

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**FETAL KROMOZOM ANOMALİLERİNİN TANISINDA
MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION
TEKNİĞİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

GÜVEN TOKSOY

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEHER BAŞARAN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Genetik Programında Güven Toksoy tarafından hazırlanan "Fetal Kromozom Anomalilerinin Tanısında Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification Tekniğinin Etkinliğinin Araştırılması" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

10 / 05 / 2011

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

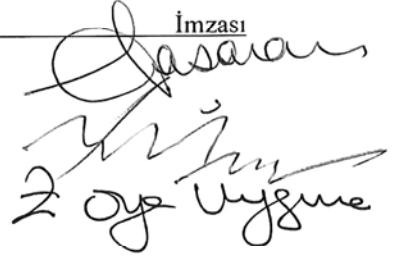
1.Prof.Dr.Seher Başaran (Danışman-Tez izleme Komitesi üyesi)

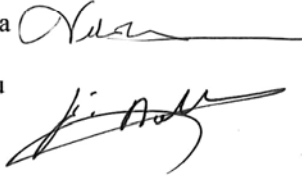
2.Prof.Dr.Recep Has (Tez izleme Komitesi üyesi)

3.Doç.Dr.Z.Oya.Uyguner (Tez izleme Komitesi üyesi)

4.Prof.Dr.Nihan Ünaltuna

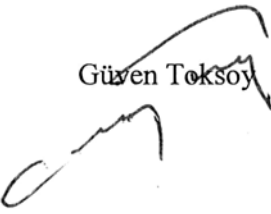
5.Doç.Dr.Esra Battaloğlu

The block contains handwritten signatures for the first three members of the thesis defense committee. The first signature is for Prof. Dr. Seher Başaran, the second for Prof. Dr. Recep Has, and the third for Doç. Dr. Z. Oya Uyguner.

The block contains handwritten signatures for the last two members of the thesis defense committee. The first signature is for Prof. Dr. Nihan Ünaltuna, and the second for Doç. Dr. Esra Battaloğlu.

BEYAN

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



Güzen Toksoy

İTHAF

Babam Süleyman Toksoy' un (1933-1984) anısına,

TEŞEKKÜR

“Testide ne varsa dışına o sızar”

(Hz. Mevlana, XIII. YY)

Testinin dolmasında büyük pay sahibi, tez çalışmamın her aşamasında katkısı olan, tıbbi genetiğe dahil olduğum ilk günden beri desteğini her zaman arkamda hissettiğim tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Seher Başaran’ a,

Moleküler genetik laboratuvarında geçirdiğim 6 yıl boyunca çalışmalarında bilgi ve tecrübesinden faydalandığım sayın Doç. Dr. Oya Uyguner’ e,

Olguların klinik çalışmalarını gerçekleştiren ve sorularımda her zaman cevap aldığım sayın Prof. Dr. Hülya Kayserili’ ye,

Benden bilgi ve tecrübesini esirgemeyen, bir kardeş olarak da destekleyen sayın Doç. Dr. Birsen Karaman’ a

Tıbbi genetik anabilim dalında çalışan tüm arkadaşlarıma,

Her halimle beni sınıksız saran ailem ve canım annem’ e

Bitmeyen öğrenciliğimi, bitmez bir sabırla destekleyen eşim Nil’ e,

Doldurduğunuz testiden gurur duymanız temennisi ile,

teşekkür ederim

Mikrodizin çalışmasını mali olarak destekleyen Prizma Laboratuar Ürünleri San. ve Tic. Ltd. Şti ve sayın Ayhan Uçkun’ a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3751 ve Proje no: 1515

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
GRAFİKLER LİSTESİ.....	Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVİİİ
ÖZET	XX
ABSTRACT.....	XXİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İNSAN KROMOZOMLARI	4
2.2. KROMOZOM ANOMALİLERİ	4
2.2.1. Kromozom Anomalilerinin Sınıflandırması	5
2.3. SAYISAL KROMOZOM ANOMALİLERİ	6
2.3.1. Poliploidiler	6
2.3.2. Anöploidiler	7
2.4. YAPISAL KROMOZOM ANOMALİLERİ	8
2.4.1. Dengeli Yapısal Kromozom Anomalileri	8
2.4.1.1. İnversiyonlar	10
2.4.1.2. Translokasyonlar.....	10
2.4.1.3. Resiprokal Translokasyonlar	11
2.4.1.4. İnversiyonlar (İnversiyonal Translokasyonlar).....	12
2.4.1.5. Robertsonian Translokasyonlar	13
2.4.2. Dengesiz Kromozom Anomalileri	14
2.4.2.1. Delesyon	15
2.4.2.2. Duplikasyon	15
2.4.2.3. İzokromozom	15

2.4.2.4. Ring Kromozom	16
2.4.2.5. Marker Kromozom	16
2.4.2.6. Kompleks Kromozom Anomalileri	17
2.4.2.7. Submikroskopik Yapısal Kromozom Anomalileri	18
2.5. KROMOZOM ANOMALİLERİNİN TANI YÖNTEMLERİ	20
2.5.1. Kromozom Anomalilerin Tanısında Klasik Sitogenetik Yöntemler	21
2.5.2. Kromozom Anomalilerin Tanısında Moleküler Sitogenetik Yöntemler	21
2.5.2.1. FISH Analizleri.....	22
2.5.3. Kromozom Anomalilerinin Tanısında Moleküler Yöntemler	25
2.5.3.1. Kantitatif PCR.....	25
2.5.3.2. MAPH (Multiplex Amplification and Probe Hybridization).....	26
2.5.3.3. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).....	26
2.5.3.4. Microdizin İncelemeleri.....	32
2.6. POSTNATAL SÜREÇTE KROMOZOM ANOMALİLERİNE TANISAL YAKLAŞIM	33
2.7. PRENATAL DÖNEMDE KROMOZOM ANOMALİLERİNE TANISAL YAKLAŞIM	41
2.7.1. İnvaziv Girişim Yöntemleri	42
2.7.2. Fetal Kromozom Analizleri	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1. MATERYAL	57
3.2. YÖNTEMLER.....	58
3.2.1. Gereçler.....	58
3.2.1.1. Kullanılan Taşınabilir Cihazlar.....	58
3.2.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	58
3.2.2. Kullanılan Teknikler	59
3.2.2.1. MLPA Prob Setlerinin Seçimi	59
3.2.2.2. DNA Eldesi.....	60
3.2.2.2.1. Otomatik İzolasyon	63
3.2.2.2.2. Manuel İzolasyon.....	63
3.2.2.3. DNA Bankalama.....	65
3.2.2.4. DNA' nın etanol kullanarak tekrar çöktürülmesi.....	68

3.2.2.5. DNA örneğinden heparini uzaklaştırma	68
3.2.2.5.1. Heparinaz çözeltisinin hazırlanma ve kullanım protokolü.....	68
3.2.3. MLPA Çalışması.....	69
3.2.3.1. DNA Denatürasyonu ve Prob Miks ile Hibridizasyon	70
3.2.3.2. Ligasyon.....	70
3.2.3.3. PCR çalışması	71
3.2.3.4. Kapiler Elektroforez Cihazı İle Fragmanların yürütülmesi	71
3.2.3.5. Fragman Analizi	73
3.2.3.6. Veri Analizleri	75
3.2.4. FISH Çalışmaları	80
3.2.4.1. Örnek hazırlanması	80
3.2.4.2. Prob hazırlanması	80
3.2.4.3. Denatürasyon ve hibridizasyon.....	80
3.2.4.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar	80
3.2.4.5. FISH analizleri	80
4. BULGULAR.....	81
4.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ	81
4.2. MLPA İNCELEMELERİ	83
4.2.1. Subtelomerik Bölge Prob Seti Değerlendirme Sonuçları	85
4.2.2. Sendromik Bölge Prob Seti Değerlendirme Sonuçları	85
4.2.3. Doğrulama çalışmaları	86
4.2.4. Olguların Demografik, Klinik Bilgileri ve Sonuçları	86
5. TARTIŞMA	201
KAYNAKLAR	216
FORMLAR	239
ETİK KURUL KARARI	241
PATENT HAKKI İZNİ	243
TELİF HAKKI İZNİ.....	244
ÖZGEÇMİŞ	245

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin farklı çalışma gruplarındaki dağılımı	6
Tablo 2-2: Resiprokal translokasyonun dağılım modelleri tablosu	12
Tablo 2-3: Robertsonian translokasyon taşıyıcılarının cinsiyetine göre dengesiz ürün ve/veya UPD li çocuk sahibi olma riskleri	14
Tablo 2-4: Zihinsel özürlü olgularda farklı tekniklerle subtelomerik bölge araştırmaları ve literatürle karşılaştırması.....	19
Tablo2-5:MLPA SALSA P070-A2 Human Telomere-5 Prob setinin lokus detayları ...	29
Tablo2-6:MLPA SALSA P245A2 Mikrodelesyon Sendromları Prob setinin lokus-sendrom ilişkileri	31
Tablo 2-7: Tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde yapılan kromozom analiz çalışmalarının karşılaştırılması	33
Tablo 2-8 Yardımcı üreme tekniklerine başvuran çiftlerde ve erkek infertilitesinde kromozom anomali oranları.....	35
Tablo 2-9: Zihinsel özürlü olgu gruplarında kromozom anomalisi frekansları.....	37
Tablo2-10: MKA, MR ve Dismorfizm bulgulu olgu gruplarında, MLPA ve MAPH çalışma sonuçları.....	39
Tablo2-11:Zihinsel özürlü olgularda farklı moleküler çalışmalar ile saptanan kromozom anomalisi ve polimorfizm oranları.....	40
Tablo 2-12 : Fetal girişim yöntemlerinin karşılaştırılması	43
Tablo 2-13: Prenatal kromozom analiz sonuçlarının girişim ve endikasyona göre dağılımı	45
Tablo 2-14 Prenatal kromozom analiz sonuçlarının endikasyona göre dağılımı.....	45
Tablo 2-15: Prenatal dönemde patolojik ultrason bulgusu varlığında uygulanan MLPA çalışma sonuçları.....	51
Tablo 2-16:Prenatal dönemde patolojik ultrason bulgulu normal kromozom saptanmış fetal örneklerde DİZİN tekniğinin uygulanması.....	54

Tablo3-1: SALSA P245 A2 Mikrodelesyon Sendromları Prob setinin hedef aldığı sendromlar, lokusları ve ilişkilendirilen ana klinik bulguları	60
Tablo 3-2: Olgulardan izole edilen DNA örneklerinin özellikleri.....	61
Tablo 4-1: Çalışmaya alınan olguların dökümü.....	81

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Resiprokal translokasyonun pakiten kuadrivalent konfigürasyon şeması.....	11
Şekil 2-2: MLPA tekniği uygulamasının şematik anlatımı.....	27
Şekil 3-1: DNA bankalama veritabanı giriş sayfası arayüzü	65
Şekil 3-2: DNA bankalama veritabanı stok kullanım sayfası arayüzü	66
Şekil 3-3: DNA bankalama veritabanı sitogenetik bilgi giriş sayfası arayüzü	66
Şekil 3-4: DNA bankalama veritabanı bilgi döküm sayfası arayüzü.....	67
Şekil 3-5: DNA bankalama veritabanı kutu içeriği döküm sayfası arayüzü.....	67
Şekil 3-6: Beckman Coulter CEQ 8000 kapiler elektroforez cihazı MLPA yürütme ayarları	72
Şekil 3-7: Beckman Coulter CEQ 8000 kapiler elektroforez cihazı fragman analiz parametre genel ayarları.....	74
Şekil 3-8: Beckman Coulter CEQ 8000 kapiler elektroforez cihazı fragman analiz metodu ayarları	74
Şekil 3-9: Kapiler elektroforez cihazında analiz sonrası pik görünümü.....	75
Şekil 3-10: Coffalyser 9.4 miks yükleme ekranı	76
Şekil 3-11: Coffalyser 9.4 aktif miks için pik kontrol ekranları	77
Şekil 3-12: Coffalyser 9.4 olgu yükleme ve olgu pik kontrol ekranı.....	77
Şekil 3-13: Coffalyser 9.4 analiz seçenekleri ayar ekranı.....	78
Şekil 3-14: Coffalyser 9.4 normalizasyon ekranı	78
Şekil 3-15: Coffalyser 9.4 olgu filtreleme kontrol ekranı	79
Şekil 3-16: Coffalyser 9.4 sonuç inceleme grafik bar ekranı.....	79
Şekil 4-1: Kötü DNA kalitesi nedeni ile yetersiz pik görünümü veren olgu örneği	84
Şekil 4-2: Denatürasyon azlığı nedeni ile yetersiz pik görünümü veren olgu örneği	85
Şekil 4-3: Olgu 10'un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın istatistiksel analiz görüntüsü	102
Şekil 4-4: Olgu 10' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın fragman pik görünümü	103
Şekil 4-5: Olgu 10'un 18 q Telomerik FISH görüntüsü	103

Şekil 4-6: Olgu 10' un mikrodizin analiz görüntüsü	104
Şekil 4-7: Olgu 10' da aCGH ile doğrulanan duplikasyon bölgesinin CNV	104
Şekil 4-8: Olgu 15' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın istatiksel analiz görüntüsü	113
Şekil 4-9: Olgu 15' in P070 prob seti ile yapılan çalışmasının fragman pik görünümü	114
Şekil 4-10: Olgu 15'in 18 p subtelomerik prob ile yapılan FISH çalışması metafaz görüntüsü	114
Şekil 4-11: Olgu 20'nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın istatiksel analiz	123
Şekil 4-12: Olgu 20' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmasının fragman pik görüntüleri	124
Şekil 4-13: Olgu 20' nin a) Williams Sendromu lokus spesifik prob (Cytocell) ile yapılan FISH çalışması metafaz görüntüsü b-) kullanılan FISH probunun pozüsyonel yerleşimi.....	125

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 4-1: Olgu 1' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	88
Grafik 4-2: Olgu 1' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	88
Grafik 4-3: Olgu 2' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	89
Grafik 4-4: Olgu 2' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	90
Grafik 4-5: Olgu3 'ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	91
Grafik 4-6: Olgu3 'ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	91
Grafik 4-7: Olgu4 'ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	92
Grafik 4-8: Olgu4 'ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	93
Grafik 4-9: Olgu5 'in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	94
Grafik 4-10: Olgu5 'in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	94
Grafik 4-11: Olgu 6 'nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	95
Grafik 4-12: Olgu 6 'nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	96
Grafik 4-13: Olgu 7 'nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	97
Grafik 4-14: Olgu 7 'nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	97
Grafik 4-15: Olgu 8' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	98
Grafik 4-16: Olgu 8' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	99
Grafik 4-17: Olgu 9' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	100
Grafik 4-18: Olgu 9' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	100
Grafik 4-19: Olgu 10' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	102
Grafik 4-20: Olgu 10' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	105
Grafik 4-21: Olgu 11' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	106
Grafik 4-22: Olgu 11' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	106
Grafik 4-23: Olgu 12' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	107
Grafik 4-24: Olgu 12' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	108
Grafik 4-25: Olgu 13' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	109
Grafik 4-26: Olgu 13' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	109

Grafik 4-27: Olgu 14' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	111
Grafik 4-28: Olgu 14' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	111
Grafik 4-29: Olgu 15' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	113
Grafik 4-30: Olgu 15' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	115
Grafik 4-31: Olgu 16' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	116
Grafik 4-32: Olgu 16' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	116
Grafik 4-33: Olgu 17' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	117
Grafik 4-34: Olgu 17' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	118
Grafik 4-35: Olgu 18' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	119
Grafik 4-36: Olgu 18' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	119
Grafik 4-37: Olgu 19' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	120
Grafik 4-38: Olgu 19' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	121
Grafik 4-39: Olgu 20' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	122
Grafik 4-40: Olgu 20' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	123
Grafik 4-41: Olgu 21' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	126
Grafik 4-42: Olgu 21' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	127
Grafik 4-43: Olgu 22' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	128
Grafik 4-44: Olgu 22' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	128
Grafik 4-45: Olgu 23' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	129
Grafik 4-46: Olgu 23' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	130
Grafik 4-47: Olgu 24' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	131
Grafik 4-48: Olgu 24' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	131
Grafik 4-49: Olgu 25' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	132
Grafik 4-50: Olgu 25' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	133
Grafik 4-51: Olgu 26' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	134
Grafik 4-52: Olgu 26' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	134
Grafik 4-53: Olgu 27' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	135
Grafik 4-54: Olgu 27' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	136

Grafik 4-55: Olgu 28' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	137
Grafik 4-56: Olgu 28' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	137
Grafik 4-57: Olgu 29' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	138
Grafik 4-58: Olgu 29' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	139
Grafik 4-59: Olgu 30' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	140
Grafik 4-60: Olgu 30' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	140
Grafik 4-61: Olgu 31' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	141
Grafik 4-62: Olgu 31' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	142
Grafik 4-63: Olgu 32' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	143
Grafik 4-64: Olgu 32' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	143
Grafik 4-65: Olgu 33' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	145
Grafik 4-66: Olgu 33' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	145
Grafik 4-67: Olgu 35' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	147
Grafik 4-68: Olgu 35' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	148
Grafik 4-69: Olgu 36' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	149
Grafik 4-70: Olgu 36' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	149
Grafik 4-71: Olgu 37' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	150
Grafik 4-72: Olgu 37' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	151
Grafik 4-73: Olgu 38' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	152
Grafik 4-74: Olgu 38' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	153
Grafik 4-75: Olgu 39' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	154
Grafik 4-76: Olgu 39' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	154
Grafik 4-77: Olgu 40' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	155
Grafik 4-78: Olgu 40' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	156
Grafik 4-79: Olgu 41' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	157
Grafik 4-80: Olgu 41' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	157
Grafik 4-81: Olgu 42' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	158
Grafik 4-82: Olgu 42' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	159

Grafik 4-83: Olgu 43' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	160
Grafik 4-84: Olgu 43' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	160
Grafik 4-85: Olgu 44' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	161
Grafik 4-86: Olgu 44' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	162
Grafik 4-87: Olgu 45' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	163
Grafik 4-88: Olgu 45' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	163
Grafik 4-89: Olgu 46 daP070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	165
Grafik 4-90: Olgu 46 daP245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	165
Grafik 4-91: Olgu 47' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	166
Grafik 4-92: Olgu 47' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	167
Grafik 4-93: Olgu 48' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	168
Grafik 4-94: Olgu 48' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	168
Grafik 4-95: Olgu 49' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	169
Grafik 4-96: Olgu 49' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	170
Grafik 4-97: Olgu 50' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	171
Grafik 4-98: Olgu 50' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	171
Grafik 4-99: Olgu 51' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	173
Grafik 4-100: Olgu 51' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	173
Grafik 4-101: Olgu 52' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	175
Grafik 4-102: Olgu 52' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	175
Grafik 4-103: Olgu 53' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	176
Grafik 4-104: Olgu 53' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	177
Grafik 4-105: Olgu 54' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	178
Grafik 4-106: Olgu 54' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	178
Grafik 4-107: Olgu 55' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	179
Grafik 4-108: Olgu 55' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	180
Grafik 4-109: Olgu 56' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	181
Grafik 4-110: Olgu 56' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	181

Grafik 4-111: Olgu 57' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	183
Grafik 4-112: Olgu 57' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	183
Grafik 4-113: Olgu 58' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	184
Grafik 4-114: Olgu 58' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	185
Grafik 4-115: Olgu 59' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	186
Grafik 4-116: Olgu 59' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	187
Grafik 4-117: Olgu 60' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	188
Grafik 4-118: Olgu 60' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	188
Grafik 4-119: Olgu 61' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	189
Grafik 4-120: Olgu 61' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	190
Grafik 4-121: Olgu 63' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	192
Grafik 4-122: Olgu 63' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	192
Grafik 4-123: Olgu 64' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	193
Grafik 4-124: Olgu 64' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	194
Grafik 4-125: Olgu 65' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	195
Grafik 4-126: Olgu 65' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	195
Grafik 4-127: Olgu 66' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	197
Grafik 4-128: Olgu 66' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	197
Grafik 4-129: Olgu 67' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	198
Grafik 4-130: Olgu 67' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	199
Grafik 4-131: Olgu 68' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	200
Grafik 4-132: Olgu 68' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği	200

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

1.TTT; 1. Trimester Tarama Testi

aCGH: Array Comparative Genomic Hybridisation (Dizinle karşılaştırmalı genomik hibridizasyon)

ACOG: American College of Obstetricianc and Gynecologists' Komitesi

AS: Amniosentez

AVSD: Atrio-Ventriküler Septal Defekt

AY: İleri Anne Yaşı

BAC: Bacterial Artificial Chromosome (bakteri kökenli yapay kromozom)

CBG: C Bant, Baryum hidroksit Giemsa

CCFDN: Konjenital Katarakt, Fasiyal Dismorfizm ve Nöropati

CCR: Complex Chromosomal Rearrangements (kompleks kromozom yeniden düzenlenmeleri)

CGH: Comperative Genomic Hybridization (karşılaştırmalı genomik hibridizasyon)

CNV: Copy Number Variation (Kopya sayısı değişimi)

CSV: Comma-Separated Values (virgülle ayrılmış değerler formatı)

DHPLC: Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (denatüran yüksek kapasiteli sıvı kromatografisi)

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

FISH: Flouresan In Situ Hibridizasyon

FKÖ: Fetal Kan Örneklemesi

GG: Gelişme Geriliği

GTG: G bant, Tripsin, Giemsa

HRBT: High Resolution Banding Technique (yüksek çözünürlüklü bantlama tekniği)

HR-CGH: High Resolution-Comperative Genomic Hybridization (yüksek çözünürlüklü karşılaştırmalı genomik hibridizasyon)

ICSI: Intra Cytoplasmic Sperm Injection (Sitoplazma içi sperm enjeksiyonu)

IUGG: İnter Uterin Gelişme Geriliği

IUMF: In Utero Mort Fetalis

KAÇ: Kromozom Anomalili Çocuk Öyküsü

KAE: Kromozom Anomalisi Taşıyısı Ebeveyn

Kb: Kilobaz (1000 baz)

KOÖ: Kötü Obstetrik Öykü

KS: Kordosentez

KVÖ: Korionik Villus Örneklemesi (CVS)

M-FISH: Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization (çoklu floresan in situ hibridizasyonu)

MAPH: Multiplex Amplification and Probe Hybridization (çoklu amplifikasyon ve prob hibridizasyonu)

Mb: Megabaz(1.000.000 baz)
MKA/MR: Multipl Konjenital Anomali / Mental Retardasyon (zihinsel ötür)
MKA: Multipl Konjenital Anomali
MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MR: Mental Retardasyon (zihinsel ötür)
MSS: Merkezi Sinir Sistemi
NOR: Nucleolus-Organizing Regions
NT: Nuccal Translucency
PAC: P1 (*Bakteriyofaj*) Artificial Chromosome (bakteriofaj yapay kromozom)
PAS: Pulmoner Arterial Stenoz
Pat USG: Patolojik Ultrasonografik Bulgu
PDA; Patent Ductus Arteriosus
PFO: Patent Foramen Ovale
PRINS: Primed In Situ Labeling
QFA: Q-bant, Floresan, Atebrin
QF-PCR: Quantitative Fluorescence PCR
RBG: R-bant, BrdUrd, Giemsa
SALSA®; Selective Adaptor Ligation, Selective Amplification
SKY®: Spektral Karyotyping
SNP: Single Nucleotid Polimorfizm (tek nükleotidliknükleotid polimorfizm)
sSMC: Small Supernumerary Marker Chromosomes
STR: Short Tandem Repeat (kısa ardışık tekrar dizileri)
SVAS: Supravalvular Aort Stenoza
UPD: Uniparental Dizomi
USG: Ultrasonografi
ÜT: Üçlü tarama testi
VSD: Ventriküler Septal Defekt
YAC: Yeast Artificial Chromosome (maya yapay kromozomu)

ÖZET

Toksoy, G. (2010). Fetal kromozom anomalilerinin tanısında multiplex ligation-dependent probe amplification tekniğinin etkinliğinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Kromozom anomalileri MKA/MR olgularının %15-20' sinde saptanan önemli etiyolojik faktörlerden biridir. Klasik sitogenetik tekniklerle gösterilemeyen <5 Mb anomalilerin tanısında moleküler genetik teknikler kullanılmaktadır. Subtelomerik FISH çalışmaları ile MKA/MR olgularında tanıya ilaveten %4-8 oranında katkı sağlanmaktadır. Postnatal olgularda klinik bulguların yönlendirmesi ile özgün problemler kullanılarak FISH ile tanıya gidilmekte oysa prenatal olgularda bu mümkün olamamaktadır. Fetal ultrasonografide anomali saptanan ancak kromozom anomalisi saptanmayan olgularda moleküler tekniklerin tanıya önemli katkılar sağlaması beklenmektedir.

Moleküler tekniklerden biri olan MLPA ile farklı anomalilerin tanısına yönelik çeşitli prob setleri kullanılmaktadır. P070 prob seti subtelomerik bölgelerin, P245 ise bilinen mikrodelsiyon / duplikasyon sendromlarının araştırılmasına yönelik hazırlanmıştır.

Bu çalışmada, prenatal USG de majör anomali saptanan ancak herhangi bir kromozom anomalisi gösterilemeyen olgularda subtelomerik yeniden düzenlenmelerin ve bilinen mikrodelsiyon/duplikasyon sendromlarının MLPA tekniği ile araştırılması amaçlandı.

Prenatal süreçte elde edilen 66 doku örneği (amniotik sıvı, fetal kordon kanı ve korionik villus örneği) P070 ve P245 prob setleri kullanılarak MLPA tekniği ile incelendi.

Bu olgulardan 3 ünde (%4,5) submikroskopik kromozom anomalisi saptandı. Anomalilerden del 18p ve del 7q11.2 FISH tekniği ile doğrulanırken dup18q olgusu mikrodizinin tekniği ile incelendi ve polimorfizm olup olmadığı belirlenemeyen ~75kb lık tetra allelik bir değişim gözlemlendi.

Literatürde MLPA tekniği ile yapılmış 4 benzer prenatal çalışmada bildirilen anomali oranı (%1,3-%6,5) çalışma sonuçlarımızla uyumlu bulunmuştur. MLPA tekniği alternatif tekniklerle karşılaştırıldığında; MLPA çoklu olgu ve lokus inceleyebilme olanağı ile FISH'e göre, mikrodizinin tekniği ise tüm genomu inceleme ve öngörülemeyen anomalileri tanıma olanağı ile MLPA'ya göre daha üstün görünmektedir. Buna karşın, mikro dizinin tekniğinin maliyet, yoğun biyoinformatik ve parental çalışma gereksinimi değerlendirildiğinde rutin prenatal kullanım için henüz tartışılmalı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: MLPA, kromozom anomalisi, patolojik fetal ultrasonografi, mikrodelsiyon/duplikasyon, subtelomer

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:3751 ve 1515

ABSTRACT

Toksoy, G. (2010). The efficiency of multiplex ligation-dependent probe amplification technique in the diagnosis of fetal chromosomal anomalies

İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Genetics.
Thesis of PhD. İstanbul.

Chromosome abnormalities are found in 15-20% of MCA/MR patients, and FISH studies can unveil subtelomeric aberrations, which constitute an additional 4-8% in MCA/MR etiology. Molecular techniques can be used to identify chromosomal abnormalities smaller than 5 Mb. Postnatally, clinical findings guide the clinician in choosing syndrome-specific FISH probes. This is usually impossible in prenatal cases. Employed molecular techniques provide edge in diagnosis of chromosomal anomalies undetectable by classical methods.

MLPA is based upon the utilization of different probe-sets designed for diagnosing different chromosome anomalies. P070 probe-set is used to screen subtelomeric regions and P245 set for known microdeletion / duplication syndromes.

In this study, we aimed to search for subtelomeric aberrations and syndrome-related microdeletions/duplications by MLPA, in fetuses with major ultrasonographic abnormalities, where no chromosomal abnormalities could be identified by conventional methods.

Tissue samples from 66 fetuses were studied with P070 and P245 probe-sets.

In 3 cases (4.5%), a submicroscopic chromosomal aberration was found. Among these, the 18p and 7q11.23 deletions were confirmed by FISH. Another case with a 18q subtelomeric duplication was studied with microarray techniques for confirmation, and the duplication was shown to be a tetra allelic gain of ~75kb. The duplication can be a polymorphism rather than being causative however, the parental status is not investigated.

In our study, the frequency of chromosomal aberrations (%0-6.5) revealed by MLPA was compatible with the literature. MLPA is superior to FISH in providing the advantage of multiple patient and loci screening, while microarray techniques are better qualified for whole genome screening since can detect unpredictable anomalies.

Key Words: MLPA, Chromosome abnormalities, Subtelomere, Pathological fetal ultrasonography, microdeletion / microduplication

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 3751 and 1515

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğan popülasyonunda ~%3 oranında saptanan major konjenital anomaliler, bu gruptaki mortalite ve morbiditenin en önemli etmenlerinden biridir. Bu orantıya, ilk sekiz yaş grubunda ortaya çıkan genetik hastalıklar ve zeka gerilikleri de eklendiğinde yaklaşık iki kata kadar çıkabilmektedir. Konjenital anomalilerin kromozom anomalileri ile birlikte, yenidoğan ölümlerinin %19,5' inden sorumlu olduğu bildirilmektedir (Milunsky ve Milunsky 2010). Teknolojik gelişmeler, major konjenital anomalilerin büyük bir kısmına gebeliğin herhangi bir evresinde ultrasonografi, manyetik rezonans v.d. teknikler ile tanınabilme olanağı sunmuştur. 1970'li yıllardan beri amniyosentez (AS), koryon villus (KVÖ) ve fetal kan örnekleme (FKÖ) ile elde edilen dokularda klasik sitogenetik yöntemlerle yapılan fetal kromozom analizleri, konjenital anomalilerin etiyolojisinin aydınlatılmasına önemli katkılar sağlamıştır. Multipl konjenital anomalili fetuslarda kromozom anormali sıklığı %18-29 olarak bildirilmektedir. Prenatal çalışmalarda klasik sitogenetik yöntemlerle saptanan kromozom anomalilerinin %98-99' luk bölümünü sayısal kromozom anomalileri ve geri kalan %1-1,5'ini yapısal kromozom anomalileri oluşturmaktadır (Van Dyke ve ark. 1983; Jacobs ve ark. 1992; Luquet ve ark.2002; Leung ve ark. 2002). Tek gen hastalıklarında ~%0,4 ve multifaktöryel hastalıklarda~%5 olarak bildirilen oranlar, yenidoğan çalışmalarına bakıldığında da çok farklı değildir (Milunsky ve Milunsky 2010). Yenidoğanda kromozom anormali sıklıkları sayısal anomalilerde %0,6 yapısal anomalilerde ise %0,07 olarak bildirilmektedir (Jacobs ve ark. 1992). Bu oranlar çalışma grubunu oluştururken uygulanan seçme kriterlerine göre farklılıklar göstermektedir. Örneğin sadece kardiyak anomaliler açısından bakıldığında fetal kromozom anormali sıklığı %49,3 iken, ense cilt kalınlığı kriter olarak alındığında %3-6 ya da koroid pleksus kisti varlığı gibi çok özgün bulgulara göre değerlendirildiğinde% 1 gibi farklı oranlara ulaşılmaktadır (Stoll ve ark. 2001; Nicolaides ve ark. 1992; Şahinoglu ve ark. 2004; Beke ve ark. 2008). Her ne kadar prenatal dönemde özgün bulgular varlığında bazı tek gen hastalıklarına yönelik testler yapılabilir olsa da, ailede daha önceden tek gen hastalığına yönelik artmış risk bilinmiyorsa bu tip hastalıklara yönelik yapılabilecek testler çok sınırlıdır (örneğin; hiperekomenik barsak bulgusu varlığında kistik fibroz açısından *CFTR* geninde mutasyon araştırılması, kemik mineralizasyon eksikliği ve tipik iskelet bulguları varlığında hipofosfataz açısından *TNSALP* geni

mutasyon analizi v.b.)(Scotet ve ark. 2010; Simon-Bouy ve ark. 2008). Bu nedenle fetal ultrasonografi taramasında konjenital anomali saptanması durumunda ilk başvuru test fetal kromozom analizidir. Kromozom anomalilerinin hemen hemen tamamında zihinsel özür birlikteliği olduğundan kromozom anomalisi saptamanın önemi de artmaktadır. Kromozom anomalilerinin tanısında duyarlılığı arttırmak amacıyla geliştirilen “High Resolution Banding Technique (HRBT)” prometafaz kromozomlarının incelenmesine ve 3-5 Mb büyüklüğündeki mikrodelsyonların ve kriptik translokasyonların tanınabilmesine olanak sağlamıştır.

Postnatal dönemde, multipl konjenital anomali ve mental retardasyonlu (MKA/MR) olgu grubunda, bu yöntemlerle yapılan çalışmalarda kromozom anomali oranı %4-28 bulunmuştur (Tablo 2-9). Ancak asıl gelişme, klasik tanı yöntemleri ile tanısı çok zor olan subtelomerik bölge anomalilerinin incelenmesine olanak sağlayan FISH tekniği ile elde edilmiştir. Bu grupta subtelomerik kromozom anomalilerinin oranı - klinik seçim kriterleri ve kromozom çözünürlüğüne bağlı olarak değişiklikler gösterse de - ortalama %6 olarak verilmektedir (Tablo 2-4). Günümüzde, mikro anomalilerin tanısında kullanılan belli başlı teknikler; subtelomerik problemlerin kullanımı ile yapılan FISH incelemeleri, Multicolor FISH/Spectral karyotyping, multiplex amplifiable probe hybridization (MAPH), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), comparative genomic hybridization (CGH), high resolution-comparative genomic hybridization (hr-CGH), microarray-comparative genomic hybridization, primed in situ labeling (PRINS) ve QF-PCR'dır (Strachan ve Read 2010).

Prenatal dönemde USG ile malformasyon saptanan fetusların kromozom analizlerinde; sitogenetik kalitenin postnatal kan örneğindeki kadar yüksek olmaması, yeterli materyal eldesinin güç olması ve klinik yönlendirmenin yetersiz kalması nedenleriyle zorluklar yaşanmaktadır. Array-CGH (aCGH) ve subtelomerik FISH tekniklerinin uygulandığı 49 olgulu bir çalışmada, yarısı subtelomerik bölge anomalileri (delesyon, dupikasyon, kriptik translokasyon) olmak üzere toplam ~%10 oranında anomali bulunmuştur (Thuresson ve ark. 2007). Konjenital anomalilerin prenatal dönemde tanı alması perinatal bakım ve tedaviye hazır olunmasını, tedavisi olmayan kromozom anomalileri ve genetik hastalıkların tanı alması ise tekrarlama riskleri

konusunda doğru rakamların elde edilmesi ve aynı zamanda aileye tıbbi tahliye şansı tanınması açısından önemlidir.

Bu çalışmada; prenatal USG incelemelerinde intra uterin gelişme geriliği (IUGG) ve/veya multipl anomali saptanan, 550-600 bant düzeyindeki kromozom analizlerinde herhangi bir anomali saptanmayan olgularda subtelomerik yeniden düzenlenmelerin ve bilinen mikrodelesyon/duplikasyon sendromlarının “multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)” tekniği ile araştırılması planlandı. Çalışmada elde edilen veriler ile prenatal olgularda kromozomların subtelomerik ve bilinen mikrodelesyon/duplikasyon sendrom bölge değişimlerinin araştırılmasında MLPA tekniğinin etkinliğini değerlendirmek ve çalışılan popülasyonda, ilgili bölgelere ait kopya sayı değişikliğinin sıklığı konusunda bilgi birikimi sağlamak amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNSAN KROMOZOMLARI

Kromozomları inceleyen bir bilim olan sitogenetik için milad, Tjio ve Levan'ın 1956 yılında insan kromozom sayısının 46 olduğunu göstermesi olarak kabul edilmektedir. 1959 yılında Lejeune ve arkadaşlarının ilk kromozom hastalığı olarak tanımladığı trizomi 21'den günümüze kadar geçen süreçte gelişen teknoloji ve bilgi birikimi kromozomların submikroskopik düzeylerde de araştırılabilmesini sağlamıştır.

Günümüzde, kromozomların fiziksel ve moleküler yapısı, taşıdıkları bilginin dağılımı, genomun organizasyonu, dengesiz düzensizlikler ve bunların fenotipe etkileri gibi birçok bilgiye ulaşılmıştır. Bununla birlikte, anomalilerin oluşum mekanizmaları, hücre siklusunun interfaz evresinde kromozomların organizasyonları, tanımlanmamış kromozomal düzensizliklerin fenotipe etkileri gibi pekçok alanda araştırmalar devam etmektedir (Miller ve Therman 2001). İnsandaki kromozom düzensizliklerinin araştırılması, bu amaca yönelik yeni tekniklerin uygulanması ve saptanan yeni anomalilerin klinik etkilerinin (fenotip-genotip ilişkileri) ortaya konulması Tıbbi Genetiğin güncel ve önemli bir konusu olmaya devam etmektedir.

2.2. KROMOZOM ANOMALİLERİ

Kromozom anomalisi, kromozomların sayı ve/veya yapılarında meydana gelen değişimler olarak tanımlanmaktadır. Bu anomalilerin önemli bir kısmı genlerde doz değişimlerine ve fenotipik etkilenmeye yol açarken, bir kısmı da işlevsel genlerde doz değişimine yol açmadığından fenotipi etkilememektedir. Kromozom anomalileri kuşaktan kuşağa aktarılabildiği (ailevi) gibi, gonad hücrelerinin oluşumu sırasında (mayotik) veya döllenmeden sonraki bir evrede (postzigotik) mitoz bölünmelerde ortaya çıkabilmektedir.

2.2.1. Kromozom Anomalilerinin Sınıflandırması

Kromozom anomalileri, fenotipe etkisi açısından “dengeli” ve “dengesiz”, kalıtım şekli açısından “ailevi” ve “*de novo*”, dokusal yaygınlığı açısından “mozaik” ve “non-mozaik” biçiminde sınıflandırılmaktadır. Sitogenetik açıdan ise “sayısal” ve “yapısal” olarak iki ana grupta değerlendirilmektedir. Sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin sıklıkları farklı popülasyonlarda önemli değişiklikler göstermektedir (Tablo 2-1) .

Kromozom anomalisinin fenotip üzerindeki etkisi dört farklı mekanizma ile açıklanmaktadır. Bunlardan biri doz etkisidir; kromozomlarda artış veya kayıp olan bölge/lerde yer alan genlerdeki dozaj değişimi sonucunda fenotipin etkilenmesi durumudur. İkinci mekanizma, yapısal kromozom anomalisinin oluşumu sırasında kırık noktasının işlevsel bir geni bölmesi ile anlatımı bozmasıdır. Üçüncü mekanizma, uniparental dizomi olayında gözlenen anormal kromozom ya da kromozom segmentinin uyumsuz parental kökenden kalıtılması ile ortaya çıkmaktadır. Dördüncü mekanizma ise genin oluşan anomali ile yeni yerinde farklı işlev ya da anlatım modeli kazanması ile ortaya çıkan füzyon genlerinin etkisidir (Gardner ve Sutherland 2004). Kromozom anomalisinin fenotipe olan etkisinin ağırlığı yaşam süresini de belirlemektedir. Otozomal monozomiler ve trizomilerin çoğu mozaik olmadığı sürece genellikle canlı doğuma ulaşamazlar. Örneğin; trizomi 1 saptanan 4 abort olgusunda da embriyonik kutup ya da fetal kalp atımı gözlenmeden gebeliğin abortus ile sonlandığı bildirilmiştir (Vicic ve ark. 2008). Oositler üzerinde yapılan çalışmalar A ve C grubu kromozomların daha düşük oranda anöploidi gösterdiklerini bildirmektedir (Pellestor ve ark. 2004). Bazı kromozom anöploidilerinin daha ender görülmesinde, ağır fenotipik etki göstermelerinin yanı sıra seçici olarak daha az mayotik hataya maruz kalmalarının da etkili olduğu vurgulanmaktadır. Spontan abortus materyallerindeki kromozom analizlerinde saptanan dengesiz kromozom anomalileri içinde sayısal anomalilerin yapısal anomalilere göre daha sık (%50-70) olduğu belirtilmektedir. İlerleyen gebelik haftaları ile bu oranın azaldığı bilinmektedir (Nussbaum ve ark. 2004).

Tablo 2-1: Sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin farklı çalışma gruplarındaki dağılımı

Anormal Karyotip	1.trimester gebelik kayıpları	Fetus (anne yaşı >35)	Canlı doğum
Total insidans	1/2	1/50	1/160
Sayısal anomaliler (anöploidi, poliploidi)	%96	%85	%60
Yapısal anomaliler Dengeli	-	%10	%30
Dengesiz	%4	%5	%10

(Nussbaum ve ark. 2004) 'den alınmıştır

2.3. SAYISAL KROMOZOM ANOMALİLERİ

Sağlıklı bir insanda haploid kromozom setinde $n:23$, diploid kromozom setinde ise $2n:46$ kromozom bulunmaktadır. Bu kromozom sayısında meydana gelen tüm artış ve azalmalar sayısal kromozom anomalisi olarak değerlendirilmektedir.

2.3.1. Poliploidiler

Diploid ($2n$) kromozom setinin haploid (n) set olarak artışlarına poliploidi denilmektedir. Bu artış 1 haploid set olduğunda “triploidi” ($3n$), iki haploid set olduğunda “tetraploidi” ($4n$) olarak isimlendirilmektedir. Poliploidiler genel olarak abortus materyali incelemelerinde ve fetal kromozom analizlerinde saptanmaktadır. 1. trimester gebelik kayıplarında saptanan kromozom anomalilerinin % 20’sinden poliploidilerin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Milunsky ve Milunsky 2010). Triploidi ve tetraploidiler hem fetus hem de plasentada ağır bulgular göstermektedir. Yenidoğan evresine ulaşmış non-mozaik tetraploidi olgusu olağanüstü ender görülmektedir. Bu olgularda intrauterin gelişme geriliği, hipotoni, kardiyak anomaliler öne çıkan bulgulardır (Stefanova ve ark. 2010). Triploidiye yol açan ilave haploid setin baba kökenli (diandric-Tip 1) ve anne kökenli (digynic-Tip 2) olmasına göre klinik bulgular değişebilmektedir. Daha ender saptanan baba kökenli triploidilerde ağır gelişme geriliği, kol-bacak gelişiminde gerilik, mikrosefali, dismorfik yüz bulguları, büyük plasenta ve parsiyel hidatiform bulgusu öne

çıkarken, olguların çoğunluğunu oluşturan anne kökenli triploidilerde, asimetrik gelişme geriliği (göreceli makrosefali) ve küçük plasenta bulunmaktadır (McFadden ve Kalousek 1991; Hasegawa ve ark. 1999; Baumer ve ark. 2000; Daniel ve ark. 2001).

