

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DÜŞÜK MATERYALLERİNDE KROMOZOMLARIN
SUBTELOMERİK BÖLGELERİNİN MLPA YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Akın TEKCAN

**Samsun
Mayıs-2013**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DÜŞÜK MATERYALLERİNDE KROMOZOMLARIN
SUBTELOMERİK BÖLGELERİNİN MLPA YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Akın TEKCAN

Danışman: Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN

**Samsun
Mayıs-2013**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Akın TEKCAN tarafından Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN Danışmanlığında hazırlanan “Düşük Materyallerinde Kromozomların Subtelomerik Bölgelerinin MLPA Yöntemiyle Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 06/05/2013 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ali Naki ULUSOY
Ondokuzmayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi AD.

Üye : Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN (Danışman)
Ondokuzmayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÇETİNKAYA
Ondokuzmayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD.

Üye : Doç. Dr. Nurten KARA
Ondokuzmayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

Üye : Yrd. Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ
Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.....

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tarafımdan yapılan bu araştırmanın tüm aşamalarında, Tıbbi Biyoloji ve Tıbbi Genetik Bilim alanlarında teorik ve pratik açıdan yetişip deneyim kazanmamda yol göstererek, destek olup çalışmalara katkıda bulunan ve her türlü desteklerini esirgemeyen değerli danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN'a ve hasta temininde önemli desteklerde bulunan Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Mehmet Bilge ÇETİNKAYA, Prof. Dr. İdris KOÇAK ve Yrd. Doç. Dr. Davut GÜVEN'e öncelikle teşekkür ediyorum.

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım her türlü sorunun çözülmesinde sabır ve özveri ile yardım eden Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Nurten KARA'ya teşekkür ediyorum. Çalışmalarım sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Şengül TURAL'a, Yrd. Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında gösterdikleri takdire şayan özverili sabır ile manevi desteklerden dolayı, değerli annem Zübeyde TEKCAN'a, değerli babam Sayın Memduh TEKCAN'a, değerli kardeşim Taşkın TEKCAN'a, değerli eşim Pınar TEKCAN'a ve çocuklarım Memduh Doruk ile Bilge Dora'ya içtenlikle teşekkür ediyorum.

Bu araştırmanın (PYO.TIP.10043) gerçekleşmesinde mali desteklerini esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Araştırma Fonu Sayın Yetkililerine ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Süleyman KAPLAN'a, Yönetim Kurulu Sayın Üyelerine ve değerli personellerine de teşekkür etmeyi borç bilirim.

ÖZET

DÜŞÜK MATERYALLERİNDE KROMOZOMLARIN SUBTELOMERİK BÖLGELERİNİN MLPA YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Amaç: Düşük materyallerinden; kromozom analizi yapılması, subtelomerik bölgelerle ilgili kromozomal abnormalitelerin saptanması ve Multipleks Ligation-dependent Prob Amplification (MLPA) yönteminin prenatal tanı uygulamalarına uyarlanması amacıyla bu araştırma gerçekleştirildi.

Materyal ve Metot: Araştırılması amacıyla laboratuvara gönderilen 60 düşük materyalinden; koryonik villus hücre kültürleri ve DNA izolasyonları yapıldı. Maternal kontaminasyon analizi yapmak amacıyla, düşük yapmış annelerin periferik kanından DNA izole edildi. Düşük materyallerinin ve düşük yapmış annelerin kantitatif floresan polimeraz zincir reaksiyonundan (QF-PCR) sağlanan kısa ardışık tekrar (STR) pik profilleri karşılaştırılarak maternal kontaminasyon analizi yapıldı. Maternal kontaminasyon olmadığı saptanan 43 düşük materyalinin 30'unda ve düşük öyküsü olmayansağlıklı çocuk sahibi 20 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda kromozomların subtelomerik bölgeleri MLPA yöntemi ile değerlendirildi.

Bulgular: Maternal kontaminasyon saptanmayan ve sitogenetik analizi yapılan 43 düşük materyalinin 19'unda normal karyotip (%44,2), 10'unda sayısal (%23,3) ve 2'sinde yapısal kromozom abnormalitesi (%4,7) ve MLPA yöntemiyle araştırılan 30 düşük materyalinin 2'sinde de subtelomerik 16q duplikasyonu saptandı (%6,6).

Sonuç: Düşük materyali ile kontrol grubu bulgularının istatistiksel analizi, düşüklerle subtelomerik abnormaliteler arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını gösterdi ($p>0,05$). Ancak, düşük materyallerinde %6,6 oranında saptanan subtelomerik abnormalitelerin kontrollerde saptanmaması, daha ileri araştırmalar yapılmasına ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Düşük materyali; MLPA; Subtelomerik kromozom abnormaliteleri

Akın TEKCAN, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Mayıs-2013

ABSTRACT
INVESTIGATION WITH MLPA METHOD OF THE SUBTELOMERIC
REGIONS OF CHROMOSOMES IN ABORTION MATERIALS

Purpose: This study was performed for chromosome analysis, to detect chromosomal abnormalities related to subtelomeric regions and to adapt prenatal diagnostic applications of Multiplex Ligation-dependent Prob Amplification (MLPA) method in abortion materials.

Material and Method: The cell cultures and DNA isolations were performed from 60 abortion material sent to laboratory in order to investigate. To perform the maternal contamination analysis, DNA isolations were done from peripheric blood of mothers who had abortions. Maternal contamination analysis were made by comparing the quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) provider short tandem repeat (STR) peak profiles of abortion materials and mothers who had abortion. The subtelomeric regions of the chromosomes in 30 of the 43 abortion materials without maternal contamination and 20 healthy persons who have healthy children and without history of abortion were assessed using the MLPA method.

Results: Of 43 abortion materials which underwent cytogenetic analysis and without maternal contamination, 19 were found to have normal karyotype (44.2%), 10 numerical (23.3%), 2 structural abnormalities (4.7%) and subtelomeric 16q duplication was determined in 2 of the 30 abortion materials investigated with MLPA method (6.6%).

Conclusion: Statistical analysis of abortion materials and control group findings showed no significant relationship between abortions and subtelomeric regions abnormalities ($p>0.05$). However, the fact that the 6.6% subtelomeric abnormalities found in abortion materials that was not found in controls showed that further studies is required.

Key Words: Abortion material; MLPA; Subtelomeric chromosome abnormalities

Akın TEKCAN, PhD Thesis
Ondokuz Mayıs University - Samsun, May-2013

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------------------------|--|
| aCGH | Array Komperatif Genomik Hibridizasyon |
| ACL | Antikardiyolipin |
| APS | Antifosfolipid Sendromu |
| BMP | Kemik Morfogenetik Protein (Bone Morphogenetic Protein) |
| CGH | Komperatif Genomik Hibridizasyon |
| CNV | Kopya Sayısı Varyasyonu (Copy Number Variation) |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| EGF | Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor) |
| FGF | Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor) |
| FISH | Floresan in-situ Hibridizasyon |
| FVL | Faktör V Leiden |
| GAS8 | Growth Arrest-Spesific8 |
| hCG | İnsan Koryonik Gonadotropin (Human Chorionic Gonadotropin) |
| HIV-1 | İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü-1 |
| IgG | İmmünglobulin G |
| ILGF-1 | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (Insulin-likeGrowthFactor1) |
| ILGF-BP1 | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlama Proteini 1 |
| IVF | İn-vitro Fertilizasyon |
| LAC | Lupus Antikoagulantı |
| LH | Luteinize Edici Hormon (Luteinizing Hormone) |
| MLPA | Multipleks Ligation-dependent Prob Amplification |
| MTHFR | Metilentetrahidrofolat Redüktaz |
| PCOS | Polikistik Over Sendromu |
| PT/INR | Protrombin Zamanı/Internasyonel Normalized Ratio |
| PTT | Parsiyel Tromboplastin Zamanı |
| QF-PCR | Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RPA | Relatif Pik Alanı |
| RPR | Relatif Pik Oranı |
| STR | Kısa Ardışık Tekrarlar |
| TGF-α | Transforme Edici Büyüme Faktörü Alfa |
| TNF- α | Tümör Nekrozis Faktör Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha) |

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Üreme Biyolojisi | 2 |
| 2.1.1. Embriyonik Dönem | 2 |
| 2.1.2. Fetal Dönem | 10 |
| 2.2. Düşük | 11 |
| 2.2.1. Epidemiyoloji | 12 |
| 2.2.2. Etiyoloji | 14 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 23 |
| 3.1. Araştırma Grubu ve Biyolojik Örnekler | 23 |
| 3.2. Gereçler | 23 |
| 3.3. Koryonik Villus Kültürü | 25 |
| 3.4. Koryonik Villus ve Periferik Kandan DNA İzolasyonu | 28 |
| 3.5. Multipleks QF-PCR Yöntemi | 29 |
| 3.6. Subtelomerik MLPA Yöntemi | 31 |
| 3.7. İstatistiksel Analiz Yöntemleri..... | 34 |
| 4. BULGULAR | 35 |
| 4.1. Araştırma Grubu..... | 35 |
| 4.2. Sitogenetik Analiz Bulguları..... | 36 |
| 4.3. Maternal Kontaminasyon Analizi Bulguları | 37 |
| 4.4. Subtelomerik Analiz Bulguları | 43 |
| 5. TARTIŞMA | 58 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 64 |
| KAYNAKLAR | 65 |
| EKLER | 74 |
| ÖZGEÇMİŞ | 81 |

1. GİRİŞ

Klinik olarak, gebeliğin fetal döneme ulaşmadan spontan kaybı, düşük olarak tanımlanmıştır (Lathi ve ark., 2011; Van den Berg ve ark., 2012). Başka bir ifadeyle söylemek gerekirse, 24. gestasyonel haftaya kadar oluşan gebelik kayıplarına düşük denmektedir (Yakut ve ark., 2002; Wold ve ark., 2006; Ambartsumyan ve Clark, 2008; Zhang ve ark., 2009; Van den Berg ve ark., 2012). Ardışık iki ya da daha fazla gebeliğin spontan sonlanması da tekrarlayan düşük olarak tanımlanmıştır (Fabro ve ark., 2011). 12. gestasyonel haftadan önce gerçekleşen düşüklere erken gebelik kayıpları ve 12. gestasyonel haftadan sonra gerçekleşen düşüklere ise geç gebelik kayıpları denmektedir (Carrington ve ark., 2005).

Literatür bilgilerinden, düşüğe; genetik abnormaliteler, uterus abnormaliteleri, endokrin ve immünolojik sebepler, enfeksiyonlar ve çevresel faktörler gibi birçok etkenin neden olduğu anlaşılmakta ve düşüğe yol açan etkenler arasında kromozomal abnormaliteler ile subtelomerik kromozomal bölge abnormalitelerinin önemli bir yer tuttuğu görülmektedir (Warren ve Silver, 2008). Spontan düşük olgularının %50-70'inde kromozomal abnormaliteler (Rajcan-Separovic ve ark., 2010), %1-13'ünde ise DNA kopya sayısı varyasyonları (CNV) olarak bilinen submikroskobik kromozomal abnormaliteler saptandığı bildirilmiştir (Rajcan-Separovic ve ark., 2010; Robberecht ve ark., 2012; Van den Berg ve ark., 2012). Bitişik repetitif DNA dizilerinden oluşan telomerlerin submikroskobik kromozomal abnormalite oranının, kromozomun diğer bölgelerine göre artış gösterdiği ileri sürülmüştür. Telomer ve subtelomer bölge CNV'lerinin ve translokasyonlarının düşüklere yol açabildiği konusunda görüş birliği olmasına rağmen (Brackly ve ark., 1999; Wakui ve ark., 1999; Knight ve Flint, 2000; de Vries ve ark., 2001; Benzacken ve ark., 2002; Boehm ve ark., 2004; Alkuraya ve ark., 2006), konuyla ilgili az sayıda araştırmanın yapılabilmiş olması dikkat çekmiştir.

Bu araştırma ile düşük materyallerinde klasik sitogenetik yöntemlerle saptanamayan subtelomerik bölgelerle ilgili delesyon ve duplikasyonların MLPA yöntemi uygulanarak incelenmesi ve bu abnormalitelerin düşüklere sıklığının saptanmasıyla birlikte MLPA yönteminin prenatal tanı uygulamalarına uyarlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üreme Biyolojisi

Üreme; dişi üreme organlarında geçen embriyonik gelişme ile sağlanan biyolojik bir süreçtir (Gökçimen ve Temel, 2004). Ovulasyon ile ovaryumdan atılan oosit, genellikle 12 saat içerisinde sadece 1 sperm tarafından fertilize olabilmektedir. Sperm hücrelerinin çoğu, servikste mukozal katlantılar içinde kalmakta ve akabinde servikal kanala ve uterusu geçerek uterin tüplere ulaşmaktadır. Spermilerin kısa süreli de olsa servikste depo edilmesi ve buradan aşamalı olarak uterus ve uterin tüplere geçmesi fertilizasyon şansını artırmaktadır (Moore ve Persaud, 2009). Fertilizasyon; hücre-hücre ve hücre-matriks arası ilişkilerden kaynaklı bir süreçtir. Fertilizasyon aşamasında sperm zona pellusidaya bağlanırken, oositin etrafı extrasellüler matriks proteinleri ile çevrilmekte ve bu ilişki, akrozom reaksiyonunu tetikleyerek, spermin oosit içine penetre olmasını sağlamaktadır. Fertilizasyon sonucu oluşan zigot, çeşitli bölünme aşamalarından geçerek, implantasyonu sağlamak üzere uterusu gelir. İmplantasyon aşamasında trofoblast hücreleri uterin luminal epitel hücrelerinin apikal yüzeyleriyle temas geçer (Atabekoğlu ve ark., 2002). Fertilizasyonu takiben, başlayan embriyonal dönem ve akabindeki fetal dönem, büyüme ve gelişim süreçlerine bağlı olarak, klinik açıdan 3'er aylık üç döneme ayrılır. İlk trimester sonunda, tüm organ sistemleri gelişmekte ve ikinci trimesterde ise fetal gelişme olmaktadır. Bu nedenle, fetüsün tüm anatomik ayrıntılarını ultrasonografik tekniklerle incelemek mümkün olabilmektedir. Doğumdan önceki dönem olan üçüncü trimester başında fetüs doğduğunda, tıbbi destekle yaşatmak mümkün olabilmektedir. Fetüsün olgunlaşmasının en önemli göstergesi, 35. haftada ağırlığının 2500 gr'a ulaşmasıdır. Gelişimle ilgili hastalıkların anlaşılması, embriyonik ve fetal gelişim süreçlerinin incelenerek değerlendirilmesi ile mümkündür (Moore ve Persaud, 2009).

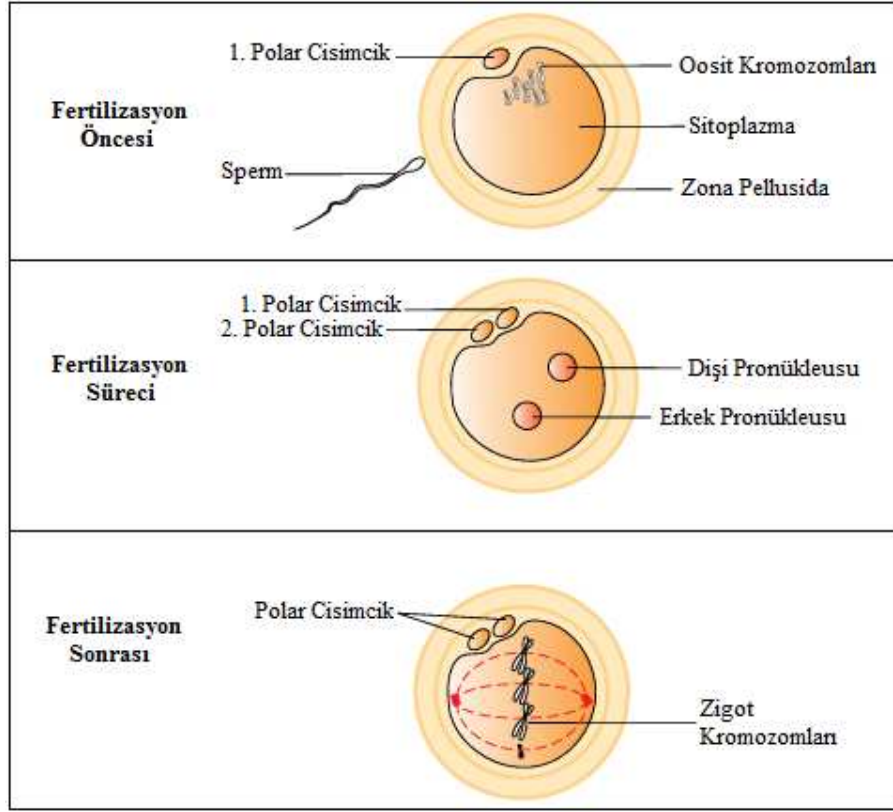
2.1.1. Embriyonik Dönem

a) Fertilizasyon

Fertilizasyon; sperm ile oositin temasıyla başlayan ve iki hücrenin birleşip kaynaşmasını ifade eden, birbiri ile ilişkili karmaşık moleküler olaylar dizisini gerektirir (Başaklar ve Sönmez, 1996; Rahman ve ark., 2008; Seçkin ve ark., 2008). Genellikle uterin tüplerinin geniş ve uzun parçası olan ampullada gerçekleşen fertilizasyon

yaklaşık 24 saat sürmektedir (Demir, 1995; Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008; Moore ve Persaud, 2009). Tüplerin diğer kısımlarında da gerçekleşen fertilizasyona uterusu rastlanmamaktadır. Eğer oosit, uterin tüplerde fertilize olmazsa, dejenere olup ortadan kalkar. Spermiler testisin seminifer tübüllerinde üretilir ve epididimiste depolanır. Koitus sırasında semenin vajene ejakulasyonu ile milyonlarca sperm servikste birikir (Başaklar ve Sönmez, 1996). Birkaç yüz sperm uterusu geçerek uterin tüplere ulaşır. Oosit ve çevresindeki folliküler hücrelerden salgılanan kimyasal yönlendirici sinyaller sperm oositi bulmasını sağlar (Demir, 1995; Başaklar ve Sönmez, 1996; Kierszenbaum, 2006; Rahman ve ark., 2008; Seçkin ve ark., 2008; Moore ve Persaud, 2009).

Spermin zona pellusidadan geçişi fertilizasyon için gereklidir. Akrozomdan salınan esteraz, akrozin, serin proteaz, fosfataz, kollojenaz, fosfolipaz C, β -galaktozidaz ve nöraminidaz gibi enzimler zona pellusidayı eriterek sperm oosite girmesini sağlar (Rahman ve ark., 2008; Seçkin ve ark., 2008). Spermin zona pellusidayı geçmesinden sonra, oosit membranı başka bir sperm geçişini engellemek için döllenme zarı oluşturur (Demir, 1995; Başaklar ve Sönmez, 1996). Spermin oosite girmesinden sonra, sekonder oosit, 2. mayotik bölünmesini tamamlar ve olgun bir oosit ile 2. polar cisimciğini oluşturur (Australian Government, National Health and Medical Research Council, 2005; Rahman ve ark., 2008) (Şekil 1). Fertilizasyon sonucu oluşan zigot, mitoz bölünme geçirerek, embriyonal gelişme sürecine girer (Australian Government, National Health and Medical Research Council, 2005; Seçkin ve ark., 2008).



Şekil 1. Fertilizasyon sürecinde oosit ve sperm pozisyonu (Australian Government, National Health and Medical Research Council, 2005'den uyarlanmıştır)

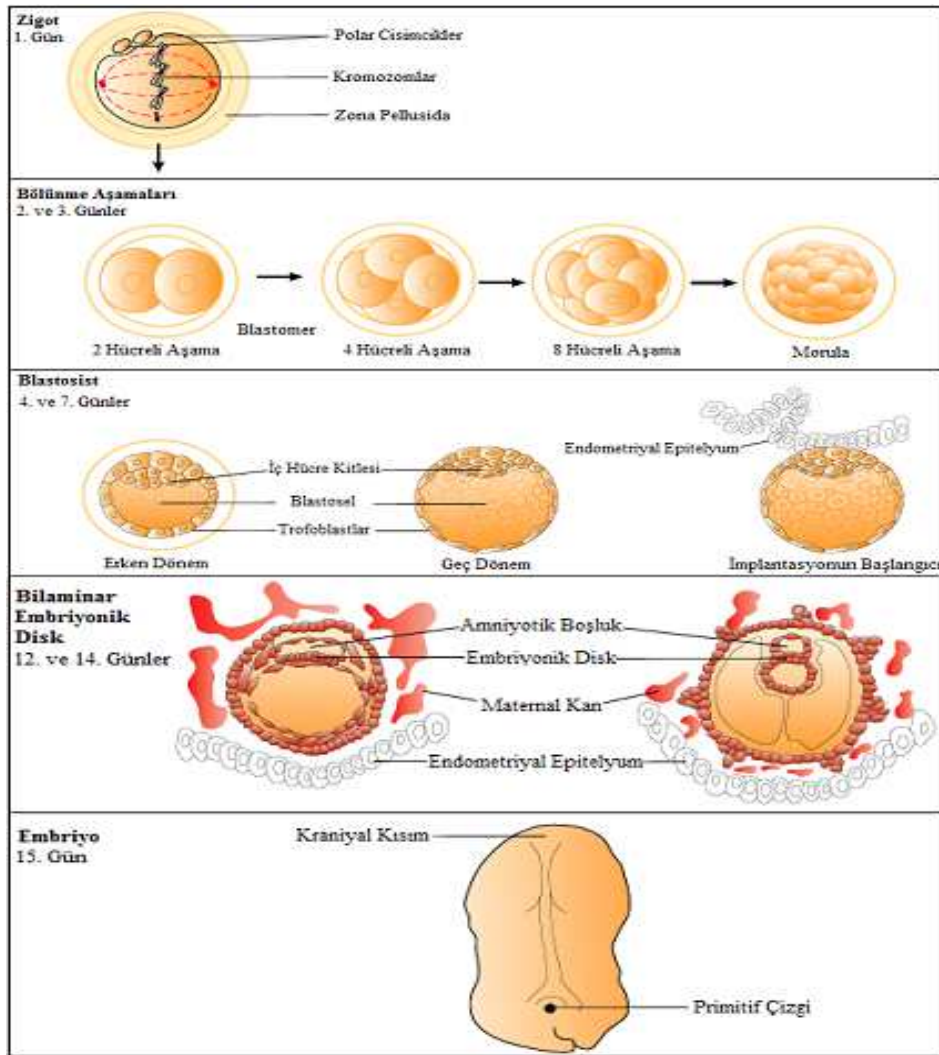
b) İmplantasyon

İmplantasyon; insan endometriyum dokusunda gerçekleşen özel bir biyolojik olaydır. Endometriyum “implantasyon penceresi” olarak adlandırılan özel bir zaman diliminde embrioyu kabul eder (Tabibzadeh, 1998; Dekel ve ark., 2010; Bahar ve ark., 2012). Döllenmeyi takiben oluşan mitoz bölünmeler sonucunda gelişen embriyonun endometriyuma yönlendirilmesi ve zonadan sıyrılıp endometriyuma tutunmasına implantasyon denir (Dekel ve ark., 2010). İn-vitro fertilizasyon (IVF) çalışmaları, diğer canlı türlerinden farklı olarak, 6-8 hücreye ulaşan insan embriyosunun implantasyon yeteneği kazandığını göstermiştir. Ancak, implantasyon öncesinde endometriyum; endokrin, otokrin ve parakrin salgı mesajlarıyla kendini implantasyona hazır hale getirir (Tabibzadeh, 1998; Bahar ve ark., 2012). Endometriyumun implantasyona hazırlık sürecine “implantasyon penceresi” denir. İmplantasyon penceresi süreci; fibroblast benzeri endometriyal stromal hücre transformasyonu, desidual hücrelerin yuvarlaklaşması, sekretuar glandüllerin gelişmesi, büyük apikal çıkıntıların oluşması ve luminal epitelde mikrovillus yapılanmalarının ortaya çıkışı gibi yoğun hücrel

değişiklikleri kapsamaktadır (Dekel ve ark., 2010). Uterin tüplerden uterusu göç eden zigot, bir dizi hücre bölünmesi geçirerek segmentasyona uğrar (Rahman ve ark., 2008) ve blastomer denen hücrelerden oluşan bir yapıya dönüşür (Demir, 1995; Başaklar ve Sönmez, 1996; Rahman ve ark., 2008; Prados ve ark., 2012) (Şekil 2). Zigotun erken aşamalarındaki hücreler totipotent karaktere sahiptir. Embriyonal totipotent hücreler, giderek pluripotent karakterli hücrelere dönüşürler (Demir, 1995). Fertilizasyonun 4. gününde uterusu ulaşan morula içinde blastosist boşluğu belirir (Seçkin ve ark., 2008) (Şekil 2). Blastosist boşluğunun sıvı ile dolması, blastomerlerin trofoblast ve embriyoblast olmak üzere iki farklı yapıya dönüşmesine yol açar (Demir, 1995; Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008). Trofoblast, iç hücre kitlesi ile blastosist boşluğunu kuşatır ve sonra embriyo dışı yapıları ve plasentanın embriyonik kısmını oluşturur (Başaklar ve Sönmez, 1996). Merkezi alana yerleşen hücre kitlesi embriyoblast olarak tanımlanır ve embriyoyu oluşturur. Embriyoblast; blastosist boşluğuna doğru uzanırken, trofoblastlar da blastosist duvarını oluşturur. Blastosist, yaklaşık 2 gün uterin salgılar içerisinde yüzdükten sonra, zona pellusidanın dejenere olmasıyla serbest kalır (Demir, 1995; Seçkin ve ark., 2008; Moore ve Persaud, 2009). Embriyo, uterus içinde serbestçe yüzerken, uterin bezlerin salgılarıyla beslenir (Moore ve Persaud, 2009). Blastosistin endometriyuma penetrasyonu, endometriyum hücreleri arasındaki desmozomların azaltılmasıyla kolaylaşır (Kierszenbaum, 2006) (Şekil 2). Blastosistin implantasyonu gerçekleşmezse, implantasyon penceresini oluşturan moleküler sistem, implantasyon penceresini kapatarak süreci durdurur (Tabibzadeh, 1998).

Embriyonik kutuba komşu trofoblastlar; dışarıda sinsityotrofoblastları ve içte sitotrofoblastları oluştururlar (Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008) (Şekil 2). Trofoblastların farklılaşması, hücre içi ve hücre dışı faktörler tarafından kontrol edilir. Fertilizasyonun 6. gününde sinsityotrofoblastlar şekillenir ve çıkıntıları endometiyal epitele uzanarak bağ dokusu içinde ilerler (Moore ve Persaud, 2009). Fertilizasyonun 7. gününde iç hücre kitlesinin blastosist boşluğuna bakan yüzeyinde oluşan tabakalaşma ile hipoblast denilen bir hücre tabakası oluşur (Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008) ve ilk hafta sonunda blastosist endometiyal epitele yüzeyel olarak implante olur (Başaklar ve Sönmez, 1996). 11-12. günde uteroplental dolaşım sağlanır (Başaklar ve Sönmez, 1996; Kierszenbaum, 2006; Seçkin ve ark., 2008; Moore

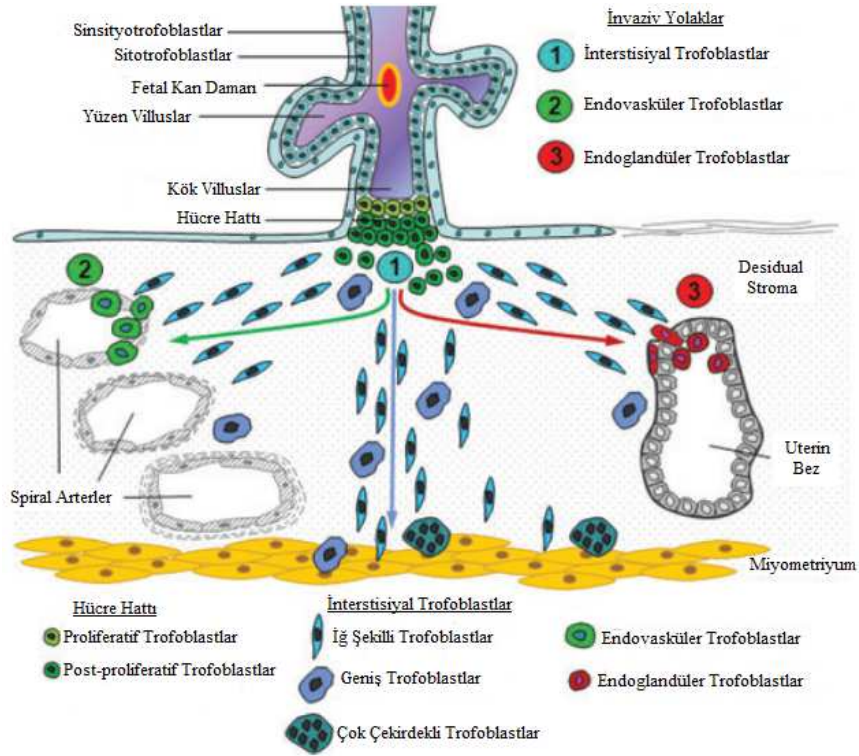
ve Persaud, 2009). Uteroplazental dolaşımın sağlanmasını takiben endometriyal epiteldeki hasar onarılır ve primer koryonik villusların gelişimi sağlanır. Koryon villuslarındaki kapillerler, koryon ve bağlantı sapının mezenseimi içinde gelişen damarlar aracılığıyla, embriyonik kalple ilişki kurarlar. Bu süreçte, embriyoblasttaki morfolojik değişimler sonucu oluşan epiblast ve hipoblasttan köken alan embriyonik disk oluşur (Moore ve Persaud, 2009) (Şekil 2). Embriyonun tüm organ ve dokularını oluşturan germ tabakaları, bu embriyonik diskten köken alırlar. İkinci hafta içinde, implantasyon süreci devam ederken, embriyoblast içerisinde amniyon boşluğu ve bu boşluğun etrafında yer alan amniyojenik hücrelerden amniyon, primer umbilikal kese, bağlantı sapı ve koryonik kese şekillenir (Moore ve Persaud, 2009).



Şekil 2. Fertilizasyon ve embriyonik gelişmenin aşamaları (Australian Government, National Health and Medical Research Council, 2005'den uyarlanmıştır)

c) Embriyonik Gelişim Süreci

Blastosist implante olurken, trofoblastlar endometriyuma temas ederek sitotrofoblastlara ve sinsityotrofoblastlara farklılaşırlar. Sitotrofoblastlar, mitotik bölünme ile yeni hücreleri oluştururlar. Yeni oluşan hücreler, giderek büyüyen sinsityotrofoblast kitlesine göç edip hücre zarlarını kaybederler (Başaklar ve Sönmez, 1996). Sinsityotrofoblastlar ise hızla genişleyen ve çok çekirdekli bir kitle olup, hiçbir hücre sınırı göstermezler. Gelişen sinsityotrofoblast hücreleri, endometriyal bağ dokusuna invaze olurken, blastosist endometriyuma gömülme süreci yaşar (Kierszenbaum, 2006) (Şekil 3). Sinsityotrofoblastik hücreler, implantasyon bölgesindeki endometriyum hücrelerini apoptoza uğratarak invazyonu kolaylaştırırken, endometriyumda gerçekleşen moleküler mekanizma implantasyonun gerçekleşmesini sağlar (Moore ve Persaud, 2009) (Şekil 3).



