

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

**PRENATAL TANIDA SAYISAL KROMOZOM ANOMALİLERİNİN  
BELİRLENMESİ İÇİN FISH TEKNİĞİ UYGULAMALARI**

T-91691

(DOKTORA TEZİ)

Hüseyin YÜCE

F.Ü. TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK  
ANABİLİM DALI



DANIŞMAN  
Prof. Dr. Halit ELYAS

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULTAYI  
DOKÜMANI SAYI: 11/2000

ELAZIĞ-2000

1) ÖNSÖZ.....	I
2) GİRİŞ.....	1-24
3) MATERYAL-METOD.....	25-47
4) BULGULAR.....	48-87
5) TARTIŞMA VE SONUÇ.....	88-97
6) ÖZET.....	98-99
7) SUMMARY.....	100-102
8) KAYNAKLAR.....	103-125
9) ÖZGEÇMİŞ.....	126
10) TEŞEKKÜR.....	127

## KISALTMALARIN LİSTESİ:

AHC	Adenine hemisulfate casein
AMCA	Aminomethyl caumarin acetic acid
ARS	Autonomous replicating sequences
Bio	Biotin
Biotin-11-dUTP	Biotinylated deoxyurasil 5'-triphosphate
bp	Base pair
BrdU	Bromo di uridine
CCD	Change coupled device
CCM	Collogenase culture medium
cDNA	Competitor DNA
CISS	Chromosome <i>in-situ</i> suppression
CPM	Confined placental mosaicism
contig	contiguous sequence
cos	cosmid
cot	concentration over time
Cy3	Cyanin 3
CVS	Chorionic villus sampling
DAPI	4,6-diamino-2-phenyl-indole
dATP	deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	deoxycytidine 5'-triphosphate
D.G.I.	Duncan Guthrie Institute of Medical Genetics
dGTP	deoxyguanosine 5'-triphosphate
Dig	Digoxigenin
DLS	Dodecyl lithium sulphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA pol	DNA polymerase
DOP-PCR	Degenerate primed-PCR
dTTP	deoxythymidine 5'-triphosphate
e.g.	exempla gratia (for example)
EDTA	Ethylene diamino tetra-acetic-acid
et al.	et alia
Fbs	Fetal bovine serum

Fcs	Fetal calf serum
FISH	Fluorescein <i>in-situ</i> hybridisation
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G-banding	Giemsa banding
gm	gram
hpDNA	Human placental DNA
i.e.	id est
IgG	Immunoglobulin G
IUGR	Intrauterine growth retardation
ISH	<i>In-situ</i> hybridisation
kb	Kilobase
Kcl	Potassium chloride
L.B.	Luria-bertoni
Mb	Megabase
mg	milligram
ml	millilitre
Na-cit	Sodium citrate
ng	nanogram
OD	Optical density
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phytohaemagglutinin
PI	Propidium iodide
P/S	Penicillin/streptomycin
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
rpm	rotation per minute
SCE	Sorbitol citrate ethylene
SSC	Saline sodium citrate
ssDNA	Salmon sperm DNA
T.B.E.	Tris boric acid ethylene
T.E.	Tris ethylene
T/V	Trypsin/versene

TRITC	Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate
UPD	Uniparental disomy
u/v	volume per volume
w/v	weight per volume
YAC	Yeast Artificial Chromosome
$\mu\text{g}$	microgram
$\mu\text{l}$	microlitre



## ÖNSÖZ

Bu çalışmanın amacı; bir prenatal tanı laboratuvarında FISH tekniğinin kullanışlı olup olamayacağını araştırmaktır. Bunun için değişik yöntemlerle farklı hücre tipleri çalışılacaktır.

1- Rutin sitogenetik tekniklerle elde edilen verilerin FISH tekniği kullanılarak elde edilen verilerle kıyaslanması. Bunun için iki farklı numune kullanılacaktır.

a- Normal yada CPM olduğu tahmin edilen vakaların plasental ve extraembriyonik dokulardan elde edilen hücreler

b- Gebelik sırasında veya doğum sonrasında IUGR tanısı konulan gebeliklerden elde edilen plasental ve extraembriyonik dokulara ait hücreler

2- Prenatal olarak yapılmış CVS çalışmaları sonucunda elde edilmiş trizomi 18 ve trizomi 21 sitogenetik sonuçlarının FISH sonuçlarıyla karşılaştırılması

3- 7, 16, 18, ve 21 numaralı kromozomlara ait problemlerin kullanılmasıyla IUGR gösteren gebeliklerde plasental mozaikliğin araştırılması

Çünkü CPM gösteren gebeliklerde bu 4 kromozomun en yaygın şekilde sayısal anomali gösterdiği rapor edilmektedir.

4- Sonuç olarak FISH'in prenatal tanıdaki güvenilirliğinin ve kullanılabilirliğinin ne olduğu araştırılacaktır. Elde edilecek verilere dayanılarak, FISH'in prenatal tanıda sayısal kromozom anomalileri ve kromozomal mozaikliğin araştırılması için uygun bir teknik olup olmadığı bu konuda çalışan bilim adamlarına ve klinisyenlere önerilip önerilemeyeceği tartışılacaktır.

## GİRİŞ

### İNSAN PLASENTASI

#### **Plasentanın Oluşumu:**

Ovariyan Döngüsü: Ergenlik dönemine girilmesiyle dışıde düzenli olarak aylık döngüler başlar. Seksüel döngü olarak bilinen bu döngüler hipotalamus tarafından kontrol edilir(81, 128).

Herbir ovariyan döngünün başlangıcında sayıları 5-7 arasında değişen primordiyal folliküller, follikül-stimülasyon hormon(FSH)'nın etkisiyle büyümeye başlar. Normal şartlar altında bu folliküllerden sadece biri tam olgunluğa ulaşır ve sadece bir oosit atılır, diğerleri dejenere olur.

Fertilizasyon: Erkek ve dişi gametlerin kaynaşmasıyla oluşan fertilizasyon uterin tübün ampullary bölgesinde meydana gelir. Sperm hücresi dişinin üreme organında 24 saat kadar canlı kalabilirken sekonder oosit eğer fertilize olmadıysa ovulasyondan sonra 12-24 saat sonra ölür(146).

Yarıklanma: Zigot iki hücreli duruma geldiğinde, bir dizi mitotik bölünme geçirerek hücre sayısını hızla artırır. Bu hücreler herbir yarıklanma bölünmesiyle daha küçük hale gelir ki bunlara blastomerler denir. Üç-dört bölünme sonunda zigot artık morula olarak adlandırılır. Bu döneme yaklaşık olarak fertilizasyondan 3 gün sonra ulaşılır ve embriyo uterus'un merkezine yakındır. Bu 12-16 hücreli dönemde morula merkezde toplanmış bir grup hücreden oluşmuştur ve buna "inner cell mass" denir. Bunun etrafında "surrounding layer" denilen bir tabaka ve en dışta "outer cell mass" denilen dış tabaka bulunur. Inner cell mass embriyonun dokularını oluştururken, outer cell mass daha sonra plasentanın gelişeceği trofoblastları meydana getirir.

Blastosit Şekillenmesi: Morulanın uterusu girişi sırasında inner cell mass'ın hücreler arası boşluğuna, zona pellucida boyunca sıvı akışı başlar. Hücreler arası boşluk yavaş yavaş

birleşerek sonuçta tek bir boşluk haline gelir ve blastosöl şekillenir. Bu sırada embriyo blastosit olarak adlandırılır. Artık embriyoblast olarak adlandırılan inner cell mass hücreleri bir kutupta lokalize olmuştur, trofoblast olarak adlandırılan outer cell mass hücreleri ise yassılaştırmıştır ve blastosit'in epitelyal duvarını oluşturur. Trofoblast iki tabakaya ayrılır;

- a- İç tabakayı oluşturan tek çekirdekli sitotrofoblast'lar
- b- Dış tabakayı oluşturan çok çekirdekli sinsitiyotrofoblast'lar

Aynı zamanda inner cell mass yani embriyoblast hücreleri iki tabakaya ayrılır;

- a- Kübik hücrelerden oluşan ve hipoblast denilen ince bir tabaka
- b- Sütun şeklindeki hücrelerden oluşan ve epiblast denilen kalın bir tabaka

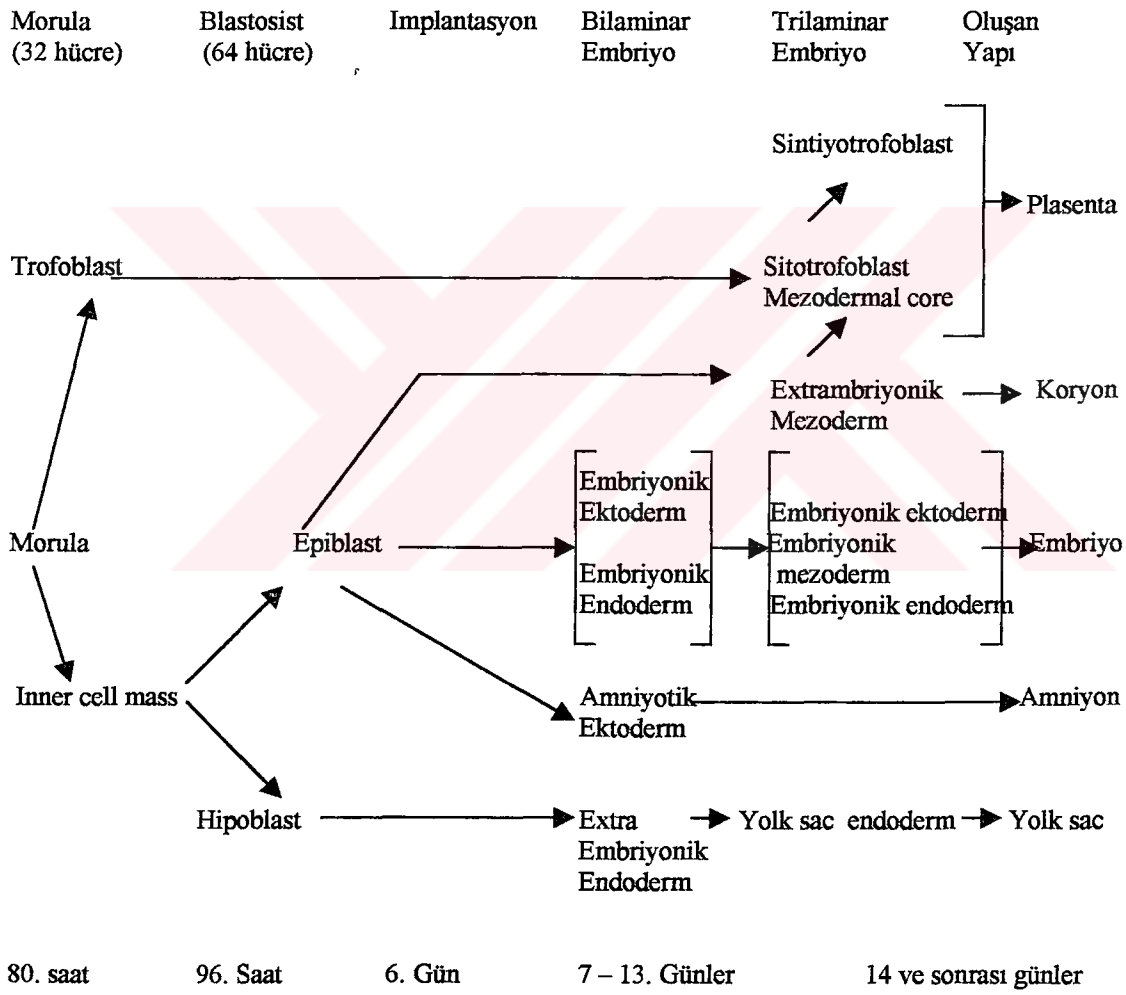
Epiblast içinde küçük bir boşluk oluşur ve genişleyerek amniyotik boşluğu oluşturur. Sitotrofoblast'a bitişik olan bu epiblast hücreleri amnioblast olarak adlandırılır ve epiblastların geri kalanlarıyla birlikte amniyotik boşluğun içeriğini kaplar.

Oluşumun 11-12. Günlerinde, sitotrofoblast'ın iç yüzeyi ile eksosöloomik boşluğun dış yüzeyi arasında yeni bir hücre popülasyonu oluşur. Bu hücreler trofoblasttan kaynaklanır, iyi şekillenmiş gevşek bağdokudur, sonradan dışarıdaki trofoblast ve içeriki amniyon ve eksosöloomik membran arasındaki yüzeyin tümünü dolduracak ekstraembriyonik mezodermi oluşturur(98).

İkinci ayın başlamasıyla, trofoblast çok sayıda ikincil ve üçüncül villilerle karakterize olur. Villiler koryonik plate'in mezoderminde girinti yaparak saçaklaşır ve maternal decidua'nın periferine tutunurlar. Villinin yüzeyi sinsitiyotrofoblast tarafından şekillendirilir.

Takip eden aylar süresince çok sayıda küçük villiler oluşur. Bu yeni şekillenmiş villiler başlangıçta ilkindir fakat 4. ayın başlamasıyla sitotrofoblastik hücreler ortaya çıkmaya başlar. Sinsitiyotrofoblast ve kan damarlarının endotelial duvarı fetal ve maternal kan sirkülasyonu ayıran bir tabaka oluştururlar.

Koryonik Villinin Oluşumu: 13 ve 14. Günler arasında sitotrofoblast kümeleşmeler yaparak sinsitiyotrofoblastlara dönüşür. Bunlar ilkel koryonik villilerdir ve hemen farklılaşacaklardır. 15. Günde villi bağ dokunun özünü oluşturur ve bundan sonra sekonder villi olarak adlandırılır. Bunlar koryonun tüm yüzeyini kaplar. Tertiary yani üçüncül villi ise villinin kılcak bir durum almasıyla oluşur. Üç tip villinin hepsi de aynı anda görülebilir. Villinin sitotrofoblast uzantıları sinsitiyotrofoblast tabakaya tutunur ve maternal endometriuma kadar uzanacak şekilde saçaklanmalar yapar. 8. haftaya kadar koryonik tabaka villi ile kaplanmıştır.



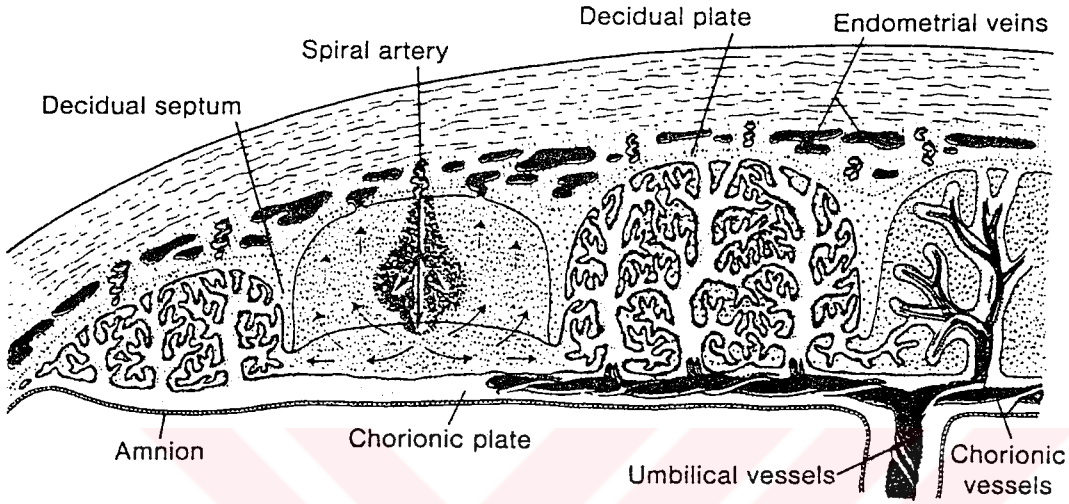
ŞEKİL-1: Erken embriyonik dönemde yapıların farklılaşması(Crone ve Cheung, 1988'den adapte edilmiştir).

Plasentanın Yapısı: Placenta, hem maternal hemde fetal dokulardan şekillendiği için fetomaternal bir organ olarak kabul edilir. 12. haftanın başlamasıyla plasentanın başlıca iki yapısı ayırtdılır. Birinci koryon villus tarafından şekillendirilen fetal bölümü, ikinci decidua basalis tarafından şekillendirilen maternal bölümü

Plasentanın bu iki bölümü stem villi tarafından bir arada tutulur ve bu anchoring villi olarak adlandırılır. Sinsitiotrofoblast tarafından decidua basalis'in aşındırılması sırasında decidual dokunun büyük bir kısmında düzensiz boşluklar oluşur ve buna plasental septa adı verilir. Bu septalar plasentada interviller boşluklar oluştururken çok sayıda kompartımanlar meydana getirir. Herbir kompartıman çok sayıda stem villi ve onun pekçok kolunu içeren kotiledona sahiptir. Plasental membran fetal ve maternal kan sirkülasyonunu sağlayan kılcal damarları birbirinden ayıran ince fetal bir membrandır. Gebeliğin ilk aylarında plasental membran 4 tabakadan oluşur;

1. Fetal kapiller epitelyum,
2. Bağ doku,
3. Sitotrofoblast
4. Sinsitiotrofoblast

Gebeliğin sonraki dönemlerinde sitotrofoblast çok incelirken bağ doku da gittikçe azalır. Sonunda plasental membran fetal ve maternal kan akımlarının ayrı olması çok ince(1 mikron) olmasına rağmen başarılı şekilde gerçekleştirir.



ŞEKİL-2: Gebeliğin ikinci yarısında plasentanın yapısı(Langmandan alınmıştır).

**Full Term Placenta:** Doğumda plasentanın şekli yaygın bir kek şeklindedir ve uzunluğu 15-20 cm, ağırlığı ise yaklaşık 500 gr. kadardır. Gebeliğin ikinci yarısında ağırlığı hızla artar. Doğuma doğru fetusun ihtiyaçlarını karşılamakta yetersiz kalmaya başlar.

Placenta genellikle posterior daha az sıklıkla ise anterior olarak uterus boşluğunun duvarına, fundus'a yakın olarak tutunur. İlkel bir organ olarak maternal ve fetal kan akımlarının karışmasını önleyerek maternal değişimini sağlar. Besin, oksijen, su, muhtemelen hormonlar anneden fetusa geçer. Karbondioksit, nitrojen, fetal metabolizma son ürünleri ve hormonlar fetustan anneye verilir. Bunların yanında patojenik organizmaların anneden fetusa geçmesini engelleyen bir bariyer görevi yapar(111). Ayrıca placenta bağımsız olarak bazı

hormonları üretebilir(HCG;Human Chorionic Gonadotrophin, HPL;Human Plasental Lactogens) yada bunları fetüsle birlikte yapabilir(Estrojenler) (60)

Amniyon ve Koryon: Amniyotik boşluk, fetus, kordon ve amniyotik sıvıyı içeren ve zarla çevrili bir kesedir. Bu kese iki tabakadan oluşur, içeride 0.5 mm kalınlığında saydam bir zar olan Amniyon ve dışarıda 0.2 mm kalınlığında bir zar olan koryon. Amniyon ve koryon birlikteliği amniyotik sıvının dışarıya akmasını engeller(60).

Göbek Kordonu: Göbek kordonu plasenta ile fetüs arasında yerleşmiş iletişim organıdır. Plasentanın genellikle ortasına ve fetal yüzeye yerleşmiştir. Maternal ve fetal kan sirkülasyonu sağlayan ve bu şekilde fetüsün ihtiyaçları için geçişi sağlayan organdır. Genellikle 1-2 cm genişliğinde ve 30-90 cm uzunluğundadır(ortalama 55 cm ). Uzun veya kısa olması konjenital bir malformasyonu gösterir.

Intrauterin Growth Retardation (IUGR) ile plasentanın ilişkisi; IUGR, gebelik dönemi için yetersiz doğum ağırlığı olarak tanımlanır. Yenidoğan ve plasental ağırlık, göbek kordonunun yeri ve uzunluğu ile koryonik damarlar arasında oldukça sıkı bir ilişki vardır. IUGR fetuslarının %10 yüksek plasental ağırlığa sahip olmakla birlikte sıklıkla bunlar aşırı perivilloz fibrin depolanmasıyla ilişkilidir. IUGR fetusların plasentaları vakaların %75'inde morfolojik olarak normaldir. Değişiklikler, bazı olumsuzluklardan veya gelişme geriliğinin sonucu olarak ortaya çıkmış olabilir. Ortalama olarak IUGR bebeği, standart gelişme eğrisinin 5 ve 10 persentili arasında bir yerdedir. Doğumda ise plasenta ağırlığı ortalama olarak 410 gr. civarındadır. Aşırı IUGR(%5 persentilin altında) durumda ise plasental ağırlık 380 gr.'a düşer.

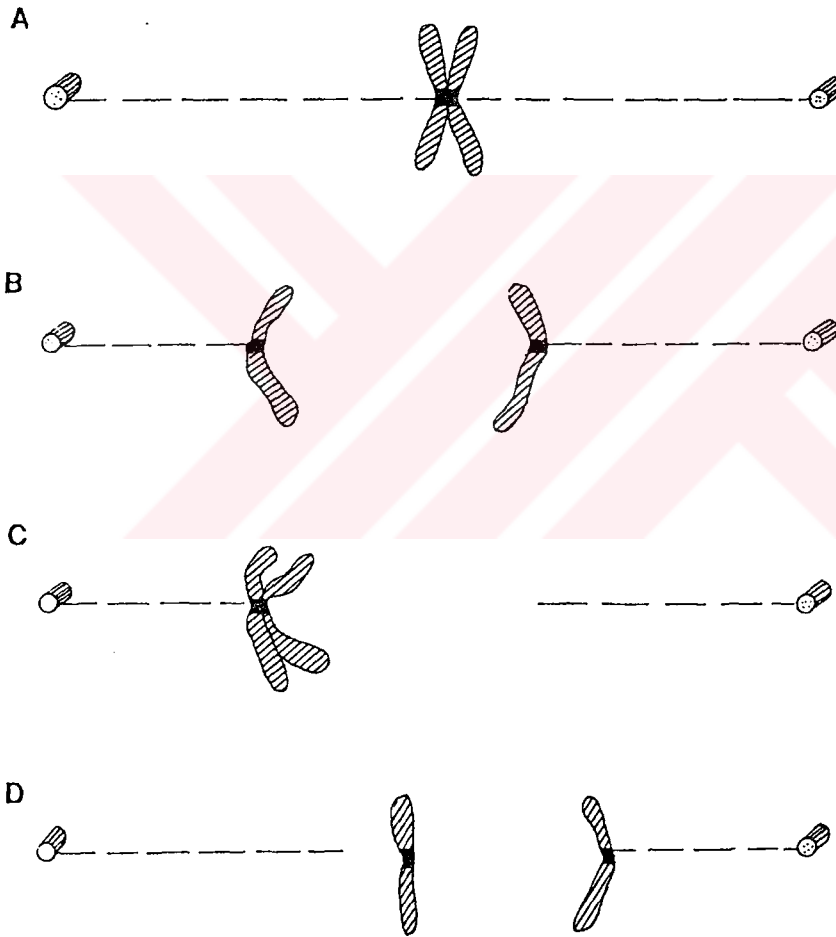
**MOZAIKLİK:** Kromozomal mozaiklik, bir kişide farklı kromozom kuruluşuyla ortaya çıkan iki yada daha fazla hücre hattının görülmesi şeklinde tanımlanır.

Mozaikliğin Oluşum Mekanizması: Kromozomal mozaiklik, embriyonun oluşumu sırasında hücrelerin sahip olduğu kromozomların de novo yapısal yeniden düzenlenmeler ve post

zigotik no-disjunction mekanizmalarıyla ortaya çıkar(20, 69, 74, 138). Bu konuda, şekil 3'de görüldüğü gibi ayrılma hatasının olabileceği düşünülür.

Non-disjunction anafazda kromatidlerin ayrılamayarak her ikisinin de aynı kutba gitmesiyle yavru hücrelerden birinin hiperploid hücre, diğerinin hipoploid hücre olmasına neden olur.

Anafaz lag ise bölünmenin anafaz evresinde bir kromatidin iç ipliklerine tutunamayarak kutba çekilmede gecikmesi ile ortaya çıkan bir durumdur. Bunun sonucunda bir hücre normal kromozom sayısına sahip olurken diğer hücre hipoploid olarak görülür.



ŞEKİL-3: Mitozda normal ve anormal kromatid ayrılması;

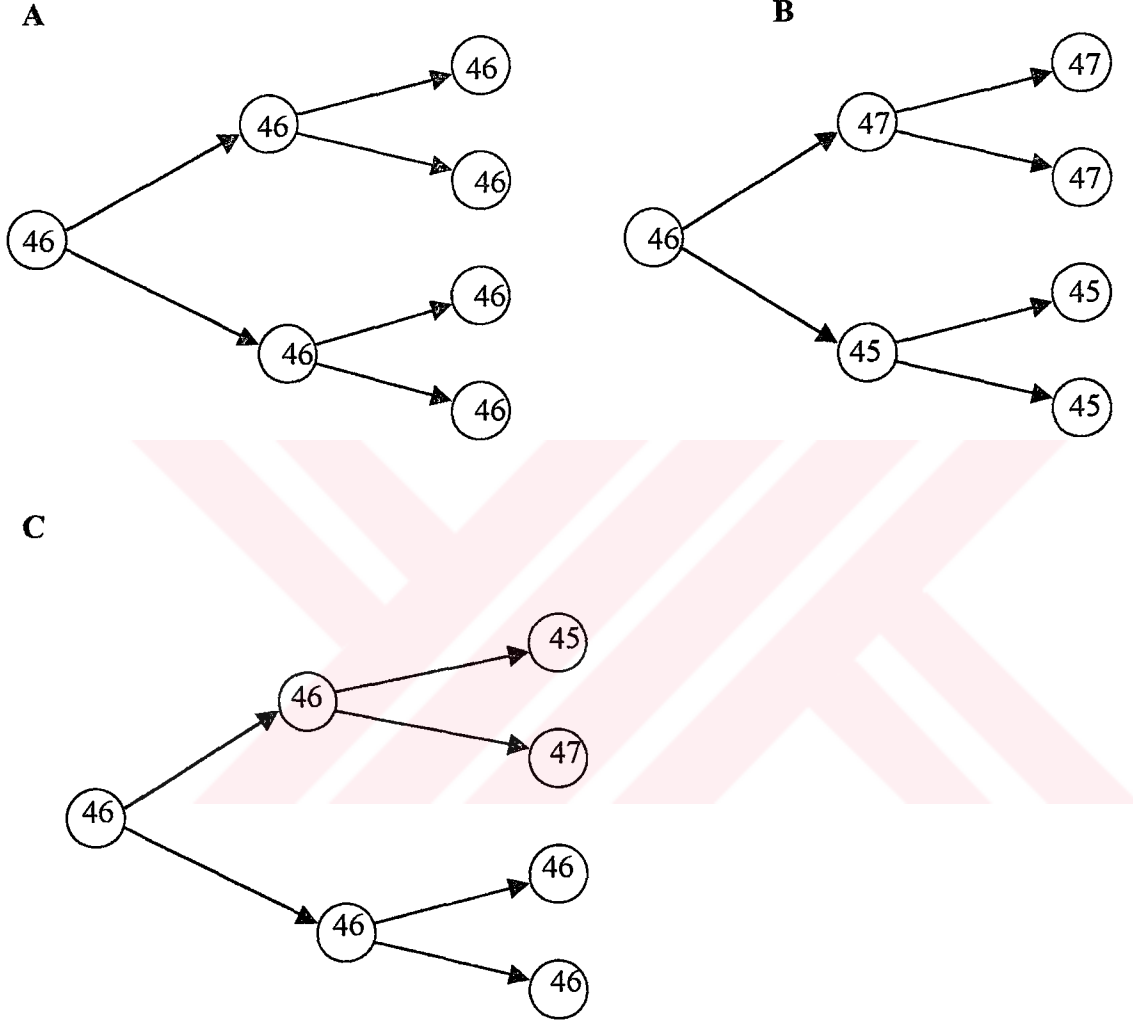
A) Metafaz kromozomları

B) Anafazda normal ayrılma

C) Metafazda non-disjunction

D) Anafaz lag

Mozaikliğin Düzeyi: Mozaikliğin düzeyinin ne olduğu, organizmanın oluşumu sırasında meydana gelen mitoz bölünmelerin hangisinde yani kaçınıcı mitoz bölünmede olduğuna göre belirlenir.(şekil-4)



ŞEKİL-4 ; Mozaikliğin oluşumu:

- A) Normal hücre bölünmesi
- B) İlk mitoz bölünmedeki dengesiz ayrılma
- C) İkinci mitoz bölünmedeki dengesiz ayrılma

Eğer bölünme hatası fertilizasyon sonrası ilk hücre bölünmesinde meydana gelirse tüm vücut hücreleri bundan etkilenir ve mozaiklik oranı her hücre hattı için %50 olur. Eğer bölünme hatası ektoderm, mezoderm ve endoderm olarak üç farklı hücre tipi oluşuktan sonra oluşursa anormal hücreler tek bir hücre tipiyle sınırlı kalır. Fakat bölünme hatası daha da sonra oluşursa anormallik hücrenin sadece bir organında görülür ve önemli bir olumsuzluk ortaya çıkarmayabilir. Anormal hücrelerin etkisinin ne olacağı, mozaikliğin oranına ve vücuttaki lokalizasyonuna bağlıdır.

Mitotik hatalar zigotun ilk bölünmesinin başlamasıyla birlikte herhangi bir bölünmede olabilir. Tüm erken otozomal mozaikler fetüste genetik dengesizliklere neden olarak erken dönem spontan abortuslara yolaçan önemli sonuçlar doğurur.

Otozomların erken monozomi ve trizomi mozaiklikleri letalite için farklıdır. Seks kromozomlarının trizomi mozaiklikleri yaşayabilme açısından oldukça iyi durumdadır. Fakat monozomi açısından sadece 45, X Turner sendromu yaşayabilir. 45,X kromozom kuruluşuna sahip fetüslerin %99 kadarı spontan abortus'la sonuçlanır(119). Yaşayabilen Turner dişilerinin büyük çoğunluğu farklı derecelerde 45,X/46,XX mozaikliğe sahiptir. Eğer anafaz lag zigotun ilk mitozunda oluşursa iki farklı hücre hattı oluşur ve bunlardan biri 45 kromozoma diğeri 46 kromozoma sahiptir. Bunlar tüm vücut hücrelerinin oluşumunda köken hücre olarak görev alırlar ve 45,X/46,XX şeklinde mozaiklik ortaya çıkar. Non-disjunction olayında ise 45 ve 47 kromozoma sahip iki ayrı hücre hattı oluşur ve sonuçta tüm vücut hücrelerinde 45,X/47,XXX mozaikliği görülür.

Eğer non-disjunction daha sonraki dönemlerde oluşursa 45, 46 ve 47 kromozoma sahip 3 farklı hücre hattı meydana gelir. Bölünme hatası herhangi bir dönemde olabileceği için mozaikliğin tipi ve oranı çok farklı şekillerde ortaya çıkabilir ve bu da fenotipte çok değişik durumlarda görülebilir. Bu nedenle toplumu oluşturan bireylerin pek çoğunda çeşitli derecelerde ve herhangi bir kromozoma ait mozaiklik olabileceği düşünülür. Fenotipik olarak

normal bir kişi eşey hücrelerinde kromozomal bir anormallikten dolayı üreme açısından bir risk taşıyabilir.

Gerçek ve Yalancı Mozaiklik: Mozaiklik tüm amniyosentezlerde %1-2 oranında görülür. Johnson ve ark.(64) 4319 gebelik için yaptıkları çalışmada kromozomal mozaiklik görülme oranını %1.3 olarak bulmuşlardır. Buna karşılık Leschot ve ark.(93) 1250 vakalık çalışmalarında mozaiklik sıklığı %1.8 bulundu.Diğer yapılan çalışmalarda ise gerçek mozaiklik amniyosentezlerde sadece %0.1-0.3 olarak bulunurken(12, 55, 181) tüm çalışmalar için %0.25 oranında görülmüştür(165).

Yalancı mozaiklik çeşitli nedenlerle ortaya çıkabilir. Plasental doku, kromozomal olarak anormal dokulara sahip olabilir, fakat aynı anormallik fetüste görülmeyebilir. Bunun yanında uzun süreli kültüre alınan hücrelerde in vitro kromozomal değişiklikler oluşabilir. Yalancı mozaikliğin gerçek fetal mozaiklikten ayrılabilmesi fenotipik inceleme ile yapılabilir. Fakat her zaman mümkün olmayabilir. Wang ve arkadaşları(165) CVS ile yapılan çalışmada yalancı mozaiklik oranını %1.9 olarak bulmuşlardır. Yanlış pozitiflik, vakaların yaklaşık %1'inde ortaya çıkarken yanlış negatiflik ise ancak %1 kadardır(148). Yanlış pozitiflik, klasik trizomi-16, trizomi-18 ve trizomi-22'de olmak üzere koryonik villi kromozomlarında görülmüştür. Bu vakalara ait fetüsler incelendiğinde kromozomal olarak herhangi bir anormallik görülememiştir. Tüm çalışma gruplarının çeşitli doku örnekleriyle yapılan araştırma sonuçları yalancı mozaiklik oranının %3.24 olduğunu göstermiştir(126).

Yalancı mozaiklik 3 düzeyde incelenir:

Düzyey-I; Tek bir anormal hücre görülür ve tümü yalancı mozaiklidir.

Düzyey-II; Tek bir flask veya kolonide aynı kromozomal anormalliğin görüldüğü iki yada daha fazla hücre, %80'inden fazlası yalancı mozaiklidir.

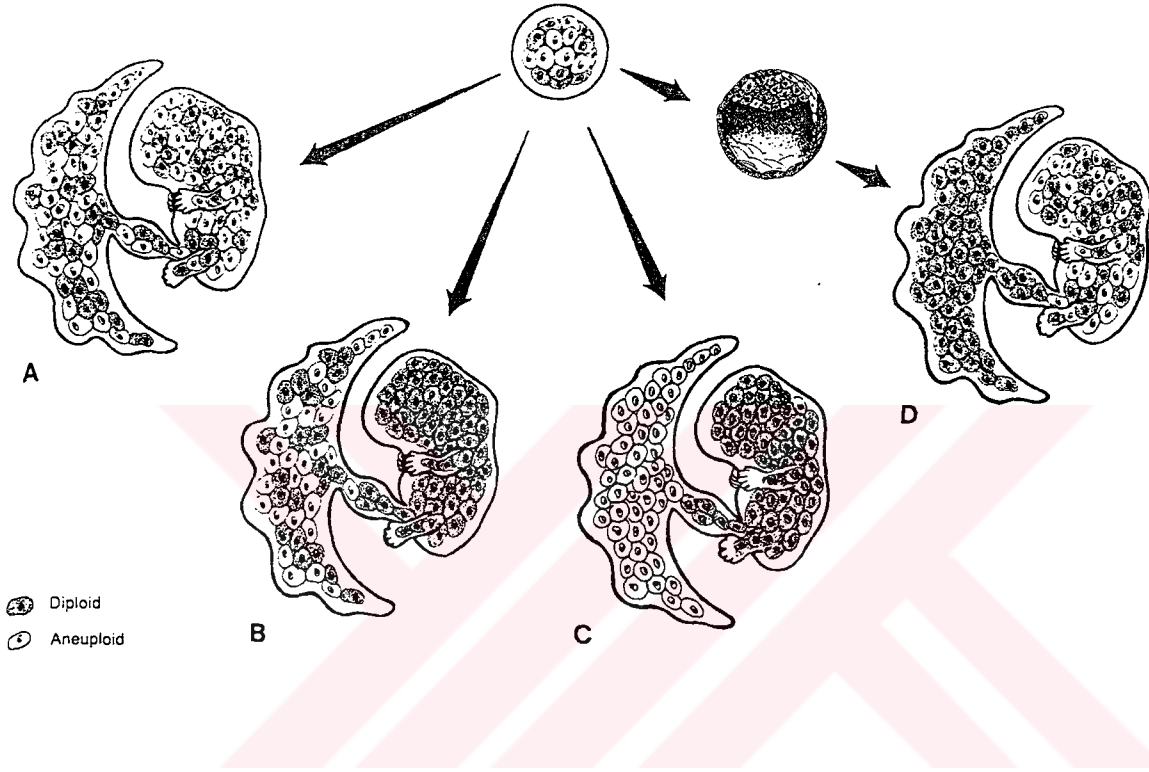
Düzyey-III; İki yada daha fazla flask yada kolonide, aynı kromozomal anormalliğin görüldüğü iki yada daha fazla hücre.

Bunların %50 kadarı gerçek fetal mozaiklik olabilir. Vakaların yarısı otozom kromozom mozaikliği, %40'ı seks kromozomları ve geri kalanı ise yapısal kromozom anormallikleri ile ilgilidir(38).

#### CONFİNED PLASENTAL MOZAIKLİK (CPM)

Eğer bölünme hatası blastosist şekillenmesinden önce oluşur ve embriyo ile plasentanın köken hücrelerinin her ikisinde etkilenirse genel mozaiklik oluşur(şekil-5A). Confined yani sınırlı plasental mozaiklik ise bir mozaik blastosit'de embriyonik ve plasental köken hücrelerin eşit olmayan biçimde dağılması ile oluşur(şekil-5B, 5C). Bu durumda ya normal fetüs, anormal (aneuploid) plasenta oluşur. Sınırlı embriyonik mozaiklikte ise embriyo oluşumunu sağlayan köken hücrelerinde meydana gelen bir bölünme hatası görülür ve plasenta normal, fetüs mozaik olur.

Kalousek(72) trofoblast, villus stroma veya her ikisiyle de ilişkili olarak 3 tip CPM tanımlanmıştır(Tablo-1). CPM gebeliğin farklı dönemlerinde gösterilmiştir. 9-12 haftalık gebeliklerde prenatal tanı için yapılan CVS analizlerinde her 3 tip CPM'in de gebeliklerin %1-2 'sinde olduğu gözlenmiştir(107, 147). CPM tip I aynı zamanda 20-40. Gebelik haftalarında yaşayabilen aneuploidi'lerde de gösterilmiştir(71). Üç tip CPM, prenatal olarak mozaik CVS tanısı konulan ve IUGR gösteren bebeklerin term plasentalarında teyit edilmiştir(68, 73). Prenatal olarak yüksek derecede plasental mozaiklik tanısı konularak doğan bebeklerde IUGR veya yüksek oranda spontan abortus olduğu bildirilmektedir(43, 64, 73). Trofoblastla sınırlı olan mozaiklik tip I olarak isimlendirilir. Bu, diploid veya aneuploid fetüslerin oluşturduğu gebeliklerde, CVS'de görülen sitotrofoblastik aneuploid hücre hattının gebelik boyunca aynı oranda kaldığı gösterilmiştir(73). 3, 7, 11, 13, 16 ve 18. Kromozomlarla ilgili otozomal trizomiler tip I CPM'de sıklıkla oluşurken diğerleri nadiren görülür.