Triploidi ve tetraploidi letal olduğundan ilk yılı dolduran olgu sayısı nadirdir (Stefanova ve ark.2010; Daniel ve ark. 2001).

2.3.2. Anöplodiler

Diploid kromozom sayısının haploid setten az olan artış ya da azalmaları “anöplodi” olarak tanımlanır ($2n\pm1$, $2n\pm2$, $2n\pm3$, $2n\pm4$, $2n\pm5$ vb.). Anöplodilerde fazla olan kromozomlar için trizomi, tetrazomi, pentazomi ve eksik olan kromozomlar için ise monozomi, nullizomi terimleri kullanılmaktadır. Otozomal monozomi ve polizomiler kanser dokularında yapılan kromozom incelemeleri dışında non-mozaik olarak insanda rastlanmayan kromozom anomalileridir, ancak mozaik olarak nadir de olsa gözlenebilmektedir. Mozaisizm yaşamla bağdaşmayan kromozom anomalilerine yaşam şansı vermektedir. Mozaik trizomi 22, trizomi 8, trizomi 9 ve trizomi 10 canlı doğuma ulaşabildiğinden bu anomalilerin klinik fenotipleri de bilinmektedir (Tinkle ve ark. 2003; Schinzel ve ark. 1993a, 1993b, 2001). Anöplodilerin içinde en sık gözlenenler, X ve Y kromozomlarının trizomileri 47,XXX, 47,XXY, 47,XYY ve bir otozomal trizomi olan trizomi 21 (47, +21)’ dir. Trizomi 21 yaşam süresi en uzun olan otozomal trizomidir. Trizomi 13 ve 18 canlı doğabilen ancak ağır klinik bulgular nedeniyle yaşam olasılığı çok kısa olan otozomal trizomilerdir (Miller ve Therman 2001). Monozomiler içinde Turner sendromu olarak tanımlanan X kromozom monozomisi canlı doğabilen tek monozomidir. 45,X kromozom yapısı taşıyan fetusların %95 inden fazlası spontan abortus veya IUMF ile sonlanır (Cockwell ve ark. 1991).

Kanser dokularında ise çok farklı sayısal ve yapısal kromozom anomalilerine rastlanabilmektedir (Porfiri ve ark. 1993).

2.4. YAPISAL KROMOZOM ANOMALİLERİ

Yapısal kromozom anomalisi kromozomlarda meydana gelen yapısal değişimlerin tümüne verilen genel bir tanımlamadır. Bir ya da birden fazla kromozomda kırık oluşması ve bunun kromozomun yapısını değiştirmesi ile ortaya çıkmaktadır. Germinal hücre dizilerinde oluşmaları kalıtsal yapısal anomalilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Somatik hücrelerde (mitotik) oluştuklarında ise kanser riskini arttırabilmektedir. Kırık noktaları rastgele bölgelerde oluşabilmekte ancak kırığa eğilimli bölgelerde daha sıklıkla görülmekte ve bu bölgeler “Hotspot” bölgeler olarak adlandırılmaktadır (Miller ve Therman 2001). Kromozom anomalileri materyal kaybı olup olmamasına göre “dengeli” veya “dengesiz” olarak sınıflandırılmaktadır. Günümüzde, yapısal kromozom anomalilerinin gösterilebilirliği, bant tekniklerinin kullanılması ve kromozom çözünürlüğünün yükselmesi ile artmıştır (Jacobs ve ark. 1992).

2.4.1. Dengeli Yapısal Kromozom Anomalileri

Fenotipik olarak normal olan bireylerde saptanan ve mikroskobik incelemede genetik materyalde dengesizlik gösterilemeyen anomaliler “dengeli yapısal kromozom anomalileri” olarak isimlendirilmektedir. Bu anomaliler, intra-kromozomal ya da inter-kromozomal oluşabilirler. Dengeli yapısal kromozom anomalisi en az iki kırık ile oluşur. 98 farklı merkezden 98.118 amniyosentez materyalinden elde edilen sonuçların derlendiği insidans çalışmasında inversiyon sıklığı 1/1126, resiprokal translokasyon sıklığı 1/563, dengeli Robertsonian translokasyon sıklığı 1/1.186 ve dengesiz Robertsonian translokasyon sıklığı 1/5.931 olarak bulunmuştur (Forabosco ve ark. 2009).

Dengeli kromozom anomalileri, oluşumu sırasındaki kırık noktalarının herhangi bir genin anlatımını bozması ya da değiştirmesi, submikroskobik düzeyde doz değişimine yol açması ya da değişimin bir füzyon proteini oluşturması gibi istisnai durumlarda fenotipik etkiye yol açabilmektedir. Bu nedenle fetal kromozom analizlerinde *de novo* olarak dengeli yapısal kromozom anomalisi saptanması durumunda az da olsa etkilenme riski literatürde kırık başına %2-3 olarak belirtilmektedir (Sutherland ve Gardner- 2004). Warburton’ un (1991) çok merkezden 377.357 amniotik sıvı örneğinde yapılan fetal

kromozom analiz sonuçlarını derlediği çalışmasında, yapısal *de novo* kromozom anomalisi sıklıklarını ve doğum sonrası ağır konjenital anomali oluşturma oranlarını irdelenmiştir. 1:2.000 sıklıkla görülen resiprokal translokasyonlar için %6,1, 1/9.000 sıklıkla görülen Robertsonian translokasyon için %3,7, 1:10.000 sıklıkla görülen inversiyonlar için %9,4, orjini bilinmeyen 1:2.500 sıklıkla görülen satellit içermeyen marker kromozomlar için %14,7 ve satellit içeren marker kromozomlar için %10,9 oranlarında fenotipik etkilenme saptandığını bildirmiştir. Mikroskobik olarak dengeli yapısal kromozom anomalisi saptanmış zihinsel özürlü 47 olgunun (33' ü *de novo* ve 14'ü ailevi) yüksek rezolüsyonlu oligonükleotid dizin tekniği ile yapılan çalışmasında; 20 olguda (16 *de novo* ve 4 ailevi) 60 Kb ile 15.37 Mb büyüklüğünde değişik kriptik delesyon saptandığı bildirilmektedir. İlginç olan bilgi, saptanan bu delesyonların yaklaşık yarısının olguların bilinen yapısal kromozom anomalilerinden farklı bir bölgede yer almasıdır. Bu çalışma sonuçlarına göre bilinen kromozom anomalisi ile ilişkili submikroskobik dengesizliğin oranı *de novo* olgularda ~%20 ve ailevi olgularda ise ~%14 olarak verilmiştir (Schluth-Bolard ve ark. 2009). Kırık noktası ile ilişkili dengesizlik saptanan olguların önemli bir bölümünün paternal geçiş gösterdiği ve anomalinin spermatogenez rekombinasyonları ile oluştuğu saptanmıştır. Literatürde, mikroskobik olarak dengeli ancak fenotipik olarak etkilenmiş *de novo* olgularda moleküler düzeyde yapılan dizin çalışmaları sonuçlarına dayanarak, anomalilerin kırık noktaları ile ilişkili sub mikroskobik dengesizlik saptanma sıklığı ~%20, anomaliden bağımsız bir bölgede herhangi bir dengesizlik saptanma olasılığı da aynı oranda verilmektedir (Schluth-Bolard ve ark. 2009; Baptista ve ark. 2008; De Gregory ve ark. 2007; Gribble ve ark. 2005)

Dengeli yapısal kromozom anomalilerinin diğer önemli bir etkisi de, taşıyıcıların yüksek orandaki dengesiz gamet ve buna bağlı olarak dengesiz embriyo/fetus/çocuk riskidir. Risk belirleme çalışmaları birçok farklı olgu grubunda yapılmıştır. 150 farklı merkez ve 1.833 ailevi kromozom anomalisi taşıyıcısı çiftin amniyotik sıvıda kromozom analiz sonuçlarının irdelendiği çok merkezli bir çalışmada dengesiz ürün riski, ilgili kromozomu taşıyan ebeveyn ve anomali tipine göre hesaplanmış ve risklerin ihmal edilebilir düzeyden %50'ye kadar farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Daniel ve ark. 1989).

2.4.1.1. İnversiyonlar

“İnversiyon”, aynı bir kromozomda iki kırık oluşumu ile serbest kalan kromozom parçasının 180 derece dönerek aynı bölgeye yapışması ile ortaya çıkan yapısal bir kromozom anomalisidir. İnversiyon kırık noktaları farklı kollarda ise “perisentrik”, tek bir kolda oluşmuşsa “parasentrik” inversiyon olarak isimlendirilir. Genel olarak inversiyonlar, taşıyıcıları için önemsizdirler, ancak kırık noktasının bir genin anlatımını bozması durumunda taşıyıcılarda da fenotipik etki ortaya çıkabilmektedir (Shashi ve ark. 1996). Kırık noktaları perisentromerik alanlardaki heterokromatin bölgelerden geçen perisentrik inversiyonlar polimorfiktirler, çoğunluğunu oluştururlar ve herhangi bir anomaliye yol açmadan nesiller boyu aktarılabilmektedirler. Bu polimorfik inversiyonlar içerisinde 9. kromozoma ait perisentrik inversiyon toplumda %0.8-2 (Lee ve ark. 2010) sıklıkla rastlanan ve sadece heterokromatin bölgeden geçen kırık noktaları ile oluşan inversiyondur. Bu nedenle taşıyıcıların bir sonraki kuşağa bu inversiyonu dengesiz rekombinant ürün olarak aktarması riski bulunmamaktadır (Nussbaum ve ark. 2004). Perisentrik inversiyonlar en sık sırası ile 9, 2, 8, 3, 1, 5 ve 6. kromozomlarda görülmektedir (Kaiser 1984). Parasentrik inversiyonlar ise en sıklıkla sırası ile 1, 3, 5, 6, 7, 11 ve 14. kromozomlarda gözlenmektedir (Madan 1994; Pettenati 1995). İnversiyonlarda rekombinasyon riski, tipine ve büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir (Fryns ve ark. 1986; Pettenati ve ark. 1995; Madan 1995). Perisentrik inversiyonlarda genel rekombinasyon riski %0,8-15 arasında verilmekte ancak inversiyon segmentinin her iki kırık noktasının terminal uçlara yaklaştığı durumlarda yani segmentin büyümesi ile bu oran (% 75-80) artmaktadır. Parasentrik inversiyonların rekombinasyonlarında asentrik ve disentrik ürün oluştuğundan yaşayabilen dengesiz ürün olasılığının çok düşük olduğu bildirilmektedir (Kaiser ve ark. 1984; Roberts ve ark. 1989; Daniel ve ark. 1989; Gardner ve Sutherland 2004).

2.4.1.2. Translokasyonlar

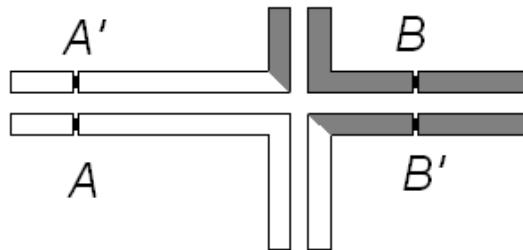
Translokasyonlar, homolog olmayan kromozomlar arasında parça değişimi (resiprokal translokasyon), kromozomun ara bir segmentinin koparak aynı ya da farklı bir kromozomun ara bölgesine katılması (insersiyonal translokasyon) ya da bağımsız 2

akrosentrik kromozomun sentromer ya da p kollarından birleşmesi (Robertsonian translokasyon) ile oluşan yapısal kromozom anomalileridir (Miller ve Therman 2001; Nussbaum ve ark. 2004)

2.4.1.3. Resiprokal Translokasyonlar

Resiprokal translokasyonlar genellikle iki homolog olmayan kromozom arasında karşılıklı parça değişimleri ile oluşmaktadır. Translokasyon taşıyıcılarının gametogenez sırasında oluşacak kromozom dağılımına göre farklı ürünler ortaya çıkmaktadır. Resiprokal translokasyonların mayoz bölünmenin pakiten evresinde kuadriyalent oluşturup ardından kutuplara çekilmesi esnasında her iki kutba translokasyona katılan kromozomlardan birer kromozomun gitmesi ile 2:2 dağılım, bir kutba 3 diğer kutba ise 1 kromozom gitmesi ile 3:1 dağılım ve dört kromozomun da bir kutba çekilmesi ile 4:0 dağılım gerçekleşir (Nussbaum ve ark. 2004).

2:2 dağılımda, homolog kromozomların ayrıştığı ve normal kromozomların bir kutba translokasyon kromozomlarının diğer kutba gittiği *alternate* dağılım modelinde oluşan gametlerden dengeli taşıyıcı veya normal ürünler oluşur. Ayrışmada bir normal ve bir translokasyon kromozomunun aynı bir kutba gitmesi ile adjacent 1 ve 2 modeline göre üründe parsiyel monozomi ve trizomiye yol açan gametler oluşacaktır. 3:1 dağılımda ise tersiyer trizomi/monozomi ya da interchange trizomi/monozomi taşıyan, 4:0 dağılımda çift trizomi ya da çift monozomi taşıyan ürünler ortaya çıkacaktır (Şekil 2-1 ve Tablo 2-2).



Şekil 2-1: Resiprokal translokasyonun pakiten kuadriyalent konfigürasyon şeması ; İki normal (A, B) ve iki translokasyon (A' , B') kromozomları homolog segmentlerinin karşılıklı yerleşimi (Gardner ve Sutherland 2004 , p 61, tablo 4-2)

Tablo 2-2: Resiprokal translokasyonun dağılım modelleri tablosu (Şekil 2-1örneği için)

Gamet 1	Gamet 2	Dağılım modeli
2:2 dağılım		
A&B	A'&B'	<i>Alternatedağılım</i>
A&B'	B&A'	<i>Adjacent-1</i> dağılım
A&A'	B&B'	<i>Adjacent-2</i> dağılım
3:1 dağılım		
AB&A'	B'	Tersiyer trizomi veya monozomi içeren 3:1 dağılım
AB&B'	A'	
A'B'&A	B	<i>Interchange</i> trizomi ya da monozomi içeren 3:1 dağılım
A'B'&B	A	
4:0 dağılım		
AB&A'B'	-	<i>Duble</i> trizomi veya monozomi içeren 4:0 dağılım

(Gardner ve Sutherland 2004, p61, tablo 4-3)

Dengesiz ürün olasılıkları, translokasyona katılan kromozom segmentinin büyüklüğü, kırık noktasının yeri, bu segmentlerin taşıdığı işlevsel genlerin miktarı, taşıyıcının dişi ya da erkek olmasına göre önemli değişiklikler göstermektedir. Translokasyon taşıyıcılarında, dengesiz ürün taşıyan gamet riski, etkilenmiş çocuk doğurma riski ve gebelik kaybı riski ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Transloke olan segment büyüklüğü arttıkça dengesiz ürünün yaşamla bağdaşma oranı düşmektedir. Translokasyon segmentinin küçük olmasının *adjacent* 1 dağılım modeline, sentrik segmentin küçük olmasının *adjacent* 2 dağılım modeline, akrosentrik kromozomların küçük segmentle katıldığı translokasyonlarda 3:1 dağılım modeline yatkınlık oluşturduğu, hem transloke olan hem de geri kalan kromozom segmentinin büyük olduğu translokasyonlarda ise yaşamla bağdaşabilen dengesiz ürün olasılığının olmadığı öne sürülmektedir. Resiprokal translokasyonlarda hasta çocuk doğurma riski çoğu otozomal translokasyonlar için %5-10 aralığında verilmektedir (Gardner ve Sutherland 2004).

2.4.1.4. İnsersiyonlar (İnsersiyonal Translokasyonlar)

İnsersiyonal translokasyonlar, bir kromozomdan iki kırıkla kopan bir parçanın oluşan yeni bir kırık bölgesine intra veya inter kromozomal olarak yerleşmesi ile oluşmaktadır (Gardner ve Sutherland 2004). Bu yerleşim eğer özgün konumunun tersi yönünde ise “inverted insersiyon” denir. İnsersiyonların ~%14’ ü *de novo* oluşmaktadır %

86' sı ise ailevi kalıtım göstermektedir. Teorik olarak dengesiz gamet riskleri %50 olmasına karşın 86 insersiyon taşıyıcısının hasta çocuk ve gebelik kaybı sayılarının derlendirildiği bir çalışmada, hasta çocuk riski erkek taşıyıcılarda %32, dişilerde ise %36 bulunmuştur (Van Hemel ve Eussen, 2000).

2.4.1.5. Robertsonian Translokasyonlar

“Robertsonian translokasyonlar”, akrosentrik kromozomların p kollarından ya da sentromerlerinden uç uca birleşmesi ile oluşmaktadır. Robertsonian translokasyonların oluşumunda üç mekanizma öne sürülmektedir. Birincisi sentromerlerin birleşmesi, ikincisi bir kısa kol ve bir uzun kolda oluşan kırıkların birleşmesi (tam kol resiprokal translokasyon) ve üçüncüsü ise her iki kısa kolun kırılıp birleşmesi sonrası translokasyonun ortaya çıkmasıdır (Nussbaum ve ark., 2004; Gardner ve Sutherland, 2004). Bu translokasyonlar non-homolog kromozomlar arasında daha sıklıkla görülmekle birlikte ender olarak homolog kromozomlar arasında da görülebilmektedir. Yenidoğanda en sıklıkla (%75) rob(13q14q) translokasyonu saptanmaktadır. 14. ve 21. kromozomlar arasındaki Robertsonian translokasyon ise Down sendromlu olgularda daha sık gözlenmektedir.

Robertsonian tipi translokasyon taşıyıcılarının sperm ve oositlerinde yapılan segregasyon analizlerinde, homolog olmayan 13. ve 21. kromozomlar için, doğum şansı olan dengesiz ürün oranlarının spermelerde %3 ile %26 arasında, oositlerde ise %32 ile %68 arasında değiştiği bildirilmektedir (Munne ve ark. 2000; Roux ve ark. 2005; Frydman ve ark. 2001; Durban ve ark. 2001). Ancak gebelik ürünleri ve doğan çocuklar incelendiğinde bu oranların çok düştüğü görüldüğünden, dengesiz ürünlerin gebelik öncesi ve/veya gebeliğin başlangıcında kaybolduğu kabul edilmektedir (Tablo 2-3). Robertsonian translokasyon taşıyıcılarının dengesiz ürün taşıyan gamet riskinin yanı sıra trizomik başlayan ancak sonradan mitotik düzeltme yolu ile serbest homolog kromozomlardan birini kaybetmesi ile ortaya çıkan uniparental dizomi (UPD) riskleri bulunmaktadır. Robertsonian translokasyon taşıyanlarda dengesiz ürün veya UPD'li çocuk sahibi olma riski dişilerde erkeklere göre daha yüksektir (Gardner ve Sutherland, 2004).

Tablo 2-3: Robertsonian translokasyon taşıyıcılarının cinsiyetine göre dengesiz ürün ve/veya UPD li çocuk sahibi olma riskleri

Translokasyon	ANNE		BABA	
	Dengesiz (%)	UPD (%)	Dengesiz (%)	UPD (%)
13q14q	1	<0,5	<1	<0,5
13q15q	1	<0,5	<1	<0,5
13q21q	10-15	-	<1	-
13q22q	1	-	<1	-
14q15q	-	0,5	-	<0,5
14q21q	10-15	<0,5	<1	-
14q22q	-	<0,5	-	<0,5
15q21q	10-15	<0,5	<1	<0,5
15q22q	-	<0,5	-	<0,5
21q22q	10-15	-	<1	-

(Gardner ve Sutherland 2004, 200p 128, tablo 6-3)

2.4.2. Dengesiz Kromozom Anomalileri

Fenotipik bulgu/lara yol açan, mikroskopik incelemede de saptanabilen ve genetik materyalde segmental artış ya da kayba neden olan kromozom anomalileri “dengesiz yapısal kromozom anomalisi” olarak sınıflandırılmaktadır. Genomda yol açtığı dengesizliğin büyüklüğü ve önemine göre fenotipik etki şiddeti değişmektedir. Delesyonların duplikasyonlardan daha ağır fenotip gösterdiği ve yaşamla bağdaşabilme sınırının delesyonlarda genomun %3’ü, duplikasyonlarda ise genomun % 10’ u olduğu genel olarak kabul edilmiştir (Brewer ve ark. 1998, 1999). Bu anomaliler *de novo* oluşabildikleri gibi translokasyon ve inversiyon taşıyıcılarının dengesiz ürünleri olarak da ortaya çıkabilmekte ve kromozomda parsiyel kayıp (delesyon), parsiyel artış (duplikasyon) ya da her ikisi de birlikte görülebilmektedir. Dengesiz yapısal kromozom anomalisi, normal kromozom setine ilave olarak da bulunabilmekte, bazen üç ya da daha fazla kromozomu ilgilendirebilmektedir (kompleks kromozom anomalisi). Prenatal karyotiplemede görülme sıklığı %0,12 ile %0,22, yenidoğan görülme sıklılığı %0,01 ile %0,06 arasında değişmektedir (Jacobs ve ark. 1992; Ferguson-Smith ve Yates 1984; Forabosco ve ark. 2009; Milunsky ve Milunsky 2010).

2.4.2.1. Delesyon

“Delesyon” genetik materyalde (kromozomal ya da DNA düzeyinde) belli bir bölgenin eksikliğine verilen genel bir tanımlamadır. Delesyon, genomda kayba uğrayan bölge/segment için “parsiyel monozomi” ye yol açmaktadır. Yenidoğanda 1:7.000 sıklıkta görülmektedir (Jacobs ve ark. 1992). Otozomal delesyonlar içerisinde en sık rastlanan 5p, 4p ve 18p delesyonlarıdır (Forabosco ve ark. 2009). Literatürde özellikle sık görülen delesyon sendromlarının özgün fenotipik bulguları tanımlanmıştır (örn: 4p, 5p, 9p, 17p ve 18p delesyon sendromları). Bazı delesyonlar yüksek çözünürlüklü kromozom analizleri ya da FISH ve/veya moleküler tekniklerle araştırıldığında kompleks bir yeniden düzenlenme ürünü olduğu ve farklı segment/kromozom içerebildikleri görülmüştür. Bu nedenle saptanan delesyona özgün olmayan fenotipik bulguların varlığında moleküler tekniklerle inceleme yapılması önerilmektedir (Davies ve ark. 2003; Gunn ve ark. 2003; Gardner ve Sutherland 2004).

2.4.2.2. Duplikasyon

“Duplikasyon”, genetik materyalde (kromozomal ya da DNA düzeyinde) belli bir bölgenin artışına verilen genel bir tanımlamadır. Duplikasyon, genomda artış görülen bölge/segment için “parsiyel trizomi” ye yol açmaktadır. Yenidoğanda 1:7.000 sıklıkla görülmektedir (Jacobs ve ark. 1992). Özellikle bant kalıbı özgün olmayan ve küçük miktarlardaki (<5mb) duplikasyonlar bantlama teknikleri ile tanınamamaktadır. Bu nedenle mikroduplikasyon sendromları mikrodelsyon sendromlarına göre çok daha sonraları özellikle moleküler tekniklerle tanımlanabilmiştir.

2.4.2.3. İzokromozom

Kromozomun sentromerinin her iki tarafında, ayna görüntüsünde aynı kolun bulunması ile oluşan kromozoma “izokromozom” adı verilmekte olup disentrik ve monosentrik görülebilmektedir. Disentrik formda olanları sıklıkla mozaik olarak gözlenmektedir. Yaşamları bağdaşabildiği için en çok cinsiyet kromozomlarında (izokromozom Xq ve Y) görülmektedir. İzokromozomlar normal kromozom setine ek

olarak da bulunabilmektedir. Marker kromozomların da bir bölümü izokromozom yapısındadır. En iyi bilinen otozomal izokromozomlara örnek 18. kromozomun kısa kolunun izokromozomudur. İzokromozom 12p' nin ilave kromozom olarak bulunması Pallister-Killian sendromu olarak adlandırılmaktadır (Schinzel 1991). Bu sendromda bu güne kadar ilave izokromozom kan dokusunda gösterilememiş, yalnızca fibroblast dokusunda, amniyotik sıvı hücrelerinde ve kemik iliğinde mozaik olarak saptanmıştır (Ward ve ark. 1988). Klinik etkileri bildirilmiş diğer bir izokromozom i(9p)' dir (Tonk 1997).

2.4.2.4. Ring Kromozom

Kromozomun her iki kolunda meydana gelen kırılma sonrası asentrik parçaların kaybolması ve sentomer içeren parçanın uçlarının birleşmesi ile ortaya çıkan halka görüntüsündeki kromozoma ring kromozomu adı verilmektedir. Normal kromozom sayısında bir kromozomun ring formunda bulunması kayıp olan terminal segmentler için parsiyel delesyona neden olmaktadır. Delesyon segmentinin büyüklüğü ile orantılı olarak fenotipik etki artmaktadır. Literatürde telomerik bölge kırıkları ile oluşan ve fenotipik etki göstermeyen ring kromozomlu olgular bildirilmiştir (Melnik ve ark. 1995; Papoulidis ve ark. 2010). Bu duruma karşın, normal fenotipli ring kromozom taşıyıcılarının mitotik instabilite nedeni ile mozaik monozomi oluşmasının yol açtığı fenotipik etkilenmiş çocuk sahibi olduğu olgular da bildirilmiştir (Flejter ve ark. 1996). Ring kromozomlarında yüksek mitotik hata olasılığı vardır ve özellikle yaşamla bağdaşması nedeniyle ring formundaki cinsiyet kromozomlarının 45,X' li hücrelerle birliktelikleri sıklıkla bildirilmektedir (Kosztolanyi ve ark. 2010; Bertini ve ark. 2008; Lopez-Valdes ve ark. 2009). Ring kromozomlar normal kromozom setine ilave olarak da gözlenmekte, parsiyel trizomilerin olduğu bu durumlar marker kromozom olarak da tanımlanabilmektedir (Callier ve ark. 2009).

2.4.2.5. Marker Kromozom

Klasik bantlama teknikleri ile tanı konulamayan kromozomlar "marker kromozom" olarak isimlendirilmekte ve genellikle diploid kromozom setine ilave olarak

bulunmaktadır (sSMC: small supernumerary marker chromosomes). Prenatal çalışmalarda 0.5–1.5/1.000 sıklıkla gözlenirler (Blennow ve ark. 1994; Liehr ve ark. 2004, 2006; Warburton ve ark. 1991; Forobosco ve ark. 2009). X ve Y kökenli küçük marker kromozomlar kromozom setinde ikinci cinsiyet kromozomu olarak da karyotipte bulunabilirler, kromozomun kökeninin klinik önemi nedeni ile bu kromozomların kökeninin aydınlatılması gerekmektedir (Lopez-Valdes ve ark. 2009; Liehr ve ark. 2006). sSMC' lerin önemli bir kısmı sadece sentromer satellit yapılardan oluşmakta ve işlevsel gen içermediklerinden fenotip üzerine etki göstermemektedirler. Bu tip kromozomlar fenotipik olarak normal bireylerde saptanabilmekte ve ailevi olarak kalıtılabilmektedir. Marker kromozomlar fetal kromozom analizlerinde saptandıklarında bu kromozomun ökromatin materyal içerip içermediği ve buna bağlı olarak fenotipik etkisinin olup olmadığı çok büyük önem taşıdığından *de novo* oluşmuş marker kromozomun kökeninin belli bir algoritma içinde araştırılması sitogenetik laboratuvarlarının önemli bir sorumluluğudur (Karaman B ve ark. 2006; Liehr ve ark. 2010). sSMC lerin %30' u 15. kromozom, %11' i izokromozom 12p (Pallister-Killian sendromu), %7' si inv dup(22) (cat-eye sendromu), %6' sı i(18p) ve %7' si 15 hariç diğer akrosentrik kromozomlardan oluşmaktadır. Prenatal çalışmalarda saptanan marker kromozomun anormal fenotipe yol açma riski %13 olarak verilmektedir (Warburton 1991). sSMC' lerin ~%10' unun ring yapısında olduğu ve bu olguların % 60' ının fenotipik olarak etkilendiği bildirilmektedir (Liehr ve ark. 2006).

2.4.2.6. Kompleks Kromozom Anomalileri

Kompleks kromozom anomalileri (CCR: complex chromosomal rearrangements) en az üç kırık ile 2 ve daha fazla kromozom anomalisinin görülmesine verilen bir isimlendirmedir (Pai ve ark. 1980). Kompleks kromozom anomalilerinin bir bölümü görünürde dengeli kompleks translokasyonlardır. Dengeli kompleks translokasyonların ~%68' i konjenital malformasyon taşıyan yenidoğan ya da üreme sorunu olan olgularda, ~%23' ü fenotipik bulgular taşıyan olgularda ve ~%9' u da prenatal karyotiplerde saptanmaktadır. 246 *de novo* yapısal kromozom anomalisinin derlendiği 269.371 olguluk pranatal tanı çalışmasında *de novo* CCR sıklığı % 0.03 olduğu ve dişi taşıyıcıların erkeklerden 3 kez fazla olduğu bildirilmektedir (Giardino ve ark. 2009). Fenotipik olarak

normal CCR taşıyan bireylerin, ~%50 spontan gebelik kaybı riski ve ~%20 dengesiz ürün taşıyan çocuk sahibi olma riski taşıdığı bildirilmektedir (Madan ve ark. 1997). Erkek CCR taşıyıcılarının önemli bir kısmında oligospermi ve azosperminin yol açtığı infertilite sorunu olduğu bildirilmektedir (Kim ve ark. 2010). FISH ve moleküler incelemeler ile mikroskobik olarak dengeli görünen translokasyonlar ve kompleks kromozom anomalilerinin bir bölümünde kırık noktaları ya da önceden belirlenmemiş başka bir lokus üzerinde yeniden düzenlenmeler olduğunu ortaya konulmuştur (Ballarati ve ark. 2009).

2.4.2.7. Submikroskobik Yapısal Kromozom Anomalileri

Mikroskobik olarak görülebilecek yapısal anomalilerin büyüklüğü değerlendirilen kromozomun bant çözünürlüğü, kalite ve değerlendirenin deneyimine göre değişmekle birlikte yaklaşık >3-5 Mb dır. Yapısal kromozom anomalisinin klasik bantlama teknikleri ile görüntülenemeyecek kadar küçük olması durumunda bu anomali “submikroskobik anomali” olarak tanımlanmaktadır. Bu anomaliler ancak moleküler sitogenetik ya da moleküler genetik tekniklerle gösterilebilmektedir.

Yüksek çözünürlüklü bantlama teknikleri (HRBT: High resolution Banding technique) ve FISH tekniklerinin uygulanması ile birçok submikroskobik delesyon/duplikasyon sendromu tanımlanmıştır (Örn: DiGeorge sendromu, Williams sendromu, Smith Magenis sendromu, Miller Dieker sendromu, Angelman/Prader willi sendromu, 1p36 delesyon sendromu, 17q21.31 delesyon sendromu, 22q11.21 duplikasyon sendromu, 16p13.3 delesyon sendromu v.d).

Kromozomların telomerik bölgeleri işlevsel genler için son derece zengin bölgeler olmasına karşın bantlama teknikleri ile özgün bant kalıbı göstermediklerinden değerlendirilmesi çok zor bölgelerdir. Son yıllarda kromozomların subtelomerik bölgelerinin araştırılması amacıyla geliştirilen moleküler sitogenetik ve moleküler genetik testler birçok farklı olgu grubunda uygulanmış ve farklı sıklıklarda subtelomerik yeniden düzenlenmeler bulunmuştur (Knight ve ark.,1999). Saptanan anomali sıklıkları arasında olgu grubunun seçim kriterlerine ve çalışma metoduna bağlı olarak oldukça farklılıklar

bulunmaktadır. Birçok sayısal ve yapısal kromozom anomalisinin farklı konjenital anomalilerin yanı sıra zihinsel yetersizliğe de yol açtığı bilinmektedir. Bununla birlikte zeka geriliği olgularının çalışma grubu olarak seçildiği araştırmalarda yapılan kromozom analizlerinde %4–34.1 arasında değişen oranlarda kromozom anomali insidansı saptanmıştır (Xu ve Chen 2003). Öte yanda kromozom analizleri normal sonuçlanmış zeka özürlü olgularda yapılan subtelomerik FISH, SKY, MAPH ve MLPA teknikleri ile yapılan subtelomer incelemelerinde %0-29,4 arasında değişen oranlarda telomerik yeniden düzenlenmeler saptanmıştır (Tablo 2-4). Kromozom analizleri ve Frajil X çalışması normal sonuçlanmış 11.688 olguluk subtelomerik FISH çalışmasında subtelomerik anomali oranı %2,5 olarak bulunmuştur (Ravnan ve ark, 2006). Kromozom anomali saptanmamış konjenital anomalili olgulardaki subtelomerik FISH çalışmalarında subtelomerik yeniden düzenlenmelerin oranı %4-13.3 olarak bildirilmektedir (Popp ve ark. 2002; Gignac ve ark. 2006).

Submikroskopik kromozom anomalilerinin moleküler tekniklerin de kullanıldığı yeni çalışmalarda, içerisinde 17q21.31, 15q13.3, 15q24, 1q41–1q42, 16p11–12.1, 2p15–16.1, 9q22.3 kromozom lokuslarının da bulunduğu birçok yeni sendrom tanımlanmıştır (Slavotinec 2008; Rosello ve ark. 2010; Spengler ve ark. 2010; Goumy ve ark. 2010).

Tablo 2-4: Zihinsel özürlü olgularda farklı tekniklerle subtelomerik bölge araştırmaları ve literatürle karşılaştırması

Referans	Olgu sayısı	Anomali sayısı	%
Subtelomerik FISH			
Viot ve ark.(1998)	17	4	23
Vorsanova ve ark.(1998)	209	8	3,8
Lamb ve ark.(1999)	43	1	2,3
Knight ve ark.(1999)	284 orta/ ağır MR	21	7,4
	182 hafif MR	1	0,5
Uhrig ve ark. (1999)	20	2	10,0
Joyse ve ark.(2001)	200	0	0
Rossi ve ark.(2001)	200	13	6,5
Hersh ve ark (2001)	44	3	6,8
Fan ve ark (2001)	150	6	4,0
Riegel ve ark (2001)	254	13	5,1
Sismani ve ark (2001)	70	1	1,4
Anderlid ve ark (2002)	111	10	9,0
Baker ve ark (2002)	250	9	3,6
Clarkson ve ark (2002)	50	2	4
Sogaard ve ark.(2005)	132	9	7
Baroncini ve ark (2005)	219	12	5,5
Ravnan ve ark.(2006)	11.688	303	2,6

CGH			
Joly ve ark (2001)	17	5	29,4
Kirchhoff ve ark (2001)	144	4	2,8
PRINS			
Bonifacio ve ark (2001)	65	2	3
GENOTİPLEME			
Flint ve ark (1995)	99	3	3
Slavotinek ve ark (1999)	27	2	7,5
Colleaux ve ark (2001)	24	2	8,3
Borgione ve ark (2001)	30	2	6,7
Rooms ve ark.,(2004)	75	3	4
MLPA			
Rooms ve ark.(2004)	75	4	5,2
Koolen ve ark.(2004)	210	14	6,7
Kirchhoff ve ark.(2007)	258	15	5,8
DİZİN (ARRAY)			
Menten ve ark (2006)	140	11	8
Shao ve ark.(2008)	1.813	69	3,8
Thuresson ve ark. (2007)	48	3	6

(Xu ve Chen. 2003' den alınarak değiştirilmiştir)

2.5. KROMOZOM ANOMALİLERİNİN TANI YÖNTEMLERİ

Kromozom analizlerinde hedef, sayısal anomalilerin yanı sıra olası tüm yapısal dengesizliklerin de araştırılmasıdır. İlk sayısal anomalinin tanımlandığı 1959 yılından günümüze kadar bu alanda büyük aşamalar kaydedilmiş, geliştirilen yeni tekniklerin kullanımı ile birçok mikrodelsiyon/duplikasyon sendromu tanımlanmıştır (Bonnet 2010; Van bon 2010; Portnoi 2005; Somerville 2005; Berg 2009). Günümüzde, bu tekniklerin birlikte kullanımı ile daha etkin fakat maliyet açısından da daha uygun olan yöntem ve algoritmaların geliştirilmesine çalışılmış ve çalışılmaktadır. İnsan kromozomlarının analizleri sitogenetik, moleküler sitogenetik ve moleküler yöntemlerle yapılabilmektedir. Sitogenetik ve moleküler sitogenetik yöntemlerle metafazlar incelendiğinde çalışma hassasiyetine bağlı olarak sayısal ve yapısal anomaliler hem dengeli hem de dengesiz olarak araştırılabilirken, moleküler yöntemlerle dengeli yapısal anomaliler gösterilememektedir.

2.5.1. Kromozom Anomalilerin Tanısında Klasik Sitogenetik Yöntemler

Klasik sitogenetik incelemelerde, hücreler kültür edilmeden veya hücre kültürü ile çoğaltılarak elde edilen metafaz plakları kullanılmaktadır. Bunun için kültür hücrelerinin mitoz bölünmeleri, inhibe edici ajanlarla (kolşisin, vinblastin v.b.) durdurulmakta ardından hipotonik bir solüsyon ile hücreler şişirilip fiks edilerek preparatlara yayılmaktadır. Bantlama tekniklerinin henüz bilinmediği ilk yıllarda kromozomlar konvasiyonel olarak boyanıp sayısal ve büyük yapısal anomaliler açısından incelenmekte idi. Günümüzde kromozomlar farklı bantlama teknikleri (GTG, HRBT, RBG, NOR, CBG, QFA vd.) ile bantlanıp ışık mikroskobu ile incelenmektedir. Elde edilen kromozomların rezolüsyonu haploid set için 250 ile 850 bant düzeyine kadar değişebilmektedir. Ortalama 550 bant düzeyi ~5Mb lık bir rezolüsyonla kromozomların yapısal anomalilerinin tanınmasına olanak sağlamaktadır (Schaffer ve Bejjani 2004). Bu durum araştırılan bölgenin özgün bir bant kalıbı içerip içermemesi ile de değişebilmektedir. Ballif ve ark.'nın (2007) GTG, subtelomerik ve lokus spesifik FISH çalışması normal sonuçlanmış 6.946 olgulu aCGH çalışmasında, 5Mb dan daha büyük bir bölgeyi içeren yeniden yapılanma taşıyan olguların gözden kaçabildiği ve bu bölgelerin daha çok subtelomerik bölgeler olduğu dikkat çekicidir. Yu ve ark. (2003) aynı deneyimi paylaşmış ve rutin analizlerde yaklaşık 10-15Mb kadarlık değişikliklerin dahi gözden kaçabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bu nedenle incelenen olguda test istemi sırasında herhangi bir mikrolezyon için özgün klinik bulgunun olması ve klinisyenin bunu endikasyonda belirtmesi seçici analiz sağladığından yapısal değişimin daha dikkatli araştırılmasına olanak sunmaktadır. GTG ve HRBT gibi klasik bantlama tekniklerinin yeterli gelmediği 5 Mb'den daha küçük yapısal anomalilerin tanımlanabilmesi için moleküler sitogenetik ya da moleküler genetik yöntemlerle araştırma yapılması gerekmektedir (Shaffer ve ark. 2004).

2.5.2. Kromozom Anomalilerin Tanısında Moleküler Sitogenetik Yöntemler

Klasik yöntemler ile 550 bantlık rutin analizlerde 5Mb' dan daha küçük kromozomal değişimlerin tanınması mümkün olamamaktadır. Bu nedenle, özellikle

bilinen mikrolelesyon ve mikroduplikasyon sendromlarının tanısında kullanılan yöntemler içerisinde en pratik, hızlı ve maliyet açısından uygun olan yöntem bu sendromlara özgün problemlerin kullanımı ile gerçekleştirilen FISH tekniğidir. Bu problemler ancak sendroma özgün klinik bulguların varlığında kullanılabilir. Kanser dokularında da, klasik yöntemlerle birlikte kullanılan FISH tekniği tanıda çok önemli katkılar sağlamaktadır. Kromozomların subtelomerik bölgeleri genler açısından çok zengin olmakla birlikte bant kalıpları özgün değildir ve anomalilerinin tanısı klasik bantlama teknikleri ile hemen hemen imkansızdır. Bu bölgelerin önemi anlaşıldıktan sonra geliştirilen subtelomerik bölgelere özgün FISH problemleri, klasik yöntemlerle kromozom anomalisi gösterilemeyen non-spesifik MKA/MR olgularında anomalinin araştırılmasında önemli katkılar sağlamıştır. Ravnan ve ark. (2006) 11.688 olguda yaptıkları subtelomerik FISH çalışmasında %3 oranında subtelomerik yeniden düzenlenme saptamıştır. Literatürde MKA/MR olgularında bu oran %0-23 arasında verilmektedir (Joyce ve ark. 2001; Viot ve ark. 1998). Saptanan anomali oranlarındaki farklılıklar özellikle olgu seçim kriterlerine bağlı olmaktadır.

Dizin çalışmalarının öncüsü sayılan “kromozomal CGH” yöntemi de moleküler sitogenetik teknikler arasında sayılmaktadır. Bu yöntem, incelenen DNA ile normal yapıdaki kontrol DNA'nın farklı floresanlı boyalar ile işaretlenerek metafaz kromozomlarında hibridizasyonu ve floresan sinyallerinin mikroskopla görüntülenerek sinyallerin birbirine oranının karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Her iki floresan renginin kromozom üzerinde oluşturduğu dengenin bozulması ile delesyon/duplikasyon tanısına gidilmektedir. Bu teknik, ilk olarak tüm genomun incelenmesine olanak sağlaması bakımından devrimsel bir nitelik taşımasına karşın kromozomların perisentromerik ve terminal bölgelerinde hassasiyetin düşük olması, rezolusyonunun kısıtlı olması uygulama ve analiz zorluğu, yaygın kullanımına engel olmaktadır (Bryndorff ve ark. 1995; Nacheva ve ark. 1998; Jacobsen ve ark. 2000).

