir bulgu elde edilemediği raporlanmıştır. Subtelomerik analizlerin daha çok mental retardasyon veya konjenital anomaliler için spesifik bir tarama olabileceği üzerinde durulmuştur. Bizim projemiz kapsamındaki hastalarımızdan elde ettiğimiz subtelomerik FISH analizlerinde tekrarlayan düşük etkeni olabilecek herhangi bir kromozomal anomali gözlenmemiştir. Hasta sayısının

az olması sebebi ile telomerik bir farklılık tespit edilmemiştir. Sayıyı arttırarak daha farklı çalışmalar yapıldığında tekrarlayan düşük etkeni olabilecek bir sonuç elde edilebileceği düşünülmektedir. Kromozom 16 için klasik sitogenetik yöntemler kullanılarak yapılan farklı çalışmalarda qh artışının bir polimorfik varyasyon olduğu raporlanmıştır. Bizim çalışmamız 16. kromozomun p11.1-q11.1 bölgesine spesifik prob ile yapılmış ve elde edilen değerler düşükleri olmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında odds ratio 2,4 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bulunmamasının sebebi 16qh+'lığının az görülmesi ve bu nedenle daha büyük hasta ve kontrol gruplarıyla çalışma yapılmasının gerekmesidir. Yine de bulduğumuz 16qh+'lığının abortus etiyojisinde önemli bir rolü olabileceğine dair bir ip ucu oluşturmaktadır. Kromozom 9 için yapılan diğer araştırmalar klasik sitogenetik bant teknikleri kullanılıp ileri tetkikler yapılmadığından netlik kazanmamıştır. Ancak birçok araştırmacı 9qh bölgesindeki değişimin daha çok infertilite etkeni olabileceğini tekrarlayan gebelik kayıplarındaki etkisinin daha az olabileceğini ileri sürmektedir. Bizim 9q12 bölgesi için FISH tekniği ile yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz bulgular istatistiksel olarak anlamlıdır. 9qh+'lığı kontrol grubuna göre abortus riskini 20 kat arttırmaktadır ( $p < 0,05$ ). Bu çalışma 9qh+'lığının abortus çiftlerinde FISH ile değerlendirildiği, net ölçümlerle ortaya konduğu ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığı ilk bilimsel çalışma olup bugüne kadar gözardı edilen bu bulgunun abortus etiyojisinde ne kadar önemli rol oynadığını göstermektedir.

Literatür bilgilerine göre bugüne kadar 9qh+ olguların çocuklarında 9. kromozomun diğer bölgelerine ait delesyon veya duplikasyon görülmemesi bu anomalinin klinik önemi olmadığını düşündürmüştür. Ancak bu kişilerin gebeliklerinde triploidi veya trizomileri için risk artabilir, bu oluşum "Interkromozomal effect" ile açıklanabilir. Bu oluşum gözönüne alınarak abortus çiftlerinde 9qh bölgesi için sperm FISH çalışması ve düşük materyalinde anöploidi taraması yapılması önerilmektedir. XY probu ile yaptığımız FISH çalışmaları sonrasında tespit ettiğimiz %3 ve %5 oranlarında XY/XXY mozaizizmleri görülen olgulara baktığımızda 9. kromozomun heterokromatin bölge polimorfizmi olduğu görülmüştür. Bu olgular düşük oranlı mozaizizmden dolayı fertil bireylerdir. Ancak 9qh+'lığı açısından yapılan diğer çalışmalarda infertiliteye sebep olduğu vurgulandığından acaba bu bireyler mozaik olmasaydı infertil bireyler olsa idi tespit

edilen qh+'lık infertilite sebebi olabilir miydi? Bunun infertil bireylerde çalışılması önerilir. Projemiz kapsamında yapmış olduğumuz tekrarlayan düşük çiftlerinde 9, 16, XY ve subtelomerik bölgelerin FISH ile analizi daha önce uygulanmamış ancak ileri tetkik olarak önerilmiş bir yöntemdir.