ŞEKİL-5:

- A- Genel mozaiklik
- B- Sadece plasentada görülen confined plasental mozaiklik
- C- Normal embriyo/fetüs, anormal hücelere sahip plasentadan oluşan confined plasental mozaiklik
- D- Confined embriyonik mozaiklik(Kalousek, 1992'den alınmıştır)

Koryonik villu stroma ile sınırlı kromozomal mozaiklik tip II CPM'i ortaya çıkarır ve sitotrofoblastla sınırlı mozaiklik kadar yaygındır. Bu tip CPM gösteren pek çok gebelikte olumsuzluklar gözlenmeyebilir ve normal canlı doğum olurken, bazen açıklanamayan intrauterin gelişme geriliği veya perinatal hastalıklar ortaya çıkabilir(73). Bunların nedeni olarak plasental hücrelerdeki mozaikliğin neden olduğu fonksiyon bozukluğu sonucunda plasentanın görev yapamaması ve fetal yetersizliği olabileceği düşünülebilir. Bu tip mozaiklikte genellikle 2, 7, 8, 9, 12, 16, 18 ve 21 numaralı kromozomların trizomilerinin etkili olduğu görülür.

Tip III CPM'de hem trofoblast hemde koryonik stroma işe karışır ve bu tip gebeliklerde sıklıkla IUGR veya intrauterin ölümler görülür(35, 73). Genellikle bu tip CPM'de 2, 7, 15, 16ve 22 numaralı kromozomların trizomileri görülür ve görülme sıklığı CVS için %0.25 olarak belirtilir(89, 165).

TABLO-1

Diploid bir embriyo/fetusla ilgili gebeliklerde görülen CPM tipleri.

<u>Doku</u>	<u>Tip I</u>	<u>Tip II</u>	<u>Tip III</u>
Sitotrofoblast	Mozaik veya non-mozaik aneuploidi	Normal (diploid)	Mozaik veya non-mozaik aneuploidi
Koryonik stroma	Normal (diploid)	Mozaik veya non-mozaik aneuploidi	Mozaik veya non-mozaik aneuploidi
Embriyonik/fetal	Normal	Normal	Normal
Dokular	(diploidi)	(diploidi)	(diploidi)

Not: aneuploid bir embriyo/fetus için aynı tip CPM görülür. Fakat aneuploidy/diploidy şekilleri ters çevrilmelidir.

### ANNE YAŞI İLE CPM SIKLIĞI ARASINDAKİ İLİŞKİ:

CPM sıklığında anne yaşının etkili olabileceği düşünülmektedir. Simoni ve Sirchia(150) plasental mozaikliğin görülmesi anne yaşı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gözlediler.

İleri anne yaşı için yapılan tanısal amaçlı toplam 5377 vakalık bu seride plasental mozaiklik sıklığının anne yaşı ile doğrusal biçimde arttığı gözlenmiştir(Tablo-2).

TABLO-2 ; CVS'de anne yaşı ile CPM sıklığı arasındaki ilişki

<b>Yas(yıl)</b>	<b>Vaka sayısı</b>	<b>CPM'li vaka</b>	<b>CPM oranı (%)</b>
≤ 30	373	0	0
30-34	784	5	0.6
35-40	3502	31	0.9
41 ≥	718	7	1.04

### FLUORESANS İN-SİTU HİBRİDİZASYON(FISH):

Klasik bantlama teknikleri metafaz hücrelerinde sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin incelenmesinde çok uygundur. Bununla beraber bu teknikler özellikle ayrıntılı incelemeler için bazı sıkıntılar yaratmaktadır. Öncelikle bu teknikler, translokasyonlar, delesyonlar, duplikasyonlar ve inversiyonlar gibi yapısal anomalilerin analizinde yüksek kaliteli metafazlar gerektirir. Fakat bu özellikle tümör sitogenetiğinde olduğu gibi her zaman mümkün olmayabilir. İkinci olarak, bu teknikler fetal hücrelerin kültüründe olduğu gibi uzun zaman gerektirir. Bu da en azından sonuç için 2-3 hafta gibi uzun süre beklemek zorunda kalan hamile kadınların endişelerini önemli ölçüde artırır. Bu tür sınırlamaların kaldırılması için FISH, uygun alternatif teklif olarak geliştirilmeye çalışılmaktadır. FISH tekniği kromozomlara özgü, prob denilen spesifik DNA'lar kullanılarak yapılmaktadır. Aynı zamanda interfaz hücrelerinde kullanılabilir olması, hızlı sonuç alınabilmesi bakımından da çok önemli bir gelişme teşkil etmektedir.

## FISH TEKNİĞİNİN GELİŞİMİ

Marmur ve Lane 1960 yılında çift iplikli DNA'nın ısıtılıp soğutulması ile denatüre ve renatüre olabileceğini göstermişlerdi(103). Goll ve Pardue (36), bunlardan ayrı olarak da John ve arkadaşları izotopik İn-Situ Hibridizasyon tekniğini geliştirdiler(63). Bu teknik DNA prob'larının kromozomal lokalizasyonunun araştırılması için en uygun tekniktir. Bununla beraber bu tekniğin kullanılmasında özellikle kullanıcıların radyasyona maruz kalma riski, sinyallerin incelenmesinde uzun süre radyasyona maruz kalmaları ve radyoaktif atıkların oluşturduğu problemler gibi bazı dezavantajları bulunmaktaydı. Bu problemi ortadan kaldırmak için non-izotopik teknikler geliştirildi ve bunun için problemler non-radyoaktif işaretlendi. Non-radyoaktif işaretlemede spesifik antibadillerle bağlanabilen haptenerler kullanıldı ve bu yöntemle inceleme immünolojik olarak gerçekleştirildi. Bu şekilde haptenerlerle işaretlenmiş olan problemler şimdi pek çok avantajlar sunmaktadır. Non-izotopik işaretli olanlara göre daha güvenlidir, daha kısa sürede işaretlenebilir, daha uzun süre kullanıma hazır olarak bekletilebilir, daha kısa sürede inceleme yapılabilir ve yüksek çözümüleme gücüne sahiptir(121)

Fluoresans İn-Situ Hibridizasyon tekniği ilk kez Landegent ve arkadaşları tarafından 1984'de tanımlandı ve son yıllarda giderek daha popüler bir teknik haline geldi. Bu teknikle kromozom, hücre ve dokuların morfolojik özellikleri korunarak spesifik DNA dizilerinin incelenmesi ve analiz yapılabilmektedir(53).

Onkolojideki kromozomal anomalilerin pek çoğu (3, 25, 152), tek gen hastalıkları(99, 131) ve konjenital hastalıkların pek çoğu(184) FISH tekniği kullanılarak kolayca tanımlanabilir. FISH'in prenatal tanıda uygulanabilmesi için çalışmalar devam etmekte, bunun için uygun DNA prob'ları geliştirilmekte, sinyal gücü ve hibridizasyon/inceleme etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır(80).

FISH sadece metafaz kromozomlarında değil, interfaz hücrelerinde kromozom DNA'larının belirli bölgelerine spesifik problar kullanılarak genetik analize fırsat vermektedir ve bu yüzden interfaz sitogenetik olarak da isimlendirilir(23, 80, 83, 167, 182).

#### FISH'İN TEMEL KURALLARI:

Özellikle son on yılda FISH, metafaz ve interfaz hücrelerinde spesifik nükleik asit dizileri ve kromozomal anormalliklerin araştırılmasında ilginç bir teknik haline gelmiştir. Pek çok tanı laboratuvarı uni-colour, multi-colour ve CGH FISH tekniklerini kullanmak için kendi protokollerini oluşturmaya başlamışlardır. Bu teknikleri başarılı bir şekilde uygulamak için bir takım faktörler gerekir.

DNA veya RNA'nın analizinde kullanılacak hücrelerin hazırlanması

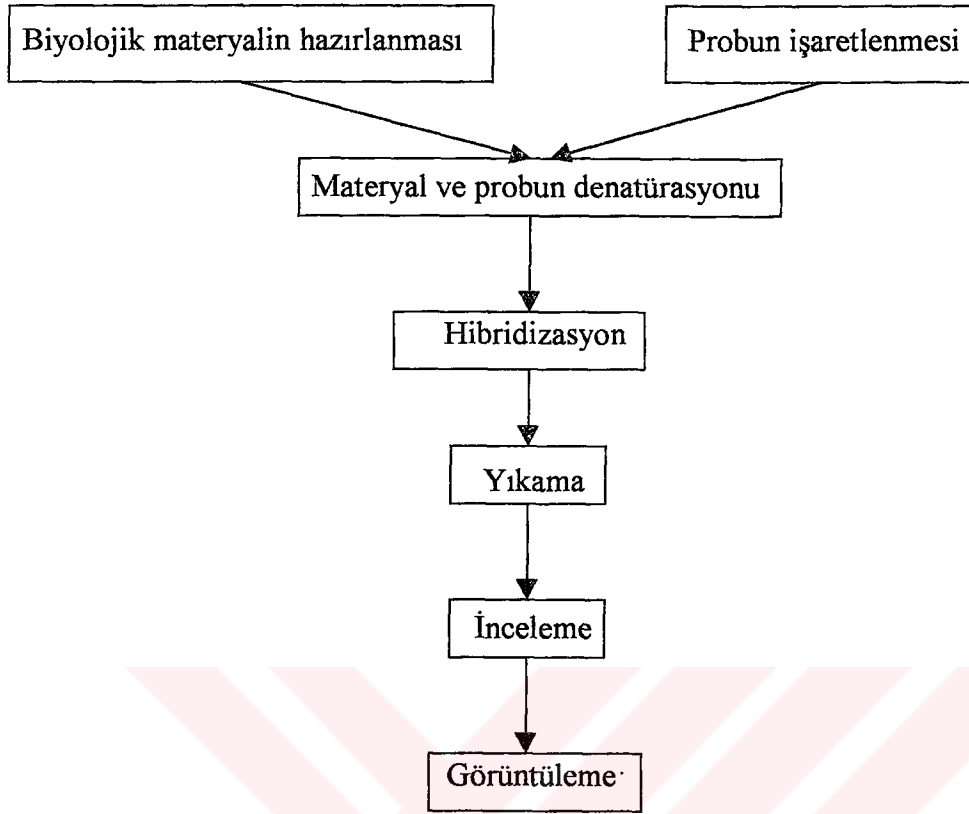
Prob işaretlemenin uygunluğu ve yeterliliği

Probun tipi

Sinyal analizinde kullanılan metodun hassasiyeti

Hibridizasyon tekniklerinin etkinliği

Preparat yapımındaki hassasiyet



Şekil-6; İn-Situ hibridizasyon protokolünün genel gösterimi

Preparat Hazırlanması: FISH tekniği tümör ve kemik iliği hücrelerinden fibroblast ve lenfositler, amniyon ve koryon hücrelerinden fetal hücrelere, kültüre alınmış hücrelerden interfaz hücrelerine, hatta formalinle fikse edilmiş ve parafinize edilmiş hücrelere kadar tüm doku tiplerinde başarıyla uygulanabilir(19, 26, 42, 59, 114).

Bu farklı dokular kullanılarak değişik fakat standart tekniklerle interfaz hücreleri veya iyi kalitede metafazlar elde edilebilir. Hibridizasyondan önce numuneler, aseton, xylene, RNaz, proteaz K, pepsin ve deterjan gibi çeşitli solüsyonlarla ön muameleye ihtiyaç gösterebilir. RNaz muamelesi RNA kalıntılarını uzaklaştırarak hedef DNA'nın hibridizasyonundaki background ve sinyal arasındaki görünüm farkını artıracaktır. Proteaz

muamelesi hedef DNA'yı saran proteinleri sindirerek probun DNA'ya hibridizasyon gücünü artıracaktır. Fakat metafaz çalışmalarında bu etki nükleus ve kromozom morfolojisinden dolayı yetersiz kalacaktır. Deterjanlar, hedef DNA'nın etrafını saran lipid tabakanın temizlenmesini sağlayacaktır. Aseton ve xylene ise bazı muhtemel artıkların uzaklaştırılmasını ve preparatın temizlenmesini sağlar.

#### PROB'LAR:

Prob, modifiye edilmiş tek iplikli bir nükleik asit parçasıdır ve hedef dizi DNA veya RNA olan komplementlerinin analizinde kullanılabilir. Başarılı bir FISH çalışması için probun uzunluğu, saflığı ve etkinliği çok önemlidir ve bu parametreler sinyal analizinin kalitesini artırır. İnterfaz -FISH için kullanılan probun uzunluğu 200-400 bp olmalıdır. Bu uzunluktaki proplar spesifik hibridizasyonu ve nükleusa girişi artırır, fluoresans background'ı azaltır. Daha kısa proplar ise hibridizasyon kalitesini azaltırken, daha uzun proplarda dokuya penetrasyonda bazı problemler oluşturabilir(87).

**PROB TİPLERİ VE ELDE EDİLMELERİ:** Prob'lar rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak plazmid, kozmid, faj, YAC(Yeast Artificial Chromosome) vektörleri ve oligonükleotid'ler aracılığıyla elde edilirler.

Centromeric alpha repetitive prob'lar özellikle spesifik kromozomların araştırılmasında kullanılışlıdır. İnsan kromozomlarının sentromerik bölgelerinin uzunluğu birkaç kb'den birkaç Mb'a kadar değişir ve çok çeşitli satellit DNA'nın karışmasıyla oluşmuştur(171, 172, 173, 174). İnsan alpha-satellit DNA'sının önemli birimi 171 bp uzunluğunda bir monomerdır(102) ve eldeki bilgi bunun alpha tekrarlayan dizilerle birkaç mb'a kadar uzayabileceğini göstermektedir. Sentromerik alpha-satellit dizilerinin herbir kromozomda çok spesifik bir bölge olarak organize olduğu gösterilmiştir(16, 109, 171). 13 ile 21 ve 5 ile 19. kromozomlar aynı tekrarlayan dizileri paylaşırlar ve bundan dolayı interfaz hücrelerinde alpha-satellit tekrarlayan proplar kullanılarak ayırt edilmeleri mümkün olmaz(14, 57).

Kromozom painting propları aynı zamanda kromozom spesifik library propları olarak da adlandırılır ve somatik hücre hibritleri veya normal metafaz kromozomları kullanılarak

flow sitometri yöntemiyle tek bir kromozomdan hazırlanır. Bu problemler Degenerate primed-PCR (DOP-PCR) yöntemiyle işaretlendikten sonra metafaz kromozomlarının analizinde kullanılırlar. Forward chromosome painting olarak da adlandırılabilen bu yöntem özellikle translokasyonlar ve kanser hücrelerindeki aberasyonlarda(22, 95, 158) ve yeniden düzenlenmeler sonucu oluşan yapısal kromozom anormallikleri(15, 58) de dahil olmak üzere pekçok alanda oldukça kullanışlıdır. Bununla beraber bu problemlerin, çok küçük duplikasyonlar gibi yapısal kromozom anormalliklerinin araştırılmasında yetersizlikleri vardır(40). Bu zorlukların giderilmesi için aynı tekniklerle elde edilen DOP-PCR “reverse chromosome paint” problemleri özellikle ilgili kromozomun orijini ve anormalliğin boyutunun araştırılmasında daha iyi sonuç vermektedir(15, 65). Bu teknik aynı zamanda marker kromozomların orijini ve yapısal kuruluşunun çalışılmasında çok etkilidir(6).

Mikrodiseksiyon yöntemiyle elde edilen kromozom spesifik problemler marker kromozomların analizinde oldukça güvenilir şekilde kullanılabilirler. Prob izolasyonu için, mikrodiseksiyon yöntemiyle kromozom parçasından DNA elde edilir ve PCR ile amplifiye edilerek işaretlenir. Daha sonra bu problemler FISH yöntemiyle metafaz kromozomları hibridize edilerek marker kromozomun orijini analiz edilir(118).

Region-spesifik problemler metafaz kromozomlarından mikrodiseksiyon yöntemiyle elde edilirler(105, 144). Temel olarak bu teknik kromozomun belirli bir bölgesinden mikrodiseksiyonla bir DNA fragmentinin alınıp PCR ile amplifikasyonu işaretlenmesi ve FISH için kullanılmasına dayanır(28). Pekçok mikrodiseksiyon tekniği zamana ve işçiliğe dayalı olup, PCR amplifikasyonu için yeterli DNA kalıbının oluşturulması amacıyla hedef bölgeden yaklaşık 40 kadar fragmentin elde edilmesine bağlıdır. Bu amaçla eklenen her bir fragment muhtemel kontaminasyon riskinde artırır. Buna alternatif olarak, daha fazla prob için disekte edilen DNA sekansları bir vektöre klonlanıp alıcı bir hücreye verilebilir. Region-spesifik problemler sitogenetik olarak incelenemeyen marker kromozomların analizinde ve pekçok yapısal kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında kullanılabilir.

Single copy veya lokus spesifik denilen problemler her bir kromozomun spesifik bir bölgesinde bulunan benzersiz genomik dizilerden elde edilir ve o bölgenin analizinde kullanılırlar. Bu problemlerin kullanıldığı tekniklere özelliğinden dolayı “Chromosome in-situ suppression” (CISS) adı verilir. Bu lokus spesifik problemler genomda komplementlerini bulmak için bir yarış halindedirler ve ancak bu şekilde hibridize olabilirler(22, 78, 122).

Lokus spesifik problemlerin üretilmesi için başlıca iki tip vektör kullanılır : Cosmids (contigs) ve YACs (yeast artificial chromosomes).

Kozmid'ler plazmidler ve yaklaşık 40 kb. yabancı DNA taşıyabilen lambda fajlarından elde edilirler. Bu nedenle bunlar, bir faj vektörünün taşıyabileceğinden 3 kat daha fazla DNA taşıyabilirler. Lambda fajı, herbir tek zincirli komplementer DNA' sının ucunda iki adet cos bölgesi bulundurur ve bunlar DNA' nın paketlenmesi için çok önemlidirler. Cos bölgeleri, sirküler duplex DNA' ya sahip plazmidin antibiyotik direnç geni içine bir restriksiyon enzimi kullanılarak klonlanır. Faj içine paketlenerek bağlanan bu DNA, enfeksiyon şeklinde E. coli gibi bir host (alıcı) hücreye verilir. Kozmid replike olur ve izolasyondan sonra muhtemelen 25 - 50 kb.' lik bir DNA probe olarak elde edilir. Bu elde edilen kozmid probe, trizomiler (96) , translokasyonlar (136, 160), inversiyonlar (24) ve delesyonlar (100, 131) gibi kromozomal anormalliklerin tanısı amacıyla metafaz kromozomlarında kullanılabilir. Ancak, bu kozmid problemleri interfaz hücrelerinde kullanıldığında çok zayıf sinyal verirler.

Cozmid contig problemleri kozmid' lere göre daha iyi sonuç verirler. Uzunlukları 90 kb' dan daha fazladır. Yüksek hibridizasyon ve deteksiyon etkinliğine iyi kalite fluoresans sinyali nedeniyle kozmid problemlerin analizde yetersiz kaldığı kromozomal hataların incelenmesi için rahatlıkla amniyotik sıvı interfaz hücreleri ve CVS interfaz hücrelerinde prenatal tanı amacıyla kullanılabilirler(11, 80, 182) .

Yeast artificial chromosome (YAC) problemleri 100-800 kb. uzunluğunda bir DNA sekansına sahiptirler. İlk kez 1987'de Burke ve arkadaşları tarafından tanımlanmışlardır. YAC' lar iki yeast telomeri içerirler. Bunlardan biri sentromer, diğeri ARS (autonomous replicating sequences) ARS sekansları replikasyonun orijinini teşkil eder. YAC DNA' sı klonlama bölgesi için iki kola ayrılır. Birisi, bir telomer den ibarettir ve tanıtıcı bir marker'dır. Diğeri ise bir telomer, bir sentromer ve bir marker'a sahiptir. Bu kollar, büyük DNA fragmentlerini kuşatırlar. Bu bağlanma karışımı transformasyon ile bir maya (yeast) hücresine verilir.

Birkaç yüz kb. uzunluğunda olan bu DNA fragmentleri bir YAC probu olarak uygun şekilde edilir ve gen haritalamalarında (143) , İnterfaz amniyosit hücreleri ve lenfositlerde (91, 121, 135). Sayısal kromozom anomalilerinin araştırılmasında çok başarılı bir şekilde kullanılabilirler.

#### PROB İŞARETLEME :

Prob' lar radyoaktif veya non - radyoaktif olarak işaretlenir. Radyoaktif işaretleme toksisitesi, kontaminasyonu ve muhafaza güçlükleri nedeniyle tercih edilmemektedir. Buna karşılık, non - radyoaktif işaretleme daha güvenli ve sinyal alımının kolay olması yanında, herhangi bir özel düzenlenmiş laboratuvara ihtiyaç duymaması, uzun süre aktivite

kaybetmeden muhafaza edilebilmesinden dolayı tüm moleküler - sitogenetik laboratuvarlarında yerini almıştır.

Non - radyoaktif olarak problar fluorochrome conjugated nükleotidlerin enzimatik bağlanmasıyla doğrudan, yada haptent conjugated nükleotidlerin enzimatik bağlanmasıyla dolaylı işaretlenir. İndirekt (dolaylı) işaretleme çok daha hassastır, bunun için en yaygın kullanılan sistemler ; fluorochrome - coupled avidin' le çalışılan biotin(86) ve fluorochromecoupled antidigoxigenin ile çalışılan digoxigenindir(112).

Enzimatik işaretleme "Nick Translation" "random priming" veya "PCR (polymerase chain reaction)" ile yapılabilir. Nick translation reaksiyonu sırasında fragment uzunlukları, DNaz konsantrasyonu veya nick translation süresinin değiştirilmesiyle farklılaşabilir. İşaretlenmiş olan problar random priming yöntemi veya PCR sırasında sıklıkla enzimatik yolla daha küçük fragmentleri ayrılırlar.

Son zamanlarda farklı renkler oluşturularak birden fazla probun birlikte kullanılması mümkün hale getirilmiştir. Bu teknikte problar farklı floresans moleküller veya haptentlerle muamele edilerek kullanılırlar(115, 132). Bu şekilde farklı tekniklerle işaretlenen pek çok prob aynı anda pek çok kromozomun analizini yapma imkanı sağlar(116, 117).

Nick translation ilk defa 1977' de Rigby ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve bugün en popüler işaretleme tekniği haline gelmiştir. Daha sonraları biotin (86) ve digoxigenin (51) gibi non - radyoaktif komponentleri nick translation yöntemiyle DNA' ya verildi. DNaz I ve DNA polimeraz I nick translation sisteminde fonksiyonel enzimlerdir. DNaz I,  $Mg^{+2}$  varlığında endonükleaz aktiviteyle DNA' nın fosfodiester bağlarında rastgele çentikler oluşturur. DNA pol. 1 exonükleaz aktiviteyle  $5^1' \dots 3^1$  yönünde çentiğin  $5^1$  fosforil ucundan nükleotidleri uzaklaştırır. Aynı anda DNA pol. 1' in  $5^1 \dots 3^1$  polimeraz aktivitesi ile de nükleasyon rezidüe' leri düzenli bir şekilde bağlanır. Bu şekilde, biotin ve digoxi genin gibi non - radyoaktif komponentler prob DNA' ya girmiş olur ve bu işaretli DNA FISH deneylerinde prob olarak kullanılabilir hale gelmiştir.

#### DNA Denatürasyonu :

Hem prob hem de hedef DNA doublehelix yapıda olduğundan hibridizasyondan önce denatüre edilmelidirler. Denatürasyon ısı veya yüksek pH ile gerçekleştirilebilir. Pek çok laboratuvar ısı kullanımını tercih eder. Bu ısıtma tekniğinde, denatürasyon ısını düşürerek hücrelerin morfolojik yapılarının bozulmasını önleyen formamide tercih edilir. Denatürasyon solüsyonuna eklenen her bir %1'lik formamide, DNA'nın erime ve bozulma ısını yaklaşık olarak  $0.75^{\circ}C$  kadar azaltır(90). Isıtma ile denatürasyon tekniği genellikle, prob DNA, hibridizasyon buffer ve gerekiyorsa kompetitör DNA içeren hibridizasyon karışımının 65-

70°C' ye kadar ısıtılmasıyla gerçekleştirilir. Hedef DNA ve prob DNA' yı birlikte bir lamel altında denatüre etmekte mümkündür. Bu lamel tekniği basit ve güvenilir bir teknik olarak sıcak formamide tekniğine alternatif kabul edilebilir, fakat formamide kullanılmadığında yüksek ısı gerekeceğinden hücre morfolojisi bozulabilir ve sinyal kalitesi düşer.

#### Hibridizasyon :

Denatürasyon sonrasında, işaretlenmiş ve denatüre edilmiş prob(lar), hibridizasyon buffer ve kompetitör DNA içeren hibridizasyon karışımı hedef DNA' ya uygulanır. Daha sonra preparat hibridizasyon için genellikle 37 - 43°C' lik nemli bir ortama bırakılarak inkübe edilir. İyi bir hibridizasyon için probun doğru konsantrasyonu ve uzunluğu, hibridizasyon süresi, eğer gerekliyse kompetitor DNA' nın konsantrasyonu ve uzunluğu önemli ve kritik parametrelerdir. Bu yüzden tüm parametreler her bir prob için optimize edilmeli ve her prob izolasyonu ve işaretlemesinden sonra kontrol edilmelidir.

#### Hibridizasyon Sonrası Yıkama :

Spesifik olarak bağlanmayan yani hibridize olmayan prob' lar hibrid olanlara göre daha gevşek olduğundan, bunlar yapılan yıkamalarla ortamdan uzaklaştırılır ve sinyal kalitesi artırılır. Bunun için, yüksek formamide konsantrasyonu ve düşük tuz konsantrasyonu yıkama solüsyonlarında kullanılabilecek uygun parametrelerdir.

#### Deteksiyon :

Uni - colour deteksiyon : Hibridize olan sekansların deteksiyonu işaretleme şekline göre farklılık gösterir. Eğer DNA prob' ları direkt işaretliyse fluorescein veya rhodamine gibi bir fluoroconjugated dNTP işaretleme yapılmış preparatlar, hibridizasyon sonrası yıkamaların hemen ardından mikroskopta hemen incelenebilir. İndirekt işaretlenmiş problemler ise yüksek affinite gösteren immünotokimyasal tekniklerle incelenir. Bu immünotokimyasal tekniklerle yapılan çalışmalarda, fluoresceinisothiocynate (FITC, yeşil), tetramethylrhodamine (TRITC, kırmızı ) , coumarin acetic acid (AMCA, mavi) , Texas red veya Cy<sub>3</sub> gibi fluorochrom' larla karıştırılmış spesifik monoclonal veya polyclonal antiserumlar yada avidin / streptavidin kullanılır. Biotin ve digoxigenin, uni - colour deteksiyonda en çok tercih edilen işaretleme sistemleridir ki bunlar parlak sinyal alınması için son raportör moleküllere bağlanırlar.

Peroksidaz ve alkalın fosfotaz gibi enzimler ışık mikroskopuyla yapılacak incelemelerde çöktürme reaksiyonları için kullanılabilirler. Fakat bu tekniğin hassasiyeti fluoresans deteksiyondan çok daha az olduğu için şu ana kadar sadece repetitive problemlerle kullanılabilmektedir(17).

Multi - colour deteksiyon : Farklı sistemlerle işaretlenmiş iki yada daha fazla prob' un aynı anda tek bir hibridizasyon alanında kullanılması multicolour deteksiyon tekniği olarak adlandırılır. Bu protokolda, her bir haptten kendisi için özel olarak hazırlanmış uygun bir fluorescent boya ile muamele edilmiş spesifik bir antibadi sayesinde incelenebilir. Üç yada daha fazla prob aynı sahada birlikte kullanıldığında, prob' lar orijinal renklerin arasındaki bir renk skalasında görülebilirler. Örneğin işaretleme sistemi farklı 4 prob birlikte kullanıldığında farklı hedef DNA' ları 15 ayrı renkte incelemek mümkün olabilir(133).

Boyama : Deteksiyondan sonra preparatlar, prob' ların görünür duruma getirilmesi için uygun bir sistemle muamele edilir. Bunun için hücreler, içinde uygun bir counterstain denilen boya içeren ve solmayı önleyici antifade solüsyonu dökülerek kaplanır. En kullanışlı antifade solüsyonu, sinyalleri fluoresans ışığın çok hızlı soldurucu etkisinden koruyan citiflour' dur. Sinyalleri en iyi görünür hale getiren counterstainler ise DAPI ve PI' dır. DAPI mavi bir renk verir, kırmızı ( rhodamine yada texas red ) ve yeşil (FITC) fluoresans boyalarla kullanılabilir. Pl ise kırmızı bir renk verir, yeşil sinyallerin elde edilmesinde DAPI ile birlikte veya ayrıca tek başına kullanılabilir.

#### Preparatların Değerlendirilmesi :

Hemen hemen tüm fluoresans mikroskoplar repetitive sekansların hibridizasyon oluşumlarını incelemek için uygundur, fakat singlecopy sekansların spesifik fluoresans sinyallerinin analizi için yüksek kalitede mikroskoplara ihtiyaç vardır. FITC ve rhodamine yada texas red' le oluşturulan dual - colour FISH çalışmalarında iki farklı renkteki sinyallerin birlikte incelenmesi için double - band pass filtreler gerekmektedir. Double - band pass filtreler, filtre değişimi sırasında oluşan görüntü kaymalarını ortadan kaldırır. Hibridize olmuş hücrelerin görüntüleri yüksek çözüm güçlü high - speed renkli film veya statik CCD ( charge coupled device ) kameralar aracılığıyla bilgisayara aktarılarak elde edilir. CCD kamera sistemleri klasik mikroskoplara ve konfokal laser incelemelerine kıyasla sinyal analizini artırır, hatta görülemeyen sinyalleri görünür duruma getirebilir(161).

#### FISH' İN PRENATAL TANIDA KULLANILMASININ AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI :

##### İnterfaz FISH' in Avantajları :

Klasik sitogenetiğe kıyasla FISH hem daha hızlı hem de maliyeti daha azdır. FISH analizi, doku kültürü yapmadan gerçekleştirilip 48 saat hatta 24 saat içinde sonuç verilebilmesini sağlar(11, 167). Bu, özellikle anormal “ triple test “ sonuçları elde edilmiş gebeliklerde, endişe içinde genetik sonucu bekleyen anne adayları için çok önemlidir(167).

İnterfaz - FISH teknik açıdan diğer pekçok avantajı da birlikte getirir. Maternal kandan fetal hücrelerin izolasyonu ve analizi rutin hale geldiğinde bu yolla elde edilen çok sayıda fetal hücrelerinin analizi İnterfaz - FISH ile yapılabilecektir. İnterfaz - FISH, CVS' deki maternal hücre kontaminasyonunun tayininde de kullanışlı olabilir. Aynı zamanda zorlukları olan prenatal sitogenetik vakalarında, klasik sitogenetik yöntemlere ek bir teknik olarak düşünülebilir. Bu teknik, klasik sitogenetik analizler için CVS ve Amniyon sıvısı örneklerinde çabuk sonuç verebilen kurtarıcı bir teknik olarak kullanılabilir. Bunların yanında İnterfaz - FISH, iyi kalitede metafazların az olduğu ve sitolojik incelemenin zor olduğu durumlarda sitogenetik kromozom analizi sonuçlarının irdelenmesi açısından da çok gerekli olabilir.

#### FISH' in Dezavantajları :

FISH' in başlıca dört dezavantajı sayılabilir : Pekçok translokasyon, bazı aneuploidi' ler ve mozaiklikler gibi çok sayıda yapısal kromozom anomalileri ancak hücrelerin tam karyotipik analizlerinin yapılmasıyla ortaya konulabilir. FISH tekniği bu tip aberrasyonların analizinde yetersiz kalabilir, çünkü FISH ile sadece kullanılan problarla ilgili bölgeler ve anormallikler incelenebilir. FISH' in spesifikliği ve etkinliği, hücreden hücreye, probdan proba, hücre preporasyonu için kullanılan tekniklere kadar bir dizi parametreye bağlıdır. Sonuçlar, sinyal morfolojisine ve sayım sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesine bağlı olarak yoruma açık olabilir. Ayrıca, maternal hücre kontaminasyonu yalancı negatif sonuçlar verebilir.

## MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada kullanılan plasentaların büyük çoğunluğu Glasgow(İskoçya)'daki Kadın Hastalıkları ve Doğum hastanelerinden sağlanmış ve Glasgow Üniversitesi, Tıp Fakültesine bağlı olarak çalışan Duncan Guthrie Institute of Medical Genetics bölümü laboratuvarlarında çalışılmıştır. Hücre kültürleri ve FISH çalışmalarının bir kısmı Türkiye'ye dönüşte, izole edilip getirilen ve ticari problemlerin kullanılmasıyla Türkiye'de yapılmıştır.

### Doku Kültürü Materyalleri :

Hasta Materyalleri : Kadın hastalıkları ve doğum servisinde sağlanan 29 plasenta bu çalışma için kullanıldı. Bu plasentalar gebelik sırasında IUGR gösteren vakalardan , spontan abortus veya normal gebelik sonunda kendiliğinden olan doğumlar sonunda elde edildiler. Tüm plasentalar abortus yada doğum sonrasında taze ve fikse edilmemiş durumda kullanıldılar.

### Genel Materyaller :

Doku kültüründe kullanılan tüm solüsyonlar distile su ile hazırlandı ve gerekiyorsa otoklav kullanılarak sterilize edildi. Cam eşya, makas, forceps ve plastik eşya gibi tüm malzemeler otoklavlandı yada steril olarak alındı. Explant kültür tekniğinde kullanılan 9x35 mm. ebadındaki lameller %100 etanol de saklandı.

### Besiyerleri :

Tüm besiyerleri aseptik teknikler kullanılarak mikrobiyolojik güvenlik kabinde hazırlandı.

#### 1- Transport Besiyeri :

500 ml. F-10(HAM), 25 mM HEPES buffer ve L-glutamine (Gibco - BRL, 223 90 - 025

10 ml penisilin / streptomisin (Gibco-BRL, 15070-030)

% 2' lik penisilin / streptomisin F - 10 besiyerine eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 4°C' de kullanılmaya kadar muhafaza edildi. Her yeni hazırlanan besiyerinden 1,5 - 2ml. alınıp steril Nunc tüb' e aktarıldı ve sterilite kontrolü için 37°C' de inkübe edildi. 3 gün sonra kontrol edilerek kontaminasyon olmadığı anlaşıldığında kullanım için soğukta muhafaza edildi.

#### 2- Hücre Kültürü Besiyeri :

Hücrelerin kültüre alınmasında iki tip besiyeri kullanıldı. Her ikisi de aşağıdaki gibi hazırlandı ve sterilite kontrolleri yapıldı.

##### A - Tüp Besiyeri :

500ml. Hams - F-10

100ml. fetal calf serum (yada fetal bovine 5ml penisilin/strept. serum) (Gibco-BRL, 10106 - 110 )

## B - Flask Besiyeri :

500 ml. Hams F-10

50 ml. fetal calf serum (veya fetal bovine ser )

50 ml. newborn calf serum

2 ml. penisilin / strept

## 3- Kollajenaz Kültür Besiyeri :

( Collagenase Culture Medium:CCM )

100 ml. RPMI 1640, (1X) (Gibco-BRL, 27010-032 )

3 ml. penisilin / strept.

200 mg. kollajenaz

200 mg. kollajenaz 100 ml. RPMI 1640 içerisinde eritilir ve 3 ml penisilin/strept. eklendikten sonra sterilite kontrolü yapılarak kullanılıncaya kadar - 20°C' de muhafaza edilir.

## 4- % 3 CCM :

100 ml. RPMI 1640

3 ml penisilin / strept.

3 ml. penisilin / strept. 100 ml. RPMI, 640 besiyerine eklenir ve kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edilir.

## Stoklar ve Solüsyonlar :

1- Kollajenaz (IV) (Sigma C 5138)

2- Kolsemid (Gibco - BRL, 15212 - 012) Stok konsantrasyonu 10 Mg/ml. Çalışma solüsyonu PBS içerisinde 1/10 dilüsyon.

3- BrdU (Sigma, B - 5002) Stok konsantrasyon 3000 Mg/ml. Çalışma solüsyonu PBS içerisinde 1 /10 dilüsyon.

4- KCl (0,075 M) (overnight harvest için) 2-7964 gr. Potasyum klorid 100 ml. distile suda eritildi ve hacmi distile su ile 500 ml.' ye ayarlandı.

KCl (0.0375) : 0.075 M kcl 1/2 oranında distile su ile dilue edildi.

5- 3 Na - sitrat ( overnight harvest için )

4 gr. tri-sodyum sitrat 100 ml. distile suda eritildi ve distile su ile 500 ml.' ye tamamlandı.

6- Buffer :

Gurr buffer tableti ( pH : 6.8 ) ( Gibco BRL, 10582 - 013 ) 1 litre distile suda çözülür.

7- Sorenson buffer :

18.96 g. Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> ve 18.16g KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1 litre distile suda çözülür ve hacmi distile su ile 2 litreye ayarlanır.

8- Bantlama Tripsini :

1.2 gr. Tripsin ( Gibco - BRL, liyo filize, 25095 -019 ) 1 litre Sorenson buffer' da çözülür, iyice eriyinceye kadar ( 5 - 10 dk. ) karıştırılır. 20 ml.' lik universal tüplere ayrılarak kullanılıncaya kadar  $-18^{\circ}\text{C}$  ' de muhafaza edilir.

9- BPS Solüsyonu :

5 tablet PBS ( Phosphate Buffer Seline ) ( Gibco - BRL, 18912 - 014 ) 500 ml. distile suda çözüldükten sonra otoklav ile sterilize edilir.

10- Versene buffer: 0.2 gr. Versene(Gibco-BRL, 15040-033) 400 ml distile suda çözülür, otoklavlanır ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilir.

11- Tripsin/versene: 400 ml versen buffer'a 2x20 ml tripsin %2,5(10X) [liyofilize, porcine parpovirus test edilmiş, mycoplasma bakılmış, 25 gr. tripsin (1:250) ve 8,5 gr. NaCl 1/1 ] eklenerek iyice karıştırılır, steril üniversal tüplere ayrılarak kullanılıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilir.

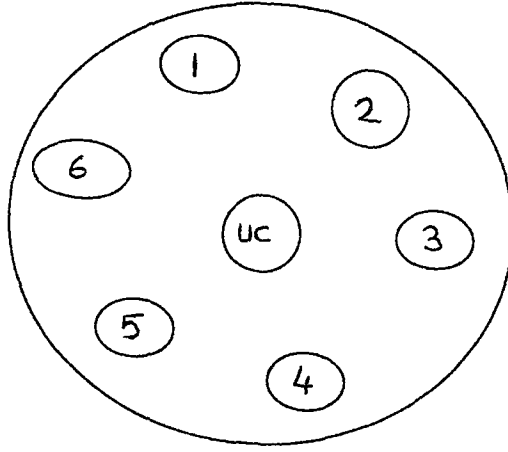
12- Tripsin-EDTA: 0.08 gr. EDTA 400ml salin içersinde eritilir ve otoklavlanır. Buna 0.2 gr. tripsin eklenerek iyice karıştırılır ve kullanılıncaya kadar  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilir.