2.5.2.1. FISH Analizleri

İn situ hibridizasyon işlemi; işaretli DNA dizilerinin (prob) lam üzerinde bulunan metafaz ya da interfaz nükleuslarındaki dentüre edilmiş DNA dizilerine hibridize

edilmesi ve probun taşıdığı işaretin görüntülenmesine dayanmaktadır. Probun flouresanlı boyalar ile işaretlenmesi nedeniyle, “Flouresan in situ hibridizasyon (FISH)” tanımlaması kullanılmaktadır. Problar YAC, BAC veya kozmid kütüphanelerinden elde edildiği gibi, özellikle satellit dizilerinde PCR ile de çoğaltılabilmektedir. Birçok prob çeşidinin ticari formu bulunmaktadır. Genomda istenen bölgeler için özel prob tasarımı laboratuvar ortamında değişik işaretleme ve klonlama metodları ile de yapılabilmektedir. Üretilen problemler hedef aldıkları kromozom bölgelerine göre isimlendirilmektedir. Bunlar;

Satellit problemleri: kromozomların satellit dizilerini içeren problemlerdir. Sentromerik satellit (alfa satellit), heterokromatik satellit (Yq, 1q) dizilerine yönelik hazırlanmıştır.

Boyama problemleri: Bir kromozomun bir kolunu ya da tüm kromozomu işaretleyebilen problemlerdir.

Lokus spesifik problemler: Kromozomların sadece belli lokuslarına yönelik hazırlanan problemlerdir. Özellikle mikrodelsiyon sendromlarına yönelik problemler bu gruba girerler (Di George lokus spesifik probu, Elastin gen lokus spesifik probu vb).

Telomerik problemler: Bunlar telomerik tekrar dizilerini içeren problemlerdir. Pan telomerik FISH problemleri olarak da isimlendirilirler. Aynı prob tüm kromozomların telomerik bölgelerine eşlenik olduğundan tüm telomerlerde sinyal verirler.

Sub telomerik problemler: Kromozomların telomerik uçlarına yakın olan özgün gen bölgelerindeki lokusları hedef olan problemlerdir. Her bir kromozomun subtelomeri için ayrı olarak üretilmektedir.

Translokasyon problemleri: Bilinen bazı translokasyonların yeniden düzenlenmiş pozisyonuna göre üretilen, füzyon ürününü tanıyan problemlerdir. Onkolojik çalışmalarda bilinen translokasyonların tanısı için kullanılmaktadır.

Breakapart (parçalara ayrılan) problemler: Kırık beklenen bölgede komşu iki alanı hedef alan ve kırıkla birlikte ikiye ayrılarak, ayrı renk ile farklı sinyal veren problemlerdir. Onkolojik çalışmalarda bilinen translokasyonların tanısında kullanılırlar.

Ticari problemlerde yapılan yeniliklerle, problemlerin 5 farklı renkte floresan boyalarla işaretlenebilmesi bu problemlerin özellikle fetal kromozom çalışmalarında hızlı aneuploidi tanısında kullanılmasını sağlamıştır. Tepperberg ve ark.'nın (2001) yayınladıkları retrospektif bir çalışmada; sık rastlanan sayısal kromozom anomalileri olan 13, 21, 18, X ve Y kromozomları için Aneuvysion probu ile toplam 6.576 olguda interfaz FISH incelemesi yapıldığı ve klasik sitogenetik metodla %99,8 uyum görüldüğü bildirmiştir. Aynı çalışmada o güne kadar yapılan tüm aneuvysion taramalarında kendi çalışmaları da dahil 29.039 olguda %0.003 yanlış pozitiflik oranı ve %0.024 yanlış negatiflik oranı saptandığını bildirmiştir. Görüldüğü üzere ilgili 5 kromozom için yüksek doğruluk ve hassasiyette tarama amaçlı FISH incelemeleri yapılabilen fakat diğer kromozomların olası sayısal anomalileri (özellikler mozaiksim açısından) ve tüm kromozomların yapısal anomalilerini tanımaya yetersiz kalmaktadır.

Özel olarak tasarlanmış lam ve lamellerle aynı lam üzerinde 24'e kadar farklı bölgeye hibridizasyon yapılabilen multiprobe FISH (Multiprobe®-Cytocell) yöntemi de aynı preparatta birden fazla lokus/kromozomun, floresan mikroskopla bir program ve bilgisayar desteği olmadan incelenebilmesine imkan tanımaktadır. Bu metod birçok amaçla kullanılabilmekte, marker kromozomlar, marker kromozomların ve yapısal kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında sıklıkla kullanılabilmektedir. Bundan başka kendilerine özgün programlarla analizleri yapılabilen özel spektral kamera ile kromozomların tümünün farklı bir spektrumda boyandığı SKY® ve kromozomların floresan renklerle bantlanarak ayrıldığı, birden fazla ticari firmanın satışını yaptığı farklı marka M-FISH problemleri de moleküler sitogenetikte daha seyrek de olsa kullanılmaktadır (Sung ve ark. 2009; Lee 2010).

Rutin uygulamada mikrodelsyon sendromlarının, yapısal kromozom anomalilerinin ve marker kromozomların detaylı olarak araştırılması, onkolojik amaçlı yapısal ve sayısal kromozom anomalileri, prenatal amaçlı aneuploidi taramaları ve

preimplantasyon genetik tarama çalışmalarında FISH tekniğinden yararlanılmaktadır (Xu J, Chen. 2003; Karaman ve ark. 2006).

2.5.3. Kromozom Anomalilerinin Tanısında Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler genel olarak DNA ve RNA düzeyindeki değişimlerin araştırmalarında kullanılmaktadır. Ancak kromozom analizleri ile gösterilemeyecek kadar küçük (<3-5 mb) kromozom anomalilerin tanısında da uygulama alanı bulmuştur. Özellikle de homolog kromozomlar arasındaki farklılıkların tanınmasına yönelik kullanılmaktadır. Bunlar arasında gerçek zamanlı döngü cihazı (real time PCR) ve kapiler jel elektroforezinin de kullanımı ile uygulanan doz çalışmaları öne çıkmaktadır. Anöploidi taramaları için kullanılan kantitatif (QF) PCR, Y mikrodelsiyonlarının tanısı için kullanılan multipleks PCR ön plana çıkmaktadır. Bu teknikler yapısal kromozom anomalilerinin ayrıntılı olarak incelenmesine de olanak sağlamaktadır (Duno ve ark. 2004; Boehm ve ark. 2005; Balakrishnan ve ark. 2006). Günümüz ilerlemeleri ile dolaylı olarak kromozomlardaki doz değişikliklerinin araştırıldığı bazı araştırmacıların sanal karyotipleme (*virtual karyotyping*) olarak da isimlendirdiği mikrodizin analizleri de moleküler sitogenetik alanında değerlendirilmektedir (Zhang ve ark. 2009; Alvarez ve ark. 2010).

Yapısal anomalilerin aydınlatılmasında kullanılan moleküler teknikler olarak; kantitatif PCR, MAPH, MLPA ve mikrodizin sayılabilir.

2.5.3.1. Kantitatif PCR

Kantitatif PCR yöntemi, floresan boyalarla işaretli primerler kullanılarak, gerçek zamanlı PCR ürünü olan DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi esasına dayanan bir tekniktir. Floresan sinyali PCR ürün miktarıyla doğru orantılı olarak artmakta, DNA veya RNA'nın miktarlarının PCR analizi sırasında ya da kapiler elektroforez ile belirlenmesi ile sonuç elde edilebilmektedir. Kantitatif PCR hızlı anöploidi taraması için uygun bir yöntemdir. Bu yöntemde, sayısal olarak taranacak her bir kromozomun, belirli STR (short tandem repeat) bölgesine yönelik farklı işaretli

primerleri ile termal döngü cihazında belirli sayıdaki siklusta (20-30 siklus) PCR gerçekleştirilmektedir. Siklus sayısının belli bir sayıda tutulması, ürünün deneydeki kalıp dizisinin miktarı ile orantılı olmasını sağlamaktadır. Elde edilen PCR ürünü, kapiler elektorforez cihazında yürütülür, doz miktarı ve STR uzunluk farklılıklarına bakılarak incelenen kromozomlar için sayısal olarak bilgi edinilir. Kantitatif PCR tekniği aynı zamanda polimorfik olmayan özgün dizilerin dozunu araştırmak amaçlı da kullanılmaktadır. Bazı yapısal kromozom anomalilerinin doğrulanması (konfirmasyonu) bu yöntemle yapılmaktadır (Van der Aa ve ark. 2009; Merla ve ark. 2010; Sommerville ve ark. 2005). Bu durumda, olguda araştırılacak bölgeye ilaveten farklı bir bölge de seçilir. Aynı bölgeler kontrol birey/lerinde de seçilip farklı DNA yoğunluklarında PCR işlemleri gerçekleştirilir. İşlem sonrası kontrol bireyindeki iki ürünün oranı ile olgudan elde edilen ürünlerin oranları karşılaştırılarak rölatif olarak araştırılan bölgenin dozunda artma ve azalma olup olmadığına karar verilir.

2.5.3.2. MAPH (Multiplex Amplification and Probe Hybridization)

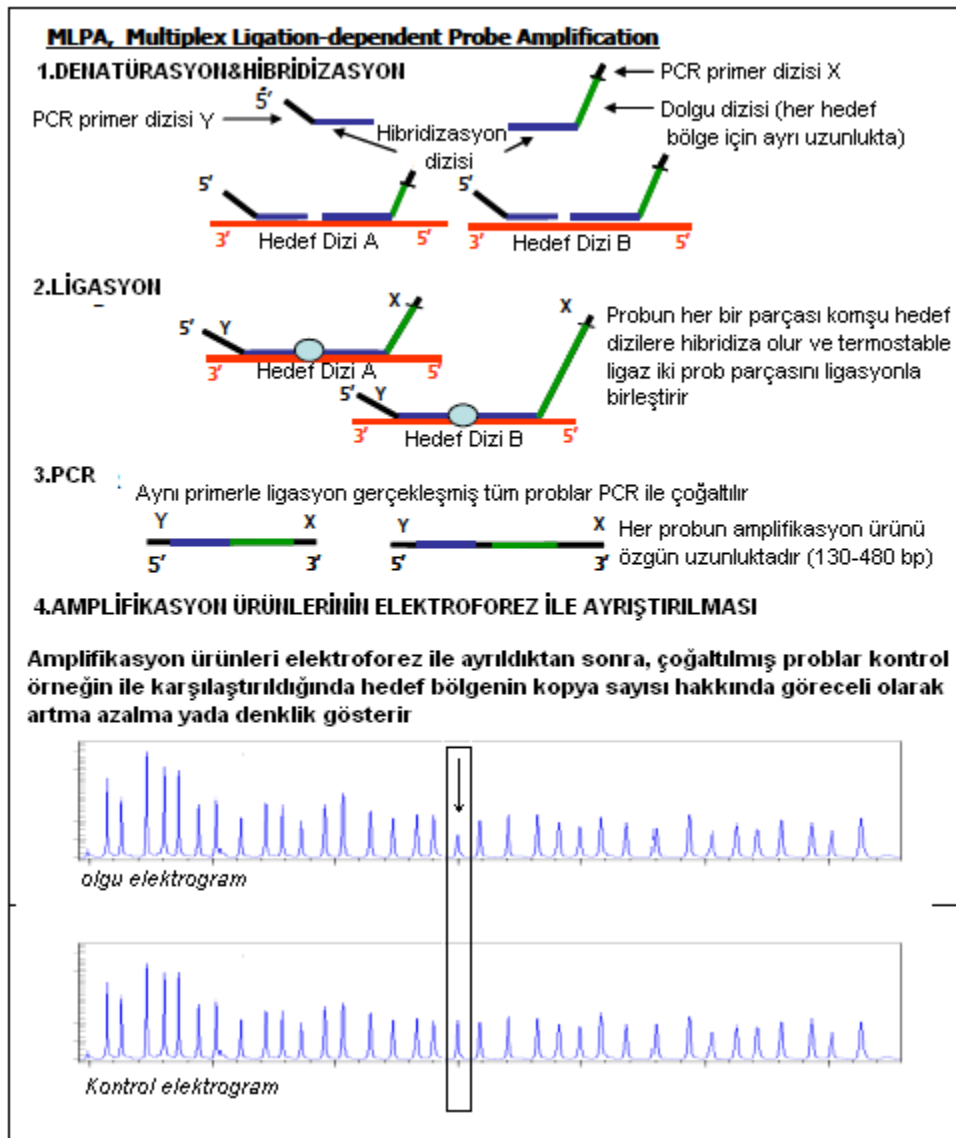
Araştırılacak bölge için farklı uzunluklarda hazırlanmış problemlerin naylon membran üzerinde, genomik DNA ile hibridizasyonu sonrasında yapılan, yıkama ve kantitatif PCR temeline dayanan bir tekniktir. Sonuçlar multipleks olarak tek çalışmada elde edilmektedir. Elde edilen fragmanlar jel ya da kapiler elektroforezde yürütülerek değerlendirilebilmektedir (Sellner ve ark. 2004; Patsalis ve ark. 2007). MAPH değişik çalışma gruplarında kullanılan bir teknik olmakla birlikte, özellikle açıklanamayan zeka geriliği olan olgularda sub telomerik bölgelerin delesyon ve duplikasyonlarının araştırılmasında, tek gen hastalıklarının (Duchenne Muskular Distrofi. vb.) delesyon ve duplikasyon tipi mutasyonlarının taranmasında (Hollox ve ark., 2002) ve bazı kanser olgularının gen taramalarında (Rakha ve ark.2004) kullanılmaktadır.

2.5.3.3. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

MLPA® (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) Türkçe'ye "Çoğul ligasyon bağımlı arttırım" olarak da tercüme edilebilecek bu teknik, 1nükleotidlik farkı bile ayırt edebilecek etkinlikte olup, genomik DNA veya RNA örneğinin 50 den fazla

bölgesi için kopya sayısı değişikliklerini multipleks PCR tekniği kullanarak araştırılmasına olanak vermektedir (Schouten JP ve ark. 2002). MLPA tekniği, termal döngü cihazı ve kapiler elektroforez cihazı bulunan laboratuvarlarda uygulanabilecek kolay bir tekniktir. Bu teknik ile aynı çalışmada 96 örnek birlikte çalışılabilmekte ve 24 saat içinde sonuç alınmasına olanak vermektedir.

MLPA tekniğinin uygulaması aşağıda şematik olarak (Şekil 2-2) de gösterilmektedir.



(Schouten ve ark. 2002 yayınından uyarlanmıştır)

Şekil 2-2: MLPA tekniği uygulamasının şematik anlatımı

Genlerin parsiyel ya da total delesyon/duplikasyonlarının birçok genetik hastalıkta ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu kopya sayısı değişiklikleri bazen birçok komşu gen bölgesini bir arada içerecek şekilde (DiGeorge sendromu, Williams sendromu, Williams bölgesi duplikasyon sendromu vb.) gözlenmektedir. Kopya sayısında ortaya çıkan bu değişimlerin varlığının araştırılmasında FISH, CGH, dizin teknikleri, Southern blotting ve doza bağımlı metodlar (kantitatif PCR, real time PCR, MAPH vb) kullanılmaktadır. Uygulama kolaylığı nedeni ile, MLPA tekniği genlerdeki kopya sayısı değişikliklerinin sorumlu olduğu tek gen hastalıklarında tanı koyma oranlarını yükseltmektedir (Aretz ve ark. 2007; Redeker ve ark. 2008; Kanno ve ark. 2007; Aldred ve ark. 2006; Dikow N. 2007; Bittel ve ark. 2007; Procter ve ark. 2006)

Postnatal olgularda MLPA kullanımı, telomerik bölgelerdeki kopya sayısı değişikliklerinin taranması, Duchenne müsküler distrofisinde, meme ve kolon kanseri (Schouten ve ark 2002) ve fetal anöploidi taramalarında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kirchhoff ve ark 2007). Günümüzde, prenatal olgularında anöloidi taraması, metilasyona özgün problemler ile Prader Willi/Angelman sendromu, Fragile X sendromu ve bazı metilasyon ilişkili kanser araştırmaları ile sub telomerik ve mikrolelesyon /duplikasyon sendromlarındaki geniş olgu gruplarında kullanılmaktadır. Son yıllarda subtelomerik ve mikrolelesyon/duplikasyon sendromik problemleri prenatal olgularda da kullanılmaya başlanmıştır (Hoppman-Chaney ve ark. 2010; Madrigal ve ark. 2007; Park ve ark. 2011; Goumy ve ark. 2010).

Ticari olarak 2010 yılı sonunda ~350 den fazla MLPA prob seti bulunmaktadır. MLPA problemleri nörojenetik hastalıklar, mental retardasyon, tüm anöploidi taraması, sentromerik tarama, onkolojik taramalar, tümör karakterizasyonu, metilasyon gösteren genlerin araştırılması, farmakogenetik araştırmalar gibi farklı konulara yönelik olarak, ~10.000 den fazla lokus kapsamaktadır.

Ayrıca, bilinen mikrolelesyon/duplikasyon sendromlarını tanımaya yönelik problemlerin yanı sıra, submikroskopik yapısal kromozom anomalilerinin taranmasına da hizmet edecek subtelomerik lokusları hedef alan prob setleri de ticari olarak bulunmaktadır. MRC Holland firması tarafından kullanıma sunulan subtelomerik prob

setinden çalışmada kullanılan P070 prob seti ve sendromik setlerinden P245 prob seti lokusları, hedef aldığı fragmanların uzunlukları, her bir lokusda hedeflenen gen bölgesi, prob numarası ve “mapview built 36” genomik harita pozisyonları sırasıyla tablo2-5 ve tablo 2-6’ da gösterilmektedir. Subtelomerik prob setinde, akrosentrik kromozomların p kolları yerine q kolları proksimal bölgelerindeki lokuslar taranmaktadır. Mikrodelesyon/duplikasyon sendromlarına yönelik hazırlanmış P245 prob setinin hedef aldığı sendromlar, bunların kromozomal lokusları ve bu sendromlarla ilişkilendirilen klinik bulgular tablo 3-2’ de sunulmaktadır.

Subtelomerlerin taranmasına yönelik MLPA problemleri, kromozomların sub telomerlerinde farklı lokusları kapsayacak şekilde çeşitlendirilmiş olarak sunulmaktadır. Bu problemlerden P036 ve P070 prob setleri en çok kullanılan subtelomerik bölge tarama problemleri olup birbirlerinin doğrulama çalışmasında kullanılmaktadır. Literatürde zeka geriliği taşıyan olgu gruplarında, subtelomerik tarama problemleri kullanılarak yapılan MLPA çalışmalarında %1,8 ile 5,9 arasında değişen oranlarda subtelomerik yeniden düzenlenme bildirilmektedir (Tablo 2-10).

Tablo2-5:MLPA SALSA P070-A2 Human Telomere-5 Prob setinin lokus detayları

Uzunluk (nt)	Kromozom pozisyonu	Araştırdığı gen	SALSA MLPA prob numarası	Mapview build 36 pozisyonu
64-70-76-82	Q-fragmanları: DNA kalite kontrol fragmanları			
88-92-96	D- fragmanları: Denaturasyon kontrol fragmanları			
100	X- fragmanları: Cinsiyet kontrol fragmanı			
105	Y- fragmanları: Cinsiyet kontrol fragmanı			
118	Y- fragmanları: Cinsiyet kontrol fragmanı			
130	1q	<i>SH3BP5L(KIAA1720)</i>	4084-L03605	01-247.08
137	2q	<i>ATG4B(=APG4B)</i>	2781-L03168	02-242.25
144	3q	<i>KIAA0226</i>	2690-L02842	03-198.88
151	4q	<i>FRG1</i>	2691-L02843	04-191.10
158	5q	<i>GNB2L1</i>	2790-L02232	05-180.60
165	6q	<i>TBP</i>	2694-L02844	06-170.71
172	7q	<i>VIPR2</i>	2793-L03167	07-158.63
179	8q	<i>RECQL4</i>	2695-L00610	08-145.71
186	9q	<i>EHMT1</i>	2792-L02846	09-139.78
194	10q	<i>ECHS1</i>	2696-L02847	10-135.03
202	11q	<i>IGSF9B(=KIAA1030)</i>	2697-L02848	11-133.29
210	12q	<i>ZNF10</i>	2686-L02849	12-132.24

Uzunluk (nt)	Kromozom pozisyonu	Araştırdığı gen	SALSA MLPA prob numarası	Mapview build 36 pozisyonu
218	13q	<i>CDC16</i>	2698-L00753	13-114.03
226	14q	<i>MTA1</i>	2699-L02850	14-104.99
234	15q	<i>TM2D3(=FLJ22604)</i>	2701-L02851	15-100.01
242	16q	<i>GAS8(=GAS11)</i>	2702-L00734	16-088.64
250	17q	<i>SECTM1</i>	2703-L03169	17-077.87
258	18q	<i>CTDP1</i>	2704-L03607	18-075.58
266	19q	<i>BC-2</i>	2705-L02853	19-063.76
274	20q	<i>UCKL1(=FLJ20517)</i>	2706-L00642	20-062.05
282	21q	<i>SI00B</i>	2587-L02854	21-046.85
290	22q	<i>ARSA</i>	2707-L00661	22-049.41
298	X/Yq(PAR2)	<i>VAMP7(=SYBL1)</i>	2708-L02855	X-154.82+Y-057.68 (PAR region)
306	1p	<i>TNFRSF18</i>	2270-L01762	01-001.13
314	2p	<i>ACPI</i>	2709-L02856	02-000.27
322	3p	<i>CHL1</i>	2896-L02363	03-000.34
330	4p	<i>ZNF141</i>	2779-L02221	04-000.32
338	5p	<i>LOC133957</i>	2791-L02233	05-000.26
346	6p	<i>IRF4</i>	4077-L03462	06-000.34
354	7p	<i>UNC84A</i>	2780-L02857	07-000.84
362	8p	<i>FBXO25</i>	2715-L00973	08-000.40
370	9p	<i>DOCK8(=FLJ00026)</i>	2716-L00688	09-000.38
378	10p	<i>ZMYND11(=BS69)</i>	5180-L02227	10-000.22
386	11p	<i>BET1L</i>	2784-L02226	11-000.20
394	12p	<i>JARID1A(=RBBP2)</i>	2787-L02229	12-000.29
402	“13p”*	<i>PSPC1</i>	2717-L03608	13-019.25(Acrocentric)
410	“14p”*	<i>ADPRTL2</i>	2718-L00732	14-019.90(Acrocentric)
418	“15p”*	<i>NDN</i>	4026-L01542	15-021.48(Acrocentric)
426	16p	<i>DECR2</i>	2720-L00648	16-000.40
434	17p	<i>RPH3AL</i>	4081-L03465	17-000.18
442	18p	<i>THOC1</i>	2789-L02231	18-000.20
450	19p	<i>PPAP2C</i>	3501-L02880	19-000.23
458	20p	<i>ZCCHC3(=FLJ22115)</i>	2723-L00641	20-000.23
466	“21p”*	<i>STCH</i>	2724-L00334	21-014.68(Acrocentric)
474	“22p”*	<i>IL17RA</i>	2725-L00660	22-015.96(Acrocentric)
482	X/Yp	<i>(PARI)SHOX</i>	3714-L00910	X/Y-000.52(PAR region)

*13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomların belirlenen tarama bölgeleri kolu olarak belirtilen bölgeler için q kolu perisentromerik lokuslar kullanılmaktadır.

Tablo2-6:MLPA SALSA P245A2 Mikrodelesyon Sendromları Prob setinin lokus-sendrom ilişkileri

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA prob numarası	Kromozom pozisyonu	İlişkili Sendrom
64-70-76-82	Q-fragmanları: DNA kalite kontrol fragmanları		
88-92-96	D- fragmanları: 88 ve 96 Denatürasyon kontrol fragmanları 92 ligasyon kontrol fragmanı		
100	X- fragmanları: Cinsiyet kontrol fragmanı		
105	Y- fragmanları: Cinsiyet kontrol fragmanı		
118	Y- fragmanları: Cinsiyet kontrol fragmanı		
130	<i>TNFRSF4</i> Probe 2269–L01761	1p36.33	1p36 delesyonsendromu
136	<i>GATA3</i> Probe 7632–L07317	10p	DiGeorge bölgesi 2 (10p)
142	<i>PAFAH1B1</i> Probe 4120–L03532	17p13.3	Miller-Dieker bölgesi
148	<i>MECP2</i> Probe 9310–L09999	Xq28	MECP2/ Xq28 duplikasyonu
154	<i>NSD1</i> Probe 2595–L08077	5q35.3	Sotos sendromu
160	<i>UBE3A</i> Probe 4620–L00863	15q12	Prader-Willi/Angelman
166	<i>GABRD</i> Probe 4690–L07966	1p36.33	1p36 deletion sendromu
172	<i>CREBBP</i> Probe 3087–L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi sendromu
178	<i>GNB1</i> Probe 2890–L07968	1p36.33	1p36 delesyonsendromu
184	<i>MECP2</i> Probe 9311–L10002	Xq28	MECP2/ Xq28 duplikasyon
190	<i>SEMA7A</i> Probe 8380–L10003	15q24.1	“15q24 delesyonsendromu
196	<i>CLDN5</i> Probe 1218–L06270	22q11.21	DiGeorge sendromu
202	<i>MECP2</i> Probe 3409–L02797	Xq28	MECP2/ Xq28 duplikasyonu
208	<i>GP1BB</i> Probe 5464–L10114	22q11.21	DiGeorge sendromu
214	<i>NDN</i> Probe 6282–L01542	15q11.2	Prader-Willi/Angelman
220	<i>PAX6</i> Probe 3253–L02690	11p13	WAGR sendromu
226	<i>MAPT</i> Probe 7856–L08385	17q21.31	17q21 mikrodelesyon sendromu
232	<i>LETM1</i> Probe 4190–L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn bölgesi
238	<i>PAFAH1B1</i> Probe 1443–L08394	17p13.3	Miller-Dieker bölgesi
247	<i>SNRPN</i> Probe 2026–L10004	15q12	Prader-Willi/Angelman
253	<i>SHANK3</i> Probe 10181–L11409	22q13.33	22q13 /Phelan-Mcdermid
260	<i>NF1</i> Probe 3778–L11180	17q11.2	NF1 mikrodelesyon sendromu
267	<i>FANCL</i> Probe 8386–L11411	2p16.1	2p16.1 delesyon sendromu
274	<i>LRRC48</i> Probe 1452–L00936	17p11.2	Smith-Magenis sendromu
283	<i>CRR9</i> Probe 1126–L00684	5p15.3	Cri du Chat sendromu
292	<i>SNRPN</i> Probe 1318–L07970	15q12	Prader-Willi/Angelman
297	<i>DMD</i> Probe 1412–L01059	Xp21.2	Kromozom X kontrol probu
303	<i>LLGL1</i> Probe 1453–L08499	17p11.2	Smith-Magenis sendromu
310	<i>ELN</i> Probe 1333–L00876	7q11.23	Williams sendromu
319	<i>TGFBR1</i> Probe 4652–L04036	9q22.33	9q22.3 delesyon sendromu
325	<i>CYP11A1</i> Probe 6811–L06406	15q24.1	15q24 delesyon sendromu
335	<i>NF1</i> Probe 2508–L02620	17q11.2	NF1 mikrodelesyon sendromu
342	<i>MAPT</i> Probe 7857–L08501	17q21.31	17q21 mikrodelesyon sendromu
349	<i>Hs.538604</i> Probe 1232–L07388	10p15.1	DiGeorge 2 (10p)
359	<i>DLG1</i> Probe 8395–L08249	3q29	“3q29 delesyon sendromu”
364	<i>ELN</i> Probe 1336–L00878	7q11.23	Williams sendromu
373	<i>SNAP29</i> Probe 1235–L00773	22q11.21	DiGeorge sendromu
382	<i>SHANK3</i> Probe 10182–L11174	22q13.33	22q13/Phelan-Mcdermid
391	<i>LIMK1</i> Probe 1337–L02333	7q11.23	Williams sendromu
401	<i>TRPS1</i> Probe 3081–L07411	8q24.12	Langer-Giedion sendromu
409	<i>TGFBR1</i> Probe 4653–L10006	9q22.33	9q22.3 delesyon sendromu
418	<i>DLG1</i> Probe 8401–L08255	3q29	3q29 delesyon sendromu
427	<i>EIF3S3</i> Probe 1108–L00679	8q24.11	Langer-Giedion sendromu
436	<i>TERT</i> Probe 3761–L02477	5p15.33	Cri du Chat sendromu
445	<i>WHSC1</i> Probe 6058–L05513	4p16.3	Wolf-Hirschhorn bölgesi
454	<i>NSD1</i> Probe 2600–L02071	5q35.3	Sotos sendromu

Uzunluk (nt)	SALSA MLPA prob numarası	Kromozom pozisyonu	İlişkili Sendrom
465	<i>RAI1</i> Probe 9440-L11412	17p11.2	Smith-Magenis sendromu
472	<i>CRHR1</i> Probe 7859-L07620	17q21.31	17q21 mikrolelesyon sendromu
486	<i>REL</i> Probe 9860-L10628	2p16.1	2p16.1 delesyon syndrome

MLPA tekniğinin MAPH tekniğinden farkı, MLPA çalışmasında problemlerin iki parçalı oluşu, uçlarında uzunluklarını belirleyici ligand bulunması, hibridizasyonun deney tüpünde gerçekleşmesi ve hibridizasyon sonrasında ligasyon işlemi ile probun eksik bazının tamamlanmasıdır. MAPH tekniğinde DNA örneğinin Southern blotta olduğu gibi birçok kez yıkama işleminden geçmesi örnek DNA'nın kaybına neden olabilmekte bu da rutin uygulamada zorluk oluşturmaktadır (Schouten ve ark. 2002). MLPA çalışmasında hibridizasyon sonrası ligasyon işleminin olması tekniğin yanlış bağlanmalara karşı üstünlüğü olarak spesifitesini yükseltmektedir.

2.5.3.4. Mikrodizin İncelemeleri

Mikrodizin analizi, FISH ve CGH tekniklerinde de kullanılmakta olan işaretleme ve hibridizasyon işlemleri ile birlikte bilgisayar teknolojisinin yoğun olarak kullanıldığı, çoğul tarama (multipleks dizin) olanağı sunan yeni bir analiz yöntemidir. Mikrodizin materyalleri (çip, lam, boncuk) her biri pikomol düzeyinde onbinlerce tarama noktası içerebilmektedirler. Bu noktalara yerleştirilmiş özgün DNA dizileri ile hibridize olan işaretli test örneklerinin (DNA, cDNA) sinyal yoğunluğu karşılaştırmalı veya doğrudan olarak ölçülmektedir. Bu veriler karmaşık istatistiksel hesaplamalar yapan özgün bilgisayar programlarında değerlendirilerek taranan noktalara özgün bağıl doz miktarları elde edilmektedir. Bu sonuçlar veritabanlarında karşılaştırılarak biyoinformatik analizleri yapılmaktadır. Mikrodizin çipleri ile kopya sayısı değişiklikleri, ekspresyon analizleri, SNP analizleri, bağlantı analizleri, CGH analizleri, haritalama, özgün protein veya füzyon genlerinin araştırılması gibi birçok amaçla kullanılabilmektedir (Lee 2007; Shaikh 2007; Strachan ve Read, 2010).

2.6. POSTNATAL SÜREÇTE KROMOZOM ANOMALİLERİNE TANISAL YAKLAŞIM

Kromozom anomalileri çoğunlukla prezigotik evrede oluşmakla birlikte, postzigotik aşamada da ortaya çıkabilmekte ve bu durum da mozaisizme yol açmaktadır. Kromozom anomalisi taşıyan bir bireyin yaşam süresi, klinik etkisi ve buna bağlı olarak genetik polikliniklerine başvuru nedeni, kromozom anomalisinin fenotipe yaptığı etkinin ağırlığına göre değişebilmektedir. Dengeli kromozom anomalileri fenotipik etki göstermemekle birlikte gebelik kayıpları, infertilite ya da rastlantısal olarak ailevi bir kromozom anomalisi saptanması ile ortaya çıkmaktadır. Dengesiz kromozom anomalileri fenotipik bulgulara yol açtığından sırası ile, yenidoğan dönemi, ergenlik dönemi ve fertilite döneminde endikasyon oluşturarak ortaya çıkmaktadır.

Tekrarlayan fetal kayıpları olan çiftlerde yapılan kromozom analiz çalışmalarında dengeli yapısal kromozom anomalisi taşıyıcılığı %2-3 oranında saptanmaktadır (Tablo 2-7). Dengeli kromozom anomalisi taşıyıcılarının cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde dişilerde, erkeklere oranla ~3:2 oranında daha sık saptandığı ve anne yaşı arttıkça taşıyıcılık saptanma oranının düştüğü bildirilmektedir (Hsu ve ark. 1996; Franssen ve ark. 2002; Elghezal ve ark. 2007). Franssen ve ark.' ın (2002), 2 ve daha fazla düşüğü olan 669 çift üzerine yaptığı kromozom analiz çalışmasında anne yaşı <23 olan çiftlerde taşıyıcılık saptanma oranı % 4,4 (birey bazında %2,2) iken, 35-36 yaş aralığında %2,4 (birey bazında %1,2) ve >39 yaşında %0,9 (birey bazında %0,45) olarak saptanmıştır. Araştırmacı, yaşa göre değişen bu oranların nedenini anne yaşı ileri olan gebelik kayıplarında anöploidi frekansının, genç annelerin gebelik kayıplarındakine göre daha yüksek olmasına bağlamaktadır. Öte yandan, spontan gebelik kaybı materyallerinde yapılan kromozom analizlerinde anne yaşının artışı ile sayısal kromozom anomalisi saptanma oranı artmaktadır (Elghezal ve ark., 2007).

Tablo 2-7: Tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde yapılan kromozom analiz çalışmalarının karşılaştırılması

Literatür	Olgu Sayısı n	Kromozom Anomalisi n	(%)
Makino ve ark. (1990)	1278	29	(%2,27)
Fryns ve Van Buggenhout (1998)	3486	93	(%2,67)

Literatür	Olgu Sayısı n	Kromozom Anomalisi n (%)
Goddijn ve ark. (2004)	38 099	942 (%2,47)
Azim ve ark. (2003)	600	16 (%2,67)
Franssen ve ark. (2005)	23178	382 (%1,65)
Elghezal ve ark. (2007)	2800	56 (%2,04)
Meza-Espinoza ve ark.(2008)	1084	23 (%2,12)
Basaran ve ark. (2011)	5043	113 (%2,2)

İnfertil olgu gruplarında yapılan kromozom analizlerinde, cinsiyet kromozomlarının sayısal anomalileri ve fertilizasyonu etkileyen yapısal kromozom anomalileri sıklıkları, çalışma gruplarına göre farklılık göstermektedir. Cinsiyet kromozomlarının sayısal anomalilerinden Turner sendromu, Klinefelter sendromu ve bunların varyantları infertil olgularda en sık rastlanan anomalilerdir. İnfertil olgu grupları ağırlıklı olarak yardımcı üreme teknikleri alan olgularda ve spermatogenik kusuru olan erkeklerde çalışılmaktadır. Başaran ve ark. (2004), başarısız ICSI (In Vitro Sperm Injection) sonrası çiftlerde yapılan kromozom analizlerinde 270 bireyin 8' inde %2,96 oranında yapısal kromozom anomalisi saptamıştır. Aynı çalışmada ağır erkek infertilitesi nedeni ile incelenen 121 olgunun 28'inde cinsiyet kromozom anöplodisi, 4'ünde yapısal kromozom anomalisi olmak üzere, toplam 32 olguda (%26,45) kromozom anomalisi bulunduğu saptanmıştır. Farklı literatürler karşılaştırıldığında kromozom anomali insidansları, yardımcı üreme tekniklerine başvuran çiftlerde %2,96-6,37 arasında ve erkek infertilitesi ile başvuran olgularda ise %6,8-26 olduğu (Tablo 2-8) görülmektedir. Yapısal kromozom anomalisi taşıyıcılarında kırık noktalarının ortaya çıkardığı düzensizlikler ve/veya gametogenezde yol açtıkları defektler nedeni ile de infertilite ortaya çıkabilmektedir. 13 ve 14. kromozomların Robertsonian translokasyon taşıyıcıları, CCR ve bazı diğer translokasyon/inversiyon taşıyıcıları bu gruba örnek olarak verilebilir. Robertsonian translokasyon taşıyıcısı erkeklerde yapılan histolojik çalışmalarda spermatogenezin komple veya parsiyal olarak kesintiye uğradığı saptanmıştır (Sasagawa ve ark. 1989; Kim ve ark. 2011), Benzer şekilde Salahshourifar ve ark' nın (2009) yayınlandığı 135 CCR taşıyıcısı erkek olgu sonucunun değerlendirildiği bir çalışmada olguların %46' sında spermatogenez kaybı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2-8 Yardımcı üreme tekniklerine başvuran çiftlerde ve erkek infertilitesinde kromozom anomali oranları

Literatür	Çiftlerde yapılan çalışmalar		Erkek infertilite çalışmaları	
	Anomali n/Toplam n	(%)	Anomali n/Toplam n	(%)
Morel ve ark.(2004)*	613/12557	(%4,9)	569/3555	%16
Liang ve ark.(2009)	658/10325	(%6,37)	-	-
Gekas ve ark.(2001)	-	-	21/1766	(%6,85)
Başaran ve ark.(2004)	8/270	(%2,96)	32/121	(%26,5)

*Birçok çalışmanın derlenmesi ile elde edilen sonuçlar

Dengesiz kromozom anomalilerinin saptanma yaşı, fenotipik etkisinin ağırlığına göre prenatal dönemden fertil dönem olan erişkinliğe kadar değişebilmektedir. Yanidoğan döneminde olgulara gelişme geriliği, konjenital anomali, dismorfizm, nöromotor anormallikler v.b. farklı klinik bulgularla sitogenetik analizler uygulanmaktadır. İleri yaşlarda bu klinik bulgulara mental retardasyon ve ergenlik problemleri de eklenmektedir. Yenidoğan döneminde yapılan kromozom analiz çalışmalarında, ölü doğum ve çocukluk çağı ölümlerinde %5-7, yapısal konjenital malformasyonlu olgularda %4-8, konjenital kalp hastalıklarında ~%13 multiple konjenital anomali (MKA) doğum defekti (3 ve daha fazla) ve zeka geriliği (MR) olgularında ~%5.5, zeka geriliğinde IQ<20 ~%3-10, IQ 20-49~%12-15, IQ~50-69 ve diğer nöro-gelişimsel yetersizliklerde ~%1-3 oranında kromozom anomalisi saptandığı bildirilmektedir. Zeka geriliği olgularında yapılan çalışmalarda saptanan kromozom anomalilerinin çeşitleri irdelendiğinde; %76 ile Down sendromunun en sık saptanan anomali olduğu bunu sıklık sırası ile %8 mikrodelesyonlar, %4 cinsiyet kromozom anöpoidileri, %3 dengeli, %3 dengesiz kromozom anomalileri, %2 duplikasyonlar, %2 ring ve marker kromozomlar, %1 diğer otozomal anöploidiler ve %1 de diğer anomalilerden oluştuğu gösterilmektedir (Gardner ve Sutherland 2004). Ardışık olarak MKA/MR endikasyonu ile çocuk kliniği ve genel kliniklerden refere edilen 600 olguda yapılan sitogenetik analizin derlendiği diğer bir çalışmada (Rauch ve ark., 2006), olguların %18,2' sinde kromozom anomalisi saptandığı ve bunların %11,3' ünde sayısal kromozom anomalisi (trizomi 21 %9,2), %3,2' sinde parsiyel anozomi (delesyon, duplikasyon, insersiyon vb. dengesiz yapısal anomalileri), %0,05' inde dengeli yapısal anomali ve %1,3' ünde mikrodelesyon sendromu (FISH ile)

olduğu şeklinde gösterilmiştir. Aynı çalışmada sitogenetik laboratuvarına başvuran hastalara ilave olarak klinik genetik konsültasyon sonrası 570 olgunun % 25,8' inin tanı aldığı bildirilmektedir. Klinik genetik inceleme sonrası tanı alan bu olgular incelendiğinde; %12,2' sinin kromozom anomalisi, %7,4' ünün monogenik hastalıklar, %1,6' sının diğer sendromlar ve geri kalanının çevresel etmenlerle olduğu görülmektedir. Kromozom anomalisi saptanan grup irdelendiğinde %4,7' lik payın klinik yönlendirme sonucu FISH çalışmaları sonucu bulunan mikrodelesyon sendromları, % 3,9' unun moleküler karyotipleme (dizin) ile saptanan anomaliler ve %1,8' inin ise FISH taramaları ile saptanan subtelomerik değişimlerden olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmada klinik genetiğin postnatal olguların tetkik seçimine sağladığı katkılar görülmektedir. MKA/MR olgularında klinik muayene bazı kromozom anomali sendromlarına özgü bulguların saptanmasına ve yapılacak test seçiminde yönlendirmeye yardımcı olmaktadır. Birçok mikrodelesyon sendromunun özgün fenotipik bulguları bilinmektedir. Klinik inceleme sonrası saptanan bulgular olguda özgün bir mikrodelesyon/duplikasyon sendromunu işaret ettiğinde, özgün FISH problemleri ile sub mikroskopik değişimler araştırılabilmektedir. Örneğin; Williams Sendromu klinik ön tanısı alan olguda klasik sitogenetik test normal sonuçlandığında ön tanının yönlendirmesi nedeni ile sendroma özgün lokus spesifik FISH probu ile mikrodelesyon araştırması yapılabilmektedir.