Sonuç olarak; 9q12 bölgesi için yapılan FISH analiz sonrası elde edilen değerler, tekrarlayan düşükleri olan kadın olgular ile kontrol grubu dikkate alınarak yapılan istatistiksel hesaplama sonrasında p değeri 0,0654 saptanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlılık sınırında olmamakla birlikte kontrol grubuna göre belirgin olarak artmış bir risk (15,48 kat) saptanmıştır. Daha büyük kontrol grubu ile ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Erkek olgular ve kontrol grubu dikkate alınarak yapılan istatistiksel hesaplama sonrasında p değeri 0,0246 ve cinsiyet ayırımı olmaksızın yapılan hesaplamada p değeri 0,0374 olarak saptanmıştır. 9q12 polimorfizmi için saptanan bu değerler istatistiksel olarak anlamlıdır ve düşük riskini 20,75 kat arttırdığını göstermektedir. 16p11.1-q11.1 polimorfizmi için cinsiyet ayırımı olmadan tekrarlı düşük çiftleri ve kontrol grubu kullanılarak yapılan istatistiksel hesaplama sonrasında elde edilen p değeri 0,5509 olarak saptanmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırında olmasada bu polimorfizm düşük riskini 2,49 kat arttırmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abalovic M, Gutierrez S, Alcaraz G, Maccallini G, Garcia A and Levalle O. Over and subclinic hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid*. 2002; 12: 63-64.
- Akbaş H, Alp N, Kalkanlı S ve Budak T. Üreme problemi olan hastalarda Sitogenetik araştırmalar. *Dicle Tıp Dergisi*. 2004; 31: 24-28.
- Akın H ve Yüce H. Cytogenetic and FISH analyses of the abortus materials: A useful Approach Towards Genetic Counseling for the Couples with Recurrent Spontaneous Abortions. *Fırat Tıp Dergisi*. 2004; 9: 72-74.
- Alp MN ve Oral D. Tekrarlayan spontan abortusları olan çiftlerde genetik araştırmalar. *Dicle Tıp Dergisi*. 2006; 33: 71- 80.
- Baek KH, Lee EJ and Kim YS. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends in Moleculer Medicine*. 2007; 13: 310-317.
- Bandyopadhyay R, McQuillan C, Page SL, Choo KHA and Shaffer LG. Identification and characterization of satellite III subfamilies to the acrosentric chromosomes. *Chromosome Research*. 2001; 9: 223–233.
- Beatriz E De la Fuente-Cortes, Ricardo M Cerda-Flores, Martha I Davila-Rodriguez, Catalina Garcia-Vielma, Rosa M De la Rosa Alvarado and Elva I Cortes-Gutierrez. Chromosomal abnormalities and polymorphic variants in couples with repeated miscarriage in Mexico. *Reproductive BioMedicine*. 2009; 18: 543-544.
- Benzacken B, Carbillon L, Dupont C, Siffroi JP, Monier-Gavelle F and Bucourt M. Lack of submicroscopic rearrangements in volving telomeres in reproductive failures. *Human Reproduction*. 2002; 17: 1154-1157.
- Bernardi LA, Plunkett BA and Stephenson MD. Is chromosome testing of the second miscarriage cost saving? A decision analysis of selective versus universal recurrent pregnancy loss evaluation. *Fertility and Sterility*. 2012; 98: 156-161.

