

YENİDOĞAN KORD KANINDAN DİREKT
YÖNTEMLE VE KORD KANI İLE
PERİFERİK KANDAN KÜLTÜR
YÖNTEMİYLE KROMOZOM ANALİZLERİ
VE UYGULANAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI.

Beyhan DURAK

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği Uyarınca
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Genetik Bilim Dalı'nda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Mustafa SOLAK

Şubat 1992

KABUL VE ONAY SAYFASI

Beyhan Durak'ın YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırladığı "Yenidoğan kord kanından direkt yöntemle ve kord kanı ile periferik kandan kültür yöntemiyle kromozom analizleri ve uygulanan yöntemlerin karşılaştırılması" başlıklı bu çalışma, Jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

18.03.1992

Üye: Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN (imza)

Üye: Prof.Dr. Ayşe BAŞARAN (imza)

Üye: Yrd.Doc.Dr. Mustafa SOLAK (imza)

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun. 31.03.1992.... gün ve .178/444.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ASLI GİBİDİR

31 MART 1992

(imza)

Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN
Enstitü Müdürü

İsmet YILMAZ
Enstitü Sekreteri

ÖZET

Kalıtsal hastalıkların erken dönemde tanısının konulmasında kullanılmak üzere ve kord kanından direkt kromozom analizi yönteminin oturtulması amacıyla Aralık 1990 - Haziran 1991 tarihleri arasında Eskişehir Sağlık Müdürlüğü Doğum ve Çocuk Bakımevi'nden miyadında ve normal doğan, doğum sonrasında gerçekleştirilen fizik muayenede herhangi bir malformasyon saptanamayan 25 yenidoğanın kord kanı ile periferik kan örnekleri GENTAM'da (Anadolu Üniversitesi Rektörlüğü Genetik Hastalıkları Doğumöncesi Tanı ve Biyoteknoloji Uygulama Araştırma Merkezi) kromozom kuruluşları bakımından değerlendirildi.

Araştırma iki aşamada gerçekleşti : İlk aşamada 25 yenidoğandan doğum sırasında alınan kord kanından en iyi metafaz plakları elde edilinceye kadar direkt kromozom analizi yönteminde modifiye işlemleri sürdürüldü. Direkt yöntemle kromozom analizi işlemlerinde Day ve ark. (1988), Granham ve Sutherland (1987), ile Francke ve ark. (1979) tarafından geliştirilen yöntemlerden yararlanıldı. Metafaz plakları; kalite ve sayı olarak, kromozomlar; morfoloji ve bant özellikleri bakımından değerlendirilerek en iyi sonucun elde edildiği yöntem ortaya kondu. Bu yöntemde kord kanının alınışı ile ekimi arasında geçen en uygun sürenin < 12 saat olduğu, ekim için newborn bovine serum ile hazırlanan RPMI-1640 en uygun besiyeri olduğu, kord kanı direkt kromozom analizi için 2 saat 45 dakikanın en uygun kültür süresi olduğu, en uygun colcemid konsantrasyonunun 0.02 Mg/ml ve bu colcemid solüsyon ile 15 dakikalık inkübasyon olduğu, en uygun KCl solüsyonunun 0.047 M ve bu KCl solüsyonu ile 45 dakikalık inkübasyon olduğu, en uygun tesbit işleminin hipotonik solüsyon + hücre süspansiyonu üzerine uygulanarak gerçekleştiği saptandı.

İkinci aşamada yine 25 yenidoğandan alınan kord kanı ve periferik kan örnekleri kültüre edildi. Bu yolla elde edilen metafaz plaklarının, hem kendi aralarında hem de kord kanından direkt analiz yöntemiyle elde edilenlerle karşılaştırılması yapıldı. Periferik kandan lenfosit kültür yöntemi olarak halen GENTAM sitogenetik laboratuvarında kullanılan ve Başaran (1982) tarafından modifiye edilen standart kültür yöntemi uygulandı. Kromozom analizi sonucunda değerlendirme için GTG bantlama tekniği kullanıldı.

Direkt ve kültür çalışmalarında elde edilen metafaz plakları ekim başına saptanan metafaz plak sayısı ve kalitesi ile kromozom morfolojisi ve bant özellikleri açısından değerlendirilerek karşılaştırıldı. Sonuçta her üç çalışmada 25 yenidoğana ilişkin kromozom kuruluşları: 10 örnekte 46,XX ; 15 örnekte ise 46,XY olarak saptandı.

Değerlendirmeler sonucunda direkt yöntemle elde edilen iyi dağılmış ve kaliteli metafaz plak sayısının kültür yöntemine göre az olduğu, buna karşılık kromozom morfolojisi ve kromozomların bant alma özellikleri bakımından yöntemler arasında bir farklılık olmadığı saptandı. Her iki yöntem birbirini karyotip açısından destekler nitelikte olduğundan direkt yöntemin kordosentez sonrası rutin tanı işlemlerinde ya da CVS ve amniyosentez gibi prenatal tanı yöntemlerinin doğrulanmasında uygulanabileceği kanısına varıldı.

Anahtar kelimeler; Direkt karyotipleme, Fetal kan,
Fetal kan örnekleme, Fetal
karyotipleme, Hızlı karyotipleme
Kordosentez.

SUMMARY

In this study, our aim is to determine the karyotype of the newborns from the cord blood by rapid karyotyping, and eventually, to evaluate the applicability of this method by comparing it with the culture method. We compared the quality of metaphases, morphologic and banding features of chromosomes by using both rapid karyotyping and culture methods in the cord blood of 25 newborns who were normal and delivered in time. We determined that the most convenient medium was RPMI-1640 supplemented with 20 Newborn Bovine Serum; the most convenient duration of incubation was 2h 45min; the most convenient colcemid concentration was 0.02 Mg/ml, the duration of incubation with colcemid was 15min; the concentration of hypotonic solution was 0.047M and the most convenient duration of incubation with KCl was 45 min. When we compared the metaphases of direct method with the culture method of cord and newborn peripheric blood samples, we determined that no differences were observed in the morphologic and banding features of chromosomes and the quality of metaphases. As a result, we concluded that rapid karyotyping from cord blood can be routinely used; and this method can also be used to support the results of prenatal diagnosis techniques such as CVS, amniocentesis or cordocentesis.

Key words: Cordocentesis, Direct karyotyping,
Fetal blood, Fetal blood sampling,
Fetal karyotyping, Rapid karyotyping.

TEŞEKKÜR

Yetişmemde ve kazandığım deneyimlerde yakın ilgisi ve büyük yardımlarını gördüğüm bana bu çalışmayı öneren her türlü imkânı sağlayan değerli hocam Prof.Dr. Nurettin Başaran'a, tezimin hazırlanmasında yöntemlerin seçimi, yazımı sırasındaki sabırlı düzeltmeleri ve değerli katkılarıyla bana rehberlik eden değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Mustafa Solak'a, manevi desteği ile çalışmalarımı sürekli izleyen ve yol gösteren değerli hocam Prof.Dr. Ayşe Başaran'a, her an yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm Öğr.Grv. Sevilhan Artan ve Öğr.Grv. Muhsin Özdemir'e, materyal sağlanması ve alınmasında her türlü kolaylığı ve yardımı gördüğüm Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Asistanları ve Eskişehir Sağlık Müdürlüğü Doğum ve Çocuk Bakımevi Çalışanları'na, ilgi ve desteklerinden dolayı tüm GENTAM Çalışanları'na ve değerli Aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
SUMMARY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Prenatal Tanı Tetkikleri.....	5
2.1.1. İndirekt yöntemler.....	6
2.1.2. Direkt yöntemler.....	7
2.2. Göbek Kordonu.....	11
3. GEREÇ - YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç.....	15
3.1.1. Kullanılan kültür ortamı.....	16
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	16
3.1.3. Solüsyonlar.....	17
3.1.4. Aygıtlar ve Gereçler.....	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Kromozom elde etme yöntemi.....	20
3.2.2. Boyama yöntemi.....	27
3.2.3. Değerlendirme.....	29

4. BULGULAR.....	31
4.1. Kord Kanının Alınışı İle Ekim Arasında Geçen Süre.....	32
4.2. Ekimde Kullanılan Besiyeri Solüsyonları.....	33
4.3. Besiyeri Hazırlamada Kullanılan Serum.....	34
4.4. Kültür Süresi.....	35
4.5. Colcemid Konsantrasyonu.....	35
4.6. Colcemid Süresi.....	36
4.7. Hipotonik Solüsyon (KCl) Konsantrasyonu.....	36
4.8. Hipotonik Solüsyon (KCl) İnkübasyon Süresi.....	37
4.9. Tesbit Solüsyonunun Hipotonik Solüsyon + Hücre Süspansiyonuna İlavesi Veya Pellet Üzerine İlavesi.....	37
4.10. Lam Isısı.....	38
5. TARTIŞMA.....	49
5.1. Kord Kanının Alınışı İle Ekim Arasında Geçen Süre.....	49
5.2. Ekimde Kullanılan Besiyeri Solüsyonları.....	50
5.3. Besiyeri Hazırlamada Kullanılan Serum.....	51
5.4. Kültür Süresi.....	51
5.5. Colcemid Konsantrasyonu.....	52
5.6. Colcemid Süresi.....	53
5.7. Hipotonik Solüsyon (KCl) Konsantrasyonu.....	53
5.8. Hipotonik Solüsyon (KCl) İnkübasyon Süresi.....	54

5.9. Tesbit Solüsyonunun Hipotonik Solüsyon + Hücre Süspansiyonuna İlavesi Veya Pellet Üzerine İlavesi.....	54
5.10. Lam Isısı.....	55
6. SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Kord kanından direkt yöntemle elde edilen metafaz plak örnekleri.....	47
4.2. Kord kanından kültür yöntemiyle elde edilen metafaz plak örnekleri.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğandan alınan kord kanına uygulanan yöntemler ve saptanan kromozom kuruluşları...	40
4.2. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğandan alınan periferi kandan kültür yöntemiyle saptan kromozom kuruluşları.....	41
4.3. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğandan alınan kord kanından kan alımı ile ekim arasında geçen farklı zaman aralıklarına göre saptanan metafaz plak sayısı.....	42

- 4.4. Araştırma grubunu oluşturan toplam
25 yenidoğanın kord kanının değişik besiyer-
leri ile direkt çalışılması sonucu saptanan
metafaz plak sayısı..... 43
- 4.5. Araştırma grubunu oluşturan toplam
25 yenidoğanın kord kanının değişik serum
çeşitleri katılan besiyeriyle direkt çalışıl-
ması sonucu saptanan metafaz plak sayısı..... 43
- 4.6. Araştırma grubunu oluşturan toplam
25 yenidoğanın kord kanının direkt çalışıl-
masında uygulanan farklı kültür sürelerine
göre saptanan metafaz plak sayısı..... 44
- 4.7. Araştırma grubunu oluşturan toplam
25 yenidoğanın kord kanının değişik colcemid
konsantrasyonlarıyla direkt çalışılması
sonucu saptanan metafaz plak sayısı..... 45
- 4.8. Araştırma grubunu oluşturan toplam
25 yenidoğanın kord kanının değişik colcemid
süreleriyle direkt çalışılması sonucu sapta-
nan metafaz plak sayısı..... 45
- 4.9. Araştırma grubunu oluşturan
25 yenidoğanın kord kanının değişik hipo-
tonik solüsyon konsantrasyonlarıyla direkt
çalışılması sonucu saptanan metafaz
plak sayısı..... 46
- 4.10. Araştırma grubunu oluşturan
25 yenidoğanın kord kanının değişik hipo-
tonik solüsyon süreleri ile direkt çalı-
şılması sonucu saptanan metafaz plak sayısı.. 46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
cm	Santimetre
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
Mg	Mikrogram
rmp	Rotation per minute
SSC	Sodyum fosfat sodyum sitrat

Kısaltmalar	Açıklama
CVS	Chorionic Villi Sampling
GENTAM	Anadolu Üniversitesi Rektörlüğü Genetik Hastalıkları Doğumöncesi Tanı ve Biyoteknoloji Uygulama Araştırma Merkezi
GTG	Giemsa-Trypsin-Giemsa
PHA	Phytohemagglutinin
PRETAM	İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Prenatal Tanı Merkezi
UNICEF	United Nations Children's Fund

1. GİRİŞ

Son yıllarda başta enfeksiyon hastalıkları olmak üzere çeşitli tıp dallarında önemli ilerlemeler olmuş , gerek tedavi edici ve gerekse koruyucu hekimlik açısından pek çok problem çözümlenmiş ya da çözümlene duruma gelmiştir. Günümüzde çevresel etkenlerle oluşan hastalıkların kontrolüne yönelik büyük başarıların sağlanması kalıtsal hastalıkların tanı ve tedavi çalışmalarını ön plana çıkarmış ve bu alandaki uygulamaların önemini arttırmıştır.

Diğer taraftan neonatolojideki gelişmelere bağlı olarak perinatal ölüm oranındaki genel bir azalmaya rağmen yenidoğandaki letal malformasyonların sıklığı sabit kalmaktadır (Başaran 1990). Canlı doğumların yaklaşık %2-5 kadarında genetik hastalık veya konjenital malformasyon görülmektedir. Ayrıca koroner kalp hastalığı, diyabet ve kanser gibi yetişkinlerde sık görülen birçok hastalığın temelinde de belirgin bir genetik predispozisyon bulunmaktadır (Başaran 1989).