Şekil 3. Trofoblast invazyonunun şematik görünümü (Huppertz ve ark., 2012'den uyarlanmıştır)

d) Doku ve Organ Gelişimi

Embriyonun gelişimi; embriyonik diskten üçüncü haftada primitif çizginin belirmesi, nötokordun ortaya çıkışı ve üç germ tabakasının farklılaşması ile sürer (Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008). Tüm embriyonik dokuların ana kaynağı olan üç germ tabakasının şekillendiği gastrulasyon süreci embriyonik eksenini belirleyen en önemli süreçtir. Hücre farklılaşmaları, yeniden düzenlenmeleri, hareket ve yapışma özellikleri gastrulasyon sürecinde artarak devam eder. Kemik morfogenetik proteinleri (BMP), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve Wnts gibi sinyal molekülleri bu süreçte rol alırlar (Moore ve Persaud, 2009). Gastrulasyonun ilk işareti, embriyonik diskin epiblast tabakası yüzeyinde primitif çizginin ortaya çıkması (Seçkin ve ark., 2008) ile doku ve organları oluşturan ektoderm, endoderm ve mezoderm tabakalarının şekillenmesidir (Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008). Bu üç germ tabakasındaki hücreler; bölünebilme, göç edebilme ve hücre grupları oluşturabilme yeteneğindedirler (Moore ve Persaud, 2009).

Embriyonun başlıca iç ve dış yapıları dördüncü hafta ile sekizinci haftalar arasında gerçekleşir. Organogenezis döneminin sonuna doğru bütün ana organ sistemleri gelişmeye başlasa da kardiyovasküler sistem dışında, diğer bazı yapıların fonksiyon görmesinde yetersizlik gözlenir. Doku ve organ yapıları geliştikçe, embriyonun dış görünüşü de değişikliğe uğrar ve sekizinci haftada doğal görünüm kazanır (Başaklar ve Sönmez, 1996; Moore ve Persaud, 2009). Gelişme sürecinde embriyonun boy, ağırlık ve organ gelişimini; anne ve embriyo kaynaklı genetik etkenlerin, çevresel kaynaklı zararlı etkenlerin şiddeti, akut ya da kronik oluşu ile embriyonun göstereceği adaptasyon belirler (Kabukçuoğlu ve ark., 1999). Morfogenez; hücre göç hareketleri ile organ ve sistem taslaklarının oluşması sonucu vücut şeklinin ortaya çıkması faaliyetleridir. Hücre hareketleri, hücrelerin birbirleriyle etkileşime girerek organ ve dokuların farklılaşmasını sağlayan temel etkidir (Seçkin ve ark., 2008).

Organogenezis boyunca, vücut şeklinde önemli değişiklikler olmaktadır. Başlangıçta embriyo hemen hemen düzdür ve yüzeyinde 4-12 somit seçilebilir (Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008). Embriyoda 3-4. haftalarda 38 somit çifti bulunuyorken, 5. haftanın sonunda 42-44 somit çifti gözlenir (Seçkin ve ark., 2008). 24. günde embriyoda birinci ve ikinci farengial arkuslar belirir. Bu aşamada kalp

ventralde büyük bir çıkıntı şeklinde bulunur ve kan pompalama işlemini yapar. 26-27. günlerde üst ekstremite tomurcukları, vücudun ventrolateral duvarında küçük şişkinlikler şeklinde görülür. 8. haftanın sonunda, ekstremitelerin hatları belirgin, parmaklar uzamış ve birbirlerinden ayrılmış (Başaklar ve Sönmez, 1996) ve embriyo tümüyle insan görünümünü almış olur. Ancak, baş hala orantısız olup embriyonun yarısı kadar büyüklüğe sahiptir. Boyun bölgesi gelişir ve göz kapakları belirginleşir (Seçkin ve ark., 2008).

Embriyonik dönemde damar sisteminin oluşumu vaskülogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki süreci içerir (Seçkin ve ark., 2008). Vaskülogenez; anjioblastlar denilen özel hücre öncüllerinin bir araya gelmesi ile yeni vasküler kanalların oluşumunu, anjiogenez ise önceden var olan damarların tomurcuklanarak ya da dallanarak yeni damar oluşum sürecini ifade eder (Rossant ve Howard, 2002; Seçkin ve ark., 2008). Üçüncü haftanın başında umbilikal kesenin ekstraembriyonik mezoderminde, bağlantı sapında ve koryonda gerçekleşen vaskülogenez ve anjiyogenezi, embriyonik kan damarlarının gelişimi izler. Kardiyovasküler sistemin diğer organ sistemlerine göre daha erken oluşumu ovum ve umbilikal kesede yeterli besinin bulunmaması, plasenta aracılığı ile anne dolaşımından oksijen ve besin maddelerinin taşınması için kan damarlarına acil gereksinim duyulmasından kaynaklanmaktadır (Seçkin ve ark., 2008; Moore ve Persaud, 2009). Üçüncü haftada primordiyal uteroplasental dolaşım başlar. Tübüler kalp; bağlantı sapı, koryon ve umbilikal kesesindeki kan damarları ile birleşerek primordiyal kardiyovasküler sistemi oluşturur (Demir, 1995; Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008).

f) Embriyonik Gelişimin Kontrolü

Embriyonik gelişim sürecinde gerçekleşen dokular arası etkileşim; hücre kolonilerinin düzenli göçü, kontrollü çoğalması ve programlı hücre ölümleri ve çeşitli kontrol mekanizmalarının öncülüğünde gerçekleşmektedir. Embriyonik gelişme; temel olarak bir büyüme süreci olup, tüm yapı ve fonksiyonları geliştirmeye yönelik işlemektedir (Seçkin ve ark., 2008). Embriyonik sürecin erken dönemlerinde rol alan hücreler, çok yönlü gelişim gösterme yeteneğindedirler. Bu gelişme potansiyeli, dokuların özelleşmiş yapı ve fonksiyonlara sahip olabilmesini sağlama bakımından önemlidir (Moore ve Persaud, 2009).

Dokular ve hücreler arasında oluşan etkileşimler; çeşitli sinyal iletim sistemleriyle oluşmakta ve sinyal iletim sistemleri buldukları dokuya göre farklılık göstermektedir. Sinyal iletimi, sinyal moleküllerinin moleküler mekanizma ile uyarıcı hücreden uyarılana geçmesiyle gerçekleşir. Hücreler arası etkileşimler, her ne kadar farklı ekstra ve intersellüler yollarla gerçekleşseler de, hedef hücrenin genetik aktivitesini etkileyerek intersellüler bir mesajın doğmasına neden olurlar. Sinyal sistemindeki ortaya çıkacak herhangi bir gecikme ya da bir anomali hatalı bir indüksiyonun ortaya çıkmasına neden olur. Embriyonik gelişim ve gelişimin kontrolü çeşitli sinyal ileti yolları ile olmaktadır (Moore ve Persaud, 2009). Embriyo gelişiminde ve farklılaşmasında, insülin benzeri büyüme faktörü (ILGF-1), epidermal büyüme faktörü (EGF), aktivin, FGF, transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α) ve morfogon benzeri moleküller rol almaktadır (Kabukçuoğlu ve ark., 1999). Embriyonik gelişim süreci; birçok hücre göçünü, etkileşimini, farklılaşmasını ve moleküler sinyal iletimini kapsamı bakımından, en hassas gelişim süreci olmaktadır. Bu dönemi olumsuz etkileyen etkenler, çoğunlukla embriyoda önemli konjenital anomalilere neden olabilmektedir. Embriyonik gelişim, hücre göçlerinin yanı sıra, morfogonlar, notch, transkripsiyon faktörleri ve reseptör tirozin kinazlar gibi sinyal ileti sistemleri tarafından düzenlenmektedir (Moore ve Persaud, 2009; Perrimon ve ark., 2012).

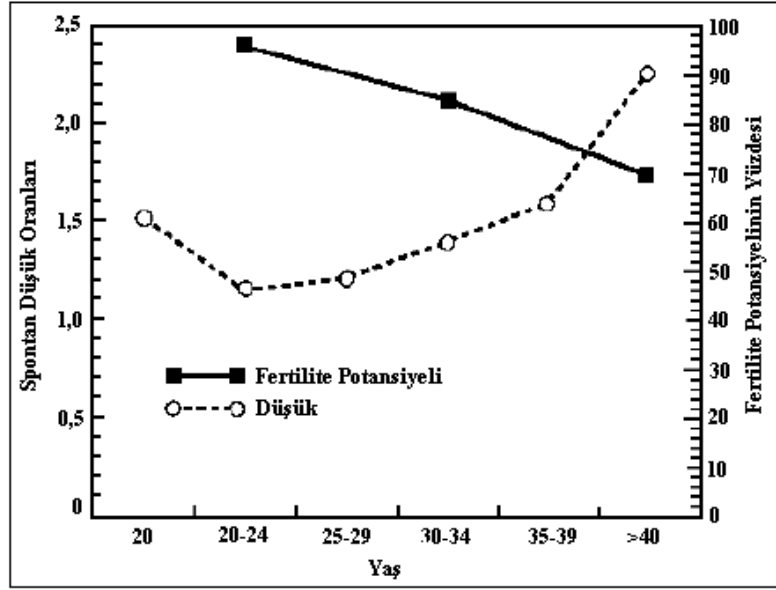
2.1.2. Fetal Dönem

Doku ve organların olgunlaşması ile karakterize üçüncü aydan sonraki dönem fetal dönem olarak adlandırılır (Desdicioğlu ve Malas, 2006). Fetal dönemin başında meydana gelen önemli gelişmelerden biri, 9. haftanın sonuna kadar benzer görünen erkek ve dişi dış genital organlarının olgun fetal şekillerine 12. haftanın sonunda ulaşmasıdır (Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008). Fetal iskeletin ve özellikle kafatası ve uzun kemiklerin primer kemikleşme merkezlerinin belirmesi, 12. haftanın sonundan itibaren görülmektedir. İkinci trimester süresince fetüs gelişimi hızlı olup vücut ağırlığında önemli artış gözlenir. 16. haftada fetüs başının bedene oranı, 12. haftadaki oran ile karşılaştırıldığında, nispeten küçüktür (Başaklar ve Sönmez, 1996; Seçkin ve ark., 2008; Moore ve Persaud, 2009). Fetal dönemde gözlenen en belirgin gelişme, bütün vücut dikkate alındığında, baş büyümesinin göreceli olarak yavaşlama göstermesidir (Seçkin ve ark., 2008; Moore ve Persaud, 2009). Fetüs radyasyona, virüslere ve ilaçların teratojenik etkilerine, diğer iki trimestere göre, daha az duyarlı

olmaktadır. Bu durum, embriyonal ve fetal gelişmenin, 1. ve 2. trimesterde teratojenik etkenlere karşı ne denli duyarlı olduğunu göstermektedir.

2.2. Düşük

Klinik olarak tanımlanan gebeliklerin %10-15'inin spontan düşük ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Yakut ve ark., 2002; Wold ve ark., 2006; Ambartsumyan ve Clark, 2008; Zhang ve ark., 2009; Van den Berg ve ark., 2012). Spontan düşüklere, jinekolojik bir problemden olduğu kadar (Moore ve Persaud, 2009), sosyal ve ekonomik problemlerden de kaynaklanabilmektedir (Bulletti ve ark., 1996). 500 gr. ya da daha az ağırlığa sahip 3 veya daha çok gebeliğin sonlanması tekrarlayan düşük olarak tanımlanmıştır. Kadınların yaklaşık %1-3'ünün tekrarlayan düşük yaptığı tespit edilmiştir (Cramer ve Wise, 2000; Ward, 2000; Carrington ve ark., 2005; Wold ve ark., 2006; The ESHRE Capri Workshop Group, 2008; Marquard ve ark., 2010; Rajcan-Separovic ve ark., 2010; Saini ve ark., 2011). Bazı kaynaklar ardışık 2 ya da daha fazla gebeliğin spontan sonlanmasını tekrarlayan düşük olarak tanımlamıştır (Fabro ve ark., 2011). 12. gestasyonel haftadan önce gerçekleşen düşüklere erken düşükler ve 12. gestasyonel haftadan sonra gerçekleşen düşüklere de geç düşükler denmektedir (Carrington ve ark., 2005). Özellikle 30-35 ve üstü yaş grubu kadınlarda fertilité potansiyeli azalırken, spontan düşük riskinin artış gösterdiği tespit edilmiştir (Bulletti ve ark., 1996; Andersen ve ark., 2000; Marquard ve ark., 2010) (Şekil 4). Stres ve sigaranın da düşük riskini artırdığı bildirilmiştir (Bulletti ve ark., 1996). Tekrarlayan spontan düşükler etiopatogenez, klinik yönetim ve tedavi açısından ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle, 2 ya da 3 ardışık düşükle karşılaşıldığında, düşüğe neden olan etkenlerin belirlenmesi için tanısal uygulamalar zorunlu görülmüştür. Ancak, ardışık düşüklerden sonra yapılan tanısal uygulamaların, ileri anne yaşına bağlı fertilité sorunu da göz önüne alındığında, gerekli tedavinin gecikmesine neden olduğu ileri sürülmüştür (Bulletti ve ark., 1996; Yaşar, 2006).



Şekil 4. Düşük ve fertilité potansiyelinin yaşa bağılı oranlarıyla ilgili grafik (Bulletti ve ark., 1996'dan uyarlanmıştır)

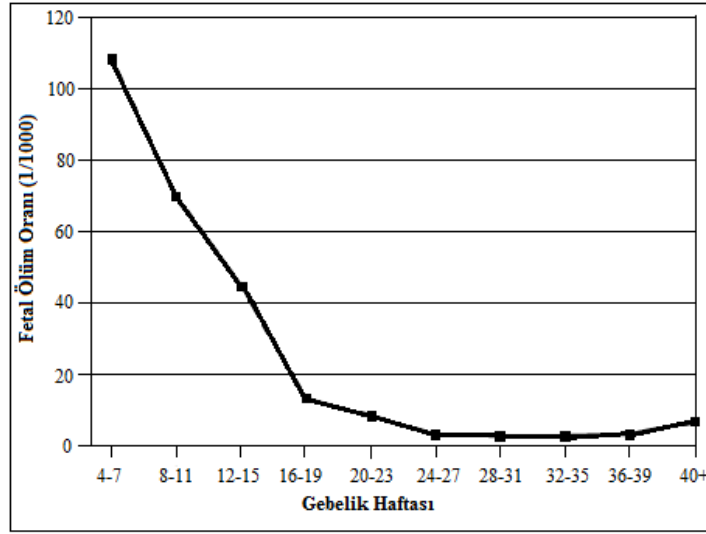
2.2.1. Epidemiyoloji

Üremenin verimliliği ve sürekliliği tartışma götüren bir konudur. Menstrual siklus aralarında yeterli cinsel temas sağlandığında, gebelik oranının %66'ya ulaştığı ve mevcut gebeliğin sonlanma ihtimalinin %8 ile %52 arasında değiştiği bildirilmiştir (Bulletti ve ark., 1996). Klinik açıdan belirlenen gebeliklerin %10-15'i spontan düşükle sonuçlanırken (Wold ve ark., 2006; Marquard ve ark., 2010), kadınların %25'inin en az bir düşük ve %5'inin ise tekrarlayan düşük yaptığı ileri sürülmüştür (Van den Berg ve ark., 2012). İlk gebelikte düşükle karşılaşma riskinin %10, ilk gebeliği düşükle sonuçlanan bir kadının ikinci gebeliğinde düşükle karşılaşma riskinin %24, ilk iki gebeliği düşükle sonuçlanan bir kadının üçüncü gebeliğinde düşükle karşılaşma riskinin %26 ve dördüncü gebelikteki riskinin ise %32 olduğu saptanmıştır (Regan ve ark., 1989). Risk taşımadığı bilinen 200 kadında fertilité ve düşük oranını değerlendirmek amacıyla yapılan bir araştırma, fertilité oranını %62,5 ve düşüklerin yarısının biyokimyasal düşüklerden oluştuğunu göstermiştir (Bulletti ve ark., 1996).

Tüm popülasyonlarda ileri yaşa bağılı olarak konsepsiyonda azalma, düşükte artış ve fertilitéde düşme olmaktadır (Bulletti ve ark., 1996; Andersen ve ark., 2000). 20-24 yaş grubu bin kadında 250-560 doğum ve 40-44 yaş grubu bin kadında ise 70-200 doğum gerçekleştiği bir araştırma sonucuyla tespit edilmiştir (Bulletti ve ark., 1996).

Buna karşın, düşük oranının, 20-24 yaş grubu kadınlarda %12 ve 40 ve üzeri yaş grubu kadınlarda ise %26 olduğu saptanmıştır (Andersen ve ark., 2000; Cramer ve Wise, 2000). Koitus sıklığında ve ovulasyonda azalmanın, düşük sıklığında ve oositlerde kromozomal abnormalite artışının gerçekleştiği ve yaşa bağlı pelvik hastalıklarla birlikte fertilitenin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Bulletti ve ark., 1996). Biyokimyasal incelemeler sonucu belirlenen spontan düşük oranının %22-31 arasında değişkenlik gösterdiği, gebeliğin ilk ayında gerçekleşen ve klinik açıdan belirlenemeyen düşükler de dikkate alındığında, bu oranın %60-78'e ulaştığı tespit edilmiştir (Taşhan, 2007). Bu nedenle, embriyo implante olmadan, özellikle implantasyon bölgesinin mikrovasküler yapılarına koryonik gonadotropin salınımı başlamadan önce, kaybedilen embriyoya spontan düşük denmektedir (Bulletti ve ark., 1996).

Gebeliklerin %60-70'inin doğuma ulaşmadan düşükle sonuçlandığı ve düşüklerin %50-60'ının da ilk ayda fark edilmeden gerçekleştiği ileri sürülmektedir. 40 ve üzeri yaş grubu kadınlarda spontan düşüklerin 2-3 kat artış gösterdiği ve kromozomal abnormalite riskinin arttığı tespit edilmiştir (Bulletti ve ark., 1996). Özellikle 9. gestasyonel haftaya ulaşmadan düşükle sonuçlanan gebeliklerin önemli bir kısmının kromozomal abnormalitelerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Cramer ve Wise, 2000). 12. gestasyonel haftaya kadar gerçekleşen düşüklere ve 12. gestasyonel haftadan sonra gerçekleşen düşüklere neden olan etkenlerin farklılığı dikkate alınıp düşüklerin ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiği ileri sürülmüştür (Bulletti ve ark., 1996) (Şekil 5).



Şekil 5. Gebelik haftalarına göre fetal ölüm oranlarını gösteren grafik (Michels ve Tiu, 2007'den uyarlanmıştır)

2.2.2. Etiyoloji

Üreme fizyolojisini olumsuz yönde etkileyen pek çok etken düşüğe neden olabilmektedir (Warren ve Silver, 2008). Etiyolojinin irdelenmesi, tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ile gebeliğin devamını sağlama açısından önemli görülmektedir (Bulletti ve ark., 1996). Spontan düşüklere; genetik abnormaliteler, uterus abnormaliteleri, endokrin ve immünolojik sebepler, enfeksiyonlar ve çevresel faktörler gibi farklı etkenler neden olabilmektedir (Warren ve Silver, 2008). Parental kromozom analizleri, maternal hormon değerlendirmeleri, uterus abnormaliteleri ve genital sistem kültürleri çiftlerin %60'ında düşük nedenlerini ortaya koymaktadır. Blastosistin implantasyonu; pre-desiduanın olgunlaşması ile uterus içi sıvı kompozisyonunun uyumlu olması durumunda gerçekleşmektedir (Bulletti ve ark., 1996). Parazzini ve ark. (1991), spontan düşüklere ve ailenin tekrarlayan düşük öyküsü arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüştür. İlk menarş yaşının düşüğe neden olan önemli bir etken olduğu bildirilmiştir (Bulletti ve ark., 1996). İmplantasyon aşamasında ortaya çıkan fiziksel problemlerin gebeliğin oluşumunu ve devamını etkilediği tespit edilmiştir (Coste ve ark., 1991; Bulletti ve ark., 1996). Aşırı kahve kullanan kadınlarda spontan düşük riskinin %70 olduğu gösterilmiştir (Parazzini ve ark., 1991; Bulletti ve ark., 1996). Taskinen ve ark. (1994), gebelik sürecinde toluen, ksilen ve formalin gibi kimyasallara maruz kalmanın spontan düşüğe neden olduğunu saptamışlardır. Gebelik öncesinde ve gebelik sürecinde

maternal kan folat seviyesindeki düşüşlerin de spontan düşüklere yol açtığı kanaatine varılmıştır (Bulletti ve ark., 1996).

a) Anatomik Uterus Anomalileri

Tekrarlayan düşüklere olan kadınlarda %15-30 oranında anatomik uterus abnormalitesi olduğu rapor edilmiştir (Bulletti ve ark., 1996; Propst ve Hill, 2000; Srinivas ve Rajangam, 2001). Konjenital müllerien anomalilerin, submüköz ve intramural miyomların, uterus malpozisyonlarının, geçirilen operasyonlar sonucu uterus duvarında oluşan skarların, uterus sineşilerinin, anatomik veya servikal yetmezliklerin de düşüklere neden olduğu bildirilmiştir (Bulletti ve ark., 1996; Cramer ve Wise, 2000; Srinivas ve Rajangam, 2001; Wold ve ark., 2006).

b) Endokrin Etkenler

Progesteron, gebeliğin sürdürülmesinde gerekli olan bir hormondur. Korpus luteumun yetersizliği sonucu gerçekleşen luteal faz bozukluklarının tekrarlayan düşüklere yol açmaması için progesteron kullanılmaktadır. Progesteron ve hCG konsantrasyonu ile gebeliğin sonlanması arasında önemli bir ilişki olmamasına rağmen, kadınlarda yetersiz üretilen progesteronun düşük oluşumu üzerine muhtemel bir moleküler etkisi bulunduğu bildirilmiştir (Bulletti ve ark., 1996). LH konsantrasyonundaki artışın düşük oluşumuna katkı sağlaması yanında, fertilité potansiyeli ve gebeliğin sürdürülmesi üzerine olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Stanger ve Yovich, 1985). Polikistik over sendromlu kadınlar folliküler faz LH artışının konsepsiyonu azalttığı, erken dönemde düşüğe neden olabildiği bildirilmiştir. Buna karşın, tekrarlayan düşük yapan kadınların %82'sinin polikistik over sendromu olduğu ve serum LH konsantrasyonunun normal sınırlarda olduğu saptanmıştır (Bulletti ve ark., 1996). LH hipersekresyonunun, testesteron ile östrojen konsantrasyonunu arttırarak, oositin ve endometriyumun gelişmesini olumsuz etkilediği saptanmıştır (Bulletti ve ark., 1996, Saini ve ark., 2011).

Polikistik over sendromunun (PCOS); ilk trimesterde gerçekleşen düşüklere %20 ile %50'sinden sorumlu olduğu tespit edildiği halde, patofizyolojisi ile ilgili mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır (Cramer ve Wise, 2000; Carrington ve ark., 2005). Diğer yandan, LH ve testesteron konsantrasyonları ile polikistik over sendromunun tekrarlayan düşüklere olan kadınların gebelik kayıplarını izah etmede bilgi

verici olmadığı da ifade edilmiştir. Tekrarlayan düşükleri olan kadınların %27'sinde ve normal kontrollerin %9,5'unda insülin direnci saptanmış ve PCOS'lu kadınlardaki insülin direnci ile düşükler arasında bir ilişki olduğu kanaatine varılmıştır. Hiperinsülinemi, endometriyal fonksiyonu etkilemekte ve endometriyal iki temel protein olan glikodelin ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlama proteininin (ILGF-BP1) konsantrasyonunda azalmaya sebebiyet vermektedir (Carrington ve ark., 2005).

c) İmmünolojik Etkenler

Fetüsün paternal antijenleri anne immün sistemi tarafından yabancı kabul edilmesine karşın, gestasyonel periyodun başlangıcından itibaren fetüs, anne uterusunda normal gelişimini sürdürmektedir (Saini ve ark., 2011). İmplantasyon tamamlandığında, anne ve embriyo arasında kan alışverişini sağlayacak vasküler yapıların gerçekleşmesi aşamasında ortaya çıkan hücrel ve humoral cevabın da düşüğe neden olduğu ifade edilmiştir. Lökositler, endometriyal ve desidual tabakada yerleşen hücreler içerisinde en önemli hücre grubudur (Bulletti ve ark., 1996). Bulmer ve ark. (1991)'nın lökositlerin endometriyal ve desidual yerleşimini araştırmak üzere yaptıkları bir çalışma, desiduanın immünosupresif aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Maternal-embriyonik ilişki münasebetiyle dokuların farklılaşması, desidual endometriyal granüllü lenfositlerin sitümülasyonunu sağlar. Granüllü lenfositlerin sitümülasyonu; **i**) maternal bağışıklık sistemine fetal antijenleri tanıtarak embriyoyu immün rejeksiyondan korur, **ii**) doğal öldürücü hücreler aracılığıyla ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) tarafından tanımlanan maternal immün cevabı baskılayabilen lokal çözünebilir faktörlerin üretimini sağlar. Koruyucu immünosupresif faktör üretiminin ya da diğer sitokin aktivitelerinin engellenmesinin, düşük oluşumunu engellediği düşünülmüştür. Normal gebelik sürecinin ilk trimesterinde paternal antijenlere karşı maternal immünglobulin (Ig) G antikoru sentezlenir. Maternal IgG'nin yüksek oranda üretilmesi düşüğe neden olduğu gibi, kompleman sisteminin aktive olmasının da erken düşüğe neden olduğu tespit edilmiştir. Antifosfolipid antikoru, lupus antikoagulantı (LAC) ve antikardiyolipin (ACL) varlığında otoimmün cevapların ortaya çıktığı ve özellikle IgA gibi antifosfolipid antikoruların tekrarlayan düşüklere neden olduğu bildirilmiştir. Antifosfolipid antikorularının anneden fetüse pasif taşınmasıyla oluşan antifosfolipid sendromunun (APS); prostasiklin inhibisyonu, vazokonstriksiyon, platelet agregasyonu, tromboz, fibrinolitik ve antitrombin aktivitesinde azalma ve venöz plazminojen

aktivatörünün inhibisyonu mekanizmasıyla düşüğe neden olduğu tespit edilmiştir (Bulletti ve ark., 1996).

d) Enfeksiyöz Etkenler

İlk trimesterde gerçekleşen tekrarlayan düşüklerin maternal ya da fetal enfeksiyonlarla ilişkisi henüz açıklanabilmiş değildir. Koryonik villus biyopsileri sonucu gerçekleşen enfeksiyonlar düşük riskini artırmasına rağmen, aslında riskin servikste bakteriyel kolonizasyondan kaynaklandığına vurgu yapılmıştır (Bulletti ve ark., 1996; Cramer ve Wise, 2000). Buna karşın, maternal insan immün yetmezlik virüsü-1 (HIV-1) antikörlerinin, maternal sifiliz serum aktivitesinin ve vajinal B grubu streptokok enfeksiyonunun spontan düşüklere neden olduğunu bildiren araştırmalarda da bulunmaktadır (Bulletti ve ark., 1996; Desdicioğlu ve Malas, 2006). Bununla birlikte, genital mikoplazma enfeksiyonlarının desidual ve plasental dokuların akut inflamasyona neden olmak suretiyle, ilk trimesterde düşüğe neden olduğu ifade edilmiştir (Lathi ve ark., 2011).

e) Diğer Etkenler

Intrauterin gelişme geriliğine neden olan etkenler arasında sigara kullanımının da önemli yer tuttuğu şüphesizdir. Gebelik süresince sigara kullanan kadınların düşük doğum ağırlıklı bebekler doğurduğu ve yetersiz beslenmeyle birlikte sigara kullanımının daha ağır sonuçlara yol açtığı belirtilmiştir. Alkol bağımlılığının, fetal alkol sendromuna yol açmak suretiyle, intrauterin gelişme geriliğine neden olduğu tespit edilmiştir (Cramer ve Wise, 2000; Desdicioğlu ve Malas, 2006; Moore ve Persaud, 2009). İlaç ve uyuşturucu bağımlılığının da intrauterin gelişme geriliğine, düşüğe ve diğer obstetrik komplikasyonlara yol açtığı vurgulanmıştır (Desdicioğlu ve Malas, 2006; Moore ve Persaud, 2009). Clark ve ark. (1993), tedavide kullanılan ribavirinin düşüğe, embriyonik gelişme geriliğine ve trofoblast hipoplazisine neden olduğunu göstermişlerdir. Genetik, anatomik, immünolojik, endokrin ve enfeksiyöz etkenler yanında, psikolojik etkenlerin de spontan düşüklere neden olduğu rapor edilmiştir (Bulletti ve ark., 1996).

f) Genetik Etkenler

Spontan düşüklere neden olan önemli etkenlerden biri de kromozomal abnormalitelerdir. Anöploidilerin, translokasyonların ve diğer yapısal abnormalitelerin analizi, spontan ve tekrarlayan düşüklerin nedenini açıklamaya katkı sağlamaktadır.

Tekrarlayan düşüklerin genetik temelini anlaşılmada sitogenetik yöntemler tek başına yetersiz kalmaktadır. Ayrıca, maternal kontaminasyon nedeniyle değerlendirilen düşük materyallerinde yanlış sonuçlara varılması mümkün olmaktadır. 1990'lı yıllardan sonra tekrarlayan düşüklerin değerlendirilmesiyle ilgili yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden floresan in-situ hibridizasyon (FISH) yöntemi, kültüre edilemeyen dokuların analizine de olanak tanımıştır. Tanı yöntemlerinin gelişmesi, spontan ve tekrarlayan düşüklerde anöploidilerin rolünün anlaşılmasını kolaylaştırmıştır. Moleküler analiz yöntemleri de tek gen mutasyonlarının, X inaktivasyonunun ve imprinting olgusunun etki ve sonuçlarını ortaya koymayı sağlamıştır. Tekrarlayan düşükler hakkında edinilecek aşamalı bilgi birikimi, çok amaçlı tanısal imkanları beraberinde getirecektir (Ward, 2000).