- Blumberg BD, Shulkin JD, Rotter JI, Mohandas T and Kaback MM. Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent abortion. *The American Journal of Human Genetics*. 1982; 34: 948- 960.
- Boue A, Boue J and Groppe A. Cytogenetics in pregnancy wastage. In: *Advances in human genetics*. Harris H, Hirschhorn K (eds). Plenum Press. 1985; 14: 1–57.
- Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, Mougou S, Elghezal H and Saad A. Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology*. 2011; 78: 792-796.
- Branch WD and Silver RM. Outcome of treated pregnancies in women with antiphospholipid syndrome: An update of the Utah experience. *Clinical Obstetrics and Gynecol*. 1992; 80: 614-620.
- Brocklehurst P, Hannah M and McDonald H. Interventions for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2000; 262-264.
- Bruno DL, Burgess T, Ren H, Nouri S, Pertile MD, Francis DI, Norris F, Kenney BK, Schouten J, Choo KHA and Slater HR. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *The American Journal of Medical Genetics*. 2006; 140: 2786-2793.
- Bryne JLB and Ward K. Genetic factors in recurrent abortion. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1994; 37: 693-704.
- Ceylan GG, Özbey Ü, Yüce H ve Elyas H. 47,XYY Sendromlu bir olgu. *Fırat Tıp Dergisi*. 2007; 12: 239-242.
- Chatzimeletiou K, Taylor J, Marks K, Grudzinskas JG and Handyside AH. Paternal inheritance of a 16qh- polymorphism in a patient with repeated IVF failure. *Reproductive BioMedicine*. 2006; 13: 864-867.
- Cockwell AE, Jacobs PA, Beal SJ and Crolla JA. A study of cryptic terminal chromosome rearrangements in recurrent miscarriage couples detects unsuspected acrocentric pericentromeric abnormalities. *Human Genetics*. 2003; 112: 298-302.

- Coulam C and Stern J. Endocrine factors associated with recurrent spontaneous abortion. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 1994; 37: 730-744.
- Cunningham F. G., Leveno K. L., Bloom S. L., Hauth J. C., Rouse D., Spong C. Y. *Williams Obstetrics*. NY: McGraw-Hill. 2010; 9.
- Çankaya T, Gündüz C, Özkınay F, Çoğulu Ö, Sağol S ve Özkınay C. İnterfaz hücrelerinde Fluoresan In Situ Hibridizasyon yöntemi ile Anöploidi aranması. *Ege Tıp Dergisi*. 2006; 45: 149-150.
- Dawood F, Farquharson R and Quenby S. Recurrent miscarriage. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2004; 14: 247-253.
- Dejmek J, Vojtassak J and Moalova J. Cytogenetic analysis of 1508 spontaneous abortions originating from South Slovakia. *European Journal of Obstetrics*. 1992; 46: 129–136.
- Del Porto G, D'Alessandro E, Grommatico P, Coghi IM, DeSanctis S and Giambenedetti M. Chromosome heteromorphisms and early recurrent abortions. *Human Reproductive*. 1993; 8: 755–758.
- Desjardins MK and Stephenson MD. "Information-rich" reproductive outcomes in carriers of a structural chromosome rearrangement ascertained on the basis of recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility*. 2012; 97: 894-903.
- Dirse V, Sliuzas V, Ciuladaite Z, Aleksiūniene B and Kucinskas V. Subtelomeric fluorescence in situ hybridization in clinical cytogenetics: results of analysis of Lithuanian patients. *Biologija*. 2011; 14: 57-59.
- Drakeley AJ, Roberts D and Afirevic Z. Cervical stitch (cerclage) for preventing pregnancy loss in women. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003; 253-254.
- Durak B, Yeşil M, Özdemir M, Çilingir O, Şener T, Bademci G, Müslümanoğlu MH ve Artan S. Is recurrent abortion an indication for subtelomeric region analysis? *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2010; 30: 1465-1468.