Bu araştırmada genetik hastalıkların tanısında kullanılabilecek kolay ve çabuk bir yöntem oluşturulması düşünülmüştür. Çeşitli nedenlerle prenatal tanı yapılamayan riskli gebeliklerde doğumdan hemen sonra yenidoğanın en kısa sürede ve kolay bir yöntemle genetik yönden incelenmesinin sağlanması amaçlanmış ve bu nedenle alternatif bir yöntem olan kord kanından (sonuca çabuk ulaşan) direkt yöntemle kromozom analizi çalışması planlanmıştır.

Araştırmamızda özellikle kord kanının henüz nedeni bilinmeyen lenfosit oranı fazlalığından yararlanarak miyadında ve normal doğan yenidoğana ilişkin kord kanı örneklerinden direkt yöntemle elde edilecek bulguların kültüre edilen kord kanı ve yenidoğan periferik kanı bulguları ile uygunluk gösterip göstermediği karşılaştırılarak değerlendirilecek ve bu yolla direkt yöntemin avantaj veya dezavantajları ortaya konmaya çalışılacaktır. Ayrıca kord kanından direkt kromozom analizi yöntemi pratik olarak uygulanabilir hale getirilerek ya kordosentez sonrası rutin tanı işlemlerinde ya da CVS ve amniyosentez gibi tanı yöntemlerinin doğrulanmasında kullanılıp kullanılmayacağı konusuna bir açıklık getirilecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Günümüzde çevresel etkenlerle oluşan hastalıkların kontrolüne yönelik büyük başarıların sağlanması kalıtsal hastalıkların tanı ve tedavi çalışmalarını ön plana çıkarmış ve bu alandaki uygulamaların önemini arttırmıştır. Kalıtsal hastalıklar sıklıkla ağır seyreden ve günümüzde genelde tedavisi mümkün olmayan hastalıklardır. Bu nedenle bu tür hastalıkların tanı ve tedavisindeki amaç tekrarlama riskini ortadan kaldırarak hastalık insidansının azaltılması ve sağlıklı toplumların oluşturulmasıdır.

1986 yılında UNICEF tarafından yapılan bir araştırmada dünyada çeşitli faktörler nedeniyle özürlü olan 514 milyon kişinin bulunduğu saptanmıştır. Yetersiz beslenme, enfeksiyon ve enfeksiyon dışı hastalıklar, yaralanmalar, psikiyatrik düzensizlikler, alkol ve ilaç kullanımı gibi faktörler %81 oranında etken olurken, konjenital düzensizlikler %19 ile ikinci sırayı almaktadır. Bunun yanısıra bir çok psikiyatrik düzensizliğin konjenital olduğu dikkate alınırsa toplam olarak %27 oranında konjenital düzensizlik olduğu ortaya çıkar. Bu da her üç özürlerden birinin konjenital nedenlerle engelli olduğunu ortaya koymaktadır (Başaran 1990).

Konjenital hastalıkların nedenleri incelendiğinde altı grup altında toplanabilir:

1. Kromozom Anomalileri: Kromozomların sayısal (Down Sendromu) ve yapısal (Kromozomal translokasyonlar) düzensizlikleri sonucu ortaya çıkmaktadır.

2. Tek Gen Mutasyonuna Bağlı Anomaliler: Gen düzeyindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadırlar (Talassemi).

3. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar: Doğumsal enzim eksikliği ya da yetersiz enzim fonksiyonu nedeniyle ortaya çıkan hastalıklardır (Mukopolisakkaridozis).

4. Multifaktöriyel Düzensizlikler: Çevre ve kalıtımın etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadırlar (Diabet).

5. Konjenital Malformasyonlar: Çeşitli teratojenik ajanların etkisi sonucu ortaya çıkan düzensizliklerdir (Yarık damak, yarık dudak).

6. Çevresel Faktörlerle Oluşan Düzensizlikler: Kalıtsal bir niteliği olmayan ancak intrauterin dönemde zararlı bir etki sonucu oluşan düzensizliklerdir.

Yukarıda sıralanan nedenlerden en önemlileri olan ve üzerinde durulması gerekenler kromozom anomalileri, tek gen mutasyonları ya da enzim eksikliği sonucu ortaya çıkan hastalıklardır. Bu hastalıkların kalıtsal olması, tekrarlama riskinin bulunması, prognozlarının iyi olmaması ve tedavilerinin gerçekleştirilememesi nedeniyle aile ve toplum için maddi manevi büyük bir yük oluşturmaktadır. Kalıtsal hastalıklı bir çocuğa sahip ailenin taşıdığı manevi yükün yanısıra bu bireyin eğitimi ve tedavisi için ilgili aile maddi bir yükün de altına girmektedir. Durum toplum sağlığı açısından değerlendirildiğinde ise kalıtsal hastalık insidansı yüksek olan bir toplumda bu bireylerin üretici durumda olmamaları yalnızca tüketici olmaları toplumda büyük oranda kayıplara neden olmaktadır.

Kalıtsal hastalıklar akraba evliliği oranının yüksek olduğu ülkemiz için daha da önem kazanmaktadır. Parental akrabalığın prenatal ve postnatal kayıplar üzerine etkisi değerlendirildiğinde, akraba evliliği ile özellikle de birinci yeğen evliliği ile prenatal ve postnatal ölümlerin arttığı gözlenmekte otozomal resesif kalıtsal hastalıklar açısından popülasyona mutasyonel bir yük getirdiği bilinmektedir (Başaran 1989). Bu bulgular akraba evliliği oranı %21.21 olduğu ve en riskli grup olan birinci yeğen evliliği insidansının yüksek olduğu ülkemiz için de önemlilik kazanmaktadır. Abortus, ölü doğum, erken yaş çocuk ölümlerinin akraba evliliği yapan çiftlerde daha sık gözleendiği pek çok araştırmacı tarafından bildirilmektedir (Başaran ve ark.1989).

Daha sağlıklı bir topluma ulaşabilmek için kalıtsal hastalık insidansının minimuma indirilmesi gerekmektedir. Bunun için çeşitli prenatal tanı teknikleri gelişmiş ülkelerde uzun süreden beri ülkemizde ise birkaç yıldan beri GENTAM, PRETAM gibi bazı merkezlerde başarıyla uygulanmaktadır.

2.1. Prenatal tanı teknikleri

20.yüzyılda Ian Donald tarafından ultrasonografinin bulunmasıyla fetüsün gelişimi, davranışı incelenmiş daha sonraları bunun geliştirilmesiyle fotoğraf çekme imkanı doğmuştur. Bu arada klinisyenlerin kalıtsal hastalıkları farketmeye başlamasıyla fetüsü morfolojik olarak incelemekle beraber olabilecek kalıtsal ve biyokimyasal düzensizliklerin doğum öncesi tanısı önem

kazanmıştır. Prenatal tanının gerek aile gerekse toplum açısından önem kazanması bu konudaki çalışmalarını arttırmıştır. Özellikle pek çok ülkede son 15-20 yıl içinde gebeliğin sonlandırılmasının yasal olarak kabul edilmesi prenatal tanı tekniklerinde pek çok yaklaşımın denenmesine neden olmuştur.

Son yıllarda geliştirilen prenatal tanı teknikleri başlıca iki grup altında toplanır (Connor and Ferguson-Smith 1987).

- İndirekt Yöntemler
- Direkt Yöntemler

2.1.1. İndirekt yöntemler

2.1.1. a) Radyografi

Gestasyonun ilk dönemlerinde fetal kemiklerin mineralizasyonunun tamamlanmamasından ve gelişen organizma için iyonize radyasyonun tehlikeli olmasından dolayı, fetüsü radyoaktif ışınlarla incelemek için yapılan girişimlerden son dönemler kadar pek önemli sonuç alınamamıştır. Bu nedenle çok kısıtlı olarak kullanılmaktadır. Radyografi günümüzde gebeliğin 20. haftasında sadece bazı tip iskelet anomalilerinin tanımı için kullanılmaktadır.

2.1.1. b) Ultrasonografi

Ultrasonografi indirek bir tetkik yöntemi olup ultrases dalgaları veren bir alet yardımı ile fetüsün iç ve dış organlarının görülmesi ve varsa anomalinin saptanması esasına dayanır. Fetüsün kafatasına ait bozuklukları, nöral tüp defektleri, ekstremitte bozuklukları, iç organ anomalileri ve konjenital kalp hastalıkları bu yöntemle tanınmaktadır.

Fetüs ve anne için sakıncası olmayan güvenilir bir prenatal tanı yöntemidir. Gebeliğin 16.-17. haftasından sonra fetal defektler daha kolay gözlenir. Ayrıca ultrasonografi direk yöntemlerin uygulanması sırasında da kullanılır.

2.1.2. Direkt yöntemler

2.1.2. a) Amniyosentez

Gebeliğin ikinci döneminde yapılan amniyosentez fetüsün çevresinde bulunan amniyon sıvısından bir miktar alınarak incelenmesidir. 1950'li yıllarda Erythroblastozis fetalis hastalığının incelenmesi amacıyla amniyotik sıvı alınmış ve sıvıda fetüse ait hücrelerin olduğu farkedilmiştir. 1960 yılında Fuchs bu bulgulardan hareket ederek özellikle X' e bağlı hastalıklarda önem kazanan cinsiyet tayini için amniyotik hücrelerde Barr body incelemesi yapmıştır. Bundan sonra amniyotik sıvının analiz edilmesi prenatal tanı yöntemi olarak kullanılmaya başlanmış ve kısa sürede geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

Amniyosentez için en uygun zaman gestasyonun 16.-18. haftalarıdır (Ferguson-Smith 1989). Bu haftalar arasında aseptik koşullarda, ultrasonografi yardımıyla plasental yerleşimin incelenmesinden sonra iğne ile amniyotik kaviteye transabdominal olarak girilip en az 20 ml sıvı çekilerek pek çok amaç için yeterli sıvı ve hücre elde edilmiş olur. Maternal kontaminasyonu önlemek için çekilen amniyotik sıvının ilk birkaç damlası akıtılmalıdır.

Amniyotik sıvı hücreleri ve supernatantla şu testler yapılmaktadır:

- Fetal cinsiyet tayini
- Fetal karyotipleme
- Fetal enzim analizi
- Fetal DNA analizi
- Amniyotik sıvıda biyokimyasal analizler

Amniyosentezde uygulama anne ve bebeğe hiç bir rahatsızlık vermez. Anne sıvı alındıktan 1-2 saat sonra evine gidebilir. Komplikasyonlar açısından oran çok düşük olup en fazla fetal kayıp oranı % 0.5 - 1 arasında hesaplanmıştır(Ferguson - Smith 1989).

Amniyosentezle saptanabilen hastalıklar şunlardır:

- Kromozom sayı ve yapı anomalilerinin tümü
- Kalıtsal metabolizma hastalıklarının önemli bir bölümü
- Cinsiyete bağlı hastalıklarda cinsiyet tayini

- Nöral tüp defektleri
- Moleküler genetik tanı yöntemleri uygulanabilen hastalıklar

Amniyotik sıvı hücreleri kültüre edilir böylece 2-3 hafta içinde gelişen hücrelerden sonuç alınabilir.

2.1.2. b) CVS (Chorionic Villi Sampling)

CVS birinci trimesterde en erken tanının yapılmasını sağlayan bir prenatal tanı yöntemidir. CVS 9. haftadan itibaren uygulanabilmektedir. Bu yöntemle fetüsü besleyen plasentanın koryon tabakasından bir miktar doku aspire edilir. Uygulama iki değişik yoldan yapılır:

i- Transservikal Yöntem : 9.-12. gebelik haftasında ultrasound yardımıyla ve ince bir kateter ile vajen ve serviks yoluyla plasentaya ulaşılarak doku aspire edilir.

ii- Transabdominal Yöntem : 13. Gebelik haftasından itibaren ultrasound yardımı ile ince bir iğneyle karın duvarından plasentaya girilerek (amniyosentez işleminde olduğu gibi) doku elde edilir. Hangi yöntemin uygulanacağı gebelik durumu ve plasentanın yerleşimine göre belirlenir.

Her iki yöntem sonucunda sitogenetik analiz için en az 5 mg doku gerekmektedir. Bu dokuyu oluşturan

trofoblast hücreleri yüksek mitotik aktiviteleri sayesinde hem direk olarak hem de hücre kültürü ile incelenebilir.

Gebeliğin erken döneminde kendiliğinden düşük riski % 4-5 olmasına karşı CVS in uygulandığı gebelerde bu oran biraz daha yükselmektedir.

CVS ile tanısı konan hastalıklar nöral tüp defektleri dışında amniyosentezle tanınan tüm hastalık ve anomalilerdir.

2.1.2.c) Fetoskopi

Diğer bir prenatal tanı yöntemi olan fetoskopi, fetusun endoskopi ile izlenmesi olup optimum zamanı gestasyonun 18.- 20. haftalarıdır. Aletin büyüklüğünden dolayı sınırlı bir alan gözlenebilmektedir. Fetüs tamamen izlenememektedir. Fetoskopi sonrası düşük riski yaklaşık % 3-4 dolaylarındadır (Ferguson - Smith 1989) . Halen bu yöntemle deri ve karaciğer biopsileri de yapılabilmektedir.