13- Leishman boya: 3 gr. leishman tozu 2 litre metanol içine konulur ve manyetik karıştırıcı ile yavaşça eritilir. Solüsyon burada iyice erimesi için 24 saat karıştırılmaya bırakılır. Dikkatlice ısıtılır ve kaynamaya bırakılır. Bir süre sonra soğumaya terkedilir. Whattman filtre kağıdı ile süzöldükten sonra 500 ml'lik şişelerde karanlık ortamda muhafaza edilir.

#### DOKU KÜLTÜR METODLARI:

Kültür için dokuların hazırlanması: Plasentadan alınacak doku örneklerinin uygun olması için plasentanın kenarından yaklaşık 4 cm kadar içerisinden biyopsi yapıldı. Plasentanın bu şekilde seçilen 6 ayrı bölgesinden steril bir makas ve forseps kullanılarak materyal alındı. Bu işlem yapılırken maternal hücre kontaminasyonunu gözönüne alarak, plasentanın göbek kordonunun bağlandığı yüzeyden ve derine inmeden biyopsi yapıldı.

Amniyon zarı ve koryon zarının alınması içinde steril makas ve forseps'ler kullanılarak plasentanın yine göbek kordonunun bağlandığı yüzeyden küçük zar parçaları biyopsi yapıldı. Alınan tüm plasental doku ve zar örneklerinin herbiri, içinde 15 ml transport besiyeri bulunan tüplere konularak en az 3 saat veya overnight olarak bekletildi. Herhangi bir kontaminasyonu önlemek için yapılan bu bekletme işleminden sonra dokuların kültürüne geçildi(şekil-7).



ŞEKİL-7: Alınan plasental bölgeler; UC: umbilikal cord, 1-6 :doku alınan sahalar.

#### KÜLTÜR METODLARI:

Hücrelerin kültürü için explant ve kollagenaz kültür metodları kullanıldı. Kültürler aşağıda açıklandığı gibi yapıldı.

##### Explant Kültürü:

Dokular makas yardımıyla kesilerek kıyma haline getirildi. Bu işlem 100 mm'lik petriyer içinde steril kabin kullanılarak yapıldı.

İyice kıyılan dokulardan 8-10 küçük parça pastör pipetin ucuyla alınarak dikkatlice nunc tübün tabanına yerleştirildi.

Pastör pipeti bu işlem için alevde ısıtılarak ucu sıcakken bir forseps ile uzatılarak soğuduğunda kırıldı ve çok daha ince hale getirildi.

Alkol içinde muhafaza edilen 9x35 mm lamellerden biri forseps yardımıyla alınıp alevden geçirildikten sonra nunc tübün içindeki doku örneklerinin üzerine dikkatlice yerleştirildi.

4-Tüp besiyerinden 1.5 ml alıp çok yavaş ve pastör pipetin ucunu lamele bastırarak eklendi. Bu işlem besiyeri boşaltırken lamelin hareket etmesini ve dokuların etrafa dağılmasını engellemek, dokuların bu baskı ile tübün tabanına daha iyi yapışmasını ve hücre üremesinin daha çabuk başlamasını sağlamak için yapıldı.

5- Doku örnekleri 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve 7 gün sonra hücre üremesi kontrol edildi.

Geri kalan kıyılmış dokular iki ayrı nunc tübe yerleştirildi ve transport besiyeri içinde 37°C'de overnight inkübasyondan sonra kollajenaz kültür için kullanıldı.

**Kollajenaz Kültürü:**

- 1- Ertesi gün kıyılmış dokuların bulunduğu tüpler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 2- Süpernatant atıldıktan sonra 4 ml tripsin/versen eklenerek enzim çalışmasına hazırlık yapıldı.
- 3-Tüpler 37<sup>0</sup>C'de bir saat inkübe edildi ve bu sürede her 15 dakikada bir çalkalandı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj den sonra süpernatant atıldı.  
1 ml CCM ve 1 ml kollajenaz %3 CCM eklenerek pellet eritildi.
- 5- Tüpler 37<sup>0</sup>C'de 2-3 saat inkübe edildi. Her 30 dakikada bir çalkalanarak tek hücreli süspansiyon haline getirilmeye çalışıldı. Bunun için hücre süspansiyonu zaman zaman inverted mikroskopla incelenerek işlemin tamamlanma zamanı kontrol edildi.
- 6- Tüpler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant atıldı.
- 7- Pellet 1.5 ml tüp besiyeri içerisinde eritilerek 37<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakıldı, 3-4 gün sonra hücrelerin üremesi kontrol edildi.

**Besleme ve Subkültür:**

Hücre üremesi olması için düzenli bir besleme ve gerektiğinde subkültür yapıldı.

**Besleme:** Mono-layer duruma gelen hücrelerin beslenmesi için eski besiyerini ortamdan dökme yoluyla uzaklaştırılması, 1.5 ml taze ve 37<sup>0</sup>C'ye ısıtılmış tüp besiyerinin verilmesi şeklinde yapıldı. Ayrıca, kültürler harvest yapılacağıında kolsemid ekmeden hemen önce veya bir gece önce ısıtılmış taze besiyeri ile beslenmelidir.

**Subkültür:**

- 1- Filtre edilmiş steril tripsin/versen ve 37<sup>0</sup>C'ye ısıtılmış taze besiyeri kullanıldı, daha önce eski besiyeri dökme yoluyla ortamdan uzaklaştırıldı
- 2- İki damla steril tripsin/versen tüpte kalan eski besiyerinin temizlenmesi için eklenerek, çalkalayıp dışarı atıldı. Tüpe altı damla tripsin/versen eklenerek hücrelerin tüpten ayrılması sağlandı.
- 3- Bir pastör pipeti bu iş için kullanılarak lamel ve tüp tabanı orasına tripsin/versen'in girmesi sağlandı.
- 4- Tüpler 37<sup>0</sup>C'de bir inkübatöre yatay olarak bırakılarak birkaç dakikada bir hücrelerin hareketi kontrol edildi. Bunun için inverted mikroskop kullanıldı.
- 5- Yaklaşık 1.5 ml taze besiyeri eklendi ve tüp birkaç defa kendi etrafında döndürülerek hücre süspansiyonununun homojen olması sağlandı.
- 6- Tüpler 37<sup>0</sup>C inkübatöre yerleştirildi.

7- Birkaç gün sonra tüpler beslendi ve bir sonraki gün harvest yapılıp yapılamıyacağına karar vermek için mikroskopta gözlendi.

Pasaj:

1-Subkültürdeki 1-4. Basamaklar tekrarlandıktan sonra yeterli miktarda taze besiyeri steril bir şırınga ile alınıp tübün içi birkaç defa yıkanır. İçinde hücrelerin bulunduğu besiyeri yeni tüplere 1.5 ml olacak şekilde aktarılır.

2- Yeni tüpler uygun şekilde işaretlenir(1-1a ve 1-1b gibi).

3- Tüpler inkübatöre yerleştirilmeden önce hafifçe çalkalanır.

Ertesi gün tüpler beslendikten sonra, birgün sonra ne yapılacağına karar vermek için kontrol edilir. Ya tekrar pasaj yapılacaktır yada harvest'a alınacaktır.

Harvest:

Analizde kullanılacak yeterli metafaz elde etmek için hücreler aktif olarak bölünme döneminde olmalıdırlar. Optimum harvest zamanı subkültür sonrası 24-48 saatler arasındır. Bunu sağlamak için iki harvest metodu kullanılır.

A-Non-senkronize metod

B-Senkronize metod

A-Non-senkronize metod:

1- Herbir tüpe 0.15 ml kolsemid solüsyonu (10µg/ml) eklenir ve 37°C'de 2 saat inkübe edilir.

2- Besiyeri bir başka tüpe dökülerek muhafaza edilir. Hücrelerin 2 damla tripsin/versenle yıkanmasından sonra 2 damla tripsin/versen eklenir.

3- Kültürler 37°C'de 5 dakika inkübasyona alınarak hücrelerin yapıştıkları tüp tabanından kaldırılmaları sağlanır. Muhafaza edilmiş eski besiyeri tübe geri dökülerek tripsin aktivitesinin durdurulması sağlanır.

4- Hücreler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılır.Hipotonikle muameleden önce hücrelerin süspanse edilebilmesi için çok az süpernatant bırakılır.

5-37°C'ye ısıtılmış KCI çözeltisi önce yavaşça sonra daha hızlı olmak üzere eklenir ve bu şekilde 2 ml'ye kadar artırılır.

B-Senkronize Metod:

1- Harvest yapmak için kolsemid (10µg/ml) (Gibco-BRL, 15212-012) ve BrdU(300µg/ml) (Sigma, B-5002) kültürler eklendi. Herbir tüpe 2 ml besiyeri için 25 µl BrdU ve 25 µl kolsemid kullnıldı. Bir flask içinse 5 ml besiyerine 62.5 µl BrdU ve 75 µl kolsemid eklendi.

2- Kültürler 37°C'de overnight(16 saat) inkübe edildi.

3- Ertesi gün besiyeri dökülerek uzaklaştırıldı ve flask 1 ml tripsin/versenle yıkandı. İki damla tripsin/versen eklenerek hücreler yerlerinden kaldırılncaya kadar inkübe edildi.

4- Tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra süpernatant dikkatlice pipetle alınarak atıldı. Hücre süspansiyonu, yeni karıştırılmış(1:1 oranında 0.075 M KCl:%0.8 Sodyum sitrat) ve 37°C'ye ısıtılmış 4-5 ml hipotonik içinde çözüldü.

Tüpler 37°C'de 20 dakika inkübasyondan sonra 1 ml taze fiksatif eklenerek karıştırıldı

Fiksasyon: Her iki harvest metodu için de aynı fiksasyon metodu kullanıldı.

1- Tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve hücrelerin süspansiyonu için çok az bir miktarı bırakıldı. Taze fiksatif, önceleri damla damla sonra hızlı şekilde son hacim 2 ml olacak şekilde eklendi.

2- Aynı şekilde bir daha fiksasyon yapıldıktan sonra hücre süspansiyonu preparat yapımına kadar en az 30 dakika -20°C'de muhafaza edildi.

#### Preparat Yapımı:

1- Hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 8 dakika santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve hazırlanmış fiksatif hücrelere eklendi.

2- Hücre süspansiyonu ıslak, soğuk ve yağdan arındırılmış lam üzerine damlatılır ve 1-2 damla fiksatif damlatma ile kromozomların homojen olarak dağılması sağlanır. Lameller işaretlenip kurumaya bırakılır.

3- Herbir preparattaki metafaz kromozomlarının durumu mikroskopla kontrol edilir.

4- G-bantlama için preparatlar 80°C'lik fırında 2 saat yaşlandırılır.

#### G-Bantlama:

1- Preparatlar sıcak bantlama tripsini ile dökme yöntemi kullanılarak muamele edilir. Burada tripsinin ısı ve miktarı tripsin muamele süresi çok önemlidir. Genellikle 15-20 saniye olarak kullanıldı.

2- Tripsin, söransan buffer'le yıkandı ve preparatlar 90 saniye süre ile boyandı(1:3, Leishman:Gurr buffer).

3- Boyanmış preparatlar akarsu ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı.

#### Kromozom Analizi:

Preparatlar 1000 büyütme ile immersiyon yağı kullanılarak analiz edildi. Vaka'ların herbir bölgesinden mümkün olduğunca 100 hücre incelenerek analiz edildi.

#### FISH İÇİN MATERYALLER:

##### Hasta Materyalleri:

İnterfaz-FISH preparatları için 4 farklı hasta materyali kullanıldı; plasental doku, Amniyon, Koryon ve CVS Plasental doku, amniyon ve koryonlar doku kültürü için kullanılan 20

plasentadan elde edildi. Trizomi-18 ve trizomi-21 vakalarının araştırılmasında dual-colour interfaz –FISH yöntemiyle 94 CVS kullanıldı. IUGR gösteren gebeliklerden elde edilen 34 plasental doku örneği ise dual-colour interfaz-FISH tekniği kullanılarak trizomi-7, trizomi-16, trizomi-18 ve trizomi-21 araştırılması için toplandı.

Genel Materyaller:

Tüm solüsyonların hazırlanmasında deiyonize su kullanıldı ve eğer gerekliyse 121<sup>0</sup>C’de 20 dakika otoklav edildi. Tüm pipet uçları, plastik ve cam eşyalar kullanmadan önce otoklav kullanılarak sterilize edildi. 50 ml’lik plastik tüpler (Sarstedt) ve 1.5 ml ‘lik eppendorf tüpler deneylerde kullanılmadan önce sterilize edildiler. Lam’lar kullanılmadan önce, bir gece Decon’da bekletilerek temizlendi, en az bir saat akarsuda tutularak yıkandı ve %70’lik etanolde muhafaza edildi. Lamalar kullanılmadan önce etanolün uzaklaştırılması için akarsuda bekletildi. Lameller %70 etanolde muhafaza edildi ve kullanımdan hemen önce Kimwipes kağıdıyla kurularak temizlendi.

**BESİYERLERİ:**

1)AHC besiyeri(Yeast kültürü için)

Aşağıdaki kimyasallar 450 ml deiyonize suda eritildi.

Adenine hemisulfate(C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> )(Sigma, A9126)	10 mg.
Acid hydrolysed casein(Gibco-BRL, 80007-565)	5 mg.
Ammonium sulphate(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma, A2939)	2,5 mg.
Yeast nitrojen base W/O (Difco, 0392-15-9)	3,35 mg.

Konsantre HCl kullanılarak pH;5.8’e ayarlandı ve hacim deiyonize su ile 475 ml’ye getirildi. Solüsyon otoklavlanarak sterilize edildikten sonra 25 ml steril %40 W/V D-glukoz steril şartlar altında bu besiyerine eklendi ve kullanılıncaya kadar 4<sup>0</sup>C’de muhafaza edildi.

2) Luria-bertoni(LB) besiyeri:

Aşağıdaki kimyasallar 450 ml deiyonize suda eritildi.

Bacto-yeast extract (Difco, 0127-17-9)	2,5 gr.
Bacto-tryptone (Difco, 123-17-3)	5.0 gr.
Sodium chloride (NaCl)	5.0 gr.

Konsantre NaOH kullanılarak pH;7.0’ye ayarlandıktan sonra hacim deiyonize su ile 500 ml’ye tamamlandı. Solüsyon otoklavlandıktan sonra soğuduğunda son konsantrasyonu 25 µg/ml olan uygun bir antibiyotik steril şartlar altında eklendi ve besiyeri kullanılıncaya kadar +4<sup>0</sup>C’de muhafaza edildi.

3) Iscove’s besiyeri(Lenfosit kültürü için)

Aşağıdakiler steril şartlar altında 100 ml Iscove besiyerine eklendi.

Phytohaemagglutinin(Sigma, L8629)	2 ml
Heparin (5000 ümits/ml)(Sigma, H0880)	1 ml
L-Glutamin (100X)(C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )(Sigma, G7029)	1 ml
Penicillin/streptomycin	1 ml

Bu besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra kullanılıncaya kadar +4<sup>0</sup>C’de muhafaza edildi.

#### SOLÜSYONLAR:

20xSSC(1 litre)

NaCl 175.2 gr.

Tri-Sodyum-sitrat (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) 88,2 gr.

700 ml distile suda eritilip bir litreye tamamlandı. Otoklavla sterilize edilip oda sıcaklığında muhafaza edildi.

4xSSC, Tween-20:

200 ml 20xSSC distile su ile bir litreye tamamlandı. 250 µl Tween-20 eklenip iyice karıştırılıp oda sıcaklığında muhafaza edildi.

%1 Ethidium Bromide:

Ethidium Bromide(C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br)(Sigma, E8751) 1 gr.

Distile su 100 ml’de karıştırılarak eritildi.

Alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu. Daha sonra kullanılmak üzere oda ısısında veya +4<sup>0</sup>C’de muhafaza edildi.

Sorbitol solüsyonu(1M): 91 gr. sorbitol(C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>)(Sigma, S1876) distile suda çözülüp 500 ml’ye tamamlandı.

Sodyum sitrat(1M): 29,4 gr. tri-sodyum sitrat (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O)(AnalaR) 90 ml distile suda çözülüp pH;5.8’e ayarlandıktan sonra distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

6- EDTA: 3.2 gr. EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid, EDS, C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)(Sigma) 90 ml distile suda eritilip pH;8.0’a ayarlandıktan sonra distile su ile 100 ml’ye tamamlandı.

SCE Solüsyonu:

Sorbitol(1M) 400 ml

Na-sitrat(1M, pH;5.8) 50 ml

EDTA (0.1M, pH;8.0) 50 ml

İyice karıştırılıp otoklavla sterilize edildikten sonra kullanılıncaya kadar +4<sup>0</sup>C’de muhafaza edildi. Kullanmadan hemen önce son konsantrasyonu 30 mM β-merkaptotanol eklendi.

DLS lizis buffer: Aşağıdakiler 90 ml deiyonize suda eritildi.

Dodecyl lithium sulfat(C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub>Sl)(sigma) 1 gr.

NaCl 0.29 gr.

Solüsyon pH;7,8 olan 10 ml 0.1 M Tris-HCl ile karıştırılıp kullanılıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi.

9-5M Potasyum asetat: 4.9 gr. Potasyum asetat( $KC_2H_3O_2$ )(Sigma, p5708) 10 ml deiyonize suda çözülüp, filtre edildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

10-T.B.E buffer:

EDTA	9.3 gr.
Borik asit	55.0 gr.
Tris base	108.0 gr.

Yukarıdaki kimyasallar 800 ml distile suda eritilip pH;8.1-8.2'ye ayarlandı.(sıvı borik asit veya NaOH ile).Distile su ile 1 litreye tamamlanıp oda ısısında muhafaza edildi.

11- T.E. buffer: 10 mM Tris-HCl, 1mM ED TA (pH;8.6) ile karıştırılıp filtre edildikten sonra oda ısısında muhafaza edildi.

12- Agaroz jel(%1.3): 0.65 gr agaroz tozu (Gibco-BRL, 15510-027) 50 ml T.B.E. buffer içerisinde çözülüp iyice karıştırılıp ve 3 dakika mikrodalga fırında kaynatıldı. Solüsyon  $60^{\circ}C$ 'ye soğuyunca 2  $\mu$ l ethidyum bromid(10 mg/ml) eklendi. Jel hemen elektroforez cihazına döküldü.

13- Loading mix:

Bromophenol blue ( $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ ) (Sigma, B0126)	0.25 mg.
Ficoll (Tip 400)(Sigma, F2637)	25.0 mg.

100 ml distile suda eritilip, alüminyum folyo ile sarılır ve oda ısısında muhafaza edildi.

14- Salmon sperm DNA(20 mg/ml): 200 mg Salmon sperm DNA'sı 10 ml deiyonize suda eritilip  $70^{\circ}C$ 'deki su banyosuna kondu. Solüsyon ucuna iğne takılmış 10 ml'lik bir şırıngadan defalarca geçirilerek şeffeleştirildi. Tüp buz içine yerleştirilerek herbiri 4 dakika süresince 3 defa 4 voltluk elektrik akımı verildi. DNA'nın fragment uzunluğu jel elektroforezi(%8 agaroz jel) ile kontrol edildi ve  $+4^{\circ}C$ 'de muhafaza edildi.

Ticari insan plasenta DNA'sı (10 mg/ml) (Sigma) da kompetitör DNA olarak salmon sperm DNA yerine kullanılabilir.

15- Hibridizasyon buffer: 1 gr. Dekstran sülfat (Sigma, D7037) 2 ml deiyonize suda eritilip aşağıdakile eklendi.

Formamide (%99, Fluka 46670)( $CH_3NO$ )	5 ml
20xSSC	1 ml
Salmon sperm DNA (20 mg/ml)	50 $\mu$ l

Solüsyon iyice karıştırılıp tamamen erimesi için birkaç saat 70°C'de bekletildi. Konsantre HCl ile pH;7.0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra distile su ile 10 ml'ye getirildi. Solüsyon 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılıp kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

16- Denatürasyon buffer (%70 formamide): 15 ml 2xSSC, 35 ml formamide (%99) karıştırılıp +4°C'de kullanılıncaya kadar karanlıkta muhafaza edildi.

17- Yıkama solüsyonu (%50 formamide): 25 ml 2xSSC ve 25 ml formamide(%99) iyice karıştırılıp kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edildi.

18- Wash-A solüsyonu(yıkama solüsyonu):

Yağsız süttozu	25 gr.
20xSSC	100 ml
Tween-20	250 µl

Yukarıdakiler 300 ml distile suda iyice eritilip 500 ml'ye tamamlandı. Solüsyon düşük ısıda , tamamen eriyinceye kadar karıştırıldı. 50 ml'lik tüplere dökülerek 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Solüsyon her deney için taze olarak hazırlanmalıdır.

19- Rnaz (Dnase free)(100µg/ml): 20 ml 2xSSC ve 80 µl konsantre stok RNaz(25 mg/ml) karıştırıldı. Herhangi bir DNA kontaminasyonundan korumak için 10 dakika hot plate kullanılarak kaynatıldı. Solüsyon 1.5 ml' lik eppendorf tüplere konularak kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

20-DAPI(Çalışma solüsyonu; 40 µg /ml): 40 µl DAPI(1 mg/ml) 960 µl distile suda dilüe edilip, iyice karıştırıldı. Karanlık ortamda +4°C'de muhafaza edildi.

21- PI(Çalışma solüsyonu; 20 µg/ml): 2 µl PI (10 mg/ml) 998 µl distile suda dilüe edilip karıştırıldı ve +4°C'de muhafaza edildi.

22- Antifade besiyeri: Antifade besiyeri olarak, citiflour, DAPI ve PI ile karıştırılarak kullanıldı(0.4 µl DAPI, 0.2 µl PI ve 9.4 µl antiflour karıştırıldı).

23- Circleprep kit (Bİ 0101, cat.no;CP-100)

24- Nick translasyon kit(Gibco-BRL, cat.no;8160 SB)

25- Digoxigenin (dNTP) labelling mixture (Boehringer Mannheim, cat. no;1277065)

26- Deteksiyon Solüsyonları:

Fluorescein isothiocyanate(FITC) avidin( Vector Lab., A-2011)

Rhodamine avidin(Vector Lab, A-2012)

Biotinylated goat antiavidin (Vector Lab, BA-0300)

Sheep antidigoxigenin fluoresceinated FAB fragments (Boehringer, 1207741)

Sheep antidigoxigenin rhodamine FAB fragments (Boehringer, 1207750)

Fluorescein anti sheep isothiocyanate IgG (H+L) (Boehringer, F<sub>1</sub> –6000)

FITC conjugated monoclonal anti digoxin (Sigma, F-3523)

FITC conjugated antimouse IgG (Sigma, F-3008)

#### FISH TEKNİKLERİ:

##### Güvenlik Önlemleri:

Bu çalışmada plasenta, CVS, amniyon, periferik kan ve amniyon sıvısından elde edilen hücreler çalışıldı. Ayrıca prob DNA izolasyonu için plazmid, faj, bakteri ve maya gibi bazı mikrobiyolojik hücreler de kullanıldı. Tüm bu hücreler enfeksiyon etkeni olabileceği için insan sağlığı açısından tehlikeli olabilir. Ayrıca kullanılan besiyerlerinde rahatlıkla üreyebilen pekçok mikrobiyolojik organizma letalite ve mutajenite bakımından kültüre alınan hücreler için öldürücü yada bazı zararlı toksinleri üreterek zararlı olabilirler.

Bu yüzden DNA izolasyonu için kullanılan maya ve bakteri hücreleriyle çalışılırken bu iş için özel olarak düzenlenmiş steril laboratuvarlar kullanıldı. Host hücreleri bu laboratuvarda çalışıldıktan sonra izole edilen DNA'lar diğer çalışmalar için İn-Situ laboratuvara aktarıldı. Ünlversal tüp, kültür flaskı, pipet ve petri kabı gibi materyaller kullanılmadan önce otoklavlanabilir disposibl torbalara konulup steril edildi. Tüm insan hücreleri, biyolojik güvenlik kabinleri kullanılarak kültür ve harvest işlemleri yapıldı. Deneyler süresince laboratuvar önlüğü ve deney eldiveni kullanıldı. Gerektiğinde, kontaminasyon riskini en aza indirmek için gözlük ve maskeler kullanıldı. İn-Situ çalışmalarında kullanılan toksik, karsinojenik, allerjenik ve teratojenik kimyasallar için mutlaka fume hood kullanıldı(Laboratory COSSH manual, 1995).

#### PERPARATLARIN HAZIRLANMASI

Kültüre edilmiş ve edilmemiş lenfositler, plasental doku hücreleri, amniyotik doku hücreleri , koryonik doku hücreleri ve CVS hücreleri temizlenmiş lamalar üzerine fix edildiler. Preparatlar etanol serisinden geçirildikten sonra in-situ hibridizasyonda kullanılıncaya kadar – 20<sup>0</sup>C'de muhafaza edildi.

##### Periferik kan kültürü, harvest ve preparat yapımı:

İnsan periferik kan hücreleri, metafaz kromozomlarında prob DNA'nın hibridizasyon gücünün kontrolü için kullanıldı. Bunun için periferik kan steril şartlarda kültüre alındı. Bir ml heparinize kan kültür tüpü içindeki 9 ml Iscove besiyerine eklendi ve 37<sup>0</sup>C'de 48 saat inkübasyona alındı. 0.1 ml timidin solüsyonu(30mg/ml) ilave edilip 18 saat inkübasyona devam edildi. 0.1 ml 2-deoksitidin(1M) eklenip 4 saat aynı şartlarda inkübe edildi.

##### Lenfosit kültürünün Harvest'i:

Matafaz kromozomlarının elde edilmesi için ortama 0.1 ml kolsemid(10µl/ml) eklendi, karıştırıldı ve bir saat kadar inkübasyona devam edildi. Tüpler 1000rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra süpernatant geride 1 ml kalacak şekilde atıldı. Dipteki pellet 37<sup>0</sup>C'ye ısıtılmış 10 ml hipotonik (0.075 M KCl) ile eritildi. 37<sup>0</sup>C'de 10 dakika inkübe edildi. Tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra süpernatant atılarak pellet 10 ml fiksatifle muamele edildi. İlk 1 ml damla damla eklenerek karıştırıldı. Bu basamak toplam 3 kere tekrarlandı. Pellet 5 ml taze fiksatif içinde +4<sup>0</sup>C'de en az 30 dakika bekletildi. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet taze hazırlanmış 15-20 damla fiksatifle eritildi. Herbir temizlenmiş ve ıslak lam üzerine 30-40 cm yüksekten 2-3 damla olacak şekilde damlatıldı. Preparatlar oda ısısında kurutulduktan sonra kullanılıncaya kadar +4<sup>0</sup>C'de muhafaza edildi.

*Kültüre alınmamış lenfositlerden preparat yapımı:*

Bir ml kan üzerine 37<sup>0</sup>C'deki hipotonikten 10 ml ilave edilip 37<sup>0</sup>C'de 10 dakika inkübe edildi. Hücreler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjle elde edildikten sonra taze fiksatifle ilk 1 ml'si çok aralıklı damlalar olarak ve tüp çok hızlı karıştırılarak eritildi. Daha sonra yine damla halinde 9 ml'ye tamamlanan fiksatif içindeki hücreler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra pellet toplam üç kere aynı şekilde fiksatifle yıkandı. Tamamen temiz duruma gelen hücre süspansiyonu 15-20 damla taze fiksatif içinde temizlenmiş ve ıslak lamlar üzerine herbirine 2-3 damla olacak şekilde damlatıldı. Preparatlar kuruduktan sonra etanol serisinden geçirilerek havada kurutuldu ve oda ısısında yaşlanmaya bırakıldı. Ertesi gün –20<sup>0</sup>C'ye alınarak uzun süre muhafaza edildi.

*Solid doku örneklerinin preparasyonu*(kültüre alınmamış plasenta, amniyon, koryon ve CVS):

Klasik sitogenetik yöntemlerle tanı konulan aneuploidilerin interfaz-FISH ile teyidi edilmesi için kültüre alınmamış plasental dokulardan elde edilen hücreler kullanıldı. Preparatların hazırlanmasından sonra mikroskopta kontrol edildi. Yeterli hücre bulunan, stoplazmik artıkların olmadığı, hücre morfolojisi bozulmamış sahalara işaretlenerek FISH için kullanıldı.

**METOD 1:** Plasenta , amniyon, koryon ve CVS dokularının kollajenaz muamelesinden sonra, hücreler önceden 37<sup>0</sup>C'ye ısıtılmış PBS ile 3 kere yıkandı. Tüpler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjden sonra pellet ön ısıtma ile 37<sup>0</sup>C'deki 0.0375 M KCl ile eritildi. Santrifüjden sonra 1.5 ml taze fiksatif kullanılarak fiks edildi. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjden sonra süpernatant atıldı. Hücreler yeniden fiks edilip santrifüj edildi ve fiksatif içinde –20<sup>0</sup>C'de en az 30 dakika bekletildi. Santrifüjden sonra süpernatant atılarak 10-15 damla taze fiksatif eklendi. Temizlenmiş ve ıslak lamlar üzerine 3-4 damla damlatılarak

havada kurutuldu. Preparatlar etanol serisiden geçirilerek kullanilincaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

**METOD 2:** Koryonik villi nunc tüpe alınarak besiyeri uzaklaştırıldı. Ön ısıtma ile  $37^{\circ}\text{C}$ 'ye getirilmiş 3 ml %1'lik tri-sodyum sitrat eklenerek 10 dakika muamele edildi. Tri-sodyum sitrat uzaklaştırılarak hücreler taze fiksatifle fiks edildi. Tüp  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika bırakıldıktan sonra santrifüjle fiksatif uzaklaştırıldı ve tüp ters çevrilip 5 dakika bırakılarak hücreler kurutuldu. Tüpe 10-15 damla %60'lık asetik asit eklenerek preparat yapıldı.

**METOD 3:** Bu protokol kollajenaz prosedürünün ortadan kaldırılmasıyla taze dokulardan interfaz-FISH yapılabilmesi için ilk defa bu çalışmada kullanılmıştır.

Küçük bir parça taze doku kesilip alınarak temiz bir lam üzerine birkaç defa değdirme yöntemiyle hücreler preparasyona alındı. Lam hemen  $-20^{\circ}\text{C}$ 'deki saf metanol içine aktararak 20 dakika bekletildikten sonra 20 dakika için taze hazırlanmış fiksatife alındı. Preparat etanol serisinden geçirilerek havada kurutuldu. Ertesi gün  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafazaya alındı.

### PROBLAR

Bu çalışmada kullanılan prob'lar değişik kaynaklardan sağlandı.

1-Prob L1.84 bir insan fragmentidir ve PAT153 plazmid'inden klonlanmıştır. Bu prob kromozom 18'in sentromer bölgesine hibridize olur.684 bp uzunluğunda olup her haploid genomda tahminen 2000 kadar kopya sayısına sahip insan alphoid DNA tekrarıyla kendini ortaya koyar(Devilee et al, 1986 a,b)

2- YAC klon 831B9 Dr. Denis'le Paslier tarafından sağlanmıştır. Kromozom 21'in uzun koluna (21q22) hibridize olur.

3- Prob pG-A16 bir insan DNA fragmentidir ve plazmid p5P64'de klonlanmıştır. Kromozomlar 5 ve 9'un sentromerik bölgelerine hibridize olur. 1950 bp uzunluğunda olup insan alphoid DNA tekrarının bir avantajını sunar (Hulsebos et al, 1988) ve ATCC'den sağlanmıştır.

4- Ticari problemler:

Sentromerik-X: Biotin labelled  $\alpha$ -satellite (DXZ1)(Oncor, P5060-B5)

Sentromerik-7: Digoxigenin labelled  $\alpha$ -satellite (D7Z1)(Oncor, P5011-DG)

Sentromerik-15: Biotin labelled  $\alpha$ -satellite (D15Z1)(Oncor, P5034-B.5)

Sentromerik-16: Biotin Labelled  $\alpha$ -satellite (D16Z2)(Oncor, P5035-B.5)

Senromerik-20 Biotin Labelled  $\alpha$ -satellite (D20Z1)(Oncor, P5050-B.5)

Prob L1.84 standart kültür besiyerinde üretilerek amplifiye edildi ve DNA izole edilerek kullanıldı. YAC içeren maya hücreleri seçici bir besiyeri olan AHC'de üretildi, DNA izole edilerek Alu-PCR ile amplifiye edildi ve prob-DNA elde edildi.

#### PROB HAZIRLANMASI:

Prob DNA izolasyonu için rekombinant vektör içeren tüm host hücreler uygun bir besiyerinde kültüre alındı ve izole edilen DNA eğer gerekliyse PCR ile amplifiye edildi. İlk olarak, L1.84 ve pG-A16 içeren bakteriyel hücreler, L-broth ve 25-50 µg/ml ampisilin içeren agar petrilerinde kültüre alındılar. Bir koloni alınarak 100 ml L-broth besiyerinde 37°C ve overnight olarak sallayıcı inkübatörde üretildiler.

YAC831B9'un izolasyonu için maya hücreleri 20 ml AHC besiyerinde 30°C'de sallayıcı inkübatör kullanılarak tamamen doyuncaya kadar kültüre edildiler, bu süre genellikle 3 gündür. Amplifiye edilen bakteriyel ve maya hücreleri daha sonra DNA izolasyonu için kullanıldı.

#### PLAZMİD DNA İZOLASYONU:

Plazmid DNA izolasyonu için satıcı firmanın verdiği protokolde küçük değişiklikler yapılarak Circleprep kit kullanıldı.

Overnight kültür.50 ml plastik tüpe aktarıldı ve 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüp ters çevrilerek kurumaya bırakıldı. Pellet 4 ml prelysis buffer ile eritilerek iyice karıştırıldı. 3-4 ml alkaline lysis süspansiyona eklenerek tam olarak lizis olana kadar karıştırıldı. 4 ml neutrolising solüsyon eklendi ve solüsyon tam olarak 2 faz oluşuncaya kadar karıştırıldı. Karışım 12.000 rpm' de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant filtre kağıdından geçirilerek yeni bir tüpe aktarıldı. Bu solüsyon eşit hacimde isopropanol (yaklaşık 12ml) kullanılarak iyi bir presipitasyon elde edilinceye kadar karıştırıldı. Süspansiyon 12.000 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak geri kalan sıvı bir kağıda emdirilme yoluyla uzaklaştırıldı. Pellet 0.5 ml. distile su kullanılıp eritilerek bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Tüp lineer hücresel DNA' nın denatürasyonu için 3-5 dk. hot plate kullanılarak kaynamaya bırakıldı. Tüpün kapağı hot plate konmadan önce evaporosyonun önlenmesi için delikli bir parafilmle kapatıldı. Tüp hemen soğutulmak için en az 1 dk. buz içine alındı. Daha sonra, tek iplik DNA ve ribozomal DNA' nın presipitasyonu için 300 µl. LiCl eklendi. Süspansiyon iyice karıştırıldı ve 2dk. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet 0,5 ml distile suda eritildi. 300 µl. LiCl eklenerek karıştırıldı ve 5 dk. oda ısısında bırakıldı. 75µ l. circleprep glassmilk eklenerek, ara sıra sallamak kaydıyla 15 dk. oda ısısında inkübe edildi. Solüsyon DNA/ glassmilk karışımının presipitasyonu için 2 dk. santrifüj edildi ve süpernatant

yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ( daha fazla DNA izolasyonu için kullanılabilir ) . Pellet 1 ml binding buffer ile 2 -3 defa yıkandıktan sonra son buffer bir mikropipet ucuyla uzaklaştırıldı. Pellet yıkama solüsyonu ile 2 defa yıkandıktan sonra vakumlanarak kurutuldu. Plazmid DNA, 100-300µl. filtre edilmiş distile suda pelletin eritilmesi suretiyle glassmilken arındırıldı. Süspansiyon karıştırılarak 60°C sıcak su banyosunda 5 dk. inkübe edildi. Tüp santrifüj edilerek ( 2 dk. ) süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Plasmid DNA içeren solüsyon 30 dk, 37°C subanyosunda inkübe edildikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edildi.

#### MAYA GENOMİK DNA' SININ İZOLASYONU :

Bunun için Sherman ve arkadaşlarının protokolünde küçük değişiklikler yapılarak izolasyon tekniği kullanıldı(145).

YAC içeren amplifiye edilmiş maya hücreleri plastik bir tüpe aktarıldı ve 10.000 rpm' de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak palet kurutuldu. Pellet 1ml. SCE solüsyonunda eritildikten sonra, hücre süspansiyonu 1,5ml' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 10ml. zymolase ( 100 mg / ml ) eklenerek lizis yapıldıktan sonra 37°C su banyosunda 1 saat inkübe edildi. Karışım 12.000 rpm' de 1 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve pellet 0.5 ml. DLS lysis buffer' da eritildi. Süspansiyon iyice karıştırıldı ve 65°C' de 30 - 60 dk. inkübe edildi. 200 ml. 5 M potasyum asetat eklenen tüp 60 dk. için buza yerleştirildi. Süspansiyon 12.000 rpm' de 5 dk. santrifüjden sonra süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Eşit oranda isopropanal eklenerek oluşan karışım oda ısısında 5 dk. bırakıldı. Tüp 12.000 rpm' de 10 saniye santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı ve pellet havada kurutuldu. Pellet 300µl. T.E. buffer da eritildikten sonra 15 µl. RNaz - A ( 1 mg / ml ) eklendi. Süspansiyon 30 µl. 3 M sodyum asetat ve 200 µl. İsoopropanol' la karıştırıldı. Tüp, YAC içeren maya genomik DNA' sının presipitasyonu için hafifçe santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet vakum ile kurutuldu. Pellet 100 - 300 µl. distile suda eritildi. DNA solüsyonu 37°C su banyosunda 30 dk. inkübe edildikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edildi.

#### DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması :

Prob DNA' nın konsantrasyonu, spektrofotometrede optik dansitenin ( O.D. ) ölçülmesi ile hesaplandı. İlk olarak spektrofotometre 260 nm' de distile su ile sıfır'a ( 0 ) ayarlandı. Sonra 10 µl. purifiye prob DNA ve 90µl. aynı distile su karışımı vorteks ile iyice karıştırıldı. Süspansiyon 260 nm.' de ölçüldü ve DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre µg / ml cinsinden hesaplandı.