- Durmaz B, Karaca E, Durmaz A, Atik T, Akın H, Çoğulu O and Özkınay F. Subtelomeric rearrangements in patients with idiopathic intellectual disability/ multiple congenital anomalies and recurrent miscarriages: seven years experience. *Genetic Counseling*. 2013; 24: 167-177.
- Dündar M, Çağlayan AO, Saatçi C, Batukan C, Başbuğ M and Özkül Y. Can the classical euchromatic variants of 9q12/qh+ cause recurrent abortions? *Genetic Counseling*. 2008; 19: 281-286.
- Elshafaay AE, Mostafa FM, Al-Awadi SA, Akbar LB, Abel Wahab MM, Abd El-Aziz HM and Naguib KK. Cytogenetic Abnormalities and Hereditary Thrombophilias among the Abortus: *Journal Egypt Public Health Association*. 2008; 83: 389-402.
- Engels H, Ehrbrecht A, Zahn S, Bosse K, Vrolijk H, White S, Kalscheuer V, Hoovers MN, Schwanitz G, Propping P, Tanke HJ, Wiegant J and Raap AK. Comprehensive analysis of human subtelomeres with combined binary ratio labelling fluorescence in situ hybridisation. *European Journal of Human Genetics*. 2003; 11: 643–651.
- Fan YS and Zhang Y. Subtelomeric translocations are not a frequent cause of recurrent miscarriages. *American Journal of Medicine Genetics*. 2002; 109: 154-155.
- Fındıklı N, Kahraman S, Sağlam Y, Beyazyürek C, Sertyel S, Karlıkaya G, Karagözoğlu H and Aygün B. Embryo aneuploidy screening for repeated implantation failure and unexplained recurrent miscarriage. *Reproductive Biomedicine Online*. 2006; 13: 38-46.
- Foyouzi N, Cedars MI and Huddleston HG. Cost-effectiveness of cytogenetic evaluation of products of conception in the patient with a second pregnancy loss. *Fertility and Sterility*. 2012; 98: 151-155.
- French FE and Bierman JM. Probabilities of fetal mortality. *Public Health Reproductive*. 1967; 77: 835–847.
- Gabriela M, Baerlocher, Mak J, Tien T and Lansdorp PM. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: Tips and pitfalls. *Cytometry*. 2002; 89–99.

- Gardella J and Hill J. Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reproductive Medicine*. 2000; 18: 407-409.
- Gardner RJM and Sutherland GR. Reproductive failure. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling*. 3 ed. New York: Oxford University Press. 2004; 339-349.
- Gersen SL and Keagle MB. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Totowa, New Jersey: Human and Health Press Inc. 2005; 82-84.
- Gignac J, Danis K, Tihy F and Lemyre E. Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by Multi-Subtelomere FISH in a Cohort of Fetuses With Major Malformations. *American Journal of Medical Genetics*. 2006; 2768–2775.
- Gottfredson LS. The general intelligence factor. In: *The Brain*. The Scientific American Book, The Lyons Press. 1999; 145.
- Guyton AC and Hall JE. Abortus. *Tıbbi Fizyoloji*. Çavuşoğlu H.N, 9. Baskı, Ankara, Nobel tıp kitabevi. 1996; 463-469.
- Hsu JH, Zeng H, Lemke KH, Polyzos AA, Weier JF, Wang M, O'Brien ARL, Weier HG and O'Brien B. Chromosome-Specific DNA Repeats: Rapid identification in silico and validation using fluorescence in situ hybridization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14: 57-71.
- Jalal SM, Harwood AR, Anderson MH, Sekhon GS, Kettering RP and Michels VV. Analysis by subtelomere FISH probes of 191 karyotypically normal patients with nonspecific dysmorphic features or developmental delay or history of multiple miscarriages. *American Journal of Human Genetics*. 2001; 69(suppl): 879.
- Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham Lorentz C, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenuer R, Anderson MH and Michels VV. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genetic Medicine*. 2003; 5: 28–34.
- Jauniaux E and Burton G. Pathophysiology of Histological Changes in Early Pregnancy Loss. *Placenta*. 2005; 26: 114-123.