2.1.2.d) Fetal Kan Örneklemesi

Fetal kan örneklemesi gestasyonun 18. hafta veya daha geç döneminde ultrasonografi yardımıyla umbilikal ven ponksiyonu ile (kordosentez) veya plasentaya iğne uygulayarak (plasentasentez) elde edilmektedir. Alınan kan örneği, kalıtsal immun defektleri, trombosit

düzensizliklerini, fetal viral enfeksiyonları ve kromozom aberasyonlarını içeren çeşitli fetal düzensizliklerin tanısında kullanılır (Boulot et al. 1990). Bu uygulama Fragil-X sendromu için riskli gebeliklerde veya ultrasonografi taramasında kromozomal sendromu destekleyici bir özelliği gösterdiği gebeliklerde hızlı fetal kromozom analizini sağladığı için tercih edilir. Bu teknikle fetal mortalite oranı %1.9 arasındadır (Boulot et al. 1990) .

Fetal kan örneklemeşi özellikle son yıllarda rutin olarak uygulanılmaya başlanmıştır. 1983'e kadar fetal kan fetoskopi ile elde edilirken artık bunun yerine kordosentez uygulanmaktadır (Orlandi 1990, Boulot 1990). Fetal kan örneklemeşi diğere bir prenatal tanı tekniğı olan amniyosentezle karşılaştırıldığında 48-72 saatte karyotipin saptanmasından dolayı geniş uygulama alanı bulmaktadır (Gosden 1985, Nicolaidis 1986). Fetal kan örneklemeşi hızlı sonuç alınmasının gerektiğı spesifik sitogenetik riski olan gebeliklerde ya da fetal anomalilerden dolayı anormal karyotip şüphesinin olduğı durumlarda uygulanabilmektedir. Ayrıca fetal kan örneklemeşi, amniyotik sıvıda bulunan fetal deri, embriyolojik membran, trofoblast, gastroentestinal, respiretuvar ve urogenital kanal hücrelerinin karışımından oluşan fetal doku da farklılıklar göstermektedir ki bu gerçek mosaisizm ve pseudomosaisizm olgularının ayırımında büyük kolaylık sağlamaktadır (Gosden 1985).

2.2. Göbek Kordonu (Umbilikal Cord)

Göbek kordonu, fetal hayat boyunca barındırdığı kan damarları ile fetüsün dolaşım sistemini plasentaya bağlayan bir oluşumdur.

Embriyolojik olarak üçüncü ayın sonlarına doğru esas şeklini alarak plasenta aracılığı ile anne ve fetus arasındaki iletişimi sağlar. Ortalama 50-60 cm uzunluğunda plasenta diskinin orta ya da ortaya yakın bir kesiminden çıkar (Kayalı 1982). Göbek kordonu kıvrıntılı bir oluşumdur (Kayalı 1982, Tekelioğlu 1982, Arısan 1984). Spiral şeklinde burulmuş olup bunun nedeni herhangi bir bükülmede damarların tıkanmamasını ve kan akımının kesilmemesini sağlamak içindir (Arısan 1984).

Klasik bilgilerimize göre göbek kordonunun temel olarak histolojik yapısı dıştan içe doğru; amniyon epiteli, Wharton jeli, 2 arter, 1 ven ve allantois kalıntısıdır. Göbek kordonunun yapısında damar sistemi olarak iki artere karşı bir ven bulunmaktadır. Fötal hayatta anne ve fetus arasındaki kan akışı alışılmışın dışında bir özellik gösterir. Arterler içinde kirli kan ven içinde ise temiz kan dolaşır. Dolaşımın yönü arterler içinde fetüsten anneye doğru ven içinde ise anneden fetüse doğrudur.

Göbek kordonunun arter ve ven yapısı histolojik olarak insan organizmasında ayrıcalıklı damar yapısının en dışında bulunan tunica adventisiya dan yoksundur. Damarlar göbek kordonunda dıştan mukoz bir bağ doku (Wharton jeli) ile kuşatılmışlardır. Dolayısıyla diğer sistemlere ait damarların aksine göbek kordon damarlarının inervasyonu yoktur.

Kord kanında lenfosit oranı normal periferik kana göre oldukça yüksektir. Bunun nedeni hala bilinmemekle birlikte araştırılmaktadır. Bilim adamları lenfosit kaynağının kemik iliğinden olan hematopoetik hücrelerden olabileceğini ve doğumdaki anoksik stres sonucu sirkülasyona geçebileceğini düşünmektedir (Granham and Sutherland 1987).

Kord kanının mitotik aktivitesi yüksek lenfositler içermesi direk yöntemle fetal karyotip yapılmasına olanak sağlayabilmektedir. Böylece kısa zamanda sonuç alınabilecek ve rutine sokulabilecek bir yöntemin oluşturulmasında kullanılabilir.

Konjenital malformasyonlu yenidoğanlarda tedavi şeklinin ve prognozun saptanabilmesi için yenidoğanın kromozom kuruluşunun saptanması, sonuca göre aileye gerekli bilgi verilerek varsa tedavinin uygulanması gerekmektedir. Ancak erken dönemde ölüm oranının yüksek olması malformasyonlu yeni doğanlarda bilgi edinebilme olanağını kısıtlı hale getirmektedir. Standart lenfosit kültürü ile kromozom analizi zaman alıcı olduğundan yenidoğan hakkında bilgi edinebilme kısıtlı olmaktadır. Kromozomal sendrom şüphesi olan malformasyonlu infantların karyotiplerinin hemen saptanabileceği yöntemler gerekmektedir.

Kromozom analizi prensip olarak mitoz bölünmenin gerçekleştiği tüm dokularda uygulanabilmektedir. Ancak hızlı karyotipin elde edilebilmesi için en uygun olanı kemik iliğidir (Francke et al. 1979). Kemik iliğinden direk kromozom analizi ilk olarak Smithies ve Valman (1974) tarafından Down sendromlu bir yenidoğanda uygulanmış Gang (et al. 1974) tarafından modifiye edilerek daha kısa zamanda sonuç elde etme olanağı sağlamıştır. Ancak bu yöntem 1979 yılına kadar rutin olarak uygulanmamıştır. Francke (1979) 15 yenidoğanda kemik iliği direk kromozom analizi yöntemini uygulamıştır. Değerlendirmeler sonucunda kemik iliği hücrelerinde kromozomal tanı endikasyonlarının kesin olarak belirlenmesi gerektiğinin, nedeni bilinmeyen malformasyon sendromlu olgularda kemik iliği analizinin uygulanmasının uygun olmadığını bildirmişlerdir. Standart lenfosit kültürüne göre örneği elde etme zorluğu, metafaz plaklarının kalitesinin yetersiz olması ve küçük yapısal

kromozom anomalilerini saptama zorluğu gibi işlemler kemik iliğinden direkt kromozom analizinin dezavantajları olarak bildirilmektedir.

Kemik iliği örneğinin elde edilmesindeki zorluklar ve metafaz plaklarının analizinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle malformasyonlu yenidoğanların tedavi ve prognozlarının saptanabilmesi için yapılan çalışmalar sonucunda Granham ve Sutherland (1987) tarafından kord kanından direk kromozom analizi yöntemi ortaya atılmıştır. Doğumdan sonraki birkaç saat içerisinde infant karyotipin saptanabildiği bu yöntem Day (et al. 1988) tarafından da uygulanmıştır.

Kordosentez ile elde edilen fetal kan 48-72 saat süre ile kültüre edilmekte ve standart teknik ile metafaz plakları elde edilebilmektedir. Ancak yenidoğanda gerçekleştirilen kord kanında direk kromozom analizi yönteminin kordosentezle elde edilen fetal kana modifiye edilmesi ile tekniğin uygulandığı gün fetal karyotip elde etme olanağı olacaktır. Bu yöntemin uygulanması tanıda büyük bir kolaylık sağlayacaktır.

Kalıtsal nitelikli hastalıklarda hastalığın erken teşhisi aileye en kısa sürede genetik danışma verilmesine yardımcı olmaktadır. Bilindiği üzere genetik danışma; herhangi bir hastalık riski taşıyan herhangi bir kişinin kendisi, çocukları ya da akrabalarında bu kalıtsal hastalığın tekrarlama ya da ortaya çıkma olasılığının hesaplanarak ilgili kişiye anlatılması ve sorunun çözülmesi için gerekli işlemlerin yapılmasında aileye yol gösterilmesidir. Bu yönde yapılan çalışmaların sonundaki karar aileye bırakılmaktadır.

3. GEREÇ - YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışma kord kanından kısa sürede kromozom analizinin yapılabilmesi bakımından önemli olan ve sonuca çabuk ulaşmayı sağlayan direkt kromozom analizi yöntemi (rapid karyotyping)'nin rutine sokulması ve bu yöntemle elde edilecek metafaz plaklarının kalite bakımından periferik kan kültürü yöntemiyle elde edilenlerle karşılaştırılması olarak planlandı.

Aralık 1990 - Haziran 1991 tarihleri arasında Eskişehir Sağlık Müdürlüğü Doğum ve Çocuk Bakımevi'nde miyadında ve normal doğan, doğum sonrasında gerçekleştirilen fizik muayenede herhangi bir malformasyon saptanmayan 25 yenidoğanın; kısa adı GENTAM olan Anadolu Üniversitesi Rektörlüğü Genetik Hastalıkları Doğumöncesi Tanı ve Biyoteknoloji Uygulama Araştırma Merkezi'nde kromozom kuruluşları bakımından değerlendirilmesi programlandı.

Araştırma iki bölümden oluştu. İlk bölümde kord kanından direkt kromozom analizi yönteminin uygulanmaya konulması, ikinci bölümde ise yine kord kanından direkt yöntemle elde edilen metafaz plaklarının kord kanı ve yenidoğan periferik kanından standart kültür yöntemiyle elde edilenlerle karşılaştırılması ve direkt yöntemin rutinde uygulanabilirliğinin ortaya konulması yer aldı.

Direkt yöntemle kromozom analizi işlemlerinde Granham ve Sutherland (1987)'ın kullandığı yöntem ile Francke ve arkadaşları (1979) tarafından geliştirilen yöntemlerden yararlanıldı.

Periferik kan kültür yöntemi olarak halen GENTAM laboratuvarlarında kullanılan ve Başaran (1982) tarafından modifiye edilen standart kültür yöntemi uygulandı. Çalışma süresince aşağıda verilen besiyerleri, kimyasal maddeler ve tamponlar kullanıldı.

3.1.1. Kullanılan kültür ortamı

a) Direkt yöntem için

- RPMI-1640/Ham's F-10/Mc Coy's 100 ml. (Gibco)
- Newborn Bovine Serum %10 ml. (Gibco)

b) Kültür yöntemi için

- RPMI-1640/Ham's F-10/Mc Coy's 100 ml. (Gibco)
- Newborn Bovine Serum %20 ml. (Gibco)
- Phytohemagglutinin % 4.5ml. (Gibco)
- Penicillin/streptomycin % 1 ml. (Gibco)

3.1.2. Kimyasal maddeler

- a) Heparin (Liquemine, Roch)
- b) Potasyum Klorür (Merck)

- c) Glacial acetic acid (Merck)
- d) Methanol (Merck)
- e) Giemsa Lösung (Merck)
- f) Xylol (Merck)
- g) Entellan (Merck)
- 1) Alkol
- i) Serum Fizyolojik
- j) Trypsin (Gibco)
- k) Sodyum Klorür (Sigma)
- l) Trisodyum Sitrat ($2H_2O$) (Sigma)
- m) KH_2PO_4 (Sigma)
- n) $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Sigma)
- o) Colcemid (Gibco)

3.1.3. Solüsyonlar

a) Tesbit solüsyonu

3 kısım methanol / 1 kısım glacial asetic acid

b) Hipotonik (KCl) solüsyonu

1) 0.047 M KCl Solüsyonu

KCl 0.3504 gr.
Distile su 100 ml.

ii) 0.075 M KCl Solüsyonu

KCl 0.5592 gr.
Distile su 100 ml.

c) Giemsa Trypsin Giemsa bantlama solüsyonları

i) 2xSSC solüsyonu

Sodyum klorür (NaCl)	17.53 gr.
Sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)	8.82 gr.
Distile su ile tamamla	1000 ml.

ii) Buffer solüsyonları (pH = 6.8)

A solüsyonu (stok)

Potasyum fosfat (KH_2PO_4)	4.539 gr.
Distile su ile tamamla	500 ml.

B solüsyonu (stok)

Sodyum Fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	5.938 gr.
Distile su ile tamamla	500 ml.

Çalışma solüsyonu (pH = 6.8)

Solüsyon A	50.8 ml.
Solüsyon B	49.2 ml.

iii) Trypsin solüsyonu

Stok solüsyon

Trypsin	25 gr.
Serum Fizyolojik	10 ml.

Çalışma solüsyonu

Trypsin stok solüsyonu	1.75 ml.
Serum Fizyolojik	40 ml.

iv) Giemsa solüsyonu

Giemsa	15 ml.
Buffer (pH = 6.8)	60 ml.

d) Klasik Giemsa boya solüsyonu

Distile su	95 ml.
Giemsa	5 ml.