Dilüsyon faktörü X DNA Süspansiyonunun O.D.' si X 50 :  $\mu\text{g} / \text{ml}$  .

50 : 1 O.D. olduğunda 50 $\mu\text{g}$  DNA ( 260 nm' de ) verir.

Alu - PCR Amplifikasyonu :

PCR protokolü içinde YAC klonları bulunan insan İnter - Alu sekanslarını amplifiye etmek için kullanıldı. Bunun için, bir kalıp ve Alu sekanslarının 3<sup>1</sup> ve 5<sup>1</sup> ucunun komplementeri olan primerleri olarak YAC içeren maya genomik DNA' sı kullanıldı. DNA' nın Amplifikasyonundan sonra ; DNA presipite edildi ve FISH deneylerinde prob olarak kullanılmak üzere nick translation tekniği ile işaretlendi.

Alu - PCR :

PCR amplifikasyonu Lengauer ve arkadaşlarının ( 1992 ) tanımladığı protokolde yapılan küçük değişiklikler sonucu gerçekleştirildi. 100  $\mu\text{g}$  . pürüfiye total genomik maya DNA' sı kalıp olarak kullanıldı. Distile su, primer' ler ( 0.25  $\mu\text{M}$  ) ve 4 dNTP' nin herbirinden 250 $\mu\text{M}$  içeren 50 $\mu\text{l}$  PCR buffer' i küçük bir eppendorf tüpe aktarıldı ve U.V. ışığı kullanılarak 10 dk. sterilize edildi. Daha sonra maya genomik DNA' sı eklenerek oluşan karışım mineral oil ile kaplandı ve PCR cihazına yerleştirildi ( Hyboid - Omni Gene ) . Başlangıç denatürasyonu 96°C' de 5 dk. olarak yapıldı ve Taq polimeraz ( 2.5 birim ) eklendi. Reaksiyon 30 döngü olarak yapıldı. Her bir döngü 96°C 1 dk. annealing 37°C' de 30 saniye ve extension 72°C ' de 6 dk. şeklinde gerçekleştirildi. Ek olarak, extension son döngünün sonunda 10 dk. olarak yapıldı. PCR ürünü mineral oil' den arındırılarak 1.5 ml.' lik yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve jel elektroforezinde kontrol edildi.

JEL ELEKTROFOREZİ :

10 $\mu\text{l}$  amplifiye DNA' ya 5 - 6  $\mu\text{l}$  1 kb. ladder eklenerek 2  $\mu\text{l}$  loading mix ile karıştırıldı. Solüsyon %1 - 3 agaroz jelde 1 saat 100 mA' de yürütüldü. DNA' nın fraksinasyonundan sonra oluşan band' lar U.V. ( UVP Image store 5000 ) altında incelendi. Görüntü bir SONY video grafik printer ( UP - 860 CE ) ile fotoğraflandı.

Etanol Presipitasyon :

Etanol presipitasyon PCR ürünlerinin 1/10 hacim 3 M sodyum asetat, 2 hacim soğuk etanol ve 1  $\mu\text{l}$  glikojen ile karıştırılmasıyla yapıldı. Solüsyon -20°C' de 30 dk. inkübasyonundan sonra 12.000 rpm' de 30 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet vakumlanarak, kurutulduktan sonra 12  $\mu\text{l}$  filtre edilmiş distile suda çözüldü. DNA konsantrasyonu spektrofotometrede 260 nm. de hesaplandı ve kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edildi.

Nick Translation Yöntemi İle Prob İşaretlenmesi :

Prob' ların işaretlenmesi için biotin - 11 - dUTP ve digoxigenin - 11 - dUTP olmak üzere 2 tip işaretleme protokolü kullanıldı.

#### Biotin İşaretleme :

Probların biotinle işaretlenmesi, üretici firmanın protokolünde yapılan küçük değişikliklerle nick translation tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. 5 µl A<sub>4</sub> , 1µg işaretlenecek DNA ve 0.5 µl biotin - 11- dUTP sırasıyla 1.5 ml' lik eppendorf tüpe konularak hacim filtre edilmiş distile su ile 45 µl' ye tamamlandı. 5 µl solüsyon C (enzim) eklenerek iyice karıştırıldı ve 15 °C' de 90 dk. inkübe edildi. 5 µl solüsyon D eklenerek reaksiyon durduruldu. İşaretli DNA' nın presipilasyonu için 4.6 µl 3 M sodyum asetat (pH : 5.2 ) , 1 µl glikojen ve 122µl - 20 °C' deki etanol sırasıyla eklendi. Süspansiyon karıştırıldı ve kısaca santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellet vakum ile kurutuldu. Pellet 10µl T.E. bufferda çözüldüğünde konsantrasyonu 100 µg/µl oldu. 37°C su banyosunda 30 dk. inkübasyondan sonra, DNA kullanılıncaya kadar -20°C' de muhafaza edildi.

#### Digoxigenin İşaretleme :

Probların Digoxigenin ile işaretlenmesi nick translation kit ve digoxigenin labelling mix. kullanılmasıyla yapıldı. 1µg işaretli DNA elde etmek için, 1 µg prob DNA ve 2 µl işaretli dNTP' ler (digoxigenin labellingmixture) 1.5 µl' lik eppendorf tüpe konularak filtre edilmiş distile su ile 25 µl' ye tamamlandı. 5 µl solüsyon C eklenerek karıştırıldı. Kısaca santrifüj edilerek 15 °C' de 90 dk. inkübe edildi. Sonraki basamaklar biotin işaretlemede anlatıldığı gibi tamamlandı.

### FISH TEKNİKLERİ:

Aneuploidilerin araştırılması için kültüre alınmamış plasental hücreler, amniyotik membran ve koryonik villi hücreleri uni-colour ve dual-colour FISH teknikleri kullanıldı.

#### UNI-COLOUR-FISH:

Deneylerde kültüre alınmamış hücreler(interfaz) kullanılarak sentromerik bölgelerin analizi için fluorescein avidin veya rhodamin avidin'le muamele edilmiş biotin işaretli proplar kullanıldı.

#### *Preparatların ön hazırlığı:*

Denetürasyondan önce preparatlar faz-kontrast mikroskopta incelenerek herbirinde 1 veya 2 uygun saha tesbit edilerek 1 saat fikse edildi, kurutuldu ve 10 dk asetonda bekletilerek temizlendi. Preparatlar kuruttuktan sonra etanol serisinden geçirilerek dehidrate edildi. Periferik kan preparatları denatürasyon ve hibridizasyon için direkt olarak kullanılabilir. Plasental hücreler, amniyotik membran ve koryonik villi preparatları ise her sahaya 100 µl RNaz eklemek suretiyle ön muamele yapıldıktan sonra kullanılmayı gerektirir. Kullanılacak saha bir lamel ile kapatılarak 37<sup>0</sup>C su banyosunda 30-40 dk inkübe edildi. Lameller preparattan uzaklaştırıldıktan sonra 2xSSC ile yıkandıktan sonra etanol serisinden geçirilerek kurutuldu.

#### *uni-colour FISH için hibridizasyon karışımları:*

Hibridizasyon karışımları kullanılmadan önce uygun konsantrasyonlarda işaretli prob, hibridizasyon buffer ve eğer gerekliyse kompetitör DNA kullanılarak hazırlandı. Hedef DNA ve prob 831B9'un tekrarlayan sekanslarının supresyonu için insan plasental DNA'sı kullanıldı. Propların konsantrasyonu işaretlemenin etkinliğine bağlı olarak farklı şekillerde kullanıldı(tablo-3).

	<i>DXZI</i> (10ng/µl) 1/10 dilü.	<i>D16Z2</i> (10ng/µl) 1/10 dilü.	<i>D20Z1</i> (10ng/µl) 1/10 dilü.	<i>L1.84</i> (100ng/µ)	<i>pG-A16</i> (100ng/µ)	<i>831 B9</i> (100ng/µ)	<i>D15Z1</i> (10ng/µl) 1/10 dil.
Prob DNA(µl)	0.5	0.3	0.3	0.5	0.8	1.0	0.4
İnsan plasental DNA (µl)	-	-	-	-	-	0.5	-
Hibridizasyon buffer (µl)	11.5	11.7	11.7	11.5	11.2	10.5	11.6
Toplam hacim (µl)	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0

Tablo-3 : Uni-colour FISH için kullanılan biotin işaretli α-satellit DNA proplarının hibridizasyon karışım konsantrasyonları:

21 numaralı kromozoma spesifik YAC831B9 ve 18 numaralı kromozoma spesifik L.184 problemlerinin Alu-PCR ürünleri biotin veya digoxigenin ile işaretlendi ve kromozom 21 ve kromozom 18'in sayısal kromozom mutasyonlarının analizleri için kullanıldı. Digoxigenin işaretli 831B9 ve L.184 problemleri daha yüksek konsantrasyonlarda (sırasıyla 150 ng ve 70-100 ng) kullanıldı. Toplam hacim hibridizasyon buffer ile 12 µl'ye tamamlandı.

*Denatürasyon ve hibridizasyon:*

İçinde prob DNA, hibridizasyon buffer ve eğer kullanıldıysa kompetitör DNA bulunan hibridizasyon karışımı 65-70°C su banyosunda 10 dk. denatüre edildikten sonra 60 dk için 37°C'deki su banyosunda inkübasyona alındı. Hedef DNA bulunan preparatlar %70 formamide/2xSSC bulunan denatürasyon solüsyonunda 3 dk için 65-70°C'de denatüre edildi. Bu sürenin sonunda hemen -20°C'deki %70 etanole daldırıldı. Prob karışımı denatüre edilmiş preparatlardaki işaretli sahalara konularak lamel ile kapatıldı. Preparatlar hibridizasyon için overnight(14-16 saat) 42-43°C su banyosuna alındı.

*Yıkama ve Deteksiyon:*

Hibridizasyon sonrası yıkamalar, spesifik olarak bağlanmayan, yada zayıf olarak bağlanmış problemlerin uzaklaştırılması için yapıştırıcı olarak kullanılan cowgum (lastik yapıştırıcı) dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve lamel 2xSSC'de 42°C'de bekletilme yoluyla düşürüldü. Preparatlar 2 defa %50 formamide/2xSSC ve iki defa 2xSSC'de 42°C'de 5'er dakika yıkandı. Daha sonra preparatlar 37°C'de 30 dk Wash-A solüsyonunda bloklandı.

Biotin işaretli problemlerin deteksiyonu fluorescein muameleli avidin ve anti-avidin sistemleri kullanılarak gerçekleştirildi. İlk basamakta, 100 µg/ml FITC muameleli avidin (wash-A solüsyonunda dilüe edildi) kullanılan sahaya konuldu. Parafilm ile kapatılarak 37°C su banyosunda 15-20 dk inkübe edildi. Preparatlar 42°C'deki wash-A solüsyonunda 3x5 dk yıkandı. İkinci basamak olarak, 100 µl 5 µg/ml biotin işaretli anti-avidin (wash-A'da dilüe edildi) aynı sahaya konularak parafilmle kapatıldı ve oda ısısında 15-20 dk inkübe edildi. 42°C'deki wash-A solüsyonunda 2x5 dk yıkandıktan sonra preparatlar üçüncü basamak olarak 100 µl 5 µg/ml FITC muameleli avidin (wash-A'da dilüe) ile oda ısısında 15-20 dk inkübe edildi. Preparatlar 42°C'de içinde 4xSSC/%0.5 Tween-20 bulunan solüsyonda oda ısısında yıkandıktan sonra etanol serisinden geçirilip kurutuldu. Biotin işaretli problemlerin deteksiyonunda rhodamin kullanıldığında, preparatlar

birinci ve üçüncü basamaklarda FITC-avidin yerine 100 µl 5 µg/ml rhodamin'le inkübe edildi.

Digoxigenin işaretli problemlerin deteksiyonu iki basamak olarak gerçekleştirildi. İlk basamakta, 100 µl 0.6 µg/ml anti-digoxigenin fluorescein Fab fragmentleri(koyundan elde edilmiş)(wash-A'da dilüe ), ikinci basamakta ise, 100 µl 2.25 µg/ml fluorescein anti-sheep IgG kullanıldı. Protokolün geri kalan kısmı, biotin işaretli problemlerin deteksiyonunda kullanılanın aynısıydı.

#### *Dual-Colour FISH:*

Bu protokol, kromozom 7 ve 16, ayrıca kromozom 18 ve 21 için spesifik problemlerin ikişerli olarak birlikte kullanılmasıyla aneuploidilerin taranmasında uygulandı. Preparatların ön muameleleri ve denatürasyonları uni-colour FISH protokolünde anlatıldığı gibi yapıldı. Hibridizasyon karışımlarının hazırlanması ve deteksiyonu farklıydı.

#### *Dual-colour FISH için Hibridizasyon Karışımı:*

Biri biotin-11-dUTP, diğeri digoxigenin-11-dUTP ile işaretlenmiş iki spesifik probun aynı anda deteksiyonu için hazırlanmış hibridizasyon karışımları kullanıldı. Kromozom 7 ve 16'nın deteksiyonunda her saha için 0.3 ng digoxigenin işaretli D7Z1 ve 0.3 ng biotin işaretli D16Z2 problemleri 12 µl hibridizasyon buffer içinde karıştırıldı ve hibridizasyon karışımı olarak kullanıldı. Diğer yanda, kromozom 18 ve 21'in deteksiyonunda her bir saha için 80 ng(0.8 µl) biotin veya digoxigenin 'le işaretlenmiş 831B9 ile karıştırıldı. 5 µg (0.5 µl) insan plasental DNA (kompetitör DNA) eklenerek toplam hacim 12 µl olacak şekilde hibridizasyon buffer ile karıştırıldı(tablo-4)

	<i>D7Z1</i> <i>Dig-işaretili</i> <i>1/10 dil.</i>	<i>D16Z2</i> <i>biotin-işaretili</i> <i>1/10 dil.</i>	<i>L1.84</i> <i>Biotin veya</i> <i>dig-işaretili</i>	<i>831 B9</i> <i>biotin veya</i> <i>dig-işaretili</i>
<b>Prob DNA (µl)</b>	0.3	0.3	0.8	1.5
<b>İnsan plasental DNA(µl)</b>	—	—	—	0.5
<b>Hibridizasyon buffer (µl)</b>	5.7	5.7	5.2	4.0
<b>Toplam hacim (µl)</b>	6.0	6.0	6.0	6.0

Tablo-4: Dual-colour FISH için biotin ve digoxigenin işaretli DNA problemlerinin hibridizasyon karışımı

### *Hibridizasyon, Yıkama Ve Deteksiyon:*

Hibridizasyon için şartlar ve protokol uni-colour FISH için anlatıldığı gibi uygulandı. Biotin ve digoxigenin ile işaretlenmiş problemleri içeren hibridizasyon karışımı hemen hibridizasyon öncesinde hazırlandı.

Preparatların deteksiyonu ve yıkanmasında uni-colour FISH için uygulanan protokol gerçekleştirildi. Biotin işaretli problemler avidinle muamele edilmiş rhodaminle izlenirken, sinyallerin gücü biotinle işaretli anti-avidin ve yeniden eklenen avidinle muamele edilmiş rhodaminle artırıldı. Buna karşılık, digoxigenin işaretli problemlerin izlenmesinde iki sistem kullanıldı.

Anti-digoxigenin fluorescein Fab fragmentleri ve fluorescein anti-sheep IgG sistemi kullanıldı. Sonra, deney FITC ile muamele edilmiş monoklonal anti-digoxigenin ve FITC ile muamele edilmiş anti-mouse IgG kullanılarak tamamlandı. Dual-colour FISH'de kullanılan protokoldeki gibi 3 basamakta yapıldı. İlk basamakta, 100 µl 5 µg/ml FITC ile muamele edilmiş avidin karışımı kullanıldı. İkinci basamakta 100 µl 5 µg/ml biotinle işaretli anti-avidin D ve 0.6 µg/ml anti-digoxigenin fluorescein Fab fragmentleri kullanıldı. Son basamakta preparat 100 µl 5 µg/ml FITC ile muamele edilmiş avidin ve 2.25 µg/ml fluorescein anti-sheep IgG karışımıyla inkübe edildi. Tüm hibridizasyon karışımları wash-A solüsyonu ile hazırlandı ve yıkama protokolü tamamen uni-colour FISH'de anlatıldığı gibiydi.

Birlikte hibridize edilen problemlerin deteksiyonunda kullanılan alternatif bir metod olarak ; ikinci basamakta içinde 5 µg/ml goat anti avidin D ve 5 µg/ml FITC ile muamele edilmiş monoklonal anti-digoxigenin bulunan 100 µl wash-A solüsyonu kullanıldı. Daha sonra deteksiyon, son basamakta preparatların içinde rhodamin(5µg/ml) ve FITC ile muamele edilmiş anti-mouse IgG(5 µg/ml) bulunan 100 µl karışımında inkübasyonu şeklinde devam etti.

### *Boyama(Counter Staining)*

FISH deneylerinde sinyallerin ortaya konulması için 3 tip boyama yöntemi kullanıldı.

A-1 µl (DAPI/49 µg/ml)(mavi) ve 2 µl PI(20 µg/ml)(kırmızı), 97 µl citiflour içinde karıştırıldı ve oluşan süspansiyondan herbir sahaya 10-12 µl uygulandı. Sonra saha 22x22 mm lamel ile kapatılarak oje ile yapıştırıldı. Preparat analiz edilinceye kadar 4<sup>0</sup>C'de karanlık ortamda muhafaza edildi. Bu protokole hücrelerdeki sinyaller FITC ile yeşil renkte görülerek incelendi.

B- 1 µl DAPI (40 µg/ml) 99 µl citiflour içinde karıştırıldı ve oluşan süspansiyon yukarıda anlatıldığı gibi uygulandı. Bu protokolde sinyaller rhodamin ile kırmızı renkte görülerek analiz edildi. Bu protokol aynı zamanda dual-colour FISH deneylerinde kırmızı (rhodamin) ve yeşil (FITC) renklerde sinyal alınarak analizde kullanıldı.

C- Bu tip boyamada 4 µl DAPI (1 µg/ml) 50 µl 2xSSC içinde karıştırılarak dual-colour FISH sinyallerinin analizinde kullanıldı. Preparat bu solüsyon içinde oda ısısında 5 dk bekletildikten sonra oda ısısında 2xSSC'de 5 dk yıkandı ve havada kurutuldu. Sonraki basamaklar A'da anlatıldığı gibi uygulandı.

#### *Sinyallerin Gösterilmesi :*

Metafaz kromozomları ve interfaz nükleusları epifluorescence mikroskop (Zeiss Axioplan) kullanılarak analiz edildi. Bu mikroskop uni - colour FISH için özel olarak filtrelendirilmişti. Zeiss filtre seti q ise dual - colour FISH deneylerindeki aynı hücredeki 2 sinyali aynı anda gösterebilecek şekilde dizayn edilmişti.

Dual - colour FISH sonuçları, cooled CCD kamera takılmış Zeiss Axioplan epifluorescence mikroskopla analiz edildi. Bu kamera Apple Macintosh bilgisayar ve smart capture software (Digital scientific) ile kontrol ediliyordu. Sinyaller FITC, rhodamine ve DAPI filtre seti ile görüntülendi. Görüntüler , renkli printerde sublimation printing paper ( A<sub>4</sub> - 5PW ) kullanılarak alındı.

#### *Sinyallerin Değerlendirilmesi :*

Hoppman ve arkadaşlarının ilk defa 1989' da uyguladıkları kriterlere göre, her bir vakadan 100 nükleus analizi yapılacak sinyaller değerlendirildi(54). Sitoplazma artıklarıyla kapatılan ve üst üste düşerek birbirinin görüntüsünü engelleyen hücreler inceleme dışı bırakıldı. Bir nükleus içindeki sinyallerin görüntü kalitesi aşağı yukarı aynı olmalıydı. Birbirinden farklı görüntü veren sinyaller sayım dışı bırakıldı. Sinyaller mutlaka birbirinden tamamen ayrı olmalıydı. Tüm preparasyonlarda küçük oval şekilli hücreler bulundu, fakat bazen bunlar birbirlerine çok yakın durumlarda gruplar oluşturmuştu. Bu gruplar mezenşimal kökenden kaynaklanmışlardı ve bunlarda sayım dışı bırakıldı.

#### *FISH Sonuçlarının Değerlendirilmesi :*

Philip ve arkadaşları dizomik ve trizomik vakaların değerlendirilmesinin kriterlerini ortaya koydular(121). Buna göre dizomik vakaların nükleuslarında %68 - 100 oranında 2 sinyal, trizomik vakaların nükleuslarında %66 - 94 oranında 3 sinyal alınmalıydı.

Harrison ve arkadaşları nın koydukları kritere göre eğer bir vakanın nükleuslarının % 23' ünden daha azı 3 sinyal veriyorsa bu vaka dizomik kabul edilmeliydi(47). Eğer nükleuslarının %42 veya daha fazlası 3 sinyal veriyorsa bu vaka trizomik olarak

değerlendirilmeliydi. % 23 - 42 hücrede 3 sinyal görülürse bu vaka hakkında karar vermek zor olarak kabul edilip, intermediyer olarak adlandırıldı. Çalışmalarında bir vaka için elde ettikleri dizomik ve trizomik sonuçları istatistiki analize aldılar ve % 23 – 42 arası olan sinyal analizini düşük oranlı mozaiklik olarak değerlendirdiler. Bu çalışmada bu kriterler kullanıldı ve FISH sonuçları değerlendirildi.

*İstatistik Analizler:* FISH deneyleri sonucunda elde edilen değerlerin istatistiki analizleri  $X^2$  testi ile yapıldı. Plasental bölgeler oranındaki farkın önemi ve sitogenetik sonuçlarla karşılaştırılan interfaz FISH değerlerinin prenatal tanıda kullanılıp kullanılmayacağı % 95' lik güven sınırları içinde değerlendirildi. P değeri 0.05' den küçük ise farkın önemli olduğu kabul edildi.

## SONUÇLAR

### *Hasta Materyalleri :*

Bu çalışmada başlıca üç grup materyal kullanıldı.

1- 29 plasentadan elde edilen plasental doku, amniyon zarı ve koryon zarı kullanılarak doku kültürü yoluyla kromozom incelenmesi ve aynı dokulardan elde edilen interfaz hücrelerinin FISH çalışmaları ilk 6 plasentaya ait vakalarda daha önce CVS yada amniyotik sıvı çalışmalarıyla prenatal tanı çalışmaları yapılmıştı. Diğer 23 plasental doku IUGR bulguları nedeniyle çalışmaya alındı.

2- Trizomi - 18 ve 21' in taranması için dual - colour İnterfaz - FISH tekniği kullanılarak 94 CVS materyali tarandı.

3- Tanımlanamayan IUGR gösteren 34 vakanın plasental dokuları kullanılarak en sık rastlanılanlar olarak trizomi - 7, trizomi - 16, trizomi - 18 ve trizomi - 21 dual - colour İnterfaz - FISH tekniğiyle tarama çalışmaları yapıldı.

Görülebileceği gibi toplam olarak 57 plaseenta, IUGR nedeniyle kromozomal aneuploidi' ler için çalışmaya alındı.

### *Plasental Dokuların Sitogenetik Analizleri :*

Plasental dokular, kromozom analizleri için standart teknikler kullanılarak preparatlar hazırlandı. 29 plasentaya ait çeşitli dokulardan elde edilen kromozomların incelenmesi G - bantlama yapılarak her bir plasental bölgeden 100 metafaz analiz edilmesi ile gerçekleştirildi. Bazı bölgelere ait kromozom incelemeleri, kültür kontaminasyonu, tripsinizasyon sonrası zayıf gelişme ve üremenin durması, iyi gerçekleşmeyen harvest ve bazı teknik nedenlerle her zaman uygun şekilde gerçekleşmedi.

17 vakanın kromozomal açıdan normal, 12 vakada ise bazı kromozomal anormallikler bulunduğu gözlemlendi ( tablo 5 ) . Tüm anormalliklerin sayısal olduğu bulundu. Amniyon ve karyon zarları ile 6 farklı plasental bölgeye ait incelemelerle bulunan bu sayısal anormalliklerin 1 yada 2 hücre hattı ile oluştuğu ve bu anormalliklerin tüm bu farklı plasental doku ve bölgelerde oran olarak farklı olabileceği gözlemlendi. Bu vakaların incelenmesinde, bir vaka mozaik olmak üzere toplam 3 vakanın trizomi - 21 olduğu bulundu. İki vaka mozaik trizomi - 16, bir vaka mozaik trizomi - 5, bir vaka mozaik trizomi - 20 gösterirken bir vaka klasik trizomi - 15 olarak görüldü. Monozomi mozaik olarak da normal ve monozomi - X hücreleri bir vakada tespit edildi.

Bu çalışmada anormalliklerin % 25' ini oluşturacak şekilde poliploidilerde görüldü. Poliplidlerin biri saf triploidi, diğer ikisi mozaik tetraploidi olarak izlendi.

Bu çalışmada kullanılan 29 plasentanın analizi sonucunda elde edilen bulgularla ortaya çıkan 12 anomalili vakaya ait dokuların karyotipleri tablo 5' de verilmiştir.

Vaka No	Karyotip	A	C	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>	Toplam	
										n	%
2	47,XY,+21	-	100	-	-	-	-	-	-	100	100
4	69,XXX	-	-	-	-	83	-	-	-	83	100
5	47,XY,+15	-	-	91	18	78	-	-	-	187	100
7	46,XX	89	71	83	85	41	32	35	55	491	85.7
	47,XX,+16	11	13	27	4	8	6	4	9	82	14.3
8	46,XY	54	72	73	80	76	81	62	74	573	85.8
	46,XY,+5	10	16	4	20	6	5	19	15	95	14.2
9	46,XX	-	-	-	8	-	-	-	-	8	2
	47,XY,+21	49	-	100	76	100	78	-	-	403	98
10	45,X	9	7	43	74	69	69	34	17	322	45
	46,XX	91	30	49	26	31	31	66	71	394	55
11	46,XY	33	51	43	31	43	41	40	58	340	47.1
	47,XY,+16	67	49	49	47	46	47	56	21	382	52.9
14	46,XY	69	48	55	44	63	-	40	56	375	59.7
	47,XY,+20	31	27	50	41	37	-	23	44	253	40.3
17	46,XY	-	77	63	-	-	29	36	70	276	79
	92,XXYY	-	19	19	-	-	8	9	18	73	21
18	46,XX	-	-	23	55	-	55	52	-	185	81
	92,XXXX	-	-	3	17	-	17	6	-	43	19
19	46,XX	-	-	-	8	7	5	-	3	23	16
	47,XX,+21	50	60	-	61	70	65	-	73	379	84

Tablo-5 :Klasik sitogenetikle analiz edilen plasental bölgelerde bulunan abnormalitelerin dağılımı; Sayılar, toplam incelenen hücreleri gösterir. Kültüre alınmış plasental dokular, A - Amniyon C - Koryon P<sub>1</sub> - P<sub>6</sub>: Plasental Bölgeler.

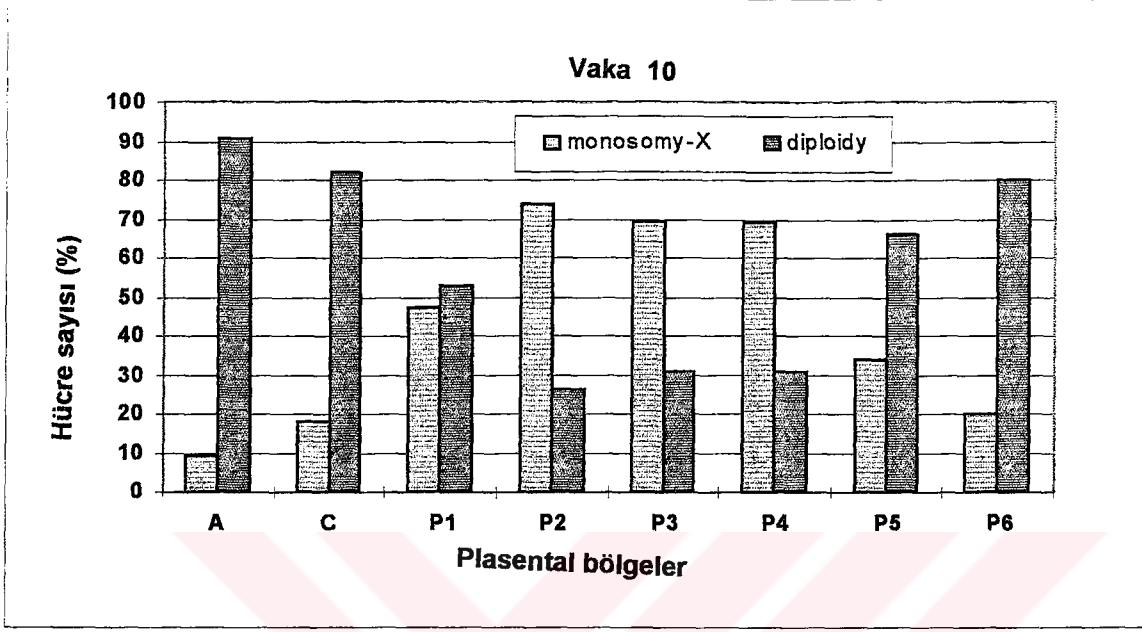
Vaka 9, % 2 oranında maternal cell kontaminasyonu gösterdi. Sadece 8 hücre plasental bölge 2' de görüldü ki bu, o bölgede incelenen hücrelerin % 11' idir. Diğer plasental bölgelerde, amniyon ve koryon zarında bu şekilde bir 46, XX karyotipine rastlanılmadı.

Vaka No	Karyotip	A	C	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>6</sub>
7	46,XX	89	85	75	95	84	84	90	86
	47,XX,+16	11	15	25	5	16	16	10	14
8	46,XY	85	82	95	80	92	94	76	83
	47,XY,+5	15	18	5	20	8	6	24	17
10	45,X	9	18	47	74	69	69	34	20
	46,XX	91	82	53	26	31	31	66	80
11	46,XY	33	51	47	40	48	47	42	73
	47,XY,+16	67	49	53	60	52	53	58	27
14	46,XY	69	64	52	52	63	-	64	56
	47,XY,+20	31	36	48	48	37	-	36	44
17	46,XY	-	80	77	-	-	78	80	80
	92,XXYY	-	20	23	-	-	22	20	20
18	46,XX	-	-	88	76	-	76	90	-
	92,XXXX	-	-	12	24	-	24	10	-
19	46,XX	-	-	-	12	9	7	-	4
	47,XX,+21	100	100	-	88	91	93	-	96

Tablo - 6 : Klasik sitogenetik teknikler kullanılarak elde edilen Amniyon, Koryon ve plasental bölgelere ait mozaik hücre hatlarının yüzde olarak dağılımları.

Aynı plasentaya ait bölgeler oranında bazı farklılıklar bulundu. Her bir vakaya ait Amniyon, Karyon ve plasental bölgelerin sonuçları arasında mozaikliğin oranı açısından ortaya çıkan farklılıklar tablo - 6' da gösterildi. Örneğin, Vaka 10' un amniyon ve plasental bölge sonuçları kıyaslandığında mozaik hücre hatlarının oranı bakımından farklılıklar gözlemlendi ( tablo - 6 ve grafik-1) . Amniyonda 91 hücre (% 91) 46, XX 9 hücre (% 9 ) 45, X karyotip gösterdi. Plasental bölge - 2' de 26 hücre (% 26) 46, XX karyotipe sahipken 74 hücre (%74 ) 45, X olarak gözlemlendi. Ayrıca Vaka, 19' da amniyon ve koryon mozaiklik görülmezken ( klasik trizomi, 47, XX+21 ) , tüm plasental bölgeler 46, XX / 47,

XX+21 şeklinde mozaik karyotip gösterdi. Bunun çok az ihtimalle MCC olduğu düşünülebilir, fakat tüm bölgelerde düşük oranda da olsa görülmesi mozaikliği düşündürür.



Grafik-1: Amniyon, koryon ve plasental bölgelerden elde edilen sitogenetik sonuçların normal ve anormal hücre hatları şeklinde dağılımı.

#### FISH SONUÇLARI:

##### *İnterfaz lenfosit hücrelerinde FISH denemeleri:*

Biotinle işaretli DXZ1, D15Z1, D16Z2 ve D20Z1 probları ile kültür sonucunda izole edilip biotinle işaretlenmiş PG-A16, L1.84 ve 831B9 problemlerinin herbiri interfaz lenfosit hücreleri kullanılarak sinyallerin etkinliği değerlendirildi. Tüm ticari problemler kuvvetli ve temiz sinyaller verdi. Elde edilen her iki sinyalde yüksek etkinlikte (%91) bulundu (herbir prob için sayılan nükleus 500, hibridizasyon ortalaması min;76, max;97).

İzole edilip biotinle işaretlenen PG-A16 probu (5. ve 19. kromozomlara spesifik) normal vakalardan yapılan interfaz- lenfosit preparatlarında 4 tane temiz sinyal verdi (sayılan nükleus;500, min;72, max;93 ve ortalama %87)

Problemlerin L1.84'ün hibridizasyon etkinliği interfaz-lenfositlerde denendi ve hibridize olan nükleusların %89'unda 2 tane temiz sinyal alındı (sayılan hücre;500, min;69, max;96). Prob 831B9 interfaz-lenfositlerde küçük fakat keskin sinyal verdi ve hücrelerde

görülen 2 sinyal sayısı olarak etkinliği %88 olarak bulundu(sayılan hücre;500, min;70, max;93)

*Lenfositlerde kromozomların analizi* : Herbir prob için incelenen metafaz sayısı 100 olarak alındı. Tüm preparatlar normal lenfositlerden elde edilen kromozomlarda FISH deneyleri için kullanıldı ve etkinlikleri araştırıldığında %93 olarak bulundu. Ticari proplar homolog kromozomların sentromer bölgelerinde temiz sinyaller verdi. Prob PG-A16 normal kişilerden elde edilen lenfosit kültürü ürünü kromozomlarda 4 tane temiz sinyal verdi ve hibridizasyon etkinliği %88 olduğu bulundu. L1.84 probu metafaz kromozomlarında denendiğinde hücrelerin %86'sında 2 sinyal oranı %88 olarak bulundu.

*Plasental Dokuların İnterfaz-FISH Analizleri:* Daha önceden CVS veya amniyotik sıvı analizleri ile kromozomal anomali tesbit edilen 3 plasenta ve IUGR gösteren 9 vakanın plasentaları olmak üzere toplam 12 plasentadan alınan doku örnekleri kromozomal analizlerin ortaya konulması için çalışmaya alındı. Daha önce doku kültürü yapılarak sitogenetik tekniklerle tesbit edilen aneuploidiler interfaz-FISH ile doğrulama çalışması yapıldı. Amniyon, koryon ve herbir plasental bölgeden yapılan çalışmalarda herbir vakadan toplam 800 hücre(herbir bölgeden 100 hücre) incelendi. FISH çalışmaları, sitogenetik olarak bulunan anomalileri gösterdi fakat sitogenetik olarak ortaya konulan mozaiklik oranları interfaz-FISH ile bulunan mozaiklik oranları arasında farklılık görüldü.

#### *Non-Mozaik Vakaların Sonuçları:*

Dört plasental doku (2. 4. 5 ve 9. Vakalar) daha önce sitogenetik olarak bulunan anomalilerin doğrulanması uygun proplar kullanılarak interfaz-FISH ile çalışıldı.

Tablo-7. Plasental dokuların interfaz hücrelerinden alınan sinyaller n; sayı, A;amniyon, C;koryon, P<sub>1</sub>-P<sub>6</sub> plasental bölgeler, S/N;herbir nükleustan alınan sinyal sayısı

S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	0	0	4	4	2	2	1	1	4	4	1	1	0	0	0	0	12	1.5
1	3	3	4	4	4	4	6	6	4	4	5	5	6	6	5	5	37	4.6
2	10	10	14	14	11	11	12	12	9	9	11	11	9	9	10	10	86	10.7
3	83	83	76	76	80	80	79	79	82	82	78	78	82	82	83	83	643	80.5
4	3	3	2	2	3	3	2	2	1	1	4	4	3	3	2	2	20	2.5
4>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0.2
Topl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	800	100

Tablo-7.1; Vaka 2, probe YAC 831B9



Resim;1, Vaka 2'den elde edilen interfaz plasenta hücresinde, biotin işaretli YAC 831B9 probunun(21. Kromozoma spesifik) verdiği sinyaller

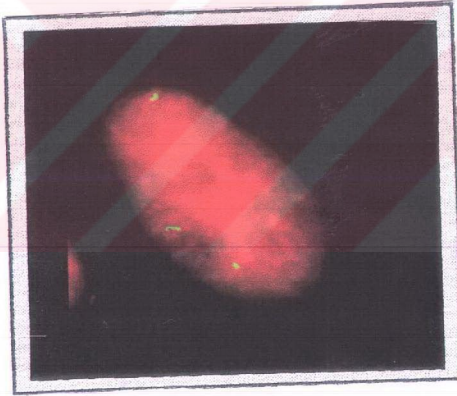
S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	0	0	-	-	0	0	3	3	2	2	4	4	-	-	-	-	9	1.8
1	5	5	-	-	4	4	6	6	2	2	7	7	-	-	-	-	24	4.8
2	9	9	-	-	8	8	17	17	5	5	7	7	-	-	-	-	46	9.2
3	81	81	-	-	80	80	70	70	82	82	80	80	-	-	-	-	393	78.6
4	4	4	-	-	6	6	4	4	5	5	2	2	-	-	-	-	21	4.2
4>	1	1	-	-	2	2	0	0	4	4	0	0	-	-	-	-	7	1.4
Topla	100	100	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	-	-	-	-	500	100

Tablo-7.2: vaka 9, prob YAC 831B9.

Vaka 2 ve 9 YAC 831B9 probuyla saf trizomi-21 gösterdiler. Kromozom 21 için alınan 3 sinyal vaka 2 için %80.5, vaka 9 için ise %78.6 olarak bulundu. Vaka 9 için ilginç olan sonuç 2. Plasental bölgede görülen %17 oranındaki iki sinyale karşılık diğer plasental bölgeler ve amniyonda iki sinyalin görülmesi ortalama %7.25 gibi daha düşük olmasıydı(min;5, max;9)(tablolar 7.1 ve 7.2).

S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	0	0	2	2	0	0	4	4	1	1	0	0	3	5	2	2.5	12	1.7
1	4	4	6	6	4	5.1	9	9	5	5	6	8	4	6.6	3	3.8	41	5.9
2	9	9	8	8	6	7.7	9	9	11	11	6	8	7	11.6	4	5.1	60	8.7
3	86	86	80	80	65	83.4	77	77	80	80	61	81.4	45	75.2	66	84.8	560	81.2
4	1	1	2	2	3	3.8	1	1	3	3	2	2.6	1	1.6	2	2.5	15	2.1
4>	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.3	3	0.4
<b>Topl</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>78</b>	<b>100</b>	<b>691</b>	<b>100</b>

Tablo-7.3; vaka 4 prob DXZ1



Resim-2; vaka 4'den kültür edilerek elde edilmiş plasental hücrede biotin işaretli DXZ1 probunun sinyalleri. 3 sinyal kromozom X'i gösterir.