Xu ve Chen (2003) zeka geriliği olgularında farklı tekniklerle yapılan birçok çalışmanın sonuçlarını derledikleri bir araştırmalarında, kromozom anomalisi prevalansının %4-34,1 arasında değiştiğini, benzer şekilde farklı tekniklerle yapılan subtelomerik bölge taramalarında da anomali prevalansının %0-29,4 arasında (Tablo 2-9) değiştiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar zeka geriliği olgularında kromozom anomalileri ve subtelomerik düzenlenmelerin gerçek prevalansının belirlenmesinin zor olduğuna değinmekte ve bu duruma, olgu seçim kriterleri, çalışmaya alınan olguların sitogenetik analiz çözünürlükleri, sınırlı sayıda olguda çalışılması ve seçilen test çeşidinin hassasiyet farklılıklarının yol açtığını belirtmektedir (Tablo2-4).

Tablo 2-9: Zihinsel özürlü olgu gruplarında kromozom anomalisi frekansları*

Referans	Olgu n	Klinik Bulgu	Ülke	Anomalisi n (%)
Bourgeois and Benezech [1977]	600	Zeka geriliği (Psikiyatri hastanesi)	Fransa	54 (9)
Kodama [1982]	197	Ağır Zeka geriliği	Japonya	8 (4)
Opitz et al. [1982]	168	Ağır Zeka geriliği	ABD	42 (25)
Rasmussen et al. [1982]	1.905	Zeka geriliği	Danimarka	359 (18.8)
Wuu et al. [1984]	470	Zeka geriliği	Tayvan	38 (8.1)
Gustavson et al. [1987]	171	Orta Zeka geriliği	İsveç	20 (11.9)
Srsen et al. [1989]	324	Zeka geriliği	Çekoslovakya	92 (28.4)
Wuu et al. [1991]	1.323	Zeka geriliği IQ50-70 IQ <50	Tayvan	104 (7.87) 231 (17.5)
Curry et al. [1997]	1.314	Zeka geriliği	Hindistan	311 (23.7)
Schwartz [1988]	350	Zeka geriliği/ Gelişme geriliği	ABD	42 (11.9)
Phelan et al. [1996]	4485	Zeka geriliği	ABD	538 (12)
Hou et al. [1998]	11.892	Zihinsel özürlü	Tayvan	1889 (15.9)
Felix et al. [1998]	202	Zeka geriliği	Brezilya	69 (34.1)
Hong et al. [1999]	604	Çocuk psikiyatri olguları	Kore	69 (11.4)
Battaglia et al. [1999]	120	Zeka geriliği/Gelişme geriliği	İtalya	18 (15)
Cora et al. [2000]	604	Zeka geriliği	Türkiye	23 (19)
Toplam	24.245			3.906 (16.1) Dağılım (4-34.1)

*Xu ve Chen. *American Journal of Medical Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)* 117C:15–24 (2003) çalışmasından alınmıştır.

Yeni tekniklerin rutin uygulamalara girmesi MKA/MR olgu gruplarında kromozom anomalisi saptanma oranlarını arttırmaktadır.

Stoeva ve ark. (2008) MKA/MR olgularında yaptığı çalışmada klasik sitogenetik tekniklerle normal sonuç almış 76 olgunun 15' inde (%19,7), FISH, MLPA ve aCGH kullanarak sub telomerik yeniden düzenlenme saptamıştır. Bu olguların 3' ü (%3,9)

subtelomerik FISH çalışması, 5' i MLPA çalışması (47 olguda uygulanmış) (%9,4) ve 7' si (%32) ise aCGH çalışması (23 olguda uygulanmış) ile tanı almıştır. Ağır ve orta zeka geriliği, dismorfizm ve multiple konjenital anomalisi olan, sitogenetik analizleri normal sonuçlanmış 95 olguda yapılan başka bir çalışmada olguların 34' ü subtelomerik düzenlenmeler açısından hem FISH hem de MLPA çalışması ile taranmış, kalan olgular sadece subtelomerik MLPA problemleri (P069 ve P070) ile taranmış ve 9 olguda subtelomerik yeniden düzenlenme saptanmıştır. Bu olgulardan 8' i hem FISH hem de MLPA ile saptanabilirken 1 olgu sadece MLPA çalışması ile saptanabilmiştir; 14. kromozomun uzun kolu q11 bandının duplikasyonu, subtelomerik FISH probunun lokusunun dışında kaldığı için FISH çalışmasında gösterilememiştir (Monfort ve ark. 2006).

Farklı araştırmacıların zeka geriliği, gelişme geriliği ve multiple konjenital anomali taşıyan olgu gruplarında yaptığı çalışmaların sonuçlarına bakıldığında (tablo 2.10) zeka geriliği bulgusuna multiple konjenital malformasyon bulgusu eklendiğinde anomali saptanma oranları yükselmektedir. MLPA tekniği klasik sitogenetik ya da FISH çalışmalarında saptanan kromozom anomalilerinin ayrıntılı incelenmesi amacı ile de kullanılmaktadır (Cho ve ark. 2009). Van Hagen ve ark. (2007) Williams sendromu tanısı almış 63 olguyu hem ticari FISH problemleri hem de MLPA ile taramış 53 olgu her iki teknik ile delesyon tanısı alırken, küçük ve atipik delesyon alan 1 olgu sadece MLPA tekniği ile saptanmıştır. MLPA tekniği aynı zamanda incelenen bölgelerde doza dayalı bir sonuç verdiğinden mikroduplikasyon sendromlarının tanısında da etkin olarak kullanılmaktadır (Baunder ve ark. 2010). Fernandez ve ark. (2005) FISH çalışmasında DiGeorge sendromu tanısı alan 30 olguyu STR analizi ve MLPA tekniği kullanarak delesyon boyutlarını inceledikleri bir çalışmada, MLPA' nın STR analizlerine göre daha ucuz, değişikliklerin boyutlarının araştırılmasında daha etkin ve DiGeorge sendromunda %2 oranında saptanan atipik delesyonların saptanmasında daha etkin olduğunu bildirmişlerdir.

Tablo2-10: MKA, MR ve Dismorfizm bulgulu olgu gruplarında, MLPA ve MAPH çalışma sonuçları

Referans	Olgu sayısı	Klinik Özellikler	Tarama bölgesi	Saptanan polimorfizm n(%)	Saptanan Anomali n(%)
MLPA					
Koolen ve ark. (2004)	210	MR, Dismorfizm	Sub tel (P036)	5(2,4)	9(4,3)
Kirchhoff ve ark. (2007)	258	MR, Dismorfizm	Sub tel ve sendromik (P064-P023)	?	15(5,8)
Stegmann (2008)	466	MR, Dismorfizm	Sub tel (P036-P070)	17(3,6)	25(5,4)
Stoeva ve ark. (2008)	47	MKA, MR	Sub tel	?	5(10,6)
Monfort ve ark. (2006)	95	MKA, MR, Dismorfizm	Sub tel (P036-P019-P020)	18(20)	9(10)
MAPH					
Şişmani ve ark. (2001)	70	MR	Sub tel	?	1(1,42)
Kriek ve ark. (2004)	188	MKA, MR, Dismorfizm	Sub tel	?	11(5,85)

Moleküler tekniklerle ve özellikle de genom boyu taramaların kullanıldığı dizin çalışmaları ile yapılan analizlerde, farklı anomali oranları saptanmakla birlikte, saptanmış olan değişimlerin bir bölümünün polimorfik değişimler olduğu ve bu polimorfik değişimlerin oranlarının uygulanan tekniğin çözünürlüğü ile doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir (Tablo 2-10 ve 2-11). Analizlerde saptanan değişimlerin fenotip ilişkisini netleştirmek için anne ve baba çalışmaları, ek testler ile doğrulama ve veritabanı araştırmaları yapılmaktadır. Genom boyu analizlerin sayısının artması ile ilgili veritabanlarındaki polimorfik değişimlerin (SNP, CNV vb.) ve hastalık ilişkilerinin bulunduğu verilerin zenginleşmesi, saptanan değişimlerin genotip fenotip ilişkisinin belirlenmesinde yardımcı olacaktır.

Tablo2-11:Zihinsel özürlü olgularda farklı moleküler çalışmalar ile saptanan kromozom anomalisi ve polimorfizm oranları

Referans	Olgu Sayısı	Klinik Özellikler	Hedef	Rezölüsyon	Saptanan Polimorfizm n (%)	Saptanan Anomali n (%)
STR						
Slavotinek ve ark. (1999)	27	MR	Sub tel	STR analizi	1(3,7)	2(7,4)
Colleaux ve ark.,(2001)	29	MR	Sub tel	STR analizi	1(3,4)	2(6,9)
Rooms ve ark. (2004)	70	MR	Sub tel	STR analizi	3 (4,2)	0 (0)
Rio ve ark. (2002)	150	MR	Sub tel	STR analizi	3(2)	16(10,6)
MİKRODİZİN						
Menten ve ark (2006)	140	MR	BAC	3431 BAC/PACclone	9(6,4)	19(13,6)
Shao ve ark.(2008)	5316	MR	Sub tel, pericent, >70 sendrom BAC	853 BAC clone/sub tel 10MB	88(1,7)	190(3,6)
Thureson ve ark. (2007)	48	MR	BAC	1MB	2(4)	3(6)
Aradhya ve ark. (2007)	20	Dismorfizm	BAC Oligo	2600 44290	3(15)	7(35)
Ballif ve ark. (2007)	6946	MKA, MR	Sub tel BAC	1120	126(1,8)	169(2,4)
Friedman ve ark.(2006)	100	MR	SNP	100K	1(1)	11(11)
Gijsberg ve ark (2009)	318	MR, MKA	SNP	317K	10(3,14)	52 (16,4)
Hayashi ve ark. (2010)	349	MR, MKA	BAC	244K	9(2,6)	48(13,8)
Lu ve ark. (2008)	638	MR, MKA	BAC, Oligo	835 42640	62(9,7)	109(17)
Pickering ve ark. (2008)	1176	MR, MKA	BAC	2600	47(3,9)	91(7,9)

MR; Zeka geriliği, GG; gelişme geriliği, MKA; Multiple konjenital anomali

Postnatal dönemde kromozom anomalilerinin araştırılması, klasik sitogenetik, FISH ve moleküler çalışmaların özgün bulgulara göre uygulanması ile yapılmaktadır. Dengeli kromozom anomalisi için risk taşıyan, infertil çiftler, tekrarlayan fetal kaybı olanlar ve yapısal kromozom anomalili çocukları olan çiftler ile fenotipik olarak etkilenmiş olgular içinde, öncelikle sayısal kromozom anomali sendromlarının yönlendirdiği olgularda klasik sitogenetik çalışmalar halen önemli bir tanı aracı olarak ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında bilinen mikrolelesyon ve mikroduplikasyon

sendromları için fenotipik bulgular taşıyan olgularda spesifik FISH problemleri ve özgün moleküler tekniklerle (MLPA vd.) hızlı ve fiyat etkin incelemeler kesin tanıya ulaşmak için etkin yöntemler olarak kullanılmaktadır. Fenotipik bulgu taşıyan ve bu tekniklerle tanı alamayan olgularda moleküler tarama yöntemlerinde MLPA, MAPH ve dizin çalışmaları belirli fiyat etkinliği, çalışılan merkezin altyapı yeterliliği içerisinde uygulanmaktadır. Moleküler incelemelerde, olgularda saptanan anomalilerin patojenik/polimorfik, ailevi/*de novo* olup olmadığının anlaşılması için değişen oranlarda teknik ve çalışmaların kullanılma zorunluluğu bulunmaktadır (Vermeesch 2007; Thuresson 2007; Pickering 2008).

2.7. PRENATAL DÖNEMDE KROMOZOM ANOMALİLERİNE TANISAL YAKLAŞIM

Fetal kromozom anomalilerinin görülme sıklıkları çalışılan hasta popülasyonuna göre değişmektedir. En yüksek kromozom anomali oranı gebeliğin ilk 12 haftasında oluşan spontan abortus materyallerinde saptanmaktadır. Fetal anomali oranı gebelik haftası ilerledikçe azalmaktadır. Ölü doğumlarda anomali oranı %5-10 canlı doğumlarda ise 1:156'dır.

Gebeliklerde "kromozom anomalisi açısından artmış risk" olup olmadığının belirlenmesi prenatal tanı amaçlı invaziv girişim kararı için son derece önemlidir. Her gebelikte kromozom anomali riski vardır ve bu risk bazı durumlarda daha da artar. Bu nedenle "riskli" gebelik "artmış riskli" gebelik anlamında kullanılmaktadır. Bu risk, invaziv girişime bağlı 1:200'lük gebelik kaybı riskinden daha büyük olması durumunda tıbbi açıdan tanı amacıyla invaziv girişim önerilir. Prenatal dönemde fetal doku eldesi için gerekli invaziv girişimin gebelik kaybına yol açma olasılığı AS için 1:200 ve KVÖ için %1-2'dir. Bu nedenle tüm gebeliklerde invaziv girişim her gebelikte az ya da çok risk olmasına karşın rutin olarak uygulanmamaktadır. Genetik danışma sürecinde gebeye artmış riskleri, kromozom anomalileri, invaziv girişimler ve riskleri konusunda bilgi verilmekte, tıbbi açıdan endikasyon varsa girişim önerilmekte ve gebenin karar vermesi sağlanmaktadır. Çiftin alacağı karar fetal kromozom analizi yaptırma yönünde olursa, seçilen invaziv yöntem ile perinatalog fetal doku için invaziv girişimi uygulamakta ve elde edilen doku sitogenetik ve/veya diğer analizler için laboratuvarında incelenmektedir.

Fetal doku eldesinin zorluğu ve gebelik kaybı riski nedeni ile elde edilen örnek çok değerli olup, endikasyona uygun olarak tanıya yönelik uygun testlerin yapılması önemlidir. Gebelikte fetal kromozom anomali riskini arttıran başlıca endikasyonlar şunlardır;

- İleri anne yaşı (> 35 yaş)
- Biyokimyasal tarama testlerinde kromozom anomalisi için artmış risk saptanması
- Kromozom anomali taşıyıcısı ebeveyn
- Kromozom anomalili çocuk sahibi olmak
- Fetal ultrasonografide patolojik bulgular (Ensede cilt kalınlığı artışı, gelişme geriliği, kalp anomalisi, merkezi sinir sistemi (MSS) anomalisi, renal anomali vb.)
- In vitro fertilizasyon gebelikleri (ICSI)
- Kötü obstetrik öyküsü olan gebeler.

2.7.1. İnvaziv Girişim Yöntemleri

Genetik hastalıkların prenatal tanısında fetal doku eldesi amacıyla dünyada 3 temel yöntem (korion villus örnekleme, amniosentez ve kordosentez) uygulanmaktadır. Bu tekniklerden KVÖ ile elde edilen koryon dokusu, amniyotik sıvı hücreleri ve fetal kan hücrelerine göre embriyonik dönemde fetusdan daha erken dönemde ayrıldığı için fetusa en uzak dokudur. KVÖ çalışmalarında saptanan mozaisimin fetal dokulardaki varlığının araştırılması için amniyosentez ve kordosentez işlemleri ile fetal hücreler elde edilmesi gerekmektedir. Benzer şekilde KVÖ ya da amniyotik sıvı çalışmalarında saptanan mozaisizmlerin ya da yapısal anomalilerin araştırılmasında yeni hücre kaynağı olarak fetal kan hücreleri kullanılabilir. Bu nedenle üç yöntemin özellikleri birbirlerini tamamlayabilir olduğundan, her üçünün de bir merkezde uygulanabilir olması prenatal tanı uygulamalarını kolaylaştırmasının yanısıra tanının hızlanmasını ve güvenilirliğin artmasını sağlamaktadır. Bu yöntemlerin karşılaştırılmaları aşağıdaki tabloda sunulmaktadır (Tablo 2-12).

Tablo 2-12 : Fetal girişim yöntemlerinin karşılaştırılması

	Korionik Villus	Amniotik Sıvı	Fetal Kan
Girişime bağlı düşük riski	% 0.5 - 2	% 0.5	% 1-2
Girişim haftası	> 10 GH	> 14+ GH	> 19 GH
Tanı Süresi	1 gün – 2 hafta	9 gün – 2 hafta	3 – 5 gün
Kültürde üreme kaybı	Var	Var	Var
Kromozom Kalitesi	Orta – Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Sitogenetik zorluk derecesi ve deneyim gerekliliği	En zor	Zor	Kolay
Maternal Hücre Kontaminasyonu	Direkt çalışmada yok / Hücre kültüründe var	Çok az	Var
Yalancı negatif	Var	Yok	Yok
Yalancı pozitif	Var	Kültür efekti	Yok
Maliyet	Yüksek	Orta	Düşük
Yedek materyal	Mümkün	Mümkün	Yok

Amniyosentez çalışmalarında Down sendromu ve tüm kromozom anomalileri oranları sırası ile %5,83 ve %6,97 iken, bu oranlar KVÖ çalışmalarında %10,2 ve %13,4 olarak gösterilmektedir (Bray ve ark. 1998 Kaynak: Milunsky ve Milunsky 2010 p197; tablo 6.2). Bu farklılık KVÖ çalışmalarının erken gebelik haftasında uygulandığında, spontan olarak 2. trimestere ulaşamayacak letal kromozom anomalilerini de saptamasının yanı sıra, KVÖ serilerinde daha yüksek oranda saptanan mozaikizim nedeni ile ortaya çıkmaktadır. “Plasenta ile sınırlı mozaikizim” olarak tanımlanan bu olgular korionik villus dokusunda %1-2 oranında saptanır ve gerçek tanı ancak fetal dokuların (amniotik sıvı ve fetal kan hücreleri) incelenmesi ile olabilir. Hahnemann ve Vejerslev (1997) 62.865 KVÖ olgusundan 2.321’inde (%3,7) gerçek pozitif ve non-mozaik kromozom anomalisi, 952’sinde (%1,51) ise belirsiz (mozaik, şüpheli) kromozom anomalisi saptandığını bildirmişlerdir. Bu belirsiz grupta yapılan ileri çalışmalarda, 77 olguda (% 0,12) hem fetus hem de plasentada gerçek mozaikizim, 656 olguda (%1,04) ise plasenta ile sınırlı mozaikizim olduğu gösterilmiştir. Soler ve ark.’nın (2008) 3.868 korionik villus örneğinden 333’ünde (%8,6) kromozom anomalisi saptanmış, bu anomalilerden 67’inin (%1,7) plasenta ile sınırlı mozaikizim olduğu gösterilmiştir. Diğer 266 (%6,88) olgunun

199’unda (%5,15) sayısal kromozom anomalisi (%4,21 otozomal anöploidi, %0,78 cinsiyet kromozom anöploidisi) ve 67 olguda (%1,7) yapısal kromozom anomalisi (%1,45 dengeli, %0,28 dengesiz) saptamışlardır. Bir başka randomize çalışmada 35 yaş ve üzeri 318 KVÖ ve 363 amniyotik sıvı örneği incelenmiş ve sırası ile 11(%3,46) ve 10 (%2,75) oranında kromozom anomalisi saptanmıştır (Borrell ve ark. 1999). KVÖ’ nin 1.trimesterde uygulanması ve direkt preparasyon tekniği ile ilk 24 saatte kromozom elde edilebilmesi sayesinde erken tanı önemli bir avantaj sağlarken olguların ~% 1,5’ inde görülen mozaizm nedeniyle gereken doğrulama testleri tanıyı geciktirdiği gibi maliyeti de arttırmaktadır (Milunsky ve Milunsky 2010).

İleri gebelik haftalarında (>18) özellikle patolojik USG bulgusu nedeniyle hızlı tanı gerektiğinde, bazı fetal hematolojik hastalıkların ve fetal enfeksiyonların tanısında, fetal kan transfüzyonunda, amniosentez ya da KVÖ dokusunda saptanan mozaizmin doğrulanması gibi durumlarda fetal kan örnekleme (FKÖ ya da KS) iyi bir alternatif tekniktir. Zhang ve ark. (2010a), 233 fetal kan örneğinde girişim endikasyonunun %78,6’ sında patolojik ultrason bulgusu, %50’ sinde ileri anne yaşı, %10,7’ sinde kromozom anomali taşıyıcılığı ve %7,1’ inde ise tarama testinde yüksek risk saptanması olduğunu bildirmiştir.

2.7.2. Fetal Kromozom Analizleri

Fetal kromozom anomalileri açısından artmış risk taşıyan gebeliklerde yapılan sitogenetik analizlerde endikasyona, girişim haftasına, kullanılan tekniğe ve incelenen dokuya bağlı olarak değişen anomali oranları saptanmaktadır. Kromozom anomalilerinin endikasyonlara göre dağılımına bakıldığında (Tablo 2-13, Tablo 2-14) yapısal kromozom anomalisi taşıyıcılığı dışlandığında en yüksek fetal kromozom anomali riski patolojik ultrason bulgusu endikasyonunda saptanmakta ve kromozom anomalileri incelendiğinde en sık anöploidiler öne çıkmaktadır. Fetal kromozom analizleri sırasında en sıklıkla saptanan kromozom anomalisi yenidoğanlarda olduğu gibi trizomi 21’ dir. Bunu otozomal anöploidilerden trizomi 18 ve 13, cinsiyet kromozom anöploidisi olan 45,X izlemektedir.

Tablo 2-13: Prenatal kromozom analiz sonuçlarının girişim ve endikasyona göre dağılımı

Endikasyon	KVÖ		AS	
	Anomali / n	(%)	Anomali / n	(%)
Tek gen	7/627	(%1,12)	4/311	(%1,29)
Pat USG	64/292	(%21,92)	280/2.558	(%10,95)
İAY	3/161	(%1,86)	151/5.790	(%2,60)
KAE	47/91	(%51,65)	75/144	(%52,08)
1.TTT	12/76	(%15,79)	11/142	(%7,75)
KAC	3/50	(%6)	13/544	(%2,38)
KOO	1/1	(%100)	1/50	(%2)
Toplam	137/1.298	(%11,55)	535/9.539	(%5,6)

(Başaran ve ark., 2008)

Tek gen: Moleküler genetik tanı amacı ile girişim yapılan olgular, Pat USG; Patolojik ultrasonografik bulgu, İAY; İleri anne yaşı (>35), KAE; Kromozom anomalisi taşıyıcısı ebeveyn, 1.TTT; 1. Trimester tarama testinde kromozom anomalisi için artmış risk, KAC; Kromozom anomalili çocuk öyküsü, KOÖ; Kötü obstetrik öykü

Tablo 2-14 Prenatal kromozom analiz sonuçlarının endikasyona göre dağılımı

	Milunsky (2010)**	Yang ve ark. (1999)	Tseng ve ark. (2006)	Han ve ark. (2006)	Basaran ve ark.* (2008)
İleri anne yaşı	1197/52965 (%2,26)	224/4651 (%2,66)	93/4026 (%2,31)	196/5817 (%3,4)	124/4909 (%2,5)
Tarama testi pozitifliği	-	83/3720 (%2,23)	39/1500 (%2,6)	615/21972 (%2,8)	51/2172 (%2,34)
Patolojik ultrasonografi	-	12/322 (%2,74)	49/553 (%8,86)	106/1802 (%5,9)	162/1737 (9,3)
Kromozom anomalili çocuk öyküsü	-	?	?	7/190 (%3,7)	11/492 (%2,2)
Kötü obstetrik öykü	-	?	?	23/790 (%2,9)	6/744 (%0,8)

*Tek endikasyonlar ileri anne yaşından arındırılmıştır

**Ferguson-Smith ve Yates 1984, Kaynak:Milunsky 2010 p198; tablo6.4

Sık rastlanmaları nedeniyle gebelikte trizomi 21 ve 18/13' e yönelik geliştirilen tarama testleri sayesinde bu anomalilerin daha yüksek oranda saptanması beklenmektedir. Klasik sitogenetik yöntemlerle (korion villus direkt preparasyonu hariç) tanı 12-15 güne uzadığından özellikle bu anomalilerin hızlı tanısına yönelik hızlı tanı testleri geliştirilmiştir.

Fetal kromozom anomalilerinin hızlı tanısında moleküler sitogenetik ve moleküler yöntemler (sentromerik ve lokus spesifik FISH problemleri ve kantitatif PCR ile STR analizleri) yaygın olarak kullanılmaktadır. FISH çalışmalarında kültür edilmemiş fetal hücrelerin interfaz nükleuslarına sık görülen kromozomların (21, 18, 13, X ve Y kromozomları) anöploidilerini araştırmak için sentromerik ve lokus spesifik problemleri uygulanmakta, QF PCR çalışmalarında da ilgili kromozomların her biri için birkaç STR marker, kantitatif PCR yöntemi ile çoğaltılarak hızlı anöploidi tanısı için kullanılmaktadır (Cacheux ve ark. 1994; Baig ve ark. 2010). Ward ve ark (1993) sitogenetik laboratuvarına refere edilen 4.500 amniyotik sıvı örneğinde 5 prob ile (13, 21, 18, X ve Y) yaptıkları çalışmada olguların 171' inin (~%4) maternal hücre kontaminasyonu, materyal azlığı nedeni ile dışlandığı, kalan 4.329 olgunun FISH çalışmasına alındığı, bu olgulardan 3.901' inde (%90) informatif sonuç alınabildiği gösterilmiştir. Sonuç alınamayan % 10 olguda başarısızlık nedeni olarak maternal hücre kontaminasyonu, rapor kriterinin altında hücre ve/veya sinyal sayısı, teknik problemler gösterilmiştir. İformatif sonuç alınan olgularda taranan otozomal anöploidleri için hiç yanlış pozitif sonuç görülmediği ancak 7 olguda yanlış negatif sonuç gözlemlendiği, taranan otozomal trizomiler için anöploidi saptama oranı %92,5 olarak bildirilmiştir. Cinsiyet kromozomları açısından 1 olguda yanlış pozitif sonuç görülmüş (46,XY kromozom yapılı fetus interfaz FISH çalışmasında 45,X olarak belirlenmiş) öte yandan cinsiyet kromozomlarında yanlış negatif sonuç saptanmamıştır. Bu kromozomlar için anöploidi saptama oranı %100 olarak bildirilmektedir.

Eiben ve ark. (1998) 798 olguluk prenatal interfaz FISH çalışmasında sitogenetik olarak anomali saptanan 71 olgudan 48' inin (%68) >%60 sinyal oranı ile saptandığını, 15' inin (%21) ise %10-%60 sinyal aralığı ile ek test gerektirecek doğrulukta gösterilebildiğini 8 olgunun (%11) ise <%10 sinyal oranı ile saptanamadığını göstermişlerdir. Bu 8 olgunun 2' sinin dengeli Robertsonian translokasyon [t(13q:21q) ve t(13q:14q)] ve diğer 6 olgunun da yapısal kromozom anomalisi olduğunu göstermişler, öte yandan normal kromozom yapısında 14 olgu ve anormal kromozom yapısında 15 olgu (~%4) sinyal oranı açısından %10-%60 aralığında kalmış ve bu olgularda doğrulama ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Araştırmacı, %96 başarı oranı ile uygulanabilen, tüm anomalilerin yaklaşık 3/2 sini tanımladığı, interfaz FISH tekniğinin bu amaçla tek başına kullanılmaya uygun olmadığı ancak acil olgularda kullanılmasının uygun olduğunu,

normal çıkan olgularda maternal anksiyetenin ortadan kalkmasına yardımcı olacağını, ancak ara bölgede kalan %4 olguda saptanan şüpheli sonuçların maternal anksiyeteye neden olduğunu bildirmektedir. Witters ve ark. (2002) maternal hücre kontaminasyonu olan ~%2 dışındaki 5.049 olgunun tümüne 21. kromozoma özgün interfaz FISH uygulamış ve tüm trizomi 21' li fetusları %100 saptama oranı ile yakalamıştır. Aynı çalışmada perinatoloji ünitesinin ultrason bulgularını dikkate alarak yönlendirmesi ile 13, 18, X ve Y kromozomlarına özgün interfaz FISH çalışmaları yapıldığında, bu anöploidlerinin %65' inin saptanabildiği, %35' inin ise FISH çalışmasına alınmadığı, diğer bir deyişle olguların yaklaşık 1/3 ünde USG nin yönlendirici olamadığı gösterilmiştir. Prospektif ve multisentrik 2.000 olgu içeren bir Fransız çalışmasında sık rastlanan 5 kromozom için interfaz FISH ve klasik kromozom analizleri ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve FISH tekniğinin güvenilirliği ve sınırları araştırılmıştır (Luquet ve ark., 2002). Bu çalışmada 43 ve üstü anne yaşı, maternal biyokimyasal tarama testinde kromozom anomalisi için 1/25 ve üstü yüksek risk, ense cilt kalınlığı ölçümünde 3mm ve üzeri kalınlık olan gebelikler, fetal USG de kalp anomalisi, sindirim sistemi anomalileri, omfalosel, çoklu konjenital anomali ve intra uterin gelişme geriliği endikasyonları ile fetal kromozom analizi yapılan gebeliklerdeki fetal kromozom analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Klasik analizlerle 1.969 olguda sonuç alınmış, bunlardan 242' sinde kromozom anomalisi saptanmış ve bu anomalilerin 213'ü FISH tekniği ile araştırılan kromozomlardan en az biri için anöploid olduğu belirlenmiştir. Geri kalan 29 olgunun 7' si diğer kromozomlar için trizomik, 14' ünün dengeli ve 15' inin dengesiz yapısal anomali olduğu anlaşılmıştır. Yapılan bu çalışmada uygulanan FISH tekniği ile anomalilerin %12' sinin saptanamadığı gösterilmiştir. Leung ve ark. (2004) 1.589 ardışık amniyotik sıvı örneği hücrelerinde hızlı anöploidi taraması ve karyotipleme karşılaştırması yaptığı çalışmasında; 1.548 olguda hem hızlı tarama hem de kromozom analizi başarı ile çalışmış, bu olgulardan 521' ini 5'li FISH probu (13, 21, 18, X ve Y) , 1.068' ini QF PCR (13, 21, 18, X ve Y kromozomlarına özgü) ile araştırmışlar, bu iki tarama tekniğinin kromozom analizi ile gösterilen anomalilerden %27 'sini (13/73) saptayamadığını, ancak hedef alınan 5 kromozomun non-mozaik trizomilerinin tümünün bu iki tarama tekniği ile saptanabildiğini bildirmişlerdir. Gene aynı çalışmada FISH tekniğinin olguların %4' ünde QF PCR tekniğinin de %1,4' ünde maternal hücre kontaminasyonu ve teknik nedenlerle başarısız olduğunu bildirmişlerdir. Prenatal

anöploidi taraması amacı ile 5 kromozom için anöploidi saptama etkinliği farklı çalışmalarda %100' den %60' a kadar değişen oranlarda verilse de bu oranın ortalama %80-98 aralığında olduğu, büyük prenatal serilerde saptanan kromozom anomalisi oran ve çeşitleri göz önüne alınarak, teorik olarak interfaz FISH uygulanması halinde kromozom anomalilerinin ~%65' inin gösterilemeyeceği bildirilmektedir (Evans ve ark. 1999; Lewin ve ark. 2000). Cirigliano ve ark. (2004) 18.000 prenatal tanı örneği ile çalıştığı büyük seride olguların 17.986' sına (%99,9) sık rastlanan 5 anöploidi için QF PCR tekniği uygulamış, 14 olguda amplifikasyon başarısızlığı ve 111 olguda da maternal hücre kontaminasyonu nedeni ile sonuç alamamıştır. Öte yandan sitogenetik olarak kültür kaybı ya da maternal hücre kontaminasyonu nedeni ile sonuç alınamayan 26 olgunun 12' sinde QF PCR ile 5 kromozom için normal sonuç alınmış ve olgular tekrar girişimden kaçınmışlardır. QF PCR çalışması bu seride % 93,2 hassasiyetle tamamlanmış ve sitogenetik çalışmada saptanan 800 kromozom anomalisinin 746' sı gösterilmiştir.

Prenatal dönemde sayısal kromozom anomalilerinin araştırılmasında MLPA tekniği de kullanılmaya başlanmıştır. Gerdes ve ark. (2008) 2.400 KVÖ ve 1.525 amniyotik sıvı örneğinde sık rastlanan 5 kromozom anöploidisine yönelik prob seti (SALSA P095) MLPA çalışmasında 139 olgu, maternal hücre kontaminasyonu ve teknik nedenlerle dışlanmış diğer 3.786 olguda MLPA çalışması uygulanmış ve elde ettikleri kesin sonuç oranlarını KVÖ için 2.330 (%97,1), AS için 1.417(%92,9) olarak vermişler, 39 olguda (%2,1) ise mozaizm, triploidi, maternal hücre kontaminasyonu ve yapısal anomaliler nedeni ile kesin sonuç elde edilemediğini bildirmişlerdir. Van Opstal ve ark. (2009) anöploidi tarama prob seti (SALSA P095) kullanarak sitogenetik analiz ile paralel uyguladıkları MLPA çalışmasında 4.000 amniyotik sıvı örneği incelenmiş olguların 3.932' sinde (98,3%) çalışma başarılı olmuş, 68' inde (1,7%) başarılı sonuç elde edilememiş, bu olguların 58' inde maternal hücre kontaminasyonu, 8' inde yetersiz DNA eldesi ve 2' sinde ise teknik nedenler ile başarısız olduğunu bildirmişlerdir. MLPA tekniği ile saptanan 149 anomalinin 146' sı hedef alınan 5 kromozomun anöploidisi (7' si <%14 mozaik), 3' ü ise taranan bölgelere rastlayan yapısal kromozom anomalileri olarak bildirilmiştir. Klasik sitogenetik ile saptanan ancak MLPA ile gösterilemeyen 76 anomaliden 56' sının yapısal kromozom anomalisi, 4' ünün triploidi, 8' inin mozaik marker kromozom ve 2' sinin düşük oranlı cinsiyet kromozom mozaizmi ve 6' sının ise

taranan 5 kromozom dışındaki kromozomların mozaik anöplidileri olduğu bildirilmiştir. Çalışmada mozaik olguların saptanabildiği bunların yanı sıra probun hedef aldığı bölgelerin de yapısal dengesiz anomalilerinin saptanması işlemin hassasiyetini göstermektedir. Bu ve benzer çalışmalarda (Kooper ve ark. 2009; Boormans ve ark. 2010) çalışılan MLPA prob setinin (SALSA P095) hassasiyeti ve spesifitesi %100 olarak bildirilmektedir.

Prenatal kromozom analizlerinde sayısal kromozom anomalilerinin yanı sıra çalışılan tekniğe bağlı olarak değişik detaydaki yapısal kromozom anomalileri de saptanmaktadır. Yüksek rezolüsyonlu sitogenetik çalışmalarda her ne kadar ~5 megabaza kadar yapısal anomalilerin saptanabileceği kabul edilse de rutin çalışmalarda 15 Mb'lık anomalilerin de gözden kaçabildiği bilinmektedir (Yu ve ark., 2003). Prenatal çalışmalarda postnatal analizlerden farklı olarak submikroskopik anomalilere özgün klinik muayene bulgularının saptanması mümkün olmadığından, bu sendromlara özgün analizlerin yapılma olanağı oldukça kısıtlıdır. Bu durum ancak ailevi bilinen yapısal kromozom anomalisi araştırılmasında ve/veya bir kromozom anomalisine özgün fetal ultrason bulgusu ortaya çıktığında mümkün olabilmektedir. Örneğin fetal kromozom analizleri normal saptansa da fallot tetralojisi varlığında DiGeorge Sendromu, supra valvular aort stenozu (SVAS) saptandığında Williams Sendromu ya da lizensefali bulgusu varlığında Mille-Dieker Sendromu'na özgün FISH probu ile ya da ilgili MLPA problemleri ile mikrodelsiyon tanısına gidilebilmektedir (Hartge ve ark. 2010; Sleurs ve ark. 2004; Krzeminska ve ark. 2009; Lenzini ve ark. 2007; Kontos ve ark. 2008).

Benzer şekilde delesyon ve duplikasyonla ilişkili tek gen hastalıklarının (Duchenne/Becker müsküler distrofisi, Spinal müsküler artrofi, Konjenital adrenal hiperplazi vd) taşıyıcılık varlığında ve saptanan yapısal kromozom anomalilerinin ayrıntılı incelenmesi amacı ile de MLPA tekniği kullanılmaktadır (Arkblad ve ark. 2006; Concolino ve ark. 2009; Chen ve ark. 2010; Zhang ve ark. 2010).

Yukarıda sözü geçen çalışmalar sonrasında fetal kromozom analizlerinde kromozom anomalisi saptandığında, aile genetik danışmanlık ile prognoz hakkında bilgilendirilir ve ailenin gebeliğin devamı ya da sonlandırılması konusunda yardımcı

olunur. Genetik danışma süreci, bilinen kromozom anomali sendromları için kolay ve anlaşılma düzeyi yüksek olan bir süreçtir. Ancak mozaisim, marker kromozom, *de novo* dengeli yapısal anomaliler gibi nadir durumlar söz konusu olduğunda danışman ve aile için daha zor anlaşılır, net karar vermeyi zorlaştıracak süreçler ortaya çıkmaktadır. Benzer bir durum patolojik ultrason bulgusu varlığı söz konusu olduğunda klasik sitogenetik tekniklerle yapılan fetal kromozom analizlerinde anomali saptanmaması, etiyolojinin aydınlatılmamış olması nedeni ile ailenin ve klinisyenin alacağı kararlarda da yaşanmaktadır. Prenatal dönemde saptanan patolojik bulguların etiyolojilerinin aydınlatılması gebeliğin devamı ve ailenin yaşadığı stresin azaltılması açısından çok önemlidir.

Fetal ultrasonografide saptanan patolojik bulgular özgün bir mikrolelesyon/duplikasyon sendromunu işaret etmiyorsa etiyolojiye yönelik çalışmalar ve tanı genellikle mümkün olamamaktadır. Bu tür olgularda fetal ultrasonda saptanan anomalilerin ağırlığı, yaşamla bağdaşıp bağdaşmadığı ve mental geriliğin eşlik edip etmediği gibi faktörler de göz önüne alınarak aileler bilgilendirilmekte, etiyolojiyi aydınlatan kesin bir tanı olmamasına rağmen fetusların önemli bir kısmı bulgular nedeni ile tahliye edilmektedir. Tahliye sonrası tekrarlama riskleri açısından genetik danışma, kesin tanı olmadığından genel ampirik riskler göz önüne alınarak verilebilmektedir.

Bir çok mikrolelesyon/duplikasyon sendromunda prenatal ve natal öyküye bakıldığında intrauterin gelişme geriliği, düşük doğum ağırlığı, kardiyak anomali ve merkezi sinir sistemi anomalilerinin bir veya birkaçının varlığı görülmektedir (Tablo 3-2) (de Vries 2001; Popp 2002; Souter 2003; Vialard 2009; Thuresson 2007; Slavotinek 2008; Engels 2009). Postnatal evrede MKA/MR grubunda yapılan çalışmalarda subtelomerik FISH, MLPA ve dizin çalışmaları ile elde edilen sonuçlarda submikroskobik düzeydeki anomalilerin saptanması, prenatal evrede aydınlatılamayan olguların bir bölümünün de submikroskobik yapısal kromozom anomalileri taşıyor olmasını düşündürmektedir. Prenatal dönemde ultrason bulgusu saptanan, kromozom analizleri normal sonuçlanmış, patolojik ultrason bulgularının özgün bir mikrolelesyon/duplikasyon sendromunu işaret etmediği olgularda farklı tekniklerle yapılan subtelomerik, sendrom spesifik ve genom boyu tarama çalışma sonuçları

yayınlanmaktadır. Çok sayıda prenatal örnekle yapılan ilk subtelomerik tarama çalışmasında (Chen ve ark., 2006) fetal kromozom analizleri normal ya da dengeli yapısal kromozom anomalisi saptanan IUGG ya da en az 1 major patolojik ultrason bulgusu olan 27 olguda önce Di George sendromuna yönelik FISH probu (*TUPLE1*) ve ardından subtelomerik FISH probu(MultiprobeT- Cytocell) ile çalışılmış, 3 olguda (%11) 22q11.2 delesyonu, 1olguda 1p36.3 ve 1 olguda da 21q22.3 delesyonu saptamıştır. Di George bölge delesyonu saptanan 3 olguda da konotrunkal kalp anomalisi bulunması dikkat çekmektedir. Bu çalışmada submikroskopik kromozom anomalisi %18,5 olarak bulunmuştur. 48 majör patolojik ultrason bulgusu ile yapılan diğer bir subtelomerik FISH çalışmasında (Gignac ve ark. 2006) 2 kalıtsal dengesiz kromozom anomalisi (%4) ve 3 polimorfizm bildirilmektedir. Faas ve ark. (2008) patolojik ultrason bulgusu olan ve 2' sinde normal 1' inde USG bulgularını açıklamayan Xp terminal delesyonu saptanan 3 olguda p036 ve P070 prob seti ile MLPA tekniği uygulamışlar her üç olguda da sub telomerik anomali saptadıklarını bildirmişler. Literatürde 2010 yılında MLPA tekniği ile çok sayıda olgu içeren ilk çalışmalar yayınlanmış bu 4 çalışma ve bulguları tablo 2.15' de özetlenmiştir. Bu çalışmalarda kromozom analizleri normal sonuçlanmış patolojik ultrason bulgusu olan fetusların örnekleri çalışmalara dahil edilmiş, %1,3 ile %6,5 arasında değişen anomali oranları bildirilmiştir. Yalnızca 1. trimester tarama testinde artmış risk saptanan 49 olguda yapılan bir çalışmada ise kromozom anomalisi saptanmamıştır (Rosello ve ark. 2010).