3.1.4. Aygıtlar ve Gereçler

- a) Etüv
- b) Lamin Air
- c) Bünzen beki
- d) Santrifüj
- e) Binoküler araştırma mikroskobu
- f) Fotomikroskop
- g) Elektronik duyarlı terazi
- h) Digital pH metre

- ı) Higrometre
- ı) Değişik hacimde enjektörler
- j) 10 ml'lik disposabl tüpler

Cam Malzeme

- k) 15 ml'lik konik dereceli santrifüj tüpleri
- l) Mezürler
- m) şaleler
- n) Lam
- o) Lamel (24 x 32)

ö) Fotoğraf Filmi (25 ASA)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kromozom elde etme yöntemi

Araştırmada kord kanından direkt yöntemle kromozom analizi Granham ve Sutherland'ın (1987) bildirdiği yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Kord kanı ve periferik kan kültür çalışmalarında ise standart lenfosit kültür yöntemi uygulandı.

3.2.1.A) Direkt yöntem

i- Kullanılan Kültür Ortamı

%10 Newborn Bovine Serum (Gibco) ile zenginleştirilmiş RPMI-1640(Gibco) besiyeri olarak kullanıldı. Çeşitli besiyerleri (Ham's F-10, Mc Coy's) ve serumlar (Fetal calf, Fetal bovine, Newborn calf, Newborn bovine serum) denendi. Daha önceden hazırlanan besiyeri ekim öncesinde 37 °C'ye getirildi ve tüplere 5'er ml. konuldu.

ii- Yöntem

Kord kanında direkt yöntemle kromozom analizi için Granham ve Sutherland'ın (1987) bildirdiği yöntem değişik yönleriyle modifiye edilerek uygulandı. Bu çalışmanın ilk amacı direkt yöntemi rutinde uygulanabilir duruma getirmek olduğundan her yenidoğana ilişkin kord kanı en iyi metafaz plakları elde edilinceye kadar yöntemde değişiklikler yapılarak çalışmalar sürdürüldü. Asıl yöntemde çalışmanın her basamağında çeşitli alternatifler tek tek denenerek en iyi metafaz plakları elde edilmeye çalışılmıştır. Her ekim veya çalışmada diğerleri sabit tutulurken sadece bir veri değiştirilerek değerlendirilmeye gidildi. Bunlar;

- Kanın alınışı ile ekilişi arasındaki süre (1 saatten-48 saate kadar)
- Çeşitli besiyeri solüsyonları (RPMI-1640, Mc Coy's, Ham's F-10)

- Serum çeşitleri
(Fetal calf serum, Fetal bovine serum,
Newborn calf serum, Newborne bovine serum)
- Kültür süresi
(1 saatten 3 saate kadar)
- Colcemid miktarı
(0.01 Mg/ml - 0.02 Mg/ml)
- Colcemid süresi
(3 saatten 15 dakikaya kadar)
- Hipotonik solüsyon (KCl) konsantrasyonu
(0.075M ve 0.047M)
- Hipotonik solüsyon (KCl) ile inkübasyon
süresi (10 dakikadan 45 dakikaya kadar)
- Hipotonik solüsyon (KCl) inkübasyonundan
sonra tesbitin hipotonik solüsyon
(KCl)+hücre süspansiyonu üzerine direk
ilavesi ve supernatant alındıktan sonra
tesbit solüsyonu eklenmesi
- Soğutulmuş lam ve oda ısısında lamlarla
preperasyon işlemi

Yukarıda verilen değişiklikler denenerek yöntemde en kaliteli metafaz plaklarının elde edilebileceği asıl yönteme varılmaya çalışılmıştır.

Olgulardan alınan kord kanının GENTAM sitogenetik laboratuvarına ulaştırılmasından sonra birkaç saat içinde karyotipin saptanabildiği bu yöntem aşağıda verilen şekilde aşama aşama uygulandı;

- a) Heparinli disposable enjektöre doğum sırasında 5ml kord kanı alındı.
- b) GENTAM sitogenetik laboratuvarına ulaştırılan kan örnekleri önceden 37°C'ye getirilmiş besiyerine 0.5-1 ml miktarında (20-25 damla) ekilerek kültüre edildi. Çalışmamızda bir saatten üç saate kadar kültür süreleri denendi ve en iyi sonuç 2 saat 4 dakikalık sürede alındı.
- c) Her bir tüpe 2 saat 45 dakika sonunda 0.02 Mg/ml colcemid eklenerek süre sonuna kadar inkübasyona devam edildi.
- d) Süre sonunda tüpler 1200 rpmde 10 dakika santrifüj edildi.
- e) Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve 0.075M ve 0.047M'lık iki farklı konsantrasyondaki KCl solüsyonundan 7'şer ml tüplere ayrı ayrı eklenerek 37°C'de 10 dakikadan 45 dakikaya kadar farklı sürelerde denenerek inkübe edildi. En iyi sonuç 0.047M konsantrasyondaki KCl solüsyonu ile 45 dakikalık inkübasyonda alındı.
- f) Süre sonunda her bir tüpe iki farklı yöntem denenecek vortex yardımı ile Carnoy fiksatif (3 kısım metanol/1 kısım glacial acetic acid) ilave edildi. Tüplerden bir kısmına KCl+hücre süspansiyonu üzerine 3 ml fiksatif eklendi. Bir kısmında ise süpernatant atıldıktan sonra 5 ml fiksatif ilave edildi. Supernatantın alınmasından sonra fiksatif eklenen

tüplerde koagülasyon görüldü ve iyi sonuç alınmadı. KCl + hücre süspansiyonuna ilave edilen fiksatif fiksasyonu kademeli olarak gerçekleştirdiğinden daha iyi sonuç alındı ve koagülasyon görülmedi.

- g) 10 dakikalık santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve pellet üzerine 5 ml fiksatif eklenerek tekrar 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek tüp dibinde 0.5 ml solüsyon kalana kadar süpernatant atıldı.
- h) Pellet pipetaj edildikten sonra önceden hazırlanan lamlara yayıldı.

iii- Preperat Hazırlama

Preparasyon için lamlara her olgunun ayrı ayrı protokol numarası verildikten sonra iki farklı işleme tabi tutulmuş lamlar kullanıldı. %96'lık alkole konup 1-2 saat bekletilmiş, üç kez distile su ile yıkanmış bir grup lam gazlı bezle silinip preperasyona hazır hale getirilirken bir grup lam 3-4 saat +4°C'de soğutulduktan sonra preperasyon için kullanıldı.

- a) Oda ısısında olan lamlara hohlandıktan sonra pastör pipetine çekilen süspansiyondan 45°'lik açı ile 20-25 cm uzaklıktan 3-4 damla damlatıldı.
- b) Preperatlar kuruduktan sonra klasik giemsa ve GTG bantlama teknikleri uygulanarak boyandı.

3.2.1.B) Kültür yöntemi

i- Kullanılan Kültür Ortamı

%20 Newborn bovine serum, %4.5 PHA ve %1 Penicillin/ Streptomycin ile desteklenen RPMI-1640, veya Ham's F-10 veya Mc Coy's besiyerleri önceden hazırlanarak 37°C'ye getirildi.

ii- Yöntem

Periferik kandan lenfosit kültür yöntemi olarak halen GENTAM laboratuvarlarında uygulanan ve Başaran (1982) tarafından modifiye edilen standart kültür yöntemi kullanıldı.

Periferik kan lenfosit kültür yöntemi kord kanı ve yenidoğandan alınan periferik kana uygulandı. Bu yöntemin aşamaları sırası ile aşağıda verilmiştir:

- a) Her olguya ilişkin kord ve yenidoğan periferik kan örnekleri tüplerde bulunan besiyerlerine ayrı ayrı 13-15 damla ekildi ve 37°C de 72 saat kültüre edildi.
- b) Kültürün 70. saatinde her tüpe 0.01 µg/ml colcemid konarak 2 saat kültüre devam edildi.
- c) 72. saatin sonunda tüpler 1200 rpm de 10 dakika

santrifüj edildi.

- d) Supernatant atılıp pellet üzerine 0.075 M KCl solüsyonu eklenerek 20 dakika 37°C de bekletildi.
- e) Süre sonunda 1200 rpm de 10 dakika santrifüj edilen tüplerden supernatant atılarak taze hazırlanmış 5 ml. Carnoy fiksatifli vortex eşliğinde damla damla eklenerek tüpler tekrar santrifüj edildi.
- f) Yukarıdaki işlemler 3 kez tekrarlandı.
- g) Son santrifüjden sonra supernatant tüp dibinde 0.5 ml. kalacak şekilde dikkatlice alındı ve hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak karıştırıldı.

iii- Preperat hazırlama

Preperasyon için lamlara olgunun protokol numarası verildi. Daha sonra % 96 lık alkolde 1-2 saat bekletilip distile su ile 3 kez yıkandıktan sonra temiz gazlı bezle silinip hazırlandı.

- a) Oda ısısında olan lamlara hohlandıktan sonra pastör pipetine çekilen süspansiyondan 45° lik açı ile 20-25 cm. uzaklıktan 3-4 damla damlatıldı.

- b) Preperatlar kuruduktan sonra klasik giemsa ve GTG bantlama teknikleri uygulanarak boyandı.

3.2.2. Boyama yöntemleri

Gerek direkt gerekse kültür yöntemi ile elde edilen metafaz plakları klasik giemsa ve GTG bantlama teknikleri uygulanarak boyandı.

3.2.2.A) Klasik giemsa boyama yöntemi

- a) Kurumuş preperatlar içerisinde % 5 lik giemsa boya solusyonu bulunan şalede 4 dakika bekletildi.
- b) Boyanan preperatlar distile su dolu şalede çalkalanarak çıkarıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- c) Kuruyan preperatlar ksilolden geçirildikten sonra entellan ile lamel kapatılarak incelenmek üzere saklandı.

3.2.2.B) Giemsa-Trypsin-Giemsa bantlama yöntemi (GTG)

- a) Havada kurutulan preperatlar 2xSSC solusyonunda bir gece bırakıldı.
- b) Ertesi sabah 2xSSC solüsyonundan çıkarılan preperatlar 10 dakika tuz solüsyonunda bekletildi.
- c) Bundan sonra preperatlar % 70, % 95, % 100 lük alkol serilerinde 2şer dakika tutularak geçirildi.
- d) Alkolden çıkarılan preperatlar havada kurutuldu.
- e) Kuruyan preperatlar 65-90 saniye kadar trypsin solüsyonunda bekletildi.
- f) Trypsinden çıkarılan preperatlar içinde tuz bulunan şalede 1 dakika tutuldu.
- g) Daha sonra preperatlar 4 dakika boya (Giemsa-buffer) şalesinde bekletildi.
- h) Boyanan preperatlar son iki buffer şalesinde birer dakika tutularak çıkarıldı ve kurumaya bırakıldı.
- ı) Havada kurutulan preperatlar ksilolden geçirildi, entellan ile lamel kapatılarak incelenmek üzere saklandı.

3.2.3. Değerlendirme

Üzerine ait olduğu kişinin protokol ve preperat numarası yazılı preperatlar, mikroskopta değerlendirilmeye alındı. Önce küçük büyütmeli objektifle taranarak iyi nitelikli metafaz plaklarının kodları sonra incelenmek üzere yazıldı. Tarama bittikten sonra plaklar immersiyon objektifi ile incelenerek sırasıyla şu işlemler yapıldı;

a) Direkt yöntemle çalışılan kord kanında her olgu için 10 kaliteli metafaz plağı;

- Kanının alınışı ile ekimi arasında geçen süre
- Ekimin yapıldığı besiyeri
- Kullanılmış olan serum
- Kültür süresi
- Kullanılan colcemid miktarı
- Colcemid süresi
- Kullanılan hipotonik solusyon (KCl) konsantrasyonu
- Hipotonik solüsyon (KCl) ile inkübasyon süresi
- Hipotonik solüsyon (KCl) inkübasyonundan sonra tesbitin hipotonik solüsyon (KCl)+hücre süspansiyonu üzerine veya supernatantın atılmasından sonra pellet üzerine ilavesi
- Lam özelliğı açısından değerlendirildi.

Bu özellikler bakımından farklılık gösteren yöntem sonucunda metafaz plaklarına olumlu ya da olumsuz etkiler incelendi. Sonuçta en

kaliteli metafaz plaklarının elde edildiği ve rutinde kullanılabilecek yöntem geliştirildi.

- b) Lenfosit kültür yöntemiyle çalışılan kord kanı ve yenidoğan periferik kanında her olgu için 25'er kaliteli metafaz plağı değerlendirilmeye alındı.
- c) Yenidoğana ait değerlendirmede; kord kanından direkt yöntemle elde edilen metafaz plakları, kord kanından kültür yöntemiyle elde edilen metafaz plakları, yenidoğan periferik kanından kültür yöntemiyle elde edilen metafaz plakları

- Metafaz plaklarının sayısı ve kalitesi
- Kromozom morfolojisi ve bant özellikleri

açısından değerlendirildi. Yöntemler karşılaştırılarak benzerlik ya da farklılıklar ortaya kondu.