Amniyon, koryon ve plasental dokuları DXZ1 probuyla çalışılan vaka 4 saf triploidi gösterdi. 3 sinyalin görülmesi tüm hücrelerden elde edilen ortalamaya göre %81.2 olarak bulundu(min;75.2, max;86)(tablo-7.3 ve resim-2).

S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	-	-	-	-	6	6	4	4	3	3	1	1.2	-	-	-	-	14	3.8
1	-	-	-	-	8	8	5	5	6	7.2	5	5.8	-	-	-	-	24	6.5
2	-	-	-	-	11	11	10	10	4	4.8	7	8.1	-	-	-	-	32	8.8
3	-	-	-	-	73	73	77	77	69	83.2	71	82.6	-	-	-	-	290	78.6
4	-	-	-	-	2	2	3	3	1	1.2	2	2.3	-	-	-	-	8	2.1
4>	-	-	-	-	0	0	1	1	0	0	0	0	-	-	-	-	1	0.2
Topl	-	-	-	-	100	100	100	100	83	100	86	100	-	-	-	-	369	100

Tablo-7.4; vaka 5, prob D15Z1



Resim -3; vaka 5 'in kültüre edilerek elde edilmiş plasental interfaz hücrelerinde biotinle işaretli D15Z1(kromozom 15'e spesifik) probun verdiği sinyaller

Vaka 5 D15Z1 probuyla saf trizomi-15 gösterdi.(Resim-3) Tüm plasental bölgelerden elde edilen 3 sinyalin ortalama değeri %76,8(min;73, max;83,2)(tablo-7.4)

### Mozaik Vakaların Sonuçları:

Klasik sitogenetik tenkiklerle daha önce plasental mozaiklik gösterdiği bulunan 8 vaka anomalileri için PG-A16, DXZ1, D16Z2, D20Z1 ve YAC 831B9 problemleri ile çalışılarak teyit edildiler.

IUGR gösteren vakalardan alınan amniyon, koryon ve plasental dokuların FISH analizi sonucunda 8 vakanın (vakalar 7, 8,10,11,14,17,18 ve 19) diploid hücre hattının yanında anomalili bir hücre hattında sahip olduğu görüldü.

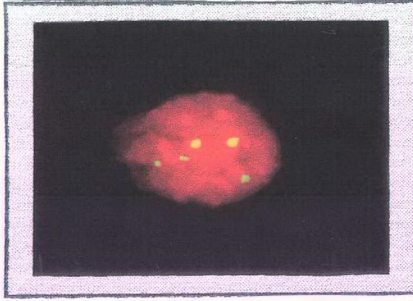
S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	5	5	6	7.1	0	0	0	0	3	3	4	4	4	4	2	2	24	3
1	6	6	7	8.2	6	6	4	4	7	7	11	11	9	9	6	6	56	7.1
2	76	76	43	50.6	55	55	79	79	78	78	81	81	75	75	74	74	561	71.5
3	9	9	28	32.9	37	37	15	15	11	11	4	4	10	10	13	13	127	16.2
4	4	4	1	1.2	2	2	2	2	1	1	0	0	2	2	4	4	16	2.1
4>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0.1
Topl	100	100	85	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10	100	785	100

Tablo-7,5, vaka 7, probD16Z2

Vaka 7'den elde edilen hücrelerin FISH analizi prob D16Z2 ile yapıldı. Hücrelerin %16,2'si (min;4, max;37) 3 hibridizasyon sinyali verirken %71.5(min;50,6, max;81) oranında hücrede kromozom 16 için 2 sinyal alındı(tablo-7,5)

S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	0	0	1	1	2	2	2	2	1	1	5	5	3	3	4	4	18	2.2
1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	0	0	1	1	3	3	12	.5
2	3	3	4	4	6	6	5	5	2	2	3	3	1	1	3	3	27	3.3
3	3	3	4	4	5	5	6	6	2	2	4	4	3	3	4	4	31	3.8
4	75	75	73	73	72	72	69	69	84	84	80	80	70	70	69	69	592	74
4>	18	18	16	16	13	13	17	17	9	9	8	8	22	22	17	17	120	15
Topl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	800	100

Tablo-7,6, vaka 8, probPG-A16



Resim-4; vaka 8'den kültür yapılmadan elde edilmiş interfaz hücrelerinde biotin işaretli PG-A16 (5. ve 19. Kromozomlara spesifik) probu görülen sinyaller kromozom 5 için 3 sinyal görülmektedir.

Vaka 8'in in interfaz hücreleri 5. Ve 19. Kromozomlara spesifik PG-A16 probuyla analiz edildi ve hücrelerin %15'de (min;8, max;22) 5 hibridizasyon sinyali alındı. Hücrelerin %74 (min;69, max;84)'ünde ise 4 sinyal görüldü.(tablo-7,6 ve Resim-4)

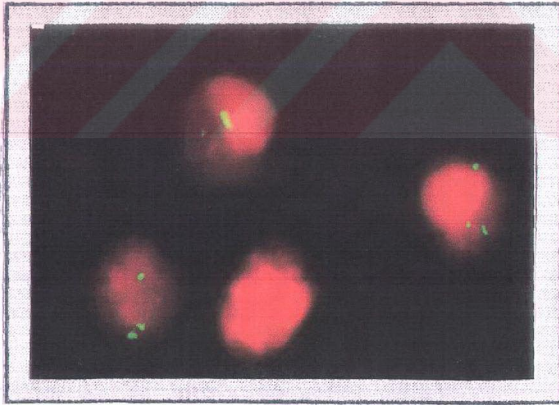
S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	0	0	3	3	2	2	4	4	6	6	5	5	4	4	5	5	29	3.4
1	13	13	26	26	40	40	68	68	65	65	70	70	28	28	23	23	333	41.5
2	83	83	69	69	54	54	26	6	26	26	22	22	63	63	67	67	410	51.7
3	4	4	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	4	21	2.6
4	0	0	1	1	2	2	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	7	0.8
4>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Topl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	800	100

Tablo-7,7 Vaka 10, Prob DXZ1

Vaka 10, proba DXZ1 kullanılarak analiz edildi ve X kromozomu için mozaiklik görüldü. Hücrelerin%41.5'nde bir sinyal ve %51.7'de iki sinyal alındı. MonozomiX'in amniyon, koryon ve plasental bölgelere göre daha düşük olduğu görüldü. Örneğin; amniyon hücrelerinin %13'de monozomi\_X (bir sinyal) görülürken %83'nde normal hücre hattı (iki sinyal) bulundu. Bunun tersi olarak, plasental bölge 4 %70 oranında monozomi-X gösterirken sadece %22 oranında normal hücre hattına sahiptir.(tablo-7.7)

S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	2	2.1	4	4	2	2	4	4.5	2	2	0	0	4	4	4	4.9	22	3
1	5	5.3	5	5	7	7	6	6.7	9	9	3	4.7	6	6	4	4.9	45	6.2
2	27	8.8	45	45	38	38	34	8.3	44	44	31	49.3	38	38	47	58.1	304	41.8
3	58	1.7	43	43	50	50	43	8.3	43	43	28	44.4	50	50	26	32.1	341	46.9
4	2	2.1	2	2	3	3	2	2.2	2	2	1	1.6	2	2	0	0	14	2
4>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.1
<b>Topl</b>	<b>94</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>89</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>63</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>81</b>	<b>100</b>	<b>727</b>	<b>100</b>

Tablo-7,8 vaka 11, prob D16Z1



Resim-5; vaka 11'in kültüre alınmamış amniyon hücrelerinde biotin işaretli D16Z2(kromozom 16 için spesifik) ile alınan sinyaller. Kromozom 16 için 2 ve 3 sinyal görülmektedir.

Vaka 11 D16Z2 probu kullanılarak analiz edildi ve trizomi-16 mozaikliği bulundu. Hücrelerin %41.8'i iki sinyal, %46,9'u üç sinyal gösterdi(Resim-5)

Diploid/trizomik hücre oranlarına ait kromozom 16 mozaikliği tüm plasental bölgelerde çok benzer olarak bulundu. Buna karşılık amniyon, plasental bölge 6 arasındaki farklılığın çok dikkat çekici olduğu tesbit edildi. Amniyonda kromozom 16 için iki sinyal (Diploid) %28,8, üç sinyal(trizomik) %61,1 olarak görülürken plasental bölge 6 iki sinyal(trizomik) %32.1 oranlarında verdi.(tablo-7.8)

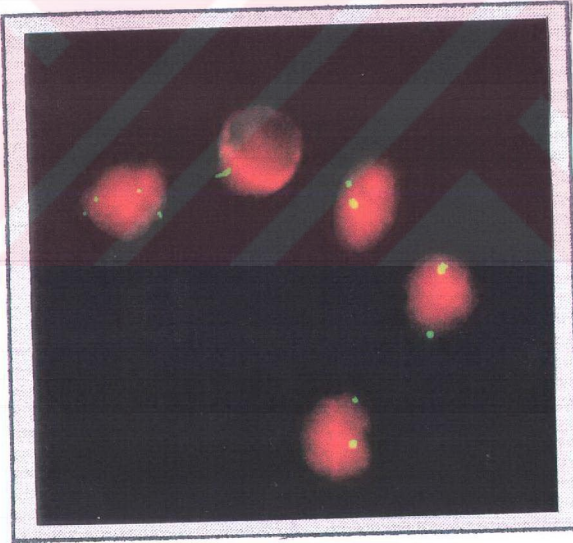
S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	7	7	4	4	4	4	3	3	3	3	2	2	4	4	4	4	31	3.8
1	5	5	3	3	2	2	2	2	3	3	4	4	3	3	2	2	24	3
2	54	54	61	61	46	46	53	53	57	57	43	43	64	64	56	56	434	54.2
3	31	31	31	31	44	44	40	40	36	36	47	47	26	26	37	37	292	36.6
4	2	2	1	1	3	3	2	2	1	1	3	3	2	2	1	1	15	1.9
4>	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	4	0.5
<b>Topl</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	800	100

Tablo7.9, vaka 14, prob D20Z1

Vaka 14'ün prob D20Z1 kullanılarak tüm plasental bölgeler, amniyon ve koryon için trizomi-20 mozaikliği gösterdiği bulundu. Mozaik hücrelerin%54.2'sinin diploid(iki sinyal) %36.5'sinin trizomik(üç sinyal) olarak görülmesiyle ortaya konuldu. Plasental bölgeler 2 ve 4 kromozom 20 mozaikliği açısından diploid/trizomik hücre hatlarının yaklaşık olarak aynı oranda görülmesiyle dikkat çeker. Buna karşılık diğer plasental bölgeler, amniyon ve koryonda trizomik trizomik hücre hattının oranının normal hücre (diploid) hatından önemli derecede yüksek olduğu görülür. Özellikle koryon %61 oranında diploid(iki sinyal) ve %31 oranında trizomik(üç sinyal) hücre hatlarıyla mozaiklik gösterdi(tablo-7.9)

S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	7	7	2	2	0	0	5	6.3	4	4.5	3	3.1	2	2.2	1	1	24	3.2
1	9	9	7	7	1	1	3	3.8	4	4.5	3	3.1	3	3.3	2	2	32	4.2
2	52	52	61	61	68	68	48	60.7	55	62.6	63	65.6	64	69.5	71	71	482	63.8
3	11	11	8	8	6	6	4	5.1	5	5.7	6	6.2	4	4.3	5	5	49	6.5
4	16	16	18	18	24	24	15	19	17	19.3	17	17.8	15	16.3	19	19	141	18.8
4>	5	5	4	4	1	1	4	5.1	3	3.4	4	4.2	4	4.3	2	2	27	3.5
Topl	100	100	100	100	100	100	79	100	88	100	96	100	92	100	100	100	755	100

Tablo-7.10, vaka 17, prob D16Z2



Resim-6; vaka 17'nin kültüre alınmamış interfaz hücrelerinin biotin işaretli D16Z2 ile verdiği sinyaller. İki ve 4 sinyaller kromozom 16 içindir.

S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	3	3.2	1	1	4	4.4	4	4.1	2	3	3	3	6	6	4	4	27	3.6
1	3	3.2	4	4	2	2.2	5	5.2	1	1.5	6	6	5	5	6	6	32	4.3
2	62	67.4	70	70	68	76.6	60	62.6	51	7.3	64	64	67	67	71	71	513	69.1
3	5	5.4	7	7	3	3.3	7	7.3	2	3	5	5	6	6	4	4	39	5.2
4	15	16.4	13	13	10	11.2	16	16.7	8	2.2	16	16	12	12	11	11	101	13.5
4>	4	4.4	5	5	3	3.3	4	4.1	2	3	6	6	4	4	4	4	32	4.3
<b>Topl</b>	<b>92</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>96</b>	<b>100</b>	<b>66</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>744</b>	<b>100</b>

Tablo-7.11, vaka 18, prob D16Z2

Vaka 17 ve 18 diploidi/tetraploidi mozaikliği için prob D16Z2 kullanılarak analiz edildi. Her iki vakada düşük dereceli mozaiklik gösterdi. Vaka 17 için %63.8 iki sinyal(min;52, max;71), %18.8 4 sinyal(min;16, max;24) oranında . Vaka 18 için ise %69.1(min;62.6, max;77.3) 2 sinyal %13.5 (min;11, max;16,7) 4 sinyal oranında mozaiklik bulundu(Resim-6). Amniyon, koryon ve tüm plasental bölgeler arasında mozaiklik açısından önemli bir fark olmadığı görüldü(tablo-7.10 ve 7.11).

S/N	A		C		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>4</sub>		P <sub>5</sub>		P <sub>6</sub>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	4	4	6	6	5	5	2	2	6	6	3	3	5	5	8	8	39	4.9
1	4	4	3	3	4	4	3	3	2	2	5	5	3	3	2	2	26	3.2
2	6	6	7	7	12	12	16	16	15	15	11	11	14	14	13	13	94	11.7
3	84	84	83	83	77	77	79	79	75	75	80	80	75	75	76	76	629	78.7
4	2	2	1	1	2	2	0	0	2	2	1	1	3	3	1	1	12	1.5
4>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Topl</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>800</b>	<b>100</b>

Tablo-7-12, vaka 19, prob YAC 831B9

Vaka 19 YAC 831B9 kullanılarak amniyon, koryon ve tüm plasental bölgeler incelendiğinde ortalama%78.7 oranında 3 sinyal ile saf trizomi-21 olarak bulundu. Amniyon ve koryonun gösterdiği 2 sinyal yüzdesi plasental bölgelere göre daha düşüktü(tablo-7.12)

*Kültüre Alınmamış CVS Hücrelerinde Dual-Colour FISH İle Trizomi-18 Ve Trizomi-21'in Araştırılması:*

Koryon villus örneklerinden elde edilen interfaz hücrelerinde dual-colour FISH tekniği kullanılarak L1.84(kromozom 18 için spesifik) ve YAC 831B9 (kromozom 21 için spesifik) ile 94 vaka aneuploidi açısından araştırıldı. 4-5 mg villus fragmenti kullanılarak interfaz preparatları dual-colour FISH deneylerinde kullanıldı. Herbir vakadan toplam olarak 500 interfaz hücresi analiz edildi. Digoxygenin işaretli prob parlak yeşil fluoresans sinyali ile, biotin işaretli prob kırmızı fluoresans sinyali olarak görüldü.

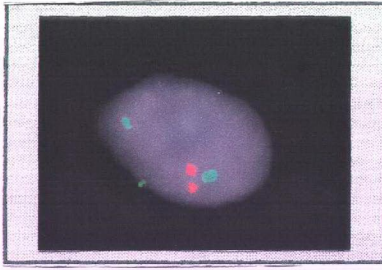
İncelenen 94 vakanın 4 tanesi aneuploidi olarak sonuçlandırıldı; trizomi-18(951345) trizomi-21(951316, 953504 ve 953847)(tablo-8) FISH sonuçları daha sonra rutin sitogenetik sonucu elde edilen bulgularla karşılaştırıldı ve bir fark olmadığı görüldü.

**Sinyaller/yüzdeler**

Vaka no	0		1		2		3		4		5		5>		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
951316	11	2	4	1	14	3	16	3	36	7	405	81	14	3	500	100
951345	0	0	1	0	4	1	19	4	40	8	435	87	1	0	500	100
953504	0	0	4	1	5	1	20	4	20	4	438	87	13	3	500	100
953847	25	5	19	4	16	3	18	4	32	6	371	74	19	4	500	100

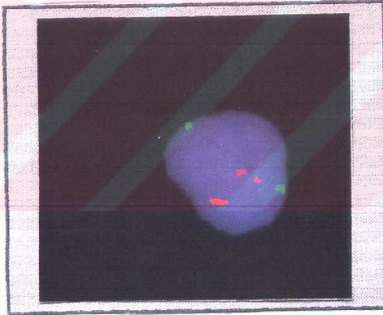
Tablo-8; L1.84 ve 831B9 problemleri kullanılarak dual-colour FISH yöntemiyle çalışılan CVS hücrelerinde görülen sinyallerin dağılımı

Vaka 951316 dual-colour FISH ile analiz edildiğinde 5 sinyal alındı ve saf trizomi-21 olarak sonuçlandırıldı. İncelenen 500 hücrenin ortalama olarak %81'inde trizomik hücre hattı görüldü.



Resim-7; vaka 951345'in kültüre alınmamış koryonik villi hücrelerinde dual-colour FISH tekniğiyle kullanılan biotin işaretli YAC 831B9 (kırmızı sinyal) ve digoxigenin işaretli L1.84(yeşil) problemleriyle alınan sinyaller

Vaka 951345'de kullanılan L1.84 ve 831B9 problemleriyle alınan toplam 5 sinyal oranı %87'dir. Bu sinyallerin 3 tanesi L1.84 probuna ait olduğu verdiği yeşil renkten anlaşıldı ve trizomi-18 olarak sonuçlandırıldı.(Resim-7).Bu vakada 4 sinyalli hücrelerin oranı %8 , üç sinyalli hücrelerin oranı %4 ve iki sinyalli hücrelerin oranı ise %1 olarak görüldü(tablo-8).



Resim-8; vaka 953504 'ün kültüre alınmamış koryonik villi hücrelerinde dual-colour FISH tekniğiyle kullanılan biotin işaretli YAC 831B9(kırmızı sinyal) ve digoxigenin işaretli L1.84 (yeşil sinyal) problemleriyle alınan sinyaller.

Vaka 953504'de 831B9 ve L1.84 problemleriyle hücrelerin %87'sinden 5 sinyal alındı. İncelenen vakanın, prob 831B9 ile alınan bu kırmızı renkli 3 sinyalin kromozom 21'e ait olduğunu sonucun trizomi-21 olarak belirlendiğini gösterir. Hücrelerin %3'ü 6 yada daha fazla sinyal gösterirken, %4'ü ise 4 veya 3 sinyal verdi. Sadece %1'i 1 yada 2 sinyale sahipti(tablo-8)

Vaka 953847'de, kullanılan L1.84 ve 831B9 problemleri hücrelerin %74'ünde 5 sinyal verdi ve sonucun trizomi-21 olduğu anlaşıldı. Preparatların eski olmasından dolayı problemlerin hibridizasyon başarısının düşük olduğu görüldü. Hücrelerin %4'ü 6 veya daha fazla hibridizasyon sinyali verirken %4'ü 3 sinyal, %3'ü 2 sinyal, %4'ü 1 sinyale sahipti. Hücrelerin %5'inde ise hibridizasyon sinyali görülmedi(tablo-8)

*IUGR Gösteren Gebeliklerden Elde Edilen Plasental Dokuların Dual - Colour İnterfaz - FISH İle Analizi :*

IUGR gösteren gebeliklerle, düşük oranlarda olmak üzere sayısal sex kromozom anomalileri ve yapısal rearrangementlar , özellikle trizomi-7 ve trizomi - 16 gibi otozomal trizomiler arasında doğrusal bir ilişki vardır (179) . İnterfaz - FISH ile bu yaygın anomalilerin analizi D7Z1, D16Z2, L1.84 ve YAC 831B9 problemleri kullanılarak yapıldı.

IUGR' den etkilenen gebeliklerden elde edilen 34 plasental doku, " touch preparation " tekniğiyle elde edilen interfaz hücrelerinin FISH yöntemiyle çalışılması sonucunda analiz edildi. Herbir plasental dokunun 6 farklı bölgesinden alınan taze örneklerle çalışma gerçekleştirildi. FISH deneylerinde digoxigenin işaretli D7Z1 ile biotin işaretli D16Z2 problemleri ile birlikte ve digoxigenin ( veya biotin ) işaretli L 1.84 ile biotin (veya digoxigenin) işaretli 831B9 problemleri ise birlikte kullanılarak dual - colour olarak gerçekleştirildi. Kromozom 7 ve 16' nın problemleri preparatın bir sahasında, kromozom 18 ve 21' in problemleri diğer sahanında uygulandı. Digoxigenin işaretli problemler FITC biotin işaretli problemler rhodamin ile görüntülendi. Herbir vakadan toplam 600 interfaz hücresi analiz edildi (her bölgeden 100 nükleus). FISH çalışmaları kromozomlar 7, 16, 18 ve 21' in sayısal anomalilerini tespit amacıyla gerçekleştirildi. Digoxigenin işaretli problemler D7Z1 ve L1.84 ( veya YAC 831B9 )' lerin verdiği yeşil sinyaller ve biotin işaretli problemler D16Z2 ve 831B9 ( veya L1.84 )' lerin verdiği kırmızı sinyaller interfaz hücrelerinde sayıldı.

## Sinyaller/yüzdeleri

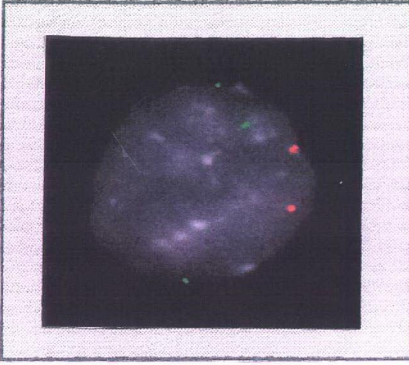
Case no	0		1		2		3		4		5		5>		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
954937	17	2.8	7	1.1	2.1	3.5	35	5.8	236	39.3	277	46.4	7	1.1	600	100
960580	15	2.5	11	1.8	13	2.1	32	5.3	31	5.1	492	82	6	1	600	100
T154326	14	2.3	9	1.5	15	2.5	43	7.1	288	48.2	227	37.8	4	0.6	600	100
960742	12	2	10	1.6	11	1.8	53	8.8	308	51.5	201	33.5	5	0.8	600	100
960804	13	2.1	9	1.5	16	2.6	39	6.5	181	30	327	54.8	15	2.5	600	100
R.G.	8	1.3	5	0.8	14	2.3	63	10.5	306	51	198	33.1	6	1	600	100

Tablo - 9 : Sayısal anomali tespit edilen 6 vakanın plasental interfaz hücrelerindeki sinyallerin dağılımı. Sonuçlar, L 1.84 ve 831B9 problemlerinin dual - colour FISH tekniğinde kullanılmasıyla alınmıştır .

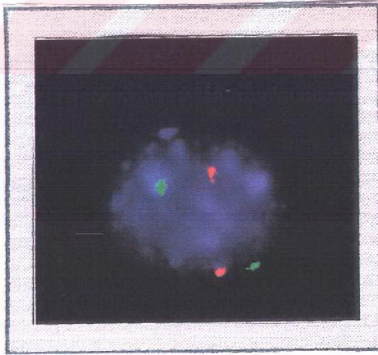
Plasentaları kullanılan 34 vakadan 6' sı trizomi - 18 veya trizomi - 21 ( % 17.6 ) olarak sayısal kromozom anomalisi gösterdi. Buna karşılık vakaların hiçbirinde kromozom 7 veya kromozom 16 için herhangi bir trizomi gözlenmedi. Görülen trizomilerin yarısı ( % 8.8 ) trizomi - 18, diğer yarısı ise ( % 8.8 ) trizomi - 21 olarak bulundu. Bunlardan biri ( 950580 ) saf trizomi - 21 ( % 2.9 ) diğerleri ya trizomi 18 yada trizomi - 21 için değişik oranlarda mozaiklik gösterdi. ( % 14 - 7 ) ( Tablo - 9 )

S/N	1		2		3		4		5		6		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	3	3	2	2	4	4	3	3	4	4	1	1	17	2.8
1	0	0	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	7	1.1
2	4	4	3	3	2	2	3	3	4	4	5	5	21	3.5
3	6	6	5	5	7	7	4	4	5	5	8	8	35	5.8
4	38	38	43	43	51	51	31	31	35	35	38	38	236	39.8
5	47	47	45	45	33	33	57	57	49	49	46	46	277	46.4
5>	2	2	1	1	1	1	0	0	2	2	1	1	7	1.1
Topl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	600	100

Tablo 10-1 : 6 plasental bölgenin interfaz hücrelerindeki sinyallerin dağılımı. Sinyaller L 1.84 ve 831B9 problemleri kullanılan İnterfaz - FISH ile elde edilmiştir.



Resim-9 : Vaka 954937' in plasental interfon hücrelerindeki biotin işaretli YAC 831B9 (kırmızı) ve digoxigenin işaretli L 1.84 (yeşil) problemlarına ait sinyalleri göstermektedir. Sinyaller dual - colour FISH tekniğinde FITC, rhodamin ile görüntüledi.



Resim-10 : Vaka 954937' in plasental interfaz hücrelerindeki biotin işaretli D16Z2 (kırmızı) ve digoxigenin işaretli D7Z1 (yeşil) problemlarına ait sinyalleri göstermektedir. Sinyaller dual - colour FISH tekniğinde FITC, rhodamine ile görüntüledi.

IUGR' lu Vaka 954937, dual - colour FISH tekniğinde digoxigenin işaretli prob L 1.84 kullanılarak trizomi - 18 için mozaiklik gösterdi. Tüm plasental bölgeler, kromozom - 18 için yüksek derecede trizomik hücre hattına sahiptir. Sadece plasental bölge 3 % 33 oranında trizomik, % 51 oranında diploid olarak bulundu. Sonuç olarak bu vaka, dual - colour FISH tekniğinde L 1.84 ve YAC 831B9 problemlerinin kullanılmasıyla elde edilen % 39.8 oranında 4 hibridizasyon sinyali ( diploid ) ve % 46.4 oranında 5 hibridizasyon sinyali ( trizomik ) ile trizomi - 18 mozaikliği olarak sonuçlandırıldı ( tablo 10.1 ve Resim-9 ) .

S/N	1		2		3		4		5		6		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	3	3	3	3	2	2	2	2	4	4	1	1	15	2.5
1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	2	3	3	11	1.8
2	1	1	4	4	2	2	3	3	2	2	1	1	13	2.1
3	4	4	5	5	5	5	4	4	6	6	8	8	32	5.3
4	4	4	4	4	6	6	5	5	5	5	7	7	31	5.1
5	85	85	83	83	83	83	83	83	79	79	79	79	492	82
5>	2	2	0	0	1	1	0	0	2	2	1	1	6	1
Topl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	600	100

Tablo : 10.2 Vaka no : 960580

Vaka 960580' nin tüm plasental bölgelerinde saf trizomi - 21 görüldü. Dual -colour FISH çalışmalarında kullanılan biotin işaretli L 1.84 ve digoxigenin işaretli YAC 831B9 problemleriyle elde edilen 5 hibridizasyon sinyali oranı % 82 ( min :79, max : 85 ) olarak bulundu ( Tablo 10.2 ) .

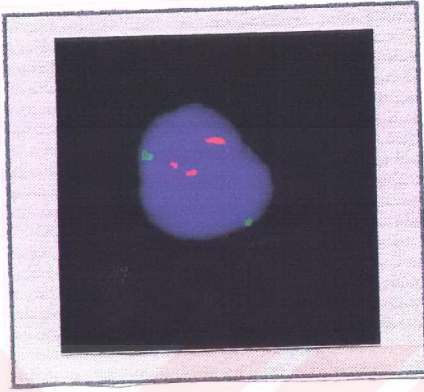
S/N	1		2		3		4		5		6		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	2	2	3	3	1	1	3	3	4	4	1	1	14	2.3
1	1	1	2	2	2	2	0	0	1	1	3	3	9	1.5
2	3	3	2	2	1	1	4	4	3	3	2	2	15	2.5
3	5	5	7	7	8	8	6	6	7	7	10	10	43	7.1
4	53	53	50	50	41	41	38	38	57	57	49	49	288	48.2
5	35	35	36	36	45	45	48	48	28	28	35	35	227	37.8
5>	1	1	0	0	2	2	1	1	0	0	0	0	4	0.6
Topl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	600	100

Tablo : 10.3 Vaka no : T 154326

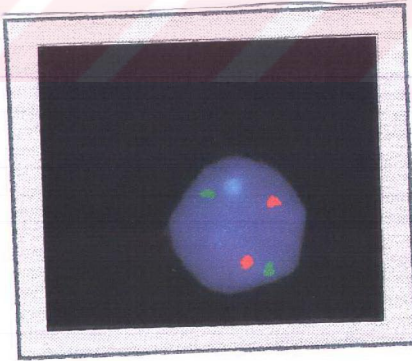
Vaka T154326, dual - colour FISH çalışmalarında kullanılan biotin işaretli L 1.84 ve digoxigenin işaretli YAC 831B9 problemleriyle 18. ve 21. kromozomlara ait aneuploidilerin araştırılması sonucunda tüm plasental bölgelerde mozaik trizomi - 18 olarak bulundu. Diploid hücre hattı, 4 hibridizasyon sinyali ile % 48.2 ve trizomik hücre hattı 5 hibridizasyon sinyali ile % 37.8 bulundu. Bulgular, plasental bölgeler 3 ve 4' ün trizomik hücre hattı oranının (sırasıyla % 45 ve % 48) diploid hücre hattı oranından (sırasıyla % 41 ve % 38) daha yüksek olduğunu gösterdi. Diğer plasental bölgelerde diploid hücre sayısının trizomik hücre sayısından daha fazla olduğu gözlemlendi. Plasental bölge 5' de diploid hücreler % 57, trizomik hücreler % 28 oranındadır (tablo 10.3).

S/N	1		2		3		4		5		6		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	0	0	2	2	1	1	3	3	2	2	4	4	12	2
1	1	1	1	1	3	3	1	1	2	2	2	2	10	1.6
2	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	11	1.8
3	7	7	8	8	7	7	11	11	9	9	11	11	53	8.8
4	54	54	61	61	45	45	22	22	68	68	58	58	308	51.5
5	33	33	25	25	41	41	62	62	17	17	23	23	201	33.5
5>	2	2	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	5	0.8
<b>Topl</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	600	100

Tablo-10.4; Vaka no; 960742



Resim-11; Vaka 960742'den elde edilen plasental interfaz hücrelerde biotin işaretli YAC 831B9(kırmızı) ve digoxigenin işaretli L1.84(yeşil) problemlerinin verdiği sinyaller. Problemler dual-colour FISH'de FITC, rhodamin ile görüntülendi.

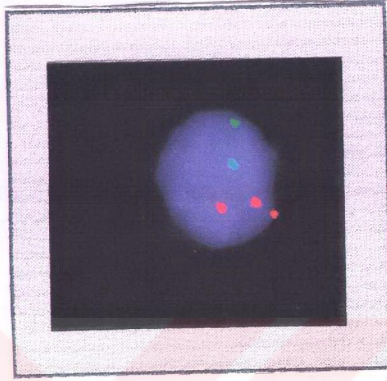


Resim-12; vaka 960742'den elde edilen plasental interfaz hücrelerde biotin işaretli D16Z2(kırmızı) ve digoxigenin işaretli D7Z1(yeşil) problemlerinin verdiği sinyaller. Problemler dual-colour FISH'de FITC, rhodamin ile görüntülendi.

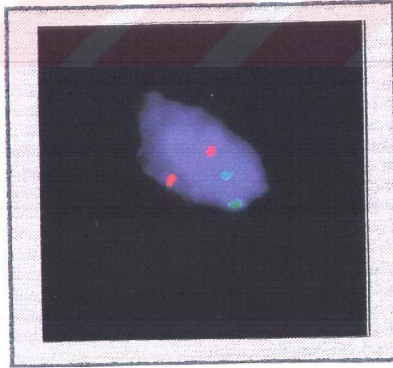
Vaka 960742, biotin işaretli YAC 831B9 probunun dual-colour FISH tekniğinde kullanılmasıyla mozaik trizomi-21 olarak görüldü(Resim-11). Diploid/trizomik hücre hatlarının oranı tüm plasental bölgelerin diploid/trizomik hücre hatları arasındaki farklar dikkate alındığında aşağı yukarı aynı oran görüldü. Plasental bölgeler 2, 5, 6 daha daha yüksek oranda diploid hücre hattına sahipti ve bu oranlar sırasıyla %61, %68, %58 şeklindeydi. Aynı plasental bölgelerde kromozom 21 açısından trizomik hücre hattı oranları sırasıyla %25, %17, %23 olarak görüldü. Bunun aksine, plasental bölge 4 %22 diploid hücre hattı ve %62 trizomik hücre hattı verdi(tablo-10.4).

S/N	1		2		3		4		5		6		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	2	2	2	2	3	3	1	1	3	3	2	2	13	2.1
1	1	1	2	2	1	1	3	3	1	1	1	1	9	1.5
2	2	2	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	16	2.6
3	7	7	6	6	8	8	5	5	6	6	7	7	39	6.5
4	35	35	30	30	21	21	27	27	25	25	43	43	181	30
5	51	51	54	54	62	62	60	60	60	60	40	40	327	54.8
5>	2	2	3	3	2	2	1	1	3	3	4	4	15	2.5
<b>Topl</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	600	100

Tablo-10.5;Vaka no;960804



Resim-13; Vaka 960804'ün plasental interfaz hücrelerinde biotin işaretli L1.84(kırmızı) ve digozigenin işaretli YAC 831B9 (yeşil) problemlerinin verdiği sinyaller. Problemler dual-colour FISH'de FITC, rhodamin ile gösterildi.

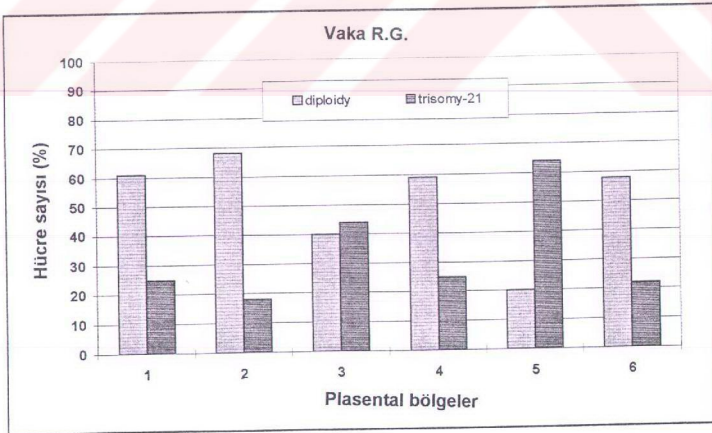


Resim-14; Vaka 960804'ün plasental interfaz hücrelerinde biotin işaretli D16Z2 (kırmızı) ve digozigenin işaretli D7Z1 (yeşil) problemlerinin verdiği sinyaller. Problemler dual-colour FISH'de FITC, rhodamin ile gösterildi.

Vaka 960804, biotin işaretli prob L1.84 kullanılarak dual-colour interfaz FISH'le trizomi-18 mozaikliği gösterdi(Resim-13). Diploid hücre hattı tüm plasental bölgelerin ortalaması olarak %30 (min;21, max;43) bulundu. Trizomik hücre hattı ortalaması ise tüm plasental bölgeler için %54.8 (min;40, max;62) idi. Sadece plasental bölge 6'da diploid hücre hattı %43, trizomik hücre hattı %40 olarak görüldü(tablo-10.5).

S/N	1		2		3		4		5		6		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	2	2	0	0	0	0	2	2	1	1	3	3	8	1.3
1	1	1	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	5	0.8
2	2	2	2	2	3	3	3	3	1	1	3	3	14	2.3
3	6	6	9	9	11	11	10	10	13	13	14	14	63	10.5
4	61	61	68	68	40	40	59	59	20	20	58	58	306	51
5	25	25	18	18	44	44	25	25	64	64	22	22	198	33.1
5>	3	3	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	6	1
<b>Total</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	600	100

Tablo-10.6 vaka;R.G.



Grafik-2; plasentada normal ve anormal hücrelerindeki dağılımı. Sonuçlar interfaz FISH ile elde edilmiştir.

Vaka R.G.'nin tüm plasental bölgelerinde mozaik trizomi-21 görüldü. Diploid/trizomik hücre hattı oranı tüm plasental bölgeler için oldukça farklı bulundu. Plasental bölge 3'de diploid/trizomik hücre hattı oranı yaklaşık olarak eşit görüldü. Plasental bölge 5, 4 hibridizasyon sinyali ile diploid hücrelerin %20 oranında olduğunu gösterdi. Bunun aksine plasental bölgeler 1, 2, 4 ve 6diploid hücre hattı bakımından %61 ortalama ile oldukça yüksek bir oranda bulundu.(min;58, max;68). Aynı bölgelerdeki trizomik hücre hattı oranı %22.5 ortalama %33.1 oranında trizomi-21 gösterdi. Geri kalan hücrelerin %51'i L1.84 ve YAC 831 problemlerinin dual-colour FISH ile diploid olarak bulundu(Tablo-10.6 ve Grafik-2).

#### *İstatistiksel Analizler:*

İnterfaz-FISH ve doku kültüründen elde edilen tüm mozaik sonuçlar  $X^2$  testiyle kıyaslandı. Test, FISH teknikleri ve klasik sitogenetik tekniklerle elde edilen sonuçların kıyaslanmasında ve bölgeler arasında farklılıkların kıyaslanmasında kullanıldı.  $X^2$  analizlerinden elde edilen P değeri %95 güvenlik sınırları içinde değerlendirildi. P değeri 0.05'den küçük olduğundan farkın önemli olduğu şeklinde değerlendirme yapıldı.

#### Sitogenetik sonuçlar

#### FISH sonuçları

Vaka	$\chi^2$	df	p	önem	$\chi^2$	df	p	önem
7	18.133	7	0.012	Ö	69.711	7	0.000	Ö
8	23.442	7	0.002	Ö	12.159	7	0.097	Ösz
10	171.571	7	0.000	Ö	161.845	7	0.000	Ö
11	33.449	7	0.000	Ö	19.824	7	0.006	Ö
14	10.133	6	0.120	Ösz	15.534	7	0.031	Ö
17	0.369	4	0.985	Ösz	1.554	7	0.980	Ösz
18	5.783	3	0.123	Ösz	4.204	7	0.756	Ösz
19	13.414	5	0.020	Ö	8.546	7	0.288	Ösz

Tablo-11;  $X^2$  testi kullanılarak, tüm plasental bölgelerin FISH ve sitogenetik sonuçlarının kıyaslanması.