Tek Gen Mutasyonları: Tek gen mutasyonlarının neden olduğu metabolik hastalıklar, hemoglobinopati ve trombofili gibi belirli hastalıkların da düşüklere yol açtığı ifade edilmiştir (Warren ve Silver, 2008). Bu nedenle, moleküler genetik yöntemlerinin, üreme genetiği ile tekrarlayan düşüklere neden olan mekanizmaların anlaşılmasında köklü yararlar sağlayacağı beklenmektedir. Tek gen mutasyonlarının, X inaktivasyonunun, imprinting olgusunun ve trombofiliye neden olan mutasyonların anlaşılması ile düşüğe neden olan mekanizmaların çözümlenebileceği kanaatine varılmıştır. Bazı maternal faktörlerin plasentada pıhtılaşmaya neden olup kan akımını engellemek suretiyle fetal ölümlere ve düşüklere neden olduğu tespit edilmiştir (Ward, 2000). Hiperkoagulasyona meyilli maternal kan, villöz trofoblastların belirli alanında çok yavaş bir şekilde geçerken, fetal damarlarda oluşan trombozis plasental diskte ciddi infarktlara neden olabilmekte ve uteroplental yetersizlik de trofoblast fonksiyonlarını etkileyerek plasentada fibrin birikimini tetiklemektedir. Protein S eksikliği, antitrombin III eksikliği ve aktive protein C direnci plasental pıhtılaşmaya neden olmaktadır (Ward, 2000; Carrington ve ark., 2005). Pıhtılaşmanın nedenlerinden biri faktör V Leiden (FVL) mutasyonudur (Carrington ve ark., 2005). Leiden mutasyonu, faktör V geninin 1691. nükleotidindeki değişiklik sonucu oluşmakta ve aktive edilmiş protein C'nin proteolitik inaktivasyonuna ve dirençli faktör V proteininin sentezine neden olmaktadır (Ward, 2000). Tekrarlayan düşükleri olan kadınlar üzerinde yapılan bir araştırma, canlı doğum oranının FVL mutasyonuna sahip kadınlarda, normal kadınlara göre, önemli oranda düşük olduğunu göstermiştir (Carrington ve ark., 2005). Meinardi ve ark.

(1999)'nın faktör V mutasyonunun düşükle ilişkisini saptamak amacıyla yaptığı bir araştırma, faktör V mutasyonunun venöz tromboembolizmin nedeni olduğunu göstermiştir. Dünya sağlık örgütü, FVL mutasyonunu taşıyanların taşımayanlara göre daha fazla düşük ve ölü doğum riskine sahip olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) geni C677T mutasyonunun tekrarlayan düşükler için ciddi bir risk olduğu gösterilmiştir (Ward, 2000).

Sınırlı Plasental Mozaisizm: Sınırlı plasental mozaisizm; plasental ve fetal hücrelerin kromozomal kuruluş bakımından farklılık göstermesidir (Wapner, 2005; Warren ve Silver, 2008). İlk trimester koryonik villusların %1-2'sinin fetüs karyotipinden farklı olduğu saptanmıştır (Ward, 2000; Wapner, 2005). Koryonik villuslarda bulunan anormal karyotip, fetüs normal olsa bile, plasental fonksiyonu bozarak spontan düşüğe ve ölüme neden olabilmektedir. Sınırlı plasental mozaisizmden kaynaklanan plasental fonksiyon bozukluğu, intrauterin gelişme geriliğine, amniyon sıvısının azalmasına ve prenatal kayıplara neden olabilmektedir (Ward, 2000). Kalousek ve ark. (1996), 54 spontan düşük üzerinde yaptıkları bir araştırma ile sınırlı plasental mozaisizmin erken düşüklere neden olduğunu göstermişlerdir.

Kromozomal Abnormaliteler: Spontan düşüklerin %50-70'inde kromozomal abnormalite saptandığı ifade edilmiştir (Rajcan-Separovic ve ark., 2010). Spontan düşük materyallerinde görülen abnormalitelerin; %60'ının otozomal trizomiler, %20'sinin monozomi X ve %20'sinin de poliploidiler olduğu bildirilmiştir (Warren ve Silver, 2008). Bununla birlikte, spermilerin %10'unda ve oositlerin de %20'sinde kromozomal abnormalitelerin olduğu tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2009).

Anöplidiler

Anöplidilerin, spontan düşüklerin %50'sinden ve tekrarlayan düşüklerin de daha fazlasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Cramer ve Wise, 2000; Ward, 2000; Carp, 2008). Genel olarak monozomiler embriyo ya da fetüs için letal etki gösterirken, bazı trizomilerin hayatla uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Ward, 2000). Düşük materyallerinde en sık gözlenen trizominin 16. kromozom trizomisi olduğu ve tüm trizomiler içindeki oranının da %20-30 olduğu belirtilmiştir (Warren ve Silver, 2008).

Yapısal Kromozom Abnormaliteleri

Spontan düşüklerin %2'sinin translokasyon, inversiyon, delesyon ve duplikasyon gibi yapısal kromozom abnormalitelerinden kaynaklandığı ifade edilmiştir (The ESHRE Capri Workshop Group, 2008). Gebeliğin erken döneminde tekrarlayan düşüklerinin en yaygın nedenin de translokasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Dengeli translokasyon taşıyıcılarının belirlenmesi, normal fenotipe sahip olunması nedeniyle, özel bir çalışmayı gerektirmektedir. Dengeli translokasyonlara tekrarlayan düşükleri veya infertilite problemleri olan çiftlerde sıkça rastlanmaktadır. Delesyon, duplikasyon veya translokasyonların gen yapısını bozarak düşüğe neden olduğu bilinmektedir (Ward, 2000; The ESHRE Capri Workshop Group, 2008).

Submikroskopik Kromozom Abnormaliteleri

Moleküler genetik yöntemlerle saptanan mikrolelesyonlara ve mikroduplikasyonlara submikroskopik kromozomal abnormaliteler denmektedir. Etiyolojisi bilinmeyen gelişme yetersizliğine sahip hastalarda mikrolelesyon ve mikroduplikasyon oranının %10-20 ve düşük materyallerinde ise %1-13 olduğu saptanmıştır (Rajcan-Separovic ve ark., 2010; Robberecht ve ark., 2012; Van den Berg ve ark., 2012). Nedeni bilinmeyen mental retardasyonlu hastalar ile farklı kliniği olan ve normal karyotipli hastalarda subtelomerik delesyon ve duplikasyonlar %7 oranında saptanmıştır (Warren ve Silver, 2008). Klasik sitogenetik yöntemleri 5 Mb'dan daha büyük kromozomal abnormalitelerin belirlenmesinde yarar sağlarken, 5 Mb'dan daha küçük abnormalitelerin araştırılmasında yetersiz kalmaktadır (Benzacken ve ark., 2002). Submikroskopik abnormalitelerin araştırılmasında FISH, QF-PCR, MLPA ve komperatif genomik hibridizasyon (CGH) yöntemlerinin kullanımının gerekli olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2009; Gao ve ark., 2012). Literatür bilgilerinden; değişik etkenlere bağlı olarak oluştuğu anlaşılan düşüklerin bir kısmının da submikroskopik kromozomal abnormalitelerden kaynaklandığı bilinmektedir. Submikroskopik kromozomal abnormaliteler ya da değişimler; CNV olarak tanımlanmakta ve klinik sonuçlarına göre, patojen ve benign olarak vasıflandırılmaktadır. Patojenik CNV'ler; de novo olup olmasına, delesyon ya da duplikasyondan etkilenen genin fonksiyonuna ve gen bölgesinin büyüklüğüne göre, benign CNV'lerden ayırt edilebilmektedir (Rajcan-Separovic ve ark., 2010; Van den Berg ve ark., 2012). CGH ve MLPA yöntemleri ile hastalık nedeni CNV'ler hakkında bilgi edinilmektedir. Mikrolelesyon ve

duplikasyonların bir kısmının fenotipik bir etkiye neden olmayan polimorfizm örnekleri olduğu ifade edilmiştir (Warren ve Silver, 2008).

Ökaryotik organizmaların lineer kromozom uçlarında yer alan ve özelleşmiş tekrar dizilerinden oluşan heterokromatik bölgelere telomer denilmiştir. Telomerik DNA dizileri, diğer DNA dizilerinden yapı ve işlev bakımından farklılık göstermekte ve önemli bir biyolojik işlevi üstlenmektedir (Atlı ve Bozcuk, 2002). Telomer bölgesinde birbirine bitişik repetitif DNA aileleri bulunmaktadır. Bu bölgede ileri derecede dizi benzerliği bulunmakta ve bu bölgeler diğer bölgelere göre yeniden düzenlenme oranında artış göstermektedir. Kromozomların telomerik ve subtelomerik bölgeleriyle ilgili abnormaliteleri rutin genetik yöntemlerle analiz etmek mümkün olamamaktadır. Bu nedenle, telomerik bölgelerle ilgili yeniden düzenlenmelerin analizi, telomerler için spesifik floresan işaretli problemlerin genomik DNA ile hibridizasyonuna dayalı FISH tekniği ile yapılabilmektedir. Fakat, FISH tekniğinin pahalı oluşu bilim insanlarını, alternatif teknikler geliştirmeye yöneltmiştir. Bu amaçla kullanılan en uygun yöntem MLPA yöntemidir. MLPA yöntemi; hedef DNA'ya bağlanan özgül problemlerin, evrensel primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmasını ve elde edilen ürünlerin miktarsal açıdan karşılaştırılmasını esas almaktadır. Pek çok araştırmacı, MLPA yöntemini kullanarak, özellikle mental retardasyonlu olgularda subtelomerik delesyon ve duplikasyonların varlığını tespit etmişlerdir (Benzacken ve ark., 2002; Monfort ve ark., 2006). Telomer ve subtelomerik bölgeleri tutan CNV'lerin ve translokasyonların düşüğe neden olabileceği iddia edilmişse de (Brackley ve ark., 1999; Wakui ve ark., 1999; Knight ve Flint, 2000; de Vries ve ark., 2001; Benzacken ve ark., 2002; Boehm ve ark., 2004; Alkuraya ve ark., 2006), yeterli sayıda araştırmacının yapılamamış olması konuya ilgiyi arttırmıştır. Düşük materyalleri ile düşükleri olan ailelerde yapılan araştırmalarda gözlenen submikroskopik abnormalitelerle ilgili veriler tablo 1'de sunulmuştur. Kromozomlarının subtelomerik bölgeleriyle ilgili olarak saptanan abnormaliteler, düşükler ile subtelomerik bölge abnormaliteleri arasında bir ilişkinin belirlenmesi çalışmalarına dayanak oluşturmuştur.

Tablo 1. Telomerik ve subtelomerik bölgelerdeki abnormalitelerin düşüklerle ilişkisini gösteren çalışmalar ve sonuçları

| Çalışma | n | n (%) | Saptanan Submikroskopik Abnormaliteler | Çalışma Yöntemi |
|--------------------------|----|-------------|--|---|
| Joyce ve ark., 2002 | 2 | Olgu sunumu | Sitogenetik analizle anne ve bebeğin normal karyotipe sahip olduğu saptanmışken, subtelomerik FISH yöntemi ile annede 11p ve 17p dengeli subtelomerik translokasyonu olduğu ve bebekte ise 17p subtelomerik delesyonu olduğu saptanmıştır. | 8 adet düşüğe sahip bir kadın ve multiple konjenital anomalili bir bebek subtelomerik FISH yöntemi ile analiz edilmiştir. |
| Jalal ve ark., 2003 | 53 | 0 | Herhangi bir subtelomerik abnormalite tespit edilmemiştir. | Tekrarlayan düşüğü olan 53 kadın subtelomerik FISH yöntemi ile analiz edilmiştir. |
| Schaeffer ve ark., 2004 | 41 | 3(7) | 10q telomer bölgesinde duplikasyon, 9p21 delesyonu, 15q telomer bölgesinde duplikasyon saptanmıştır. | 41 örnek aCGH ve sitogenetik yöntemle analiz edilmiştir. |
| Benkhalifa ve ark., 2005 | 26 | 2(8) | 1p terminal bölgesi duplikasyonu ve 22q13 delesyonu saptanmıştır | Kültür başarısızlığı olan 26 örnek aCGH ile analiz edilmiştir. |
| Alkuraya ve ark., 2006 | 2 | Olgu sunumu | Sitogenetik analizle anne ve bebeğin normal karyotipe sahip olduğu saptanmışken, subtelomerik FISH yöntemi ile annenin 10q26.3 ve 17q25 bantları arasında dengeli bir subtelomerik translokasyona sahip olduğu ve bebeğin ise 10q26.3 subtelomerik bölge monozomisine, 17q25 subtelomerik bölge trizomisine sahip olduğu saptanmıştır. | 3 düşük yapmış bir kadın ile mutiple konjenital anomalili erkek çocuğu subtelomerik FISH yöntemi ile analiz edilmiştir. |
| Al-Zahrani ve ark., 2011 | 1 | Olgu sunumu | Sitogenetik analizle anne ve bebeğin normal karyotipe sahip olduğu saptanmışken, aCGH yöntemi ile annenin normal olduğu ve çocuğun 12q telomer bölgesi yakınında bir delesyona sahip olduğu saptanmıştır. | 2 düşüğü olan bir aile ile gelişim geriliği bulunan bir kız çocuğu aCGH ve MLPA yöntemi ile analiz edilmiştir. |

3. MATERYAL VE METOT

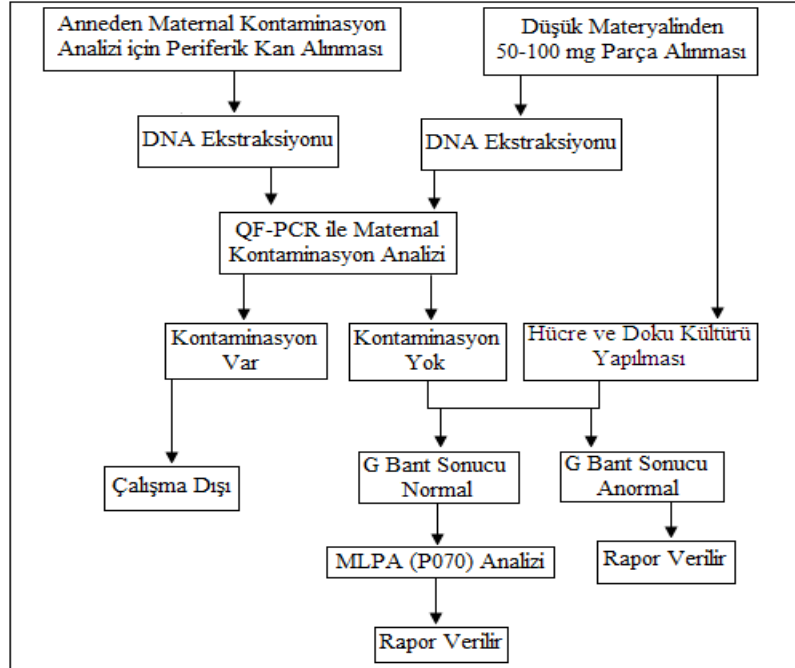
3.1. Araştırma Grubu ve Biyolojik Örnekler

Bu araştırma; düşük materyallerinde klasik sitogenetik yöntemlerle saptanamayan, kromozomların subtelomerik bölgeleriyle ilgili mikrodelyasyon ve mikroduplikasyon gibi abnormalitelerin MLPA yöntemiyle araştırılması ve tekrarlayan düşüklüğü olan çiftlerde düşüğe neden olan genetik etkenin saptanması ve elde edilen verilerin prenatal tanı çalışmalarına uyarlanarak mikroabnormalitelerin prenatal tanı aşamasında saptanması amacıyla, 2011-2012 yılları arasında, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı Laboratuvarına, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalından gönderilen toplam 60 düşük materyali (araştırma grubu), düşük yapmış anneler ve düşük öyküsü olmayan sağlıklı çocuk sahibi 20 sağlıklı birey (kontrol grubu) üzerinde gerçekleştirildi. Laboratuvarımıza gönderilen 60 düşük materyalinden koryonik villuslar ayrıştırılarak hücre kültürü ile DNA izolasyonu yapıldı. Düşük materyallerinin doğası gereği maternal hücre kontaminasyon riskini taşıması nedeniyle, düşük yapmış annelerin periferik kanından izole edilen DNA örnekleri ile düşük materyallerinden izole edilen DNA örnekleri QF-PCR yöntemi ile karşılaştırılarak, maternal kontaminasyon analizi yapıldı. Maternal kontaminasyon saptanmayan ve pıhtılaşma problemi de olmayan 30 düşük materyalinin DNA örnekleri ile kontrol grubuna ait DNA örnekleri subtelomerik MLPA yöntemiyle araştırıldı. Araştırmaya alınan düşük yapmış anneler ve kontrol grubu yapılacak işlemlerle ilgili olarak bilgilendirildi ve hazırlanan onay formları imzalandı. Bu araştırmanın gerçekleştirilmesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Araştırma Etik Komisyonunun OMÜ-TAEK 2010/43 nolu kararıyla uygun görülmüştür. Araştırma, şekil 6'da sunulan planda belirtilen çalışma akışına göre yürütüldü.

3.2. Gereçler

- Buzdolabı (Arçelik NoFrost)
- CO₂ İnkübatörü (Thermo Scientific, Heracell 240i)
- CO₂ İnkübatörü (Heraeus)
- Dijital Isı Bloğu (VWR Digital Heatblock)
- Diseksiyon Mikroskobu (Nikon)
- Görüntü Analiz Sistemi (Cytovision)
- Işık Mikroskobu (Olympus CX31)

- Kapiller Elektroferez Sistemi (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer)
- Kültür Flaskı (Falcon)
- Kültür Tüpü (Greine bio-one)
- Lam (Menzel-Glaser)
- Lamel (Deckglaser)
- Lamin Air (Holten HV2436)
- Lamin Air (Nuair Class II Type Biological Safety Cabinets)
- Manyetik Karıştırıcı (IKAMAG)
- Mikro Santrifüj (Nüve NF048)
- Pipetör (CAPP)
- Pipetör (Pipet4U)
- Santrifüj (Nüve NF1000R)
- Santrifüj (Sigma 3-15)
- Spektrofotometre (Jenway Genova Nano)
- Stereo Mikroskop (Zeiss Axiovert 100)
- Thermal Cyler (Applied Biosystems GeneAmp 9700 PCR System)
- Vorteks (Clifton Cyclone)
- Vorteks (Boeco)



Şekil 6. Araştırma sürecinde takip edilen çalışma akış planı

3.3. Koryonik Villus Kültürü

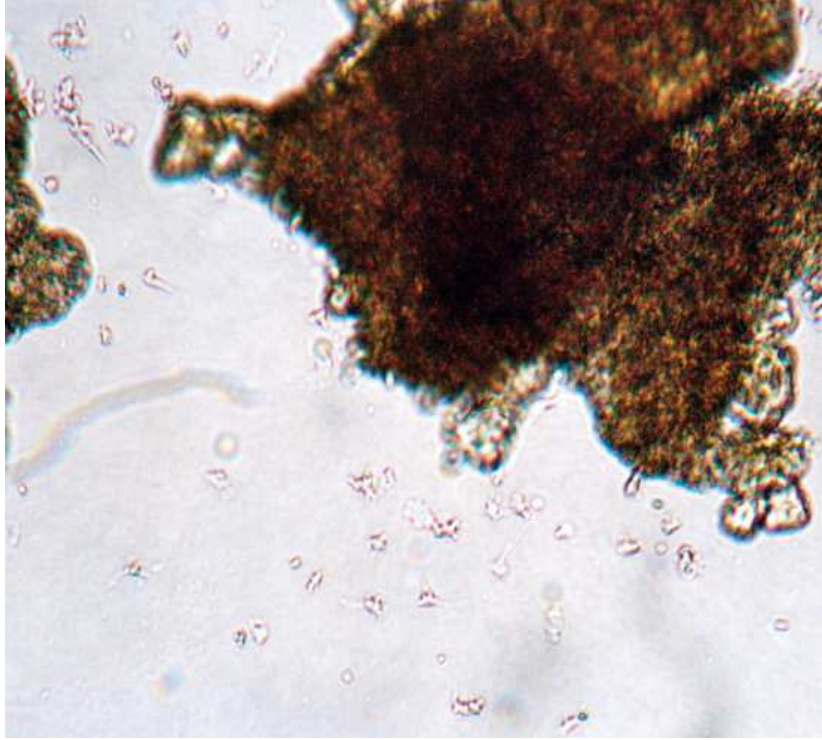
Maternal hücre kontaminasyon riskinin daha az olması nedeniyle düşük materyallerinden uzun süreli kültür yapılmıştır (Van den Berg ve ark., 2000). Küretaj işlemleri Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanları tarafından yapıldı. Düşük materyalinden koryonik villusların ve ilgili fetal yapıların ayrıştırılması, stereo mikroskobu altında gerçekleştirildi. Düşük materyallerinin uygun şartlarda laboratuvara ulaştırılması için, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Doğumhane ve Ameliyathane bölümlerine, 10 ml. RPMI 1640 içeren steril transport tüpleri bırakıldı. Steril şartlar altında alınan düşük materyalleri, steril transport tüpleri içinde laboratuvara ulaştırıldı. Hücre kültürü yöntemi aşağıdaki aşamalara bağlı kalınarak gerçekleştirildi.

1. Laboratuvara gönderilen düşük materyalleri laminar flowda steril transport mediumu ile birlikte petri kabına aktarıldı.
2. Petri kabına aktarılan materyal, steril pens ve bistüri aracılığıyla, doku bütünlüğü bozulmayacak şekilde ayrıştırıldı (Şekil 7).
3. 1'er ml. RPMI 1640 mediumu içeren iki ayrı petri kabı hazırlandı.
4. Hücre kültürü ve DNA izolasyonu için yeterli miktarda materyal, yıkama mediumu içeren ikinci petri kabına alındı.
5. Yıkama medyumunu bulunan doku parçaları stereo mikroskobu altında ayrıştırıldı.
6. Ayrıştırılan fetal dokular 3. petri kabına aktarıldı. Fetal doku parçaları veya koryonik villus örnekleri, kan pıhtılarından arındırılmak için temiz şeffaf görünüm alınca kadar 3. petri kabında yıkandı.
7. Kültüre hazır hale gelen doku materyalinden 50-100 mg'lık bir kısım doku parçası DNA izolasyonu yapmak amacıyla 1,5 ml'lik steril endorf tüpüne transfer edildi ve bölüm 3.4'te anlatılan aşamalara tabi tutuldu. Materyalin geri kalan 100 mg'lık kısmı, steril bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı ve içinde 2'şer ml. kültür mediumu bulunan 25 cm²'lik iki kültür flaskına ekildi.
8. Flaska ekilen örnekler %5'lik CO₂ inkübatöründe 37 °C'de kültüre edildi.
9. Kültür flaskları bir hafta hiç dokunulmadan etüvde bekletildi. Bir hafta sonra, flaskların invert mikroskop altında ilk kontrolleri yapıldı. Geçen süre içinde doku parçalarının çevresinde kol atma tarzında hücresel yapışmanın başladığı gözlemlendi (Şekil 8).

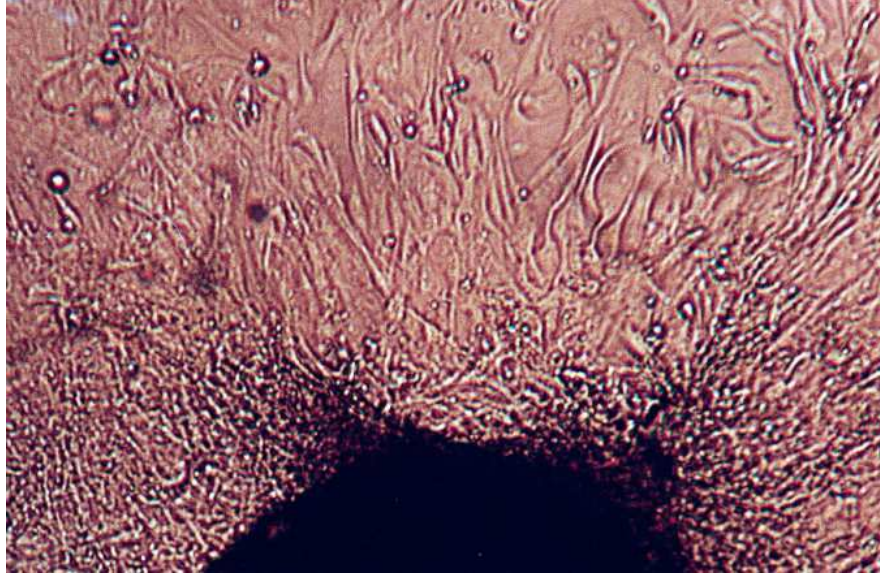
10. Mediumlar uygun miktarlarda değiştirilerek kültüre devam edildi. Bu işlemden sonra, flasklar 2-3 gün ara ile kontrol edilip uygun oranda medium değişikliği yapıldı.
11. Hücre üremesi yeterli olan flasklar harvest işlemine alındı (Şekil 9).
12. Harvest işlemi esnasında final konsantrasyonu 0.045µg/ml olacak şekilde kolsemid ilave edildi ve flasklar 2 saat süreyle 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
13. Kolsemid uygulamasını takiben flasklara 1’er ml. tripsin-EDTA ilave edildi ve 5 dk. 37°C’de inkübasyona bırakıldı.
14. 5 dk sonra flaska yapışmış hücrelerin serbest kalıp kalmadıkları invert mikroskop altında kontrol edildi. Hücrelerin flask tabanından ayrıldıkları görüldüğünde, flaska 1-2 ml. medium ilave edilerek tripsin-EDTA’nın aktivitesi durduruldu.
15. Steril cam pipetlere flask içeriği çekilerek steril kültür tüplerine aktarıldı ve kültür tüpleri 1200 rpm’de 10 dk. santrifüj edildi.
16. Santrifüj işleminden sonra, tüp dibinde 1 ml çökelti bırakılarak, üstteki süpernatant su trombu vasıtasıyla çekilip atıldı. Tüp dibinde bırakılan 1 ml’lik çökelti hafif hafif pipetaj yapıldı ve pipetaj işlemi sürdürülerek üzerine 8 ml. hipotonik solüsyonu yavaş yavaş ilave edildi. Tüpler, 37°C’lik etüve konarak 10 dk. bekletildi. Süre sonunda tüpler etüvden alındı ve 1200 rpm’de 10 dk. santrifüj edildi.
17. Santrifüj sonrasında, 1 ml çökelti kalacak şekilde su trombu ile üstteki süpernatant alınıp atıldı. Tüp dibindeki 1 ml’lik pellet pipet yardımı ile karıştırıldı ve pipetaj yapılarak 5 ml’lik fiksatif yavaş yavaş ilave edildi. Fiksatif uygulamasından sonra, tüpler 1200 rpm’de 10 dk. santrifüj edildi. Bu aşamayı takiben fiksatif ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
18. Son fiksatif işleminden sonra, tüp dibinde 1 ml’lik çökelti kalacak şekilde su trombu ile süpernatant nazikçe alınıp atıldı. Tüp dibinde kalan pellet nazik şekilde pipetaj yapıldı ve standart preparat hazırlama yöntemi ile preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar, 37°C ‘ye ayarlanmış etüvde 1 gün bekletilerek yaşlandırıldı.
19. 37°C’lik etüvde 1 gün bekletilen preparatlara standart bant yöntemi uygulandı.



Şekil 7. 10 haftalık fetüse ait düşük materyali



Şekil 8. 5 günlük düşük materyali kültürünün invert mikroskoftaki görünümü



Şekil 9. 12 günlük kültür işleminden sonra, düşük materyali kültürünün harvest işlemine hazır olduğunu gösteren invert mikroskop fotoğrafı

3.4. Koryonik Villus ve Periferik Kandan DNA İzolasyonu

Düşük materyallerinden ayrıştırılan 50-100 mg koryonik villus örneği ile düşük yapmış annelerden sitratlı tüplere alınan 2 ml.'lik kan örnekleri, DNA izolasyon işlemi yapılıncaya kadar, -20°C 'de bekletildi. Düşük materyallerinden ve kanlardan DNA izolasyonları QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) kullanılarak yapıldı.

1. 25 mg koryonik villus örneği ve 200 μl . kan örneği ependorf tüplerine aktarıldı.
2. Tüplere 180 μl ATL Buffer ve 20 μl Proteinaz K eklendi. Tüpler 56°C ' de 3 saat bekletildi ve saat başında en az 4 kez 2 sn. vortekslenip tekrar 56°C 'ye konuldu.¹
3. Tüplere 200 μl AL Buffer eklendi ve 15 sn. şiddetli şekilde vortekslendi.
4. Tüpler 70°C 'de 10 dakika inkübe edildi ve 8000 rpm'de 30 sn. santrifüj yapıldı.²
5. Her bir tüp içine 200 μl absolut etanol ilave edilerek 15 sn şiddetli şekilde vortekslendi ve 8000 rpm'de 30 sn. santrifüj edildi.
6. Tüplerin içindeki sıvı çökeltiyle birlikte spin kolonlara alındı ve 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi. Kolon filtresinden geçen sıvı atıldı.
7. Spin kolon başka bir toplama tüpüne konuldu ve üzerine 500 μl AW1 Buffer ilave edilerek 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.

¹ Periferik kandan DNA izolasyonu işlemleri sırasında ikinci basamak uygulanmadı.

² Periferik kandan DNA izolasyonu sırasında inkübasyon ısısı 56°C olarak ayarlandı.

8. Kolonun altındaki sıvı atıldı. Kolonun üzerine 500 ul AW2 Buffer ilave edilerek 14.000 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi.
9. DNA'nın saflığını arttırmak için kolon temiz bir toplama tüpüne konuldu ve yüksek devirli santrifüj işlemi tekrarlandı.
10. Kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alınarak üzerine 200 ul AE Buffer ilave edildi ve oda ısısında 1 dk. inkübe edildi. Her bir tüp kolon ile birlikte 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildi.
11. Bu aşamayı takiben kolondan ependorf tüpüne geçen DNA'nın nanodrop cihazı ile DNA konsantrasyonu ölçüldü.
12. DNA konsantrasyonu uygun olan örnekler, daha sonra çalışılmak üzere -20°C'lik derin dondurucuya kaldırıldı.

3.5. Multipleks QF-PCR Yöntemi

Düşük materyallerinden izole edilen DNA'lara ve düşük yapmış annelerden izole edilen DNA'lara, multipleks QF-PCR yöntemi uygulandı. Bu yöntem ile 13, 18, 21 ve cinsiyet kromozomları üzerinde yer alan 19 STR markırı ve cinsiyet kromozomları üzerinde yer alan iki gen bölgesi karşılaştırmalı olarak incelenip maternal kontaminasyon analizi yapıldı (Aneufast User's Manual, 2011). Maternal kontaminasyon analizi, ticari olarak satılan Aneufast kiti ile yapıldı.

1. Kite ait S1 ve S2 multiplex PCR karışımları kullanımdan önce 15 dk. oda ısısına bırakılarak çözülmeleri sağlandı ve vortekslendi.
2. Her bir hasta için 2'şer adet PCR tüpü hazırlandı. Tüplerden birine 5 µl S1 karışımından, diğerine 5 µl S2 kondu ve üzerlerine 5'er µl DNA ilave edildi.
3. Hazırlanan tüpler, tablo 2'deki program kullanılarak, thermal cycler'da PCR işlemine tabi tutuldu.
4. Elde edilen PCR ürünlerinin ABI 3130 kapiller elektroforez cihazına yüklenmesinde gereken 10 µl formamid+0.3 µl Liz Size Standart karışımı hazırlandı ve yükleme plağının her bir kuyucuğuna 10'ar µl ilave edildi.
5. Her bir örneğin S1 PCR ürününden ve S2 PCR ürününden 1'er µl yükleme plağının aynı kuyucuğuna yüklendi ve yükleme işlemi sırasında plak kuyucuğunun dibinde baloncuk kalmamasına dikkat edildi.
6. Kapiller elektroforez cihazına yükleme yapılmadan önce, yükleme plağı 95°C'de 2 dk. denatüre edildi ve cihaza yüklendi.

7. Sonuçlar GeneMapper software sistemi kullanılarak değerlendirildi. Tablo 3’de QF-PCR kitinde kullanılan markırlar ve özellikleri sunulmuştur.