Uygun ve kaliteli metafaz plakları seçilerek her olgu ve üç ayrı çalışma için fotoğraf çekildi. Fotoğraflar immersiyon objektifi ve düşük ASA'lı bir film kullanılarak gerçekleştirildi. Her pozdan üç adet tab edilerek fotoğraf kartına basıldı. Kartlara basılan fotoğraflardan biri kontrol olarak bırakıldı diğer ikisinden karyotip hazırlanarak kromozomlar karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Kord kanından sonuca çabuk ulaşmayı sağlayan direkt kromozom analizi yönteminin rutin olarak kullanılabilmesi amacıyla planlanan bu çalışma Aralık 1990 - Haziran 1991 tarihleri arasında Eskişehir Sağlık Müdürlüğü Doğum ve Çocuk Bakımevinden sağlanan toplam 25 yenidoğandan alınan materyal ile GENTAM laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Miadında ve normal doğan, doğum sonrası fizik muayenede herhangi bir malformasyon saptanmayan 25 yenidoğan kromozom kuruluşu bakımından incelendi (Çizelge 4.1).

Çalışma iki bölümden oluştu. İlk bölümde doğum sırasında alınan kord kanından en iyi metafaz plakları elde edilinceye kadar direkt kromozom analizi yönteminde modifiye işlemleri sürdürüldü. Metafaz plakları kalite ve sayı olarak, kromozom morfolojisi ve bant özellikleri açısından değerlendirilerek en iyi sonucun elde edildiği yöntem ortaya konmaya çalışıldı.

İkinci bölümde yine 25 kord kanı örneği ve 25 bebekten alınan periferik kan örneği kültüre edildi. Bu yolla elde edilen metafaz plaklarının, kord kanından direkt analiz yöntemiyle elde edilenlerle karşılaştırılması yapıldı. Bu karşılaştırma ve değerlendirme sonucunda her iki yöntemde de

aynı kalitede metafaz plakları saptandı ve kord kanından direkt kromozom analizinin rutin olarak uygulanabilirliği görüldü (Çizelge 4.1).

Direkt yöntemle çalışılan 25 kord kanı örneğinde kromozom kuruluşu 10 örnekte 46,XX; 15 örnekte ise 46,XY olarak saptanırken kültür yöntemiyle çalışılan kord kanı örneklerinde de benzer kromozom kuruluşları gözlemlendi (Çizelge 4.1). Yine kültür yöntemiyle çalışılan 25 yenidoğandan alınan periferik kandan elde edilen metafaz plaklarının kromozom kuruluşları benzer olarak saptandı (Çizelge 4.2). Sonuçta her üç çalışmada da her olguya ilişkin aynı kromozom kuruluşu gözlemlendi.

Direkt kromozom analizi yönteminde en kaliteli metafaz plaklarının elde edilmesi için şu parametreler denenerek değerlendirilmeye alındı:

4.1. Kord Kanının Alınışı İle Ekim Arasında Geçen Süre

25 olguda korddan kan alınışı ile ekim zamanı arasında 1 saatten 48 saate kadar farklı süreler denendi (Çizelge 4.3). Ekilen kan örneği sayısı denenen süre başına en az üç olarak gerçekleşti. Aynı olguya ve farklı olgulara ait kan örnekleri farklı zamanlarda ekildi. En uygun sürenin bulunmasında ekim başına saptanan toplam metafaz plaklarının sayısı dikkate alındı. En iyi sonuç kan alındıktan 3 ve 10 saat sonra yapılan ekimlerden alındı. Ekim başına kaliteli plak sayısı 3 saat için 4.6 plak iken 10 saat için 4.4 plaktır. Daha sonra 8 ve 12 saat sonra yapılan ekimler gelmektedir. 1, 2 ve 5 saat sonra yapılan metafaz plak sayısı (ekim başına yaklaşık

3-3.5 plak) pek farklılık göstermemekle birlikte 3 ve 10 saat sonra yapılan ekimlerde elde edilen metafaz plak sayılarından az olmaktadır. 1, 2 ve 5 saat sonra yapılan ekimlerde ekim başına saptanan metafaz plak sayısında düşme görüldü. Kan alımından 24 ve 48 saat sonra yapılan ekimlerde ekim başına saptanan metafaz plak sayısı diğerlerine göre çok az olup (ekim başına yaklaşık 0-1) bazı örneklerden yapılan ekimlerde hiç plak gözlenmedi (Çizelge 4.3).

4.2. Ekimde Kullanılan Besiyeri Solüsyonları

Kord kanından direkt kromozom analizi yönteminde kanın ekimi sırasında üç besiyeri denendi. Bunlar, RPMI-1640, Mc Coy's ve Ham's F-10 dur (Çizelge 4.4). Aynı veya farklı olgulara ait kan örnekleri üç ayrı besiyerine ekilerek en iyi sonucun alındığı besiyerinin bulunmasında ekim başına saptanan toplam metafaz plak sayısı dikkate alındı. Buna göre en fazla metafaz plak sayısı RPMI-1640 la hazırlanan besiyerine ekilen kan örneklerinden elde edildi (Çizelge 4.4). Bu besiyerinde ekim başına saptanan toplam metafaz plak sayısı 4.6 kadardır.

Büyük bir fark olmamakla birlikte Mc Coy's ve Ham's F-10 la hazırlanan besiyerine ekilen kan örneklerinden elde edilen metafaz plaklarının sayısı (ekim başına Mc Coy's için 4.2, Ham's F-10 için 3.4) daha azdır (Çizelge 4.4). Mc Coy's ve Ham's F-10 la hazırlanan besiyerine ekilen kan örneklerinden elde edilen metafaz plak sayıları birbirine yakın olmakla birlikte Mc Coy's la hazırlanan besiyerinden ekim başına elde edilen metafaz plaklarının sayısı Ham's F-10'a göre

fazladır (Çizelge 4.4). Bu sonuca göre çalışmalarda RPMI-1640 tercih edilmekle beraber her üç besiyeri de kültür çalışmalarında kullanılabilir.

4.3. Besiyeri Hazırlamada Kullanılan Serum

Direkt çalışmada kord kanının ekimi için hazırlanan besiyerine katılmak üzere dört çeşit serum denendi. Bunlar fetal bovine serum, fetal calf serum, newborn bovine serum, newborn calf serumdur (Çizelge 4.5).

Farklı serum katılarak hazırlanan besiyerine yapılan ekimlerde ekim başına elde edilen metafaz plak sayılarına göre en iyi sonuç newborn bovine serumla alındı (Çizelge 4.5). Newborn bovine serumla yapılan çalışma sonucunda ekim başına 6.2 kadar metafaz plağı elde edilirken, newborn calf serumun kullanımında 5.9, fetal calf serumda 1.5 ve fetal bovine serumda 0.8 metafaz plağı elde edilebildi. Ekim başına elde edilen metafaz plak sayısı dikkate alınarak yapılan değerlendirme sonucunda; ikinci sırayı newborn calf serum alırken , fetal calf ve fetal bovine serumun kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar birbirine yakındı en az plak bu çalışmalarda gözlemlendi.

4.4. Kültür Süresi

Kord kanından direkt kromozom analizinde ekilen kan örnekleri 1 saatten 3 saate kadar değişen farklı sürelerde kültüre edildi. Denenen değişik kültür süreleri içinde en uygun kültür süresinin seçimindeyse yine ekim başına elde edilen toplam metafaz plak sayısı dikkate alındı ve buna göre en iyi sonuç 2 saat 45 dakikalık kültür süresinde alındı (Çizelge 4.6). Bu kültür süresinde saptanan toplam metafaz plak sayısı 92 dir. 1 Saat, 1 saat 30 dakika, 1 saat 45 dakika, 2 saat ve 3 saat lik kültür sürelerinde ekim başına saptanan plak sayıları 2 saat 45 dakikalık süreye oranla oldukça düşük görüldü. Başarılı sonuç bakımından 2 saat 30 dakikalık kültür süresi ikinci sırayı, 2 saat 15 dakikalık kültür süresi ise üçüncü sırayı aldı (Çizelge 4.6).

4.5. Colcemid Konsantrasyonu

Kord kanından direkt kromozom analizi çalışmalarında iki colcemid konsantrasyonu denendi. Bunlar 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ve 0.02 $\mu\text{g/ml}$ idi. Kültüre 0.01 $\mu\text{g/ml}$ colcemid katıldığında ekim başına saptanan metafaz plak sayısı 1.96 iken, 0.02 $\mu\text{g/ml}$ colcemid katılan kültürlerden ekim başına elde edilen plak sayısı 5.78 dir (Çizelge 4.7). 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 'lik colcemid konsantrasyonunun bu çalışmalarda daha uygun olduğu ortaya kondu.

4.6. Colcemid Süresi

Direkt kromozom analizi çalışmalarında kültür süresi ve colcemid miktarı ile birlikte en uygun colcemid inkübasyon süresi de bulunmaya çalışıldı. Colcemidle inkübasyon süresi 3 saatten 15 dakikaya kadar denenerek düşürüldü (Çizelge 4.8). 3 saatlik colcemid inkübasyon süresi, colcemidin başlangıçta besiyerine ilavesi ile sağlandı.

Denenen farklı colcemid inkübasyon süreleri (Çizelge 4.8) içinde en iyi sonuç 15 dakikalık süre sonunda alındı. Uygun inkübasyon süresi, ekim başına saptanan metafaz plaklarının sayısına göre belirlendi (Çizelge 4.8). Buna göre 15 dakikalık inkübasyon süresinde ekim başına saptanan metafaz plak sayısı 6.3, 30 dakikalıkta 4.6, 45 dakikalıkta 3.0, 60, 75, 90 dakikalık inkübasyonlarda 2.1-2.2, 120 dakikalıkta 1.4 ve de 180 dakikalık inkübasyonda 3.5 dir. Uzun süreli colcemid inkübasyonunda kromozomlarda kısalma ve hiperplooidiler gözlemlendi.

4.7. Hipotonik Solüsyon (KCl) Konsantrasyonu

Kord kanından direkt kromozom analizinde farklı molaritede iki KCl konsantrasyonu denendi. KCl inkübasyonu için 33 ekimde 0.047 M lık KCl solüsyonu ve yine 33 ekimde 0.075 M lık KCl solüsyonu kullanıldı (Çizelge 4.9). 0.047 M lık KCl solüsyonu muamelesi gören hücrelerden elde edilen plakların 0.075 M lığa oranla çok daha kaliteli olduğu gözlemlendi. 0.047 M lık KCl solüsyonu konsantrasyonu ile muamele edilen hücrelerden

ekim başına elde edilen metafaz plakları 0.075 M'lık KCl solüsyonunun kullanımıyla elde edilenlere oranla daha iyi dağılım ve daha iyi morfoloji gösterdikleri gözlemlendi. 0.047 M'lık KCl solüsyonu kullanımında ekim başına 5.7 kadar metafaz plağı elde edilirken, 0.075 M'lık KCl kullanımında 1.9 kadar metafaz plağı gözlenebildi (Çizelge 4.9).

4.8. Hipotonik Solüsyon (KCl) İnkübasyon Süresi

Kord kanında direkt kromozom analiz çalışmasının bu aşamasında altı farklı inkübasyon süresi denendi. İnkübasyon süreleri 10 dakikadan 45 dakikaya kadar değişmekteydi (Çizelge 4.10). Ekim başına saptanan toplam metafaz sayısı 6.1 olarak bulundu ve böylelikle en iyi sonuç 45 dakikadaki KCl inkübasyonunda alındı. 40 dakikalık KCl inkübasyonunda da plak sayısı 5.4 olarak bulundu. 40 ve 45 dakikalık inkübasyon süreleri sonunda gözlenen metafaz plaklarında kromozomlar ayrılabilir ve sayılabilir kalitedeydi. Diğer inkübasyon sürelerinde saptanan plaklarda kromozomların ayrılamadığı ve iç içe bir konumda olduğu gözlemlendi.

4.9. Tesbit Solüsyonunun Hipotonik Solüsyon (KCl) + Hücre Süspansiyonu Üzerine Direkt İlâvesi veya Pellet Üzerine İlavesi

Çalışmamızda; direkt kromozom analizi yönteminde ekilen kan miktarı (0.5 - 1 ml) kültür yönteminde uygulanan miktara (12 - 13 damla) oranla daha fazlaydı. Bu nedenle

eritrosit oranı da artmıştır. Tesbit solüsyonunun KCl solüsyonu ile inkübasyondan sonra supernatantın alınmasıyla pellet üzerine direkt ilavesinin koagülasyona neden olduğu gözlemlendi. Koagülasyon nedeniyle preperasyon yapılamadı ve sonuç elde edilemedi. Sonuçta bu yöntem birkaç çalışmadan sonra bırakıldı. Hiç metafaz plağı elde edilemediğinden değerlendirilmeye de alınmadı.

Çalışma süresince eritrositlerin kademeli fiksasyonunu sağlamak amacıyla KCl solüsyonu + hücre süspansiyonuna az bir tesbit solüsyonu ilave edilerek (3 ml) yöntem modifiye edildi. Bu sayede koagülasyon önlenerek kaliteli metafaz plakları gözlemlendi.