Ö; (önemli), ösz;(önemsiz)

Mozaiklik gösteren vakaların sitogenetik sonuçları  $X^2$  testiyle analiz edildi ve 3 vakanın bölgeleri arasında bir farklılığın olmadığı, bunun yanında 5 vakanın bölgeleri arasındaki farkın önemli olduğu görüldü. Aynı vakaların FISH sonuçları da  $X^2$  testi ile analiz edildi ve 4 vakanın bölgeleri arasında farkın olduğu, fakat diğer 4 vakanın bölgeleri arasında anlamlı bir farkın olmadığı sonucuna varıldı (tablo-11)

Vaka	$\chi^2$	df	p	Önem
7	3.891	1	6.049	Ö
8	1.816	1	0.178	Ösz
10	0.003	1	0.953	Ösz
11	0.000	1	0.988	Ösz
14	0.001	1	0.980	Ösz
17	0.383	1	0.536	Ösz
18	0.681	1	0.409	Ösz
19	14.694	1	0.000	Ö

Tablo-12; Tüm plasental bölgelerin toplam sayıları kullanılarak FISH ve sitogenetik sonuçlarının  $X^2$  testi ile kıyaslanması.

Ö;önemli, ösz;önemsiz

Mozaiklik gösteren 8 vakanın interfaz-FISH ve klasik sitogenetik sonuçları bu teknikler arasında önemli bir fark olduğunu gösterirken diğer 6 vakanın sonuçları teknikler arasında fark olmadığını gösterdi

Klasik sitogenetik ve interfaz FISH sonuçları kullanılarak, tüm vakaların bölgeleri arasındaki farkın önemli olup olmadığı araştırıldı. Karşılaştırmalar  $X^2$  testi kullanılarak gerçekleştirildi.

## Sitogenetik sonuçlar

## FISH sonuçları

Bölge	$\chi^2$	df	p	önem	$\chi^2$	df	p	Önem
A-C	0.806	1	0.369	Ösz	17.795	1	0.000	Ö
A-P <sub>1</sub>	6.485	1	0.011	Ö	20.165	1	0.000	Ö
A-P <sub>2</sub>	2.728	1	0.099	Ösz	1.108	1	0.293	Ösz
A-P <sub>3</sub>	0.839	1	0.360	Ösz	0.134	1	0.714	Ösz
A-P <sub>4</sub>	0.585	1	0.445	Ösz	2.082	1	0.149	Ösz
A-P <sub>5</sub>	0.016	1	0.899	Ösz	0.059	1	0.808	Ösz
AP <sub>6</sub>	0.342	1	0.559	Ösz	0.731	1	0.393	Ösz
C-P <sub>1</sub>	2.394	1	0.122	Ösz	0.010	1	0.920	Ösz
C-P <sub>2</sub>	5.882	1	0.015	Ö	11.572	1	0.001	Ö
C-P <sub>3</sub>	0.017	1	0.897	Ösz	15.708	1	0.000	Ö
C-P <sub>4</sub>	0.002	1	0.965	Ösz	28.619	1	0.000	Ö
C-P <sub>5</sub>	0.609	1	0.435	Ösz	16.077	1	0.000	Ö
C-P <sub>6</sub>	0.057	1	0.811	Ösz	12.206	1	0.000	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	15.040	1	0.000	Ö	13.586	1	0.000	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	1.334	1	0.248	Ösz	18.016	1	0.000	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>	1.250	1	0.264	Ösz	31.304	1	0.000	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>5</sub>	3.568	1	0.059	Ösz	18.339	1	0.000	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>6</sub>	2.710	1	0.100	Ösz	14.190	1	0.000	Ö
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	5.572	1	0.018	Ö	0.486	1	0.486	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	4.684	1	0.031	Ö	5.956	1	0.015	Ö
P <sub>2</sub> -P <sub>5</sub>	1.537	1	0.215	Ösz	0.653	1	0.419	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>6</sub>	4.384	1	0.037	Ö	0.036	1	0.850	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	0.005	1	0.946	Ösz	3.233	1	0.072	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>5</sub>	0.679	1	0.410	Ösz	0.014	1	0.904	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>6</sub>	0.111	1	0.739	Ösz	0.249	1	0.618	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	0.521	1	0.470	Ösz	2.802	1	0.094	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>6</sub>	0.057	1	0.812	Ösz	5.058	1	0.025	Ö
P <sub>5</sub> -P <sub>6</sub>	0.318	1	0.573	Ösz	0.375	1	0.541	Ösz

Tablo-13; Vakaların plasental bölgelerinin ayrı ayrı kullanılmasıyla FISH ve sitogenetik sonuçlarının kıyaslanması  $X^2$  testiyle yapıldı.

Tablo-13.1 vaka 7

## Sitogenetik sonuçlar

## FISH sonuçlar

Bölge	$\chi^2$	df	p	Önem	$\chi^2$	df	p	Önem
A-C	0.171	1	0.679	Ösz	0.057	1	0.812	Ösz
A-P <sub>1</sub>	4.252	1	0.039	Ö	0.509	1	0.476	Ösz
A-P <sub>2</sub>	0.500	1	0.480	Ösz	0.005	1	0.945	Ösz
A-P <sub>3</sub>	2.543	1	0.111	Ösz	3.509	1	0.061	Ösz
A-P <sub>4</sub>	3.924	1	0.048	Ö	3.872	1	0.049	Ö
A-P <sub>5</sub>	1.371	1	0.242	Ösz	0.567	1	0.452	Ösz
AP <sub>6</sub>	0.041	1	0.839	Ösz	0.005	1	0.945	Ösz
C-P <sub>1</sub>	6.502	1	0.011	Ö	0.225	1	0.635	Ösz
C-P <sub>2</sub>	0.100	1	0.752	Ösz	0.092	1	0.762	Ösz
C-P <sub>3</sub>	4.447	1	0.035	Ö	2.644	1	0.104	Ösz
C-P <sub>4</sub>	6.269	1	0.012	Ö	2.981	1	0.085	Ösz
C-P <sub>5</sub>	0.715	1	0.398	Ösz	0.961	1	0.327	Ösz
C-P <sub>6</sub>	0.054	1	0.816	Ösz	0.092	1	0.762	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	8.136	1	0.004	Ö	0.591	1	0.442	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	0.303	1	0.582	Ösz	1.293	1	0.256	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>	0.030	1	0.863	Ösz	1.560	1	0.212	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>5</sub>	10.584	1	0.001	Ö	2.069	1	0.151	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>6</sub>	5.537	1	0.019	Ö	0.591	1	0.442	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	5.919	1	0.015	Ö	3.664	1	0.056	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	7.998	1	0.005	Ö	4.030	1	0.045	Ö
P <sub>2</sub> -P <sub>5</sub>	0.316	1	0.574	Ösz	0.446	1	0.504	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>6</sub>	0.309	1	0.578	Ösz	0.000	1	1.000	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	0.155	1	0.694	Ösz	0.018	1	0.892	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>5</sub>	8.174	1	0.004	Ö	6.719	1	0.010	Ö
P <sub>3</sub> -P <sub>6</sub>	3.603	1	0.058	Ösz	3.664	1	0.056	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	10.551	1	0.001	Ö	7.115	1	0.008	Ö
P <sub>4</sub> -P <sub>6</sub>	5.266	1	0.022	Ö	4.030	1	0.045	Ö
P <sub>5</sub> -P <sub>6</sub>	1.156	1	0.283	Ösz	0.446	1	0.504	Ösz

Tablo-13.2 vaka 8

## Sitogenetik sonuçlar

## FISH sonuçlar

Bölge	$\chi^2$	df	P	Önem	$\chi^2$	df	P	Önem
A-C	2.576	1	0.109	Ösz	5.618	1	0.018	Ö
A-P <sub>1</sub>	34.557	1	0.000	Ö	19.875	1	0.000	Ö
A-P <sub>2</sub>	87.015	1	0.000	Ö	67.139	1	0.000	Ö
A-P <sub>3</sub>	75.662	1	0.000	Ö	64.386	1	0.000	Ö
A-P <sub>4</sub>	75.662	1	0.000	Ö	74.531	1	0.000	Ö
A-P <sub>5</sub>	18.516	1	0.000	Ö	8.100	1	0.005	Ö
A-P <sub>6</sub>	4.182	1	0.041	Ö	4.295	1	0.038	Ö
C-P <sub>1</sub>	8.604	1	0.003	Ö	4.794	1	0.029	Ö
C-P <sub>2</sub>	33.904	1	0.000	Ö	38.225	1	0.000	Ö
C-P <sub>3</sub>	27.424	1	0.000	Ö	36.108	1	0.000	Ö
C-P <sub>4</sub>	27.424	1	0.000	Ö	44.405	1	0.000	Ö
C-P <sub>5</sub>	2.929	1	0.087	Ösz	0.261	1	0.610	Ösz
C-P <sub>6</sub>	0.003	1	0.959	Ösz	0.078	1	0.780	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	14.960	1	0.000	Ö	17.059	1	0.000	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	9.769	1	0.002	Ö	15.708	1	0.000	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>	9.769	1	0.002	Ö	21.636	1	0.000	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>5</sub>	3.237	1	0.072	Ösz	2.762	1	0.097	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>6</sub>	15.219	1	0.000	Ö	5.900	1	0.015	Ö
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	0.613	1	0.434	Ösz	0.019	1	0.890	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	0.613	1	0.434	Ösz	0.341	1	0.559	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>5</sub>	32.206	1	0.000	Ö	32.008	1	0.000	Ö
P <sub>2</sub> -P <sub>6</sub>	56.042	1	0.000	Ö	46.260	1	0.000	Ö
P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	0.000	1	1.000	Ösz	0.513	1	0.474	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>5</sub>	24.522	1	0.000	Ö	30.102	1	0.000	Ö
P <sub>3</sub> -P <sub>6</sub>	46.552	1	0.000	Ö	38.116	1	0.000	Ö
P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	24.522	1	0.000	Ö	37.772	1	0.000	Ö
P <sub>4</sub> -P <sub>6</sub>	46.552	1	0.000	Ö	46.489	1	0.000	Ö
P <sub>5</sub> -P <sub>6</sub>	5.104	1	0.024	Ö	0.608	1	0.436	Ösz

Tablo-13.3 Vaka 10

## Sitogenetik sonuçlar

## FISH sonuçlar

<i>Bölge</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
A-C	6.650	1	0.010	Ö	6.678	1	0.010	Ö
A-P <sub>1</sub>	3.782	1	0.052	Ösz	2.403	1	0.121	Ösz
A-P <sub>2</sub>	0.865	1	0.352	Ösz	2.642	1	0.104	Ösz
A-P <sub>3</sub>	4.594	1	0.032	Ö	6.276	1	0.012	Ö
A-P <sub>4</sub>	3.622	1	0.057	Ösz	6.250	1	0.013	Ö
A-P <sub>5</sub>	1.524	1	0.210	Ösz	2.403	1	0.121	Ösz
A-P <sub>6</sub>	28.847	1	0.000	Ö	16.781	1	0.000	Ö
C-P <sub>1</sub>	0.348	1	0.555	Ösz	1.117	1	0.291	Ösz
C-P <sub>2</sub>	2.235	1	0.135	Ösz	0.802	1	0.371	Ösz
C-P <sub>3</sub>	0.136	1	0.713	Ösz	0.006	1	0.941	Ösz
C-P <sub>4</sub>	0.364	1	0.546	Ösz	0.028	1	0.867	Ösz
C-P <sub>5</sub>	1.715	1	0.191	Ösz	1.117	1	0.291	Ösz
C-P <sub>6</sub>	9.314	1	0.002	Ö	2.859	1	0.091	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	0.840	1	0.360	Ösz	0.016	1	0.900	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	0.045	1	0.832	Ösz	0.960	1	0.327	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>	0.000	1	0.984	Ösz	1.243	1	0.265	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>5</sub>	0.490	1	0.484	Ösz	0.000	1	1.000	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>6</sub>	12.512	1	0.000	Ö	7.197	1	0.007	Ö
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	1.238	1	0.266	Ösz	0.675	1	0.412	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	0.789	1	0.375	Ösz	0.942	1	0.332	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>5</sub>	0.066	1	0.797	Ösz	0.016	1	0.900	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>6</sub>	18.127	1	0.000	Ö	6.173	1	0.013	Ö
P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	0.053	1	0.818	Ösz	0.054	1	0.815	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>5</sub>	0.825	1	0.364	Ösz	0.960	1	0.327	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>6</sub>	11.000	1	0.001	Ö	3.086	1	0.079	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	0.452	1	0.502	Ösz	1.243	1	0.265	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>6</sub>	12.411	1	0.000	Ö	1.893	1	0.169	Ösz
P <sub>5</sub> -P <sub>6</sub>	17.731	1	0.000	Ö	7.197	1	0.007	Ö

Tablo13.4 vaka 11

Bölge	$\chi^2$	df	p	Önem	$\chi^2$	df	p	Önem
A-C	0.484	1	0.487	Ösz	0.149	1	0.699	Ösz
A-P <sub>1</sub>	5.919	1	0.015	Ö	2.753	1	0.097	Ösz
A-P <sub>2</sub>	5.741	1	0.017	Ö	0.792	1	0.374	Ösz
A-P <sub>3</sub>	0.802	1	0.371	Ösz	0.095	1	0.758	Ösz
A-P <sub>4</sub>	-	-	-	-	4.390	1	0.036	Ö
A-P <sub>5</sub>	0.529	1	0.467	Ösz	1.144	1	0.285	Ösz
A-P <sub>6</sub>	3.605	1	0.058	Ösz	0.207	1	0.650	Ösz
C-P <sub>1</sub>	2.413	1	0.121	Ösz	4.335	1	0.038	Ö
C-P <sub>2</sub>	2.441	1	0.119	Ösz	1.697	1	0.193	Ösz
C-P <sub>3</sub>	0.018	1	0.892	Ösz	0.503	1	0.478	Ösz
C-P <sub>4</sub>	-	-	-	-	6.376	1	0.012	Ö
C-P <sub>5</sub>	0.004	1	0.951	Ösz	0.489	1	0.485	Ösz
C-P <sub>6</sub>	0.138	1	0.286	Ösz	0.738	1	0.391	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	0.007	1	0.933	Ösz	0.636	1	0.425	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	2.364	1	0.124	Ösz	1.926	1	0.165	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>	-	-	-	-	0.200	1	0.655	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>5</sub>	1.978	1	0.160	Ösz	7.574	1	0.006	Ö
P <sub>1</sub> -P <sub>6</sub>	0.270	1	0.603	Ösz	1.537	1	0.215	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	2.378	1	0.123	Ösz	0.356	1	0.551	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	-	-	-	-	1.556	1	0.213	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>5</sub>	2.028	1	0.155	Ösz	3.956	1	0.047	Ö
P <sub>2</sub> -P <sub>6</sub>	0.332	1	0.565	Ösz	0.199	1	0.655	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	-	-	-	-	3.370	1	0.067	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>5</sub>	0.004	1	0.949	Ösz	1.969	1	0.161	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>6</sub>	1.017	1	0.314	Ösz	0.023	1	0.881	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	-	-	-	-	10.163	1	0.001	Ö
P <sub>4</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	2.849	1	0.092	Ösz
P <sub>5</sub> -P <sub>6</sub>	0.896	1	0.344	Ösz	2.405	1	0.121	Ösz

Tablo-13.5 vaka14

<i>Bölge.</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
A-C	-	-	-	-	0.011	1	0.915	Ösz
A-P <sub>1</sub>	-	-	-	-	0.136	1	0.712	Ösz
A-P <sub>2</sub>	-	-	-	-	0.001	1	0.970	Ösz
A-P <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.000	1	0.991	Ösz
A-P <sub>4</sub>	-	-	-	-	0.110	1	0.740	Ösz
A-P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.453	1	0.501	Ösz
A-P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.131	1	0.717	Ösz
C-P <sub>1</sub>	0.301	1	0.584	Ösz	0.250	1	0.617	Ösz
C-P <sub>2</sub>	-	-	-	-	0.021	1	0.886	Ösz
C-P <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.014	1	0.904	Ösz
C-P <sub>4</sub>	0.055	1	0.814	Ösz	0.055	1	0.815	Ösz
C-P <sub>5</sub>	0.001	1	0.977	Ösz	0.345	1	0.557	Ösz
C-P <sub>6</sub>	0.013	1	0.911	Ösz	0.069	1	0.793	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	-	-	-	-	0.103	1	0.748	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.132	1	0.716	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>	0.035	1	0.852	Ösz	0.551	1	0.458	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>5</sub>	0.170	1	0.680	Ösz	1.217	1	0.270	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>6</sub>	0.184	1	0.668	Ösz	0.624	1	0.430	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.001	1	0.978	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	-	-	-	-	0.133	1	0.715	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.489	1	0.484	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.156	1	0.693	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	-	-	-	-	0.122	1	0.727	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.482	1	0.488	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.145	1	0.704	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	0.032	1	0.857	Ösz	0.127	1	0.722	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>6</sub>	0.022	1	0.833	Ösz	0.000	1	0.982	Ösz
P <sub>5</sub> -P <sub>6</sub>	0.004	1	0.951	Ösz	0.118	1	0.731	Ösz

Tablo-13.6 vaka 17

Bölge	$\chi^2$	df	p	Önem	$\chi^2$	df	p	Önem
A-C	-	-	-	-	0.403	1	0.526	Ösz
A-P <sub>1</sub>	-	-	-	-	1.271	1	0.260	Ösz
A-P <sub>2</sub>	-	-	-	-	0.059	1	0.809	Ösz
A-P <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.833	1	0.361	Ösz
A-P <sub>4</sub>	-	-	-	-	0.007	1	0.935	Ösz
A-P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.502	1	0.479	Ösz
A-P <sub>6</sub>	-	-	-	-	1.068	1	0.302	Ösz
C-P <sub>1</sub>	-	-	-	-	0.265	1	0.607	Ösz
C-P <sub>2</sub>	-	-	-	-	0.773	1	0.380	Ösz
C-P <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.121	1	0.728	Ösz
C-P <sub>4</sub>	-	-	-	-	0.524	1	0.469	Ösz
C-P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.007	1	0.934	Ösz
C-P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.168	1	0.682	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	1.714	1	0.191	Ösz	1.859	1	0.173	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.016	1	0.899	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>	1.714	1	0.191	Ösz	1.481	1	0.224	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>5</sub>	0.027	1	0.870	Ösz	0.183	1	0.669	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.012	1	0.911	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	-	-	-	-	1.276	1	0.259	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	0.000	1	1.000	Ösz	0.026	1	0.871	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>5</sub>	3.882	1	0.049	Ö	0.900	1	0.343	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	1.624	1	0.203	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	-	-	-	-	0.986	1	0.321	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.072	1	0.788	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.001	1	0.980	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	3.882	1	0.049	Ö	0.634	1	0.426	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	1.264	1	0.261	Ösz
P <sub>5</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.104	1	0.748	Ösz

Tablo-13.7 vaka 18

## Sitogenetik sonuçlar

## FISH sonuçları

<i>Bölge</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
A-C	-	-	-	-	0.083	1	0.773	Ösz
A-P <sub>1</sub>	-	-	-	-	2.299	1	0.130	Ösz
A-P <sub>2</sub>	6.215	1	0.013	Ö	4.567	1	0.033	Ö
A-P <sub>3</sub>	4.811	1	0.029	Ö	4.367	1	0.037	Ö
A-P <sub>4</sub>	3.727	1	0.054	Ösz	1.563	1	0.212	Ösz
A-P <sub>5</sub>	-	-	-	-	3.704	1	0.055	Ösz
A-P <sub>6</sub>	2.022	1	0.155	Ösz	2.973	1	0.085	Ösz
C-P <sub>1</sub>	-	-	-	-	1.535	1	0.216	Ösz
C-P <sub>2</sub>	7.416	1	0.007	Ö	3.488	1	0.062	Ösz
C-P <sub>3</sub>	5.748	1	0.017	Ö	3.314	1	0.069	Ösz
C-P <sub>4</sub>	4.457	1	0.035	Ö	0.939	1	0.333	Ösz
C-P <sub>5</sub>	-	-	-	-	2.733	1	0.099	Ösz
C-P <sub>6</sub>	2.422	1	0.120	Ösz	2.103	1	0.147	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>2</sub>	-	-	-	-	0.402	1	0.526	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	-	-	-	-	0.354	1	0.552	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>4</sub>	-	-	-	-	0.079	1	0.779	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.180	1	0.671	Ösz
P <sub>1</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.047	1	0.829	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	0.247	1	0.619	Ösz	0.001	1	0.975	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>4</sub>	0.812	1	0.368	Ösz	0.847	1	0.358	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.042	1	0.838	Ösz
P <sub>2</sub> -P <sub>6</sub>	3.016	1	0.083	Ösz	0.173	1	0.678	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>4</sub>	0.186	1	0.667	Ösz	0.771	1	0.380	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.029	1	0.865	Ösz
P <sub>3</sub> -P <sub>6</sub>	1.656	1	0.198	Ösz	0.144	1	0.705	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>5</sub>	-	-	-	-	0.499	1	0.480	Ösz
P <sub>4</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.247	1	0.619	Ösz
P <sub>5</sub> -P <sub>6</sub>	-	-	-	-	0.044	1	0.835	Ösz

Tablo-13.8 vaka 19

Tablo-13.1 'den 13.8'e kadar yapılacak izlemelerde mozaiklik bakımından farkın bazı bölgelerde önemli bazılarında önemsiz olduğu görülecektir.

<i>Vaka</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
954937	12.435	5	0.030	Ö
T154326	12.487	5	0.029	Ö
960742	65.497	5	0.000	Ö
960804	16.529	5	0.006	Ö
R.G.	77.768	5	0.000	Ö

Tablo-14; Tüm plasental bölgelerin “touch preparation” interfaz-FISH sonuçlarının  $X^2$  ile kıyaslanması.

IUGR gösteren vakalardan alınan 6 plasental bölgeye ait hücrelerin interfaz-FISH sonuçlarının toplam sayısı kullanılarak  $X^2$  testi ile kıyaslandı.

IUGR gösteren 6 mozaik vakanın plasental bölgeleri arasında oldukça önemli farklılıklar gözlemlendi. Mozaikliğin derecesi farklı bölgeler için oldukça farklı bulundu.

Tablo-15; Plasental bölgelerin ayrı ayrı kullanılmasıyla “touch preparation” interfaz-FISH sonuçlarının  $X^2$  testi ile kıyaslanması.

IUGR gösteren 6 vakanın tüm plasental bölgeleri, bölgeler arasındaki mozaiklik derecesinin ortaya konulması için karşılaştırıldı.

<i>Bölge</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
1-2	0.300	1	0.584	Ösz
1-3	4.343	1	0.037	Ö
1-4	1.620	1	0.203	Ösz
1-5	0.159	1	0.690	Ösz
1-6	0.005	1	0.945	Ösz
2-3	2.435	1	0.119	Ösz
2-4	3.358	1	0.067	Ösz
2-5	0.898	1	0.343	Ösz
2-6	0.227	1	0.634	Ösz
3-4	11.191	1	0.001	Ö
3-5	6.099	1	0.014	Ö
3-6	4.038	1	0.045	Ö
4-5	0.754	1	0.386	Ösz
4-6	1.793	1	0.181	Ösz
5-6	0.218	1	0.641	Ösz

Tablo-15.1 vaka 954937

<i>Bölge1.</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
1-2	0.078	1	0.779	Ösz
1-3	2.759	1	0.097	Ösz
1-4	4.486	1	0.034	Ö
1-5	0.871	1	0.351	Ösz
1-6	0.064	1	0.801	Ösz
2-3	1.890	1	0.169	Ösz
2-4	3.351	1	0.067	Ösz
2-5	1.452	1	0.228	Ösz
2-6	0.001	1	0.980	Ösz
3-4	0.211	1	0.646	Ösz
3-5	6.566	1	0.011	Ö
3-6	1.938	1	0.164	Ösz
4-5	9.058	1	0.003	Ö
4-6	3.404	1	0.065	Ösz
5-6	1.376	1	0.241	Ösz

Tablo-15.2 vaka T154326

<i>Bölge1.</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
1-2	1.524	1	0.217	Ösz
1-3	1.677	1	0.196	Ösz
1-4	22.281	1	0.000	Ö
1-5	6.704	1	0.010	Ö
1-6	1.716	1	0.190	ösz
2-3	6.294	1	0.012	Ö
2-4	34.042	1	0.000	Ö
2-5	1.898	1	0.169	Ösz
2-6	0.009	1	0.923	Ösz
3-4	12.155	1	0.001	Ö
3-5	14.607	1	0.000	Ö
3-6	6.559	1	0.011	Ö
4-5	49.140	1	0.000	Ö
4-6	34.051	1	0.000	Ö
5-6	1.598	1	0.206	Ösz

Tablo-15.3 vaka 960742

<i>Bölge</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
1-2	0.447	1	0.504	Ösz
1-3	4.519	1	0.034	Ö
1-4	1.756	1	0.185	Ösz
1-5	3.267	1	0.071	Ösz
1-6	2.098	1	0.148	Ösz
2-3	2.134	1	0.144	Ösz
2-4	0.421	1	0.516	Ösz
2-5	1.266	1	0.261	Ösz
2-6	4.394	1	0.036	Ö
3-4	0.689	1	0.407	Ösz
3-5	0.136	1	0.713	Ösz
3-6	12.308	1	0.000	Ö
4-5	0.226	1	0.635	Ösz
4-6	7.567	1	0.006	Ö
5-6	10.451	1	0.001	Ö

Tablo-15.4 vaka 960804

<i>Bölge</i>	$\chi^2$	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>Önem</i>
1-2	1.519	1	0.218	Ösz
1-3	9.576	1	0.002	Ö
1-4	0.010	1	0.921	Ösz
1-5	37.825	1	0.000	Ö
1-6	0.050	1	0.823	Ösz
2-3	18.141	1	0.000	Ö
2-4	1.754	1	0.186	Ösz
2-5	51.970	1	0.000	Ö
2-6	0.978	1	0.323	Ösz
3-4	8.878	1	0.003	Ö
3-5	10.370	1	0.001	Ö
3-6	10.548	1	0.001	Ö
4-5	36.343	1	0.000	Ö
4-6	0.103	1	0.749	Ösz
5-6	38.950	1	0.000	Ö

Tablo-15.5 vaka R.G.

Tablo-15.1 ve 15.5’de görüleceği gibi, bölgeler arasında önemli bir fark yoktur. Bununla beraber vaka 960742 ve R.G.’de olduğu gibi bazı bölgeler arasında farklılıklar görüldü.

## TARTIŞMA

*Doku kültürü ve interfaz-FISH teknikleriyle çalışılan IUGR plasental doku bulgularının sumumu:*

Doku kültürü ve interfaz-FISH teknikleri ile çalışılan 29 plasental dokudan elde edilen sonuçlara göre ilk 6 vakada çeşitli sayısal kromozom anomalileri bulundu. Vaka 4 ve 5 sırasıyla 22 ve 28. Haftalarda ölü doğumla sonuçlanmıştı. Vaka 4’de saf triploidi ve vaka 5’de saf trizomi-15 görüldü.

Diğer 23 vaka IUGR bulguları nedeniyle çalışmaya alındı. Bunların 9 tanesi, çoğunlukla mozaik olmak üzere bazı kromozomal anomali gösterdi. Vaka 9’un bazı plasental bölgelerinde çok düşük oranda 46, XX şeklinde karyotiplere rastlanıldı, fakat özellikle amniyon ve koryon doku örneklerinde 47,XY,+21 karyotipik bulguları sonucu bunun maternal kontaminasyon neticesinde düşük oranlı bir yalancı mozaiklik olduğu sonucuna varıldı. Bunun da muhtemelen, plasental numunelerin alınması sırasında maternal yüzeye yakın dokulardan biyopsi yapılması neticesinde olduğu düşünüldü. Diğer 8 vaka ise çeşitli tipte mozaiklikler gösterdi.

*Kültüre alınmamış CVS’lerde dual-colour FISH ile trizomi-18 ve trizomi-21’in araştırılması:*

Bu çalışmada dual-colour interfaz-FISH’te kullanılan 94 CVS vakasından biri (%3) saf trizomi-18 gösterdi. Tüm aneuploidik vakalar dual-colour ile 5 sinyal göstermeleri sonucunda yüksek oranda trizomi olarak belirlendi. 3 vaka %81’den daha yüksek oranda trizomik hücre hattı gösterdi. Bir vaka ise (vaka 953847) daha düşük oranda 3 hibridizasyon sinyali ile (%74) trizomik olduğu belirlendi. Bu düşük hibridizasyon sinyal oranının, kullanılan preparatların eski olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

FISH tekniğinin, insan embriyonik blastomer(46, 113), maternal sirkülasyondan elde edilen fetal hücreler(5) kültüre alınmamış amniyositler (31) ve kültüre alınmamış koryonik hücreler (11) in prenatal tanı için kullanımında çok yararlı olabileceği belirtilmektedir. Multi-colour FISH tekniğinde erken insan embriyolarının kromozom sayılarının belirlenmesi çalışmalarında kullanıldı(18, 46, 113).

Bryndorf ve arkadaşları en yaygın kromozom anomalileri gösteren 13, 18, 21, X ve Y’nin prenatal dönem analizlerinin en hızlı biçimde, interfaz CVS ve intrefaz amniyositler, hücrelerinde FISH’in kullanılmasıyla yapılabileceğini rapor ettiler(10). İnterfaz CVS hücreleri çok etkin şekilde hibridizasyon sinyali verirlerken, interfaz amniyositler, maternal hücre kontaminasyonu, problemlerin zayıf hibridizasyonu yönünden problemlidir. Bu

problemlerin amniyotik sıvı örneklerindeki yüksek oranda dejenere hücrelerden kaynaklandığı sanılmaktadır.

Prenatal tanıda CVS hücrelerinin kullanılması çalışmalarında gebeliklerin %1-2'nin CPM gösterdiği bulundu(93). First trimester gebeliklerden alınan bir villus örneği çeşitli anormal hücre hatları gösterebilir(20), fakat daha önemlisi, sitotrofoblast(139), ve ekstra-embriyonik hücre hatlarında(4), CPM için yapılan term plasentanın ayrıntılı çok bölge analizleri, trizomik hücrelerin oldukça farklı şekilde dağılabildiklerini göstermiştir.

Plasentakoryonik villi'den elde edilen interfaz hücrelerinde mozaik trizomi-18 ve saf trizomi-18'in araştırılması fetusun kromozom yapısı hakkında tam bir bilgi veremez(147, 178). Uzun süreli villus kültürlerinin doğrulama çalışmaları bunun asıl nedenlerinden biri olarak yapılır. Bununla beraber koryonik villinin kültürü, rapor verme zamanını oldukça geciktirir(74, 162). Bunların yanında kültüre alınmış villiden elde edilen karyotip ile fetusun karyotipi arasında farklılıklar olabileceği bildirilmiştir(52, 165).

Opstal ve arkadaşları(1995), koryonik villiden elde ettikleri direkt preparasyonlardan trizomi-18'in araştırılmasında interfaz-FISH'in kullanılmasını hızlı ve başarılı bir yöntem olarak buldular. Özellikle non-mozaik trizomi-18 çalışmalarında spesifik probun interfaz hücrelerinde fetüsün kromozom sayısının doğru olarak gösterilmesini sağlayabileceğini rapor ettiler.

Mozaik trizomi-18 vakalarında klasik sitogenetik analizlere ek olarak FISH çalışmalarında 3 vakada yüksek oranda 3 sinyal alınmasıyla trizomi-18 mozaiklik teyit edildi ve teyid edilmeyen 4 vaka ile karşılaştırıldı. Eğer 3 sinyale sahip hücrelerin oranı %66'dan düşük ise, trizomi-18 fetal hücrelerde teyid edilmedi. Genel olarak, FISH sonuçları fetus kromozom yapısının tahmini için yapılan klasik sitogenetik analizler daha değerli olabilir. Gebeliğin ilk trimester'ında alınan koryonik villuslardan yapılan direk preparasyonlarda mozaik yada non-mozaik trizomi-18 tanısı yanlış pozitif(8, 89, 137) ve yanlış negatif oluşumlarıyla sonuçlanabilir. Bununla beraber, FISH bazı vakalarda oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Orta dercede (%66-83) olmak üzere 3 sinyal alınmışsa fetusun ya gerçek bir mozaik veya yanlış pozitif sonuç olduğu düşünülür(120).

Brydorf ve arkadaşları(1994) koryonik villiden mezenşimal hücrelerde YAC probu kullanılarak trizomi-21 araştırdılar(11). Yine Brydorf ve arkadaşları elde ettikleri klasik sitogenetik sonuçları aynı gebeliklerden elde ettikleri interfaz-FISH sonuçlarını karşılaştırdılar, ve aralarında uygunluk olduğunu gördüler(10). Gebeliğin 8-10. haftalarındaki CVS prenatal tanı için çok büyük avantaj sağlar ve bu erken dönemde kromozom anomalilerinin ortaya konulması önemlidir(129). Burada dikkate alınması gereken hususlardan

birisi maternal hücre kontaminasyonudur ve bununda hücrelerin %2'inde görülebileceğidir(88). Gebeliğin geç dönemlerinde yapılan direkt CVS preparasyonları az sayıda incelenebilecek başarılı metafaz verir ve mozaikliğin araştırılması için çok sayıda ve başarılı metafaz gerektiğinden önemli bir problem oluşturur. FISH ile yapılacak interfaz sitogenetik çalışmaları bu sıkıntıları ortadan kaldırır ve plasental dokularda kromozomal mozaikliğin araştırılmasında pratik ve başarılı bir alternatif metod olarak ortaya çıkar.

Trizomi-18 vakalarının büyük çoğunluğu ilk yada ikinci trimesterde spontan abortusla kaybedilir. Yaklaşık %5'i üçüncü trimester'e ulaşır ve ya canlı yada ölü doğumla sonuçlanır. Plasentanın kromozom yapısının aneuploid fetusların doğum öncesinde canlılıklarını korumalarında çok önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir(61, 151).

#### *IUGR plasental dokularda bazı yaygın trizomilerin araştırılması*

Çalışmanın bu bölümünde, IUGR'den etkilenmiş fetusun plasental dokuları kullanılarak trizomi-7, trizomi-16, trizomi-18 ve trizomi-21 dual-colour FISH tekniğiyle araştırıldı. Bir vaka saf trizomi-21 ve 5 vaka plasental mozaiklik gösterdi. Anormal vaka oranı %17.6 olarak bulundu. Buna karşılık trizomi-7 ve trizomi 16 görülmedi. Plasental mozaiklik oranı %14.7(5/34) olarak tesbit edildi.

Trizomi-7 gösteren pekçok vakanın gebeliğin ilk trimesterinde spontan abortusla sonuçlandığı sanılır(7, 67, 82, 104). Bu vakaların çoğunun ya küçük embriyolar yada fetal doku bulunmayan membranlardan oluştuğu gözlemlendi.

Trizomi-7 amniyotik sıvı kültürlerinde en sık rastlanılan ikinci yalancı mozaiklikdir(55). Plasentada rastlanılan trizomik hücreler gebeliğin devamında olumsuz etki yaparak ölümle neticelenen duruma yol açabilir.

Redy ve arkadaşları, CVS'de %53 term plasentada %8 oranında trizomi-7 gördüler. Bu term plasentada görülen düşük trizomi-7 oranının normal fetal oluşum ve gelişime izin vermiş olabileceğini düşündüler(127).

Trizomi-16 insanda en sık rastlanılan kromozom anormalliğidir ve genellikle gebeliğin ilk trimesterinin sonunda fetusun kaybedilmesiyle sonuçlanır. Trizomi-16 CPM'lerinin %85'den daha fazlasının mayotik kaynaklı olduğu görülür ve genellikle de materyal mayoz I'dir(180). Mozaik ve non-mozaik trizomi-16 CVS'lerde de tespit edilmiştir.

Trizomik hücreler CVS vakalarının herbirinde ekstraembriyonik membranlar ve plasenta ile sınırlıdır. Genellikle abortların ve yenidoğanların fenotipleri normal olarak tanımlanır, fakat bazılarında IUGR görülür(35, 49, 75, 77, 89, 157, 168, 177). Plasentada trizomik hücrelerin bulunuşu fonksiyonun buzulmasına IUGR'ye neden olduğu

düşünülmekle birlikte CVS'le tanı konulan 108 CPM vakasına ait kollobrativ bir çalışmada böyle bir ilişkinin olduğu teyid edilmedi(68, 70, 166).

Amniyotik sıvı örneklerinde trizomi-16 mozaikliği nadiren görüldü. 116.000 amniyon sıvısının çalışıldığı bir seride 1 tane trizomi-16 mozaikliği görülürken, bir başka kollobrativ çalışmada 2 trizomi-16 mozaik vakaya rastlandı(12, 55, 56, 181)

Tüm trizomik abortların %30'unu oluşturan trizomi-16'nın bu yüksek oranının, trizomi -16'nın ölümcül olduğunu ve gebeliğin erken dönemlerinde fetal kayıplara neden olduğunu ortaya koyar(50, 61). Amniyotik sıvı ve CVS 'de bulunan trizomi-16 doğrulanması problemlidir; Non-mozaik ve mozaik trizomi-16 bulunan CVS vakaları henüz amniyotik sıvı çalışmalarıyla teyid edilemedi. Trizomik hücrelerin ekstraembriyonik membranlar ve plasenta ile sınırlı kaldığı düşünülmektedir(32, 35, 49, 75, 89, 159, 164, 177).

Plasental trizomi -16'nın IUGR'a y ol açtığı ve normal fenotipli canlı doğumlar görüldüğü belirtilmektedir(62, 124). Bunun yanında fetal dokularda da trizomi -16'nın görüldüğü ve IUGR nedeni olduğu bildirilir. Bu tür vakalar çok nadirdir ve mozaik trizomi-16 olarak tanı konulmuştur. Bu tür anomalili yenidoğanların dismorfik özellikleri belirtilmiştir(39, 41, 168). Devam eden yada etmeyen gebeliklerde mozaik yada non-mozaik trizomilerin oranının trizomi-7, trizomi-8, ve trizomi-9 için toplam olarak %30-40 olduğu görülmüştür(180).

Plasentanın karyotip, trizomik veya diploid fetusların intrauterin gelişimi ve yaşamaları açısından çok önemlidir. Kalousek ve arkadaşları trizomi18'li bir fetusun, diploid bir yapıya sahip plasenta ile normal gelişime sahip olduğunu gösterdiler. Buna benzer bulgular, anormal karyotipe sahip bir plasentanın normal bir karyotipe sahip fetusun gelişimine olumsuz etki yaptığı ve IUGR görüldüğünü, tersine normal bir hücre hattına sahip plasentanın saf trizomik bir fetusun canlılığı üzerinde olumlu etki ederek onun yaşayabilmesine yardımcı olduğunu göstermiştir(9, 64, 72, 73, 75).