Tablo 2. QF-PCR protokolü (Anefast User’s Manual, 2011’den uyarlanmıştır)

| Taq Aktivasyonu | Denatürasyon-Annealing-Extension | | | Final Extension | Saklama |
|-----------------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------------|---------|
| | 28 döngü | | | | |
| 95°C | 95°C | 60°C | 72°C | 60°C | 4°C |
| 15 dakika | 40 saniye | 90 saniye | 40 saniye | 30 dakika | ∞ |

Tablo 3. Maternal kontaminasyon amacıyla kullanılan QF-PCR markırları ve özellikleri (Anefast User’s Manual, 2011’den uyarlanmıştır)

| Markır | Boya-Renk | Het. Oranı | Nt. Aralığı | Kromozomal Lokalizasyon |
|----------|-------------|------------|-------------|-------------------------|
| AMXY | 6-Fam/Mavi | -- | X:104/Y:109 | Xp22.1/Yp11.2 |
| SRY | 6-Fam/Mavi | -- | 463 | Yp11.2 |
| X22 | 6-Fam/Mavi | 0,91 | 189-253 | Xq28/Yq (PAR2) |
| DXYS267 | PET/Kırmızı | 0,78 | 330-354 | Xq21.31/Yp11.31 |
| DXYS218 | PET/Kırmızı | 0,65 | 266-294 | Xp22.32/Yp11.3 |
| HPRT | 6-Fam/Mavi | 0,75 | 264-313 | Xq26.1 |
| D21S1414 | 6-Fam/Mavi | 0,85 | 328-443 | 21q21 |
| D21S1411 | VIC/Yeşil | 0,93 | 246-319 | 21q22.3 |
| D21S1446 | PET/Kırmızı | 0,77 | 200-228 | 21q22.3-ter |
| D21S1442 | 6-Fam/Mavi | 0,76 | 136-174 | 21q11.11 |
| D21S1435 | PET/Kırmızı | 0,75 | 142-188 | 21q21 |
| D18S535 | NED/Siyah | 0,82 | 126-156 | 18q12.2 |
| D18S391 | VIC/Yeşil | 0,75 | 144-168 | 18p11.2 |
| D18S976 | NED/Siyah | 0,76 | 164-184 | 18p11.31 |
| D18S386 | NED/Siyah | 0,89 | 319-387 | 18q22.1 |
| D18S390 | VIC/Yeşil | 0,75 | 398-430 | 18q22.2 |
| D13S797 | NED/Siyah | 0,65 | 417-454 | 13q32-33 |
| D13S631 | VIC/Yeşil | 0,78 | 192-218 | 13q31-32 |
| D13S305 | PET/Kırmızı | 0,75 | 426-458 | 13q12.1-13q14.1 |
| D13S634 | VIC/Yeşil | 0,85 | 460-500 | 13q14.3 |
| D13S258 | NED/Siyah | 0,89 | 230-281 | 13q21 |

3.6. Subtelomerik MLPA Yöntemi

Kromozomların p ve q kollarındaki subtelomerik bölgeler, MRC Holland tarafından üretilen P070 SALSA MLPA kiti kullanılarak araştırıldı. Araştırmada kullanılan MLPA yöntemi aşağıdaki aşamalar takip edilerek uygulandı;

1. DNA Denatürasyonu

1. Her bir düşük materyalinden ve kontrol grubu bireylerin periferik kanından izole edilen DNA'lardan 5'er µl (20-250 ng DNA) alınıp 200 µl'lik PCR tüplerine konuldu.
2. 98 °C de 5 dk. thermal cycler cihazında bekletilerek DNA'nın denatürasyonu sağlandı ve sonra örnekler 25°C'ye gelinceye kadar soğutuldu.

2. Hibridizasyon Reaksiyonu

3. MLPA buffer ve 46 adet kromozomun p ve q kollarındaki subtelomerik bölgelere özgü MLPA prob karışımı kullanmadan önce vortekslendi.
4. 1,5 ul MLPA buffer + 1,5 ul prob karışımından oluşan hibridizasyon master karışımı hazırlandı ve vorteks yardımıyla iyice karıştırıldı.
5. DNA denatürasyonundan sonra, her bir örnek tüp içine 3'er ul hibridizasyon master karışımı ilave edildi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
6. Tüpler thermal cycler cihazına konuldu ve 95°C'de 1 dk inkübe edilip, 60°C'de 16-20 saat hibridizasyona bırakıldı.

3. Ligasyon Reaksiyonu

7. Ligaz bufferlar kullanım aşamasında vortekslendi ve her bir reaksiyon için 25 ul dH₂O + 3 ul Ligaz buffer A + 3 ul Ligaz buffer B + 1 ul Ligaz-65 enzimden oluşan Ligaz-65 master karışımı hazırlandı ve karışım çok hassas pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı.
8. Süre sonunda thermal cycler 60°C'de durduruldu ve master karışımının ilave edilmesi için thermal cycler ısısının 54°C'ye gelmesi beklendi.
9. Thermal cycler'daki örnekler 54°C'de iken, her bir reaksiyon tüpüne 32'şer ul ligaz master karışı ilave edildi ve çok hassas pipetaj yapıldı.
10. Thermal cycler programı 54°C'de devam ettirilerek 15 dk. inkübasyon sağlandı. Ligaz-65 enziminin ısıyla inaktivasyonunu sağlamak için ısı 98°C'ye çıkarıldı ve tüpler 5 dk tutuldu. Tüpler thermal cycler içindeyken, ısı 20°C'ye indirildi ve

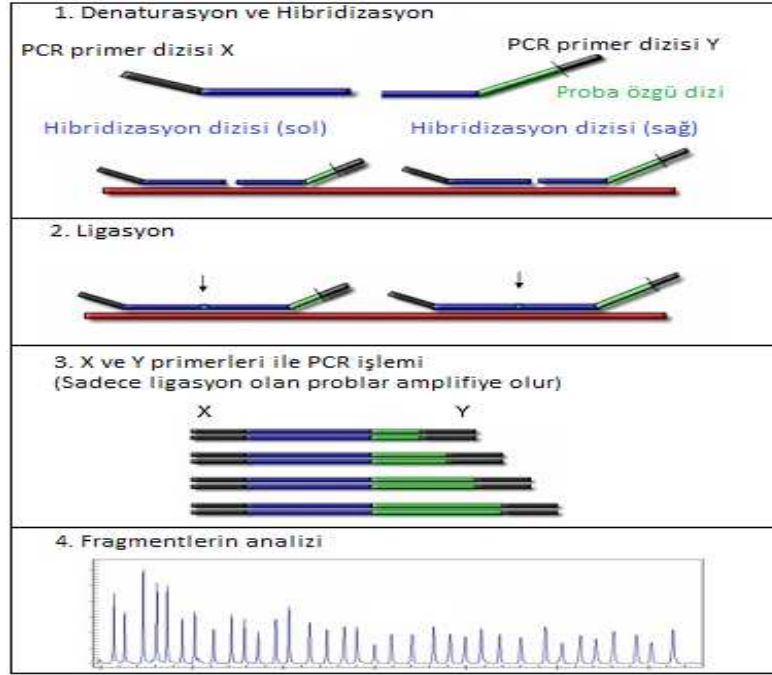
program durduruldu. Tüpler cihazdan çıkarıldı ve PCR işlemi için 4°C'de bekletildi.

4. PCR Reaksiyonu

11. SALSA PCR primer karışımı, kullanımdan önce iyice vortekslendi ve viskoziteyi gidermek için, 10 sn elde tutuldu.
12. Her bir reaksiyon için, 7,5 ul dH₂O + 2 ul SALSA PCR primer karışımı + 0,5 ul SALSA polimeraz karıştırılarak polimeraz master karışımı hazırlandı ve hassas pipetaj yapıldı. Hazırlanan karışım, kullanılıncaya kadar, buz üstünde muhafaza edildi.
13. Her tüpe oda ısısında 10'ar ul polimeraz karışımı ilave edilerek hassas pipetaj yapıldı ve thermal cycler'daki PCR programı sürdürüldü.
14. PCR reaksiyon ürünleri, -20°C'ye alınarak, karanlıkta saklandı. MLPA işleminin basamakları ve çalışma şartları tablo 4'de sunulmuştur. MLPA reaksiyonu aşamalarının şematik görünümü Şekil 10'da sunulmuştur.

Tablo 4. MLPA yönteminin reaksiyon aşamaları

| | |
|------------------------------------|---|
| 1) DNA denaturasyonu | 1. 98°C 5 dk. 2. 25°C durdurulur. |
| 2) Hibridizasyon reaksiyonu | 3. 95°C 1 dk. 4. 60°C 16-20 saat bekletilir. |
| 3) Ligasyon reaksiyonu | 5. 54°C durdurulur. 6. 54°C 15 dk. 7. 98°C 5 dk. 8. 20°C durdurulur. |
| 4) PCR reaksiyonu | 9. 35 döngü <ul style="list-style-type: none">• 95°C 30 sn.• 60°C 30 sn.• 72°C 60 sn. 10. 72°C 20 dk. 11. 15°C durdurulur. |



Şekil 10. MLPA reaksiyonunun şematik görünümü (www.mrc-holland.com'dan uyarlanmıştır)

5. ABI 3130 Cihazına Yükleme

15. Kapiller elektroforez yapılmak üzere; 0,7 ul PCR ürünü + 0,2 ul LIZ size standart + 9 ul formamidden oluşan yükleme karışımı hazırlanarak yükleme plağına yüklendi ve kapiller elektroforez cihazının uygun filtre setleri ayarlandı.
16. Yükleme yapılan ve sıkıca kapatılan plak, 80°C'de 2 dk. inkübe edildi ve oda ısısına gelmesi için kısa süre bekletildi.
17. Oda ısısına gelen plak, kapiller elektroforez cihazına (ABI 3130) yüklendi ve GeneMapper programında analiz edildi.

6. MLPA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

GeneMapper programında analiz edilen her bir örneğe ait pik görüntüleri ve pik alanları tespit edildi. GeneMapper programından elde edilen prob uzunluğu, pik yüksekliği ve alan bilgilerinin bulunduğu WordPad belgesi, Coffalyser analiz programına yüklendi. Düşük materyallerine ve referans bireylere ait verilerin Coffalyser programına tanıtımı yapıldı. Veriler, normalizasyon yapan "Tumor Analysis" metoduyla analiz edildi. MLPA uygulamasının sonuçlarını değerlendirmeye geçmeden, testin verimliliğini doğrulamak amacıyla, MLPA prob karışımı içerisine kontrol amaçlı yerleştirilen Q ve D fragmentlerinin pik yükseklikleri karşılaştırmalı olarak kontrol

edildi (Tablo 5). DNA miktarının yeterliliği ve denatürasyon probleminin olmayışı anlaşıldıktan sonra, araştırma grubu örneklerinin ve kontrollerin pik analizleri, excel tabanlı Coffalyser c9.4 programı kullanılarak yapıldı. Tumor Analysis yöntemi her bir proba ait pik alanının o örneğin tüm pik alanlarının toplamına bölünmesiyle gerçekleştirildi. Relatif pik oranı (Relative Peak Ratio-RPR), hastaların ortalama relatif pik alanının (RPA) referansların ortalama relatif pik alanına bölünmesiyle elde edilir. RPR sonuçları 0,7 altına inerse delesyon ve 1,3 üstüne çıkarsa duplikasyon olarak tanımlanır. Fakat, 0,7-1,3 arasındaki RPR değerleri normal olarak kabul edilir. Ancak, bir proba ait RPR değeri, 0,7'nin altında çıktığında ya da 1,3'ün üzerinde çıktığında ve bu değerler prediction tablosunda normali temsil ettiğinde, bu değerler arasında görülen problemlerin kopya sayıları, yeni referanslarla karşılaştırılarak incelendi. Yeniden aynı sonuçla karşılaşıldığında, durum delesyon veya duplikasyon olarak değerlendirildi. Düşük materyallerine ait pikler ile kontrollere ait pikler referanslarla karşılaştırmalı olarak analiz edildi. SALSA MLPA P070-B2 İnsan telomer prob karışımına ait bilgiler Ek 1'de sunulmuştur.

Tablo 5. MLPA reaksiyonunda yer alan kontrol fragmentlerinin özellikleri

| İsim | Nt | Özellikleri |
|---------------------|-------------|---|
| 92 nt kontrol | 92 | Ligasyona bağlı prob olup diğer kontrol fragmentlerini karşılaştırmada kriter özelliği gösterir. |
| Q-fragmentleri | 64-70-76-82 | DNA miktarının çok düşük olduğunu gösterir. Q fragmentlerinin pik yüksekliklerinin, 92 nt'lik kontrol fragmentinin pik yüksekliğinin 1/3'ünden fazla olması, DNA miktarının yetersizliğini gösterir. |
| D-fragmentleri | 88-92-96 | Denatürasyon probleminin gösterilmesinde rol oynarlar. D fragmentlerinin pik yüksekliği, 92 nt'lik kontrol fragmentinin pik yüksekliğinin %40'ından daha düşük olması, denatürasyon problemi olduğunu gösterir. |
| X ve Y fragmentleri | 100, 105 | X ve Y kromozomlarına özgü fragmentleri temsil eder. |

3.7. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Aile öyküsü bulguları ile sitogenetik analiz bulgularının istatistiksel değerlendirilmesinde "SPSS 15,0 Windows Software" programı ve MLPA bulgularının istatistiksel değerlendirilmesinde ise "Fisher-Exact test" yöntemi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Araştırma Grubu

Bu araştırma; 2011-2012 yılları arasında, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı Laboratuvarına Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalından gönderilen 60 düşük materyali, düşük yapmış anneler, düşük öyküsü olmayan sağlıklı çocuk sahibi 20 sağlıklı birey üzerinde gerçekleştirildi. Araştırma grubunda yer alan düşük yapmış annelerin yaş ortalaması $30,68 \pm 5,74$ ve sağlıklı çocuk sahibi olup düşük öyküsü olmayan sağlıklı kontrol grubunun yaş ortalaması $33,55 \pm 5,56$ olarak saptandı. Düşük materyali sahibi aile öyküleri değerlendirildiğinde, birçok ailenin birden çok düşüğe sahip oldukları ve ortalama düşük sayısının $2,2 \pm 1,4$ olduğu tespit edildi. Aile öyküleri değerlendirildiğinde, düşüklerin %94,9'unun ilk trimesterde ve özellikle %63,3'ünün 8-9. haftalarda gerçekleştiği ve ortalama gebelik haftasının ise $9,15 \pm 4,17$ olduğu görüldü. Araştırma grubundaki 60 düşük materyalinden %56,7'sinin missed, %35'inin habitüel, %6,7'sinin anembriyonik gebelik ve %1'inin de diğer nedenlere bağlı gerçekleşen düşükler olduğu belirlendi.

60 düşük materyaline ait koryonik villus örneklerinden hücre kültürleri gerçekleştirildi. Düşük materyallerine ait koryonik villus örneklerinden ve düşük yapmış annelerin periferik kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak maternal kontaminasyon analizi yapıldı. Tüm düşük materyallerinin maternal kontaminasyon analizleri değerlendirildiğinde, düşüklerin 43'ünde (%71,7) maternal kontaminasyon olmadığı ve 9'unda (%15) maternal kontaminasyon olduğu anlaşıldı. Düşük yapmış annelerin 8'i (%13,3) kan vermedikleri için maternal kontaminasyon analizine tabi tutulamadı (Tablo 6). Sonuç itibarıyla, araştırma grubunda yer alan 60 düşük materyalinin 52'sinde kontaminasyon analizi gerçekleştirildi (%86,7).

Tablo 6. Araştırma grubunda yer alan düşük materyallerine ait veriler

| Gruplar | n (%) | Toplam n |
|---|-----------|----------|
| Maternal Kontaminasyon Saptanmayan Düşük Materyalleri | 43 (71,7) | 60 |
| Maternal Kontaminasyon Saptanan Düşük Materyalleri | 9 (15) | |
| Maternal Kontaminasyon Analizi Yapılamayan Düşük Materyalleri | 8 (13,3) | |

4.2. Sitogenetik Analiz Bulguları

Araştırma grubundaki 60 düşük materyalinden sitogenetik analizler yapıldı. Sitogenetik analiz bulguları aşağıdaki gibi saptandı. Maternal kontaminasyon saptanan 9 düşük materyalinde 46,XX, maternal kontaminasyon analizi yapılamayan 8 düşükten 5'inde 46,XX ve 3'ünde kültür başarısızlığı, maternal kontaminasyon saptanmayan 43 düşük materyalinin 13'ünde (%68,4) 46,XX; 6'sında (%31,5) 46,XY karyotipi, 10'unda (%23,3) sayısal kromozom abnormalitesi ve 2'sinde de (%4,7) yapısal kromozom abnormalitesi saptandı. Sayısal kromozom abnormalitesi bulunan 10 düşük materyalindeki abnormalite dağılımı; 2 düşük materyalinde 45,X; 3 düşük materyalinde sırasıyla 47,XY,+10; 47,XY,+22 ve 47,XX,+7; 4 düşük materyalinde sırasıyla 69,XXX ve 69,XXY ve 1 düşük materyalinde ise 92,XXXX karyotipi tespit edildi. Yapısal abnormalite saptanan 2 düşük materyalinde 46,XY,der(1),t(1;2)(p34,2;q14,1) ve 46,XX,der(1)t(1;8)(p36,2;p22) translokasyonları saptandı. Yapısal kromozom abnormalitesi gözlenen düşük materyallerinin anne ve babasından yapılan sitogenetik analizlerden; 46,XY,der(1),t(1;2)(p34,2;q14,1) translokasyon taşıyıcısı düşük materyalinin anne ve babasının normal, 46,XX,der(1),t(1;8)(p36,2;p22) translokasyonuna sahip düşük materyalinin annesinin 46,XX ve babasının ise 46,XY,t(1;8)(p36,2;p22) karyotipine sahip olduğu anlaşıldı. 60 düşük materyalinin 15'inde (%20) kültür başarısızlığı nedeniyle sitogenetik analiz yapılamadı. Maternal kontaminasyon saptanmayan düşük materyallerinin sitogenetik analiz sonuçları tablo 7'de sunuldu. QF-PCR yöntemi ile yapılan maternal kontaminasyon analizi neticesinde, maternal kontaminasyon saptanmayan ve kültür başarısızlığı nedeniyle sitogenetik analizleri yapılamayan düşük materyali sayısının 12 olduğu belirlendi. Sitogenetik analizi yapılamayan 12 düşük materyalinden 10'unun kromozomal kuruluşları QF-PCR ve MLPA yöntemlerinin kombinasyonlarıyla değerlendirildi.

Tablo 7. Maternal kontaminasyon saptanmayan düşük materyallerinin sitogenetik analiz sonuçları

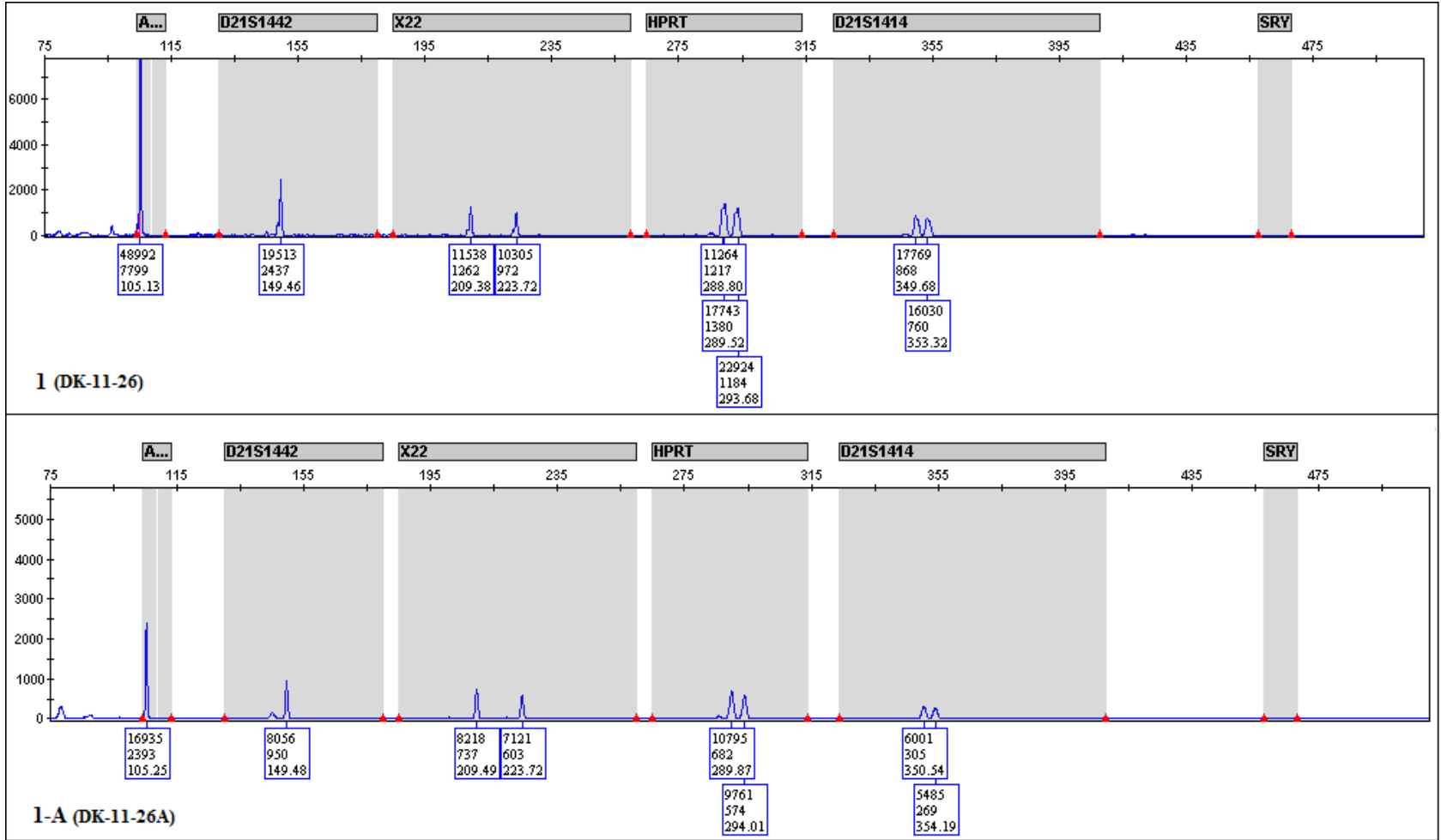
| Gruplar | Alt Gruplar | n (%) | Toplam n (%) |
|------------------------------------|--------------------|--------------|---------------------|
| Normal Karyotip Saptananlar | 46, XX | 13 (68,4) | 19(%44,2) |
| | 46, XY | 6 (31,5) | |
| Sayısal Abnormalite Saptananlar | 45,X | 2 (%20) | 10 (%23,3) |
| | Trizomi | 3 (%30) | |
| | Triploidi | 4 (%40) | |
| | Tetraploidi | 1 (%10) | |
| Yapısal Abnormalite Saptananlar | Translokasyonlar | | 2 (%4,7) |
| Sitogenetik Analizi Yapılamayanlar | | | 12 (%27,9) |
| Toplam | | | 43 |

4.3. Maternal Kontaminasyon Analizi Bulguları

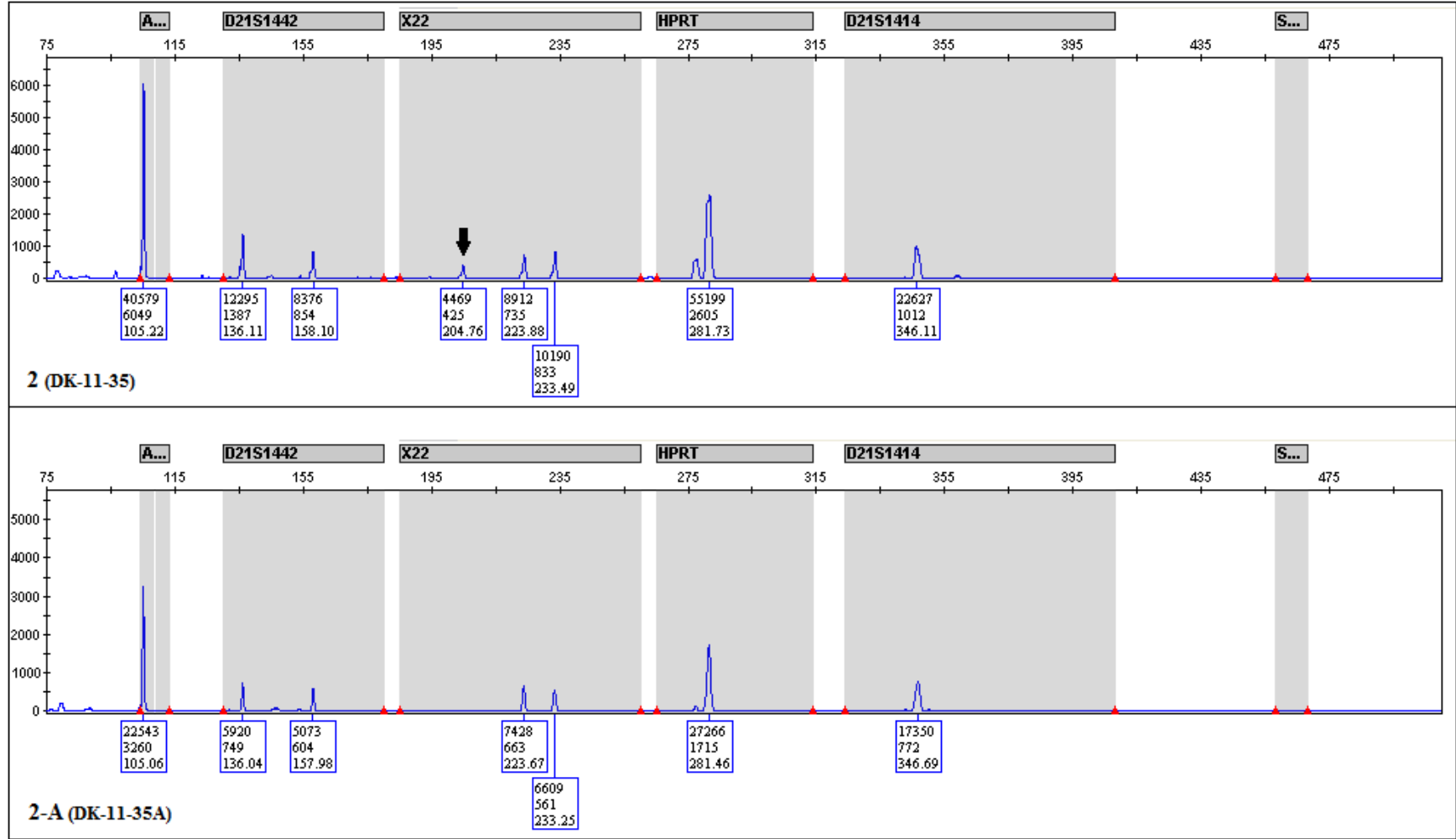
Düşük materyallerinden ve düşük yapmış annelerin kanlarından izole edilen DNA'lar üzerinde 13, 18, 21 ve cinsiyet kromozomları üzerinde yer alan 19 STR bölgesinin ve cinsiyet kromozomları üzerinde yer alan iki gen bölgesinin multipleks QF-PCR'ı yapıldı. Düşük materyalleri ve düşük yapmış annelere ait STR ve gen bölgelerinin pik profilleri, maternal kontaminasyon bakımından karşılaştırmalı olarak değerlendirildi (Aneufast User's Manual, 2011). Araştırma grubunu oluşturan 60 düşük materyalinin 8'inde maternal kontaminasyon analizi yapılamadı. Maternal kontaminasyon analizi yapılan 52 düşük materyaline ait sonuçlar, maternal kontaminasyon saptanmayanların oranının %82,6 ve maternal kontaminasyon saptananların oranının ise %17,3 olduğunu gösterdi (Tablo 8). Düşük materyallerinin maternal kontaminasyon analizi ile ilgili QF-PCR görüntüleri şekil 11, 12, 13, 14 ve 15'de sunulmuştur.