4.10. Lam ısısı

Kord kanında direkt kromozom analizinde preperasyon için iki çeşit lam kullanıldı. Lamlar içerisinde %96 lık alkol bulunan bir şaleye konup 1-2 saat bekletildi sonra distile su ile üç kez yıkandı. Lamların yarısı oda ısısında bekletilip gazlı bezle silinerek preperasyonda kullanıldı. Diğer yarısı ise 3-4 saat +4°C'de soğutulduktan sonra kullanıldı.

Preperasyonda kullanılan lamların farklı ısıda bekletilişinin saptanan metafaz plaklarının kalitesini etkilemediği gözlemlendi.

Olguların kord kanından kültür yöntemiyle yapılan kromozom analizi çalışmalarında kromozom kuruluğu 10 olguda 46,XX , 15 olguda 46,XY olarak gözlendi (Çizelge 4.1).

Yenidoğandan periferik kan kültür yöntemiyle yapılan kromozom analizi çalışmalarında yine 10 olguda kromozom kuruluğu 46,XX , 15 olguda 46,XY olarak bulundu (Çizelge 4.2).

Çalışmamızda incelemeye alınan olguların karyotipleri üç çalışmada da aynı olarak bulundu (Çizelge 4.1 - Çizelge 4.2). Direkt çalışmada ekim başına saptanan metafaz plak sayısı kord kültür ve periferik kan kültür yöntemiyle ekim başına elde edilen metafaz plak sayısına göre daha düşük olarak saptandı. Her üç çalışmada da kromozom sayı ve morfolojisinde fark gözlenmedi (Çizelge 4.1 - Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğandan alınan kord kanına uygulanan yöntemler ve saptanan kromozom kuruluşları

Sıra No	Protokol No	Yaş	Gebelik Haftası	Materyal Türü	Direkt Yöntem	Kültür Yöntemi	Saptanan Karyotip
1	91/ K-1	20	36	Kord kanı	+	+	46, XX.
2	91/ K-2	27	36	Kord kanı	+	+	46, XX.
3	91/ K-3	31	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
4	91/ K-4	25	36	Kord kanı	+	+	46, XX.
5	91/ K-5	28	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
6	91/ K-6	35	37	Kord kanı	+	+	46, XX.
7	91/ K-7	22	37	Kord kanı	+	+	46, XX.
8	91/ K-8	21	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
9	91/ K-9	34	36	Kord kanı	+	+	46, XX.
10	91/ K-10	18	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
11	91/ K-11	17	36	Kord kanı	+	+	46, XX.
12	91/ K-12	24	36	Kord kanı	+	+	46, XX.
13	91/ K-13	22	37	Kord kanı	+	+	46, XY.
14	91/ K-14	31	36	Kord kanı	+	+	46, XX.
15	91/ K-15	19	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
16	91/ K-16	27	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
17	91/ K-17	25	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
18	91/ K-18	19	37	Kord kanı	+	+	46, XY.
19	91/ K-19	33	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
20	91/ K-20	28	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
21	91/ K-21	25	36	Kord kanı	+	+	46, XX.
22	91/ K-22	32	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
23	91/ K-23	18	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
24	91/ K-24	21	36	Kord kanı	+	+	46, XY.
25	91/ K-25	20	36	Kord kanı	+	+	46, XY.

Çizelge 4.2. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğandan alınan periferik kandan kültür yöntemi ile saptanan kromozom kuruluşları

Sıra No	Protokol No	Materyal Türü	Saptanan Karyotip
1	91/ B-1	Periferik kan	46, XX.
2	91/ B-2	Periferik kan	46, XX.
3	91/ B-3	Periferik kan	46, XY.
4	91/ B-4	Periferik kan	46, XX.
5	91/ B-5	Periferik kan	46, XY.
6	91/ B-6	Periferik kan	46, XX.
7	91/ B-7	Periferik kan	46, XX.
8	91/ B-8	Periferik kan	46, XY.
9	91/ B-9	Periferik kan	46, XX.
10	91/ B-10	Periferik kan	46, XY.
11	91/ B-11	Periferik kan	46, XX.
12	91/ B-12	Periferik kan	46, XX.
13	91/ B-13	Periferik kan	46, XY.
14	91/ B-14	Periferik kan	46, XX.
15	91/ B-15	Periferik kan	46, XY.
16	91/ B-16	Periferik kan	46, XY.
17	91/ B-17	Periferik kan	46, XY.
18	91/ B-18	Periferik kan	46, XY.
19	91/ B-19	Periferik kan	46, XY.
20	91/ B-20	Periferik kan	46, XY.
21	91/ B-21	Periferik kan	46, XX.
22	91/ B-22	Periferik kan	46, XY.
23	91/ B-23	Periferik kan	46, XY.
24	91/ B-24	Periferik kan	46, XY.
25	91/ B-25	Periferik kan	46, XY.

Çizelge 4.3. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğandan alınan kord kanından kan alımı ile ekim arasında geçen farklı zaman aralıklarına göre saptanan metafaz plak sayısı.

Sıra No	Kan alımı ile ekim arasında geçen zaman (saat)	Ekim sayısı	Uygulanan tetkik türü	Saptanan toplam metafaz sayısı	Ekim başına saptanan toplam metafaz sayısı
1	1	5	D.Y.	18	3.6
2	2	6	D.Y.	24	4.0
3	3	9	D.Y.	42	4.6
4	5	7	D.Y.	28	4.0
5	8	6	D.Y.	25	4.1
6	10	15	D.Y.	63	4.2
7	12	10	D.Y.	53	4.4
8	24	5	D.Y.	2	0.4
9	48	3	D.Y.	1	0.3

D.Y.: Direkt Yöntem

Çizelge 4.4. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğanın kord kanının değişik besiyerleri ile direkt çalışılması sonucu saptanan metafaz plak sayısı

Sıra No	Kullanılan besiyeri	Ekim sayısı	Uygulanan tetkik türü	Saptanan toplam metafaz plak sayısı	Ekim başına saptanan toplam metafaz plak sayısı
1	RPMI-1640	25	D.Y.	115	4.6
2	Mc Coy's	23	D.Y.	98	4.2
3	Ham's F-10	18	D.Y.	62	3.4

Çizelge 4.5. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğanın kord kanının değişik serum çeşitleri katılan besiyeri ile direkt çalışılması sonucu saptanan metafaz plak sayısı

Sıra No	Kullanılan serum	Ekim sayısı	Uygulanan tetkik türü	Saptanan toplam metafaz plak sayısı	Ekim başına saptanan toplam metafaz plak sayısı
1	Fetal bovine	15	D.Y.	12	0.8
2	Fetal calf	15	D.Y.	23	1.5
3	Newbornbovine	21	D.Y.	132	6.2
4	Newborn calf	15	D.Y.	89	5.9

Çizelge 4.6. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğanın kord kanınınin direkt çalışmasında uygulanan farklı kültür sürelerine göre saptanan metafaz plak sayısı

Sıra No	Ekilen materyal türü	Ekim sayısı	Uygulanan tetkik türü	Kültür süresi (dakika)	Saptanan toplam metafaz plak sayısı	Ekim başına saptanan toplam metafaz plak sayısı
1	Kord kanı	5	D.Y.	60	7	1.4
2	Kord kanı	6	D.Y.	90	13	2.1
3	Kord kanı	8	D.Y.	105	18	2.2
4	Kord kanı	8	D.Y.	120	17	2.1
5	Kord kanı	8	D.Y.	135	24	3.0
6	Kord kanı	8	D.Y.	150	37	4.6
7	Kord kanı	15	D.Y.	165	92	6.1
8	Kord kanı	8	D.Y.	180	29	3.6

Çizelge 4.7. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğanın kord kanının değişik colcemid konsantrasyonları ile direkt çalışılması sonucu saptanan metafaz plak sayısı

Sıra No	Colcemid miktarı (µg/ml)	Ekim sayısı	Uygulanan tetkik türü	Saptanan toplam metafaz plak sayısı	Ekim başına saptanan toplam metafaz plak sayısı
1	0.01	33	D.Y.	65	1.9
2	0.02	33	D.Y.	191	5.7

Çizelge 4.8. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğanın kord kanının değişik colcemid süreleri ile direkt çalışılması sonucu saptanan metafaz plak sayısı

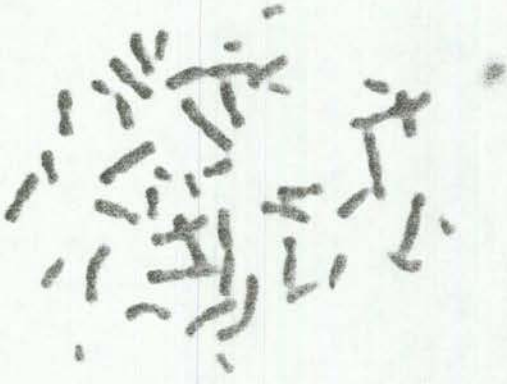
Sıra No	Ekim sayısı	Colcemid süresi (dakika)	Uygulanan tetkik türü	Saptanan toplam metafaz sayısı	Ekim başına saptanan toplam metafaz sayısı
1	15	15	D.Y.	92	6.3
2	8	30	D.Y.	37	4.6
3	8	45	D.Y.	24	3.0
4	8	60	D.Y.	17	2.1
5	8	75	D.Y.	18	2.2
6	6	90	D.Y.	13	2.1
7	5	120	D.Y.	7	1.4
8	8	180	D.Y.	28	3.5

Çizelge 4.9. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğanın kord kanının değişik hipotonik solüsyon konsantrasyonları ile direkt çalışılması sonucu saptanan metafaz plak sayısı

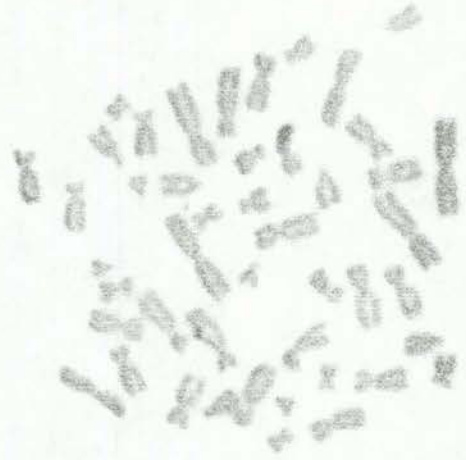
Sıra No	Ekim sayısı	KCl konsantrasyonu (M)	Uygulanan tetkik türü	Saptanan toplam metafaz sayısı	Ekim başına saptanan toplam metafaz sayısı
1	33	0.047	D.Y.	191	5.7
2	33	0.075	D.Y.	65	1.9

Çizelge 4.10. Araştırma grubunu oluşturan toplam 25 yenidoğanın kord kanının değişik hipotonik solüsyon süreleri ile direkt çalışılması sonucu saptanan metafaz plak sayısı

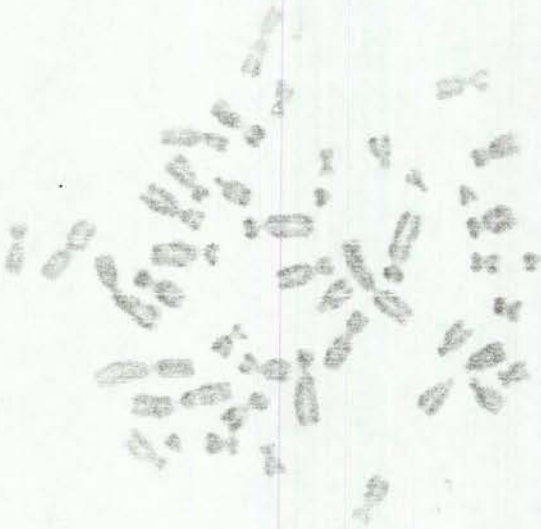
Sıra No	Ekim sayısı	KCl inkübasyon süresi(dakika)	Uygulanan tetkik türü	Saptanan toplam metafaz sayısı	Ekim başına saptanan toplam metafaz sayısı
1	6	10	D.Y.	11	1.8
2	7	15	D.Y.	19	2.7
3	10	20	D.Y.	23	2.3
4	11	30	D.Y.	30	2.7
5	15	40	D.Y.	81	5.4
6	15	45	D.Y.	92	6.1



a



b

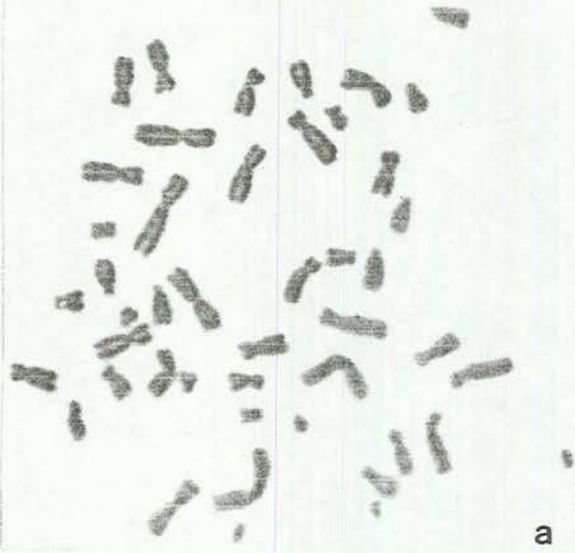


c



d

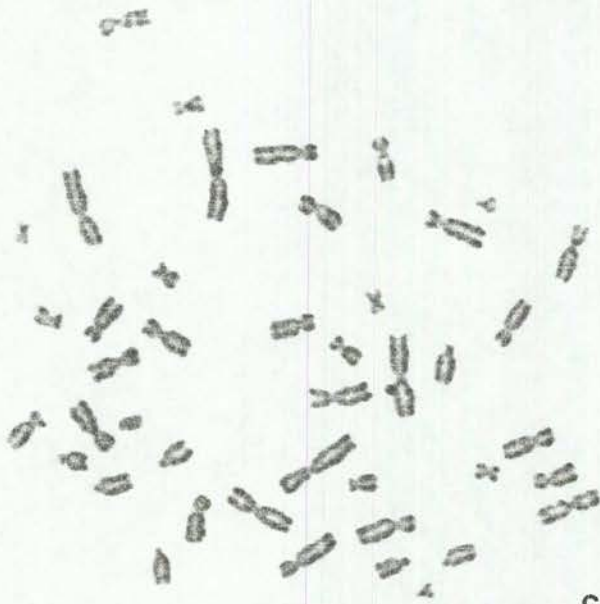
Şekil 4.1. Kord kanından direkt yöntemle elde edilen metafaz plak örnekleri (a,b,c ve d).