Lynch ve Berkowitch ilk trimesterde trizomi-18 gösteren 5 fetusun ve 16 fetosluk normal kontrol grubunun büyüme paternlerini inceledi ve karşılaştırdı(101). Tüm trizomi-18 fetüslerinin baş çevresi uzunluklarının beklenenden en az 5 gün(ortalama;8.2 gün, aralık; 5-11 gün) daha geride olduğunu gördü. Benzer olarak Kirkinen ve arkadaşları fetal anormalliği olan 68 gebeliği inceledi ve en yaygın komplikasyon olarak IUGR gördü. Vakaların %81'inde pekçok malformasyonlar trizomi-18 için tipikti.

#### *Plasentada anormal hücre hatlarının dağılımı:*

Çeşitli anormal hücre hatlarının plasentada dağılımının başlıca iki şekilde olabileceği düşünülür. Birincisi, bu anormal hücrelerin plasentanın çeşitli bölgelerine dağılmış olması,

ikincisi bazı bölgelere sınırlı kalması. Anormalliğin olduğu spesifik plasental bölgeleri incelenmeden önceden tahmin etmek mümkün değildir. Bu konudaki bilgiler bazı otörler tarafından ortaya konulmuştur(4, 73, 108, 139).

Bu çalışmada amniyon , koryon ve plasental bölgeler arasında hücre hatlarının dağılımının farklı olduğu bulundu. Çalışmanın ilk bölümünde vaka 19'un plasental bölgelerinde görülen normal hücreler açısından(46,XX) düşük seviyeli mozaikliğe karşılık, amniyon ve koryon saf trizomi-21 olarak bulundu(47, XX, +21). Dokular ve bölgeler arasındaki bu farkın iki şekilde meydana gelmiş olabileceği düşünülür. Birincisi, bu vakanın saf trizomi olduğu fakat plasental bölgelerin biyopsi sırasında bazı maternal hücrelerinden alınmış olabileceği(MCC), ikincisi amniyon ve koryonun-mozaik trizomi-21, plasentalın ise düşük seviyeli mozaik olduğu(tablo-5)

Klasik sitogenetik ve interfaz-FISH teknikleriyle mozaik görülen diğer vakaların amniyon, koryon ve tüm plasental bölgeler arasında hücre hatlarının dağılımı açısından oldukça yüksek oranda farklılıklar görüldü.(Tablo-6 ve grafik-1).

Vaka 7, 8, 10, 11 ve 19 'un amniyon, koryon ve tüm plasental bölgelerinden elde edilen sitogenetik sonuçları  $X^2$  testiyle analiz edildiğinde tüm bölgeler arasında önemli farklılıklar olduğu görüldü. Buna karşılık vaka 14, 17 ve 18'in bölgeleri arasında önemli bir farkın olmadığı bulundu(Tablo-11). Bu vakaların FISH sonuçları  $X^2$  testiyle analiz edildiğinde vaka 7, 10, 11 ve 14'ün bölgeleri arasında önemli bir farkın olduğu fakat vaka 8, 17, 18 ve 19'un böyle bir fark göstermediği bulundu(tablo-11).

Tablo 13.3 ve grafik-1 incelendiğinde vaka 10'un bazı plasental bölgeleri arasında oldukça önemli bir farklılığın olduğu göze çarpar. Tablo-7'nin incelenmesinde ise amniyon %91 arasında 46,XX ,%9 oranında 45,X karyotipe, plasental bölge 2'nin %20 oranında 46,XX ve %74 oranında 45,X karyotipe sahip olduğu görülür. Bu iki bölgenin  $X^2$  ile istatistik analizi çok yüksek oranda bir farkın olduğunu göstermiştir.( $X^2$ :87.015; P=0.000) (tablo 13.3) Bu vakanın FISH sonuçları analizinde aynı bölgeler arasında aynı farklılığın bulunması ( $X^2$ = 67.139 ; p= 0.000 ) ( tablo 13.3) FISH ve sitogenetik çalışmaların karşılaştırılması açısından önemlidir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde, bu konuda diğer tipik örneklerle rastlanmıştır. İnterfaz-FISH tekniğiyle çalışılan plasental dokuların bölgeleri arasında bazı farklılıklara rastlanmıştır (tablo 10). Vaka R.G.'nin plasental bölgeleri 2 ve 5 arasında farklılıklar görüldü (grafik-2). Plasental bölge 2, dual-colour interfaz-FISH sonucunda %68 oranında diploid hücre (4 sinyal) ve %18 oranında trizomik hücre (5 sinyal) verirken, plasental bölge 5 % 20 oranında diploid hücre ve % 64 oranında trizomik hücre vermiştir (tablo 10.6). Grafik-2'de görüldüğü gibi, bu

vakanın plasental bölgeler 2 ve 5 arasında çok önemli bir fark vardır ( $X^2= 51.970$  ;  $p= 0.000$ ) , (tablo 15.5).

Mutasyonlar ya tamamen normal fetus/infantların embriyonel farklılaşmalarının olduğu erken gebelik döneminde yada plasental oluşumun sonunda ortaya çıkarlar. Plasental bölgelerdeki anormal hücre hatlarının farklılığından dolayı mutasyonun ne zaman olduğuna karar vermek mümkün değildir. Pittalis ve arkadaşları bazı kromozom farklılaşmalarının, embriyo hariç olmak üzere, plasental oluşuma iştirak eden tüm hücelere geçirebileceğini düşünürler. Bu çalışmadan elde edilen verilerin gösterdiği plasental bölgeler arasındaki hücre hatlarının farklılığı Pittalis ve arkadaşlarının düşüncelerine uymaktadır(123).

*Plasental mozaiklik ile IUGR arasındaki ilişki :*

Johnson ve arkadaşları gibi Kalousek ve arkadaşları da, gelişme geriliği görülen doğumlarla spesifik genetik faktörler arasında bir ilişki olabileceğini düşünürler(64, 73). Kromozomal mozaiklik plasentanın fonksiyonunda olumsuz bir etki yapabilir. Bunun tersine normal hücelere sahip bir plasentanın trizomi-13 ve trizomi-18'li fetusların canlılığını devam ettirmelerinde olumlu etki yapar (71). Bunun tersine, trizomik hücelere sahip bir plasentanın, normal karyotipe sahip bir fetus'un gelişiminde olumsuz etki yaptığı da görülmüştür (44). Term plasentada yoğun olarak görülen CPM, açıklanamayan IUGR oluşumundan sorumlu tutulur. Bu tür ilişkiler, yapılacak olan geniş first-trimester CVS çalışmalarında bulunacak olan mozaik sonuçlarla, IUGR bulgularının ortaya konulması sonucunda yapılabilir.

CPM'in, IUGR (73, 75) , Fetal kayıp (9, 166) veya gelişme geriliğiyle görülen doğumlar (64) arasında doğrusal bir ilişki olduğunu düşündürten bazı deliller vardır. Geniş diagnostik CVS serileri, CPM'li gebeliklerin büyük çoğunluğunun, normal bir bebek doğumuyla sonuçlandığı görülür. Trizomi-16 gibi plasentadaki bazı spesifik kromozom anomalilerinin IUGR ile ilişkili olduğu veya normal doğumla sonlandığı görülebilir(75, 125).

Bu çalışmanın ilk bölümünde, 8 IUGR vakasının farklı mozaiklikler gösterdiği bulundu. Bu sonuç IUGR vakalarının % 34.8'inin (8/23) plasental mozaiklikle ilişkili olduğunu gösterir. Bunların içinden 2 vakanın düşük düzeyli tetraploid mozaikliği gösterdiği düşünülür ve hariç tutulursa CPM/IUGR oranı % 26 (6/23) olur. Bu sonuç Wilkins-Haugh ve arkadaşlarının buldukları % 25 (3712) oranıyla denk düşer(170). Fakat. Kalousek ve arkadaşları IUGR vakalarında CPM oranını %35 (6/17) olarak buldular(73) ve bu oranda bu çalışmanın sonuçlarına yakındır.

Kalousek ve arkadaşları CVS'lerde , CPM gösteren 34 hastayı çalıştılar(73). Doğum sonrası yapılan plasental analizlerde aynı mozaiklikleri sadece 17 vakada yani yarısında gördüler. Araştırmacı, CVS ile yapılan çalışmalarda daha yüksek oranda anormal hücre hattı

olabileceğini öne sürer. Mozaiklik gösteren 17 hastanın term plasentada teyid edilen 6 tanesinin gelişme geriliği ile doğduğu ve bir tanesinin ölümle sonuçlandığı, geri kalanların (10 vaka) normal sürelerinde ve normal ağırlıkta doğduklarını belirtilir.

Wilkins-Haugh ve arkadaşları açıklanamayan IUGR, normal karyotipli 12 yenidoğanın ve 24 gelişme gösteren yenidoğanın plasentalarının karyotiplerini analiz ettiler(170). IUGR vakalarının %25'inde (3/12) plasental mozaiklik bulunurken kontrol grubundada %8.3 (2/24) oranında plasental mozaiklik gösterdiler.

Çalışmanın üçüncü kısmında trizomiler 7, 16, 18 ve 21 için IUGR vakalarının plasentalarında yapılan analizlerde plasental mozaiklik %14.7 (5734) olarak bulundu. Bu oran, diğer çalışmalarda bulunan %0.04-1.8 oranlarından oldukça yüksektir (64, 94, 108, 123, 150, 179). Bu düşük oranlar first-trimester gebeliklere aittir. Bu çalışmanın oranları aynı zamanda Artan ve arkadaşlarının term plasentalara ait %4.8'lik oranındanda yüksektir(4). Fakat gözden uzak tutulmaması gereken husus, çalışmamızda kullanılan tüm vakaların IUGR olarak seçilmiş olmasıdır. Bu yüzden plasental mozaiklik oranının yüksek olarak bulunması normal kabul edilebilir. Eğer seçilmemiş vakalar olsaydı diğer araştırma gruplarının oranlarına yakın olacağı düşünülebilir.

CPM gösteren bazı gebelikler, ağır IUGR veya hatta intrauterin ölüm gösterirken (2, 127, 176) bazıları normal bebek doğumları ile sonuçlandı(27, 108, 159). Bu farklılıkları uniparental dizomi'nin etkileri şeklinde açıklamak mümkün olabilir.

Extraembriyonik dokularla sınırlı kalmış sitogenetik anomalilerin değişik doğum olaylarına neden olmasının en az iki ayrı mekanizmayla ilişkili olduğu sanılır :

- 1- Anormal hücrelerin sayısının yüksek olmasından dolayı plasental fonksiyon üzerinde direkt etkileri; anormal hücre hattı normal bir gebelikte mitotik hatayı arttırabilir yada, normal hücre hattı, trizomik zigotun erken bir oluşum döneminde ayrılamayan kromozomlardan (non-disjunction) birinin kaybolmasıyla oluşur, trizomik hücre popülasyonu ayrılarak extraembriyonik hücre hatlarını meydana getirir.
- 2-Trizomik bir zigotan uniparental dizomili diploid bir fetüs'ün oluşumu, normal bir gametten kaynaklanan kromozom kaybı yoluyla oluşur.

#### *Prenatal tanıda interfaz-FISH'in güvenilirliği :*

FISH tekniği, embriyonik blastomerlerin (46, 113), maternal sirkülasyondan elde edilen fetal hücrelerin (5), uncultured koryonik hücrelerin (11) ve uncultured amniyositlerin (31) analizleri de dahil olmak üzere pek çok kromozomal anomalinin prenatal tanısında kullanılabilir.

Dual-colour FISH, polispermik embriyolar (18) ve normal olarak fertilize olmuş preimplantasyon embriyoların (46) kromozom anomalilerinin incelenmesinde kullanılabilir. Ayrıca multi-colour FISH, Handyside ve Delhanty tarafından erken insan embriyolarının kromozom sayılarının araştırılmasında kullanıldı(45). Bu teknik, sitogenetik incelemeler için gerekli olan uygun metafaz kromozomlarının yeterli olmadığı gibi durumlarda blastomerlerin analizi için idealdir.

Divane ve arkadaşları 13 ve 21. Kromozomların problemlerini kullanarak uncultured amniyotik hücreler ve maternal sirkülasyondan elde edilen fetal hücrelerin analizi için multi-colour FISH'i kullandıklarını rapor ettiler(31).

Uncultured amniyositlerdeki aneuploidilerin tanısı için yapılan klasik sitogenetik ve FISH çalışmalarının kıyaslanması konusundaki ilk büyük çalışma 1992'de Klinger ve arkadaşları tarafından yayınlandı(80). Klingerin grubu 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarının spesifik alt bölgelerinden elde edilmiş kozmid problemleri kullandılar. Bu problemlerle 526 vaka incelendi. Hibridize olan hücrelerin %90'ının iki sinyalle dizomik olduğu görüldü. Kullanılan 5 prob birlikte hibridize edildiğinde hücrelerin %50'sinden fazlası her prob için iki sinyal verdi ve dizomik olarak kabul edildi.

Trizomik vakalar dizomiklerden rahatça ayrılabilir. Sitogenetik olarak doğrulanan trizomik vakalarda trizomik hücrelerin verdiği 3 sinyal oranı %42-88'dir.

Ward ve arkadaşları, kromozom 13, 18, 21, X ve Y problemlerini kullanarak 4500 uncultured amniyosit örneğini analiz ettiler ve oldukça ilgi çekici sonuçlar elde ettiler(167). Kan kontaminasyonu sonucu %2.3, yetersiz amniyotik sıvı sonucu %1.5 vakayı çıkardıktan sonra vakaların %90.2'sinden informatif sonuçlar aldılar. 3782 vakanın 108'i anormal olarak bulundu ve 107 tanesi sitogenetikle teyid edildi. Otozomal trizomiler için yanlış pozitiflik yoktu ve otozomal etkinlik %92.5 olarak bulundu. Maternal hücre kontaminasyonu, yetersiz nükleus sayısı ve hibridizasyon, hücre preparasyonu gibi teknik problemlerle karşılaşıldı. Ward ve arkadaşları vaka sayısını 10.000'in üzerine çıkardılar ve sitogenetik sonuçlarla yapılan kıyaslamada başarıyı %99.9'a yükselttiler.

Spathas ve arkadaşları uncultured amniyositlerde 500 vaka çalıştılar ve sitogenetik sonuçlarla kıyasladıklarında trizomi-21'i 7/7 doğru olarak sonuçlandırdılar(154).

Bu çalışmada, klasik sitogenetik analiz sonuçlarıyla interfaz-FISH sonuçları  $X^2$  testi ile kıyaslandı farklılıklar ortaya konulmaya çalışıldı (tablo 12). 8 vakanın 2 tanesinde sitogenetik ve FISH sonuçları arasında önemli bir fark olduğu görüldü (vaka 7 ve 19). Buna karşılık vaka 7'nin sitogenetik ve interfaz-FISH sonuçları çok benzerdir ve D16Z2 probunun hibridizasyon etkisi, preparatların eski olmasından dolayı yetersiz kaldı (tablo 6 ve 7.5).

Bundan dolayı, hücrelerin %7.1'i sadece 1 sinyal gösterdi ki bu oran diğer vakalarda görülen 1 sinyalden oldukça yüksektir. Vaka 6'nın sitogenetik ve interfaz-FISH sonuçları arasında önemli bir fark olmadığı görülür (tablo 12).

Yüksek riskli gebeliklerde, hızlı aneuploidi tanısı için interfaz-FISH'in kullanımı numunenin alınmasından 48 saat içinde sonuç verilebilmesi bakımından çok değerlidir (156). Triploidi gibi sağlık açısından önemli aneuploidilerin hızlı tanısı hastanın geleceği bakımından çok önemlidir. FISH sonuçları aneuploidilerin hızlı tanısı açısından çok yararlı sonuçlar verebilir fakat aneuploidiler klasik sitogenetikle tanı konulabilen tüm anomalilerin ancak %50-70'ini oluştururlar (141).

FISH'in tamamen bağımsız bir teknik olarak kullanılamayacağı düşünülür(130, 167). FISH, hızlı olmak, sonuçları kültüre gerek olmadan alınması, maliyet azlığı ve MCC'nin eliminasyonu gibi pek çok avantajlarına karşılık, interfaz-FISH sonuçları mutlaka klasik sitogenetik sonuçlarla teyid edilmelidir. İnterfaz-FISH, daha önceden tanısı konulmamış kromozomal anomalilerin, yalancı negatiflik veya yeterli olmayan sonuçları yüzünden annenin endişesini artırır.

İnterfaz-FISH'le mozaiklik çalışmaları, mozaiklik oranı düşük olduğunda bazı problemleri birlikte getirir. Vaka 7'nin FISH sonuçları ele alındığında, A, P<sub>2</sub>, 3, 4, 5 ve 6 kullanılarak mozaik yada non-mozaik kararını vermek zordur. Trizomik hücrelerin oranı, diploid hücrelerle kıyaslandığında oldukça düşüktür ve bu vakanın non-mozaik olduğu düşünülür. Buna karşılık Koryon ve P<sub>1</sub> sonuçları kullanılırsa trizomik ve diploid hücrelerin oranının birbirine çok yakın olmasından dolayı vakanın mozaik olduğu sonucu çıkarılır. Aynı sonuçlar vaka 8, 17 ve 18 için de çıkarılabilir.

Yukarıda tartışılan vakaların sitogenetik analizleri de düşük düzeyli mozaiklik karakterlerini gösterdi. Bununla beraber, interfaz-FISH sonuçları için yapılan yorumları sitogenetik bulgular için söylemek zordur.

Bir vaka'nın mozaik olduğunu söyleyebilmek için 3 sinyal alınan hücre sayısının toplam hücrelerin %23.4'ünden fazla olması gerekir(47). İnterfaz-FISH kullanılarak elde edilen bu çalışmanın sonuçları, vaka 7, 8, 17 ve 18 için %23.4'den genellikle daha düşüktür. Bu yüzden bu vakalar mozaik olarak tanımlanamazlar.

Yukarıda tartışılan test sonuçlarından sonra genel olarak şunlar söylenebilir:

1-FISH, klasik sitogenetikle yapılabildenden daha fazla hücreyi hızlı bir şekilde analiz edebildiğinden, plasental dokulardan elde edilen interfaz hücrelerinde kromozomal aneuploidilerin ortaya konulmasında çabuk sonuç verir. Doku kültürü ihtiyacını ortadan

kaldırmasıyla interfaz-FISH, klasik sitogenetik tekniklerin kullanılması sırasında kaybedilen örneklerde başarıyla uygulanabilir ve kromozom yapısı hakkında yeterli bilgi verir.

2- FISH, CVS örneklerinde trizomi-18 ve trizomi-21'in varlığını tahmin etmede başarılı bir şekilde kullanıldı. Bu, kültür ihtiyacını ve tam kromozom analizini ortadan kaldırarak hızlı bir şekilde tanı koymayı sağladığı gibi çok daha fazla hücre analizinin yapılmasına fırsat verir.

Gelecekte, Kromozomal aneuploidilerin FISH kullanılarak yapılması, fetal anormallikler açısından yüksek riske sahip gebelerden alınacak çeşitli örneklerin taranması hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilecektir. İnterfazFISH için gelecek ümit vericidir. Pek çok laboratuvar ticari proplar veya kendi laboratuvarlarında geliştirdikleri propları kullanarak FISH tekniklerini oluşturmayı denemektedirler. Şu durumda 5 renkli interfaz-FISH, sayısı giderek artan laboratuvarlarda kullanılmaktadır ve muhtemel renk kombinasyonlarının sayısı artmaya devam edecektir (31, 110, 132). Ayrıca, metafaz kromozomlarında birlikte kullanılan 27 farklı DNA probunun renk ayırımı ve deteksiyonu için epifluorescence filtreler ve bilgisayar programları geliştirilmekte, multi-colour FISH ile karyotip analizinin olabirliği gösterilmeye çalışılmaktadır (155).

## ÖZET

Kromozomal mozaiklik, kişide iki ya da daha fazla, karyotipik olarak farklı hücre hatlarının ortaya çıkmasıdır. Bu, genel mozaiklik olabildiği gibi plasenta veya embriyo ile sınırlı şekilde de görülebilir. Confined plasental mosaicism (CPM), intrauterine growth retardation (IUGR), fetal kayıplar veya gelişmemiş bebek doğumlarıyla ilgili olabilir. CPM'nin etkisi, mozaikliğin seviyesi ve CPM'e neden olan kromozomla ilgilidir.

Bu çalışmanın ilk bölümünde, doku kültürü teknikleriyle elde edilen klasik sitogenetik sonuçlar ve interfaz-FISH sonuçları kullanılarak, plasental mozaiklik ile IUGR arasındaki ilişki araştırıldı. Bu tekniklerle elde edilen sonuçların karşılaştırılmasıyla, interfaz-FISH'in kromozomal aneuploidilerin araştırılmasındaki kullanılabilirliği tartışıldı.

İkinci bölümde, trizomi-18 ve trizomi-21, uncultured Chorionic Villus Sampling (CVS) hücreleri kullanılarak dual-colour interfaz-FISH tekniğiyle tarandı. Bu çalışmanın amacı, uncultured CVS'de dual-colour FISH'in kromozomal aneuploidilerin prenatal tanı için hızlı bir şekilde ortaya konulup konulamayacağını araştırılmasıdır.

Üçüncü bölümde ise çok yaygın olarak rastlanıldığı bildirilen trizomi-7, trizomi-16, trizomi-18 ve trizomi 21 gibi kromozomal aneuploidiler dual-colour interfaz-FISH tekniği kullanılarak IUGR gösteren vakaların plasental dokularında araştırıldı.

Çalışmanın ilk bölümünde 23'ü açıklanamayan IUGR vakasına ait toplam 29 plasenta kullanıldı. Bu plasentalardan alınan amniyon, Koryon 6 plasental bölge örneğinden doku kültürü ile elde edilen klasik sitogenetik sonuçları değerlendirildi ve 17 vakanın kromozomal açıdan normal ve 12 vakanın bazı sayısal anomaliler gösterdiği bulundu. IUGR gösteren vakaların 8'inde kromozom sayısı açısından çeşitli mozaiklikler gözlemlendi. Bir vaka MCC'den dolayı mozaik olarak değerlendirilmedi. Bu grupta plasental mozaiklik oranının %34.8 (8/23) olduğu görüldü. Eğer tetraploidi mozaikliği görülen 2 vaka bu gruptan çıkarılırsa mozaiklik oranı %26 (6/23) olarak değerlendirilebilir. Bu anomalili 12 vakadan 3'ü trizomi-21 olarak görüldü. Bunların 2'si saf trizomi-21, diğeri 46,XX/47,XX+21 karyotipli bir mozaiklikti. İki vaka mozaik trizomi-16, 1 vaka mozaik trizomi-5, 1 vaka mozaik trizomi-20 ve 1 vaka saf trizomi-15 olarak ortaya çıktı. Bir sex kromozomu monozomisi mozaikliği 46,XX/45,X karyotipiyle kendini gösterdi. Ayrıca 12 vakanın üçünde poliploidi görüldü. Bunlardan biri saf triploidi (69,XXX), ikisi düşük seviyeli tetraploidi mozaikliği gösterdi. Tetraploidi mozaiklerden birinde 46,XX/92,XXXX karyotipi ve diploid/tetraploid oranı %81/%19 iken diğesinde 46,XY/92,XXYY karyotipi ve diploid/tetraploid oranı %79/%21 olarak tespit edildi.

Her bir vakanın amniyon, koryon ve plasental bölgelerinden elde edilen sitogenetik sonuçlarla ortaya çıkan mozaiklik oranları  $X^2$  testiyle analiz edildi ve bazı önemli farklar bulundu. Paralel olarak, aynı plasental bölgeler kullanılarak elde edilen interfaz-FISH sonuçları da mozaiklik seviyeleri açısından kıyaslandı ve yine bazı önemli farklar elde edildi.

Klasik sitogenetik ve interfaz-FISH sonuçları  $X^2$  testiyle kıyaslandığında, iki tekniğin birbirinden önemli bir farkı olmadığı görüldü. Çok çabuk sonuç alınması gerektiğinde, doku kültürüne gerek kalmadan interfaz-FISH'in klasik sitogenetik analiz yerine sayısal kromozom anomalilerinin araştırılması için kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Çalışmanın ikinci bölümünde, L1.84 (kromozom 18'e spesifik) ve YAC 831B9 (kromozom 21'e spesifik) problemleri, dual-colour interfaz-FISH tekniğiyle 94 CVS'de trizomi-18 ve trizomi-21 taranması amacıyla kullanıldı. Bir vaka trizomi-18, 3 vaka trizomi-21 olarak bulundu. FISH sonuçları daha sonra klasik sitogenetik sonuçlarla karşılaştırıldı ve tüm vakaların her iki teknikle de aynı sonucu verdiği görüldü.

Çalışmanın üçüncü bölümünde, IUGR'lı 34 plasenta en yaygın trizomiler olarak bilinen 7, 16, 18 ve 21'in araştırılması için kullanıldı. İnterfaz-FISH preparatlarının yapılmasında "touch preparation" protokolü ile her bir plasentadan 6 değişik saha biyopsisi kullanıldı. Dual-colour interfaz-FISH deneyleri, digoxigenin işaretli D7Z1 ve biotin işaretli D16Z2 problemleri birlikte, digoxigenin işaretli L1.84 ve biotin işaretli YAC 831B9 problemleri birlikte kullanılarak gerçekleştirildi. Herbir vakanın her bir bölgesinden 100 hücrenin analiziyle her vaka için toplam 600 hücre analiz edildi. Kullanılan 34 vakanın 6'sında sayısal anomali tesbit edildi. Biri saf trizomi-21, 3 mozaik trizomi-18 ve biri mozaik trizomi-21 olarak görüldü. Kromozom 7 ve 6 için herhangi bir anomali bulunmadı. IUGR plasentaları kullanılarak yapılan trizomi 7, 16, 18 ve 21 araştırılması sonucunda plasental mozaiklik oranı %14-7(5/34) olarak bulundu.

## SUMMARY

Chromosomal mosaicism is the presence of two or more karyotypically different cell lines in an individual. It may take the form of generalised mosaicism or may be confined either to the placenta or the embryo. Confined placental mosaicism (CPM) may be associated with intrauterine growth retardation (IUGR), fetal loss or poor perinatal outcome. The adverse influence of CPM depends on its level and the chromosomes which are involved.

In the first part of this study, the relation of IUGR and placental mosaicism was studied using conventional cytogenetic analysis through tissue culture techniques and interphase-FISH technique. The results obtained with these techniques were compared to evaluate the usefulness of interphase-FISH to detect chromosomal aneuploidies. In the second part, trisomies 18 and 21 were detected by dual-colour interphase-FISH on uncultured chorionic villus samples (CVS). The aim of this part of the study was to show that trisomies 18 and 21 can be rapidly detected by dual-colour FISH using uncultured CVS for prenatal diagnosis. In the third part of this project, the presence of some commonly reported chromosome trisomies such as 7, 16, 18 and 21 were studied in IUGR placental tissues, using dual-colour interphase-FISH.

Six placental samples from cases having undergone pre-natal diagnosis (3 of these cases having been previously identified as having chromosome abnormalities), and 23 placental samples from pregnancies complicated by unexplained IUGR (total 29 samples) were used in the first part of the study. Conventional cytogenetic analysis obtained by tissue culture using amnion, chorion and six sites of the placental tissue showed that seventeen cases were chromosomally normal, while the remaining 12 cases had some numerical abnormalities. Eight of twenty-three IUGR cases showed different mosaicism in the first

part of study (this excludes the one case of proven MCC). This means that the rate of placental mosaicism was 34.8% (8/23) in this group (although if the two cases of tetraploidy are excluded this would give a rate of 26% (6/23). Out of these twelve samples, three cases of trisomy 21 were detected, two of which were complete trisomy 21 with 47,XY,+21 karyotypes and the other was mosaic 47,XX,+21/46,XX. Two cases were found to be mosaic trisomy 16. One case showed trisomy 15. Mosaic trisomy 5 was also found in one sample. Another sample showed a mosaicism of trisomy 20. Monosomy for a sex chromosome was found in one sample with a 45,X/46,XX mosaic karyotype. Three of the 12 samples were polyploidies. One of the polyploidies was a pure triploidy (69,XXX), two cases showed low level mosaicism with tetraploidy, having 92,XXXX/46,XX (19% of tetraploid and 81% of diploid cell line) and 92,XXYY/46,XY (21% of tetraploid and 79% of diploid cell line) karyotypes.

The level of mosaicism (obtained by conventional cytogenetic analysis) between different regions of the placenta, amnion and chorion in each sample was analysed using the  $\chi^2$  test and some statistically significant differences were found, but no consistent pattern was evident. On identification of a mosaicism using conventional cytogenetics, the same regions of placenta, amnion and chorion were used to detect abnormalities by interphase-FISH using the relevant probes.

Interphase-FISH and conventional cytogenetic results were compared by using the  $\chi^2$  test in order to show the usefulness of one as opposed to the other. The results showed that there was no significant difference between conventional cytogenetic results and interphase-FISH results, therefore, interphase-FISH technique can be used for the detection of numerical chromosome abnormalities instead of conventional cytogenetic analysis when rapid results are required, and without the necessity for conventional culturing.

94 chorionic villus samples (CVS) were used to detect trisomy 18 and trisomy 21 by dual-colour interphase-FISH using the probes L1.84 (specific for chromosome 18) and YAC 831B9 (specific for chromosome 21) in the second part of the study. One case showed a trisomy 18 and another three cases showed trisomy 21. The FISH results were later compared with conventional cytogenetic results obtained by the tissue culture techniques, and no discrepancies were found

In the third part of the study, 34 placental samples with IUGR were used to detect the most common autosomal trisomies 7, 16, 18 and 21. Six different regions from each placental sample were used to prepare the interphase-FISH slides following the development of the touch preparation protocol. Dual-colour interphase-FISH experiments were accomplished using the probes digoxigenin-labelled D7Z1 with biotin-labelled D16Z2 and digoxigenin-labelled L1.84 with biotin-labelled YAC 831B9. A total of 600 interphase cells from each sample (100 cells from each region) were analysed. Six of these 34 samples showed chromosome abnormalities, one complete trisomy 21, 3 trisomy 18 mosaics and 2 trisomy 21 mosaics. No chromosomal aneuploidy for chromosomes 7 and 16 was found. Placental mosaicism was found in 5/34 (14.7%) of the IUGR samples for detection of trisomies 7, 16 18 and 21 in the third part of this study.

## KAYNAKLAR

- 1-Antonarakis,S.E., Blouin,J-L., Maher,J. et al. (1993).** Maternal uniparental disomy for chromosome14, due to loss of a chromosome 14 from somatic cells with t(13;14) trisomy 14, Am. J. Hum. Genet., 52, 1145-1152.
- 2-Appelman,Z., Rosensaft,J., Chemke,J., Caspi,B., Astikenazi,H., Mogilner,M.B. (1991).** Trisomy 9 confined to the placenta: Prenatal diagnosis and neonatal follow-up., Am. J. Med Genet., 40, 464-466.
- 3-Arnoldus,E.P.J., Wiegant.J., Noordermeer,I.A., Weesels,J.W., Bewerstock,G.C., Grosveld,G., van der Ploeg,M. and Raap,A.K. (1990).** Detection of the philadelphia chromosome in interphase nuclei. Cytogenetics and cell Genetics, 54, 108-111.
- 4-Artan,S., Basaran,N., Hassa,H., Ozalp,S., Sener,T., Sayli,B.S., Cengiz,C., Ozdemir,M., Durak,T., Dolen,I., Ozgunen,T., Tuna,M. (1995).** Confined placental mosaicism in term placentae: analysis of 125 cases., Prenat. Diagn., 15, 1135-1142.
- 5-Bianchi,D.W., Mahr,A., Zickwolf, G.K., Houseal,T.W., Flint,A.F., Klinger,K.W. (1992).** Detection of fetal cells with 47,XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood., Hum. Genet., 90, 368-370.
- 6-Blennow,E., Telenius,H., Larsson,C., Devos,D., Bajalica,S., Ponder,B.A.J., Nordenskjold,M. (1992).** Complete characterization of a large marker chromosome by reverse and forward chromosome painting., Human Genetics., 90, 371-374.
- 7-Boue,J., Boue,A., Deluchat,C., Perraudin,N., Yvert,F. (1975).** Identification of C trisomies in human abortuses., J. Med. Genet., 12, 265-268.
- 8-Breed,A.S.P.M., Mantingh,A., Beekhuis,J.R., Kloosterman,M.D., Ten Bolsher,H., Anders,G.J.P.A. (1990).** The predictive value of cytogenetic diagnosis after CVS : 1500 cases., Prenat. Diagn., 10, 101-110.

- 9-Breed,A.S.P.M., Mantingh,A., Vosters,R., Beekhuis,J.R., van Lith,J.M.M., Anders,G.J.P.A. (1991).** Follow-up and pregnancy outcome after a diagnosis of mosaicism in CVS., *Prenat. Diagn.*, 11, 577-580.
- 10-Bryndorf,T., Christensen,B., Xiang,Y., Lind,A.M., Philip,J. (1993).** Rapid detection of numerical aberrations chromosomes 13, 18 and 21 in chorionic villus cells., *Prenat. Diagn.*, 13, 815-823.
- 11-Bryndorf,T., Christensen,B., Xiang,Y., Philip,J., Yokobata,K., Bui,N., Gaiser,C. (1994).** Fluorescence *in-situ* hybridisation with a chromosome 21-specific cosmid contig: 1-day detection of trisomy 21 in uncultured mesenchymal chorionic villus cell. *Prenat. Diagn.*, 14, 87-96.
- 12-Bui,T,-H., Iselius,L., Lindsten,J. (1984).** European collaborative study on prenatal diagnosis: mosaicism, pseudomosaicism and single abnormal cells in amniotic fluid cell cultures, *Prenat. Diagn.*, 4, 145-162.
- 13-Burke,D.T., Carle,G.F. and Olson,M.V. (1987).** Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors., *Science*,236,806-812.
- 14-Cacheux,V., Tachdjian,G., Druart,L., Oury,J.F., Serero,S., Blot,P., Nessmann,C. (1994).** Evaluation of X, Y, 18, and 13/21 alpha-satellite DNA probes for interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by fluorescence *in-situ* hybridization, *Prenat. Diagn.*, 14, 79-86.
- 15-Carter,N.P., Ferguson-Smith,M.A., Perryman,M.T., Telenius,H., Pelmeur,A.H., Leversha,M.A., Glancy,M.T., Wood,S.L., Cook,K., Dyson,H.M., Ferguson-Smith,M.E., Willat,L.R. (1992).** Reverse chromosome painting: A method for a rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics., *J. Med. Genet.*, 29, 299-307.

- 16-Choo,K.H., Vissel,B., Earle,E. (1989).** Evolution of a  $\alpha$ -satellite DNA on human acrocentric chromosomes, *Genomics*, 5, 332-344.
- 17-Christensen,B., Bryndorf,T., Philip,J., Lundsten,C., Hansen,W., (1992).** Rapid prenatal diagnosis of trisomy 18 and triploidy in interphase nuclei of uncultured amniocytes by non-radioactive *in-situ* hybridisation., *Prenat. Diagn.*, 12, 241-250.
- 18-Coonen,E., Harper,J.C., Ramaekers,F.C.S., Delhanty,J.D.A., Hopman,A.H.N., Garaedts,J.P.M., Handyside,A.M. (1994).** Presence of chromosomal mosaicism in abnormal preimplantation embryos detected by fluorescence *in-situ* hybridisation., *Hum. Genet.*, 94, 609-615.
- 19-Covles,T.A., Elder,F.F.B., Taylor,S. (1995).** Identification of abnormal chromosomal complement in formalin-fixed, paraffin-embedded placental tissue., *Prenat. Diagn.*, 15,21-26.
- 20-Crane,J.P., and Cheung,S.W. (1988).** An embryogenic model to explain cytogenetic inconsistencies observed in chorionic villus versus fetal tissue, *Prenat. Diagn.*, 8, 119-129.
- 21-Cremer,T., Landegent,J., Bruckner,A., Scholl,H.P., Schardin,M., Hager,H.D., Devilee,P., Pearson,P., van der Ploeg,M. (1986).** Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive *in-situ* hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84, *Hum. Genet.*, 74, 346-352.
- 22-Cremer,T., Lichter,P., Borden,J., Ward,D.C., Manuelidis,L. (1988).** Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by *in-situ* hybridisation using chromosome-specific library probes, *Hum. Genet.*, 80,235-246.
- 23-Cremer,T., Popp,S., Emmerich,P., Lichter,P., Cremer,C. (1990).** Rapid metaphase and interphase detection of radiation-induced chromosome aberrations in

human lymphocytes by chromosomal suppression *in-situ* hybridisation, Cytometry, 11:110-118.

**24-Dauwerse,J.G., Kievits,T., Beverstock,G.C., van der Keur,,D., Smit,E., Wessels,H.W., Hagemeyer,A., Pearson,P.L., van Omen,G.-J.B. and Breuning,M.H. (1990).** Rapid detection of chromosome 16 inversion in acute nonlymphocytic leukemia, subtype M4: regional localisation of the breakpoint in 16p., Cytogenetics and Cell Genetics, 53, 126-128.

**25-Dauwerse,J.G., Jumlet,E.A., Wessels,J.W., Saris,J.J., Beverstpcck,J.C., van Ommen,G.J.B., Breuning,M.H. (1992).** Extensive cross-homology between the long and short arm of chromosome 16 may explain leukemic inversions and translocations., Blood, 79, 1292-1304.

**26-Delhanty,J.D.A., Griffin,D.K., Handyside,A.H., Harper,J.C., Atkinson,G.H.G., Pieters,M.H.E.C., Winston,R.M.L. (1993).** Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent *in-situ* hybridisation., Hum. Mol. Genet., 2, 1183-1185.

**27-Delozier-Blanchet,C.D., Engel,E., Extermann,P., Pastori,B. (1988).** Trisomy 7 in chorionic villi: follow-up studies of pregnancy, normal child, and placental clonal anomalies., Prenat. Diagn., 8, 281-286.

**28-Deng,HX., Yoshiura,KH., Dirks,R.W., Harada,N.,Hirota,T., Tsukamoto, K.,Jinno,Y.,Niikawa,N.(1992).** Chromosome-band specific painting: Chromosome *in-situ* suppression hybridisation using PCR products from a microdissected chromosome band as a probe pool. Human Genet., 89, 13-17.

**29-Devilee,P., Slagboom,P., Cornelisse,C.J., Pearson,P.L. (1986a).** Sequence heterogeneity within the human alphoid repetitive DNA family., Nucleic Acids Res., 14: 2059-2073.