Tablo 8. Düşük materyalleriyle ilgili maternal kontaminasyon analizi sonuçları

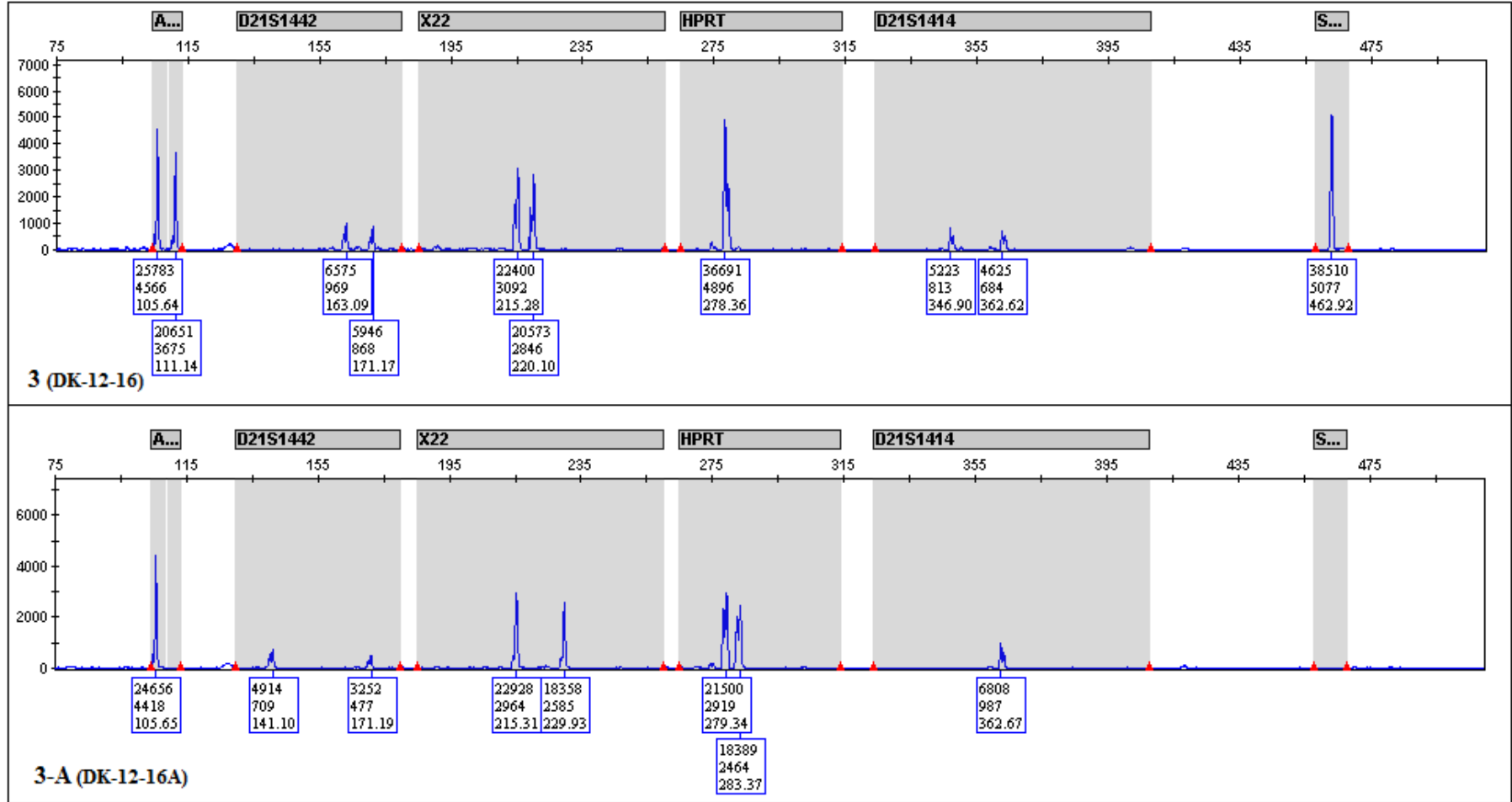
| Gruplar | n (%) | Toplam |
|---------------------------------------|--------------|---------------|
| Maternal Kontaminasyon Saptanmayanlar | 43 (82,6) | 52 |
| Maternal Kontaminasyon Saptananlar | 9 (17,3) | |



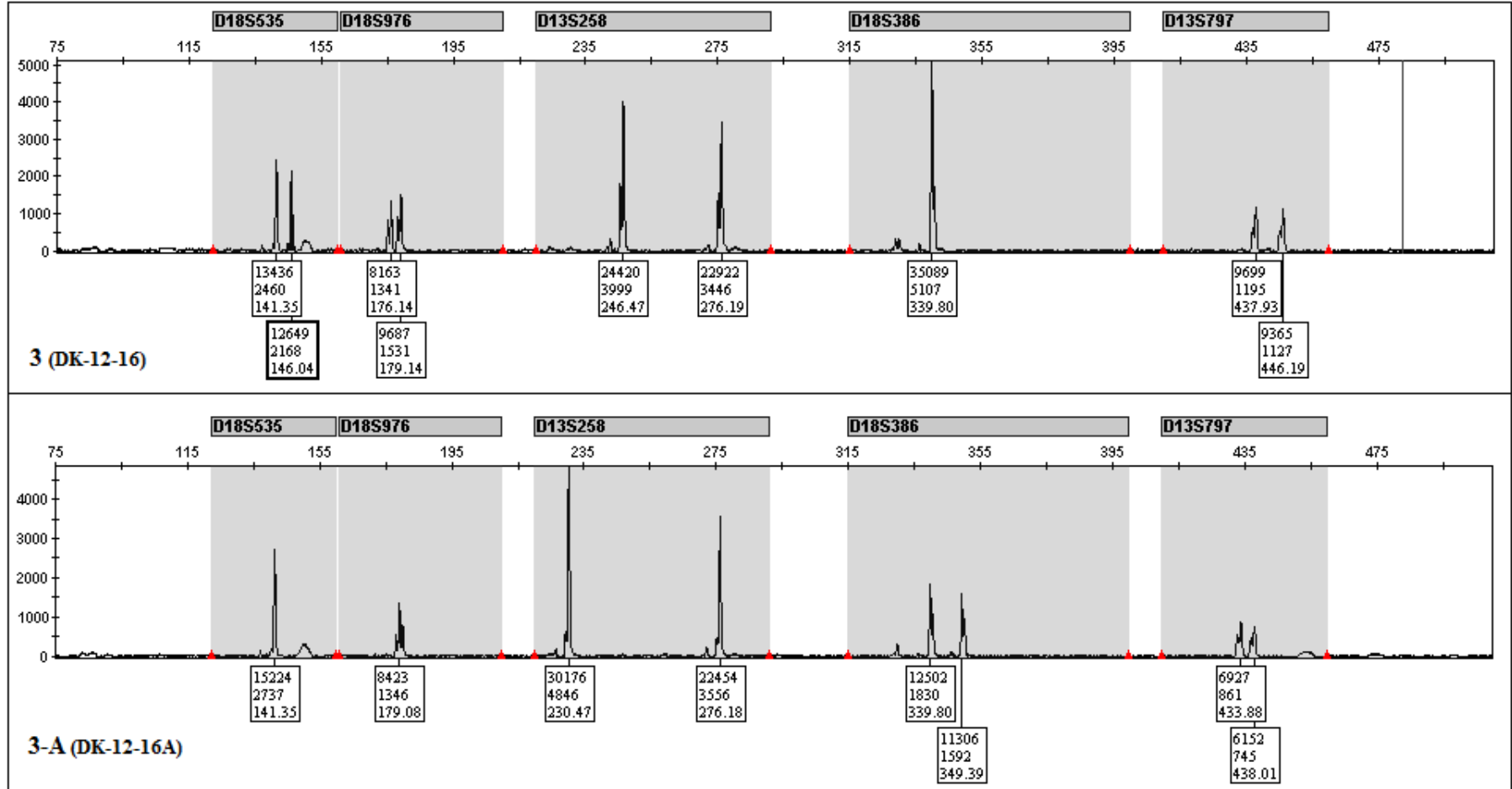
Şekil 11. 1: Düşük materyalinin QF-PCR görüntüsü, **1-A:** Düşük yapmış annenin QF-PCR görüntüsü. Düşük materyaline ait markır alanlarındaki pik görüntülerinin annenin pik görüntüleri ile birebir uyum sağlaması maternal kontaminasyon olduğunun göstergesidir



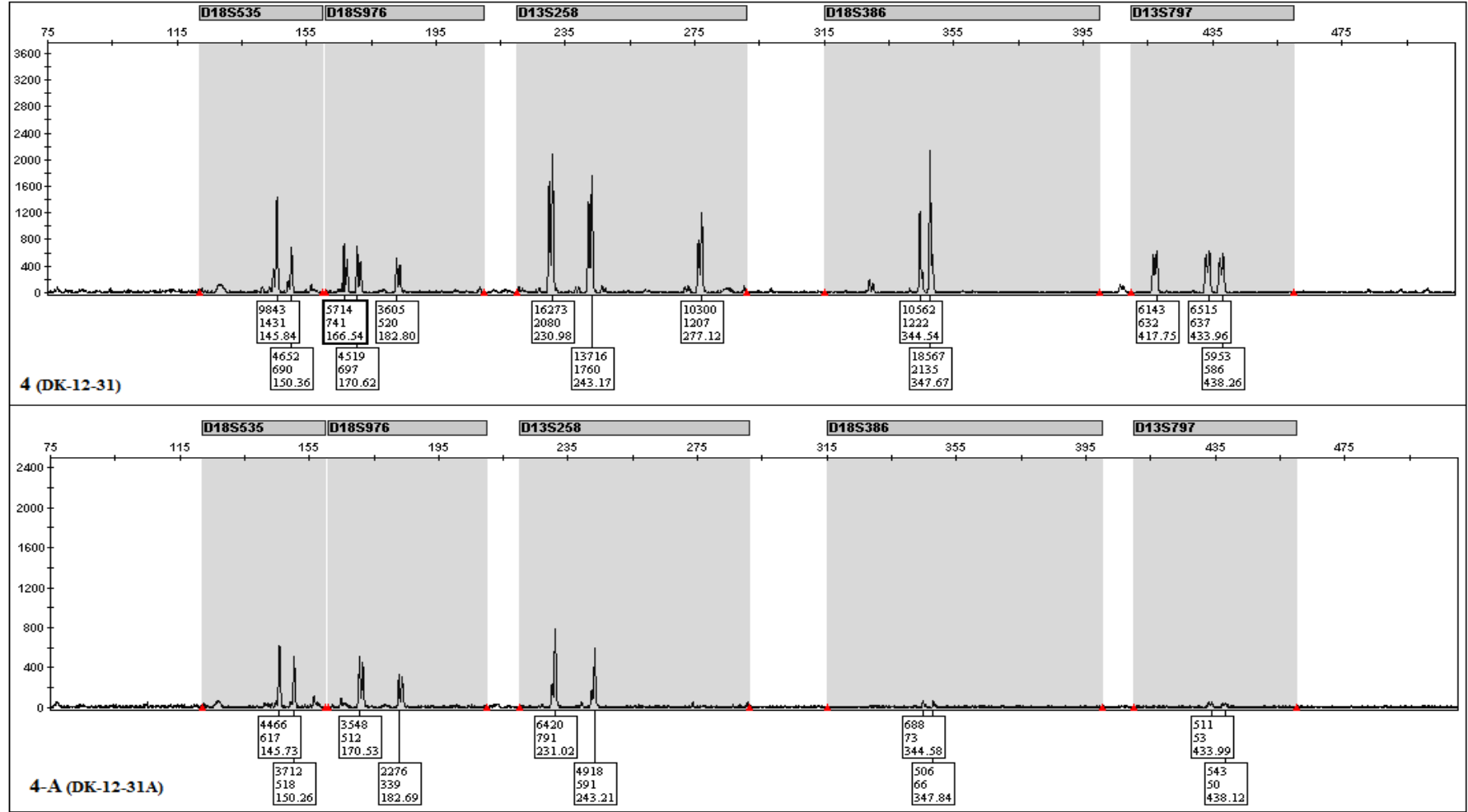
Şekil 12. 2: Düşük materyalinin QF-PCR görüntüsü, **2-A:** Düşük yapmış annenin QF-PCR görüntüsü. Anne kaynaklı pik baskınlığına karşın, nadir de olsa fetal pik varlığı belirli oranda kontaminasyon olduğunu düşündürmüştür. Ok işareti, X22 markırında fetal kaynaklı bir pikin varlığını göstermektedir



Şekil 13. 3: Düşük materyalinin QF-PCR görüntüsü, **3-A:** Düşük yapmış annenin QF-PCR görüntüsü. Düşük materyaline ait markır alanlarındaki piklerden sadece birer tanesinin annenin pik görüntüleri ile uyum sağlaması, maternal kontaminasyon olmadığını göstergesidir



Şekil 14. 3: Düşük materyalinin QF-PCR görüntüsü, **3-A:** Düşük yapmış annenin QF-PCR görüntüsü. Düşük materyaline ait markır alanlarından elde edilen piklerden sadece birer tanesinin annenin pik görüntüleri ile uyum sağlaması, maternal kontaminasyon olmadığını göstergesidir



Şekil 15. 4: Düşük materyalinin QF-PCR görüntüsü, **4-A:** Düşük yapmış annenin QF-PCR görüntüsü. 69,XXY karyotipine sahip düşük materyalinin pikleri ile anneye ait piklerin kıyaslanması, tiploidinin anne kaynaklı olduğunu göstermiştir

4.4. Subtelomerik Analiz Bulguları

Sitogenetik analizlerin yanı sıra, maternal kontaminasyon analizleri yapılan ve maternal kontaminasyon saptanmayan 30 düşük materyalinin subtelomerik bölgeleriyle ilgili muhtemel mikrolezyon ve mikroduplikasyonların saptanması amacıyla subtelomerik MLPA yöntemi kullanıldı. Araştırma grubuna ait subtelomerik MLPA sonuçlarını değerlendirebilmek için, düşük öyküsü olmayan ve sağlıklı çocuk sahibi 20 sağlıklı birey kontrol grubu olarak seçilerek subtelomerik MLPA analizine tabi tutuldu. İzole edilen DNA örneklerinin saflık derecesi ile miktarı MLPA başarısını etkilediğinden, DNA saflığına ve miktarına özen gösterildi. Düşük materyallerinin ve kontrollerin MLPA kalite piklerinin uygun olarak görülmesi ve genel pik yapılarının arzu edilen boyutta görüntülenmesi için, DNA'lar çeşitli oranlarda seyreltilerek kullanıldı. Düşük materyallerine ait MLPA sonuçları tablo 9'da sunulmuştur.

Tablo 9. Düşük materyalleriyle ilgili analiz sonuçları **M.A.:** Missed Abortus, **A.E.:** Anembriyonik gebelik, **H.A.:** Habitüel Abortus, **K.B.:** Kültür Başarısızlığı, **G:** Gravida, **P:** Parite, **A:** Abortus, **PTT:** Parsiyel tromboplastin zamanı, **PT/INR:** Protrombin zamanı/Internasyonal normalized ratio

| Protokol | Yaş | GPA | Gebelik Haftası | PTT | PT/INR | Tam | Genotip | MLPA Sonucu |
|----------|-----|--------|-----------------|-------|--------|------|-------------------------|--------------------|
| MLPA-01 | 30 | G2P0A2 | 9 | 31,7 | 0,98 | M.A. | 46,XX | Normal |
| MLPA-02 | 38 | G2P1A1 | 9 | 23,6 | 1,06 | A.E. | 46, XY, der(1)t(1;2) | 1p.del |
| MLPA-03 | 28 | G1P0D1 | 8+6 | 23,8 | 0,89 | M.A. | K.B. | Normal |
| MLPA-04 | 27 | G1P0A1 | 11 | 38 | 1,15 | M.A. | 46,XX | Normal |
| MLPA-05 | 34 | G4P1A3 | 9+1 | 27 | 1,15 | A.E. | 46,XX | Normal |
| MLPA-06 | 31 | G1P0A1 | 10+1 | 23,66 | 0,99 | M.A. | 46,XY | Normal |
| MLPA-07 | 19 | G2P0A2 | 14 | 25,42 | 0,98 | M.A. | K.B. | Xp.del. Xq.del. |
| MLPA-08 | 25 | G5P1A4 | 8+1 | 23 | 0,99 | H.A. | K.B. | Normal |
| MLPA-09 | 31 | G3P1A2 | 9+5 | ---- | ---- | M.A. | 46, XY | Normal |
| MLPA-10 | 29 | G3P0A3 | 10 | 23,49 | 0,89 | H.A. | 46, XX | Normal |

Tablo 9'un devamı. Düşük materyalleriyle ilgili analiz sonuçları. **M.A.:** Missed Abortus, **A.E.:** Anembriyonik gebelik, **H.A.:** Habitüel Abortus, **K.B.:** Kültür Başarısızlığı, **G:** Gravida, **P:** Parite, **A:** Abortus, **PTT:** Parsiyel tromboplastin zamanı, **PT/INR:** Protrombin zamanı/Internasyonel normalized ratio

| Protokol | Yaş | GPA | Gebelik Haftası | PTT | PT/INR | Tamı | Genotip | MLPA Sonucu |
|----------|-----|--------|-----------------|-------|--------|------|--------------------------|--------------------|
| MLPA-11 | 31 | G3P0A3 | 10 | ---- | ---- | H.A. | 46, XX, der(1),t(1;8) | 1p.del. 8p.dup. |
| MLPA-12 | 32 | G2P0A2 | 9 | 22,1 | 0,91 | H.A. | 46, XX | Normal |
| MLPA-13 | 37 | G3P1A2 | 6 | ---- | ---- | M.A. | K.B. | 9p.dup 9q.dup. |
| MLPA-14 | 27 | G3P0A3 | 9 | 24,34 | 0,96 | H.A. | 46, XX | 16q.dup |
| MLPA-15 | 29 | G1P0A1 | 6 | 20 | 1,08 | M.A. | 46, XX | Normal |
| MLPA-16 | 36 | G6P0A6 | 8 | 27,35 | 0,9 | H.A. | K.B. | Normal |
| MLPA-17 | 27 | G1P0A1 | 8 | 26,48 | 0,89 | M.A. | 46, XX | Normal |
| MLPA-18 | 26 | G1P0A1 | 8 | 25,15 | 0,97 | M.A. | 46, XX | Normal |
| MLPA-19 | 25 | G1P0A1 | 8 | 21,08 | 0,97 | M.A. | K.B. | Normal |
| MLPA-20 | 28 | G1P0A1 | 9 | ---- | ---- | M.A. | 46, XX | Normal |

Tablo 9'un devamı. Düşük materyalleriyle ilgili analiz sonuçları. **M.A.:** Missed Abortus, **A.E.:** Anembriyonik gebelik, **H.A.:** Habitüel Abortus, **K.B.:** Kültür Başarısızlığı, **G:** Gravida, **P:** Parite, **A:** Abortus, **PTT:** Parsiyel tromboplastin zamanı, **PT/INR:** Protrombin zamanı/Internasyonal normalized ratio

| Protokol | Yaş | GPA | Gebelik Haftası | PTT | PT/INR | Tam | Genotip | MLPA Sonucu |
|----------|-----|--------|-----------------|-------|--------|------|---------|--------------------|
| MLPA-21 | 40 | G2P1A1 | 13 | 23,21 | 0,87 | M.A. | K.B. | Normal |
| MLPA-22 | 30 | G3P1A2 | 9 | ---- | ---- | H.A. | 46, XX | Normal |
| MLPA-23 | 30 | G1P0A1 | 9+4 | 25,53 | 0,88 | M.A. | K.B. | Normal |
| MLPA-24 | 25 | G1P0A1 | 7 | 29,7 | 1,1 | M.A. | K.B. | 16q.dup |
| MLPA-25 | 35 | G3P1A2 | 8 | ---- | ---- | H.A. | K.B. | 16p.dup 16q.dup |
| MLPA-26 | 35 | G2P1A1 | 5 | 29,2 | 0,98 | M.A. | 46, XX | Normal |
| MLPA-27 | 21 | G4P1A3 | 7 | 27,7 | 1,09 | H.A. | 46, XX | Normal |
| MLPA-28 | 31 | G1P0A1 | 8 | 21,98 | 0,98 | A.E. | 46, XY | Normal |
| MLPA-29 | 39 | G5P1A4 | 8 | 27,67 | 0,89 | H.A. | 46, XY | Normal |
| MLPA-30 | 28 | G3P2A1 | 6 | 28,27 | 1,03 | M.A. | 46, XY | Normal |

Düşük yapmış annelerde rutin olarak değerlendirilen pıhtılaşma faktörü markırlarından PTT ve PT/INR'lerin normal olduğu ve araştırma grubundaki düşüklerin pıhtılaşma faktörlerine bağlı nedenlerden kaynaklanmadığı anlaşıldı. Düşüğü olmayan 20 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubuna uygulanan MLPA, subtelomerik bölgelerde normal pikler olduğunu ve herhangi bir delesyon ya da duplikasyona rastlanmadığını gösterdi (Şekil 16). Araştırma grubunda yer alan, maternal kontaminasyon saptanmayan ve MLPA uygulanan 30 düşük materyalinin 20'sinde hücre kültürü başarılı ve sitogenetik analizleri yapıldı. Sitogenetik analizleri yapılan 20 düşük materyalinin 18'inde normal karyotip gözlenirken, 2'sinde 46,XY,der(1)t(1;2) ve 46,XX,der(1)t(1;8) translokasyonları tespit edildi. Kültür başarısızlığı nedeniyle sitogenetik analizleri yapılamayan 10 düşük materyali de QF-PCR ve MLPA kombinasyonu ile değerlendirildi.

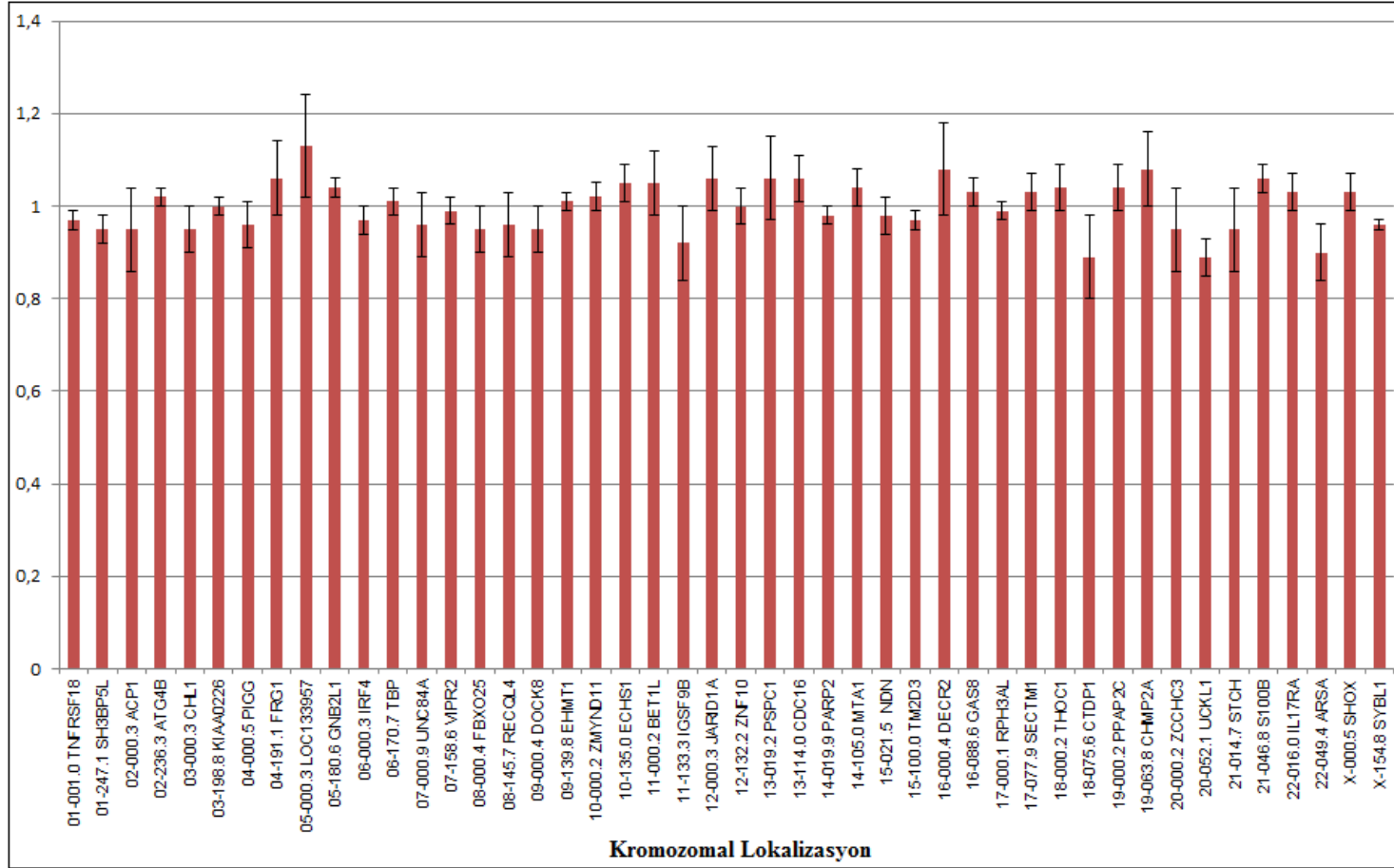
MLPA yöntemiyle subtelomerik bölgeleri çalışılan 30 düşük materyalinin 23'ünden sağlanan pikler normal sınırlarda görülürken (Tablo 9, Şekil 17), 7'sinden sağlanan piklerin farklı abnormalitelerle uyumluluğu dikkat çekti. Sitogenetik analiz sonucu karyotipinin 46,XY,der(1)t(1;2) olduğu saptanan ve protokolü MLPA-02 olan düşük materyalinin MLPA analizi sonucunda, 1. kromozomun p kolunda delesyon gözlemlendi (Tablo 9, 10). Karyotipi 46,XX,der(1),t(1;8) olarak saptanan ve protokolü MLPA-11 olan düşük materyalinin MLPA analizi, 1. kromozomun p kolunda delesyon ve 8. kromozomun p kolunda duplikasyon olduğunu gösterdi (Tablo 9, 10). Protokolü MLPA-11 olan düşük materyalinin anne ve babasının sitogenetik analizleri, babanın dengeli translokasyon taşıyıcısı ve annenin normal olduğunu gösterdi. Protokolü MLPA-07 olan düşük materyalinin karyotipi, kültür başarısızlığı nedeniyle belirlenemedi. MLPA-07 protokollü düşük materyalinin MLPA analizi, X kromozomunun p ve q kollarında delesyon bulunduğunu gösterdi (Tablo 9, 10, Şekil 18, 19). MLPA-07 protokollü düşük materyalinin subtelomerik MLPA sonuçları ile QF-PCR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, subtelomerik delesyon ya da duplikasyon mevcut olmayıp, sonucun monozomi X'ten kaynaklandığı tespit edildi. Protokolü MLPA-13 olan düşük materyalinin karyotip analizi, kültür başarısızlığı nedeniyle yapılamadı. Subtelomerik MLPA çalışması, protokolü MLPA-13 olan düşük materyalinin 9. kromozomunun p ve q kolunda duplikasyon olduğunu gösterdi (Tablo 9, 10). Bu sonuç, trizomi 9 ile uyumlu görüldü. Protokolü MLPA-25 olan düşük materyalinin 16. kromozomunun p ve q kollarında duplikasyon saptandı (Tablo 9, 10, Şekil 20, 21). Ancak, sonuçların değerlendirilmesi, bu sonucun 16. kromozomun trizomisinden kaynaklandığını gösterdi.

Sitogenetik analizle karyotipi 46,XX olarak belirlenen MLPA-14 protokollü düşük materyalinin 16. kromozomunun q kolunda (Tablo 9, 10, Şekil 22, 23) ve protokolü MLPA-24 olan düşük materyalinin 16. kromozomunun q kolunda duplikasyon saptandı (Tablo 9, 10, Şekil 24). Yapılan değerlendirmeler, protokolleri MLPA-14 ve MLPA-24 olan düşük materyallerinin subtelomerik bölgesine denk düşen 16q24.3 bölgelerinde yerleşik olan growth arrest-specific 8 (GAS8) geninde duplikasyon olduğunu ortaya koydu. Araştırılan düşük materyallerinin subtelomerik bölgeleriyle ilgili abnormalite oranı %6,6 olarak saptandı. Maternal kontaminasyon saptanmayan ve MLPA yöntemiyle araştırılan 30 düşük materyalinin 2'sinde belirlenen

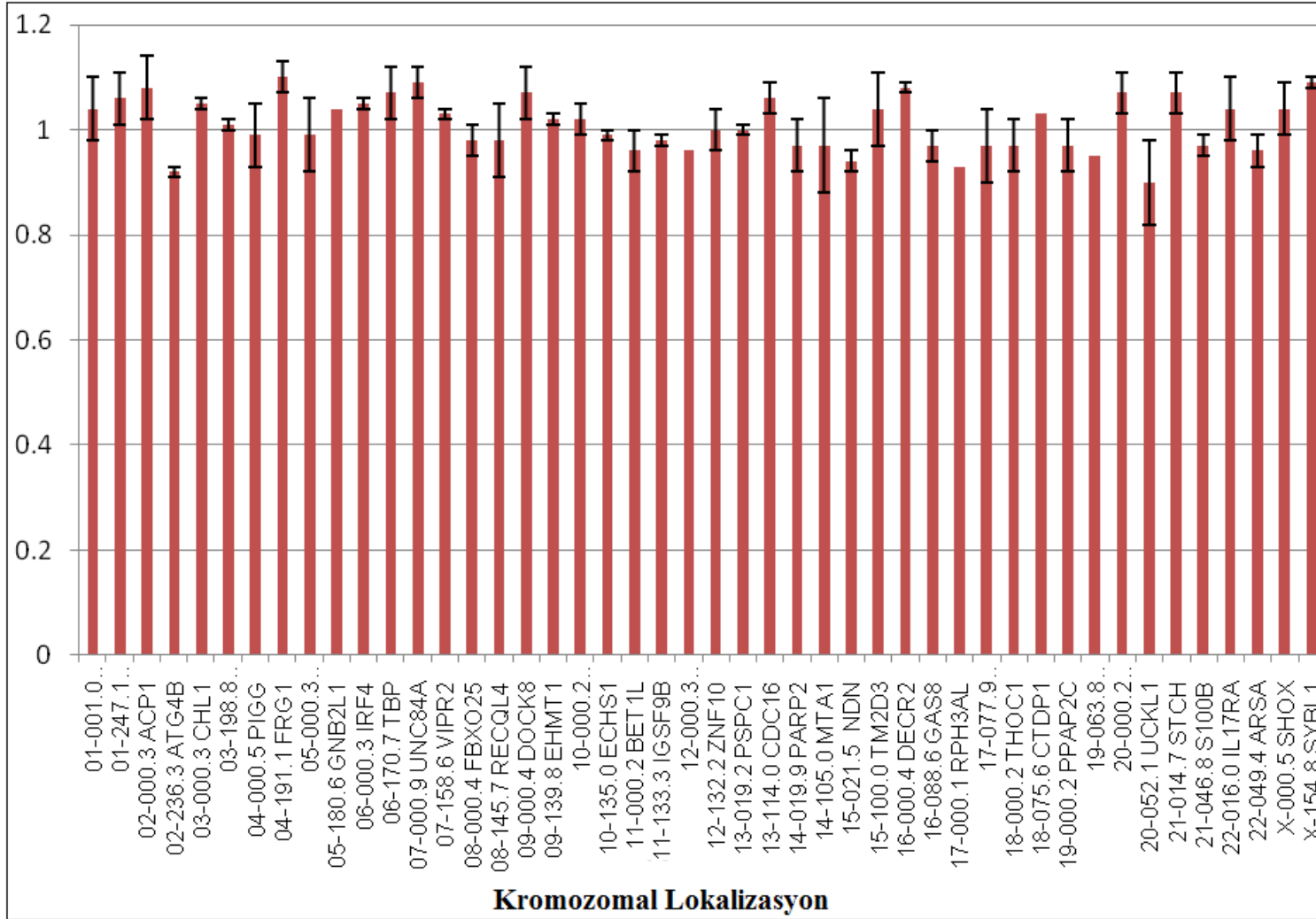
subtelomerik duplikasyon istatistiksel açıdan değerlendirildi. Fisher-Exact testi kullanılarak kontrol grubu ile yapılan karşılaştırma, gözlenen duplikasyonların istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını ortaya koydu ($p>0,05$). Protokolleri MLPA-02, MLPA-07, MLPA-11, MLPA-13, MLPA-14, MLPA-24, MLPA-25, MLPA-27 olan düşük materyallerine ait markırların Coffalyser programı kapsamında yapılan değerlendirmeleri ile ilgili sonuçlar Tablo 10'da sunulmuştur.