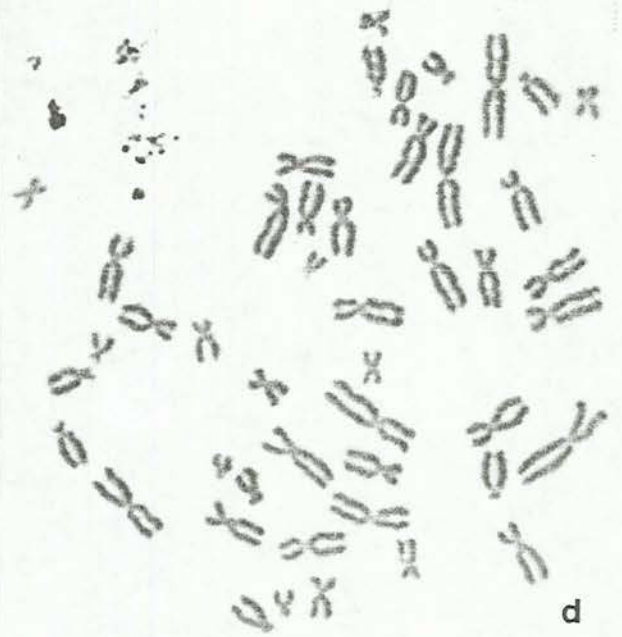
a



b



c



d

Şekil 4.2. Kord kanından kültür yöntemi ile elde edilen metafaz plakları (a,b,c ve d)

5. TARTIŞMA

Giriş bölümünde belirtildiği gibi Eskişehir Doğum ve Çocuk Bakımevi'nden sağlanan toplam 25 olguya ilişkin materyal örnekleri uygun koşullarda GENTAM sitogenetik laboratuvarına ulaştırılarak incelemeye alındı ve araştırma iki aşamada gerçekleştirildi.

Araştırmamızın ilk aşamasında kord kanından direkt kromozom analizi yöntemi ortaya konmaya çalışıldı ve rutinde uygulanabilirliği denendi. İkinci bölümde ise bu yöntemle elde edilen metafaz plaklarının periferik kan örneklerinin kültüre edilmesi sonucu elde edilen plaklarla kalite ve sayı bakımından karşılaştırması yapıldı. Kord kanından direkt kromozom analizinde denenen ve uygulanan parametreler bulgular bölümündeki sıraya göre tartışılacaktır.

5.1. Kord Kanının Alınışı İle Ekimi Arasında Geçen Süre

Araştırmamızı oluşturan 25 kord kanı örneği 1-48 saat süre içinde çalışmaya alındı. En uygun sürenin bulunması ekim başına saptanan toplam metafaz plak sayısına göre değerlendirildi. Yeterli ve kaliteli metafaz plaklarının kan alımı ile ekim arasında geçen 12 saatlik süreye kadar iyi

olduğu gözlemlendi. 12 saatten sonraki süreler de incelenebilir metafaz sayısında azalma olduğu saptandı. Kan alımı ve ekimi arasındaki sürenin 24 ve 48 saat olduğu örneklerde ise hemen hemen hiç metafaz plağına rastlanmadı. Buna göre bizim laboratuvar koşullarımızda sonuca gidebilmede <12 saatlik sürenin optimal süre olduğu ortaya kondu. Diğer taraftan bu alanda araştırma yapan Garnham ve Sutherland (1990) 50 kord kanında yapılan çalışmalarında direkt kromozom analizinde kan alımı ile ekim zamanı arasında geçen sürenin 36 saat ve üstü olabileceği buna karşılık 0-12 saatlik sürede başarı oranının %100 olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde Day ve ark. (1988) da 42 kord örneğinde <81 saate kadar başarılı olduğunu ancak en iyi sonucun <23 saatte alındığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda saptadığımız <12 saatlik optimal süre bu verilere uygunluk göstermektedir.

5.2. Ekimde Kullanılan Besiyeri Solüsyonları

Çalışmamızda kord kanının kültürü için RPMI-1640, Ham's F-10, Mc Coy's olmak üzere üç farklı besiyeri denendi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda besiyerlerinin ekim başına saptanan toplam metafaz sayısı açısından pek farklılık göstermediği ancak RPMI-1640'ın yine ekim başına saptanan metafaz plak sayısı bakımından diğerlerine göre biraz daha iyi sonuç verdiği gözlemlendi. Kord kanında direkt kromozom analizi çalışmalarında diğer araştırmacılar (Garnham and Sutherland 1987, Day et al. 1988) da RPMI-1640 besiyerinin kullanılmasıyla daha uygun sonuç alınacağını belirtmişlerdir. Bulgularımız bu araştırmacıların bulgularıyla paralellik göstermektedir.

5.3. Besiyeri Hazırlamada Kullanılan Serum

Araştırmamızda newborn bovine, newborn calf, fetal bovine, fetal calf olmak üzere dört çeşit serum denendi. Serum konsantrasyonunda değişikliğe gidilmedi ve %10 konsantrasyon sabit tutuldu. Serum çeşitleri karşılaştırıldığında en iyi sonuç newborn bovine serumun kullanıldığı besiyerinde elde edildiği bunu takiben newborn calf serumun geldiği ancak diğer iki serum tipinde plak sayısında belirgin bir azalma olduğu saptandı (Çizelge 3.5). Bu azalmanın nedeni özellikle fetal calf serumun prolifer hücrelere olumsuz etkisi olabilmektedir. Fetal calf serumda çok yüksek miktarda poliamino oksidaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzim prolifer hücrelerce salgılanan spermin ile birleştiğinde sitotoksik etkisi olan poliamino aldehiti oluşturmaktadır. Sitotoksik etki sonucunda hücrelerin ölmesiyle plak elde edememe beklenen bir sonuçtur. Özellikle kord kanında prolifer hücrelerden oluşması sitotoksik etkinin sonucu plak gözlenmemesinin nedeni olabilmektedir (Freshney 1987).

5.4. Kültür Süresi

25 olgudan alınan kord kanı besiyerine ekildikten sonra 1-3 saat süre ile kültüre edildi ve colcemid öncesi uygun optimal kültür süresinin 2 saat 45 dakika olduğu gözlemlendi. Laboratuvar koşullarımıza göre saptadığımız bu kültür süresi diğer araştırmacılara göre farklılık göstermektedir. Day ve ark.

(1988) ile Garnham ve Sutherland'a (1987) göre kord kanında direkt kromozom analizi çalışmalarında colcemid öncesi optimal kültür süresi 2 saattir. Ancak çalışmalar arasında ortaya çıkan bu zaman farklılığının her laboratuvarın oluşturduğu standart çalışma koşullarından kaynaklanmış olabileceği kanısındayız.

5.5. Colcemid Konsantrasyonu

Araştırma süresince kord kanından direkt kromozom analizi çalışmalarında iki colcemid konsantrasyonu denendi. Bunlardan biri standart periferik kan kültüründe kullanılan 0.01 $\mu\text{g/ml}$ diğeri ise 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyondur. Metafaz plak sayısı ve kalitesi ile kromozom morfolojisi ve bant özellikleri bakımından değerlendirildiğinde 0.01 $\mu\text{g/ml}$ colcemid konsantrasyonunun uygulandığı örneklerde plak sayısının çok az (1.96) olduğu 0.02 $\mu\text{g/ml}$ colcemid konsantrasyonunun uygulandığı örneklerde ise (5.78) arttığı gözlemlendi. Bu konuda yapılan diğer çalışmalara bakıldığında Garnham ve Sutherland'ın çalışmalarında (1987, 1989) en iyi sonucun alındığı colcemid konsantrasyonu 1.0 $\mu\text{g/ml}$ iken Day ve arkadaşlarının çalışmasında 40.0 $\mu\text{g/ml}$ dir. Ancak bizim bulgularımıza göre 0.02 $\mu\text{g/ml}$ lik colcemid konsantrasyonu yeterli olmaktadır. Araştırmalar arasında kaynaklanan bu farklılığın her laboratuvarın oluşturduğu standart çalışma koşullarından kaynaklanmış olabileceği kanısındayız.

5.6. Colcemid Süresi

Araştırmamızın temelini oluşturan direkt kromozom analizi çalışmalarında 0.02 Mg/ml konsantrasyondaki colcemid solüsyonu kültüre eklendikten sonra 15 dakika ile 3 saat arasında inkübasyona devam edildi. 45 dakikadan 3 saate kadar olan colcemidle inkübasyon süresi sonunda değerlendirilen ekim başına metafaz plak sayısı hem çok az olarak gözlenirken hem de kromozomların morfolojik özellikleri tamamen kaybolmaktadır ki bu durum uzun süreli colcemid muamelesinde beklenen bir durumdur. En fazla sayıda ve kaliteli metafaz plaklarının elde edilmesine ilişkin en uygun sürenin ise 15 dakika olduğu ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda uygulanan colcemid enkübasyon süresi diğer araştırmalarda belirtilen sürelerden çok kısadır. Day ve ark. (1988) 45 dakika ile 1 saat arasındaki bir süre bildirirken Garnham ve Sutherland (1987, 1989) Colcemidle 2 saatlik kültür süresini denemiş ve önermişlerdir.

5.7. Hipotonik Solüsyon Konsantrasyonu

Day ve ark.(1988) kord kanından direkt kromozom analizinde üç farklı hipotonik solüsyon kullanmışlardır: Bunlar 0.047 M KCl, 0.075 M KCl ve Ohnuki's solüsyonu (0.005 M KCl, NaNO₃ ve CH₃COONa) dur. Bu araştırmacılarca yapılan değerlendirmelerden sonra 0.047 M KCl solüsyonunun en iyi sonuç alınan konsantrasyon olduğu gösterilmiştir. Bu bulgudan hareketle bizim çalışmamızda 0.047 M ve 0.075 M'lık KCl hipotonik solüsyonları karşılaştırmalı olarak kullanıldı ve

bizim çalışmamızda da 0.047 M KCl solüsyonunda en iyi sonuç elde edildi. Böylece bulgularımız Day ve arkadaşlarının verileriyle uygunluk göstermektedir.

5.8. Hipotonik Solüsyonla İnkübasyon Süresi

Çalışmamızda hipotonik solüsyonla inkübasyon 10-45 dakika arasındaki sürelerde denendi. Metafaz plaklarının en kaliteli görüldüğü ve kromozomların değerlendirilebilir nitelikte olduğu sürenin 40 ile 45. dakikalar olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.10). 0.047 M'lık KCl inkübasyonunu öneren Day ve arkadaşlarının öngördüğü süre 20 dakikadır ki bizim laboratuvar koşullarımızda bu inkübasyon süresinde iyi yayılmamış ve kalitesiz kromozomlu metafaz plakları elde edildi. Garnham ve Sutherland'in (1987) tavsiye ettiği 30 dakikalık sürede ise kaliteli olmayan metafazlar gözlemlendi. Buna karşılık bizim çalışmamızda 0.047 M'lık konsantrasyondaki KCl hipotonik solüsyonuyla 40-45 dakikalık muamelede kaliteli metafaz plakları elde edildi.

4.9. Tespit Solüsyonunun Hipotonik Solüsyon + Hücre Süspansiyonuna İlavesi Veya Pellet Üzerine İlavesi

Hipotonik solüsyonla muameleden sonra Carnoy fiksatif solüsyonu damla damla pellet üzerine ilave edildiğinde koagülasyon meydana geldi ve pek çok fiksatif muamelesine rağmen plak elde edilemedi. Ancak hipotonik

muamelesi sonrasında santrifüj öncesi hücre süspansiyonuna 3 ml fiksatif eklenerek santrifüj işlemi gerçekleştirildiğinde koagülasyonla karşılaşılması ve başarılı sonuç elde edildi.