- Karaman A ve Uluğ P. Cytogenetic Analysis of Couples with Recurrent Miscarriages: A series of 316 cases. *The New Journal of Medicine*. 2013; 30: 30-32.
- Karaoğuz MY, Nas T, Konaç E, İnce D, Pala E ve Menevse S. Is cytogenetic diagnosis of 46,XX karyotype spontaneous abortion specimens erroneous? Fluorescence in situ hybridization as a confirmatory technique. *The Journal Obstetrics and Gynaecol Research*. 2005; 31: 508-513.
- Kochhar PK and Ghosh P. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities. *The Journal Obstetrics and Gynaecol Research*. 2013; 39: 113-120.
- Kosyakova N, Grigorian A, Liehr T, Manvelyan M, Simonyan I, Mkrtychyan H, Aroutiounian R, Polityko AD, Iulpanovich A, Egorova T, Jaroshevich E, Frolova A, Shorokh N, Naumchik IV, Volleth M, Schreyer I, Nelle H, Stumm M, Wegner RD, Reising-Ackermann G, Merkas M, Brecevic L, Martin T, Rodríguez L, Bhatt S, Ziegler M, Kreskowski K, Weise A, Sazcı A, Vorsanova S, Cioffi MB and Ergül E. Heteromorphic variants of chromosome 9. *Molecular Cytogenetics*. 2013; 6: 14.
- Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P and Flint J. Subtelomeric chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet*. 1999; 354: 1676–1681.
- Laird SM, Tükerman EM, Cork BA, Linjawi S and Blakemore AL. Immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Human Reproductive Update*. 2003; 9: 163-174.
- Leible S, Munoz H, Walton R, Sabaj V, Cumsille F and Sepulveda W. Uterin arter blood flow velocity wave forms in pregnant women with mullerian duct anomaly. A biologic model for uteroplacental insufficiency. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1998; 1048-1053.
- Levsky JM and Singer RH. Fluorescence in situ hybridization: Past, present and future. *Journal of Cell Science*. 2003; 116: 2833-2838.
- Madon PF, Athalye AS and Parikh FR . Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 2005;11:726-732.

- Manuelidis L. Chromosomal localization of single copy gene by in situ hybridization human beta-globin genes on the short arm of chromosome 11. *Annals of Human Genetics*. 1981; 45: 135–141.
- Marquard K, Westphal LM, Milki AA and Lathi RB. Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years. *Fertility and Sterility*. 2010; 94: 1473-1477.
- Monfort S, Martinez F, Rosello M, Badia L, Prieto F and Orellana C. A subtelomeric translocation apparently implied in multiple abortions. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2006; 23: 97-101.
- Mueller RF and Young ID. *Emery's Elements of Medical Genetics*. Churchill Livingstone. 1995; 8-14.
- Neas KR, Smith JM, Chia N, Suna H, Heaps LS, Peters G, Sholler G, Tzioumi D, Sillence DO and Mowat D. Three patients with terminal deletions within the subtelomeric region of chromosome 9q. *American Journal of Medical Genetics*. 2005; 132: 425–430.
- Niroumanesh S, Mehdipour P, Farajpour A and Darvish S. A cytogenetic study of couples with repeated spontaneous abortions. *Annals Saudi Medicine*. 2011; 31: 77-78.
- Obut M, Evsen MS, Soydiç HE, Sak ME, Özler A, Fidanboy M, Balkan M, Türkyılmaz A ve Gül T, Tekrarlayan gebelik kayıplarında etiyolojik nedenlerin değerlendirilmesi. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*. 2013; 10: 67-71.
- Okon M, Laird S, Tückerman E and Li T. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertility and Sterility*. 1998; 69: 682-690.
- Page SL, Shin J-C, Han J-Y, Choo KHA and Shaffer LG. Breakpoint diversity illustrates distinct mechanisms for Robertsonian translocation formation. *Human Molecular Genetics*. 1996; 5: 1279–1288.
- Patton P and Novy M. J. Reproductive potential of the anomalous uterus. *Semin Reproduction Endocrinology*. 1988; 6: 217-218.

- Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW and Pinkel D. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*. 1995; 19: 10–26.
- Propst A and Hill J. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reproductive Medicine*. 2000; 18: 341-344.
- Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, Tyson C, Qiao Y, Harvard C, Fawcett C, Kalousek D, Philipp T, Somerville MJ and Stephenson MD. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction*. 2010; 25: 2913-2922.
- Robertson B and Greaves M. Antiphospholipid syndrome: An evolving story. *Blood Reviews*. 2006; 20: 201-212.
- Sağ Ş, Gülten T, Karkucak M, Yakut T, Kimya Y, Evre E, Yiğit B ve Cengiz C. Prenatal Tanıda Konvansiyonel Sitogenetik ve FISH Analiz Sonuçlarının Sayısal Kromozomal Anomaliler ve Endikasyonlar Açısından Değerlendirilmesi, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2009; 35: 83-87.
- Schuler M, Muehlbauer P, Guzzie P and Eastmond DA. Noscapine hydrochloride-induced numerical aberrations in cultured human lymphocytes: a comparison of FISH detection methods and multiple end-points. *Mutagenesis*. 2003; 18: 235-242.
- Scriven PN, Handyside AH and Ogilvie CM. Chromosome translocations, segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal Diagnosis*. 1998; 18: 1437–1449.
- Shaffer LG and Lupski JR. Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *Annual Review of Genetics*. 2000; 34: 297–329.
- Sierra S and Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reproductive Medicine*. 2006; 24: 17-24.
- Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clinical of Obstetrics and Gynecology*. 2007; 50: 10-30.