Tablo 10. Subtelomerik MLPA sonuçlarını değerlendiren Coffalyser programı sonuç çıktısı. Bu programda delesyonlar turuncu renkle ‐LOH‐ olarak, duplikasyonlar yeşil renkle ‐Gain‐ olarak ifade edilmektedir

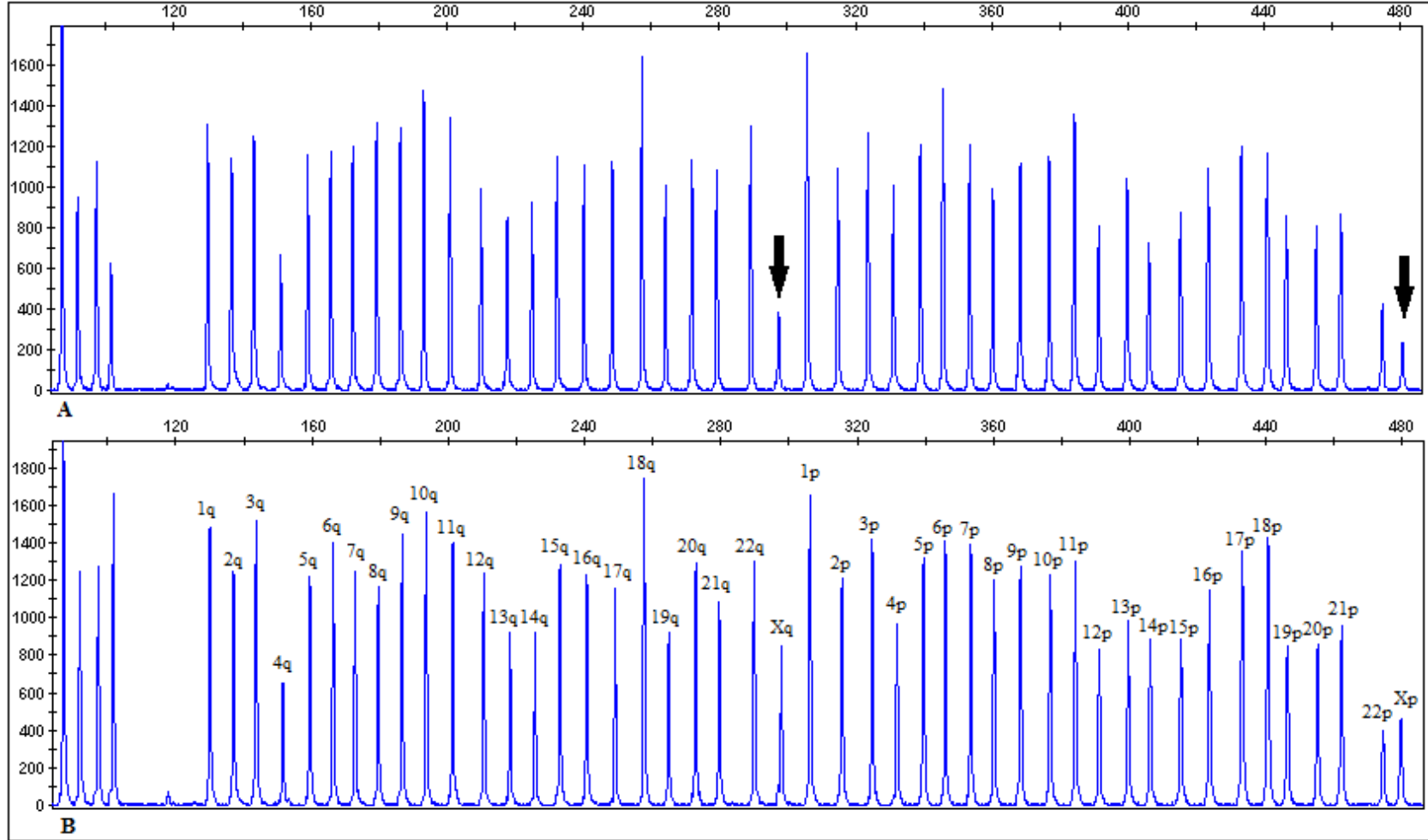
| Gen | Bölge | Protokol | | | | | | | |
|----------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | MLPA-02 | MLPA-07 | MLPA-11 | MLPA-13 | MLPA-14 | MLPA-24 | MLPA-25 | MLPA-27 |
| TNFRSF18 probe 2270-L1762 | 01p36.3 | LOH (0.55) | Normal (1.09) | LOH (0.59) | Normal (1.08) | Normal (0.93) | Normal (0.93) | Normal (1.2) | Normal (0.84) |
| SH3BPSL probe 4084-L3605 | 01q44 | Normal (1.11) | Normal (0.96) | Normal (1.02) | Normal (1.13) | Normal (1.03) | Normal (0.99) | Normal (0.93) | Normal (0.97) |
| ACP1 probe 2709-L2856 | 02p25 | Normal (1.12) | Normal (0.9) | Normal (0.88) | Normal (0.94) | Normal (0.9) | Normal (0.96) | Normal (0.98) | Normal (1.17) |
| ATG4B probe 2781-L3168 | 02q37.2 | Normal (0.96) | Normal (1.01) | Normal (1.05) | Normal (1.01) | Normal (1.03) | Normal (1.01) | Normal (0.98) | Normal (0.77) |
| CHL1 probe 2896-L2363 | 03p26.1 | Normal (1.19) | Normal (0.93) | Normal (0.94) | Normal (0.83) | Normal (0.9) | Normal (1.07) | Normal (0.89) | Normal (1.14) |
| KIAA0226 probe 2690-L2842 | 03q29 | Normal (1.01) | Normal (0.82) | Normal (0.99) | Normal (0.96) | Normal (1.13) | Normal (1.05) | Normal (0.98) | Normal (1) |
| PIGG probe 14440-L16146 | 04p16.3 | Normal (0.88) | Normal (1.07) | Normal (0.98) | Normal (0.82) | Normal (1.06) | Normal (1.08) | Normal (0.88) | Normal (1.13) |
| FRG1 probe 2691-L2843 | 04q35 | Normal (0.85) | Normal (1.22) | Normal (0.89) | Normal (1) | Normal (1.11) | Normal (1) | Normal (1.03) | Normal (1.07) |
| LOC133957 probe 2791-L2233 | 05p15.33 | Normal (1.01) | Normal (0.95) | Normal (0.98) | Normal (1.13) | Normal (0.81) | Normal (1.09) | Normal (0.95) | Normal (0.96) |
| GNB2L1 probe 2790-L2232 | 05q35.3 | Normal (0.94) | Normal (1.03) | Normal (1.04) | Normal (0.96) | Normal (1.03) | Normal (1.05) | Normal (1.1) | Normal (0.86) |
| IRF4 probe 4077-L3462 | 06p25-p23 | Normal (1.01) | Normal (1.09) | Normal (1.01) | Normal (0.98) | Normal (1) | Normal (1.09) | Normal (0.97) | Normal (1.09) |
| TBP probe 2694-L2844 | 06q27 | Normal (1.03) | Normal (0.89) | Normal (0.98) | Normal (0.99) | Normal (0.98) | Normal (1) | Normal (1.01) | Normal (1.03) |
| UNC84A probe 2780-L2857 | 07p22.3 | Normal (1.03) | Normal (0.96) | Normal (1.03) | Normal (1) | Normal (0.89) | Normal (0.95) | Normal (1.05) | Normal (0.81) |
| VIPR2 probe 2793-L3167 | 07q38.3 | Normal (1.04) | Normal (0.99) | Normal (0.97) | Normal (1.01) | Normal (1.07) | Normal (1.01) | Normal (0.95) | Normal (1.11) |
| FBXO25 probe 2715-L0973 | 08p23.3 | Normal (0.98) | Normal (0.91) | Gain (1.36) | Normal (0.91) | Normal (0.84) | Normal (0.92) | Normal (0.94) | Normal (1.07) |
| RECQL4 probe 2695-L0610 | 08q24.3 | Normal (0.95) | Normal (1.14) | Normal (1.21) | Normal (0.92) | Normal (1.03) | Normal (0.99) | Normal (1.23) | Normal (0.96) |
| DOC2B probe 2716-L0888 | 09p24.3 | Normal (1.11) | Normal (0.99) | Normal (0.92) | Gain (1.52) | Normal (0.97) | Normal (0.95) | Normal (0.86) | Normal (1) |
| EHMT1 probe 2792-L2846 | 09q34.3 | Normal (0.89) | Normal (0.91) | Normal (0.94) | Gain (1.5) | Normal (1.01) | Normal (1.06) | Normal (1) | Normal (0.97) |
| ZMYND11 probe 5180-L16343 | 10p14 | Normal (0.97) | Normal (1.07) | Normal (0.77) | Normal (1.01) | Normal (1.03) | Normal (0.97) | Normal (0.93) | Normal (1.24) |
| ECHS1 probe 2696-L2847 | 10q26.2-q26.3 | Normal (1.04) | Normal (0.94) | Normal (1.16) | Normal (0.97) | Normal (0.94) | Normal (1.02) | Normal (1.18) | Normal (0.88) |
| BET1L probe 2784-L2226 | 11p15.5 | Normal (0.98) | Normal (1.11) | Normal (0.96) | Normal (0.95) | Normal (1.01) | Normal (0.97) | Normal (1.03) | Normal (1.04) |
| IGSF9B probe 2697-L2848 | 11q25 | Normal (1.05) | Normal (0.96) | Normal (1.11) | Normal (0.91) | Normal (0.88) | Normal (1.02) | Normal (0.94) | Normal (1.05) |
| JARID1A probe 2787-L2229 | 12p11 | Normal (0.87) | Normal (1.2) | Normal (0.9) | Normal (1.12) | Normal (1.1) | Normal (1.02) | Normal (0.94) | Normal (1.02) |
| ZNF10 probe 2696-L2849 | 12q24.33 | Normal (0.98) | Normal (0.81) | Normal (0.89) | Normal (1.12) | Normal (1.12) | Normal (1) | Normal (1) | Normal (0.93) |
| PSPC1 probe 2717-L3808 | 13q12.11 | Normal (1.07) | Normal (1.21) | Normal (1.14) | Normal (1.18) | Normal (1.03) | Normal (0.87) | Normal (1.22) | Normal (0.75) |
| CDC16 probe 2698-L0753 | 13q34 | Normal (0.95) | Normal (1.03) | Normal (0.93) | Normal (1.13) | Normal (0.98) | Normal (0.96) | Normal (0.87) | Normal (1.01) |
| PARP2 probe 2718-L0732 | 14q11.2-q12 | Normal (1) | Normal (0.9) | Normal (0.89) | Normal (0.99) | Normal (0.88) | Normal (1) | Normal (0.74) | Normal (0.82) |
| MTA1 probe 2699-L2650 | 14q32.3 | Normal (0.88) | Normal (1.02) | Normal (1.1) | Normal (1.01) | Normal (1.04) | Normal (1.04) | Normal (1.14) | Normal (0.85) |
| NDN probe 4026-L1542 | 15q11.2-q12 | Normal (1.09) | Normal (1.05) | Normal (1.03) | Normal (0.96) | Normal (0.99) | Normal (0.99) | Normal (0.89) | Normal (1.03) |
| TM2D3 probe 2701-L2851 | 15q26.3 | Normal (1.07) | Normal (0.89) | Normal (0.93) | Normal (0.94) | Normal (1.01) | Normal (0.96) | Normal (0.95) | Normal (1.11) |
| DEC2 probe 2720-L0648 | 16p13.3 | Normal (0.92) | Normal (1.11) | Normal (0.97) | Normal (1.08) | Normal (0.99) | Normal (1.26) | Gain (2) | Normal (0.74) |
| GAS8 probe 2702-L0734 | 16q24.3 | Normal (0.9) | Normal (0.92) | Normal (1.09) | Normal (1.05) | Gain (1.51) | Gain (1.56) | Gain (1.46) | Normal (0.89) |
| RPH3AL probe 4081-L3465 | 17p13.3 | Normal (1.12) | Normal (0.95) | Normal (1.05) | Normal (0.95) | Normal (1) | Normal (0.99) | Normal (0.87) | Normal (0.99) |
| SECTM1 probe 2703-L3169 | 17q25 | Normal (1) | Normal (1) | Normal (1.18) | Normal (0.99) | Normal (0.95) | Normal (0.98) | Normal (1.03) | Normal (0.87) |
| THOC1 probe 2789-L2231 | 18p11.32 | Normal (1.03) | Normal (0.92) | Normal (0.77) | Normal (1.04) | Normal (0.92) | Normal (0.97) | Normal (1.06) | Normal (1.01) |
| CTDP1 probe 2704-L3607 | 18q23 | Normal (1.16) | Normal (1.02) | Normal (1.09) | Normal (0.98) | Normal (0.85) | Normal (0.92) | Normal (1.04) | Normal (0.96) |
| PPAP2C probe 3501-L2860 | 19p13 | Normal (0.94) | Normal (1.16) | Normal (0.99) | Normal (1.04) | Normal (1.08) | Normal (0.98) | Normal (1.06) | Normal (1) |
| CHMP2A probe 2705-L2853 | 19q13.43 | Normal (0.83) | Normal (1.27) | Normal (1.01) | Normal (1.23) | Normal (1) | Normal (0.99) | Normal (1.08) | Normal (0.99) |
| ZCCHC3 probe 2723-L0641 | 20p13-p12.2 | Normal (0.98) | Normal (1.04) | Normal (1.03) | Normal (0.82) | Normal (1.14) | Normal (1.06) | Normal (1) | Normal (1.25) |
| UCKL1 probe 2706-L0842 | 20q13.33 | Normal (1.03) | Normal (0.92) | Normal (1.1) | Normal (0.78) | Normal (0.86) | Normal (0.94) | Normal (1.1) | Normal (0.84) |
| STCH probe 2724-L0334 | 21q11 | Normal (1.23) | Normal (0.94) | Normal (0.95) | Normal (0.82) | Normal (0.98) | Normal (1.07) | Normal (1.1) | Normal (1.24) |
| S100B probe 2587-L2854 | 21q22.3 | Normal (0.84) | Normal (1.13) | Normal (1.01) | Normal (1.15) | Normal (0.96) | Normal (1.08) | Normal (0.84) | Normal (1.01) |
| IL17RA probe 2725-L16344 | 22q11.1 | Normal (0.92) | Normal (1.26) | Normal (1.07) | Normal (1.05) | Normal (1.21) | Normal (1.04) | Normal (1.14) | Normal (1) |
| ARSA probe 2707-L0661 | 22q13.33 | Normal (1.04) | Normal (1) | Normal (1.14) | Normal (1.06) | Normal (0.89) | Normal (0.91) | Normal (1.2) | Normal (0.9) |
| SHOX probe 3714-L16345 | Xpter-p22.32 | Normal (0.96) | LOH (0.59) | Normal (1.09) | Normal (1.05) | Normal (1.25) | Normal (1.05) | Normal (1.14) | Normal (1) |
| SYBL1 probe 2708-L2855 | Xq28 | Normal (0.82) | LOH (0.52) | Normal (0.78) | Normal (1.1) | Normal (0.99) | Normal (1.15) | Normal (0.85) | Normal (1.01) |



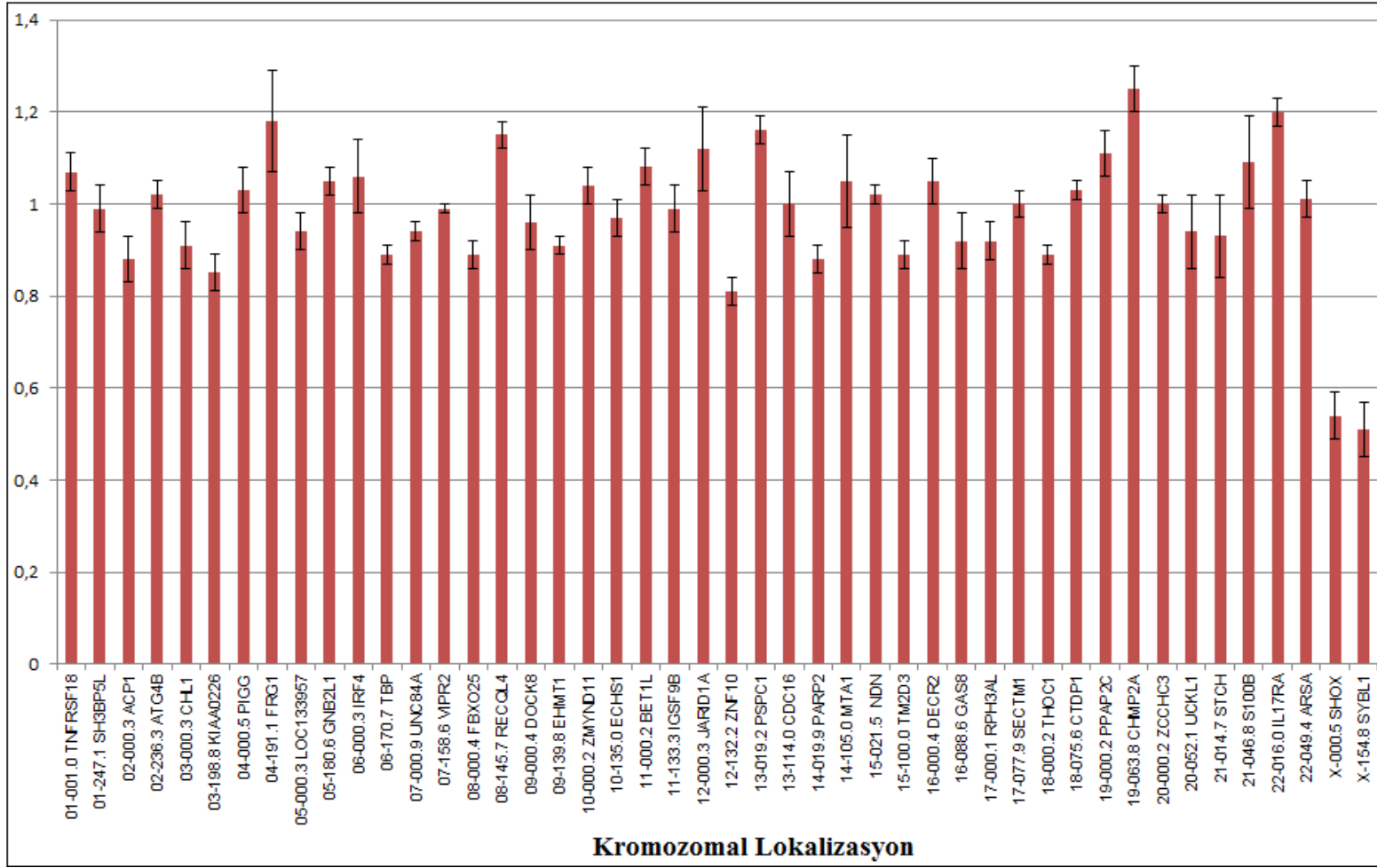
Şekil 16. Kontrol grubunda yer alan ve protokolü MLPA-K14 olan bireyin normal MLPA pikeri



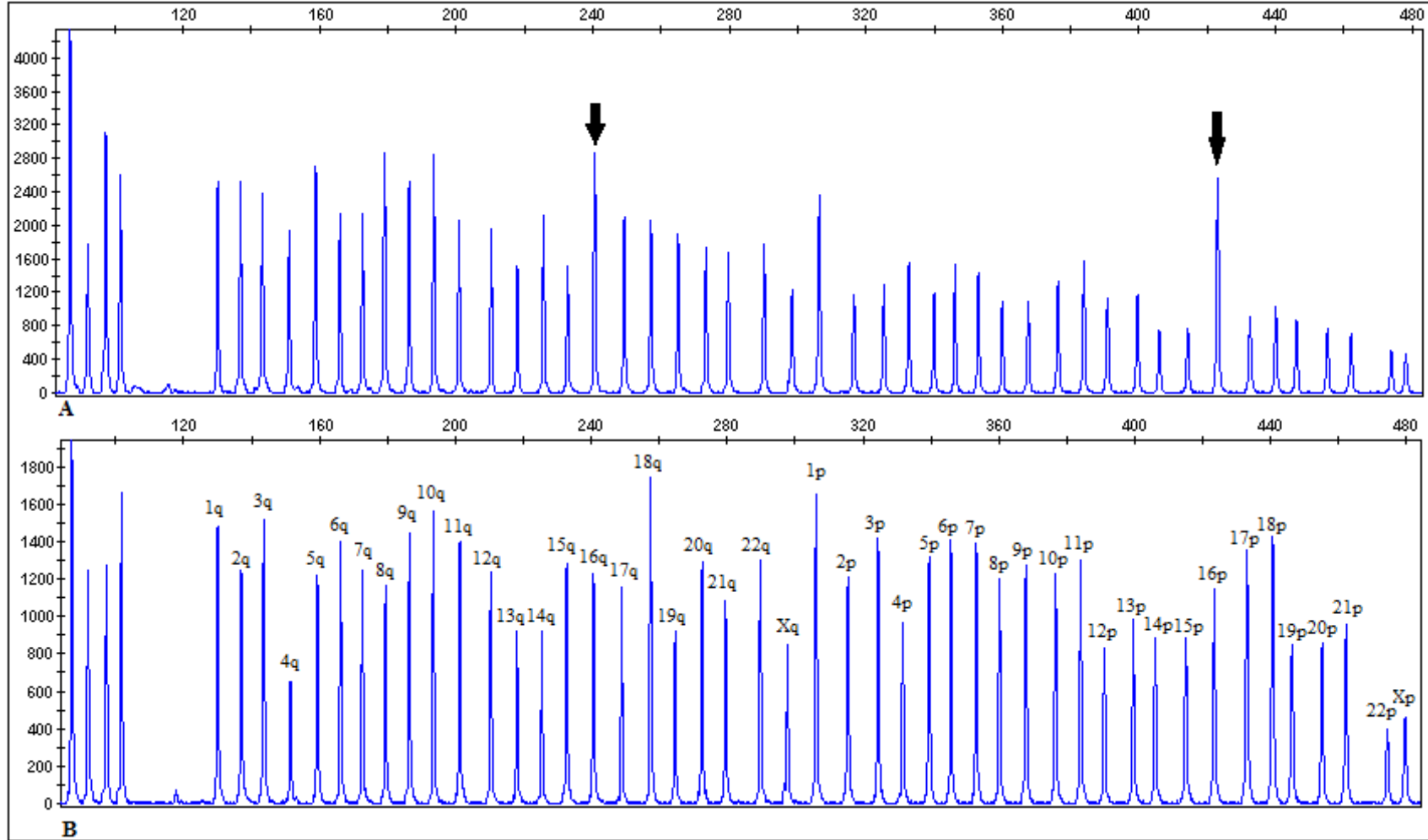
Şekil 17. Protokolü MLPA-23 olan düşük materyalinin normal MLPA pikleri



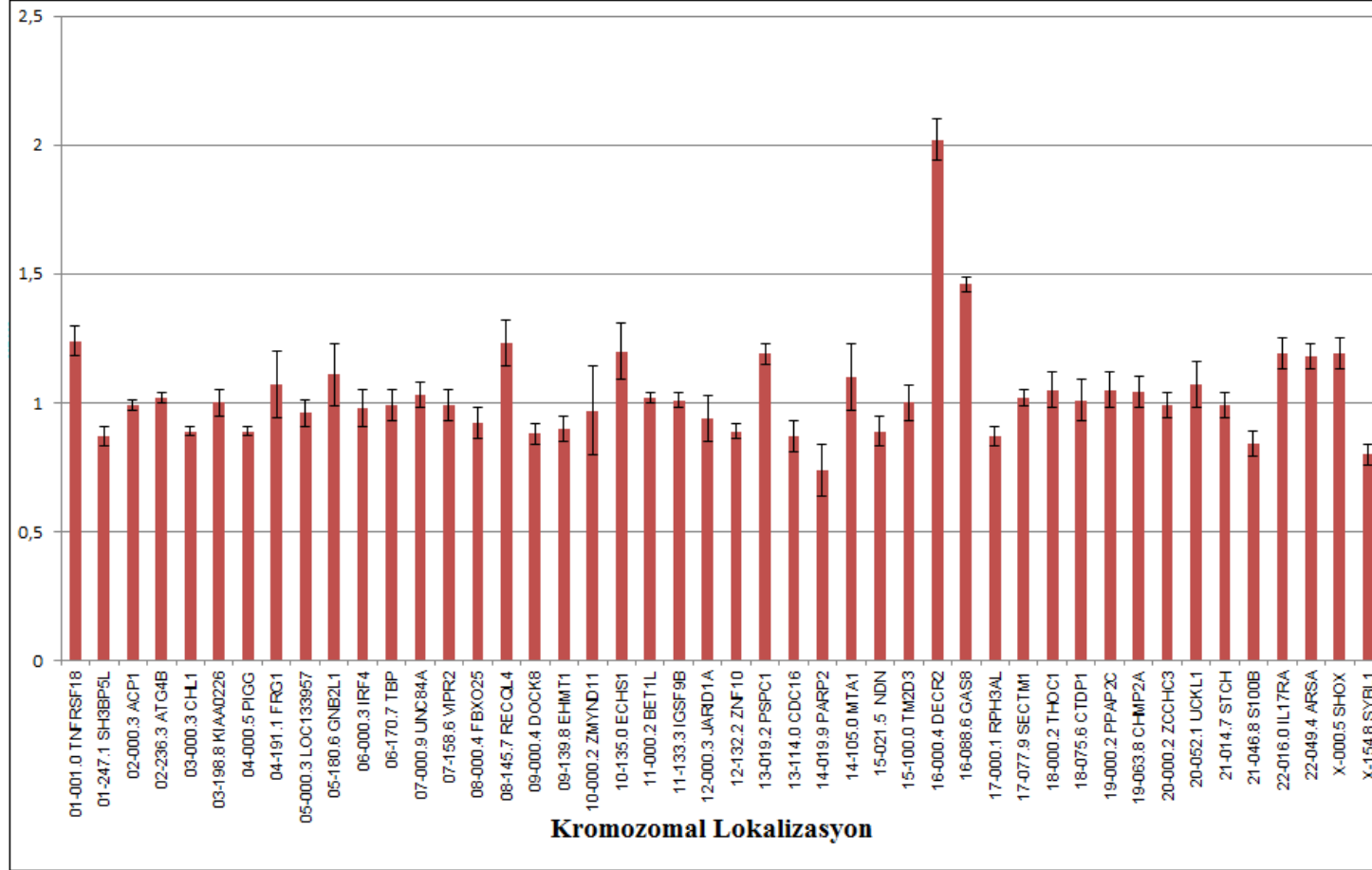
Şekil 18. A: Protokolü MLPA-07 olan düşük materyalinde saptanan Monozomi X ve Genemapper pikleri (Delesyon bölgeleri ok işareti ile gösterilmiştir). **B:** Protokolü MLPA-29 olan düşük materyalinin normal Genemapper pikleri



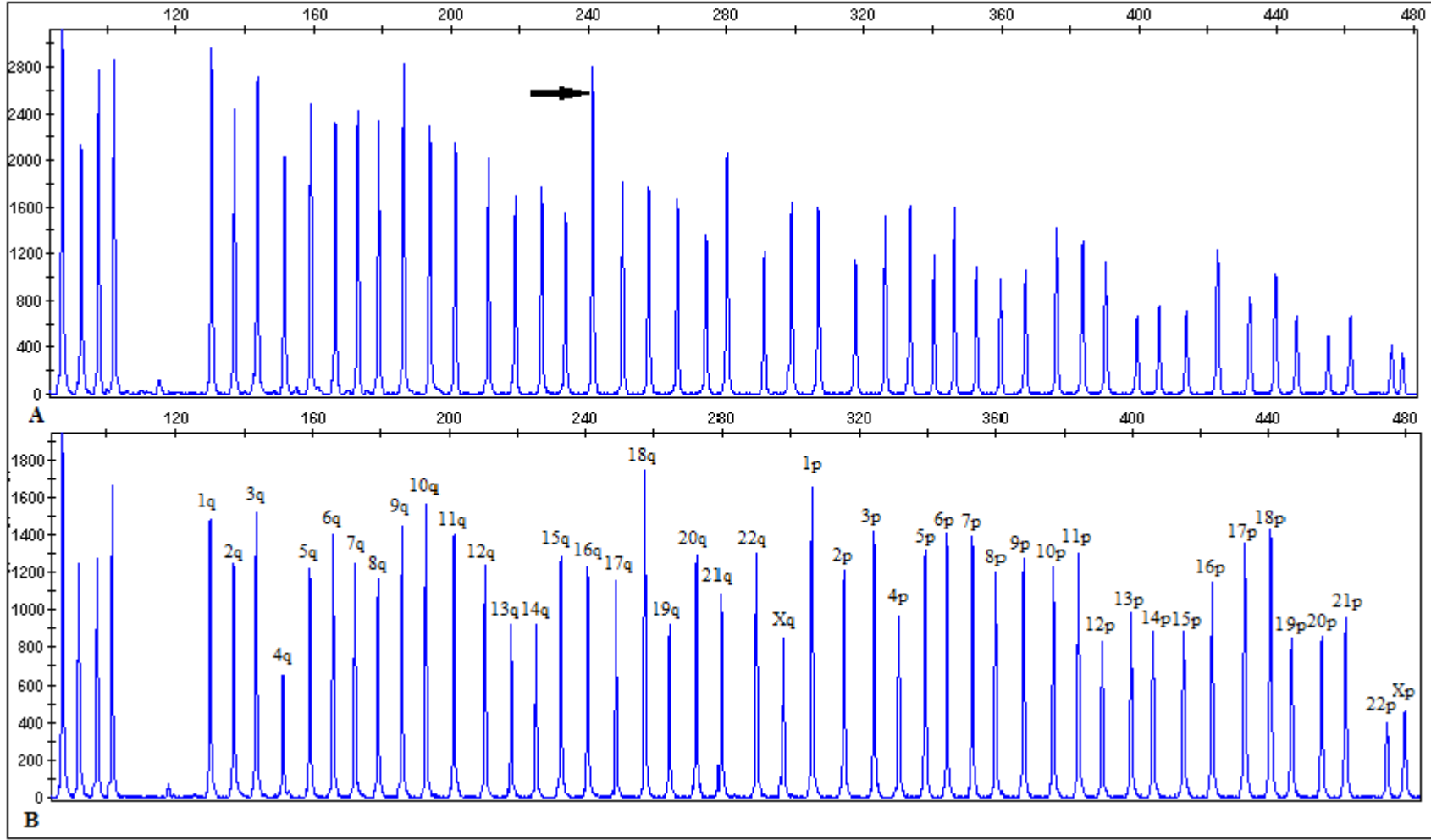
Şekil 19. Protokolü MLPA-07 olan düşük materyalinin SHOX ve SYBL1 markırlarında saptanan delesyon pikleri (Delesyonlar Monozomi X'ten kaynaklanmıştır)