**30-Devilee,P., Cremer,T., Slagboom,P., Bakker E., Scholl,H.P., Hager,H.D., Stevenson,A.F.G., Cornelisse,C.J., Pearson,P.L. (1986b).** Two subjects of human alphoid repetitive DNA show distinct preferential localization in the pericentric regions of chromosomes 13, 18, and 21., *Cytogenet. Cell Genet.*, 41, 193-201.

**31-Divane,A., Carter,N.P., Spathas,D.H., Ferguson-Smith,M.A. (1994).** Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy from uncultured amniotic fluid cells using five-colour *in-situ* hybridisation., *Prenat. Diagn.*, 14, 1061-1069.

**32-Dorfmann,A.D., Perszyk,J., Robinson,P., Black,S.H., Schulman,J.D. (1992).** Rare non-mosaic trisomies in chorionic villus tissue not confirmed at amniocentesis, *Prenat. Diagn.*, 12, 899-902.

**33-Engel,E., Delozier-Blanchet,C.D. (1991).** Uniparental disomy, isodisomy, and imprinting : probable effects in man and strategies for their detection. *Am. J. Med. Genet.*, 40, 432-439.

**34-Fraccaro,M., Simoni,G., Brambati,B. (1985).** *First Trimester Fetal Diagnosis*, Berlin: Spring-Verlag.

**35-Fryburg,J.S., DiMaio,M.S., Mahoney,M.J. (1992).** Postnatal placental confirmation of trisomy 2 and 16 detected at chorionic villus sampling: a possible association with intrauterine growth retardation and elevated maternal serum alpha-fetoprotein., *Prenat. Diagn.*, 12, 157-162.

**36-Gall,J.G., Pardue,M. (1969).** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparation., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 63, 378-383.

**37-Garber,A., Carlson,D., Schreck,R. et al. (1994).** Prenatal diagnosis and dysmorphic findings in mosaic trisomy 16., *Prenat. Diagn.*, 14, 259-266.

**38-Gardner,R.J.M., Sutherland,G.R. (1989).** *Chromosome abnormalities and genetic counseling.*, Oxford University press.

- 39-Gilbertson,N.J., Taylor,J.W., Kovar,I.Z. (1990).** Mosaic trisomy 16 in a live newborn infant., *Arch. Dis. Child.*, 65, 388-389.
- 40-Gould,C.P., Waters,J.J., Mercer,A.M., Challinor,P.R., Hill,S.M., Johnson,R.A., Simpson,P.J., Delhanty,J., Hulten,M.A. (1992).** Limitations of whole chromosome FISH analysis in clinical cytogenetics: Failure of detection of translocated proterminal segments shorter than 2.5 Mb., *Eur. Soc. Hum. Genet., Denmark*,78 (abstract).
- 41-Greally,J.M., Boone,L.Y., Cummins,J.H., Lenkey,S.G., Wenger,S.L., Fischer,D.R., Paul,R.H., Hughes,H.B., Neiswanger,K., Steele,M.W. (1990).** Mosaic trisomy 16 in a minimally dysmorphic child: clinical, cytogenetic and molecular studies., *Am. J. Med. Genet.*, 47, A218 (abstract).
- 42-Griffin,D.K., Abruzzo,M.A., Millie,E.A., Sheean,L.A., Feingold,E., Sherman,S.L., Hassold,T.J. (1995).** Non-disjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age., *Hum. Mol. Genet.*, 4, 2227-2232.
- 43-Gueneri,S., Fortuna,R., Romitti, L., Bettio,D., Simoni,G. (1989).** Seven cases of trisomy 3 mosaicism in chorionic villi., *Prenat. Diagn.*, 9, 691-695. **Hall,J.G. (1990).** Genomic imprinting : review and relevance to human diseases., *Am. J.Hum. Genet.*, 46, 857-873.
- 44-Handyside,A.H., Delhanty,J.D.A. (1993).** Cleavage stage biopsy of human embryos and diagnosis of X-linked recessive disease. In: Edwards,R.G. (ed). *Preimplantation Diagnosis of Human Genetic Disease.*, Cambridge: Cambridge University Press, 239-270.
- 45-Harper,J.C., Coonen,E., Handyside,A.H., Winston,R.M.L., Hopman,A., Delhanty,J.D.A. (1995).** Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal , monospermic preimplantation human embryos, *Prenat. Diagn.*, 15, 41-49.

- 46-Harrison,K.J., Barret,I.J., Lomax,B.L., Kuchinka,B.D., Kalousek,D.K. (1993).** Detection of confined placental mosaicism in trisomy 18 conceptions using interphase cytogenetic analysis., *Hum. Genet.*, 92, 353-358.
- 47-Harrison,K.B., Eisenger,K., Yeboa, K-A. et al. (1994).** Maternal uniparental disomy of chromosome 2 in a baby with trisomy 2 mosaicism in amniotic fluid culture., *Am. J. Hum. Genet.*, 55, A 106.
- 48-Hashish,A.F., Monk,N.A., Lovel-Smith,M.P., Bardwell,L.M., Fiddes,T.M., Gardner,R.S. (1989).** Trisomy 16 detected at chorionic villus sampling.,*Prenat. Diagn.*, 9, 427-432.
- 49-Hassold,T.J., Jacobs,P.A. (1984).** Trisomy in man., *Annual Rev. Genet.*, 18, 69-97.
- 50-Hassold,T.J. (1986).** Chromosome abnormalities in human reproductive wastage., *Trends in Genetics.*, 2, 105-110.
- 51-Hoeltke,H.J., Seible,R., Burg,J., Muehlegger,K., Kessler,C. (1990).** Non-radioactive labelling and detection of nucleic acids : 11. Optimatisation of digoxigenin., *Biol. Chemist. Hoope-Seyler.*, 371, 929-938.
- 52-Hogge,W.A., Schonberg,S.A., Golbus,M.S. (1986).** Chorionic villus sampling: experience of the first 1000 cases., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154, 1249-1252.
- 53-Hoppman,A.H.N., Raap,A.K., Landegent,J.E. et al. (1988).** Non-radioactive *in-situ* hybridisation. In: van Leeuwen, Buijs, Pool and Pach (eds). *Molecular Neuroanatomy*, Elsevier Science Publishers B.V. (Medical division), 43-68.
- 54-Hoppman,A.H.N., Ramaekers,F.C.S., Vooijs,G.P. (1989).** Interphase cytogenetics of solid tumours. In: Polak, McGee (eds). *In situ hybridisation*, Oxford: Oxford University Press.
- 55-Hsu,L.Y., Perlis,T.E. (1984).** United States survey on chromosome mosaicism and pseudomosaicism in prenatal diagnosis., *Prenat. Diagn.*, 4, 97-130.

- 56-Hsu,L.Y., Kaffe,S., Jenkins,E.C., Alonso,L., Benn,P.A., David,K., Hirschorn,K., Lieber,E., Shanske,A., Shapiro,L.R., Schutta,E., Warburton,D. (1992).** Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies., *Prenat. Diagn.*, 12, 555-573.
- 57-Hulsebos,T., Schonk,D., Van Dalen,I., Coervinkel,D.M., Schepens,J., Ropers,J., Wieringa,B. (1988).** Isolation and characterization of alphoid DNA sequences specific for the pericentric regions of chromosomes 4, 5, 9, and 19., *Cyto. Cell Genet.*, 47 : 144-148.
- 58-Hulten,M.A., Gould,C.P., Goldman,A.S.H., Waters,J.J. (1991).** Chromosome *in-situ* hybridisation in clinical cytogenetics., *J. Med. Genet.*, 28, 577-582.
- 59-Hunt,P., Le Maire,R., Embury,P., Sheean,L., Mroz,K. (1995).** Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: Monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis., *Hum. Mol. Genet.*, 4, 2007-2012.
- 60-Iffy,L., Kaminetzky,H.A. (1981).** Principles and practice of obstetrics and perinatology. Wiley Medical Publication. pp: 181-243.
- 61-Jacobs,P., Hassold,T. (1987).** Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirths. In: Vogel,F., Sperling,K. (eds). *Human genetics*. Springer,Berlin,Pp 233-244.
- 62-Jalal,S., Lindor,N.M., Bonde,D., Karnes,P. (1992).** Trisomy 16 mosaicism in a six month old infant., *Am. J. Med Genet.*, 51, A290 (abstract).
- 63-John,H., Birnstiel,M.L. Jones,K.N. (1969).** RNA-DNA hybrids at the cytological level., *Nature*, 223, 582-587.

- 64-Johnson,A., Wapner,R.J., Davis,G.H., Jackson,L.G. (1990). Mosaicism in chorionic villus sampling : an association with poor perinatal outcome., *Obstet. Gynecol.*, 75, 573-577.
- 65-Joos,S., Scherthan,H., Speicher,M.R., Schlegel,J., Cremer,T., Lichter,P. (1993). Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumour DNA as probe., *Hum. Genet.*, 90, 584-589.
- 66-Jorgensen,A.L., Jones,C., Bostock,C.J., Bak,A.L. (1987). Different subfamilies of alphoid repetitive DNA are present on the human and chimpanzee homologous chromosomes 21 and 22., *EMBO J.*,6, 1691-1696.
- 67-Kajii,T., Ohama,K., Niikawa,N., Ferrier,A., Avirchan,S. (1973). Banding analysis of abnormal karyotypes in spontaneous abortion., *Am. J. Hum. Genet.*, 25, 539-547.
- 68-Kalousek,D.K., Dill,F.J. (1983). Chromosome mosaicism confined to the placenta in human conceptions., *Science*, 221, 665-667.
- 69-Kalousek,D.K. (1985). Mosaicism confined to the chorionic tissue in human gestations. In : Fraccaro,M. et al.(Eds)., *First-trimester fetal diagnosis*, Berlin : Springer-Verlag, *Hum. Genet.*, 130-135.
- 70-Kalousek,D.K., (1988). The role of confined chromosome mosaicism in fetal function and human development., *Growth*, 4, 1-3.
- 71-Kalousek,D.K., Barrett,I.J., McGillivray,B.C. (1989). Placental mosaicism and intrauterine survival of trisomies 13 and 18., *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 338-343.
- 72-Kalousek,D.K. (1990). Confined placental mosaicism., *Pediatr. Pathol.*, 10, 69-77.
- 73-Kalousek,D.K.,Howard-Peebles,P.N., Olson,S.B., Barret,I.J., Dorfmann,A., Black,S.H., Schulman,J.D., Wilson,R.D. (1991). Confirmation of CVS mosaicism in

term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism., *Prenat. Diagn.*, 11, 743-750.

**74-Kalousek,D.K., Barret,I., Gartner,A. (1992).** Spontaneous abortion and confined chromosomal mosaicism., *Hum. Genet.*, 88, 642-646.

**75-Kalousek,D.K., Langlois,S., Barrett,I.J. Yam,I., Wilson,D.R., Howard-Peebles,P.N., Johnson,M.P., Giorgiutti,E. (1993).** Uniparental disomy for chromosome 16 in humans., *Am. J. Hum. Genet.*, 52, 8-16.

**76-Kalousek,D.K., Barrett,I. (1994).** Genomic imprinting related to prenatal diagnosis., *Prenat. Diagn.*, 14, 1191-1201.

**77-Kennerknecht,I., Terinde,R. (1990).** Intrauterine growth retardation associated with chromosomal aneuploidy confined to the placenta. Three observations: triple trisomy 6, 21, 22; trisomy 16; and trisomy 18., *Prenat. Diagn.*, 10, 539-544.

**78-Kievits,T., Dauwerse,J.G., Wiegant,J., Devilee,P., Breuning,M.H., Cornelisse,C.J., van Ommen,G.J.B., Person,P.L. (1990).** Rapid subchromosomal localization of cosmids by non-radioactive *in-situ* hybridisation., *Cytogenet. Cell Genet.*, 53, 134-136.

**79-Kirkinen,P., Jouppila,P., Herva,R. (1981).** Clinical features of pregnancies with fatal fetal abnormality., *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 19, 367-374.

**80-Klinger,K., Landes,G., Shook,D., Harvey,R., Lopez,L., Locker,P., Lerner,T., Osathanondh,R., Leverone,B., Houseal,T., Pavelka,K., Dackowski,W. (1992).** Rapid detection of chromosome aneuploidies in cultured amniocytes by using fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH)., *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 55-65.

**81-Klopper,A. (1970).** The reproductive hormones., *Science*, 6, 44.

**82-Kuliev,A.M., Kukhareno,V.I., Grinberg,K.N., Vasileysky, S.S., Terskikh,V.V., Stepanova,L.G. (1973).** Morphological, autoradiographic, immunochemical and

cytochemical investigation of a cell strain with trisomy 7 from a spontaneous abortus., Humangenetik, 17, 285-296.

**83-Kuo,W.-L., Tenjin,H., Seagraves,R., Pinkel,D., Golbus,M.S., Gray,J. (1991).** Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21 by fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH) to interphase and metaphase amniocytes., Am. J. Hum. Genet., 49, 112-119.

**84-Kuwano,A., Ledbetter,S.A., Dobyns,W.B., Emanuel,B.S., Ledbetter,D.H. (1991).** Detection of deletion and cryptic translocations in Miller-Diker syndrome by *in-situ* hybridisation., Am. J. Hum. Genet., 49, 707-714.

**85-Landegent, J.E., Jansen de Wal,N., Baan,R.A.A., Hoeijmakers,J.H.J., Van der Ploeg,M. (1984).** 2-acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridochemical detection of specific nucleic acid sequences., Exp. Cell Res., 153, 61-72.

**86-Langer,P.R., Waldrop,A.A., Ward,D.C. (1981).** Enzymatic synthesis of biotin-labelled polynucleotides : novel nucleic acid affinity probes., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6633-6637.

**87-Lawrence,J.B., Singer,R.H. (1985).** Quantitative analysis of *in-situ* hybridisation methods for the detection of actin gene expression., Nucleic Acid Res., 13, 1777-1799.

**88-Ledbetter,D.H., Martin,A.O., Verlinsky,Y., Pergament,E., Jackson,L., Yang-Feng,T., Schonberg,S.A., Gilbert,F., Zachary,J.M., Barr,M., Copeland,K.L., DiMaio,M.S., Fine,B., Rosinsky,B., Schuette,J., de la Cruz,F.F., Desnick,R.J., Elias,S., Golbus,M.S., Goldberg,J.D., Lubs,H.A., Mahoney,M.J., Rhoads,G.G., Simpson,J.L., Schlesselman,S.E. (1990).** Cytogenetic results of chorionic villus sampling : high success rate and diagnostic accuracy in the United States collaborative study., Am. J. Obstet. Gynecol., 162, 495-501.

- 89-Ledbetter,D.H.,Zachary,J.M.,Simpson,J.L., Golbus,M.S., Pergament,E., Jackson,L.,Mahoney,M.J.,Desnick,R.J.,Schulman,J.,Copeland,K.L.,Verlinsky,Y.,YangFeng,T.,Schonberg,S.A.,Babu,A.,Tharapel,A.,Doffmann,A.,Lubs,H.A.,Rhoads,G.G.,Fowler,S.E., de la Cruz,F. (1992).** Cytogenetic results from the U.S. collaborative study on CVS., *Prenat. Diagn.*, 12, 317-345.
- 90-Leitch,A.R. (1994).** *In-situ* Hybridisation.,First ed., BIOS Scientific Publishers.
- 91-Lengauer,C.,Green,D.G., Cremer,T. (1992).** Fluorescence *in-situ* hybridisation of YAC clones after Alu-PCR amplification., *Genomics*, 13, 826-828.
- 92-Leschot,N.J., Wolf,H., Weenik,G.H. (1988).** False-negative findings at third trimester chorionic villus sampling (CVS)., *Clin. Genet.*, 34, 204-205.
- 93-Leschot,N.J., Wolf,H., van Proogen-Kneght,A.C., van Asperen,C.J., Verjaal,M., Schuring-Bloom,G.H., Boer,K., Kanhai,H.H.H., Christiaens,G.C.M.L. (1989).** Cytogenetic findings in 1250 chorionic villus samples obtained in the first-trimester with clinical follow-up of the first 1000 pregnancies., *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 96, 663-670.
- 94-Leschot,N.J., Wolf,H. (1991).** Is placental mosaicism associated with poor perinatal outcome?, *Prenat. Diagn.*, 11, 403-404.
- 95-Lichter,P., Cremer,T., Borden,J., Manuelidis,L., Ward,D.C. (1988).** Delineation of individual suppression hybridisation using recombinant DNA libraries., *Hum. Genet.*, 80, 224-234.
- 96-Lichter,P., Ledbetter,S.A., Ledbetter,D.H., Ward,D.C. (1990).** Fluorescence *in-situ* hybridisation with *Alu* and L1 polymerase chain reaction probes for rapid characterisation of human chromosomes in hybrid cell lines., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 6634-6638.
- 97-Lindor,N.M., Jalal,S.M., Thibodeau,S.N. et al. (1993).** Mosaic trisomy 16 in a thriving infant : maternal heterodisomy for chromosome 16., *Clin. Genet.*, 44, 185-189.

- 98-Luckett,W.P. (1971).** The origin of extraembryonic mesoderm in the early human and rhesus monkey embryos. *Anat. Rec.*, 169-369.
- 99-Lupski,J.R., Montes de Oca-Luna,R., Slangenaupt,S., Tentao,L., Guzzetta,V., Trask,B.J., Saucedo-Cardinas,O., Barker,D.F., Killian,J.M., Garcia,C.A., Charkrivarti,A., Patel,P.L. (1991).** DNA duplication associated with Chacot-Marie-Tooth disease type 1A., *Cell.*, 66, 219-232.
- 100-Lux,S.E., Tse,W.T., Menninger,J.C., John,K.M., Harris,P., Shlev,O., Chilcote,R.R., Marchesi,S.L., Watkins,D.C., Bennett,V., McIntosh,S., Collins,F.S., Francke,V., Ward,D.C., Forget,B.G. (1990).** Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8., *Nature*, 345, 736-739.
- 101-Lynch,L., Berkowitch,R.L. (1989).** First-trimester growth delay in trisomy 18., *Am. J. Perinatol.*, 6, 237-239.
- 102-Manuelidis,I., Wu,J.C. (1978).** Homology between human and simian repeated DNA., *Nature*, 276, 92-94.
- 103-Marmur,J.,Lane,D. (1960).** Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: biological studies., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 46, 453-461.
- 104-McCreanor,H.R., O'Malley,F.M., Reid,R.A. (1973).** Trisomy in abortion material, *Lancet*, 2, 972-973.
- 105-Meltzer,P.S., Guan,X.-Y., Trent,J.M. (1993).** Telomere capture stabilizes chromosome brekage., *Nature Genet.*, 4, 252-255.
- 106-Mikkelsen,M., Ayme,S. (1986).** Cytogenetic findings in chorionic villi. A collobrative study. Presented at 7<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics., Berlin.
- 107-Mikkelsen,M., Ayme,S. (1987).** Chromosomal findings in chorionic villi. A collobrative study. In: Vogel,F., Sperling,K. (eds). *Human Genetics*, Berlin: Springer-Verlag, 597-606.

- 108-Miny,P., Hammer,P., Gerlach,B., Tercanli,S., Horst,J., Holzgreve,W., Eiben,B. (1991).** Mosaicism and accuracy of prenatal cytogenetic diagnosis after chorionic villus sampling and placental biopsies., *Prenat. Diagn.*, 11, 581-589.
- 109-Mitchell,A.R., Gosden,J.R., Miller,D.A. (1985).** A cloned sequence, p82H, of the alphoid repeated DNA family found at the centromeres of all human chromosomes., *Chromosoma*,92, 369-377.
- 110-Mohaddes,S.M., Boyd,E., Morris,A., Morrison,N., Connor,J.M. (1996).** A practical strategy for detection of major chromosome aneuploidies using ratio-mixing fluorescence *in situ* hybridization., *Mol. and Cellular Probes.*, 10, 147-154.
- 111-Moore,K.L. (1988).** *Essentials of Human embryology*, Blackwell Scientific Publications.
- 112-Muhlegger,K., Huber,E., von der Eltz,H., Ruger,R., Kessler,C. (1990).** Non-radioactive labelling and detection of nucleic acids. IV. synthesis and properties of digoxigenin-modified 2'-deoxyuridine-5'-triphosphates and a photoactivable analog of digoxigenin (photodigoxigenin), *Biol. Chem. Hoppe Seyler.*, 371, 953-965.
- 113-Munne,S., Lee,A., Rosenwaks,Z., Grifo,J., Cohen,J. (1993).** Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos., *Hum. Reproduction.*, 8, 2185-2191.
- 114-Munne,S., Weier,H.U.G., Grifo,J., Cohen,J. (1994).** Chromosome mosaicism in human embryos., *Biology of Reproduction.*, 51, 373-379.
- 115-Nederlof,P.M., Robinson,D., Abuknesha,R., Wiegant,J., Hoppman,A.H., Tanke,H.J., Raap,A.K. (1989).** Three-colour fluorescence *in-situ* hybridisation for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences.,*Cytometry*, 10, 20-27.

116-Nederlof,P.M., van der Flier,S., Wiegant,J., Raap,A.K., Tanke,H.J., Ploem,J.S., van der Ploeg,M. (1990). Multiple fluorescence *in-situ* hybridisation., Cytometry, 11, 126-131.

117-Nederlof,P.M., van der Flier,S., Vrolijk,J., Tanke,H.J., Raap,A.K. (1992). Fluorescence ratio measurements of double-labelled probes for multiple *in-situ* hybridisation by digital imaging microscopy., Cytometry, 13, 839-845.

118-Ohta,T., Tohma,T., Soejima,H., Fukushima,Y., Nagai,T., Yoshiura,K., Jinno,Y., Niikawa,N. (1993). The origin of cytologically unidentifiable chromosome abnormalities: six cases ascertained by targeted chromosome- band painting., Hum. Genet., 92, 1-5.

119-Opitz,J.M. (1981). Development effects of aneuploidy., Karyogram, 7, 1-5.

120-Opstal,D.V., Berg,C.V.D., Jahoda,M.G.J., Brandenburg,H., Los,F.J., Veld,P.A.I. (1995). Retrospective study of trisomy 18 in chorionic villi with fluorescent *in-situ* hybridisation on archival direct preparations, Prenat. Diagn., 15, 51-55.

121-Philip,J., Bryndorf,T., Christensen,B. (1994). Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH)., Prenat. Diagn., 14, 1203-1215.

122-Pinkel,D., Landegent,J., Collins,C., Fuscoe,J., Segraves,R., Lucas,J., Gray,J. (1988). Fluorescence *in-situ* hybridisation with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,85, 9138-9142.

123-Pittalis,M.C., Dalpra,L., Torricelli,F., Rizzo,N., Nocera,G., Cariati,E., Santarini,L., Tibiletti,M.G., Agosti,S., Bovicelli,L., Forqbosco,A. (1994). The predictive value of cytogenetic diagnosis after CVS based on 4860 cases with both direct and culture methods., Prenat. Diagn., 14, 267-278.

**124-Pletcher,B.A., Sanz,M.M., Schlessel,J.S., Kunaporn,S., McKenna,C., Bialer, M.G., Alonso,M.L., Zaslav,A.-L., Brown,W.T., Ray,J.H. (1994).** Postnatal confirmation of prenatally diagnosed trisomy 16 mosaicism in two phenotypically abnormal liveborns., *Prenat. Diagn.*, 14, 933-940.

**125-Post,J.G., Nijhuis,J.G. (1992).** Trisomy 16 confined to the placenta, *Prenat. Diagn.*, 12, 1001-1007.

**126-Priest,J.H. (1991).** Prenatal chromosomal diagnosis and cell culture. The ACT cytogenetic laboratory manual, Chapter 5, second edition, Edited by M.J.Barch, Raven Press Ltd., New York.

**127-Reddy,N.S., Blakemore,K.J., Stetten,G., Corson,V. (1990).** The significance of trisomy 7 mosaicism in chorionic villus cultures, *Prenat. Diagn.*, 10, 417-423.

**128-Reed,M. (1970).** Hypothalamic releasing factors. In: Philipp,E.E., Barnes,J., Newton,M. (eds): *Scientific Foundations of Obstetrics and Gynecology.* London,William Henemann.

**129-Rhoads,G.G., Jackson,L.G., Schlesselman,S.E., de la Cruz,F.F., Desnick,R.J., Golbus,M.S., Ledbetter,D.H., Lubs,H.A., Mahoney,M.J., Pergament,E., Simpson,J.L., Carpenter,R.J., Elias,S., Ginsberg,N.A., Goldberg,J.D., Hobbins,J.C., Lynch,L., Shiona,P.H., Wapner,R.J., Zachary,J.M. (1989).** The safety and efficacy of chorionic villus sampling for early prenatal diagnosis of cytogenetic abnormalities., *N. Engl. J. Med.*, 320, 609-617.

**130-Richkind,K. (1992).** Advances and new directions in cytogenetic technology. I. Interphase cytogenetics., *Appl. Cytogenet.*, 18, 6-9.

**131-Ried,A.K., Mahler,V., Vogt,P., Blonden,L.A.J., van Ommen,G.J.-B., Cremer,T., Cremer,M. (1990).** Direct carrier detection by *in-situ* supression

hybridisation with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus., *Human Genetics.*, 85, 581-586.

**132-Ried,T., Landes,G., Dackowski,W., Klinger,K., Ward,D.C. (1992a).** Multicolor fluorescence *in-situ* hybridisation for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21 X and Y in uncultured amniotic fluid cells., *Hum. Mol. Genet.*, 5, 307-313.

**133-Ried,T., Baldini,A., Rand,T.C., Ward,D.C. (1992b).** Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in-situ* hybridisation using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 1388-1392.

**134-Rigby,P.W.J., Diekman,M., Rhodes,C., Berg,P. (1977).** Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I., *J. Mol. Biol.*, 113, 273-241.

**135-Romana,S.P., Tachdjian,G., Druart,L., Cohen,D., Berger,R., Cherif,D. (1993).** A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes., *Eur. J. Hum. Genet.*, 1, 245-251.

**136-Rowley,J.D., Diaz,M.O., Epinosa III,R., Patel,Y.D., van Melle,E., Ziemin,S., Taillon-Miller,P., Lichter,P., Evans,G.A., Kersey,J.H., Ward,D., Domer,P.H., Le Beau,M.M. (1990).** Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: Identification of 11q23 translocation breakpoints with yeast artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9358-9362.

**137-Sachs,E.S., Jahoda,M.G.J., Los,F.J., Rijpers,L., Reuss,A., Wladimiroff,J.W. (1990).** Interpretation of chromosomal mosaicism and discrepancies in chorionic villi studies., *Am. J. Med. Genet.*, 37, 268-271.

**138-Schreck,R., Falik-Borenstein,Z., Hirota,G. (1990).** Chromosomal mosaicism in chorionic villus sampling., *Clin. Perinatol.*, 17, 867-888.

- 139-Schuring-Blom,G.H., Keijzer,M., Jacobs,M.E., van den Brande,D.M., Visser,H.M., Wiegant,J., Hoovers,J.M.N., Leschot,N.J. (1993).** Molecular cytogenetic analysis of term placentae suspected of mosaicism using fluorescence *in-situ* hybridisation., *Prenat. Diagn.*, 13, 671-679.
- 140-Schuring-Blom,G.H., Plug-Engel,K., Smit,N., et al. (1994).** 7th international conference on early prenatal diagnosis., Jerusalem,Israel, May 1994,A23.
- 141-Schwartz,S. (1993).** Efficacy and applicability of interphase Fluorescent *in-situ* hybridisation for prenatal diagnosis, *Am. J. Hum. Genet.*, 52, 851-853.
- 142-Searle,A.G., Peters,J., Lyon,M.F., et al. (1989).** Chromosome maps of men and mouse.,*Ann. Hum. Genet.*, 53, 89-140.
- 143-Selleri,L., Hermanson,G., Eubanks,J.H., Evans,G. (1991).** Chromosomal *in-situ* hybridisation using yeast artificial chromosomes.,*GATA*, 82, 59-66.
- 144-Senger,G., Ludecke,H.-G., Horsthemke,B., Claussen,U. (1990).** Microdissection of banded human chromosomes., *Hum. Genet.*, 84, 507-511.
- 145-Sherman,F., Fink,G.R., Hicks,J.B. (1986).** Laboratory Course Manual for Methods In Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, 125-128.
- 146-Shettles,L.B. (1970).** Fertilization and early development from the inner cell mass. In: Philipp,E.E., Barnes,J., Newton,M. (eds). *Scientific Foundations of Obstet. and Gynecol.* London, William Heinemann.
- 147-Simoni,G., Gimelli,G., Cuoco,C., Terzoli,G.L., Rosella,F., Romitti,L., Dalpra,L., Nocera,G., Tibiletti,M.G., Tenti,P., Fraccaro,M. (1985).** Discordance between prenatal cytogenetic diagnosis after chorionic villi sampling and chromosomal constitution of the fetus. In: Fraccaro,M., Simoni,G., Brambati,B. (eds). *First Trimester Fetal Diagnosis*,Berlin: Springer-Verlag, 137-143.

- 148-Simoni,G., Fraccaro,M., Gimelli,G., Maggi,F., Bricarelli,F.D. (1987).** False-positive and false-negative findings on chorionic villus samples., *Prenat. Diagn.*, 7, 671-672.
- 149-Simoni,G., Brambati.B., Maggi,F., Jackson,L. (1992).** Trisomy 16 confined to chorionic villi and unfavourable outcome of pregnancy., *Ann. Genet.*, 35, 110-112.
- 150-Simoni,G., Sirchia,S.M. (1994).** Confined placental mosaicism., *Prenat. Diagn.*, 14, 1185- 1189.
- 151-Simpson,J.L. (1990).** Incidence and timing of pregnancy losses: relevance to evaluating safety of early prenatal diagnosis, *J. Med. Genet.*, 35, 165-173.
- 152-Smith,V.T.H.B.M., Wessels,J.W., Mollevagner,P., Dauwerse,J.G., van Vliet,M., Beverstock,G.C., Breuning,M.H., Devielee,P., Raap,A.K., Cornelisse,C.J. (1991).** Improved interpretation of complex chromosomal rearrangements by combined GTG banding and *in-situ* suppression hybridisation using chromosome-specific libraries and cosmid probes., *Genes, Chromosomes and Cancer.*, 3, 239-248.
- 153-Solter,D.A. (1988).** Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. *Ann. Rev. Genet.*, 22, 127-146.
- 154-Spathas,D.V., Divane,A., Maniatis,G.M., Ferguson-Smith,M.E., Ferguson-Smith,M.A. (1994).** Prenatal detection of trisomy 21 in uncultured amniocytes by fluorescence *in-situ* hybridisation: A prospective study., *Prenat. Diagn.*, 14, 1049-1054.
- 155-Speicher,M.R., Ballard,S.G., Ward,D.C. (1996).** Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-flour FISH, *Nature Genetics*, 12, April, 368-375.
- 156-Strovel,J.V., Lee,K.D., Punzalan,C., Schwartz,S. (1992).** Prenatal diagnosis by direct analysis of uncultured amniotic fluid and chorionic villus cells using interphase fluorescence *in-situ* hybridisation (FISH)., *Am. J. Hum. Genet.*, Suppl., 51, A12.

- 157-Sundberg,K., Smidt-Jensen,S. (1991).** Non-mosaic trisomy 16 on chorionic villus sampling but normal placenta and fetuses after termination, *Lancet*, i, 1233-1234.
- 158-Telenius,H., Carter,N.P., Bebb,C.E., Nordenskjold,M., Ponder,B.A.J., Tunnacliffe,A. (1992).** Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer., *Genomics.*, 13, 718-725.
- 159-Tharapel,A.T., Elias,S., Shulman,L.P., Seely,L., Emerson,D.S., Simpson,J.L. (1989).** Resorbed co-twin as an explanation for discrepant chorionic villus results: non-mosaic 47,XX,+16 in villi (direct and cultured) with normal (46,XX) amniotic fluid and neonatal blood., *Prenat. Diagn.*, 9, 467-472.
- 160-Tkachuk,D., Westbrook,C., Andreef,M., Donlon,T., Cleary,M., Suranarayan,K., Homge,M., Render,A., Gray,J., Pinkel,D. (1990).** Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukaemia by *in-situ* hybridisation., *Science*, 250, 559-562.
- 161-Trask,B.J. (1991).** Fluorescence *in-situ* hybridisation., *TIG (Trends in Genetics)*, 5, 149-154.
- 162-Vejerslev,L., Mikkelsen,M. (1989).** The European collaborative study on mosaicism in chorionic villus sampling: data from 1986 to 1987, *Prenat. Diagn.*, 9, 575-588.
- 163-Verlinsky,Y., Pergament,E., Fine,B., Ginsberg,N., Brandt,T., Cadkin,A. (1986).** Cytogenetic discrepancies in chorionic villus sampling., *Am. J. Hum. Genet.*, 39. A267.
- 164-Verp,M.S., Rosinsky,B., Sheikh,Z., Amarose,A.P. (1989).** Non-mosaic trisomy 16 confined to villi., *Lancet*,ii,915-916.

**165-Wang,B.B.T., Rubin,C.H., Williams III,J. (1993).** Mosaicism in chorionic villus sampling: an analysis of incidence and chromosomes involved in 2612 consecutive cases., *Prenat. Diagn.*, 13, 179-190.

**166-Wapner,R.J., Simpson,J.L., Golbus,M.S., Zachary,J.M., Ledbetter,D.H., Desnick,R.J., Fowler,S.E., Jackson,L.G., Lubs,H., Mahoney,R.J., Pergament,E., Rhoads,G.G., Schulman,J.D., de la Cruze,F. (1992).** Chorionic mosaicism: association with fetal loss but not with adverse perinatal outcome., *Prenat. Diagn.*, 12, 347-355.

**167-Ward,B.E., Gersen,S.L., Carelli,M.P., McGuire,N.M., Dackowski,W.R., Weinstein,M.P., Sandlin,C., Warren,R., Klinger.K.W. (1993).** Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence *in-situ* hybridisation: clinical experience with 4500 specimens., *Am. J.Hum. Genet.*, 52, 854-865.

**168-Watson,J.D., Ward,B.E., Peakman,D., Henry,G. (1988).** Trisomy 16 and 12 confirmed chorionic mosaicism in liveborn infants with multiple anomalies, *Am. J. Hum. Genet.*, 43, A252 (abstract).

**169-Whiteford,M.L., Coutts,J., Al-roomi,L., Mather,A., Lowther,G., Cooke,A., Vaughan,J.I., Moore,G.E., Tolmie,J.L. (1995).** Uniparental isodisomy for chromosome 16 in a growth-retarded infant with congenital heart disease., *Prenat. Diagn.*, 15, 579-584.

**170-Wilkins-Haug,L., Roberts,D.J., Morton,C.C. (1992).** Confined placental mosaicism and intrauterine growth retardation: an analysis of 12 cases and 24 matched controls., *Am. J. Hum. Genet.*, 51,A11,34.

**171-Willard,H.F. (1985).** Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA., *Am. J. Hum. Genet.*, 37, 524-532.

**172-Willard,H.F. Wye,J.S. (1987).** Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA, *Trends in Genetics*, 3, 192-198.

**173-Willard,H.F. (1990).** Molecular cytogenetics of centromeres of human chromosomes., *Chromosomes Today*, 10,47-60.

**174-Willard,H.F. (1992).** Centromeres-primary constrictions are primarily complicated., *Hum. Mol. Genet.*, 1, 667-668.

**175-Willat,L.R., Davison,B.B.C., Goudie,D. et al. (1992).** A male with trisomy 9 mosaicism and maternal uniparental disomy for chromosome 9 in the euploid cell line., *J. Med. Genet.*, 29, 742-744.

**176-Williams,J., Wang,B., Rubin,C., Clark,R., Mohandes,T. (1989).** Apparent non-mosaic trisomy 16 in chorionic villi: diagnostic dilemma or clinically significant finding?, *Am. J. Hum. Genet.*, 45, A273.

**177-Williams,J., Wang,B.B.T., Rubin,C.H., Clark,R.D., Mohandas,T.K. (1992).** Apparent non-mosaic trisomy 16 in chorionic villi: diagnostic dilemma or clinically significant finding?, *Prenat. Diagn.*, 12, 163-168.

**178-Wirtz,A., Gloning,K.-P.H., Murken,J. (1991).** Trisomy 18 in chorionic villus sampling: problems and consequences, *Prenat. Diagn.*, 11, 563-567.

**179-Wolstenholme,J., Rooney,D.E.,Davison,E.V. (1994).** Confined placental mosaicism, IUGR, and adverse pregnancy outcome: A controlled retrospective U.K. collaborative survey, *Prenat. Diagn.*, 14, 345-361.

**180-Wolstenholme,J. (1996).** Confined placental mosaicism for trisomies 2, 3, 7, 8, 9, 16, and 22: their incidence, likely origins, and mechanisms for cell lineage compartmentalization., *Prenat. Diagn.*, 16, 511-524.

**181-Worton,R.G., Stern,R, (1984).** A Canadian collaborative study of mosaicism in amniotic fluid cell cultures., *Prenat. Diagn.*, 4, 131-144.

**182-Zheng, Y.L., Ferguson-Smith, M.A., Warner, J.P., Ferguson-Smith, M.E., Sargent, C.A., Carter, N.P. (1992).** Analysis of chromosome 21 copy number in uncultured amniocytes by fluorescence *in-situ* hybridisation using a cosmid contig., *Prenat. Diagn.*, 12, 931-943.



## ÖZGEÇMİŞ

17.12.1955 tarihinde Manisa'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Manisa'da yaptıktan sonra öğretmen okulunu bitirerek bir süre Milli Eğitim Bakanlığına bağlı olarak öğretmenlik yaptım. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü 1984'de bitirdikten sonra Fırat üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. 1987 yılında Yüksek Lisansımı tamamladıktan sonra askerlik görevimi yaptım. 1992 yılında İngiltere Glasgow Üniversitesinde Genetik doktorası yapmak üzere görevlendirildim. Burada insan genetiği ile ilgili çeşitli araştırmalar yaptıktan sonra 1996 yılında sürem bitmesi üzerine Fırat Üniversitesine döndüm. Halen Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktayım.

Öğr. Gör. Hüseyin YÜCE

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın büyük kısmının gerçekleştirilmesi için bana Glasgow Üniversitesi Tıp Fakültesi Duncan Guthrie Institute of Medical Genetics bölümü laboratuvarlarını açan ve çalışma sırasında hiçbir yardımı esirgemeyen danışmanım Prof.Dr. J.M. Connor, prenatal tanı ve sitogenetik çalışmalarında hiçbir fedakarlığı esirgemeyen Dr. G. Lowther, FISH tekniğini öğreten E. Boyd 'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Danışmanlığımı üstlenip yurt dışında çalışma fırsatı sağlayan ve eğitimimin her aşamasında desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Prof.Dr. Halit ELYAS'a ve mesai arkadaşım Yard.Doç Dr. Haluk AKIN'a, tezin yazılması esnasında hiçbir yardımını esirgemeyen MSc. Tıbbi Biyolog Necati DENİZ'e ve Diğer mesai arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Hüseyin YÜCE