Tablo 2-15: Prenatal dönemde patolojik ultrason bulgusu varlığında uygulanan MLPA çalışma sonuçları (Sık rastlanan anöploidiler hariç)

Literatür	Olgun	Seçim Kriteri*	Çalışılan bölge	Kullanılan prob setleri	Anomali n (%)
Kjaergaard ve ark., (2010)	530	Patolojik Ultrason Bulgusu (NT $\geq$ 3.5 mm) parental translokasyon taşıyıcılığı ve mikrolelesyon/duplikasyon sendromlu çocuk öyküsü	del/dup Sendromlar Subtelomerik bölgeler	P064 (470 olgu) P036-P069 (441 olgu)	9 (%1,7)
Rosello ve ark. (2010)	49	1. Trimester usg de patoloji veya tarama testinde yüksek risk	Del/dup Sendromlar Subtelomerik bölgeler	P064-P096 (49 olgu) P036 (49 olgu)	0(%0)

Literatür	Olgun	Seçim Kriteri*	Çalışılan bölge	Kullanılan prob setleri	Anomali n (%)
Mademont-Soler ve ark., (2010)	229	Patolojik Ultrason Bulgusu anomalisi (IUGG ve/veya NT (>99P) ve diğer major bulgular)	Subtelomerik bölgeler	P036 –P070(229 olgu)	3 (%1,3)
Goumy ve ark., (2010)	61	Patolojik ultrason bulgusu (major ve multiple)	Subtelomerik bölgeler Del/dup Sendromlar	P036 –P070 P245	4 (%6,5)

*NT(Nucal translucency); ense cilt kalınlığı, IUGG;intra uterin gelişme geriliği

Prenatal kromozom analizlerinde ileri moleküler teknikler olan dizin teknikleri de uygulanmaya başlamıştır. Vialard ve ark. (2009) çoklu konjenital anomalisi nedeni ile tahliye olan 39 fetusa ait doku örnekleri önce klasik yöntemlerle incelenmiş, 37 olguda normal kromozom yapısı, 1 olguda Yq+, 1 olguda da 9p+ anomalisi saptanmıştır. Bu olgularda, 287 lokus tarayabilen “The Genosensor TM Array 300” (Abbott Molecular, Abbott Park, Ill. USA) kullanarak dizin tekniği ile incelenmiş ve sitogenetik olarak saptanan Yq+ olgusunda derivatif Y kromozomundaki ilave materyalin yaklaşık 30 Mb uzunluğunda 20. kromozomun q koluna ait olduğu ve sitogenetik olarak saptanan derivatif 9. kromozomda p kolunda ~10Mb büyüklüğünde bir delesyon ve 11. kromozomun kısa koluna ait 10Mb’lık parsiyel bir trizomi gösterilmiştir. Sitogenetik olarak normal kromozom kuruluşu saptanan 1 olguda 8. kromozomun q terminal bölgesinde ~5Mb büyüklüğünde duplikasyon ve 11. kromozomun q terminal bölgesinde ~1Mb büyüklüğünde bir delesyon saptanmış ve bu olguda babanın 8. ve 11. kromozomlar arası telomerik bir translokasyon taşıdığı gösterilmiştir. Diğer bir olguda 22. kromozomun q11.2 lokusunda delesyon ve başka bir olguda da 1. kromozomun p36 bandında delesyon saptanmış bu son iki olgu FISH çalışmaları ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada, çalışmanın tahliye sonrası yapıldığını, benzer çalışmaların prenatal olarak yapıldığında (ticari FISH problemlerinin yetersiz olması nedeni ile) saptanan anomalilerin doğrulanmasının prenatal tanının kısıtlı sürecindeki zorluğuna dikkat çekilmiştir. Yazarlar, bu nedenle de dizin çalışmalarının bilinen delesyon/ duplikasyon sendromlarına yönelik yapılmasının doğrulanma ve uygulamasında kolaylık sağlayacağını vurgulamıştır. Sitogenetik çalışmalarda normal kromozom saptanmış klinisyen tarafından özellikle dizin yapılması için refere edilen 15 olguluk 1Mb çözünürlükle yapılan aCGH çalışmasında 2

olguda (%13,3) kopya sayısı değişimi saptanmış bu olgulardan ensede cilt kalınlığı artışı endikasyonu olan 1 olguda (%6,6) klinik bir sendrom ilişkili (22q11.2 mikroduplikasyon sendromu) duplikasyon saptandığı ancak anne ve baba çalışması yapılamadan intrauterin fetal ölümle sonuçlandığı, hipoplastik nazal kemik bulgusu olan diğer olguda ise polimorfizm olduğu klinik bulgu taşımayan ebeveynde de varlığı gösterilmiştir (Evangelidou ve ark. 2010). Kleeman ve ark.(2009) normal karyotip saptanan ancak fetal ultrasonografik taramada patoloji gözlenen 50 olgulu aCGH çalışmasında 1 olguda (%2) klinik olarak anlamlı değişim ve 2 olguda da polimorfik CNV saptandığı bildirilmiştir. Shaffer ve ark. (2008) normal karyotip saptanmış, 110' u patolojik ultrason bulgulu toplam 151 fetal dokuda yaptığı aCGH çalışmasında 2 olguda (%1,3) klinik olarak anlamlı değişim, 12 olguda polimorfik CNV ve 1 olguda da klinik etkisi belirsiz kopya sayısı değişimi saptandığını bildirmektedir. Klinik olarak anlamlı değişim saptanan her iki olgunun da patolojik ultrason bulgusu taşıdığını ve anomali saptanma sıklığını patolojik ultrason bulgulu olgular içinde (2/110 ve %1,8) olarak bildirmiştir.

Patolojik ultrason bulgulu fetusların etiyolojik araştırmalarının genom boyu taramalarla yapılması durumunda varyasyon ve polimorfizm doğrulanma işlemleri nedeniyle ek çalışmalar gerekeceği, tanının gecikeceği ve ek maliyetler oluşacağına başka çalışmalarda da dikkat çekilmiştir (Iafate ve ark. 2004; Sebat ve ark, 2004; Vissers ve ark, 2010). Amniyotik sıvı süpernatantlarından elde edilen fetal DNA ile fetal kromozom anomalilerinin tanısının yapılabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Miura ve ark. 2006; Lapaire ve ark. 2007). Prenatal olgularda farklı dizin tipleri ve olgu grupları ile yapılan başlıca çalışmalar aşağıda özetlenmiştir (Tablo 2-16). Dizin çalışmalarının anöploidi taramalarında sitogenetik sonuçlarla tam uyumlu olduğu ancak mozaik olgularda oran-sonuç ilişkisinin değerlendirilmesi için daha fazla deneyim gerektiği kabul edilmektedir. Sayısal kromozom anomalilerinin yanı sıra gerek sitogenetik olarak saptanan yapısal anomalilerin ayrıntılandırılması, gerekse de yeni dengesiz yapısal anomalilerin saptanmasında dizin çalışmaları çok hassas bir şekilde sonuca ulaşabilmektedir. Ancak bu hassasiyet dizin tipinin çözünürlüğü ile doğru orantılı olmakla birlikte, polimorfizm ve klinik etkisi net olmayan yeni değişimlerin de saptanmasına yol açtığından gereksiz ek çalışmalar, maliyet ve genetik danışmada güçlüklerle yol açmaktadır (Shaffer ve ark. 2008; Van den Veyver ve Beaudet 2009;

Gross ve ark. 2011). Farklı çalışmalarda olgu seçimine ve kullanılan dizin tipine göre saptanan anomali sıklıkları %0-10 ve polimorfizm sıklıkları ise %0,7-%39 arasında değişmektedir. Saptanan polimorfizmlerin bir bölümü CNV veri tabanı ile karşılaştırılarak, anne ve baba çalışmaları ile veya ek doğrulama testleri ile araştırılması gerekmekte ve böylece tanı zamanı uzamakta, maliyet artmaktadır. Tüm bu testlere rağmen bir grup verinin klinik etkisi aydınlatılamamıştır (Sahoo ve ark. 2006; Shaffer ve ark. 2008; Van den Veyver ve Beaudet 2009).

Tablo 2-16:Prenatal dönemde patolojik ultrason bulgulu normal kromozom saptanmış fetal örneklerde DİZİN tekniğinin uygulanması

Literatür	Olgu n	Seçim Kriteri*	Çalışılan klon tipi/ sayısı	Saptanan Anomali** n (%)	Saptanan polimorfizm veya etkisi belirsiz değişim n (%)
Schaeffer ve ark., (2004)	41	Spontan abortus materyali	GenoSensor array 300- Human P1(modifiye PAC, PAC ve BAC klonları/287	4 (%9,8)	(%7,9)?
Le Caignec ve ark. (2005)	49	En az üç major anomli (kardiovasküler, iskelet, sindirim, merkezi sinir sistemi ve ürogenital sistem anomalisi) 49 fetus (medikal tahlie 41 ve intrauterin ölüm sonrası tahlie 3 fetus)	GenoSensor array 300- Human P1(modifiye PAC, PAC ve BAC klonları/287	4(%8)	1 (%0,7)
Sahoo ve ark. (2006)	98	Kromozom analiz endikasyonlu prenatal olgular	The Baylor College of Medicine Chromosome Microarray version 4.0 (41 subtelomer ve 55 hastalık bölgese özgü 366 BAC ve PAC klonu)	1 (%1)	30(%30) CNV 12(%12) belirsiz
Shaffer ve ark. (2008)	151	Kromozom analiz endikasyonlu prenatal olgular	Signature PrenatalChip BAC microarray	2 (%1.,8	12(%8) CNV 1(%0,7) belirsiz
Van den Veyver ve Beaudet (2009)	300	Kromozom analiz endikasyonlu prenatal olgular	The Baylor College of Medicine Chromosome Microarray Version 5 ve 6(41 subtelomer, 43 perisentromerik bölge ve 140 hastalık bölgese özgü 1476 BAC ve PAC klonu)	15 (%5)	40 (%13.3) CNV 3(%1) belirsiz

Literatür	Olgun	Seçim Kriteri*	Çalışılan klon tipi/ sayısı	Saptanan Anomali** n (%)	Saptanan polimorfizm veya etkisi belirsiz değişim n (%)
Kleeman ve ark. (2009)	50	50 patolojik ultrason bulgulu fetus	Signature Chip V 4.0 Signature Chip Whole Genome	1 (%2)	3 (%6)
Maya ve ark. (2010)	254	Kromozom analiz endikasyonlu prenatal olgular	SignatureChip Whole Genome (SignatureChipWG) V 1.0–2.0 veya BCM BAC Chromosomal Microarray V 5 or 6.	3 (%1,1)	33(%12)
Evangelidou ve ark. (2010)	25	15 patolojik ultrason bulgulu fetus 10 mikroskopik dengeli yapısal anomalili fetus (±patolojik usg)	Cytochip (Blue-Gnome, Ltd) 0,5-1Mb rezolüsyonda tüm genom taraması	2 (%8)	2(%8)
Gross ve ark. (2011)	101	Kromozom analiz endikasyonlu prenatal olgular	Sık rastlanan anöploidiler ve 11 mikrodelsiyon sendromu için BAC array (Perin Elmer)	0 (%0)	?

*Sitogenetik çalışmada normal sonuçlanan olgular alınmıştır

**Sık rastlanan anöploidler çıkarılmıştır

Bazı araştırmacılar (Shaffer ve ark. 2008) dizin çalışmalarının klasik sitogenetik tekniklerin yerine geçebileceğini ve uygulanabilirliğini savunsa da diğer bazı araştırmacılar bu tekniğin yapısal anomalileri çok ince detay ile araştırabilen ve birçok yeni dengesizliği saptayabilen bu tekniğin polimorfizm ve klinik etkisi net olmayan birçok değişimin saptanması nedeni ile genetikçi ve klinisyeni genetik danışma açısından zor bir duruma düşüreceğini savunmaktadır (Gross ve ark. 2011). ACOG'un (American College of Obstetrician and Gynecologists' Committee) 2009 yılı tavsiye kararında dizin çalışmalarının benzer nedenlerle prenatal tanı çalışmalarında rutin yöntem olarak kullanılmasının fiyat ve teknik sakıncalar açısından erken olduğunu bildirmektedir (ACOG Committee Opinion No. 446, 2009).

Bugün için klinik etkisi bilinen sayısal ve yapısal anomalilerin taranabildiği dizin çalışmaları, genom boyu ayrıntılı taramalarla kıyaslandığında rezolüsyonu düşük olmakla

birlikte, bölgelerin çoğunun FISH problemlerinin olması nedeni ile doğrulanması kolay, varyasyon olasılığı düşük spesifitesi daha güçlü bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Vialard ve ark. 2009).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MATERİYAL

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda prospektif olarak yürütüldü.

Çalışmada, 20.09.2007 ile 26.04.2010 tarihleri arasında Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na fetal kromozom analizi yapılmak üzere kabul edilen, başvuru endikasyonu içinde intra uterin gelişme geriliği, fetal kardiyak anomali, merkezi sinir sistemi anomali vd. patolojik ultrason bulgularının biri veya birden fazlasının bulunduğu fetal doku örneklerinden kromozom analizi ve varsa FISH çalışmaları yapılmış, herhangi bir anomali saptanmamış 68 olguya ait doğrudan fetal doku veya kültür edilmiş hücrelerinden elde edilen DNA örnekleri kullanıldı.

Fetal kromozom analizleri ve FISH çalışmaları İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Sitogenetik laboratuvarında, tıbbi tahliye veya doğum sonrası olgu muayeneleri aynı bilim dalının polikliniğinde yapıldı.

Çalışma materyalini oluşturan 68 olgunun invaziv girişimleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Perinatoloji Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bu dokulardan 10 tanesi korionik villus örneği, 24 tanesi amniyotik sıvı hücreleri, 34 tanesi fetal kan örneği idi.

Seriye dahil edilen 2 olgu, biri amniyotik sıvı kültüründen elde edilen DNA'nın yetersiz olması (olgu 34) ve diğeri gebeliğin tahliye edilmesinden sonra akondroplazi kesin tanısı (olgu 62) alması nedeniyle seriden çıkarıldı. Böylece toplam 66 olguda MLPA çalışması yapıldı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Gereçler

3.2.1.1. Kullanılan Taşınabilir Cihazlar

- a) Tam otomatik DNA izolasyon cihazı- Magna Pure Compact (*Roche*)
- b) Termal Döngü Cihazı- PTC 200 (*MJ Research*)
- c) Santrifüj- Allegra X22R (*Beckman*)
- d) Mikrosantrifüj- 5415R (*Eppendorf*)
- e) Spektrofotometre- Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*)
- f) Kapiler elektroforez cihazı- CEQ 8000 (*Beckman Coulter*)
- g) Hibridizasyon cihazı - Hybridize- (*DAKO*)
- h) Mikropipet Seti- (*Gilson, Finpette*)
- i) PCR tüpleri- (*Axygen*)
- j) Tek kullanımlık polipropilen tüpler- (*Greiner, Orange*)
- k) Buzdolabı- SR-L629EV (*Samsung*)
- l) Derin dondurucu- (*Real*)
- m) Distile su cihazı- (*Nüve*)
- n) Mikrodalga fırın- MD55I (*Arçelik*)
- o) Su banyosu- 1083 (*GFL*)
- p) İnkübatör- Shake n stack (*Hybide*)
- q) Masaüstü ısıtıcı blok- Accublock (*Labnet*)
- r) Vorteks- (*Elektromag*)
- s) Bilgisayar –Satellite L10-102 (*Toshiba*)
- t) DNA Bankalama programı- Özel yapım veritabanı (*File Maker Pro V 8*)
- u) MLPA Analizi- (*Coffalyser® V 9.4*)
- v) Ofis programı- Office 2007 (*Microsoft*)

3.2.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- a) MLPA Probları- P070, P245- (*MRC Holland*)
- b) DNA izolasyon kiti- QIAamp® DNA Mini (*Qiagen*)
- c) Subtelomerik FISH probu (*Cytocell, Vysis*)
- d) Etanol- (*Merck*)

- e) Proteinaz K-(*Qiagen, Roche*)
- f) Heparinaz- H-2519 (*Sigma*)
- g) 1xPBS tamponu
- h) TE tamponu
- i) 3M Sodyum Asetat çözeltisi
- j) 2xSSC çözeltisi
- k) 0.4xSSC+0,05 tween 20 çözeltisi
- l) %70, %85 çözeltileri

3.2.2. Kullanılan Teknikler

3.2.2.1. MLPA Prob Setlerinin Seçimi

Çalışmada uygulanacak MLPA prob setlerinin seçiminde üretici firmanın (MRC-Holland) ticari olarak kullanıma sunduğu tüm kromozomların subtelomerik bölgelerini kapsayan iki prob setinden (P036 ve P070) daha yeni üretime girmiş olan P070 prob seti seçilmiştir. Üretici firma subtelomerik taramalarda bu iki prob setini birbirlerini doğrulama amaçlı ardışık olarak kullanmayı önermektedir. Doğrulama işlemlerini yapmak için laboratuvarımızda kolay uygulanabilen FISH tekniği seçilmiş ikinci prob seti kullanımı konusunda birçok mik rodelesyon/duplikasyon sendromunu kapsayan P245 prob seti tercih edilmiştir. Bu prob setinin kapsadığı sendromların klinik bulguları irdelendiğinde (Tablo 3-1) büyük bir bölümünün gelişme geriliği, kalp anomali, merkezi sinir sistemi anomali gibi prenatal ultrasonografide saptanabilecek patolojilerden sorumlu olduğu ve çalışmanın olgu seçim kriterlerine uyumlu olduğu görülmektedir. Bu sendromların prenatal çalışmalarda saptanması olgularda major bulguların yanı sıra zeka geriliği bulgusunun olması açısından da aile için önem taşımaktadır.

Tablo3-1: SALSA P245 A2 Mikrodelesyon Sendromları Prob setinin hedef aldığı sendromlar, lokusları ve ilişkilendirilen ana klinik bulguları

Sendrom ve kromozomal lokus	OMIM ID*	Klinik bulgular**
1p36 delesyon sendromu	OMIM 607872	GG, MR, Dsm, KH, MSS, ESA
2p16.1 mikrodelesyon sendromu	OMIM 612513	GG, MR, Dsm, KH, MSS, ESA
3q29 mikrodelesyon sendromu	OMIM 609425	MR, Dsm, MSS
Wolf-Hirschhorn sendromu, 4p16.3	OMIM 194190	GG, MR, Dsm, KH, GA, ESA, İA
Cri du Chat bölgesi, 5p15	OMIM 123450	MR, Dsm, KH, GA, ESA, İA
Sotos sendromu, 5q35.3	OMIM 117550	AB, MR, Dsm, KH, MSS, NP
Williams sendromu, 7q11.23	OMIM 194050	GG, MR, Dsm, KH, MSS, GA, ESA, İA
Williams bölgesi duplikasyon sendromu, 7q11.23	OMIM 609757	GG, MR, Dsm
Langer-Giedion sendromu, 8q24.12	OMIM 150230	GG, MR, Dsm, İA, GA
9q22.3 mikrodelesyon sendromu	Literatür***	AB, MSS, Dsm, GA
DiGeorge bölgesi 2, 10p15.1	OMIM 601362	GG, AB, MR, Dsm, ESA, İA, GA
WAGR sendromu, 11p13	OMIM 194072	MR, GA, NP, Dsm
Prader-Willi /Angelman sendromu, 15q12 PWS-OMIM 176270. AS-	OMIM 105830 OMIM 176270	MR, Dsm, GİS, MSS, İA, GA
15q24 delesyon sendromu	OMIM 613406	GG, MR, KH, MSS, Dsm, İA, GA
Rubinstein-Taybi sendromu, 16p13.3	OMIM 180849	GG, MR, Dsm, KH, GA, İA, NP
16p13.3 delesyon/duplikasyon sendromu	OMIM 610543	GG, GA, İA, NP
Miller-Dieker bölgesi, 17p13.3,	OMIM 247200, 607432	GG, MR, Dsm, MSS, KH, GİS, GA
Smith-Magenis sendromu, 17p11.2	OMIM 182290	MR, Dsm, MSS, GİS, GA
NF1 mikrodelesyon sendromu, 17q11.2	OMIM 162200	MR, Dsm, MSS, KH, İA, NP
17q21.31 mikrodelesyon sendromu	OMIM 610443	GG, MR Dsm, KH, GA, MSS
DiGeorge sendromu, 22q11.21	OMIM 188400	GG, AB, MR, Dsm, ESA, İA, GA
22q11.21 duplikasyon sendromu	OMIM 608363	GG, MR, Dsm, KH, MSS
Phelan-McDermid sendromu, 22q13	OMIM 606232	GG, MR, KH, Dsm, MSS, GA,
RETT sendromu, MECP2 duplikasyon sendromu, Xq28	OMIM 312750, OMIM 30260	MR, Dsm, , MSS, GA

*OMIM numarası olmayan lokuslar için literatür verilmiştir

**AB: Aşırı büyüme; Dsm: dismorfizm; ESA: Endokrin sistem anormallikleri; GA: Genito-üriner sistem anomalileri; GG: gelişme geriliği; GİS: Gastrointestinal sistem anomalileri; İA: İskelet anomalileri; KH; kardiyak anomal; MR: zeka geriliği; MSS: merkezi sinir sistemi anomalisi; NP: Neoplazi

***Redon ve ark. Eur J Hum Genet 2006

3.2.2.2. DNA Eldesi

Olguların kromozom analizi amaçlı alınmış olan fetal dokularından DNA izole edilerek MLPA çalışması için bankalanmıştır. DNA izolasyonunda 60 olgunun DNA izolasyonunda Qiagen firmasının QIAamp® DNA Mini izolasyon kiti kullanılmış, ancak örnek miktarının az olduğu 8 fetal kan örneğinde daha yüksek verim almak için tam otomatik DNA izolasyon cihazı (*Magna Pure Compact -Roche*) ile izolasyon yapılmıştır. DNA izolasyonu için; amniyotik sıvı ve korionik villus örneğinde mümkünse (izolasyon aşamasında doku sindirici enzim aşamasının gerekmemesi nedeni ile) hücre

kültürlerinden elde edilen hücreler öncelikli olarak kullanmıştır. Fetal kordon kanı, kordosentez işlemi sırasında heparin kullanılarak alındığından ve heparinin PCR inhibitörü olduğu bilindiğinden (İzraeli ve ark. 1991; Yokota ve ark. 1999; Beutler 1990), DNA’da heparin kontaminasyonunu en düşük seviyede tutabilmek için kısa süreli hücre kültüründe elde edilen hücreler öncelikle izolasyona alınmaya çalışılmıştır. Üreme azlığı durumunda fetal kordon kanı hücreleri kültür edilmeden DNA izolasyonuna alınmıştır. Olguların DNA izolasyonlarına ait özellikleri aşağıdaki tabloda (Tablo 3-2) gösterildi.

Tablo 3-2: Olgulardan izole edilen DNA örneklerinin özellikleri

Olgu No	Kaynak Doku	DNA YOĞUNLUK ngr/μL	260/280	Total DNA μgr	İzolasyon Metodu
1	AS K	24,1	1,97	4,82	Manuel izolasyon (Qiagen)
2	FK K	21,9	1,80	4,38	Manuel izolasyon (Qiagen)
3	FK K	65,7	1,8	6,07	Manuel izolasyon (Qiagen)
4	AS K	60	1,96	6,00	Manuel izolasyon (Qiagen)
5	FKK	65	1,0	13,00	Manuel izolasyon (Qiagen)
6	AS K	43,2	1,95	4,32	Manuel izolasyon (Qiagen)
7	AS K	77,1	1,90	15,42	Manuel izolasyon (Qiagen)
8	FK K	67,2	1,86	6,72	Manuel izolasyon (Qiagen)
9	AS K	123,1	1,87	12,31	Manuel izolasyon (Qiagen)
10	AS D	33,3	1,8	3,33	Manuel izolasyon (Qiagen)
11	AS K	139,8	1,99	13,98	Manuel izolasyon (Qiagen)
12	AS K	77,6	1,93	7,76	Manuel izolasyon (Qiagen)
13	AS K	102,7	2,02	20,54	Manuel izolasyon (Qiagen)
14	KVÖ K	106,9	1,96	10,69	Manuel izolasyon (Qiagen)
15	FK D	76,3	1,88	7,63	Manuel izolasyon (Qiagen)
16	FK K	19,3	1,73	3,86	Manuel izolasyon (Qiagen)
17	FK D	72,8	1,85	14,56	Manuel izolasyon (Qiagen)
18	FK D	103,8	1,84	10,38	Manuel izolasyon (Qiagen)
19	AS K	63,9	1,76	12,78	Manuel izolasyon (Qiagen)
20	FK D	61,1	1,82	12,22	Manuel izolasyon (Qiagen)
21	FK D	40,1	1,84	8,02	Manuel izolasyon (Qiagen)
22	AS K	33	1,95	6,60	Manuel izolasyon (Qiagen)
23	FK D	98,8	1,92	19,76	Manuel izolasyon (Qiagen)
24	FK D	231	1,91	46,20	Manuel izolasyon (Qiagen)
25	FK D	46,9	1,88	9,38	Manuel izolasyon (Qiagen)
26	FK D	81,9	1,96	16,38	Manuel izolasyon (Qiagen)
27	FK D	24,1	1,82	4,82	Manuel izolasyon (Qiagen)
28	AS D	68,3	1,87	17,76	Manuel izolasyon (Qiagen)
29	KVÖ K	79,9	2	17,98	Manuel izolasyon (Qiagen)
30	KVÖ K	11,2	1,97	2,24	Manuel izolasyon (Qiagen)
31	FK D	65,2	1,83	13,04	Manuel izolasyon (Qiagen)
32	KVÖ K	22	1,92	4,40	Manuel izolasyon (Qiagen)
33	FK D	28,5	1,87	5,70	Manuel izolasyon (Qiagen)
34	AS K	1	3,7	0,50	Manuel izolasyon (Qiagen)
35	AS K	25,1	1,95	3,77	Manuel izolasyon (Qiagen)

Olgu No	Kaynak Doku	DNA YOĞUNLUK ngr/ μ L	260/280	Total DNA μ gr	İzolasyon Metodu
36	KVÖ D	15	1,88	3,00	Manuel izolasyon (Qiagen)
37	AS K	16,9	1,95	5,07	Manuel izolasyon (Qiagen)
38	FK D	63,3	1,84	12,66	Manuel izolasyon (Qiagen)
39	KVÖ D	25,3	1,79	10,12	Otomatik izolasyon (MagnaPure)
40	AS K	91,4	1,98	18,28	Manuel izolasyon (Qiagen)
41	FK D	304,9	1,97	60,98	Otomatik izolasyon (MagnaPure)
42	FK D	201,8	1,97	40,36	Otomatik izolasyon (MagnaPure)
43	AS K	32,4	1,94	6,48	Manuel izolasyon (Qiagen)
44	AS K	50,2	1,93	10,04	Manuel izolasyon (Qiagen)
45	FK D	102,3	1,98	10,23	Otomatik izolasyon (MagnaPure)
46	AS K	114,7	1,93	22,94	Otomatik izolasyon (MagnaPure)
47	FK D	228,1	1,92	45,62	Otomatik izolasyon (MagnaPure)
48	FK D	621,8	1,98	124,36	Otomatik izolasyon (MagnaPure)
49	FK D	106,5	1,98	21,30	Otomatik izolasyon (MagnaPure)
50	FK D	118,9	1,95	23,78	Manuel izolasyon (Qiagen)
51	AS K	50,2	1,89	10,04	Manuel izolasyon (Qiagen)
52	KVÖ D	82,9	1,82	6,21	Manuel izolasyon (Qiagen)
53	FK D	89,8	1,86	17,96	Manuel izolasyon (Qiagen)
54	AS K	105,1	1,97	10,51	Manuel izolasyon (Qiagen)
55	KVÖ D	121,4	1,78	24,28	Manuel izolasyon (Qiagen)
56	KVÖ K	175,4	1,95	21,05	Manuel izolasyon (Qiagen)
57	FK D	64,1	1,84	12,82	Manuel izolasyon (Qiagen)
58	FK D	42,6	1,95	8,52	Manuel izolasyon (Qiagen)
59	FK D	76,2	1,87	15,24	Manuel izolasyon (Qiagen)
60	FK D	82,1	1,8	8,21	Manuel izolasyon (Qiagen)
61	FK D	73,1	1,9	14,62	Manuel izolasyon (Qiagen)
62	AS K	148,9	1,97	29,78	Manuel izolasyon (Qiagen)
63	AS D	150,2	1,87	22,53	Manuel izolasyon (Qiagen)
64	FK D	22,5	1,67	4,50	Manuel izolasyon (Qiagen)
65	FK D	135,1	1,96	17,56	Manuel izolasyon (Qiagen)
66	FK D	99,7	1,93	11,96	Manuel izolasyon (Qiagen)
67	AS K	145,6	1,98	21,84	Manuel izolasyon (Qiagen)
68	KVÖ K	91,9	1,93	27,57	Manuel izolasyon (Qiagen)

AS D; Amniyotik sıvı hücreleri (kültür edilmemiş), AS K; Amniyotik sıvı hücre kültürü, FK D; Fetal kordon kanı hücreleri (kültür edilmemiş), FK K; Fetal kordon kanı hücre kültürü, KVÖ D; Koryonik villus dokusu (kültür edilmemiş), KVÖ K; Koryonik villus hücre kültürü, Manuel izolasyon (Qiagen); QIAamp® DNA Mini (Manuel izolasyon (Qiagen))DNA izolasyon kiti, MagnaPure; Magna Pure Compact (Roche) DNA izolasyon kiti

Çalışma yapılan 66 olgudan 33'ünde erkek, 33'ünde ise dişi kromozom yapısı gözlenmiştir. Olguların anne yaşı ortalamaları 29 yaş (19-43), ortalama gebelik yaşları 22 hafta (12-35) olarak hesaplanmıştır.

Olguların DNA izolasyonunda, mümkün olduğu kadar örnek dokudan doğrudan izolasyon yapılmaya çalışılmıştır. Fetal kromozom analiz çalışmalarından yedek olarak ayrılan dokuların miktarı yeterli olmadığında DNA kaynağı olarak ekilen hücre kültürleri

kullanılmıştır. Özellikle fetal kordon kanlarında kısıtlı miktarda örnek olduğundan DNA izolasyonunda mümkün olduğu kadar tam otomatik DNA izolasyon cihazı (Magna Pure Compact-Roche) kullanılmaya çalışılmıştır. Diğer örneklerde manuel DNA izolasyon kiti (QIAGEN) kullanılarak izolasyon yapılmıştır.

3.2.2.2.1. Otomatik İzolasyon

Otomatik izolasyonda Magna Pure Compact (Roche) izolasyon cihazı ve MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I kullanılmıştır. Bu cihazın kullanımı, örnek ve kit uygulaması cihazın ekran yönlendirilmesine göre yapılmıştır. Cihazın kullanımı basamaklar halinde aşağıda verilmiştir. Magna pure cihazı izolasyonu kullanılan elüsyon tampon ve DNA örneğinde manyetik boncuk artığı kalma ihtimali nedeni ile MLPA çalışmasında MRC Holland firması tarafından çok önerilmemektedir. Cihaz hazır kit kullanıldığından elüsyon tamponunu değiştirmek mümkün değildir. Bu cihazla sadece bazı fetal kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örneklerle alkol çöktürmesi uygulanarak DNA ilave bir saflaştırma ile temizlenmiş ve bu işlemde elüsyon tamponu olarak TE tampon kullanılmıştır.

Otomatik izolasyon işlem basamakları;

- a) Cihaz açma kapama düğmesinden açılır 5dk ısınma süresi beklenir
- b) İzolasyon örnek tipi, kit tipi ve lot numarası girilir.
- c) Örnek ve DNA tüp barkod listesi eşleştirilir.
- d) Kapak açılarak pipet kartuşu, kit kartuşu (kartuş yerleştirilmeden önce hafif dairesel hareketlerle karıştırılır), örnek kanları yerlerine koyulur.
- e) “Start” düğmesine basılarak işlem başlatılır.
- f) İşlem sonunda DNA örnekleri alınarak cihaz temizlenip kapatılır.

3.2.2.2.2. Manuel İzolasyon

Manuel izolasyonda Manuel izolasyon (Qiagen) mini DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Bu kit içeriği spin kolon yöntemi ile izolasyona olanak vermektedir. Kullanılan spin kolonlar kit protokolüne göre 200µl periferik kan için optimum verim taşımaktadır. Kordon kanında aynı miktar kan işleme alınmış diğer örnekler için

mikrosantrifüj tüpünde ~3mm yükseklikte palet içerecek şekilde ayrılmış ve 1xPBS ile 200µl'lik hücre çökeltisi halinde işleme başlanmıştır. Korionik villuslardan DNA izolasyonu işleminde tüp başına ~5mg (5-6) villus ayrılarak 200µl ye 1XPBS ile tamamlanıp doku parçalayıcı enzim ile muamele edildikten sonra lizis işlemi (madde 2) ile protokole devam edilmiştir.

Bu yöntemle DNA izolasyon protokolü basamaklar halinde aşağıda verilmiştir.

Manuel izolasyon (Qiagen) mini DNA ekstraksiyon protokolü*;

- a) 1,5 µl lik mikrosantrifüj tüpüne 20µl Manuel izolasyon (Qiagen) proteaz (ya da proteinaz K) koyulur
- b) Üzerine 200µl örnek koyulur ve 200µl Buffer AL eklenir
- c) 56°C de 10 dk inkübe edilir
- d) Hızlı santrifüjle kapak etrafına bulaşmış örnek çöktürülür
- e) 200µl etanol (96-100) eklenir 15 sn alt üst edilerek çalkalanır
- f) Hızlı santrifüjle örnek çöktürülür
- g) Karışım 2 ml lik toplama tüpü içine yerleştirilmiş QIAamp mini spin kolon a aktarılır, 6000xg de 1 dk santrifüj edilir
- h) Spin kolon temiz bir toplama tüpüne aktarılır, eski toplama tüpü filtratla birlikte atılır
- i) Spin kolon un kapağı açılır ve içine 500 µl AW1 solüsyonu eklenir, kapağı kapatılır, 6000xg de 1 dk santrifüj edilir
- j) Spin kolon temiz bir toplama tüpüne aktarılır, eski toplama tüpü filtratla birlikte atılır
- k) Spin kolon un kapağı açılır ve içine 500 µl AW2 solüsyonu eklenir, kapağı kapatılır, 20.000xGg' de 3 dk santrifüj edilir
- l) Spin kolon temiz bir toplama tüpüne aktarılır, 20.000xg' de 1 dk santrifüj edilir, eski toplama tüpü filtratla birlikte atılır,
- m) Spin kolon etiketlenmiş 2 µl' lik saklama tüpüne aktarılır, üzerine 200 µl TE** tampon koyulur, oda sıcaklığında 2 dk bekletilir.
- n) 6000xg de 1 dk santrifüj edilir, örnek saklanır kolon atılır.

*Protokol Manuel izolasyon (Qiagen) mini DNA ekstraksiyon kiti protokol el kitabından alınmıştır.

**Kit içeriğinde elusyon tampon olarak AE tampon bulunmaktadır. Çalışmada AE tampon yerine MRC Hollandın MLPA çalışmaları için önerdiği TE tampon kullanılmıştır.

3.2.2.3. DNA Bankalama

İzole edilen DNA örneklerinin bankalama işlemlerinin düzenli yapılabilmesi için *FileMaker Pro Versiyon 8* veritabanı programı kullanılarak bir DNA bankası veritabanı yapılmış, tüm DNA örnekleri etiket, ölçüm, depolama bilgileri veritabanına kaydedilerek bankalama işlemlerinin daha düzenli olması sağlanmıştır. Bu veritabanının arayüz sayfa resimleri aşağıda (Şekil 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, ve 3-5) verilmiştir.

Şekil 3-1: DNA bankalama veritabanı giriş sayfası arayüzü

Şekil 3-2: DNA bankalama veritabanı stok kullanım sayfası arayüzü

FileMaker Pro Advanced - [Kopyası DNA BANK Clone]

File Edit View Insert Format Records Scripts Tools Window Help

Browse
Layout:
[karyotypi]

**i.Ü.
İ.T.F.
TIBBİ GENETİK AD
DNA-BANK VERİTABANI**

DNA KARTI TUM KAYITLAR TUM KAYITLAR LISTE DNA ARA DNA LİSTE KAYIT SİL

ÖNCEKİ SONRAKİ KAYIT EKRANI AYNI HASTA YENİ ÖRNEK KUTUYU GÖR STOK KULANMA

PROTOKOL NO : HASTALIK GRUBU ADI : DNA NO :
LAB NO : SOYADI : KUTU NO :
AİLE DURUMU : AİLE NO : KUYU NO :
ENDİKASYON : TANı : DOLAP NO :
ESKİ DNA NO :

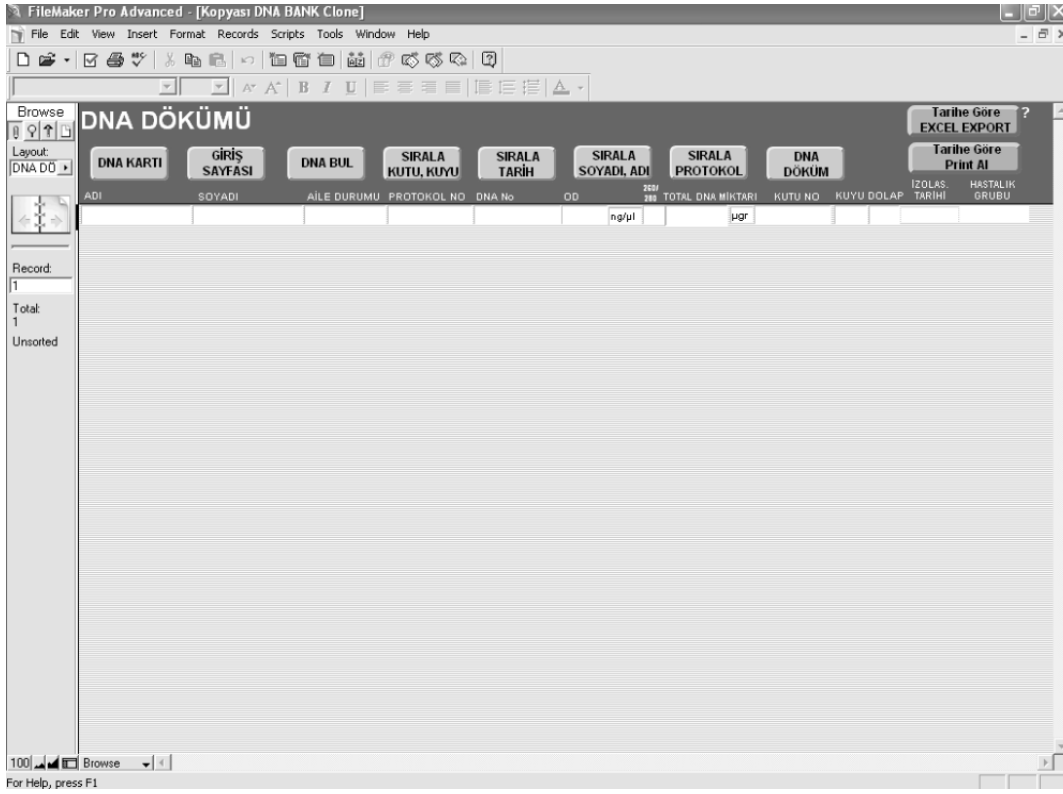
SİTOGENETİK BİLGİLER

KARYOTİP :
MİKROSKOBİK GÖRÜNÜM: DENGELİ ANOMALİ : VAR YOK YAPISAL-SAYISAL: AİLEVİ

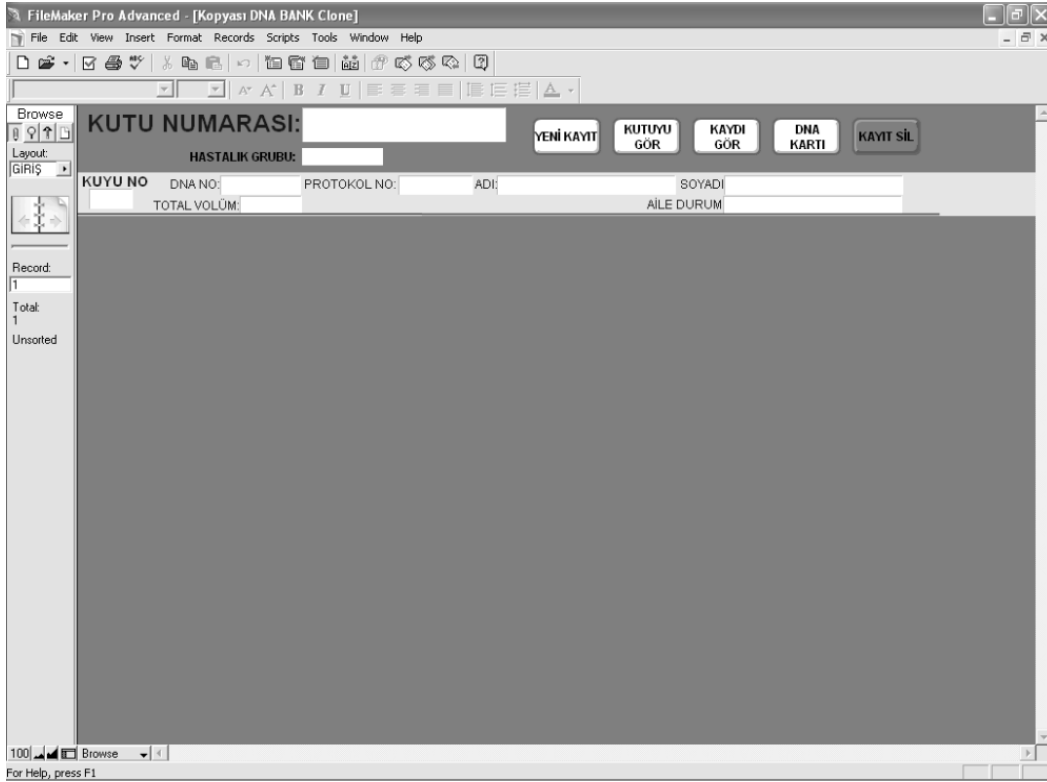
FISH VAR YOK FISH PROBE
M-TEL VAR YOK
MLPA VAR YOK
ARRAY VAR YOK ARRAY KİT
ARRAY-SONUÇ

ANNE KARYOTİP
BABA KARYOTİP

AÇIKLAMA



Şekil 3-4: DNA bankalama veritabanı bilgi döküm sayfası arayüzü



Şekil 3-5: DNA bankalama veritabanı kutu içeriği döküm sayfası arayüzü

3.2.2.4. DNA' nın etanol kullanarak tekrar çöktürülmesi

Bazı olgu DNA' larında kirlilik bulunması ve/veya konsantrasyonun çok düşük olması nedeni ile etanol çöktürmesi (Zeugin ve ark. 1985; Crouse ve ark. 1987; Sambrook ve Russell 2001) ile tekrar pürifikasyon yapılmıştır. Protokol basamaklar halinde aşağıda verilmiştir.