- Starke H, Nietzel A, Weise A, Heller A, Mrasek K, Belitz B, Kelbova C, Volleth M, Albrecht B, Mitulla B, Trappe R, Bartels I, Adolph S, Dufke A, Singer S, Stumm M, Wegner RD, Seidel J, Schmidt A, Kuechler A, Schreyer I, Claussen U, von Eggeling F and Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes: genotype phenotype correlation and classification. *Human Genetics*. 2003; 114: 51–67.
- Stephenson MD and Sierre S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Human Reproduction*. 2006; 21: 1076-1082.
- Szumilas M. Explaining odds Ratios. *J Can Child Adolesc Psychiatry*. 2010; 19: 227-229.
- Tharapel AT, Tharapel SA and Bannerman RM. Recurrent pregnancy losses and parental chromosome abnormalities: a review. *British Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1985; 92: 899-914.
- Tharapel SA, Wilroy RS, Keath AM, Rivas ML and Tharapel AT. Identification of the origin of ring/marker chromosomes in patients with Ullrich-Turner syndrome using X and Y specific alpha satellite DNA probes. *American Journal of Medical Genetics*. 1992; 42: 720–723.
- Tekcan A, Elbistan M, Kara N ve Koçak İ. Dengeli resiprokal translokasyon taşıyıcısı bir olgu ve habitüel düşük. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2012; 29: 312-314.
- Thompson MW, McInnes RR and Willard HF. *Thompson & Thompson: Genetics in Medicine*. 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company. 2001; 1447-1449.
- Usha R, Dutta P, Rajitha V, Kumar P and Ashwin BD. Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in Southern region of India: report and review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2011; 28: 145-149.
- Vaz N and Shyama SK. Numerical chromosomal abnormalities in the malformed newborns. *International Journal of Human Genetics*. 2005; 5: 237–240.
- Ventolini G, Zhang M and Gruber J. Hysteroscopy in the evaluation of patients with recurrent pregnancy loss: a cohort study in a primary care population. *Surgical Endoscopy*. 2004; 18: 1782-1784.

- Vidal F, Gimenez C, Rubio C, Simon C, Pellicer A, Santalo J and Egozcue J. FISH Preimplantation Diagnosis of Chromosome Aneuploidy in Recurrent Pregnancy Wastage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1998; 15: 310-313.
- Wallerstein R, Gibas L, Anderson CE, Jackson L. Diagnosis of a complex chromosomal rearrangement using fluorescen in situ hybridisation. *Journal of Medical Genetics*. 1996; 33: 793-794.
- Werner M, Reh A, Grifo J, Perle MA. Characteristics of chromosomal abnormalities diagnosed after spontaneous abortions in an infertile population. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012; 29: 817-820.
- Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, Vander PM, Tanke HJ and Raap AK. In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Research*. 1991; 19: 3237-3241.
- Willard HF. Centromeres of mammalian chromosomes. *Trends in Genetics*. 1990; 6: 410-416.
- Wise JL, Crout RJ, McNeil DW, Weyant RJ, Marazita ML and Wenger SL. Cryptic Subtelomeric Rearrangements and X Chromosome Mosaicism: A Study of 565 Apparently Normal Individuals with Fluorescent In Situ Hybridization. *Plos one*. 2009; 4: 855-857.
- Yakut S, Berker-Karüzüm S, Şimşek M, Zorlu G, Trak B ve Lüleci G. Telomere-specific fluorescence in situ hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clinical Genetics*. 2002; 61: 26–31.
- Yetman DL and Kutteh WH. Antiphospholipid antibody panels and recurrent pregnancy loss: Prevalence of anticardiolipin antibodies compared with other antiphospholipid antibodies. *Fertility and Sterility*. 2002; 77: 342-347.
- Zarina AL, Jamil MA, Ng SP, Rohanna J, Yong SC, Salwati S and Boo NY. Unbalanced chromosomal translocation: A cause of recurrent spontaneus abortion. *The Medical Journal of Malaysia*. 2006; 61: 260-262.