Kültür yöntemine göre direkt yöntemde daha fazla kanın ekilmesi ve dolayısıyla eritrosit oranının artışı nedeniyle damla damla fiksatif ilavesinde bile koagülasyon önlenememektedir. Bu nedenle eritrositlerin şokunu önlemek ve kademeli fiksasyonunu sağlamak amacıyla KCl + hücre süspansiyonuna az miktarda fiksatif ilave edilmesi uygun görüldü. Garnham ve Sutherland'ın (1987) araştırmalarında tespit solüsyonu doğrudan pellete ilave edilmiştir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi Day ve ark. (1988) da koagülasyon nedeniyle ve kademeli fiksasyonu sağlamak amacıyla hipotonik solüsyonu+hücre süspansiyonuna tespit solüsyonu ilavesini yayınlarında vurgulamışlardır. Dolayısıyla Day ve arkadaşlarının (1988) bulguları ile bizim bulgularımız uygunluk göstermektedir.

5.10. Lam Isısı

Kord kanından elde edilen metafaz plaklarının dağılımını etkileyen önemli faktörlerden biri olan lam ısısı değerlendirildiğinde soğuk ya da oda ısısındaki lamlara yayılan plaklarda dağılım ve kromozom morfolojisi bakımından bir farklılık gözlenmedi.

Williams ve ark (1984) (Garnham ve Sutherland 1987) soğuk ve ateşten geçirilmiş lamlarda kromozomların kaliteli olarak yayılmasında belirgin bir artış olduğunu

bildirmişlerdir. Ancak yaptığımız çalışmada lam ısısının metafaz plaklarının kalitesine etkisi ve farklılığı olmadığı gözlemlendi.

Çalışmamızın ilk bölümünde böylece ortaya konan ve rutinde uygulanabilirliği araştırılan kord kanından direkt kromozom analizi yönteminin tartışmasından sonra ikinci bölümde kord kanı ile yenidoğan periferik kanından yapılan standart kültür yöntemi ile çalışıldı ve elde edilen metafaz plakları, metafaz sayısı ve kalitesi ile kromozom morfolojisi ve bant özellikleri bakımından değerlendirilerek direkt yöntemle elde edilenlerle karşılaştırıldı.

Yapılan bu değerlendirmelerin sonucunda direkt yöntemle elde edilen iyi dağılmış ve kaliteli metafaz plak sayısının kültür yöntemine göre az olduğu buna karşılık kromozom morfolojisi ve kromozomların bant alma özellikleri bakımından yöntemler arasında bir farklılık olmadığı saptandı. Her olgudan en az dört preparat elde edildiğinden sonuca gitme konusunda bir problemle karşılaşılmadı.

İki yöntem arasındaki bu değerlendirmelerimize ilişkin bulgularımız Day ve ark. (1988) ile tam uygunluk göstermektedir. Garnham ve Sutherland'ın (1987) 15 kord kanında yaptıkları araştırmada ise kromozomların daha kısa ve şişmiş olduğu, metafaz plak sayısının az olduğu ve ancak birkaç preparatla sonuç elde edilebildi bildirilmiştir.

Bizim alışmamızda da karyotip açısından yn-temler arasında şüphe doğuracak bir durumla karşılaşılmadı. Her iki yöntemin birbirini destekler nitelikte olduğu saptandı böylece Garnham ve Sutherland (1987, 1989) ile Day ve arkdaşlarının (1988) bulgularıyla bizim elde ettiğimiz bulguların uyumlu olduğu gözlemlendi.

6. SONUÇ

Eskişehir Sağlık Müdürlüğü Doğum ve Çocuk Bakımevi'nde miyadında ve normal doğan 25 yenidoğanın kord kanından direkt ve kord kanı ile periferik kanından kültür yapılarak kromozom kuruluşları incelenen bu çalışmanın ilk aşamasında en iyi incelenebilir metafaz plaklarını elde etmek üzere direkt kromozom analizi yöntemi oturtulmaya çalışıldı ve aşağıdaki parametreler denenerek her parametre için uygun değerler bulundu. Buna göre;

- Kord kanının alınışı ile ekim arasında en uygun sürenin 12 saatten az saat olduğu,
- Ekim için en uygun besiyerinin newborn bovine serum ile hazırlanan RPMI-1640 olduğu,
- En uygun kültür süresinin 2 saat 45 dakika olduğu,
- En uygun colcemid konsantrasyonunun $0.02 \mu\text{g/ml}$ ve bu colcemid solüsyonuyla 15 dakikalık inkübasyonun olduğu,
- En uygun hipotonik solüsyonun (KCl) 0.047 M ve bu konsantrasyondaki KCl ile 45 dakikalık inkübasyon olduğu,
- Tesbit solüsyonunun hipotonik solüsyon + hücre süspansiyonu üzerine eklenerek eritrositlerin kademeli fiksasyonunu en uygun biçimde sağladığı ve koagülasyonu önlediği saptandı.

Araştırmamızın ikinci aşamasında yine 25 yenidoğandan alınan 25 kord kanı örneği ile 25 periferik kan örneği kültüre edildi. Bu yolla elde edilen metafaz plaklarının, kord kanından direkt kromozom analizi yöntemiyle elde edilenlerle karşılaştırması yapıldı. Bu karşılaştırma ve değerlendirme sonucunda:

a) Direkt yöntemle çalışılan 25 kord kanı örneğinde kromozom kuruluşu; 10 örnekte 46,XX ; 15 örnekte ise 46,XY olarak saptanırken, kültür yöntemiyle çalışılan kord kanı ve periferik kan örneklerinde benzer kromozom kuruluşu gözlemlendi.

b) Araştırmamızda incelemeye alınan olguların karyotiplerinin her üç çalışmada da aynı bulunmasından sonra direkt çalışmada ekim başına saptanan metafaz plak sayısı kord kültür ve periferik kan kültür yöntemiyle ekim başına elde edilen metafaz plak sayısına göre değerlendirildi ve daha düşük olarak saptandı.

c) Her üç çalışmada da kromozom sayı ve morfolojisinde fark gözlenmedi. Böylelikle kord kanından direkt yöntemle kromozom analizinin rutinde kullanılabilirliği ortaya kondu.

d) Ayrıca kord kanından direkt kromozom analizi yöntemi kordosentez sonrası rutin tanı işlemlerinde ya da CVS ve amniyosentez gibi prenatal tanı yöntemlerinin doğrulanmasında kullanılabileceği kanısı ortaya kondu.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- 1- Başaran, N.: Tıbbi Genetik. Dördüncü baskı Bilim Teknik Yayınevi, İstanbul, 1986.
- 2- Başaran, N.: Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvar Yöntemleri Kılavuzu, Eskişehir, 1987.
- 3- Başaran, N.: GENTAM Tanıtım Kılavuzu, Eskişehir, 1990.
- 4- Başaran, S., Miny, P., Pawlowitzki, I.H., Horst, J., Holzgreve, W.: Rapid karyotyping for prenatal diagnosis in the second and third trimesters of pregnancy. Prenatal Diagnosis, 8(4) : 315-20, 1988.
- 5- Benn, P.A. and Perle, M.A.: Chromosome Staining and Banding Techniques, In Human cytogenetics a practical approach. Rooney, D.E. and Czepulkowski, B.H. IRL press. Washington D.C., 1987, p. 57-83.
- 6- Boulot, P., Deschamps, F., Lefort, G., Sandra, P., Hedon, B., Laffargue, F. and Viala, J.L.: Purefetal blood

samples obtained by cordocentesis:
Technical aspects of 322 cases.
Prenatal Diagnosis, 10 : 93-100, 1990.

- 7- Connor, J.M. and Ferguson-Smith, M.A.:
Essential medical genetics. Second ed.,
Blackwell Scientific Pub., Oxford, 1987.
- 8- Day, D.W., Jalal, S.M., Worley, L.,
Kukolich, M., Freeman, M. and Sakakini, J.:
Direct chromosome analysis from neonatal
cord blood. Am. J. of Med. Genetics,
31: 943-946, 1988.
- 9- Francke, U., Brown, M.G. and Jones, K.J.:
Immediate chromosome diagnosis on
bone marrow cells: An aid to management
of the malformed newborn infant.
The J. of Pediatrics, 94(2): 289-292,
1979.
- 10- Freshney, R.I.: Culture of animal cells:
A manual of basic technique. Wiley-Liss,
Inc., 1987, p72-78.
- 11- Gong, B.T., Jones, K.L. and Smith, D.W.: Rapid
diagnosis of Down's syndrome. The Lancet,
10: 346-347, 1974.
- 12- Gonsoulin, W., Copeland, K.L., Carpten, R.J.,
Hughes, M.R. and Elder, F.F.B.: Fetal blood
sampling demonstrating chimerism in

monozygotic twins discordant for sex and tissue karyotype (46,XY and 45,X). *Prenatal Diagnosis*, 10: 25-28, 1990.

- 13- Gosden, C., Rodeck, C.H., Nicolaides, K.H., Campbell, S., Eason, P. and Sharp, F.C.: Fetal blood chromosome analysis: some new indications for prenatal karyotyping. *Brit. J. of Obst. and Gynec.*, 92: 915-920, 1985.
- 14- Gosden, C., Nicolaides, K.H., Rodeck, C.H.: Fetal blood sampling in investigation of chromosome mosaicism in amniotic fluid cell culture. *Lancet*, 1(8586): 613-617, 1988.
- 15- Granham, I. and Sutherland, G.R.: Rapid karyotyping of neonates on the basis of data from cord blood. *Am.J. of Hum.Genet.*, 41: 668-670, 1987.
- 16- Granham, I. and Sutherland, G.R.: Three years diagnostic experience with direct karyotyping of neonatal blood. *Clin. Genet.*, 38(5): 371-373, 1990.
- 17- Hsieh, F.J., Hsu, H.C., Ko, T.M., Chang, M.F., Chen, H.Y., Jean, H.H. and Chuang, S.M.: Rapid karyotyping in fetuses with abnormal sonogram. *Acta. Obstet. Gynecol Scand*, 67: 621-625, 1988.

- 18- Kaffe, S., Benn, A.B. and Hsu, L.Y.F.: Fetal blood sampling in investigation of chromosome mosaicism in amniotic fluid cell culture. *The Lancet*, 30: 284-285, 1988.
- 19- Kayalı, H.: İnsan Embriyolojisi. Güven Yayıncılık, İstanbul, 1982.
- 20- Kotylo, P.K., Baenzinger, J.C., Yoder, M.C., Engle, W.A. and Bolinger, C.D.: Rapid analysis of lymphocyte subsets in cord blood. *Brief Scientific Reports*, 93(2): 263-264, 1990.
- 21- Legras, B., Clerc, C., Ruelland, A., Vialand, J., Millon, J. and Cloarec, L.: Blood chemistry of human fetuses in second and third trimesters. *Prenatal Diagnosis*, 10: 801-807, 1990.
- 22- Lüleci, G., Başaran, S., Bağcı, G., Keser, İ.: Sitogenetik uygulama yöntemleri. Ankara, 1990.
- 23- Metaxotou, C., Antsaklis, A., Panagotopoulou, P., Tsenghi, C., Benetou, M., Mavrou, A., Matsaniotis, N.: Fetal karyotypes from fetoscopy blood samples. *Prenatal Diagnosis*, 3(2), 173-175, 1983.

- 24- Nicolaides, K., Rodeck, C.H.: Prenatal diagnosis.
Fetoscopy. Br. J. Hosp. Med., 31(6), 396-405.
- 25- Nicolaides, K.H., Gosden, C.M. and Rodeck, C.H.:
Rapid karyotyping in non-lethal fetal
malformations. The Lancet, 8: 283-286,
1986.
- 26- Nicolini, U., Nicolaidis, P., Fisk, N.M.,
Vaughan, J.I., Fusi, L., Gleeson, R. and
Rodeck, C.H.: Limited role of fetal
blood sampling in intrauterine
growth retardation. The Lancet,
336: 768-772, 1990.
- 27- Orlandi, F., Jakil, C., Damiani, G., Lauricella,
S., Maggio, A., D'Alcamo, E., QUartoraro, P.,
Cittadini, E.: First trimester fetal blood
sampling. Acta. Eur. Fertil. 19(1), 23-24,
1988.
- 28- Orlandi, F., Damiani, G., Jakil, C.,
Lauricella, S., Bertolino, O. and
Maggio, A.: The risks of early
cordocentesis (12-21 Weeks):
Analysis of 500 procedures. Prenatal
Diagnosis, 10: 425-428, 1990.

- 29- Shah, D.M., Jeanty, P., Dey, V.G.,
Ulm, J.E. and Phillips, J.,: Diagnosis
of trisomy 18 in monozygotic twins
by cordocentesis. Am.J. Obstet.
Gynecol, 160: 214-215, 1989.
- 30- Shah, D.M., Roussis, P., Ulm, J., Jeanty, P.,
Boehm, F.H.: Cordocentesis for rapid
karyotyping. Am. J. Obstet. Gynecol., 162(6),
1548-1550, 1990.
- 31- Smithies, A. and Valman H.B.,: Rapid diagnosis
of Dawn's Syndrome. The Lancet, 25:
1056-1057, 1974.
- 32- Tayşı, K., Say, B.: Tibbi Genetik, Ankara, 1975.
- 33- Tekelioğlu, M.,: Tıp Embriyolojisi. Yasemin
Kalp Vakfı Yayınları, Ankara, 1982.