- Mikrosantrifüj tüpüne saflaştırılacak DNA örneği alınır
- DNA örneğine hacimce 20' si kadar sodyum asetat eklenir
- Üzerine hacimce 2,5-3 kat 100 etanol eklenir.
- Altüst edilerek karışması sağlanır, 1saat +4°C' de bekletilir.
- 14.000xg' de 30 dakika santrifüjle çöktürülür.
- Süpernatant atılır, çökeltiye 70' lik etanol koyulur, karıştırılır
- 14.000xg' de 15 dakika santrifüjle çöktürülür
- Süpernatant atılır, çökelti oda ısısında kurumaya bırakılır
- Kuruma gerçekleştiğinde konsantrasyon istenilen miktarda olacak şekilde TE tamponunda çözülür

3.2.2.5. DNA örneğinden heparini uzaklaştırma

Antikoagülan olarak lityum heparin kullanılmış kan örneğinden elde edilen DNA kullanılan PCR çalışmalarında heparinin işlemi bloke etmesi sonucu başarısız olabilmektedir. Kordosentez işlemi ile elde edilen fetal kordon kanları kromozom çalışmaları amaçlanarak alındıkları için lityum heparin içeren enjektörlerle alınmaktadır. Bu çalışmada MLPA çalışmasına alınmadan önce doğrudan kordon kanından elde edilen DNA örnekleri heparinaz ile işleme tutularak kalan artık heparinden uzaklaşmaya çalışılmıştır. Bu yöntem Taylor' un 1997' de yayınladığı protokolden alınmıştır.

3.2.2.5.1. Heparinaz çözeltisinin hazırlanma ve kullanım protokolü

50 ünite heparinaz 1 (sigma –H2519) şişesine 11.2µl 1M Tris pH 7.5, 2.2 µl 1M CaCl₂ ve 2229µl distile su koyulur. Bu çözelti 19µl miktarlarda mikrotüplere ayrılarak -20 °C de saklanır.

Kullanımı; 19 µl' lik bir doz heparinaz çözeltisine işleme alınacak DNA örneğinden 4 µl (400-600 ng/µl) koyulur. 37°C' de 2 saat bekletilir. Süre sonunda bu çözeltiden 5 µl alınarak MLPA işlemine geçilir.

3.2.3. MLPA Çalışması

MLPA çalışması için ekleme veya aktarma gibi pipetasyon işlemleri gereken basamaklarda, uygun sıcaklıkta bekletme seçeneğini de içeren tek bir PCR protokolü termal döngü cihazı hafızasına alınarak, denatürasyon, hibridizasyon, ligasyon ve PCR basamaklarının tümü için uygulanan inkübasyonlarda tek program kullanılmıştır. Bu programın ve MLPA yönteminin tüm basamakları basamakları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

Termal Döngü Cihazı MLPA program basamakları;

- a) 98°C 5'
- b) 25°C beklet
- c) 95°C 1'
- d) 37°C 16 saat
- e) 54°C beklet
- f) 54°C 15'
- g) 4°C beklet
- h) 60°C beklet
- i) 35 siklus
- j) 95°C 30''
- k) 60°C 30''
- l) 72°C 60''
- m) 72°C 20'
- n) 4°C beklet

3.2.3.1. DNA Denatürasyonu ve Prob Miks ile Hibridizasyon

- a) MLPA çalışmasına alınacak olan örneklerin stok DNA'ları -20°C den çıkarılarak çözülür
- b) Kısa süreli (~5sn) santrifüjle çöktürülür
- c) 40°C masaüstü blok ısıtıcıda ısıtılır
- d) Stok DNA' dan yoğunluğu 70ng/μl-100ng/μl olacak şekilde ~25μl miktarda çözeltiler hazırlanır
- e) Çalışılacak prob kitinden SALSA Probe miks ve MLPA tampon çıkarılarak oda ısısında çözülmesi sağlanır. Tampon çok iyi vortex ile karıştırılır ve kısa santrifüjleme ile dibe toplanır
- f) DNA çözeltisinden her örnek için 5μl DNA 200 μl' lik PCR tüplerine alınır
- g) İçinde DNA bulunan bu etiketlenmiş tüpler termal döngü cihazında 98°C' de 5 dk. inkübe edilir.
- h) Inkübasyon sonunda tüpler 25°C' ye soğutulur
- i) Inkübasyon sırasında her bir örnek için 1,5 μl MLPA tampon ve 1,5 μl Probe miks olmak üzere master miks hazırlanır, pipetajla iyice karıştırılır
- j) Tüplerin sıcaklığı 25°C' ye düştüğünde, her bir örneğe 3 μl master miks koyulur ekleme sırasında yukarı aşağı pipetaj ile karışması sağlanır.
- k) Termal döngü cihazının kapağı kapatılarak önce 1 dk 95°C denaturasyon ve ardından 16 saat (gece boyu) 37°C' de hibridizasyona bırakılır.

3.2.3.2. Ligasyon

- a) Ön PCR hazırlığı olarak dondurucudan Ligaz 65 tampon A, Ligaz 65 tampon B dondurucudan çıkarılarak çözülür
- b) Her bir örnek için 3 μl Ligaz 65 tampon A, 3 μl Ligaz 65 tampon B ve 25 μl dH₂O olmak üzere ligaz tampon miksi hazırlanır.
- c) Ligaz tampon miksi her bir örnek için 1 μl Ligaz 65 enzimi eklenir, yukarı aşağı pipetaj ile karışması sağlanır.
- d) Termal döngü cihazı 37°C' den 54°C bekleme basamağına getirilir

- e) Örneklerin sıcaklığı 54°C' ye ulaştığında her bir tüpe 32 ligaz miks eklenir yukarı aşağı pipetaj ile karışması sağlanır.
- f) Termal döngü cihazında 54°C' de 15 dakika inkübe edilir
- g) Ligasyon ürünü 4°C' de 1 hafta kadar saklanabilir. Daha uzun saklama için -20°C önerilmektedir.

3.2.3.3. PCR çalışması

- a) PCR çalışması öncesinde SALSA PCR tamponu, SALSA PCR primerleri ve SALSA enzim dilüsyon tamponu dondurucudan çıkarılır ve çözülür, vorteksle karıştırılır
- b) Yeni PCR tüpleri her örnek için etiketlenir
- c) Her bir örnek için 4 µl SALSA PCR tamponu ve 26 µl dH₂O olacak şekilde PCRtampon miksi hazırlanır ve vorteksle karıştırılır
- d) Hazırlanan her bir tüpe 30 PCR tampon miksi pipetlenerek koyulur
- e) Üzerlerine her örneğin kendi ligasyon ürününden 10'ar µl eklenir
- f) Örnekler PCR tüpü içerisinde dağılmışsa santrifüjde hızlı çevirme ile alta toplanır ve termal döngü cihazına yerleştirilir
- g) Buz üzerinde, örnek başına 2 µl SALSA PCR primeri, 2 µl SALSA enzim dilüsyon tamponu ve 5,5 µl dH₂O olacak şekilde PCR master miks hazırlanır yukarı aşağı pipetaj ile karışması sağlanır. Her bir örnek için 0,5 µl SALSA polimeraz enzimi eklenir ve tekrar yukarı aşağı pipetaj ile karışması sağlanır.
- h) Termal döngü cihazı 60°C' ye ayarlanır
- i) 60°C sıcaklıkta termal döngü cihazındaki tüplerin her birine 10' ar µl PCR master miks eklenir ve yukarı aşağı pipetaj ile karışması sağlanır. PCR işleminin başlaması için termal döngü cihazı çalışmasına devam edilir.

3.2.3.4. Kapiler Elektrophorez Cihazı İle Fragmanların yürütülmesi

Kapiler elektrophorez cihazı açılır, kapiler uçlarını koruyucu su tablası doldurulur, örnek listesi, plaka grafiğine tarih hasta numarası ve prob setinin adı olacak şekilde girilir.

Separasyon tampon plağı ve örnek yükleme plağı hazırlanır cihaza yüklenir ve cihaz yürütme işlemi başlatılır.

Kapiler elektroforez için tampon plağı ve örnek yükleme plağının hazırlanması:

- Tampon plağının örnek sayısı ve yerleri kadar olan kuyucuklarına 3/2' sini dolduracak kadar separasyon tamponu doldurulur
- Örnek yükleme plağı için; örnek başına 32 µl formamid, 0,2 µl CEQ600 size marker düşecek şekilde master miks hazırlanır iyice karıştırılır
- Hazırlanan master miks örnek yükleme plakası kuyucuklarına 32' şer µl koyulur
- Her bir örneğin kuyucuğuna 2,2' şer µl PCR ürünü eklenir
- Her bir örnek kuyucuğuna birer damla mineral yağı damlatılır

Heri iki plak da kapiler elektroforez cihazına yüklenir, yürütme ayarları (şekil 3-6) yapılır ve cihazda fragman ayrılması işlemine geçilir.

Yürütme ayarları:

- Kapiler sıcaklığı:50°C
- Sıcaklık için bekleme: açık
- Denaturasyon sıcaklığı:90°C
- Süresi:120sn
- İnjesiyon voltajı:2.0kV
- İnjesiyon süresi:60sn
- Yürütme süresi:4,8 kV
- Yürütme süresi:60 dk

Note	Method	Analysis
Method Name: MLPA		
Capillary Temperature: 50 °C Wait for Temp: Yes		
Denature Temperature: 90 °C Duration: 120 sec.		
Inject Voltage: 2.0 kV Duration: 60 sec.		
Separate Voltage: 4.8 kV Duration: 60.0 min.		
Pause: 0 min.		
Edit...		

Şekil 3-6: Beckman Coulter CEQ 8000 kapiler elektroforez cihazı MLPA yürütme ayarları

3.2.3.5. Fragman Analizi

Kapiler elektroforezde örnekler yürütüldükten sonra fragman analizine geçilir.

Bu işlem için CEQ 8000 cihazının fragman analiz programı açılır ve analiz parametreleri ve analiz metodu ayarlanır (Şekil 3-7; Şekil 3-8) Ayarlamalardan sonra fragman analizi yapılarak elde edilen fragman sonuçları “csv” formatında export edilir ve data analizine geçilir.

Genel analiz parametreleri;

- i. Pik kriterleri;
 - a. Slope düzeltmesi:3
- ii. Relatif pik yükseklik düzeltmesi:1
- iii. Alel tanımlaması;
 - a. Size tahmin ve alel ID güvenilirliği;
 - i. Güvenlik düzeyi:95
- iv. Analiz metodu;
- v. Size standardı: Size standart 600(3)
- vi. Model:Cubic
- vii. Göç değişkeni: Migrasyon zamanı

Parameter Set Name: MLPA
Project: Default

General | Analysis Method | Quantitation | STR Locus Tags | SNP Locus Tags | Advanced

Parameter Set
Date created: 3/24/2010 10:56:30 AM
Date modified: 3/24/2010 10:56:30 AM

Peak Criteria
Slope threshold: 3
Relative peak height threshold: 1 %

Allele Identification
☐ Identify STR Alleles
☐ SNP Analysis

Size Estimation and Allele ID Confidence
Confidence level: 95 %

Help | Save As | Save | Cancel

Şekil 3-7: Beckman Coulter CEQ 8000 kapiler elektroforez cihazı fragman analiz parametre genel ayarları

Parameter Set Name: MLPA
Project: Default

General | **Analysis Method** | Quantitation | STR Locus Tags | SNP Locus Tags | Advanced

Size standard: SizeStandard-600(3)
Dye: D1
Size Standard Fit Coefficient: 0.57
Model: Cubic
Requires a minimum of 4 selected peaks.

Migration Variable
☒ Migration time
☐ Mobility

Selected Peaks:

Use	Number	Size
☒	1	60
☒	2	70
☒	3	80
☒	4	90
☒	5	100
☒	6	120
☒	7	140
☒	8	160
☒	9	180
☒	10	190
☒	11	200
☒	12	220
☒	13	240
☒	14	260
☒	15	280

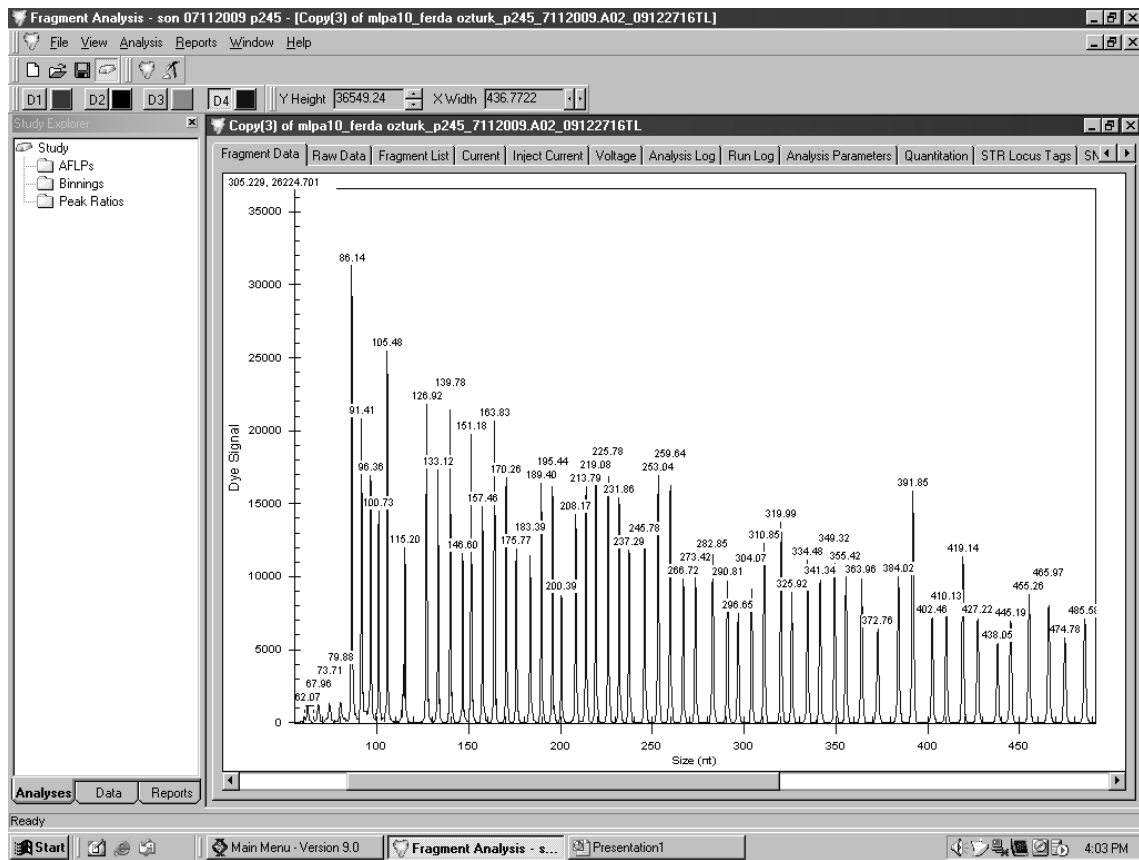
Select All | Deselect All

Help | Save As | Save | Cancel

Şekil 3-8: Beckman Coulter CEQ 8000 kapiler elektroforez cihazı fragman analiz metodu ayarları

3.2.3.6. Veri Analizleri

Fragman analizi sonrasında elde edilen kontrol pikleri ve hedef bölge pikleri sayı ve boyutları açısından genel olarak gözle kontrol edilir. Piklerinin uygun boyutta ve sayıda olduğu doğrulandıktan sonra veri analizlerine geçilir (Şekil 3-9). Uygun olmayan örnekler silinerek tekrar MLPA çalışmasına alınır.



Şekil 3-9: Kapiler elektroforez cihazında analiz sonrası pik görünümü

Veri analizleri için fragman analizi sonrasında uygun olan örneklerin verileri csv (*comma-separated values*= virgülle ayrılmış değerler) formatında cihazdan alınarak Coffalyser 9.4 programında analiz işlemine geçilir. Coffalyser programında yapılan analiz işlemi aşağıda basamaklar halinde anlatılmıştır.

Coffalyser 9.4 programı açıldıktan sonra miks yükleme ekranından incelenecek verilerin kullanıldığı lot ve miks numaralı MLPA prob seti seçilir (Şekil 3-10)

Açılan ekrandan kullanılan prob setinin pik fragmanları kontrol edilir (Şekil 3-11)

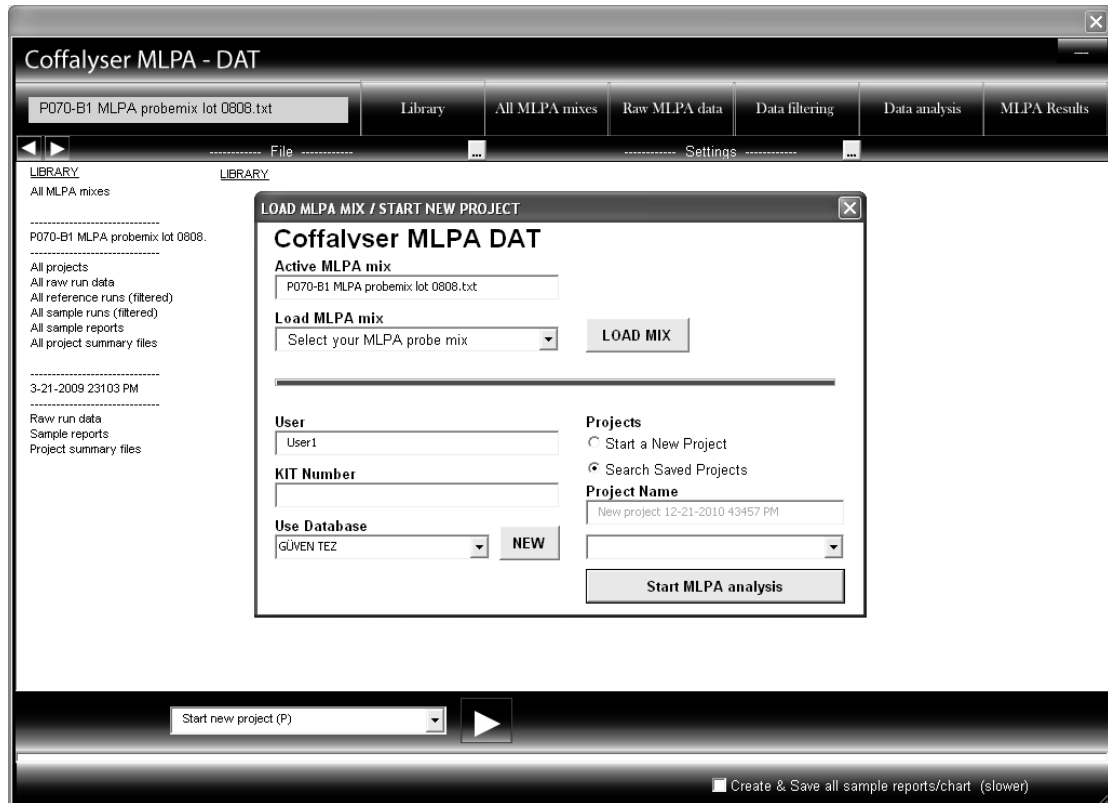
“RAW data” veri ekranından analiz edilecek csv dosyası seçilerek yüklenir (Şekil 3-12).

Analiz ayarları yapılarak analiz işlemi gerçekleştirilir (Şekil 3-13).

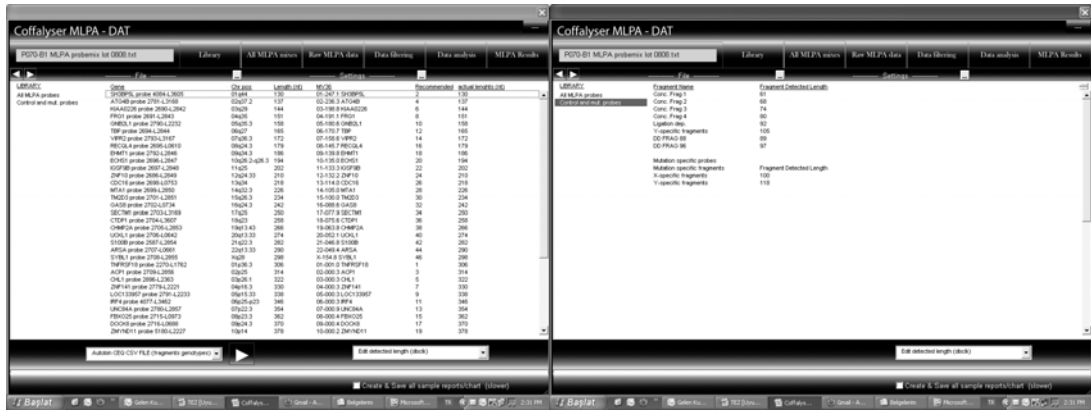
Kontrol ve hasta örnekleri seçilir. Pik normalizasyonu yapılarak elde edilen pikler ile program pikleri eşitlenir (Şekil 3-14).

Filtreleme işlemi ile pikler filtre edilerek analiz edilecek pikler ayrılır (Şekil 3-15).

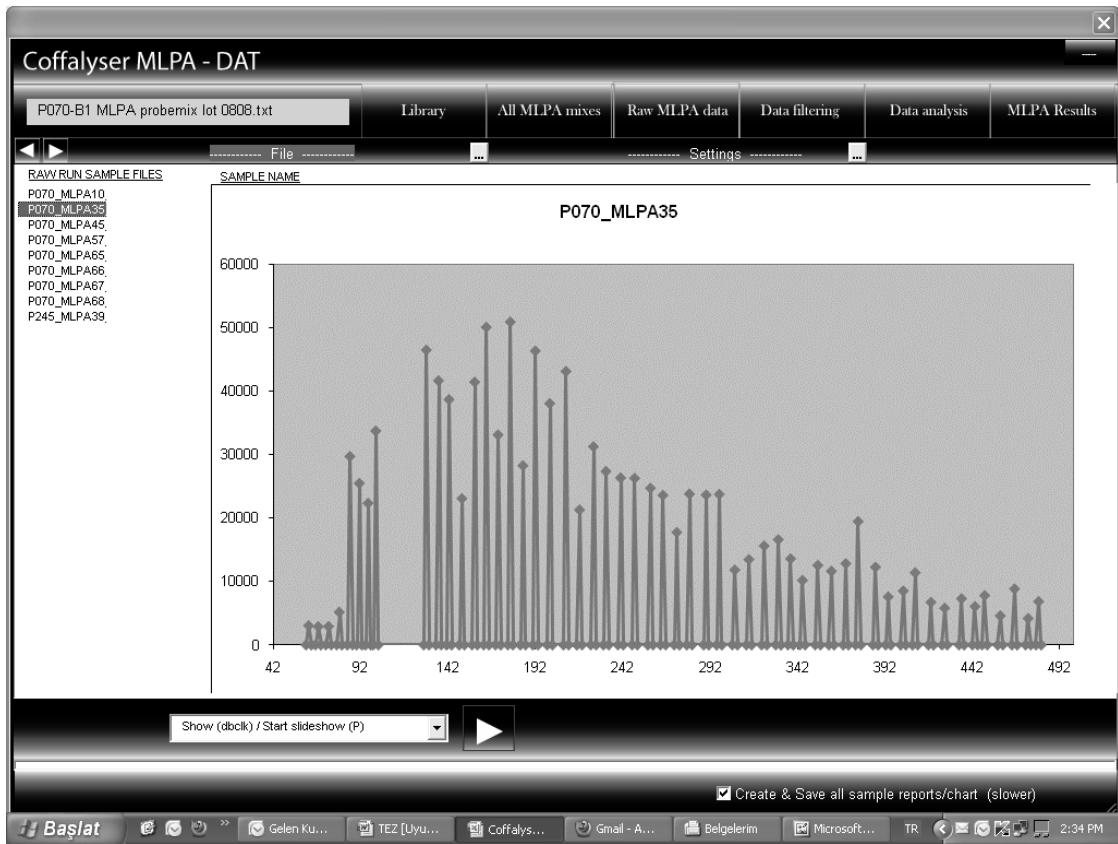
Analiz işlemi yaptırılır, pik değerleri ve pik grafikleri değerlendirilerek var olan kopya sayısı değişiklikleri elde edilir (Şekil 3-16).



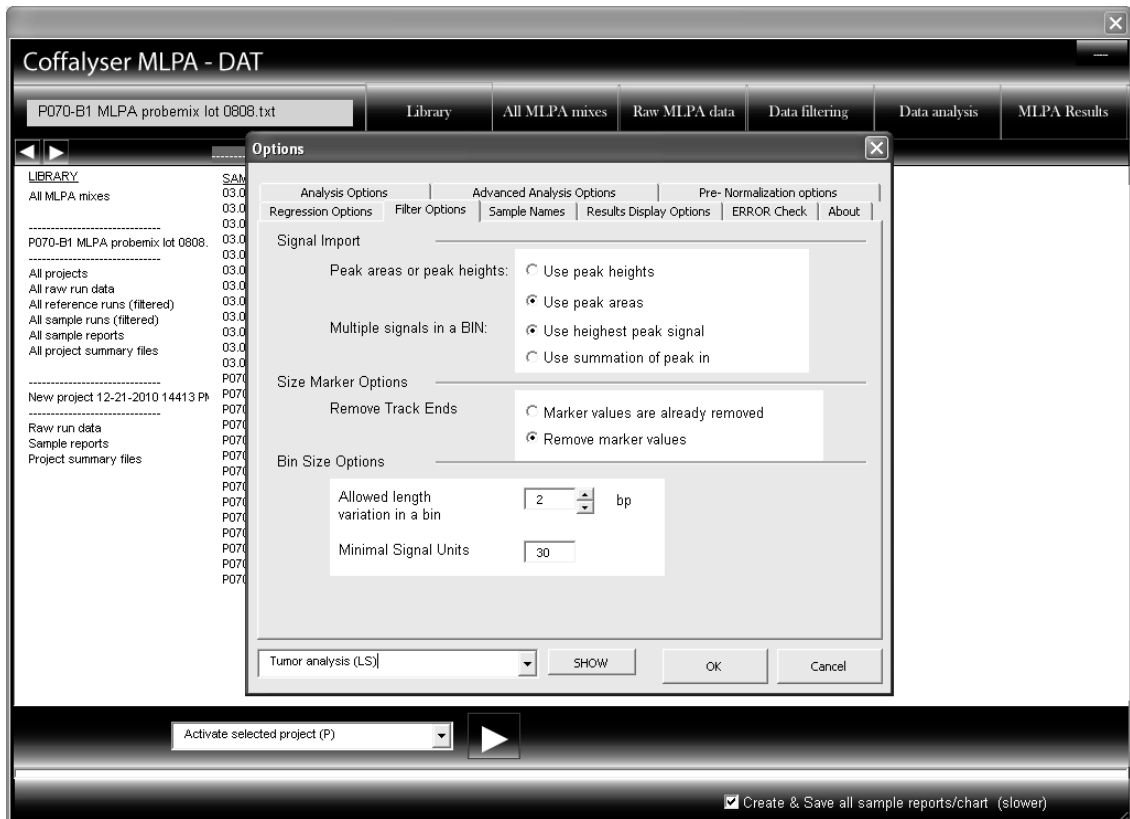
Şekil 3-10: Coffalyser 9.4 miks yükleme ekranı



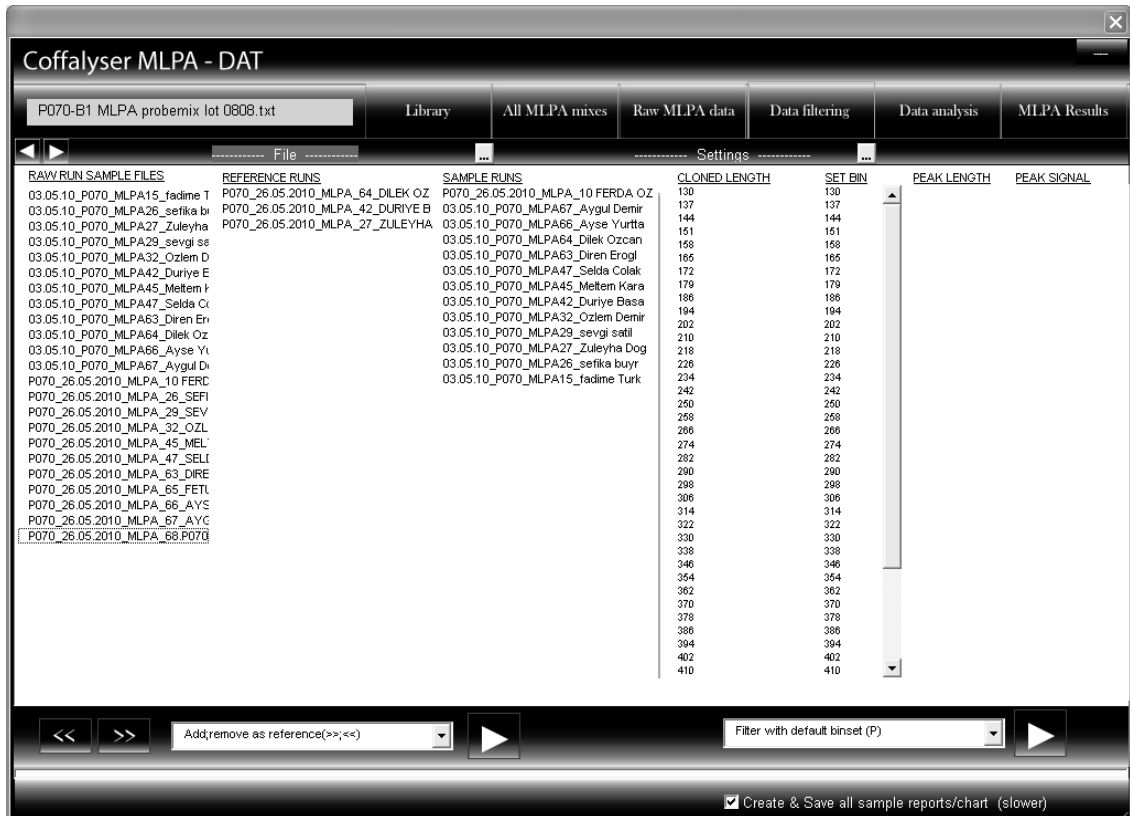
Şekil 3-11: Coffalyser 9.4 aktif miks için pik kontrol ekranları



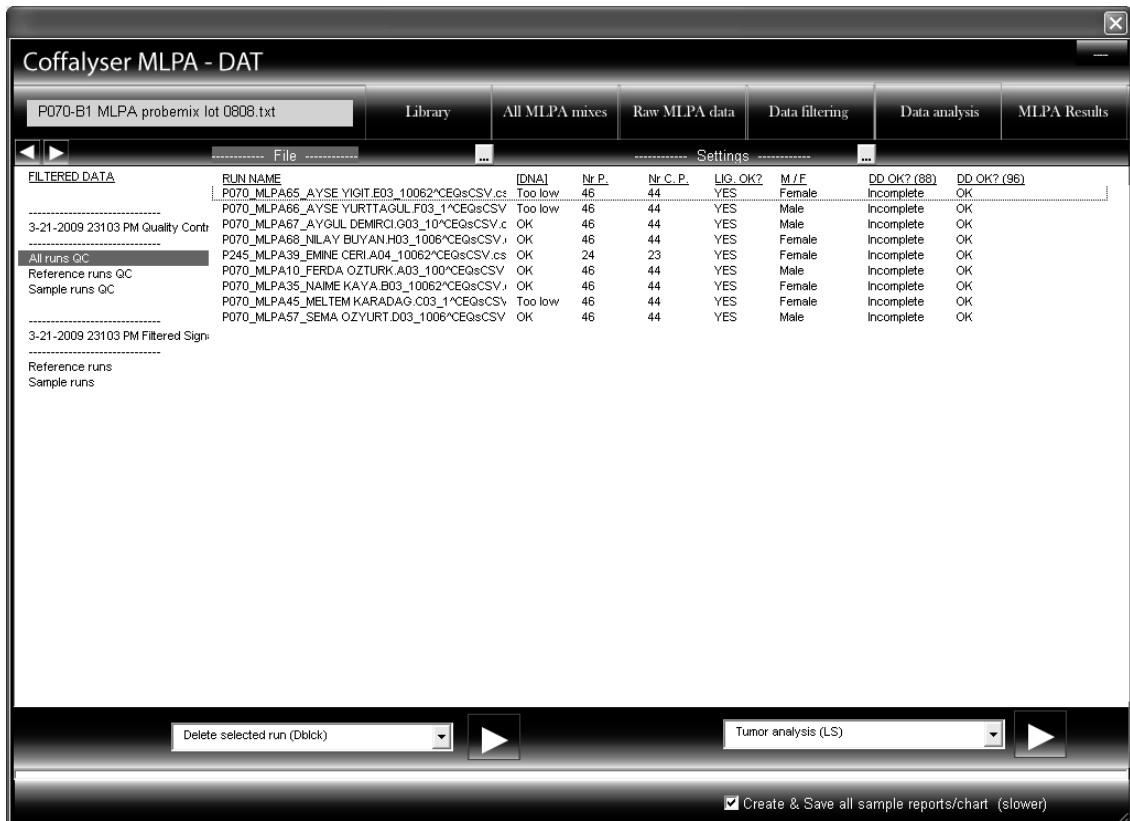
Şekil 3-12: Coffalyser 9.4 olgu yükleme ve olgu pik kontrol ekranı



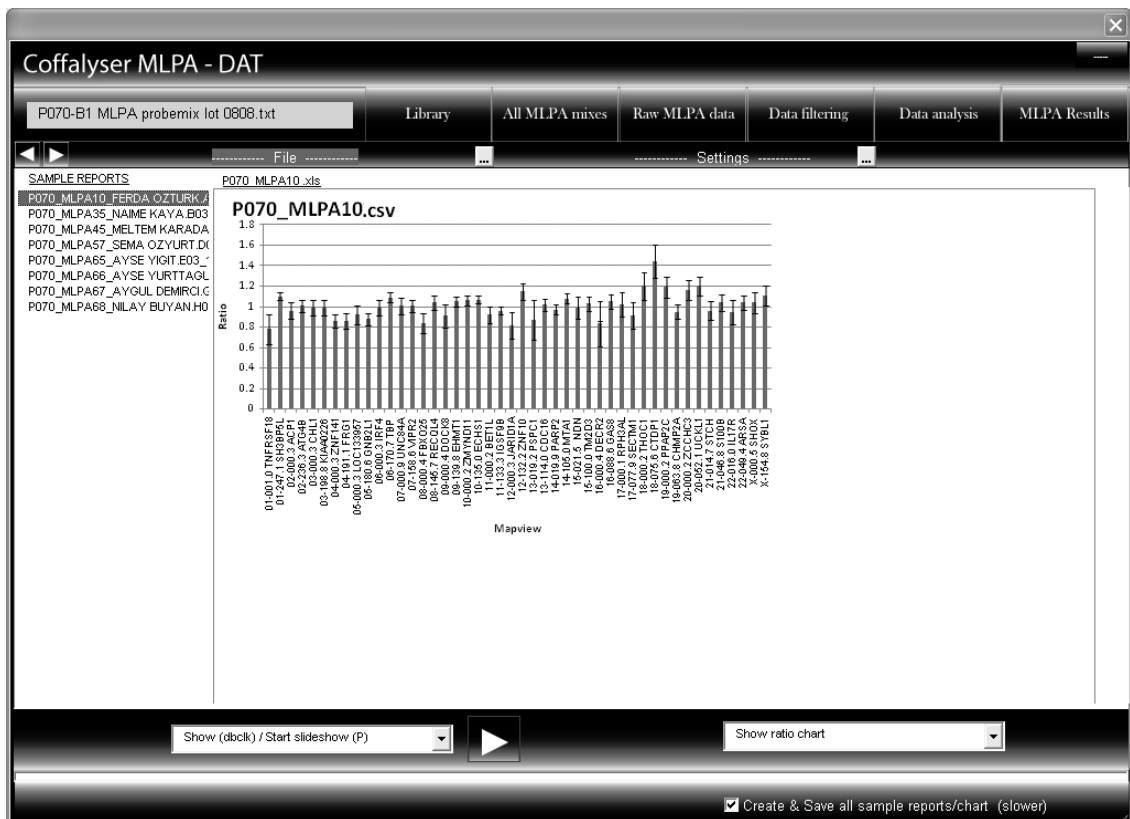
Şekil 3-13: Coffalyser 9.4 analiz seçenekleri ayar ekranı



Şekil 3-14: Coffalyser 9.4 normalizasyon ekranı



Şekil 3-15: Coffalyser 9.4 olgu filtreleme kontrol ekranı



Şekil 3-16: Coffalyser 9.4 sonuç inceleme grafik bar ekranı

3.2.4. FISH Çalışmaları

3.2.4.1. Örnek hazırlanması

Sitogenetik çalışmalar sonrasında saklanmış olan fiksatifli hücre diplerinden lamlara yayma yapılarak uygun kalitede preparatlar hazırlanır. Preparatlar 2' şer dakika 2xSSC, %70 etil alkol, %85 etil alkol ve %100 etil alkol çözeltilerinde bekletildikten sonra kurutulur.

3.2.4.2. Prob hazırlanması

Subtelomerik problemler için 1µl prob, 2 µl distile su ve 7 µl hibridizasyon solüsyonu ile karıştırılarak hazırlanır.

3.2.4.3. Denatürasyon ve hibridizasyon

Hazırlanan problemler lamlara koyularak lamel koyulur, kapatılır ve lamelin çevresi yapıştırıcı ile kapatılır. Lamlar 73°C' de 3 dakika kodenatürasyona koyulur ve 16 saat hibridize edilir.

3.2.4.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar

16 saat sonrasında yapıştırıcı ve lameller çıkarılır. Lamlar 2xSSC solüsyonunda 72°C' de 1,5 dakika, oda ısısında 0,4xSSC +0.05 Tween 20 solüsyonunda 30sn yıkanır. Havada kurutularak DAPI damlatılır ve lamel ile kapatılır.