## 7. EKLER

### 7.1.Özgeçmiş

#### DİĞDEM UYSAL

##### Kişisel Bilgiler

Uyruğu	T.C
T.C Kimlik No	52381156494
Doğum Yeri	Üsküdar / İstanbul
Doğum Tarihi	06/05/1980
Tel Cep	(505) 451 30 58
E-Mail	<a href="mailto:digdem_uyisal@hotmail.com">digdem_uyisal@hotmail.com</a>

##### Öğrenim Durumu

###### Lisans

Üniversite	Trakya Üniversitesi
Akademik birim	Fen-Edebiyat Fakültesi
Program/Bölüm	Biyoloji
Mezuniyet yılı	2003
<b>Yüksek Lisans</b>	
Üniversite	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Akademik birim	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program/bölüm	Tıbbi Genetik
Mezuniyet yılı	Öğrenim devam ediyor

**Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan özet metin olarak yayımlanan bildiri ya da poster veya gösteri.**

- Sılan F., Yalçın-tepe S., **Uysal D.**, Uludağ A., Coşar E., Güngör A. N. C., Özdemir O. İnfertilite ve tekrarlayan gebelik kayıpları olan çiftlerde sayısal ve yapısal kromozom anormalileri: ÇOMÜ Tıp Fakültesi deneyimi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s. 70, 19-23 Aralık 2012, Bursa
- Özdemir O., Uludağ A., Güngör A. N. C., Coşar E., Yalçın-tepe S. A., **Uysal D.**, Kankaya D. G., Demir Y., Sılan F. Fetal anöploidilerin analizinde QF PCR: Çanakkale deneyimi. 10. Ulusal Tıbbi Genetik kongresi, s. 61, 19-23 Aralık 2012, Bursa.
- **Uysal D.**, Özdemir Ö., Sılan F., Urfalı M., Yalçın-tepe S., Coşar E., Güngör C.A. Tekrarlayan Düşükleri Olan Çiftlerde D16Z2 Lokus Polimorfizminin FISH Yöntemiyle Analizi. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.20, 6-7 Aralık 2013, İstanbul.
- Göveç H., **Uysal D.**, Urfalı M., Ari E., Sılan F., Özdemir Ö. Sitogenetik Sonuçları Olan Bir Tek Gen Defekti: Prematur Chromatide Separation. Erişkin Yaşta Görülen Genetik Hastalılar Sempozyumu, s.40, 6-7 Aralık 2013, İstanbul.

#### **İlgi Alanları-Laboratuvar Deneyimi**

- Sitogenetik/Moleküler Sitogenetik
- Hücre kültürü (lenfosit ve amniyon), kromozom analizi, Karyotip-karyogram analizi.
- Manuel-otomatik karyotip, karyogram ve ideogram analizler
- GTG, NOR, HRB bant teknikleri
- Tahliye materyali, amniyon hücre kültürleri
- Seks kromatin analizi
- Mikronukleus analizi
- Floresan Insitu Hibridizasyon (FISH) analizi (Telomer, sentromer).



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : KLİ.ARŞ.ETİK.KURUL.BŞK./050.99-67  
Konu : Başvuru İncelemesi

28./02/2013

Sayın Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

“Tekrarlayan Gebelik Kaybı Olan Çiftlerde Sayısal ve Yapısal Kromozom Aberasyonlarının Subtelomerik FISH Yöntemi ile İleri Düzeyde Araştırılması” başlıklı EK-2013-28 nolu çalışmanızda Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, etik kurallara aykırı bir husus bulunmadığına karar vermiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hakkı Engin AKSULU  
Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkan

ASLI GİBİDİR  
01/03/2013  
  
Hâtice KAMAR  
Enstitü Sekreter