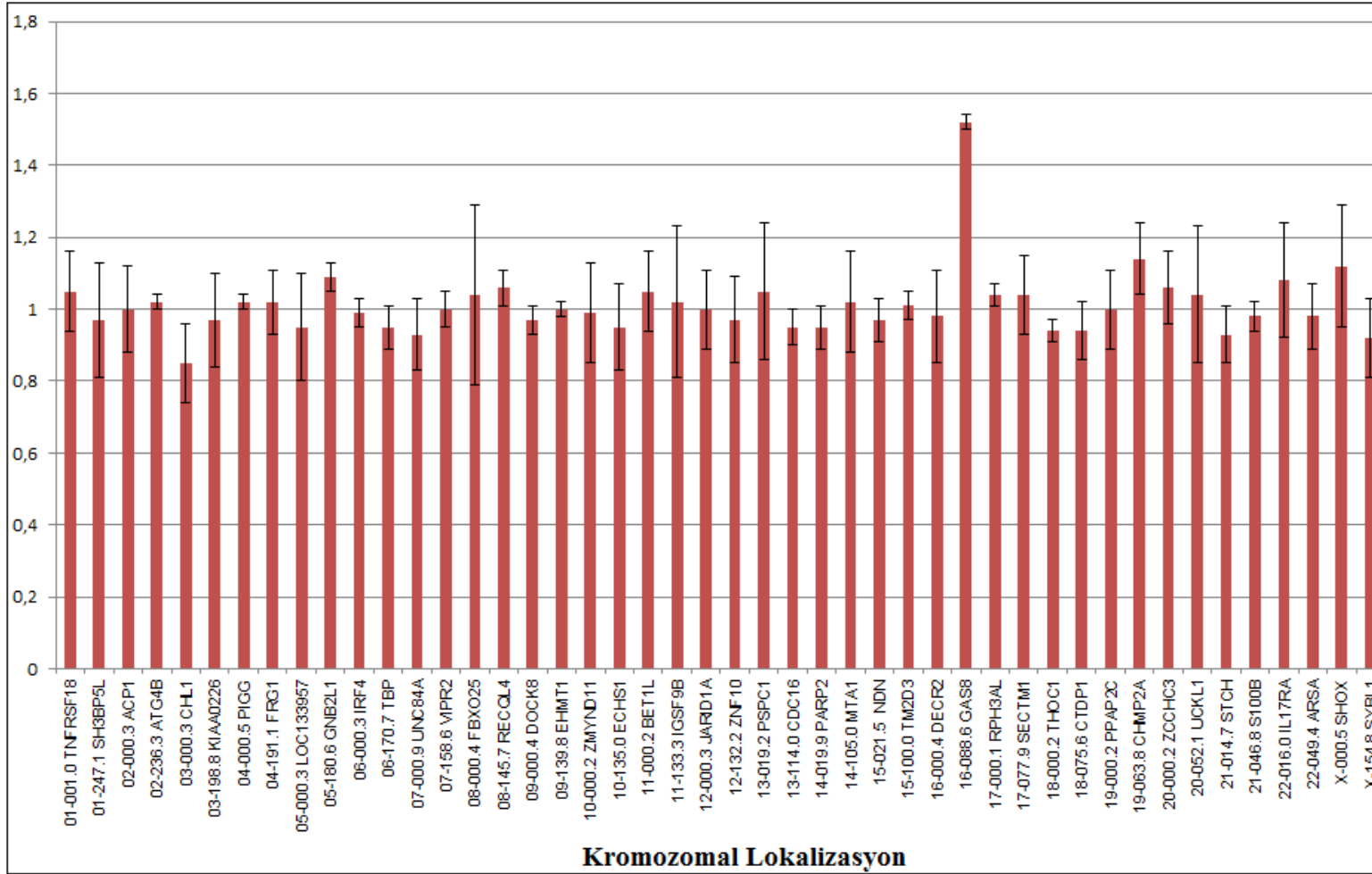
Şekil 20. A: Protokolü MLPA-25 olan düşük materyalinin 16. kromozomunun p ve q kolundaki duplikasyonlarla ilgili Genemapper pikleri (Duplikasyon bölgeleri ok işareti ile gösterilmiştir). **B:** Protokolü MLPA-29 olan düşük materyalinin normal Genemapper pikleri



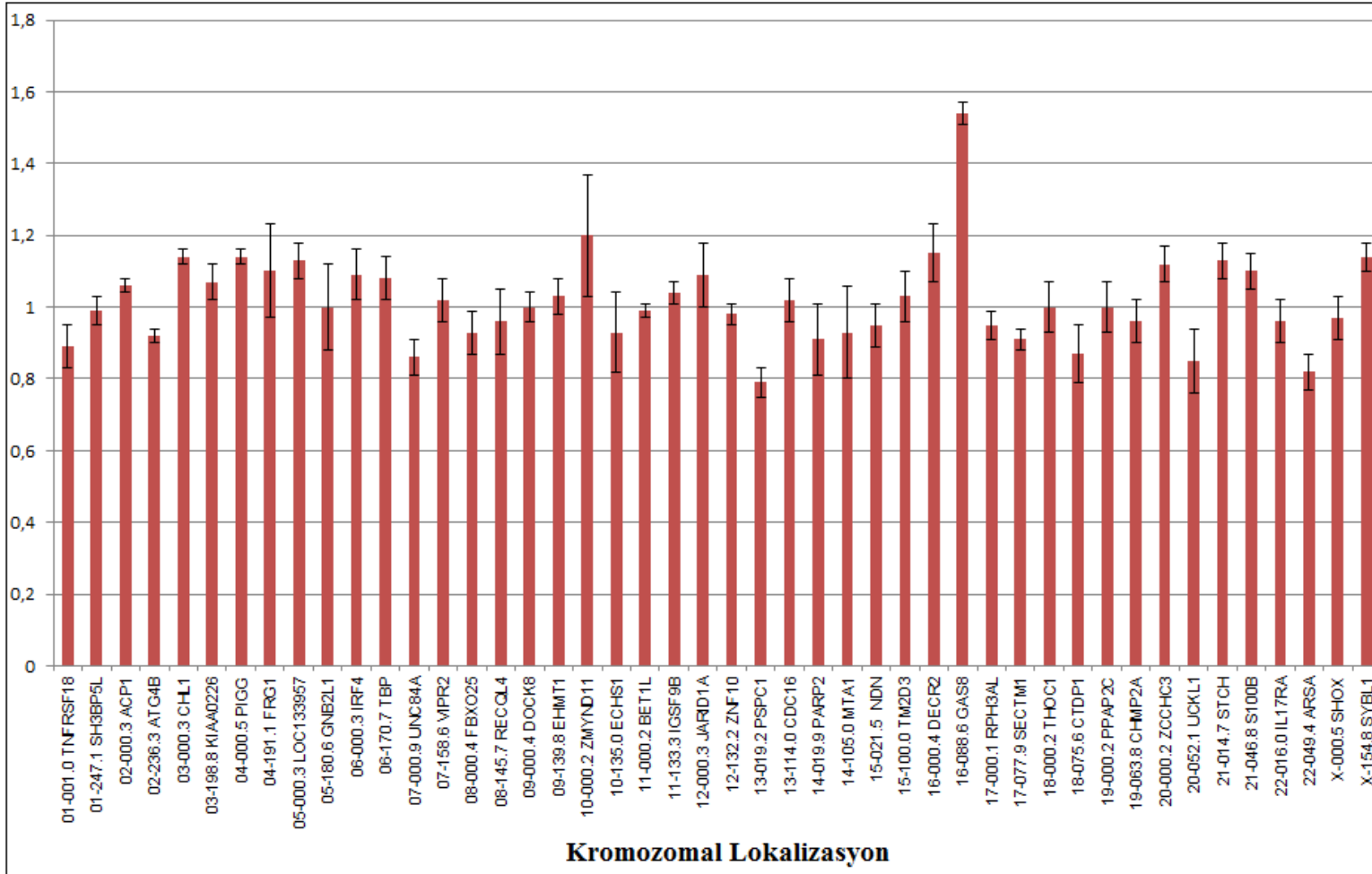
Şekil 21. Protokolü MLPA-25 olan düşük materyalinin DEC2 ve GAS8 markırlarında saptanan duplikasyon pikleri (Duplikasyonlar trizomi 16'dan kaynaklanmıştır)



Şekil 22. A: Protokolü MLPA-14 olan düşük materyalinden saptanan 16q subtelerik bölge duplikasyonunun Genemapper pikleri (Duplikasyon bölgesi ok işareti ile gösterilmiştir). **B:** Protokolü MLPA-29 olan düşük materyalinin normal Genemapper pikleri



Şekil 23. Protokolü MLPA-14 olan düşük materyalinde saptanan 16q subtelerik bölge duplikasyonu ile ilgili pikler (GAS8 markırında duplikasyon bulunmaktadır)



Şekil 24. Protokolü MLPA-24 olan düşük materyalinde saptanan 16q subtelerik bölge duplikasyonu ile ilgili pikler (GAS8 markırında duplikasyon bulunmaktadır)

5. TARTIŞMA

Embriyonal ve fetal gelişmenin en yaygın komplikasyonu klinik olarak tanımlanan gebeliklerin %10-15'inde görülen spontan düşüktür (Joo ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2009; Fabro ve ark., 2011; Van den Berg ve ark., 2012). Düşükler; sporadik ya da tekrarlayan düşükler şeklinde gerçekleşebilmekte ve ardışık iki ya da daha fazla gebeliğin düşükle sonuçlanmasına tekrarlayan düşük denilmektedir. Özellikle tekrarlayan düşüklere genetik abnormaliteler, otoimmün faktörler, yapısal abnormaliteler, enfeksiyonlar ve endokrin hastalıkların neden olduğu bildirilmiştir (Fabro ve ark., 2011). Multifaktöriyel kalıtımın da tekrarlayan düşüklere neden olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, X inaktivasyonunun, genomik imprinting'in, tek gen mutasyonlarının, kromozomal kararsızlık ve abnormalitelerin de tekrarlayan düşüklere neden olduğu bildirilmiştir (Dutta ve ark., 2011). İlk trimesterde düşüklerden sorumlu en önemli etkeninin kromozomal abnormaliteler olduğu vurgulanmıştır (Şahin, 2008). Tekrarlayan düşüklerin etiyolojisinde rol oynayan etkenlerin çeşitliliği ve etiyolojiye katkısının henüz açıklığa kavuşturulamaması ilgiye değer bulunmuştur (Şahin, 2008; Tayyar, 2011). Kromozomların subtelomerik bölgeleriyle ilgili abnormalitelerin klasik sitogenetik yöntemlerle saptanamaması, subtelomerik bölgeleri tutan delesyon ve duplikasyonların MLPA yöntemiyle değerlendirilmesini gerekli kılmıştır. Bu araştırma; düşük materyallerinde klasik sitogenetik yöntemlerle saptanamayan subtelomerik bölgelerle ilgili delesyon ve duplikasyonların MLPA yöntemi uygulanarak incelenmesi ve bu abnormalitelerin düşüklere sıklığının saptanmasıyla birlikte MLPA yönteminin prenatal tanı uygulamalarına uyarlanması amacıyla yürütülmüştür.

Araştırma grubunda yer alan aile öykülerinden sağlanan maternal yaş, düşük sayısı ve düşüğün gerçekleştiği gestasyonel haftayla ilgili veriler değerlendirilmiştir. Literatürde maternal yaşa bağlı olarak, özellikle 30-35 yaşlarından sonra, fertilité potansiyelinde azalmave spontan düşük riskinde artış olduğu bildirilmiştir (Bulletti ve ark., 1996; Andersen ve ark., 2000; Marquard ve ark., 2010). Araştırma grubunda düşük yapmış annelerin yaş ortalaması $30,68 \pm 5,74$ olarak saptandı. Yaş ortalamasının $30,68 \pm 5,74$ olması, araştırma grubunda düşüklerin ileri yaş nedeniyle olmadığını göstermiştir. Aile öyküleri, düşük ortalamasının $2,2 \pm 1,4$ olduğunu, düşüklerin %94,9'unun ilk trimesterde gerçekleştiğini ve ortalama gebelik haftasının da $9,15 \pm 4,17$ olduğunu ortaya koymuştur. Düşüklerin gestasyonel haftaları literatürle kıyaslandığında

(Joo ve ark., 2009; Tayyar, 2011), araştırma grubu düşüklerin erken dönem düşüklerine tekabül ettiği anlaşılmıştır. Üstün ve ark., (1998), ilk trimester spontan düşüklerinde kromozomal abnormalite oranını %50-60 ve ikinci trimesterde ise %20 olduğunu tespit etmiştir. Cramer ve Wise (2000), ilk trimesterde gerçekleşen düşüklere kromozomal abnormalitelerin neden olduğunu ifade etmiştir. Araştırma grubunda gestasyonel hafta ortalamasının $9,15 \pm 4,17$ olarak saptanması ve düşüklerin %94,9'unun ilk trimesterde gerçekleştiğinin anlaşılması, ileri çalışmalarla düşüklerin kromozomal abnormalitelerle ilişkisinin araştırılmasını gerektirdiği kanaati vermiştir. Maternal kontaminasyon saptanmayan 43 düşük materyalinin sitogenetik analizleri; %44,2'sinin normal karyotipli ve normal karyotipli düşüklerin %68,4'ünün 46,XX ve %31,5'inin de 46,XY karyotipli olduğunu göstermiştir. Araştırılan düşüklerin %23,3'ünde sayısal kromozom abnormalitesi saptanmıştır. Sayısal kromozom abnormalitelerinin %20'sinin monozomi X, %30'unun trizomi, %40'ının triploidi ve %10'unun da tetraploidi olduğu tespit edilmiştir. Maternal kontaminasyon saptanmayan 43 düşük materyalinin %4,7'sinde yapısal kromozom abnormalitesi görülmüştür. Cramer ve Wise (2000), Carp (2008), Rajcan-Separovic ve ark. (2010), spontan düşüklerin %50-70'inin kromozomal abnormalitelerden kaynaklandığıyla ilgili sonucu, araştırma grubunun verilerini destekler niteliktedir. Kano ve ark. (2009)'nın tekrarlayan düşükleri olan kadınların düşük materyallerinde yaptığı çalışma, düşüklerin %85,4'ünün normal ve bunların %90,8'inin 46,XX, %9,2'sinin de 46,XY karyotipli olduğunu ve kromozomal abnormalite oranının da %14,6 olduğunu göstermiştir. Araştırma grubu düşük materyallerinin sitogenetik analiz sonuçları ile Kano ve ark. (2009)'nın sonuçları arasında dikkate değer bir uyum görülmemiştir. Bu uyumsuzluğun; Kano ve ark.(2009)'nın maternal kontaminasyon ihtimalini dışlamaları ve yüksek oranda 46,XX karyotipi saptamalarından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Fabro ve ark.(2011), araştırdıkları düşük materyallerinin %61'inde normal karyotip ve %39'unda kromozomal abnormalite saptamış, normallerin %64'ünde 46,XX, %36'sında ise 46,XY karyotipi belirlemiş ve ayrıca otozomal trizomilerin, triploidilerin ve monozomi X'in düşük materyalinde en sık rastlanılan abnormaliteler olduğunu göstermiştir. Fabro ve ark.(2011)'nin, sonuçları ile araştırma grubunda saptanan normal karyotip ve kromozomal abnormalite sonuçları uyumlu bulunmuştur. Kwinecka-Dmitriew ve ark.(2010)'nca düşüklerde yapılan bir araştırma, en sık gözlenen sayısal

abnormalitelerin trizomi, triploidi ve monozomi X ve kromozomal abnormalitelerin de %37,5 oranında olduğu ortaya konmuştur. Rolnik ve ark. (2010), kromozomal abnormalite oranını %55,4, normal karyotip oranını %33,9 ve en sık gözlenen abnormalitelerin de trizomi 16, triploidi ve monozomi X olduğunu belirlemiştir. Ljunger ve ark. (2005), kromozomal abnormalite oranını %61 ve en sık görülen abnormalitelerin de trizomi 16, triploidi ve monozomi X olduğunu saptamıştır. Hogge ve ark. (2003), ilk trimester düşüklerde kromozomal abnormalite oranını %69,4 olarak göstermiştir. Carp ve ark. (2001), kromozomal abnormalite oranını %29 ve sık gözlenen abnormalitelerin de trizomi 16, triploidi ve monozomi X olduğunu saptamıştır. Carp ve ark. (2001), Hogge ve ark. (2003), Ljunger ve ark. (2005), Kwinecka-Dmitriew ve ark. (2010), Rolnik ve ark. (2010), Fabro ve ark. (2011), tarafından yapılan çalışmalarda saptanan kromozomal abnormalite oranlarının bir kısmı, araştırma grubunda saptanan oranlarla uyumluluk sağlamasa da, bazıları ve özellikle trizomi 16, triploidi ve monozomi X bulgularının uyumluluk sağladığı görülmüştür. Diğer yandan, Hogge ve ark. (2003), Ljunger ve ark. (2005), Rolnik ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmalardan saptanan kromozomal abnormalite sonuçları ile bu araştırma sonuçlarının uyumluluk göstermediği gözlenmiştir.

Sayısal kromozom abnormalitelerinin yanı sıra, yapısal kromozom abnormalitelerinin de düşüklere neden olduğu bildirilmiştir. Özellikle translokasyonların, inversiyonların, delesyonların ve duplikasyonların spontan düşüklere yaklaşık %2'sinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir (The ESHRE Capri Workshop Group, 2008). Fryns ve Buggenhout (1998), tekrarlayan düşüklere olan çiftlerde yapısal abnormalite oranını %5,34 ve Dutta ve ark. (2011) ise yapısal abnormalite oranını %3,35 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, Hogge ve ark. (2003), düşüklere yapısal abnormalite oranını %6,2 ve Ljunger ve ark. (2005) ise %4,6 oranında saptamışlardır. Araştırma grubunda saptanan %4,7'lik yapısal abnormalite oranı, literatürün bu bulgularıyla uyumluluk göstermiştir.

Sitogenetik analizleri olumsuz etkileyen faktörlerden biri kültür başarısızlığıdır. Kültür başarısızlığı; Ljunger ve ark. (2005), %14,8, Rolnik ve ark. (2010), %10,7, Carp ve ark. (2001), %25 ve Fritz ve ark. (2001), iki farklı merkezle ilgili olarak %12,5 ve %30 oranında saptamışlardır. Araştırılan 60 düşük materyalinde kültür başarısızlığı oranı %20 olarak gerçekleşmiş ve bu oran literatür bulgularıyla

uyumluluk sağlamıştır. Kültür başarısızlığı nedeniyle karyotipleri belirlenemeyen ve maternal kontaminasyon olmadığı saptanan 12 düşük materyalinin 10'u QF-PCR ve MLPA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular literatür bilgileriyle kıyaslandığında, kültür başarısızlığı nedeniyle karyotip analizi yapılamayan düşük materyallerinin 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarının ve tüm telomerlerin QF-PCR ve MLPA yönteminin kombinasyonu ile değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Düşük materyallerinin analizde, yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçların elde edilmesine yol açan maternal kontaminasyonun dışlanması gerektiği ifade edilmiştir (Diego-Alvarez ve ark., 2005). Maternal kontaminasyondan genetik analizlerin olumsuz etkilendiği ileri sürülmüşse de, maternal kontaminasyonu dışlayıcı analizlere başvurulmamıştır. Literatürden, bir çok araştırmacının maternal kontaminasyonun varlığını 46,XX ve 46,XY karyotip oranlarını belirleyerek ortaya koyduğu anlaşılmaktadır (Carp ve ark., 2001; Hogge ve ark., 2003; Fabro ve ark., 2011). Bazı araştırmacılar, 46,XX karyotipli düşük materyallerinde maternal kontaminasyon oranının %29-58 arasında değiştiğini ileri sürmüşlerdir (Lathi ve ark., 2012). Literatürde cinsiyet dağılım oranı dikkate alınarak maternal kontaminasyonun belirlenmesi yaklaşımı, objektif sonuçlara yol açmayacağı düşüncesiyle benimsenmemiştir. Jobanputra ve ark. (2011), düşük materyali kültürlerinin %41,4'ünde maternal, %45,7'sinde fetal ve %11,4'ünde de maternal fetal kaynaklı hücre grupları tespit etmiştir. Borovik ve ark. (2008), düşük materyali kültürlerinde maternal kontaminasyonu %4,4 ile %29 oranında, Zhang ve ark. (2009) ise %4,7 ile %11,4 arasında gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır. Araştırma grubunda yer alan 60 düşük materyalinden maternal kontaminasyon analizi yapılan 52'sinde %17,3 oranında maternal kontaminasyon ve fetal karyotip %82,6 oranında gözlenmiştir. QF-PCR yöntemiyle düşük materyallerinin değerlendirilmesi, yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçların elde edilmesine yol açan maternal kontaminasyonu dışlamış ve sitogenetik analizle elde edilen düşük materyallerine ait karyotipleri belirlemeye katkı sağlamıştır.

Kromozomların subtelomerik bölgelerinin rekombinasyona uğrama potansiyeli taşıdığı, bu bölgelerde yer alan DNA tekrarlarının yeniden düzenlenmelerin gerçekleşmesine temel teşkil ettiği ve telomerleri kapsayan dengesiz yeniden

düzenlenmelerin idiyopatik mental retardasyon ile konjenital malformasyonlara yol açtığı ileri sürülmüştür (Durak ve ark., 2010). Yakut ve ark. (2002), tekrarlayan düşükleri olan çiftlerde subtelomerik FISH yöntemiyle yaptıkları bir çalışma ile bir erkekte 3q ve 10p'nin subtelomer bölgeleriyle ilgili bir resiprokal translokasyon olduğunu göstermiş ve bu sonuca dayanarak tekrarlayan düşükleri olan çiftlerde subtelomerik abnormalitelerin araştırılmasını önermiştir. Rio ve ark.(2002), idiyopatik mental retardasyonlu hastaların %10,7'sinde subtelomerik bölgelerle ilgili abnormaliteler saptamıştır. Subtelomerik bölgelerle ilgili abnormalitelerin etkilerini değerlendiren araştırmalar, abnormalitelerin %1,8 ile %5,9 oranları arasında ve polimorfizmlerin ise %0 ile %6,2 arasında değiştiğini göstermiştir (Ahn ve ark., 2007). Telomerik ve subtelomerik bölgeleri tutan CNV'lerin ve translokasyonların tekrarlayan düşüklere neden olduğu ileri sürülmüşse de (Brackley ve ark., 1999; Wakui ve ark., 1999; Knight ve Flint, 2000; de Vries ve ark., 2001; Benzacken ve ark., 2002; Boehm ve ark., 2004; Alkuraya ve ark., 2006), bu konuda yeterli sayıda araştırma yapılmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada MLPA yöntemiyle araştırılan 30 düşük materyalinin 2'sinde 16. kromozomun q kolu subtelomerik bölgesinde duplikasyon saptanmıştır. Düşük materyallerine ait sonuçlar ile kontrol grubu sonuçlarının Fisher-Exact testi ile karşılaştırılması, 2 düşük materyalinde saptanan subtelomerik bölge duplikasyonunun istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını göstermiştir ($p>0,05$). Ancak, %6,6 oranında saptanan subtelomerik duplikasyonun küçük bir araştırma grubuna ait olması gerçeği dikkate alındığında, bilimsel bir sonuca ulaşabilmenin daha ileri araştırmaların yapılmasını gerektirdiği kanaatine varılmıştır. Araştırma grubunun %6,6'lık duplikasyon oranı, literatürle kıyaslandığında, Rio ve ark. (2002)'inca mental retardasyonlu hastalarda saptanan %10,7 oranından düşük ve düşük materyallerinde Donaghue ve ark. (2010)'inca saptanan %1,8 oranından ise yüksek olduğu anlaşılmıştır. Fakat, Donaghue ve ark. (2010)'nın araştırma grubunun hazırdaki araştırma grubundan büyük oluşu dikkate alındığında, %6,6'lık oranınampirik bir değere tekabül ettiği sonucuna varılmıştır. Araştırma grubunda saptanan 16q duplikasyonu ile Diego-Alvarez ve ark. (2007)'nin düşük materyallerinde yaptığı bir araştırma sonucunda saptanan 16p ve 1p'de duplikasyonu arasında bir uyumluluk görülmemesine rağmen, 16q ile 16p duplikasyonlarının düşüklere yol açabileceğini düşündürmüştür. Diego-Alvarez ve ark.

(2007), düşük materyallerinde MLPA yönteminin telomerik abnormaliteleri saptamak amacıyla prenatal tanıda kullanılabileceğini rapor etmeleri, hazırdaki araştırma sonuçlarıyla uyumluluk sağlamıştır. Mademont-Soler ve ark. (2010)'ınca ultrasonografi sonucu abnormalite saptanan fetüslerde yapılan çalışma ile subtelomerik bölge abnormalitelerinin MLPA yöntemi ile araştırılmasına vurgu yapılmış ve subtelomerik abnormalite oranı da %1,3 olarak saptanmış ise de genel olarak literatüre bakıldığında; Bruno ve ark. (2006), Diego-Alvarez ve ark. (2007), Gu ve ark. (2009), Lei ve ark. (2009), Carvalho ve ark. (2010), Donaghue ve ark. (2010), McClelland ve ark. (2011)'nın MLPA yöntemiyle düşük materyallerinde yaptıkları araştırmalarda, MLPA yönteminin konvensiyonel sitogenetik yöntemlere alternatif bir tanı uygulaması olarak kullanılıp kullanılmayacağını değerlendirmeyi amaçladıkları anlaşılmıştır. Bu araştırmaların düşüklerle subtelomerik abnormaliteler arasında bir ilişki kurma amacı taşımamaları ve sadece MLPA yönteminin kullanılabilirliğinin yararı üzerine odaklanmış olmaları nedeniyle, araştırma grubumuzun sonuçlarıyla bu araştırmaların sonuçlarını tartışmak mümkün olamamıştır. Bu araştırmaların konuları ile hazırdaki araştırmanın konusu arasındaki farklılık, araştırma konumuzun özgün ve orijinal olduğunu düşündürmüştür.

16q subtelomer bölgesine özgü MLPA probunun bağlandığı kromozomal bant lokalizasyonu 16q24.3'tür. Bu bant bölgesi, growth arrest-specific 8 (GAS8) geninin yerleştiği bölgeye tekabül etmektedir. GAS8; memeli hücrelerinde dinein regülasyonunu sağlayan bölgelerde lokalize olan mikrotübül bağlayıcı bir protein olmanın yanı sıra, tümör baskılayıcı özelliğinden dolayı, delesyonla oluşan heterozigozite kaybı ile meme ve prostat kanserinin gelişimine de sebep olmaktadır (<http://omim.org>). Yeh ve ark. (2002), GAS8 ürünlerinin spermatogenezde de rol aldığını ileri sürmüştür. Ahn ve ark. (2007), subtelomerik 16q probunda duplikasyon saptamış ve bu duplikasyonun gelişme geriliği, yarı damak ve işitme kaybına neden olabileceği vurgulanmıştır. Ahn ve ark (2007)'nın 16q duplikasyonu ile ilgili ifade ettikleri bulgular ile hazırdaki araştırma bulgularının uyum sağladığı görülmüştür. Bu çalışmada düşük materyallerinde sitogenetik yöntemlerle saptanamayan subtelomerik değişimlerin varlığı MLPA yöntemiyle ortaya konmuştur. Sonuç olarak, subtelomerik bölge abnormaliteleri ile düşükler arasında pozitif bir ilişkinin ortaya konması daha kapsamlı araştırmaların yapılmasıyla mümkün olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Maternal kontaminasyon saptanmayan 43 düşük materyalinin %23,3'ünde sayısal ve %4,7'sinde yapısal kromozom abnormalitesi saptandı. Sayısal abnormalitelerin %20'sinin monozomi X, %30'unun trizomi, %40'ının triploidi ve %10'unun da tetraploidi olduğu ve yapısal abnormalite olarak 46,XY,der(1)t(1;2)(p34,2;q14,1) ile 46,XX,der(1)t(1;8)(p36,2;p22) translokasyonu tespit edildi.

Araştırma grubu 60 düşük materyalinde kültür başarısızlığının %20 oranında olduğu gözlemlendi. Kültür başarısızlığı nedeniyle karyotipleri belirlenemeyen ve maternal kontaminasyon olmadığı saptanan 12 düşük materyali QF-PCR ve MLPA yöntemi ile değerlendirildi. Bulgular, kültür başarısızlığı nedeniyle karyotip analizi yapılamayan düşük materyallerinin 13, 18, 21, X ve Y kromozomları ile tüm kromozom telomerlerinin QF-PCR ve MLPA yönteminin birlikte kullanılarak değerlendirilmesi gerektiğini gösterdi.

Maternal kontaminasyon analizi yapılan 52 düşük materyalinin %82,6'sında kontaminasyon saptanmazken, %17,3'ünde kontaminasyon saptandı. Düşük materyallerinin QF-PCR ile değerlendirilmesi, yanlış pozitif ya da yanlış negatif sonuçlara yol açan maternal kontaminasyonu ortaya çıkardığı gibi, analiz sonucu elde edilen karyotiplerin doğrulanmasına da katkı sağladı.

MLPA yöntemiyle araştırılan 30 düşük materyalinin 2'sinde 16. kromozomun q kolunda subtelomerik duplikasyon saptandı. Düşük materyallerine ait bulgular ile kontrol grubunun bulguları Fisher-Exact testi ile karşılaştırıldığında, subtelomerik bölge duplikasyonu ile düşüklükler arasındaki ilişkinin istatistiksel açıdan anlamsız olduğu anlaşıldı ($p>0,05$). Ancak, %6,6 olan subtelomerik duplikasyon oranının küçük bir araştırma grubuna ait olması, daha çok araştırma yapılmasını düşündürdü. Sitogenetik yöntemlerle saptanamayan subtelomerik abnormalitelerin varlığı ise MLPA yöntemiyle ortaya kondu. Literatürdeki araştırmalardan farklı bir hipotezi konu edinen bu araştırmanın, ilk kez yapılmış oluşu da dikkate alındığında, özgün ve orijinal olabileceğine kanaat getirildi. Sonuçta, subtelomerik abnormalitelerin düşüklere neden olup olmadığına dair objektif bir sonuca varılabilmesi, ancak, çok sayıda araştırmanın yapılmasıyla mümkündür.

KAYNAKLAR

- Ahn JW, Ogilvie JM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C, Mann K. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Medical Genetics*. 2007;8(9):1-13.
- Alkuraya KS, Martin CL, Kimonis VE. Recurrent miscarriage in a carrier of a balanced cytogenetically undetectable subtelomeric rearrangement: how many are we missing? *Prenat Diagn*. 2006;26:291-295.
- Al-Zahrani J, Al-Dosari N, AbuDheim N, Alshidi TA, Colak D, Al-Habit O, Al-Odaib A, Sakati N, Meyer B, Ozand PT, Kaya N. Chromosome 12q24.31-q24.33 deletion causes multiple dysmorphic features and developmental delay: First mosaic patient and overview of the phenotype related to 12q24qter defects. *Molecular Cytogenetics*. 2011;4(9):1-5.
- Ambartsumyan G, Clark AT. Aneuploidy and early human embryo development. *Human Molecular Genetics*. 2008; 17(1):10-15.
- Andersen AMN, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ*. 2000;320:1708-1712.
- Aneufast User's Manual. Multiplex QF-PCR Kit. V2, S.L. Amigo 12, E08021 BARCELONA, molGENTIX. Aug 2011;1-38.
- Atabekoğlu CS, Engin Y, Üstün Y, Aytacı R. Üreme Fizyolojisi ve Adezyon Molekülleri. *Ankara Üniv. Tıp Fak. Mecmuası*. 2002;55(1):85-92.
- Atlı K, Bozcuk N. Telomer ve Hücresel Yaşlanma. *Turkish Journal of Geriatrics*. 2002;5(3):111-114.
- Australian Government, National Health and Medical Research Council. Discussion Paper: 'Human Embryo'-A Biological Definition. December 2005.
- Bahar L, Kahraman S, Akkuş M, Baykal T. Fertil kadınlar ve implantasyon başarısızlığı olan infertil kadınlarda endometriumun ince yapı ve immünohistokimyasal değerlendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi*. 2012;39(2):269-275.
- Başaklar AC, Sönmez K. Langman's Medikal Embriyoloji (çeviri)'de, 7. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık. 1996;1-137.
- Benkhalifa M, Kasakyan S, Clement P, Baldi M, Tachdjian G, Demirolo A, Gurgan T, Fiorentino F, Mohammed M, Qumsiyeh MB. Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenat Diagn*. 2005;25:894-900.