3.2.4.5. FISH analizleri

Flouresan mikroskopta DAPI, FITC ve Texas red filtrelerinde incelenerek analiz edilir. İstenilen metafaz ve interfazlar görüntüleme sistemine aktarılır.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Olgulardan 54' ünün subtelomerik FISH çalışması Multiprobe® T (Cytocell) probu kullanılarak yapılmış, normal sonuçlanmış idi. Diğer 14 olgunun subtelomerik FISH çalışması yetersiz metafaz sayısı ve/veya işlem başarısızlığı nedeni ile hiç yapılamamış olmasına rağmen çalışmaya dahil edilmiştir. Olguların 5' inde ultrason bulgusu olarak kardiak anomali bulunması nedeni ile Di George lokus spesifik probu (*TUPLE1*-Cytocell) kullanılarak, 1 olguda Smith Megenis & Miller Diekerloku spesifik probu (*LIS1, FLII*-Cytocell) ile, bir olguda da ileri gebelik haftası nedeni ile kromozom analizi öncesinde 5 kromozom (13, 18, 21 X ve Y/Aneuvysion-Vysis) için hızlı anöplodidi taramasına yönelik interfaz FISH analizleri çalışmaya alınmadan önce yapılmış ve tümü normal sonuçlanmış idi. Bir olguda fetal ultrasonografide hiper ekojen barsak bulgusu nedeni ile, fetal DNA' da kistik fibrozis açısından *CFTR* geni dizi analizi ile taranmış ve mutasyon saptanmamıştır. Kromozom analizleri dahil yukarıda açıklanan testleri yapılmış ve normal sonuçlanmış olgular çalışma grubu olarak seçilmiş ve DNA izolasyonları yapılarak çalışmaya dahil edilmiştir. Bu aşamada olgulardan 1' inin (olgu 34) DNA miktarı yetersiz olduğundan, diğer bir olgu da (olgu 62) MLPA çalışması başlamadan önce dış merkezde yapılan moleküler çalışmada *FGFR3* geninde G1138A mutasyonu saptanması nedeni ile Akondroplazi tanısı kesinleşmiş ve MLPA çalışmasına alınmamıştır. Çalışılan olguların yaş, gebelik haftası, saptanan fetal cinsiyet, kromozom analiz endikasyonu, yapıldı ise FISH çalışmalarının sonuçları, farklı bir test yapıldı ise sonuçları ve çalışılan MLPA kitlerinin sonuçlarının görünümü tablo 4-1 de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 4-1: Çalışmaya alınan olguların dökümü

MLPA NO	YAŞ	GH	ENDİKASYON	Fetal sex	Multiprobe Telomerik FISH	FISH diğer	DİĞER TEST	MLPA P070	MLPA P245
MLPA 1	34	22	PU, KOÖ, ÜT	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 2	26	32	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 3	23	26	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 4	29	19	PU, DT, KOÖ	XX	N	YOK	CF N	N	N

MLPA NO	YAŞ	GH	ENDİKASYON	Fetal sex	Multiprobe Telomerik FISH	FISH diğer	DİĞER TEST	MLPA P070	MLPA P245
MLPA 5	19	24	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 6	36	21	PU, AY	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 7	30	17	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 8	38	22	DT, AY, PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 9	20	21	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 10	35	17	PU, AY, 1. TRİ	XY	N	YOK	YOK	dup CTDPI	N
MLPA 11	36	20	PU, AY	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 12	30	24	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 13	22	19	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 14	26	16	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 15	31	24	PU, AY	XX	N	YOK	YOK	del THOC1	N
MLPA 16	27	28	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 17	28	27	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 18	26	23	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 19	36	24	PU	XY	N	AT-N	YOK	N	N
MLPA 20	34	18	PU	XX	N	YOK	YOK	N	del 7q11.23
MLPA 21	30	35	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 22	21	19	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 23	21	22	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 24	24	29	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 25	33	28	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 26	25	30	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 27	30	32	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 28	35	19	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 29	29	22	PU	XX	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 30	31	18	PU	XY	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 31	27	31	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 32	33	24	PU	XX	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 33	22	22	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 34	29	20	PU	XY	YOK	DGS-N	YOK	YOK	YOK
MLPA 35	22	18	PU, 1. TRİ	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 36	19	21	PU	XY	YOK	DGS-N	YOK	N	N
MLPA 37	25	20	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 38	22	22	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 39	26	23	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 40	24	18	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 41	24	23	PU	XY	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 42	21	28	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 43	22	23	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 44	33	19	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N

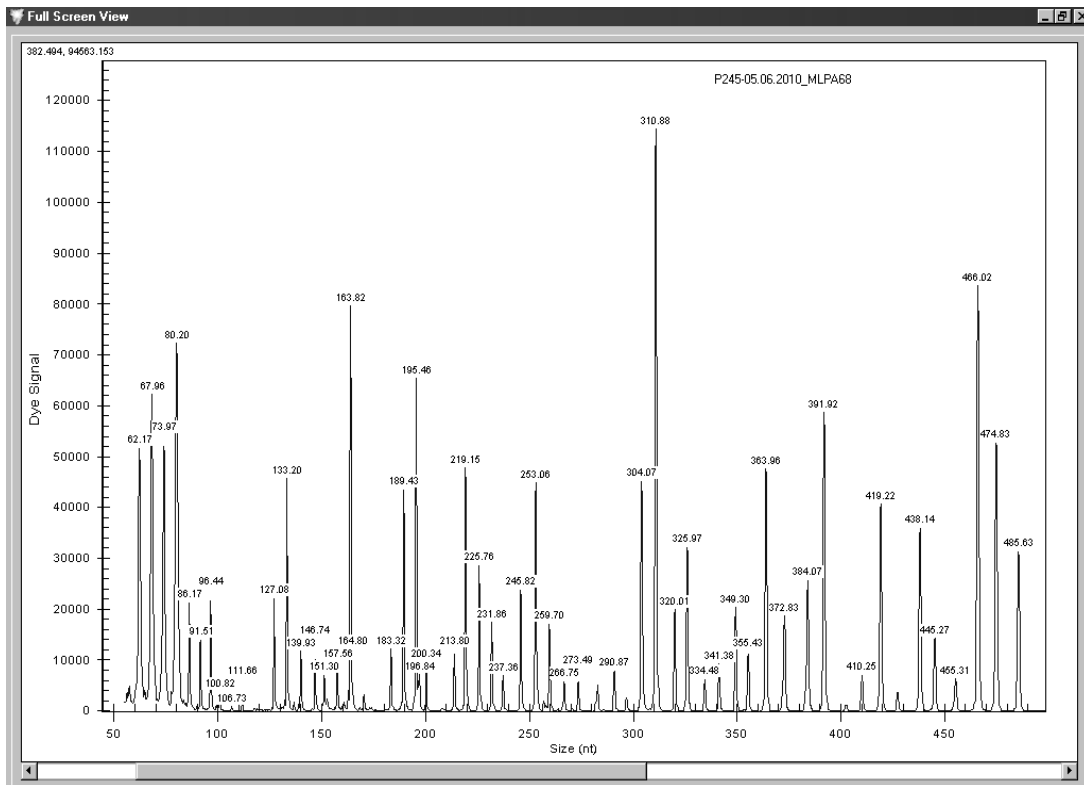
MLPA NO	YAŞ	GH	ENDİKASYON	Fetal sex	Multiprobe Telomerik FISH	FISH diğer	DİĞER TEST	MLPA P070	MLPA P245
MLPA 45	31	25	PU	XY	N	MD/SMS-N	YOK	N	N
MLPA 46	36	21	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 47	35	29	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 48	25	26	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 49	35	27	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 50	31	25	PU	XY	N	DGS	YOK	N	N
MLPA 51	37	20	PU	XY	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 52	22	21	PU	XX	YOK	DGS-N	YOK	N	N
MLPA 53	24	32	PU	XY	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 54	28	18	PU	XX	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 55	34	23	AY, PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 56	26	18	PAT US	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 57	26	35	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 58	32	28	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 59	23	27	PU	XX	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 60	21	27	PU	XX	YOK	YOK	YOK	N	N
MLPA 61	19	29	PU	XX	YOK	DGS-N	YOK	N	N
MLPA 62	35	20	AY, ÜT, PU	XX	N	YOK	YOK	YOK	YOK
MLPA 63	27	16	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 64	30	31	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 65	30	26	PU	XX	YOK	DGS-N	YOK	N	N
MLPA 66	43	27	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 67	31	22	PU	XY	N	YOK	YOK	N	N
MLPA 68	31	30	PU	XX	N	YOK	YOK	N	N

N: Normal GH: Gebelik haftası, AY: İleri anne yaşı, PU: patolojik ultrasonografi bulgusu, DT: Dörtlü tarama testinde yüksek risk, ÜT: Üçlü tarama testinde yüksek risk, 1. TRI: 1. Trimester tarama testinde yüksek risk, KOÖ: Kötü obstetrik öykü, DGS: Di George Sendromu, MS/SMS: Miller Dieker/Smith Megenis sendromu, CF: Kistik Fibroz, AT-N: Hızlı aneuploididi taraması-normal

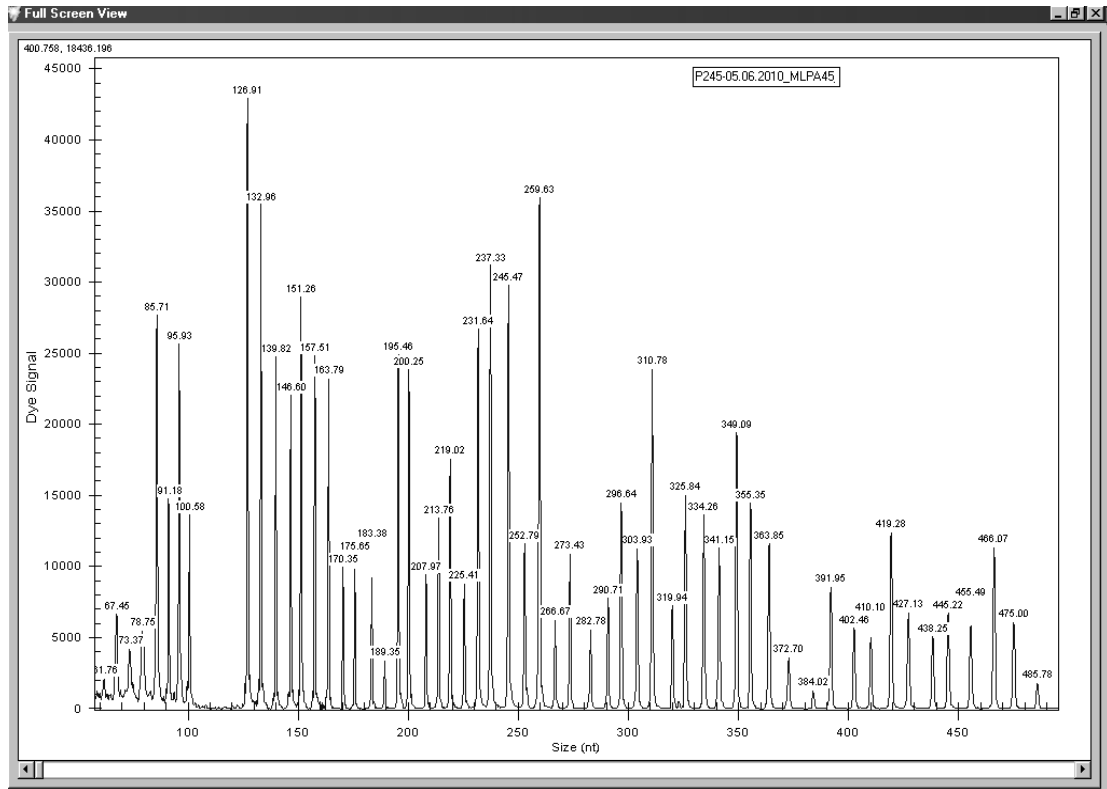
4.2. MLPA İNCELEMELERİ

MLPA çalışması sırasında DNA kalitesi ve miktarının test sonuçlarını değerlendirilmesinde oldukça etkin olduğu görüldü. Bu olgularda alkol çöktürmesi ile DNA saflaştırılması ve DNA miktarında yapılan değişiklikler ile kalite piklerinin düzelmesi ve genel pik şiddetinin optimal seviyelere gelmesi sağlandı. Veri analizlerinde 0.65 ile 1.35 aralığında kalan pik oranları normal olarak kabul edildi ve 0,65 ile 0,5 arasında kalan olgular için olası delesyon, 0,5' in altında kalan olgularda kesin delesyon ve 1,35 ile 1,5 arasında kalan olgular için olası duplikasyon ve 1,5' in üzerinde bulunan

olgular kesin duplikasyon olarak değerlendirildi. Kesin ve olası delesyon/duplikasyon gösteren olguların testleri tekrar edildi, ayrıca bu pikler tüm kontrol ve test olgularında genel pik şiddet ve yapıları ayrıntılı incelendi. Tekrarlanan çalışmada aynı kalıbı gösteren olgular doğrulama çalışmasına alındı. Kontrol piklerinin fragman analizinde incelenmesi sonrası bazı olguların DNA denatürasyon pikleri ve DNA miktar piklerinin şiddetinin düşük olması nedeni ile bu olgularda önce kullanılan DNA miktarı arttırıldı ancak sonuçlarda bir düzelme görülmedi (Şekil 4-1, Şekil 4-2). Etil alkol çöktürmesi ile DNA'lar saflaştırıldı ancak bazı olgularda kontrol piklerinin halen düzelmediği görüldü. Yüksek miktarda DNA kullanımının izolasyon işlemi ve elüsyon tamponları ile ortama eklenen tuz konsantrasyonunu arttırdığı, bunun da DNA denatürasyonunu etkilediği üretici firmanın uygulama notlarında da bildirilmektedir. Bu nedenle bazı olgularda bu işlem sonrasında kontrol piklerinde düzelme olmaması nedeni ile tekrarlanan işlemde daha az miktarda DNA kullanımının kalite piklerinin ve sinyal kalitesinin artmasını sağladığı görüldü.



Şekil 4-1: Kötü DNA kalitesi nedeni ile yetersiz pik görünümü veren olgu örneği



Şekil 4-2: Denatürasyon azlığı nedeni ile yetersiz pik görünümü veren olgu örneği

4.2.1. Subtelomerik Bölge Prob Seti Değerlendirme Sonuçları

Subtelomerik bölge prob seti (SALSA P070) ile toplam 66 olgu çalışıldı. Bir olguda (olgu 10) 18. kromozom uzun kolu subtelomerik bölge *CTDPI* lokusunda duplikasyon saptandı. Bir olguda (olgu15) ise 18. kromozom kısa kolu *THOC1* lokusunda delesyon saptandı. Anormal sonuç saptanan bu iki olguda ve kalite pikleri ile denatürasyon piklerinde anormallik saptanan olgularda işlemler tekrar edildi.

4.2.2. Sendromik Bölge Prob Seti Değerlendirme Sonuçları

Sendromik bölge prob seti (SALSA P245) ile toplam 66 olgu çalışıldı. Bir olguda (olgu 20) 7. kromozom uzun kolu 11.23 bandında bulunan *ELN* ekson 1, ekson 20 ve *LIMK* gen lokusunda (Williams Sendrom bölgesi) delesyon saptandı. Anormal sonuç saptanan bu olguda ve kalite pikleri ile denatürasyon piklerinde anormallik saptanan olgularda işlemler tekrar edildi.

4.2.3. Doğrulama çalışmaları

MLPA çalışmasında subtelomerik delesyon ve duplikasyon ve sendromik delesyon saptanan üç olguda doğrulama amaçlı FISH çalışmaları yapıldı. 18. kısa kolu subtelomerik delesyonu saptanan olguda (olgu 15) sitogenetik çalışma sonrasında multitelomerik FISH (Cytocell) ile normal sonuç alınmış olması MLPA çalışması ile uyumsuz bulundu. Olgunun saklanmış olan hücre dip materyalinde 18p subtelomerik probu (Vysis) ile tekrarlanan FISH çalışmasında delesyon gösterilerek MLPA ile saptanan delesyon doğrulandı. Bu olguda daha önce yapılan multitelomerik FISH çalışmasında hücre sayısı ve/veya tekniğe bağlı yetersizlik nedeni ile yanlış negatif sonuç alındığı anlaşıldı.

18. kromozomun uzun kolu subtelomerik bölge *CTDPI* lokusunda MLPA ile saptanan duplikasyon için olgunun sitogenetik çalışma sonrası saklanmış olan hücre dip materyalinde 18q subtelomerik probu (Vysis) ile yapılan FISH çalışmasında metafaz ve interfaz nukleuslarında duplikasyon gösterilemedi. Bu duplikasyonun FISH çalışması ile saptanabilecek büyüklükte ya da pozüsyonda olmaması olasılığı nedeni ile olgu DNA örneği Affimetrix firması Türkiye temsilcisine gönderilerek Affimetrix Cyto2.7 çipi ile aCGH çalışmasına alındı ve “Chromosome Analysis Suite” programında yapılan veri analizleri sonrasında MLPA da saptanan *CTDPI* lokus duplikasyonu doğrulandı. Dizin çalışmasında 18q23 bandında *CTDPI* geninin büyük bir bölümünü içine alan yaklaşık 75 kb büyüklüğünde bir bölge için tetrazomi varlığı gözlemlendi (Şekil 4-3)

7. kromozom uzun kolu 11.23 bandında bulunan Williams Sendromu lokusunda delesyon saptanan olguda (olgu 20) *ELN* gen lokus probu (Cytocell) ile yapılan FISH çalışmasında delesyon doğrulandı.

4.2.4. Olguların Demografik, Klinik Bilgileri ve Sonuçları

Olguların klinik bilgileri, SALSA P070 ve P245 prob setleri ile yapılan MLPA çalışmalarının sonuçları, pik analiz sonuç grafikleri, anormal sonuçlanan olgularda

yapılan doğrulama çalışmaları ve çalışmalara ait fotoğraflar, olgu sırasına göre aşağıda verilmiştir.

OLGU 1

Demografik bilgiler;

Anne yaşı: 34, gebelik haftası: 22, 1,5° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik Ultrason bulgusu, Üçlü testte 1:203 trizomi 21 riski, Kötü obstetrik öykü (1 gebelik kaybı, 2 intrauterin ölüm, 1 zihinsel özürlü 8 yaşında çocuk öyküsü)

Ultrason Bulguları: Sağda tek taraflı borderline ventrikülomegali

Uygulanan Girişim: Amniosentez

Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

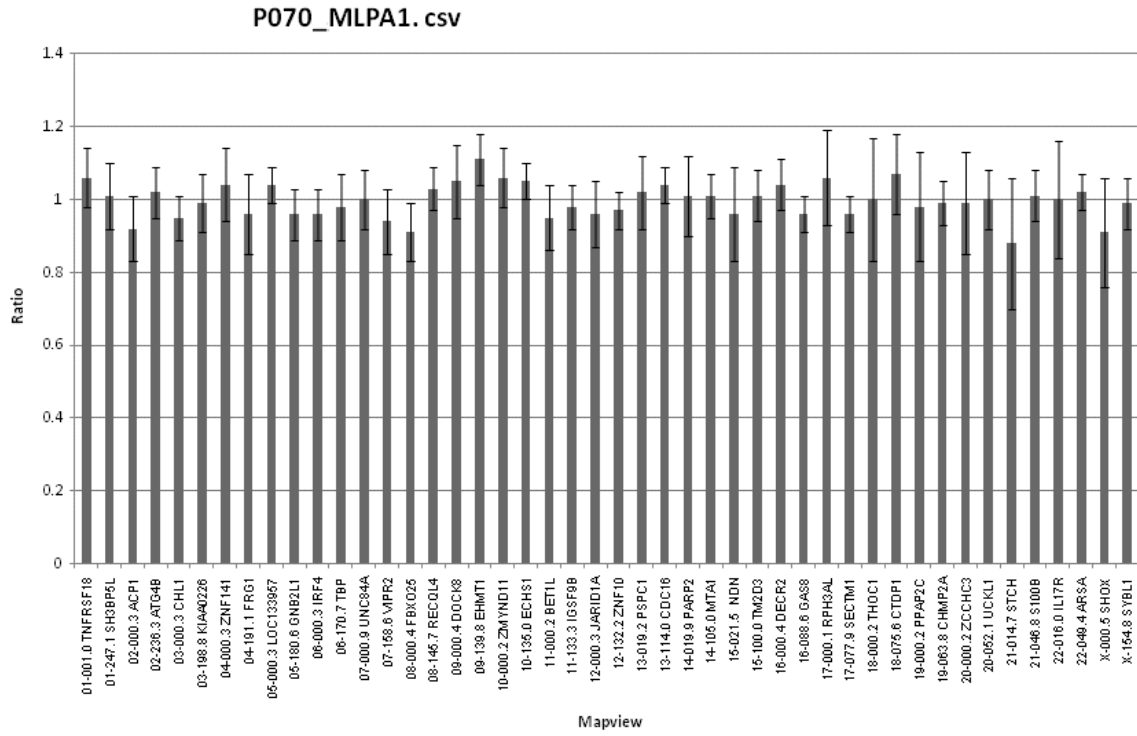
DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

İzlem: 2 günlükken yapılan kranial USG normal sonuçlanmış,

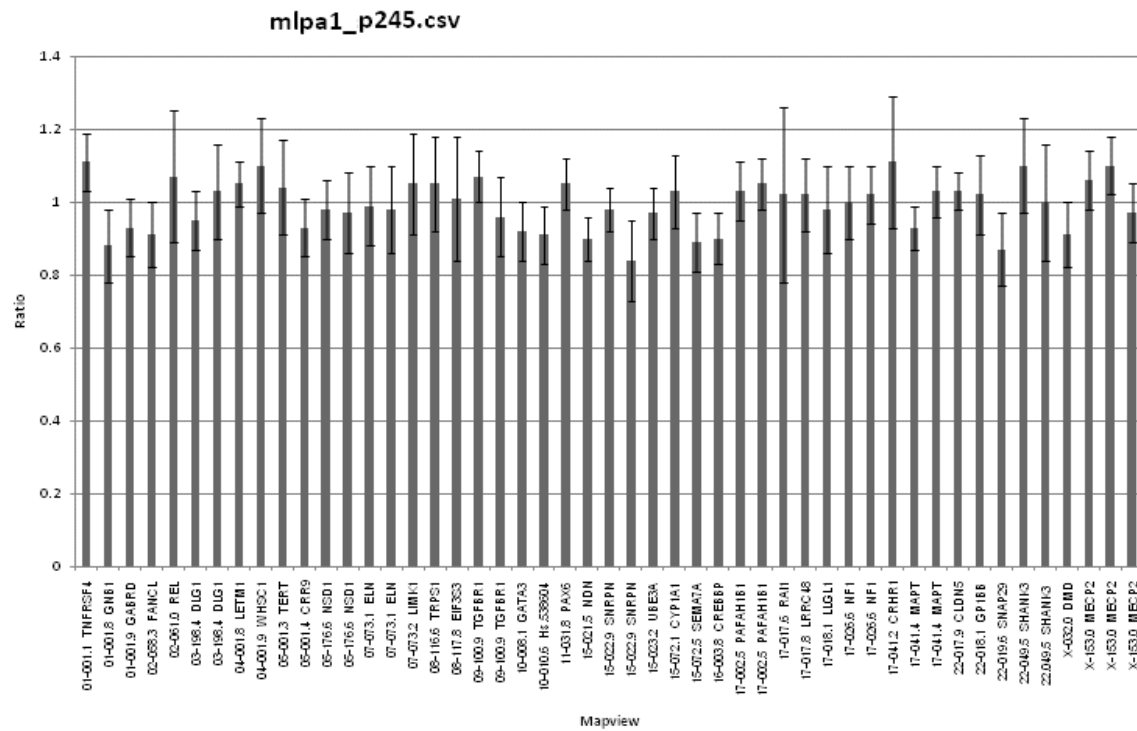
8 aylıkken West sendromu klinik tanısı almış,

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-1: Olgu 1' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-2: Olgu 1' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 2

Demografik bilgiler;

Anne yaşı: 26 , gebelik haftası: 32, 1,5° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik Ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları:İntrauterin gelişme geriliği, tek umbilikal arter

Yapılan Girişim:Fetal kan örneklemesi

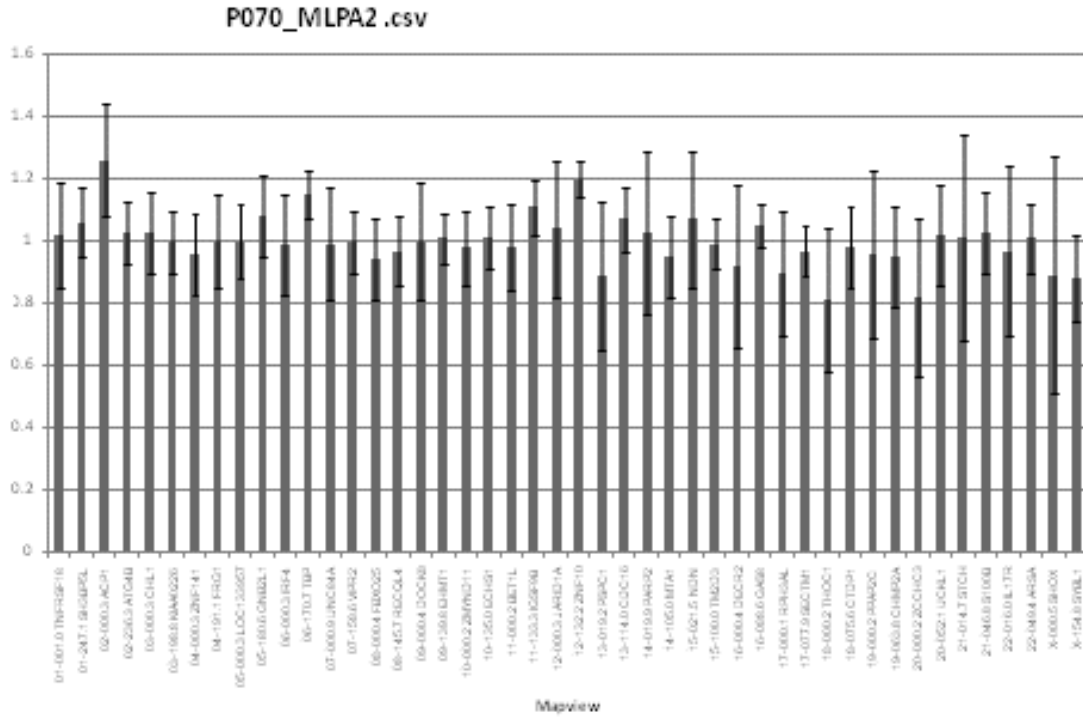
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı:Fetal kan kültürü

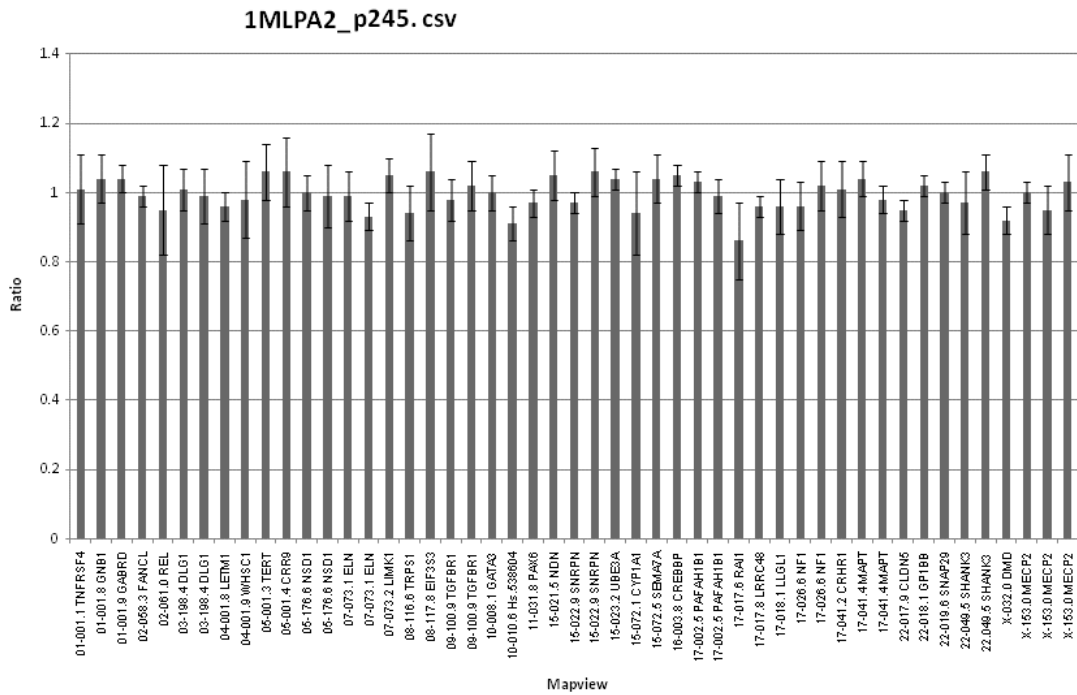
İzlem:-

MLPA Sonucu;mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-3: Olgu 2' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-4:Olgu 2' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 3

Demografik bilgiler;

Anne yaşı: 23, gebelik haftası:26, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, üçlü testte 1:190 trizomi 21 riski

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, sağ uterin arterde notch, umbilikal arterde end diastolik akım kaybı, amniyotik sıvı volümü normal, mesane dilatasyonu, masanede aralıklı çıkış obstrüksiyonu?

Uygulanan Girişim:Fetal kan örneklemesi

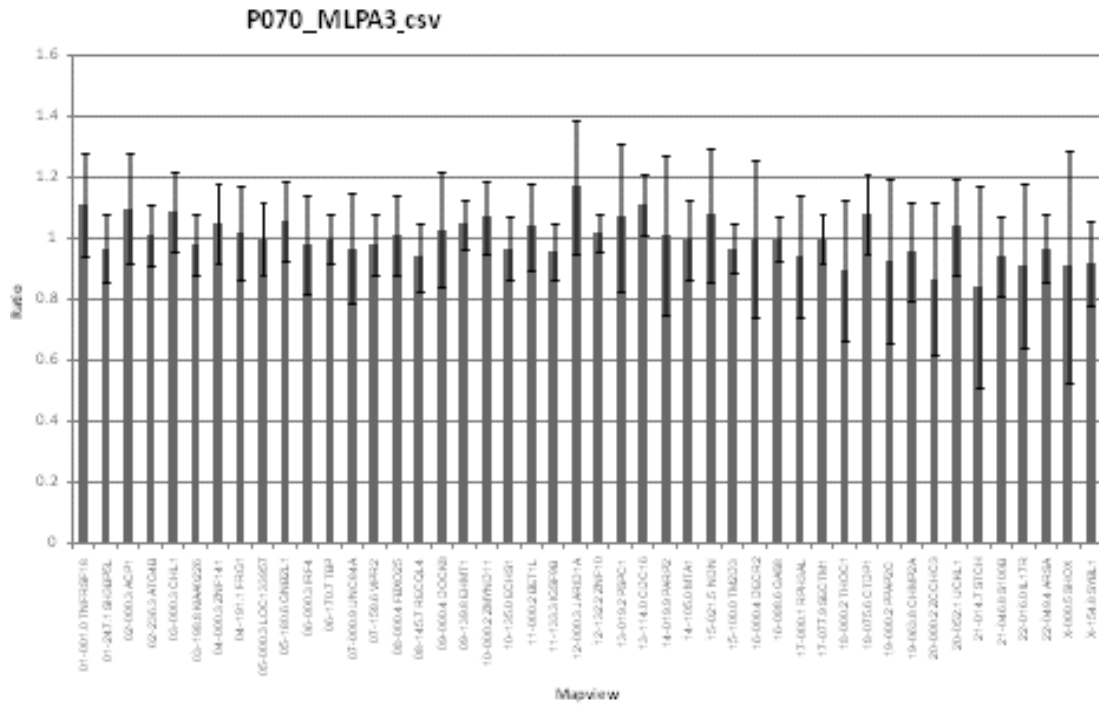
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kan örneği

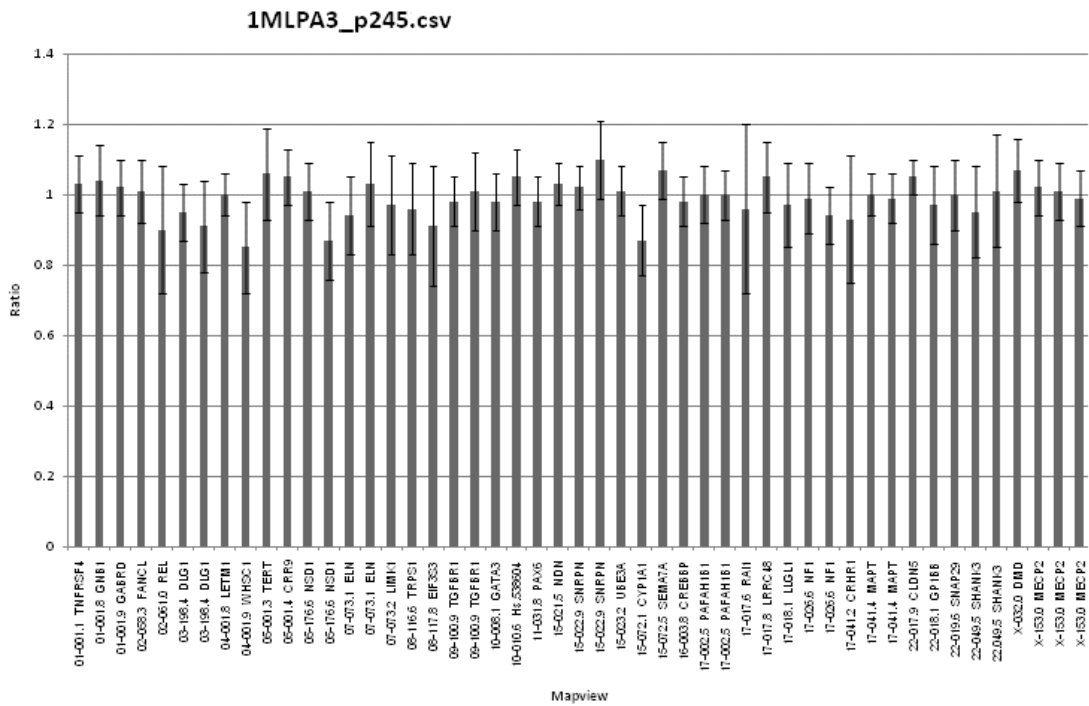
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-5: Olgu3 ‘ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-6: Olgu3 ‘ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 4

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:29, gebelik haftası:19, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, dördünlü testte 1:20 trizomi 21 riski

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, hiperekojen barsak, plasental eski kanama odakları

Uygulanan Girişim: Amniosentez

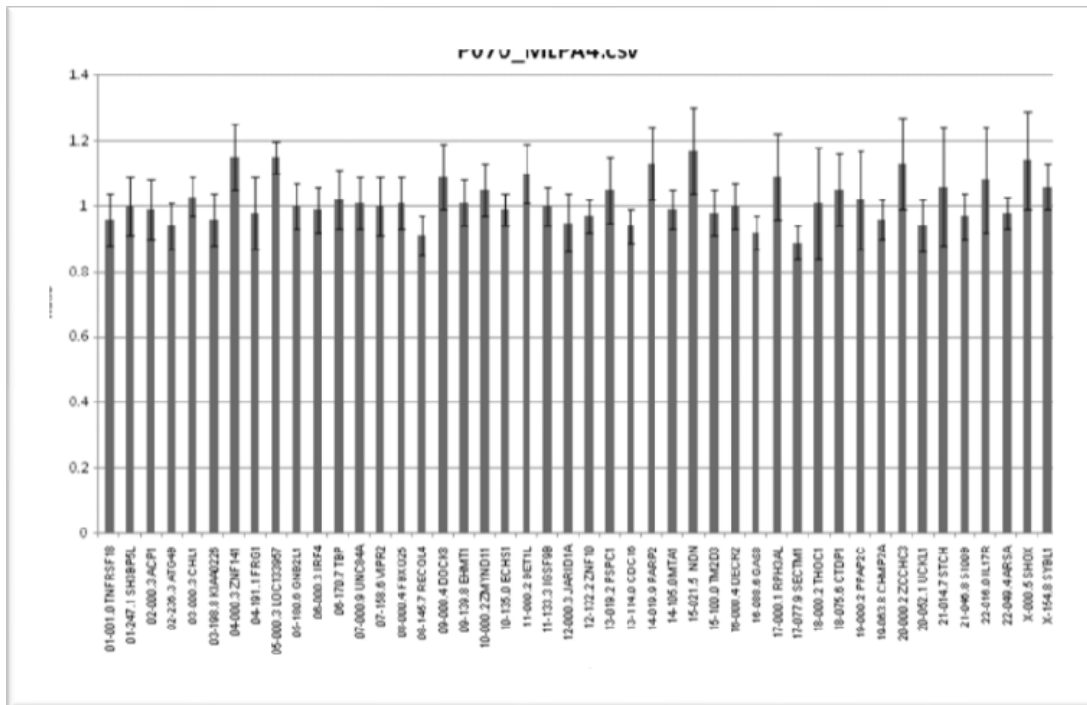
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

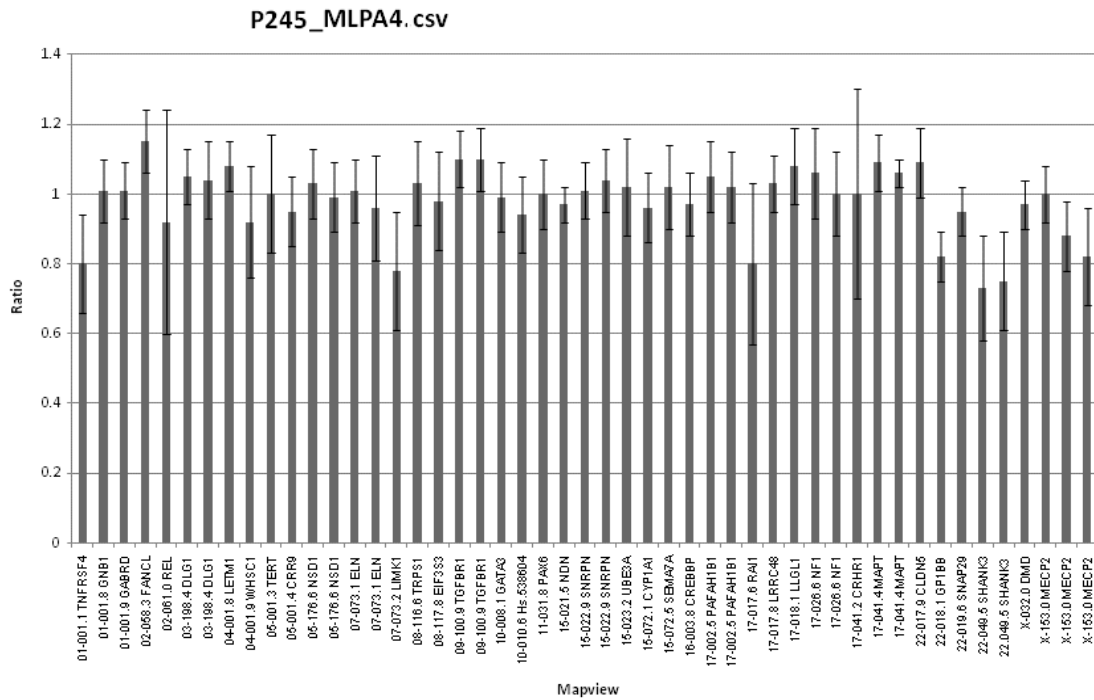
İzlem: Doğum sonrası muayenede normal muayene bulguları

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-7: Olgü4 ‘ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-8: Olgu4 ‘ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 5

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:19, gebelik haftası:24, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Serebellar hipoplazi, retro-mikrognati, sağ ayakta rocker bottom, solda talipes, üst üste binmiş el parmakları, polihidramnios

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

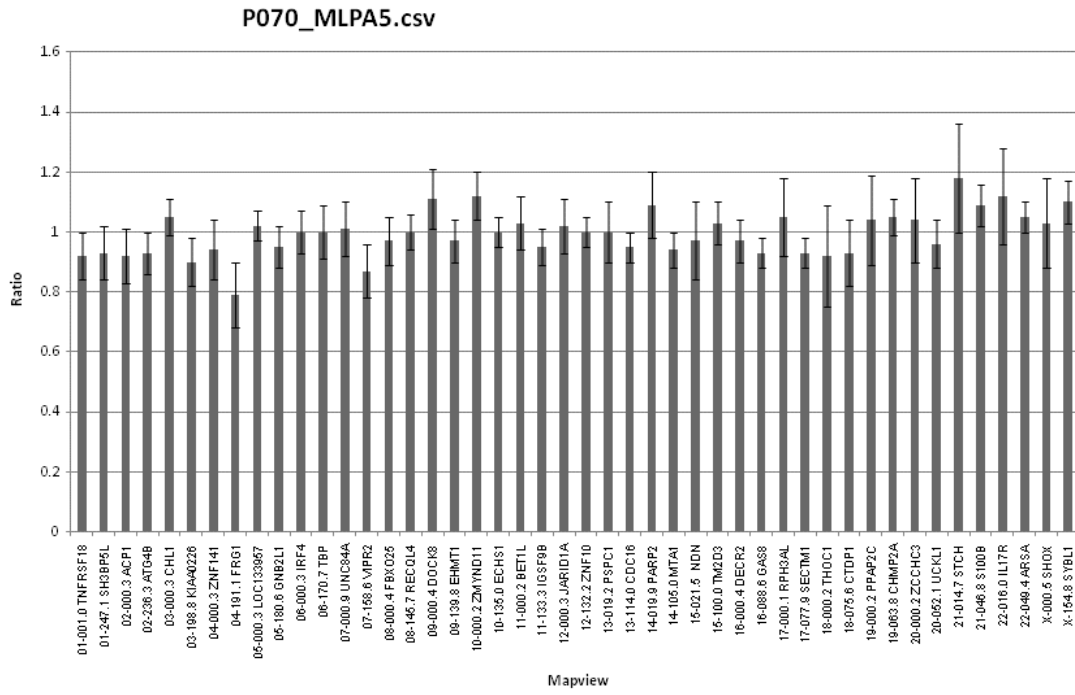
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kan kültürü

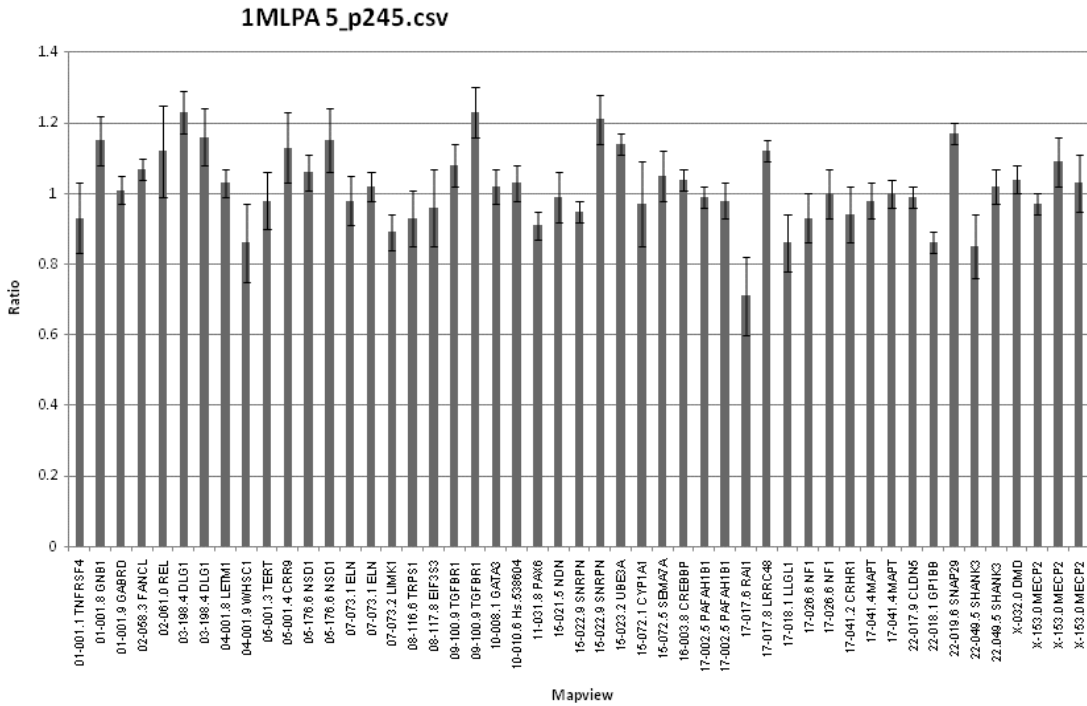
İzlem: Tahliye sonrası muayenede retro-mikrognati, her iki elde 4. parmakta kamptodaktili, sol ayak rocker bottom , sağ ayakta talipes saptanmış.