- Benzacken B, Carbillon L, Dupont C, Siffroi JP, Monier-Gavelle F, Bucourt M, Uzan M, Wolf JP. Lack of submicroscopic rearrangements involving telomers in reproductive failures. *Human Reproduction*. 2002;17(5):1154-1157.
- Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccone F. Rapid Detection of Subtelomeric Deletion/Duplication by Novel Real-Time Quantitative PCR Using SYBR-Green Dye. *Human Mutation*. 2004;23:368-378.
- Borovik CL, Perez ABA, da Silva LRJ, Krepischi-Santos ACV, Costa SS, Rosenberg C. Array-CGH testing in spontaneous abortions with normal karyotypes. *Genetics and Molecular Biology*. 2008;31(2):416-422.
- Brackley KJ, Kilby MD, Morton J, Whittle MJ, Knight SJL, Flint J. A Case of Recurrent Congenital Fetal Anomalies Associated with a Familial Subtelomeric Translocation. *Prenat. Diagn*. 1999;19:570-574.
- Brown S. Miscarriage and Its Associations. *Seminars in reproductive medicine*. 2008;26(5):391-400.
- Bruno DL, Burgess T, Ren H, Nouri S, Pertile MD, Francis DI, Norris F, Kenney BK, Schouten J, Andy Choo KH, Slater HR. High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *Am J Med Genet A*. 2006;140(24):2786-2793.
- Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Human Reproduction Update*. 1996;2(2):118-136.
- Bulmer JN, Longfellow M, Ritson A. Leukocytes and resident blood cells in endometrium. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;622:57-68.
- Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G. Karyotype of the abortus in recurrent Miscarriage. *Fertility and Sterility*. 2001;75(4):678-682.
- Carp HJA. Recurrent Miscarriage: Genetic Factors and Assessment of the Embryo. *IMAJ*. 2008;10:229-231.
- Carrington B, Sacks G, Regan L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2005;17:591-597.
- Carvalho B, Dória S, Ramalho C, Brandão O, Sousa M, Matias A, Barros A, Carvalho F. Aneuploidies detection in miscarriages and fetal deaths using multiplex ligation-dependent probe amplification: an alternative for speeding up results? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;153(2):151-155.
- Cramer DW, Wise LA. The Epidemiology of Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2000;18(4):331-339.

- Clark DA, Banwatt D, Croy BA. Murine trophoblast failure and spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1993;29:199-205.
- Coste J, Job-Spira N, Fernandez H. Risk factors for spontaneous abortion: a case-control study in France. *Hum Reprod.* 1991;6(9):1332-1337.
- Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G. Inflammation and Implantation. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2010;63:17–21.
- Demir R. İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi. 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık. 1995; 17-275.
- Desdicioğlu K, Malas MA. Fetal büyümeye etki eden maternal faktörler. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2006;13(2):47-54.
- de Vries BBA, White SM, Knight SJL, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OWJ, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet.* 2001;38:145-150.
- Diego-Alvarez D, de Alba MR, Cardero-Merlo R, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C, Lorda-Sanchez I. MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenat Diagn.* 2007;27:765-771.
- Diego-Alvarez D, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Gonzalez-Gonzalez C, de Alba MR, Ayuso C, Ramos-Corrales C, Lorda-Sanchez I. Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages. *Human Reproduction.* 2005;20(5):1235-1243.
- Donaghue C, Mann K, Docherty Z, Mazzaschi R, Fear C, Ogilvie C. Combined QF-PCR and MLPA molecular analysis of miscarriage products: an efficient and robust alternative to karyotype analysis. *Prenat Diagn.* 2010;30:133-137.
- Durak B, Yeşil M, Özdemir M, Çilingir O, Şener T, Bademci G, Müslümanoğlu MH, Artan S. Is Recurrent Abortion an Indication for Subtelomeric Region Analysis? *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2010;30(5):1465-1468.
- Dutta UR, Rajitha P, Pidugu VK, Dalal AB. Cytogenetic abnormalities in 1162 couples with recurrent miscarriages in Southern region of India: report and review. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28:145–149.
- Fabro AD, Driul L, Anis O, Londero AP, Bertozzi S, Bortotto L, Marchesoni D. Fetal gender ratio in recurrent miscarriages. *International Journal of Women's Health.* 2011; 3:213-217.
- Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, Schmidt S, Coerdts W, Müntefering H, Rehder H. Cytogenetic analyses of culture failures by

- comparative genomic hybridisation (CGH)-Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *European Journal of Human Genetics*. 2001;9:539-547.
- Fryns JP, Buggenhout GV. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 1998;81:171-176.
- Gao J, Liu C, Yao F, Hao N, Zhou J, Zhou Q, Zhang L, Liu X, Bian X, Liu J. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. *Molecular Cytogenetics*. 2012;5(33):1-7.
- Gökçimen A, Temel S. İmplantasyon ve moleküler etkileşimler. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2004;11(4):25-33.
- Gu Y, Xie JS, Luo FW, Geng Q, Zhang HK, Shen HN, Zhao K, Liu QZ. Karyotype analysis of chorionic villi from pregnant women with missed abortion using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2009;44(7):509-513.
- Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189:397-402.
- <http://omim.org/entry/605178>, 2013-03-01.
- Huppertz B, Berghold VM, Kawaguchi R, Gauster M. A Variety of Opportunities for Immune Interactions During Trophoblast Development and Invasion. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2012;67:349-357.
- Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham Lorentz C, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenuer R, Anderson MH Jr, Michels VV. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med*. 2003;5(1):28-34.
- Jobanputra V, Esteves C, Sobrino A, Brown S, Kline J, Warburton D. Using FISH to increase the yield and accuracy of karyotypes from spontaneous abortion specimens. *Prenat Diagn*. 2011; 31:755-759.
- Joo JG, Beke A, Berkes E, Papp Z, Rigo J, Papp C. Fetal Pathology in Second-Trimester Miscarriages. *Fetal Diagn Ther*. 2009;25:186-191.
- Joyce CA, Dennis NR, Howard F, Davis LM, Thomas NS. An 11p;17p telomeric translocation in two families associated with recurrent miscarriages and Miller-Dieker syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2002;10(11):707-714.

- Kabukcuoğlu S, Tel N, Şener T, Paşaoğlu Ö, Dündar E, Bildirici K. Abortus ve Perinatal Otopsilerin Değerlendirilmesi. *Türkiye Ekopatoloji Dergisi*. 1999;5(1-2):28-34.
- Kalousek DK, Langlois S, Robinson WP, Telenius A, Bernard L, Barrett IJ, Howard-Peebles PN, Wilson RD. Trisomy 7 CVS mosaicism: pregnancy outcome, placental and DNA analysis in 14 cases. *Am J Med Genet*. 1996;65:348-352.
- Kano T, Mori T, Kimura A. Gender Ratio Distortion in Abortuses and Live Births From Patients with Recurrent Spontaneous Abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2009;62:125-127.
- Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. Demir, R. Çeviri Editörü, Ankara, Palme Yayıncılık. 2006;585-597.
- Knight SJL, Flint J. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet*. 2000;37:401-409.
- Kwinecka-Dmitriew B, Zakrzewska M, Latos-Bieleńska A, Skrzypczak J. Frequency of chromosomal aberrations in material from abortions. *Ginekol Pol*. 2010;81(12):896-901.
- Lathi RB, Hazard FKG, Heerema-McKenney A, Taylor J, Chueh JT. First Trimester Miscarriage Evaluation. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2011;29(6):463-469.
- Lathi RB, Loring M, Massie JAM, Demko ZP, Johnson D, Sigurjonsson S, Gemelos G, Rabinowitz M. Informatics Enhanced SNP Microarray Analysis of 30 Miscarriage Samples Compared to Routine Cytogenetics. *PLOS ONE*. 2012;7(3):1-5.
- Lei Q, Wang Q, Zhou CQ, Chen BJ, Chen Z, Xu YW, Zeng YH. Genetic analysis of chorionic villi specimen in spontaneous abortion using various methods. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2009;44(4):253-256.
- Ljunger E, Cnattingius S, Lundin C, Anneren G. Chromosomal anomalies in first-trimester Miscarriages. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005;84:1103-1107.
- Mademont-Soler I, Morales C, Bruguera J, Madrigal I, Clusellas N, Margarit E, Sanchez A, Soler A. Subtelomeric MLPA: is it really useful in prenatal diagnosis? *Prenat Diagn*. 2010;30:1165-1169.
- Marquard K, Westphal LM, Milki AA, Lathi RB. Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years. *Fertility and Sterility*. 2010;94(4):1473-1477.
- McClelland LS, Allen SK, Larkins SA, Hamilton SJ, Marton T, Cox PM, Hargitai B, Johnston EH, Morgan C, Hardy G. Implementation and experience of an

- alternative QF-PCR and MLPA diagnostic strategy to detect chromosomal abnormalities in fetal and neonatal pathology samples. *Pediatr Dev Pathol.* 2011;14(6):460-468.
- Meinardi JR, Middeldorp S, de Kam PJ, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak K, Prins MH, Büller HR, van der Meer J. Increased risk for fetal loss in carriers of the factor V Leiden mutation. *Ann Intern Med.* 1999;130:736-739.
- Michels TC, Tiu AY. Second Trimester Pregnancy Loss. *Am Fam Physician.* 2007;76:1341-1346.
- Monfort S, Orellana C, Oltra S, Rosello M, Guitart M, Martinez F. Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med.* 2006;147:295-300.
- Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Dalçık, H, Yıldırım M. Çeviri Editörleri, 8. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2009;31-144.
- Parazzini F, Bocciolone L, Fedele L, Negri E, La Vecchia C, Acaia B. Risk factors for spontaneous abortion. *Int J Epidemiol.* 1991;20(1):157-161.
- Perrimon N, Pitsouli C, Shilo BZ. Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;Aug 1;4(8):59-75.
- Prados FJ, Debrock S, Lemmen JG, Agerholm I. The cleavage stage embryo. *Human Reproduction.* 2012;27:50-71.
- Propst AM, Hill JA. Anatomic Factors Associated with Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine.* 2000;18(4):341-350.
- Rahman ANMA, Abdullah RB, Wan-Khadijah WE. Gametogenesis, Fertilization and Early Embryogenesis in Mammals with Special Reference to Goat: A Review. *Journal of Biological Science.* 2008;8(7):1115-1128.
- Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, Tyson C, Qiao Y, Harvard C, Fawcett C, Kalousek D, Philipp T, Somerville MJ, Stephenson MD. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Human Reproduction.* 2010;25(11):2913-2922.
- Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous Abortion. *BMJ.* 1989;299:541-545.
- Rio M, Molinari F, Heuertz S, Ozilou C, Gosset P, Raoul O, Cormier-Daire V, Amiel J, Lyonnet S, Lee Merrer M, Turleau C, de Blois M-C, Prieur M, Romana S, Vekemans M, Munnich A, Colleaux L. Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet.* 2002;39:266-270.

- Robberecht C, Pexsters A, Deprest J, Fryns J-P, D'Hooghe T, Vermeesch JR. Cytogenetic and morphological analysis of early products of conception following hystero-embryoscopy from couples with recurrent pregnancy loss. *Prenatal Diagnosis*. 2012;32:933-942.
- Rolnik DL, Carvalho MH, Catelani AL, Pinto AP, Lira JB, Kusagari NK, Belline P, Chauffaille Mde L. Cytogenetic analysis of material from spontaneous abortion. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(6):681-683.
- Rossant J, Howard L. Signaling Pathways in Wascular Development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2002;18:541-573.
- Saini V, Arora S, Yadav A, Bhattacharjee J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412:702-708.
- Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, Wong A, Ledbetter DH, Martin CL. Comparative Genomic Hybridization–Array Analysis Enhances the Detection of Aneuploidies and Submicroscopic Imbalances in Spontaneous Miscarriages. *Am. J. Hum. Genet*. 2004;74:1168-1174.
- Seçkin İ, Ertürkoğlu AŞ, Taşyürekli M, Arda O, Alkan F, Oktar H. Embriyoloji Ders Kitabı. İstanbul, İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi Müdürlüğü. 2008; 21-80.
- Stanger JD, Yovich JL. Reduced in-vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br J Obstet Gynaecol*. 1985;92(4):385-393.
- Srinivas N, Rajangam S. Anatomical Causes of Bad Obstetric History. *J Anat. Soc. India*. 2001;50(2):119-121.
- Şahin U. Multiple Abortuslu Kadınlarda Tromborisk Paneli ile CVD Panelinin Karşılaştırılması. 2008. Düzce.
- Tabibzadeh S. Molecular Control of the Implantation Window. *Human Reproduction Update*. 1998;4(5):465-471.
- Taskinen H, Kyyrönen P, Hemminki K, Hoikkala M, Lajunen K, Lindbohm ML. Laboratory work and pregnancy outcome. *J Occup Med*. 1994;36(3):311-319.
- Taşhan F. Tekrarlayan erken gebelik kayıplarında maternal trombofililer. 2007. İstanbul.
- The ESHRE Capri Workshop Group. Genetic aspects of female reproduction. *Human Reproduction Update*. 2008;14(4):293-307.

- Tayyar A. Tekrarlayan Abortuslarda Trombin Üretim Ölçümü (Thrombin Generation Assay) Testinin Yeri. 2011. Kayseri.
- Üstün MÖ, Özbilim G, Üner M, Karaveli Ş. Multipl Konjenital Anomalileri Olan Habitüel Abortus Olgusu. *Perinatoloji Dergisi*. 1998;6(3):89-90.
- Van den Berg C, Opstal DV, Brandenburg H, Wildschut HIJ, den Hollander NS, Pijpers L, Galjaard RJH, Los FJ. Accuracy of abnormal karyotypes after the analysis of both short- and long-term culture of chorionic villi. *Prenat Diagn*. 2000;20:956-969.
- Van den Berg MMJ, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1822:1951-1959.
- Wakui K, Tanemura M, Suzumori K, Hidaka E, Ishikawa M, Kubota T, Fukushima Y. Clinical applications of two-color telomeric fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis: identification of chromosomal translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. *J Hum Genet*. 1999;44(2):85-90.
- Wapner RJ. Invasive Prenatal Diagnostic Techniques. *Semin Perinatol*. 2005;29:401-404.
- Ward KJ. Genetic Factors in Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2000;18(4):425-432.
- Warren JE, Silver RM. Genetics of Pregnancy Loss. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2008;51(1):84-95.
- Wold ASD, Pham N, Arici A. Anatomic Factors in Recurrent Pregnancy Loss. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2006;24(1):25-32.
- www.mrc-holland.com, 2013-02-25.
- Yakut S, Berker-Karaüzüm S, Şimşek M, Zorlu G, Trak B, Lüleci G. Telomere-specific fluorescence in situ hybridization analysis of couples with five or more recurrent miscarriages. *Clin Genet*. 2002;61:26-31.
- Yaşar B. Erken Gebelik Kayıplarında Histeroskopi Bulguları. 2006. İstanbul.
- Yeh S-D, Chen Y-J, Chang ACY, Ray R, She B-R, Lee W-S, Chiang H-S, Cohen SN, Lin-Chao S. Isolation and Properties of *Gas8*, a Growth Arrest-specific Gene Regulated during Male Gametogenesis to Produce a Protein Associated with the Sperm Motility Apparatus. *The journal of biological chemistry*. 2002;277(8):6311-6317.
- Zhang YX, Zhang YP, Gu Y, Guan FJ, Li SL, Xie JS, Shen Y, Wu BL, Ju W, Jenkins EC, Brown WT, Zhong N. Genetic analysis of first-trimester miscarriages with a

combination of cytogenetic karyotyping, microsatellite genotyping and arrayCGH. Clin Genet. 2009;75:133-140.

EKLER

Ek 1. SALSA MLPA P070-B2 İnsan telomer prob karışımı (www.mrc-holland.com'dan uyarlanmıştır)

| Nt | Numara | Gen | Ekzon | Pozisyon | Bölge | 5' | 3' | Başlangıç | Bitiş |
|-----|--------------|--------------|-------|---------------|---------|---|---|-----------|-----------|
| 132 | 04084-L03605 | SH3BP5L | 3 | 01-247.077648 | 01q44 | TGCAGGAGGAGTTG GAGCACCTGAA | CCAGGCCAGCGAGGAGATC AACCAGGTGGAACACTACAGC | 247077648 | 247077710 |
| 139 | 02781-L03168 | ATG4B | 7 | 02-242.247199 | 02q37.3 | GATAGGAAGCTTGC TGTCTTCGATACGT GGAGCTCCT | TGGCGGTCCACATTGCAATG GACAACACTGTTGTGATGGA GGA | 242247199 | 242247270 |
| 145 | 02690-L02842 | KIAA022 6 | 22 | 03-198.883877 | 03q29 | CTCTTTCTCCAGGT CACTGCGCTGGAGG ACAG | ATGTGCCGTCTTGTCTGCC TGTTTCACATCAGCATAGGA TCA | 198883877 | 198883950 |
| 152 | 02691-L02843 | FRG1 | 1 | 04-191.099071 | 04q35.2 | CCCTGTTCCTCCGC GCCCTGTGCTGCC CCGA | CTCACATACTCGTCCAGAAC CGGCCTCAGCCTCTCCGCGC | 191099071 | 191099141 |
| 160 | 02790-L02232 | GNB2L1 | 2 | 05-180.601812 | 05q35.3 | GCGGGGTCCTCCC ACTTTGTTAGTGAT | GTGGTTATCTCCTCAGATGG CCAGTTTGCCCTCTCAGGCT | 180601812 | 180601884 |
| 166 | 02694-L02844 | TBP | 2 | 06-170.707891 | 06q27 | GACAGCATCACTGT TTCTTGGCGTGTGA AGAT | AACCCAAGGAATTGAGGAA GTTGCTGAGAAGAGTGTGCT GGAG | 170707891 | 170707964 |
| 172 | 02793-L03167 | VIPR2 | 2 | 07-158.627924 | 07q36.3 | CGCATTACCCAGA ATGCCGATTTTCAT | CTGGAATACAGGAGGAAG AAACAAAATGTGCAGAGCT TCT | 158627924 | 158627991 |

Ek 1'in devamı. SALSA MLPA P070-B2 İnsan telomer prob karışımı (www.mrc-holland.com'dan uyarlanmıştır)

| Nt | Numara | Gen | Ekzon | Pozisyon | Bölge | 5' | 3' | Başlangıç | Bitiş |
|-----|------------------|--------|-------|---------------|----------|--|--|-----------|-----------|
| 179 | 02695- L00610 | RECQL4 | 17 | 08-145.708631 | 08q24.3 | CAGCAGCTCCGTGG AGTTTGACAT | GGTCAAGCTGGTGGACTCCA TGGGCTGGGAGCTGGCCTCT | 145708631 | 145708695 |
| 186 | 02792- L02846 | EHMT1 | 10 | 09-139.776962 | 09q34.3 | TCAGATGTGCTGGA GACAGACGGCCTCC AGG | AAGTGCCTCTGCAGCTGC CGGATGGAAACACCGAAGA GT | 139776962 | 139777023 |
| 193 | 02696- L02847 | ECHS1 | 8 | 10-135.026355 | 10q26.3 | TCCGGAAAGAAGG GATGACCGCGT | TTGTGGAAAAGAGAAAGGC CAACTCAAAGACCAGTGA GAACCA | 135026355 | 135026422 |
| 202 | 02697- L02848 | IGSF9B | 20 | 11-133.292680 | 11q25 | CGCTTTGTAGCGAA ATGTCATCACTCCC CTGT | GCTCCTTGCCTTCTGCAGCC TGACCTTGGTAGTCACAGGA CTG | 133292680 | 133292754 |
| 211 | 02686- L02849 | ZNF10 | 5 | 12-132.242375 | 12q24.33 | CACTTACTCAGGAG AGAGTCTCTGAAAG TGGTAA | ATATGGGGGAAACTGTCTTC TTCCTGCTCAGCTAGTACTG AGAG | 132242375 | 132242452 |
| 218 | 02698- L00753 | CDC16 | 8 | 13-114.027450 | 13q34 | GACGGTCATCCCTG AATCTGTAGATGGC T | TGCAAGAGAATCTGGATGT GGTAGTGTCTTTAGCTGAGA GA | 114027450 | 114027519 |
| 226 | 02699- L02850 | MTA1 | 7 | 14-104.991619 | 14q32.33 | CCTGCTGGCAGATA AAGGAGAGATTCG AGT | AGGAAACCGGTACCAGGCA GACATCACCGACTTGTTAAA AG | 104991619 | 104991689 |

Ek 1'in devamı. SALSA MLPA P070-B2 İnsan telomer prob karışımı (www.mrc-holland.com'dan uyarlanmıştır)

| Nt | Numara | Gen | Ekzon | Pozisyon | Bölge | 5' | 3' | Başlangıç | Bitiş |
|-----|--------------|--------|-------|---------------|----------|---|---|-----------|-----------|
| 233 | 02701-L02851 | TM2D3 | 3 | 15-100.007800 | 15q26.3 | GCCTTATGTGATGA AGTGTCCGAGCAAT | GGTTTGTGTAGCAGGCTCC TGCAGACTGTATAGACTGCA CAA | 100007800 | 100007870 |
| 241 | 02702-L00734 | GAS8 | 11 | 16-088.637625 | 16q24.3 | CCTTTGCAGGTGCT GGCACTAACT | TCATTGACACCTGAGTCACA GCTGCCAGTGGGATTC | 88637625 | 88637685 |
| 250 | 02703-L03169 | SECTM1 | 4 | 17-077.874063 | 17q25.3 | CGTGGTCACTGCTG TCTTCATCCTCT | TGGTCGCTCTGGTCATGTTT GCCTGGTACAGGTGCCGC | 77874063 | 77874127 |
| 258 | 02704-L03607 | CTDP1 | 9 | 18-075.575783 | 18q23 | TCACGGGCACTGAC CTGGACTTTGACT | TATCCAGCGACAGCGAGAG CAGCAGTGAGTCCGAGGGC ACGAA | 75575783 | 75575851 |
| 265 | 02705-L02853 | CHMP2A | 3 | 19-063.755470 | 19q13.43 | GCCAGGCTGTGTCC CTCAAGATCCA | GCACTCAAGTCCAACA CGATGGCACAAGCCATGAA GGGT | 63755470 | 63755537 |
| 274 | 02706-L00642 | UCKL1 | 6 | 20-062.046371 | 20q13.33 | GAGGGTGTCAATCAA GCAGTACAACAA | GTTTGTCAAGCCCTCCTTCG ACCAGTACATCCAGCCCACC A | 62046371 | 62046438 |
| 281 | 02587-L02854 | S100B | 2 | 21-046.846658 | 21q22.3 | CGCCCTCATCGACG TTTTCCACCAATAT TCT | GGAAGGGAGGGAGACAAGC ACAAGCTGAAGAAATCCGA ACT | 46846658 | 46846729 |

Ek 1'in devamı. SALSA MLPA P070-B2 İnsan telomer prob karışımı (www.mrc-holland.com'dan uyarlanmıştır)

| Nt | Numara | Gen | Ekzon | Pozisyon | Bölge | 5' | 3' | Başlangıç | Bitiş |
|-----|--------------|--------------|-------|---------------|----------|--|--|-----------|-----------|
| 290 | 02707-L00661 | ARSA | 1 | 22-049.413270 | 22q13.33 | CCGCTAGGCGAGGA GGATCAGAT | CTCCGCTCGAGAATCTGAAG GTGCCCTGGTCCTGG | 49413270 | 49413327 |
| 298 | 02708-L02855 | SYBL1 | 8 | X-154.825695 | Xq28PAR | CCTGTGCAAAGGGA GGTAGTGTGGGAAA AGT | GTTTCCATTCTGGGAAAAGC CCAAACCGAATACGGTCAG CAGT | 154825695 | 154825768 |
| 306 | 02270-L01762 | TNFRSF1 8 | 4b | 01-001.129414 | 01p36.33 | GGCTGCACCCAGTT CGGGTTTCTCAC | TGTGTTCCCTGGGAACAAGA CCCACAACGCTGTGTGCGTC | 1129414 | 1129484 |
| 315 | 02709-L02856 | ACP1 | 5 | 02-000.267097 | 02p25.3 | CCACGTTTTAGGGC TAATATGAAGACCC AACACA | TTTGTATCCTGCCATATTAA ATAACAGATGAGATTGTGTT AAG | 267097 | 267173 |
| 323 | 02896-L02363 | CHL1 | 3 | 03-000.336381 | 03p26.3 | GGTCTCAGCTGTAA ACCAAAAGTGAGA GGA | GACATTAAGATTTTCATCT TACCGGGTTGTCTTCTTCT GAA | 336381 | 336454 |
| 329 | 14440-L16146 | PIGG | 8 | 04-000.505735 | 04p16.3 | GTACGGCTGGTTCC TGGGAGTGTGACGT A | GTCCTTCTGCTCAGGTGTGTT CTTGTTATTTTCAGGCTGCCT TTCG | 505735 | 505807 |
| 337 | 02791-L02233 | CCDC127 | 3 | 05-000.258918 | 05p15.33 | CGGAAGCCAAGTAC CACGCCATGATCT | CAGAAAATCGGCGTGCTGTC GCTCAGTTGTCCTTGGAAC C | 258918 | 258985 |

Ek 1'in devamı. SALSA MLPA P070-B2 İnsan telomer prob karışımı (www.mrc-holland.com'dan uyarlanmıştır)

| Nt | Numara | Gen | Ekzon | Pozisyon | Bölge | 5' | 3' | Başlangıç | Bitiş |
|-----|--------------|-------------|-------|---------------|---------|--|--|-----------|--------|
| 346 | 04077-L03462 | IRF4 | 3 | 06-000.339901 | 06p25.3 | GCTTTGAACAAGAG CAATGACTTTGAGG AA | CTGGTTGAGCGGAGCCAGCT GGACATCTCAGACCCGTACA | 339901 | 339971 |
| 355 | 02780-L02857 | UNC84A | 5 | 07-000.844978 | 07p22.3 | GCGGGACATCCGTG GAGAATCAAA | TACAGGGTCCAATTTGTGCT CCGTCTCAAAATCCAGAGCA | 844978 | 845042 |
| 362 | 02715-L00973 | FBXO25 | 8 | 08-000.398391 | 08p23.3 | GCAGTGACCTTCCT CTGCACATGCTGA | ACAACATCCTATACCGGTC TCAGACGGATGGGACATCA TCACCTTAGG | 398391 | 398466 |
| 370 | 02716-L00688 | DOCK8 | 23 | 09-000.376334 | 09p24.3 | CCGATCGCAACTGC AGCCGAATGTCTTA CT | ATTGCTCTGGCAGTAGTGAT GCTCCAAGTTCACCTGCAGC | 376334 | 376404 |
| 379 | 05180-L16343 | ZMYND1 1 | 2a | 10-000.215989 | 10p15.3 | TCGGTCAATGTTGG CAATCTGCTTCTGG TT | CCGTATAATCTCAATGGCTG CCCAAAGATGCTGGATAGCT T | 215989 | 216058 |
| 387 | 02784-L02226 | BET1L | 3b | 11-000.195448 | 11p15.5 | GGGTGGTCAAATCA CCAATTCTGTGTG | ATCTTGCTGGGATTCCTCCC TTAGGACTCGGATTCACAA G | 195448 | 195520 |

Ek 1'in devamı. SALSA MLPA P070-B2 İnsan telomer prob karışımı (www.mrc-holland.com'dan uyarlanmıştır)

| Nt | Numara | Gen | Ekzon | Pozisyon | Bölge | 5' | 3' | Başlangıç | Bitiş |
|----------|------------------|---------|-------|---------------|----------|--|--|-----------|----------|
| 393 | 02787- L02229 | JARID1A | 23 | 12-000.286991 | 12p13.33 | CGACAGAACGTGCT ATGAGTTGGCAAGA T | AGAGCGCGGCAGGCTCTAG CCACAGATGAACTATCCTCT GC | 286991 | 287064 |
| 402 + | 02717- L03608 | PSPC1 | 1 | 13-019.254548 | 13q11 | GCACGGAGGAGGA CTTCAAGAGGCTCT T | CGAACGCTATGGCGAGCCC AGCGAAGTCTTCATCAACCG GGACC | 19254548 | 19254619 |
| 409 + | 02718- L00732 | PARP2 | 16 | 14-019.895643 | 14q11.2 | CAGTACAGTGCCAT TAGGACCAGCAA | GTGACACAGGAATTCTGAAT CCAGATGGTTATACCCTCAA C | 19895643 | 19895709 |
| 418 + | 04026- L01542 | NDN | 1 | 15-021.482490 | 15q11.2 | GCTAGTCCTCAGAG ACACTGCTGCGA | GGGTAGTGGGCAGTGGGAT TAGCCTCCCGCAGAGC | 21482490 | 21482551 |
| 427 | 02720- L00648 | DECR2 | 9 | 16-000.402228 | 16p13.3 | CCCGAGACTTGTGT TCTCTTGGCT | GAAAACACTGAGGTGCTCC CATCTGTGCGTGGCCCAT | 402228 | 402289 |
| 436 | 04081- L03465 | RPH3AL | 2 | 17-000.183588 | 17p13.3 | GCCTCCAGCAGAAT TTGTGTAGTGGACA CT | TGTACGTGCACTTTGGAGAC AGCAAGCATGAGGCCTGCA GC | 183588 | 183659 |

Ek 1'in devamı. SALSA MLPA P070-B2 İnsan telomer prob karışımı (www.mrc-holland.com'dan uyarlanmıştır)

| Nt | Numara | Gen | Ekzon | Pozisyon | Bölge | 5' | 3' | Başlangıç | Bitiş |
|----------|------------------|--------|-------|---------------|----------------|--|--|-----------|----------|
| 444 | 02789- L02231 | THOC1 | 21 | 18-000.204731 | 18p11.32 | GGCAGATTGAGTGT GACAGTGAAGACAT GA | AGATGAGAGCTAAGCAGCT CCTGGTTGCCTGGCAAGATC A | 204731 | 204801 |
| 450 | 03501- L02880 | PPAP2C | 7 | 19-000.232437 | 19p13.3 | CAGCACTGTCTGAA GGAGGAGGAGCT | GGAACGGAAGCCCAGCCTG TCACTGACGTTGACCC | 232437 | 232498 |
| 459 | 02723- L00641 | ZCCHC3 | 1 | 20-000.226979 | 20p13 | CAGCTTGAAGACGC TCTTCATCCTCT | TCCGGAACGAGACGGTGGGA CGTGGAGGACATTGTGACTT GG | 226979 | 227046 |
| 466 + | 02724- L00334 | HSPA13 | 2 | 21-014.675469 | 21q11.2 | CAATGATGTATATG TGGGATATGAAAGC G | TAGAGCTGGCAGATTCAAAT CCTCAAAACACAATATAT | 14675469 | 14675536 |
| 478 + | 02725- L16344 | IL17RA | 4 | 22-015.959672 | 22q11.1 | CCTCCTGTACCTCG AGGGTGCAGAGTTA TCT | GTCTGCAGCTGAACACCAA TGAACGTTTGTGCGTCAGGT | 15959672 | 15959739 |
| 484 | 03714- L16345 | SHOX | 5 | X-000.521733 | Xp22.33PA R | CCACAGGCGTCATC TTGGGCACAGCCAA CCAC | CTAGACGCCTGCCGAGTGCC ACCCTACGTCAACATGG | 521733 | 521796 |

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Akın TEKCAN

Doğum Yeri: Amasya

Doğum Tarihi: 24.11.1981

Medeni Hali: Evli, 2 çocuk babası

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

1999-2003 Kafkas Üniversitesi Kars Sağlık Yüksekokulu (Lisans)

2003-2008 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans)

2008-2013 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Doktora)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

2002-2003 Kars Sağlık Müdürlüğü

2003-2012 Samsun Sağlık Müdürlüğü

2012-2013 Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi

E-posta: akintekcan@hotmail.com