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-9: Olgu5 ‘in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-10: Olgu5 ‘in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 6

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:36, gebelik haftası:20, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği ve triventriküler hidrosefali (Monokoryonik, diamniotik ikiz gebelik, diğer ikizde normal ultrason bulguları)

Uygulanan Girişim:Amniosentez

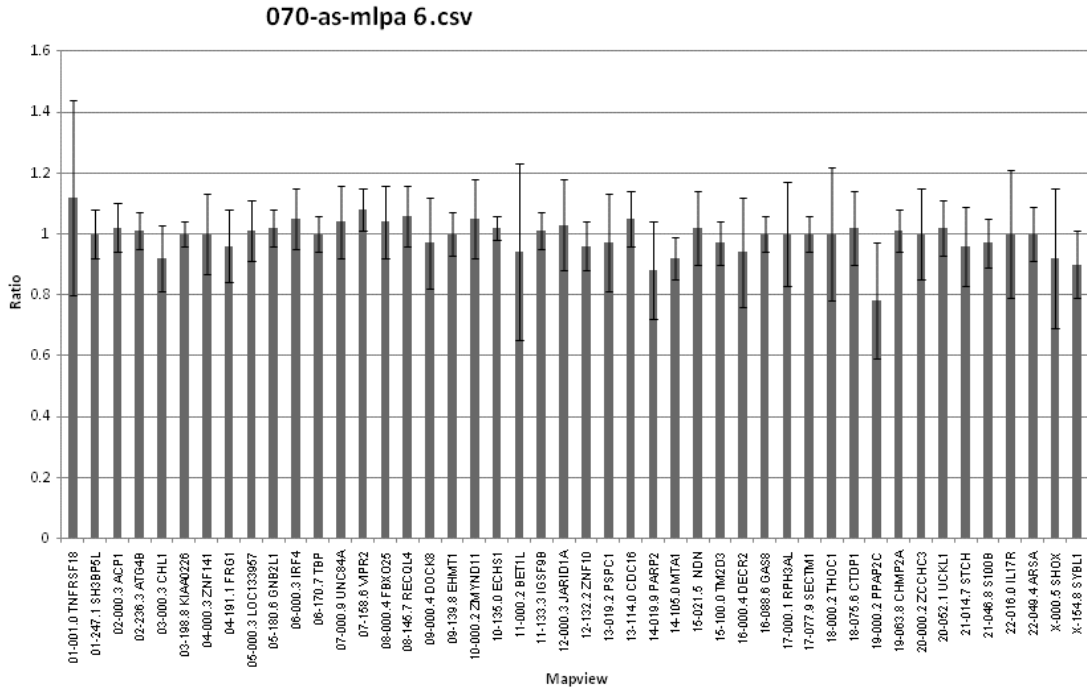
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

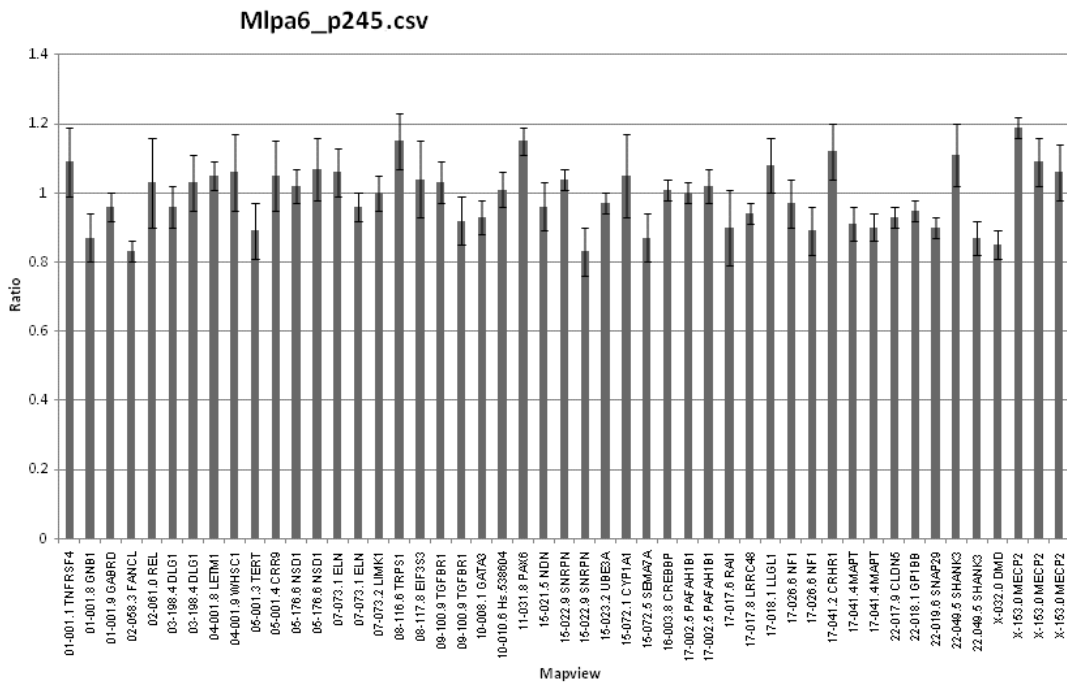
İzlem:Tahliye sonrası muayenede; hidrosefali olan fetus da her iki el bilateral 5. parmak klinodaktilisi ve antevert burun delikleri saptanmış

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-11: Olgu 6 ‘nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-12: Olgu 6 ‘nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 7

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:30, gebelik haftası:17, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Ventrikülomegali (Hidrosefali)

Uygulanan Girişim: Amniosentez

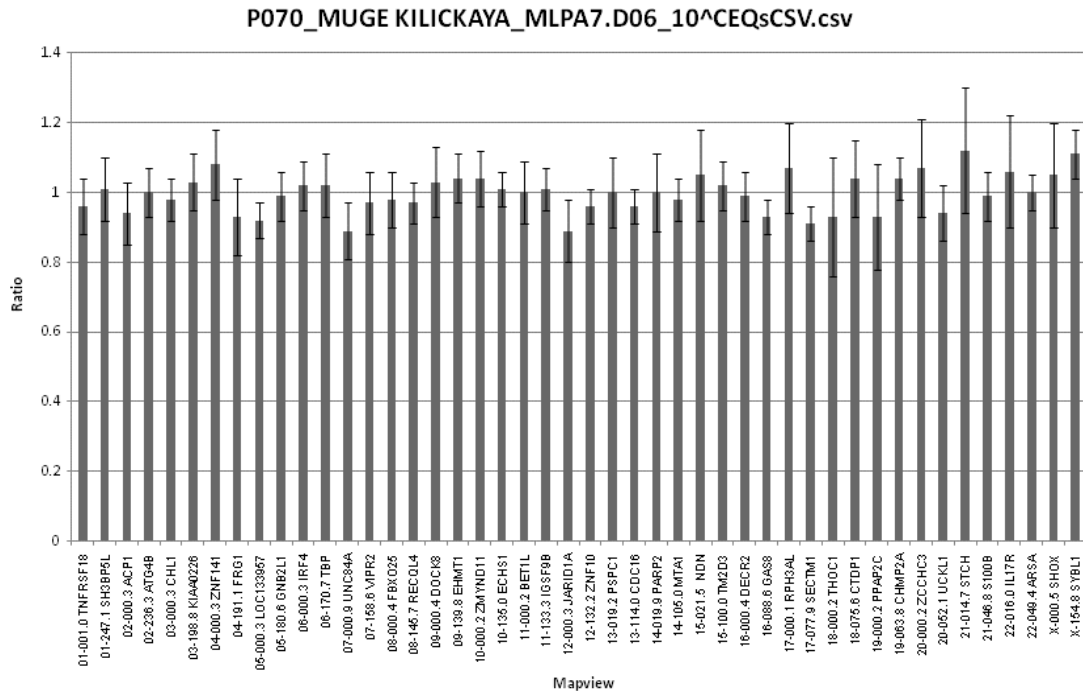
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

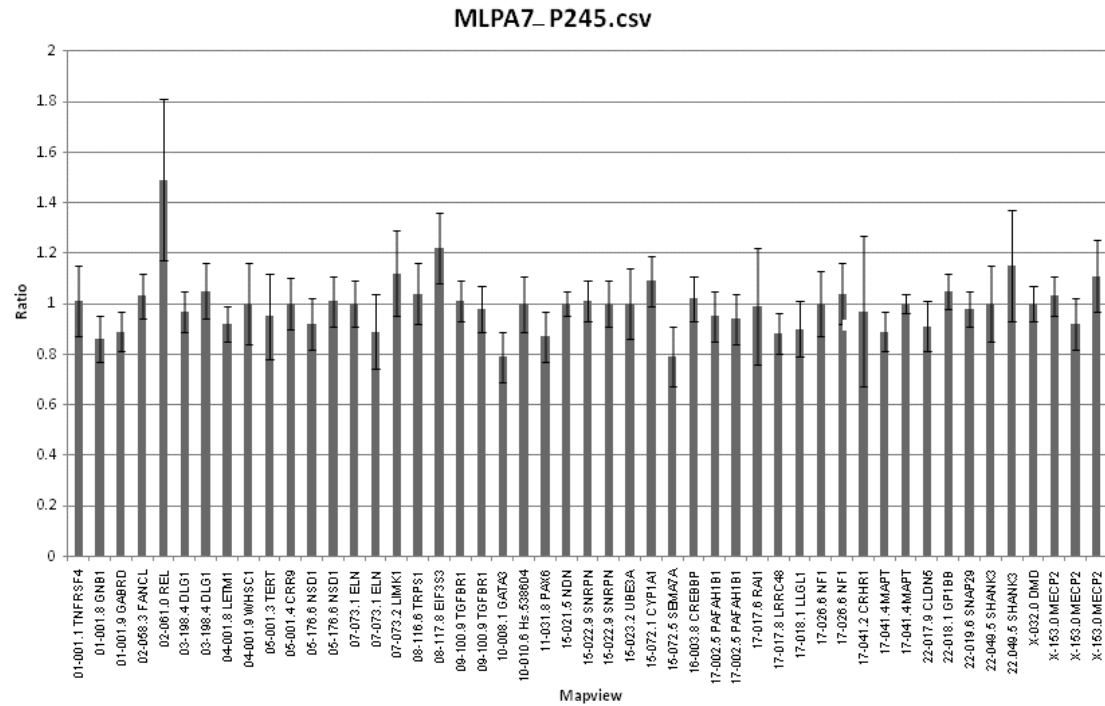
İzlem: Tıbbi tahliye edilen fetus muayeneye getirilmemiş

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-13: Olgu 7 ‘nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-14: Olgu 7 ‘nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 8

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:38, gebelik haftası:22, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, dörtlü testte 1:100 trizomi 21 riski, ileri anne yaşı

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

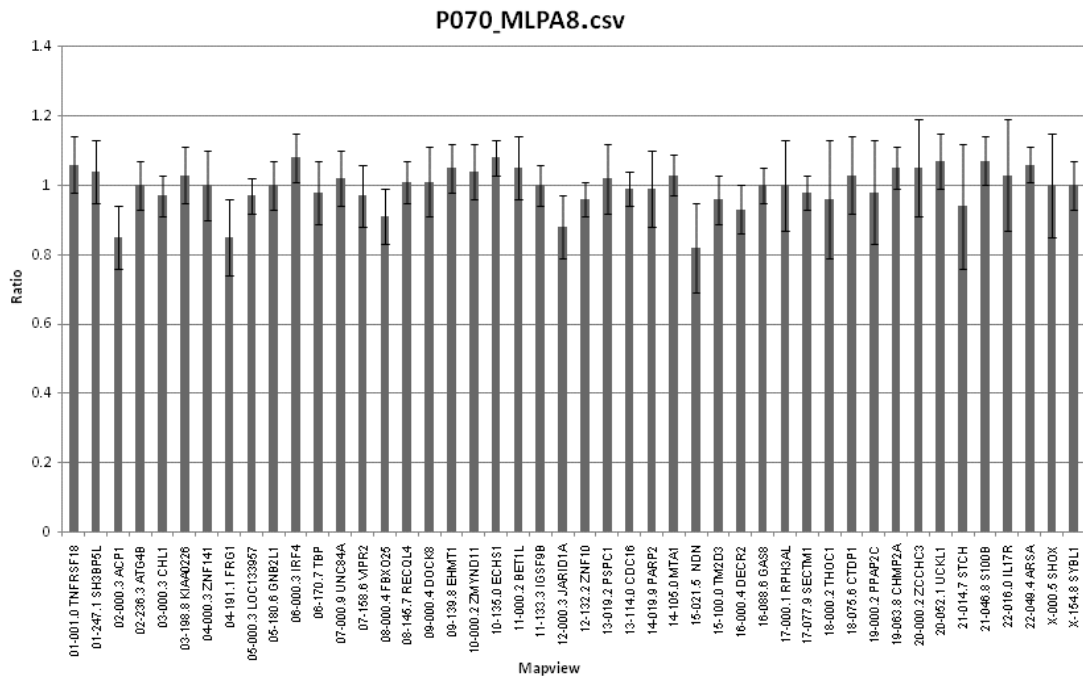
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kan kültürü

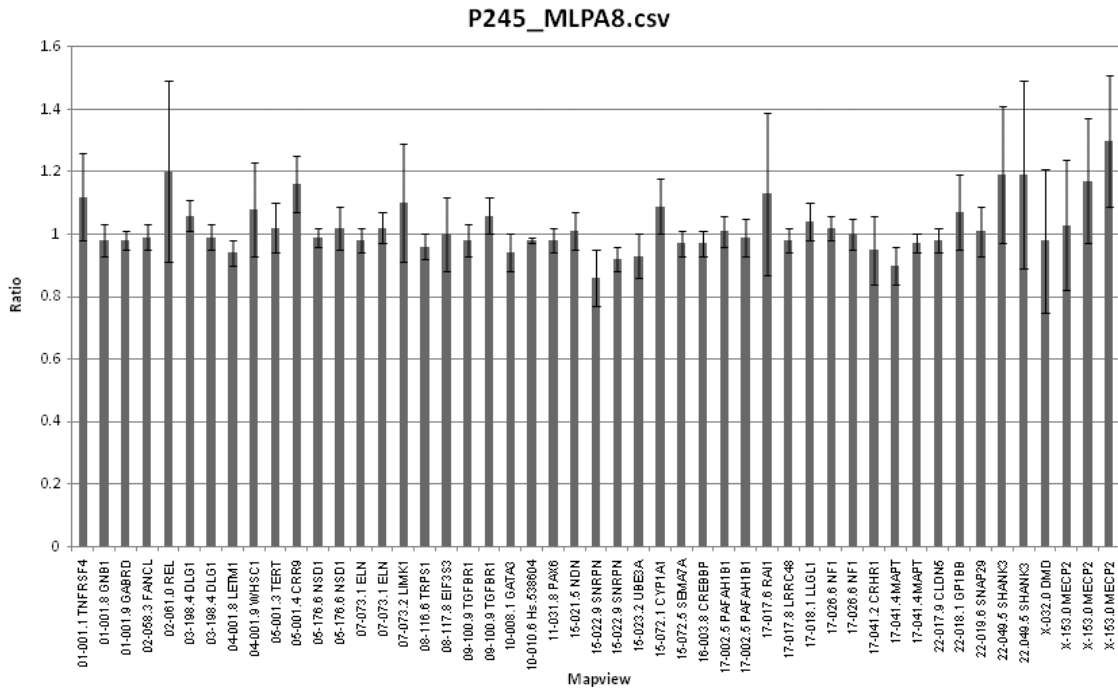
İzlem:-

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-15: Olgu 8' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-16: Olgu 8' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 9

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:20, gebelik haftası:21, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Tetra ventriküloomegali (hidrosefali), mega sisterna magna, tek umbilikal arter, kardiak hiperekojen odak

Uygulanan Girişim: Amniosentez

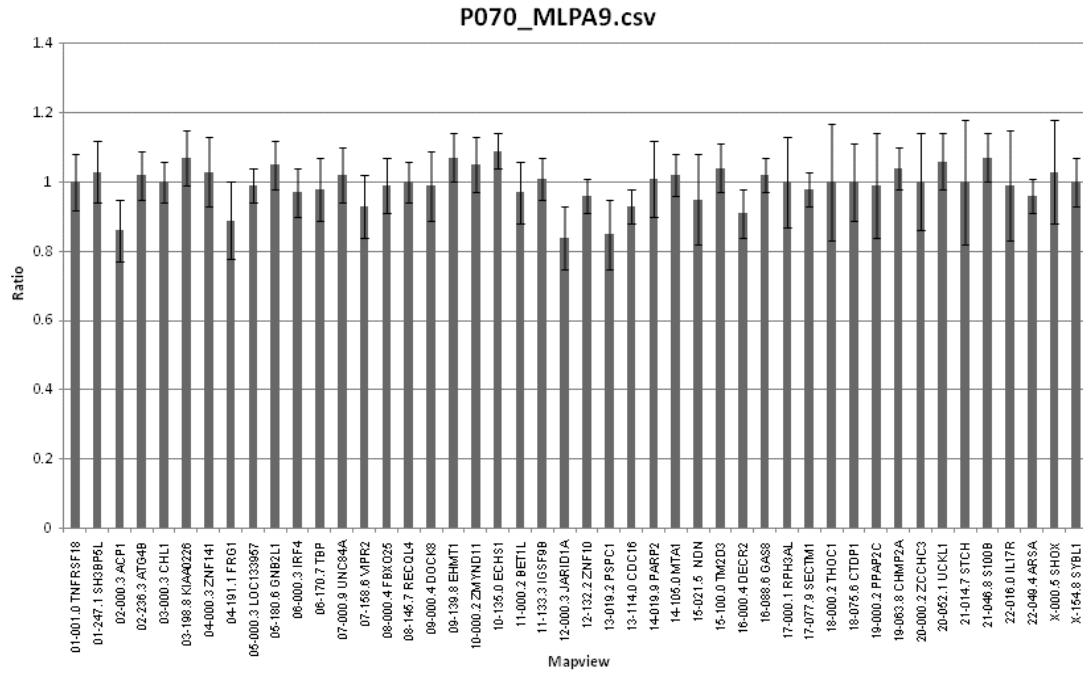
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücreleri (kültür)

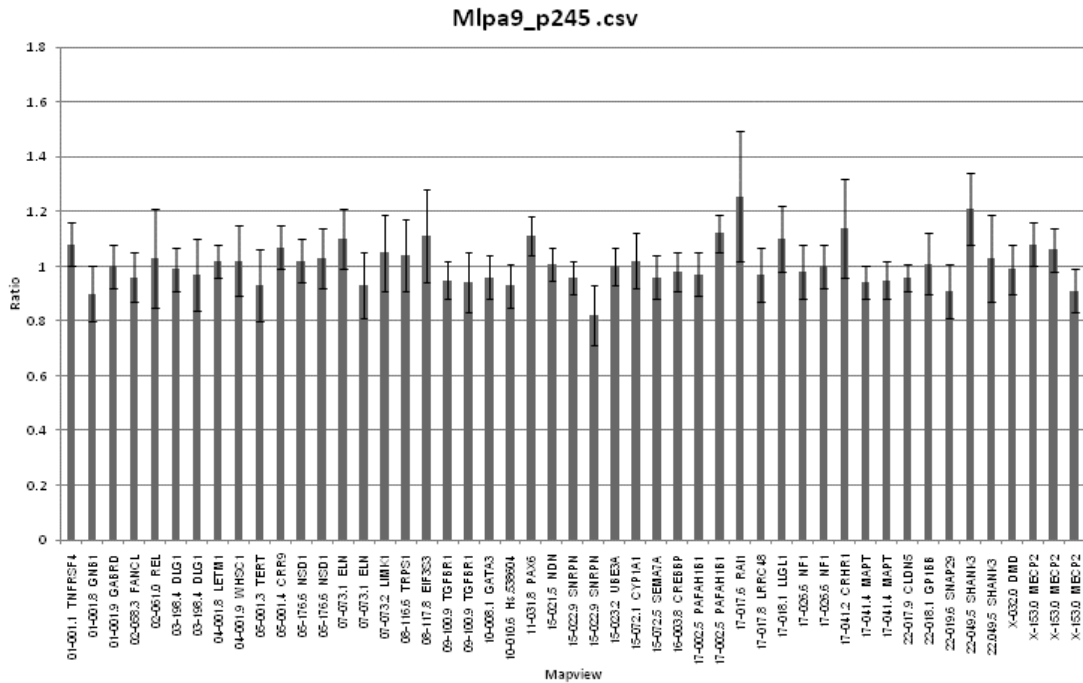
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-17: Olgu 9' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-18: Olgu 9' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 10

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:35, gebelik haftası:17, 1° kuzen akraba evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, ikili testte 1:50 trizomi18 riski, ileri anne yaşı

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, diyafragma hernisi

Uygulanan Girişim: Amniosentez

Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücreleri (kültür edilmemiş)

İzlem:34. Gebelik haftasında sezeryan ile doğan hasta 4 günlükken diyafragma hernisi nedeni ile opere edilmiş ve postoperatif dönemde eks olmuş.

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2, 18q subtel (P245)x3

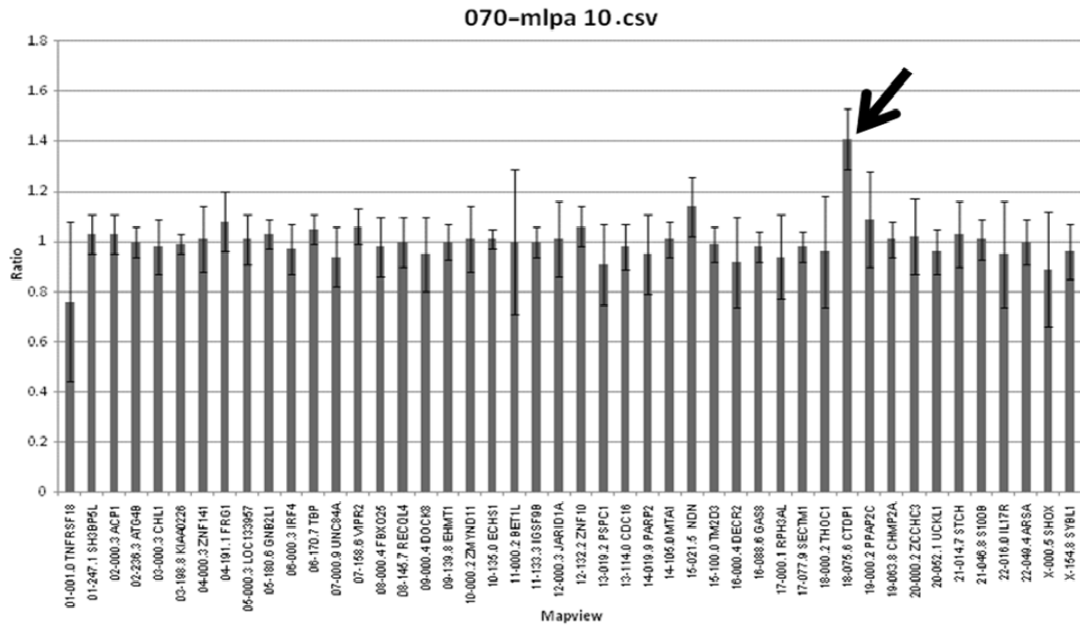
(SALSA P070 ile normal sonuç, SALSA P245 ile 18q subtelomerik duplikasyon)

Dizin Sonucu: arr 18q23(75.516.228-75.590.562*)x4

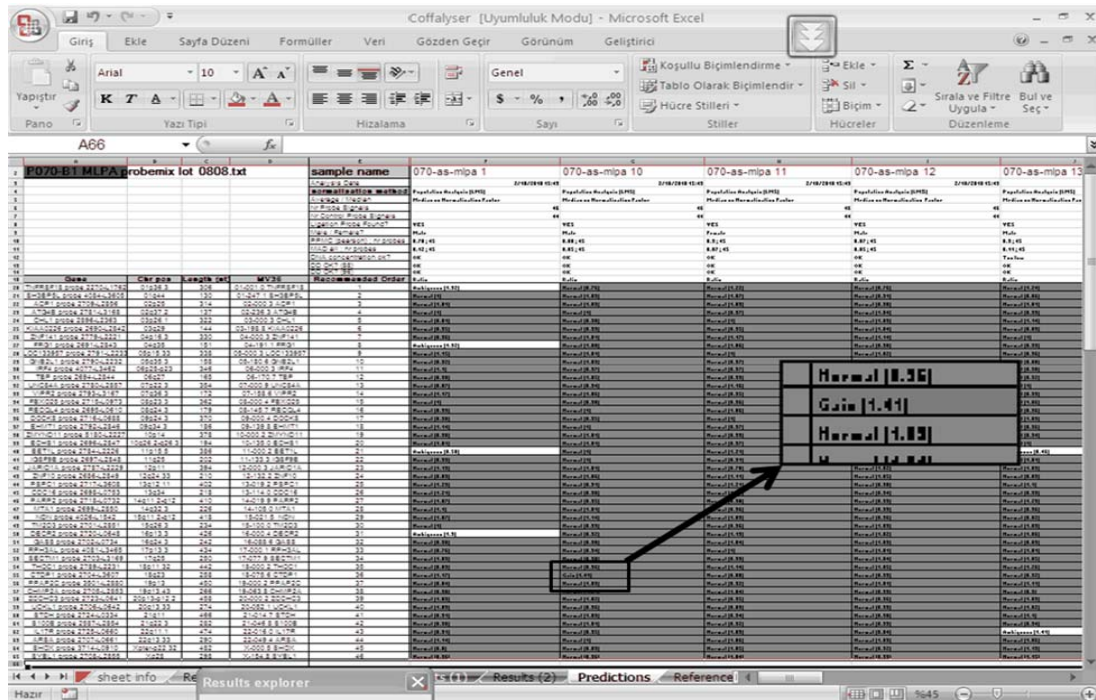
(18q23' de ~75 kb'lık bir bölge için tetraallelik kalıtım)

*Mart 2006 (NCBI36/hg18) assembly

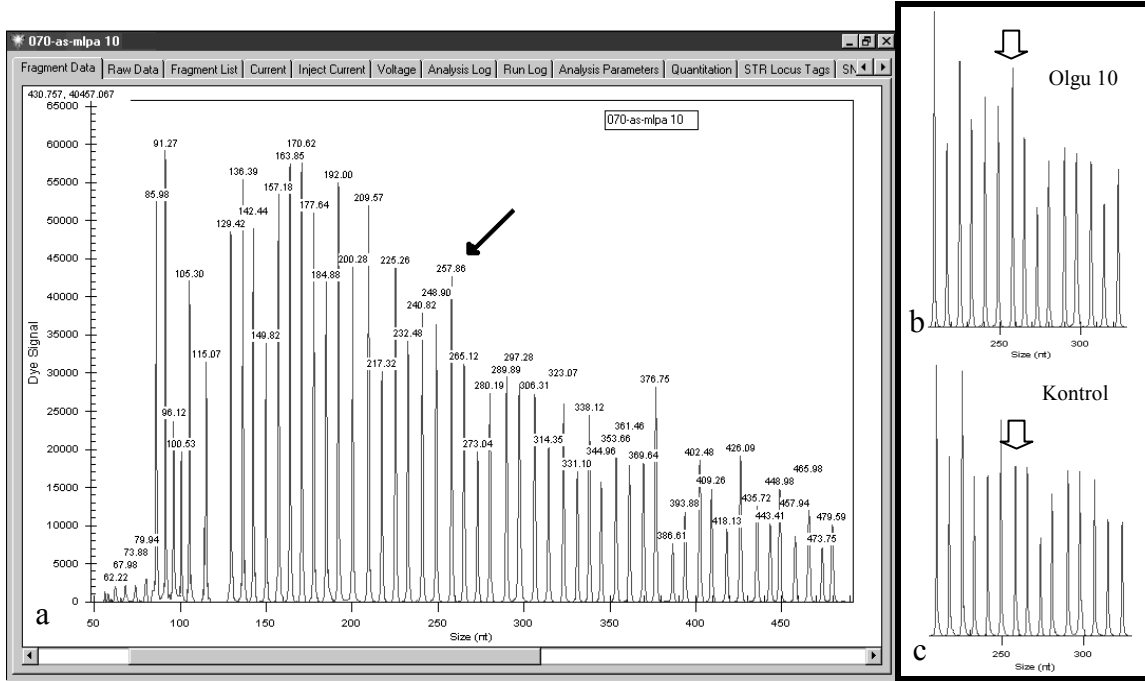
Doğrulama: MLPA çalışmasında olgunun 18. Kromozom uzun kolu terminal bölgesinde saptanan duplikasyonun FISH çalışması ile doğrulanamaması nedeni ile olgu DNA' sında Affimetrix Cyto2.7 çipi ile aCGH çalışması yapıldı ve MLPA da saptanan *CTDPI* lokus duplikasyonu doğrulandı. Dizin çalışmasında 18q23 bandında *CTDPI* geninin büyük bir bölümünü içine alan yaklaşık 75 kb büyüklüğünde bir bölge için tetrazomi varlığı gözlemlendi (Şekil 4-6). İlgili bölge CNV (Copy Number Variation) veritabanında (<http://projects.tcag.ca/variation/?source=hg18>) araştırıldığında aynı bölge ile örtüşen ve benzer büyüklükte bildirilen anlamlı bir kopya sayısı değişikliği olmadığı görüldü. (Şekil 4-7).



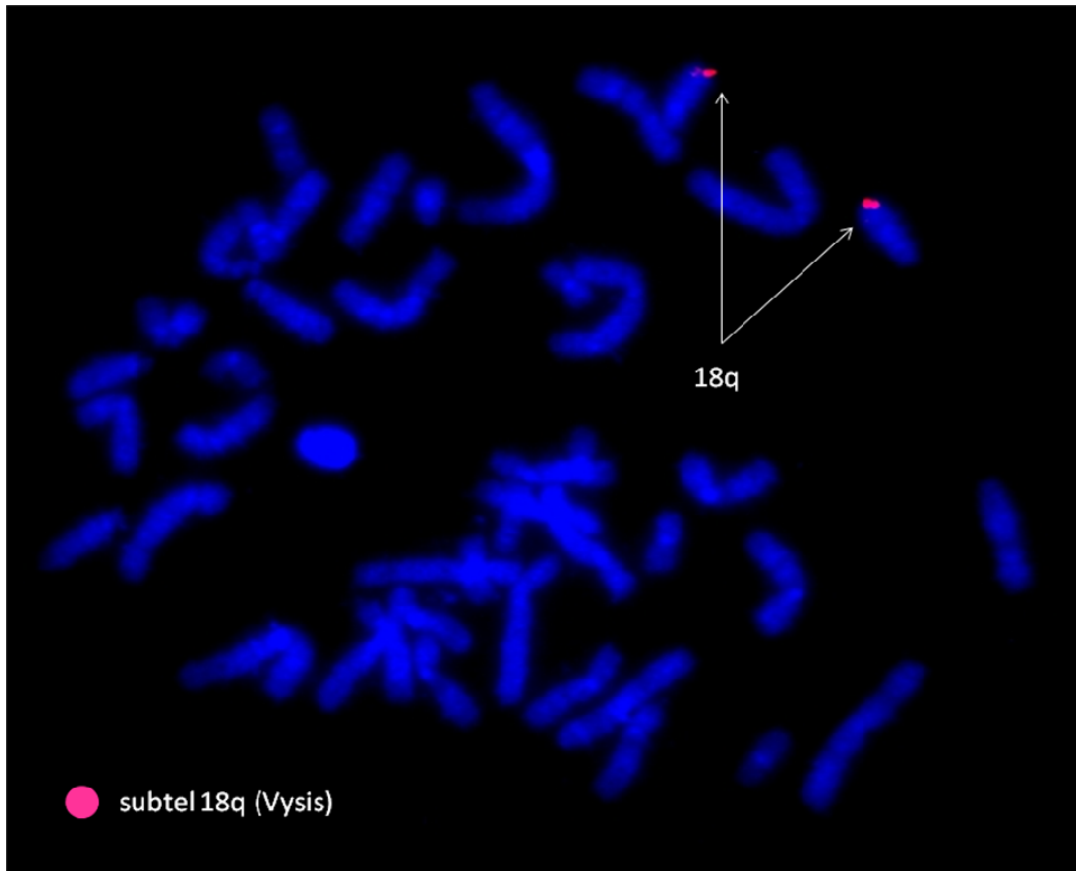
Grafik 4-19: Olgu 10' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



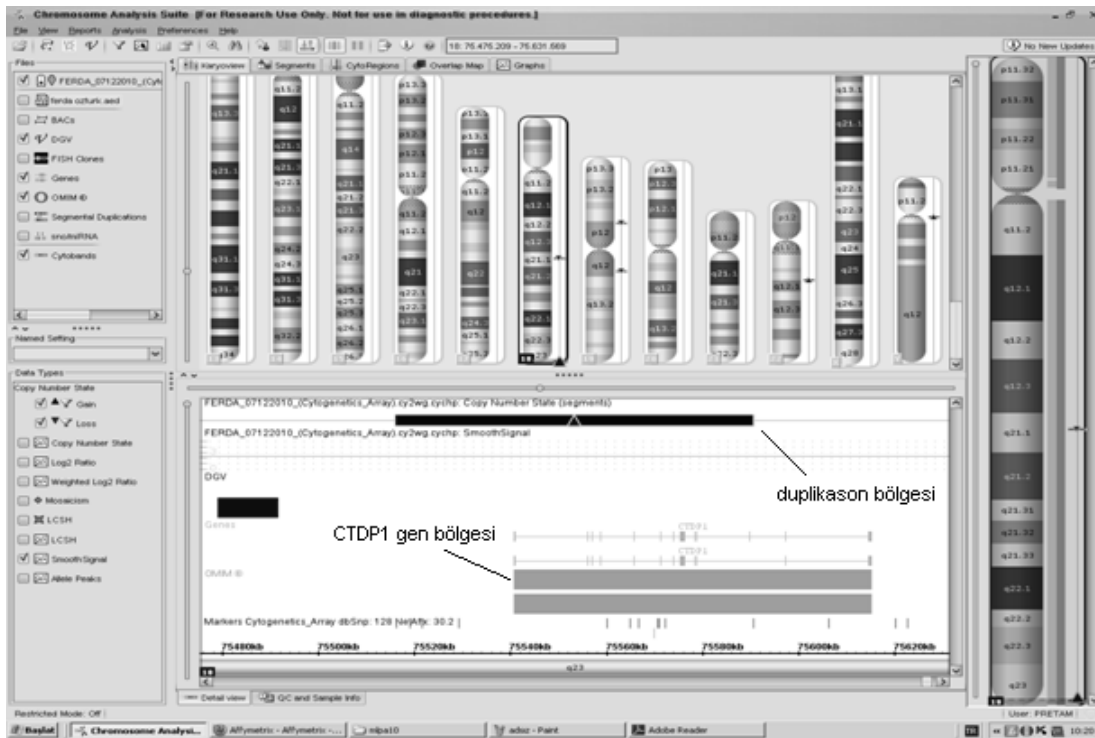
Şekil 4-3: Olgu 10'un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın istatistiksel analiz görüntüsü



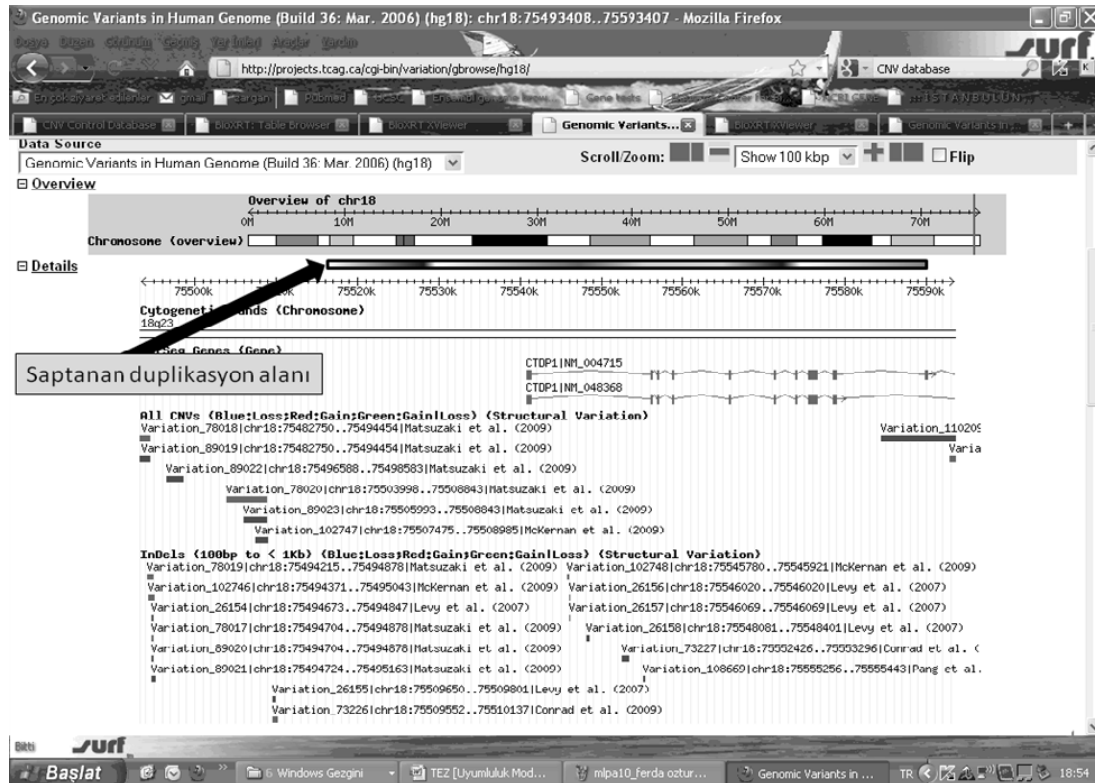
Şekil 4-4: Olgu 10' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın fragman pik görünümü a) tüm telomerik lokusların genel görüntüsü, b) olgunun *CTDP1* lokusu yakın görünümü ve c) normal bireyin *CTDP1* lokusu yakın görünümü



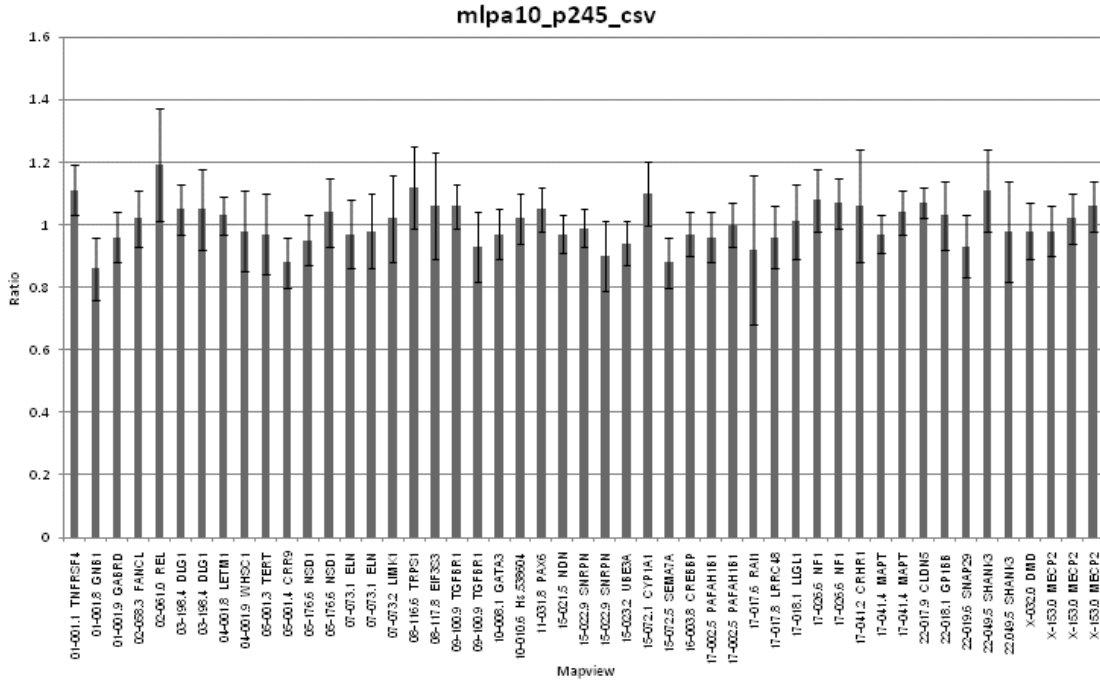
Şekil 4-5: Olgu 10'un 18 q Telomerik FISH görüntüsü



Şekil 4-6: Olgu 10' un mikrodizin analiz görüntüsü



Şekil 4-7: Olgu 10' da aCGH ile doğrulanan duplikasyon bölgesinin CNV veritabanı ile karşılaştırılması



Grafik 4-20: Olgu 10' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 11

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:36, gebelik haftası:20, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği (Monokoryonik, diamniyotik ikiz gebelik, diğer ikizde polihidramnios bulgusu)

Uygulanan Girişim: Amniosentez

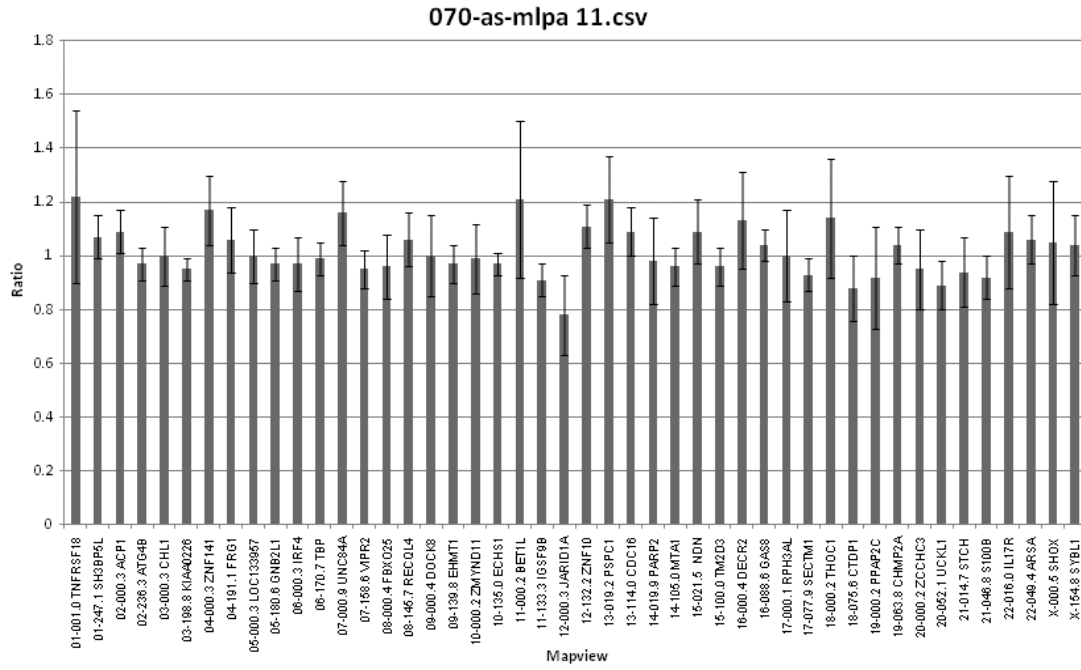
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

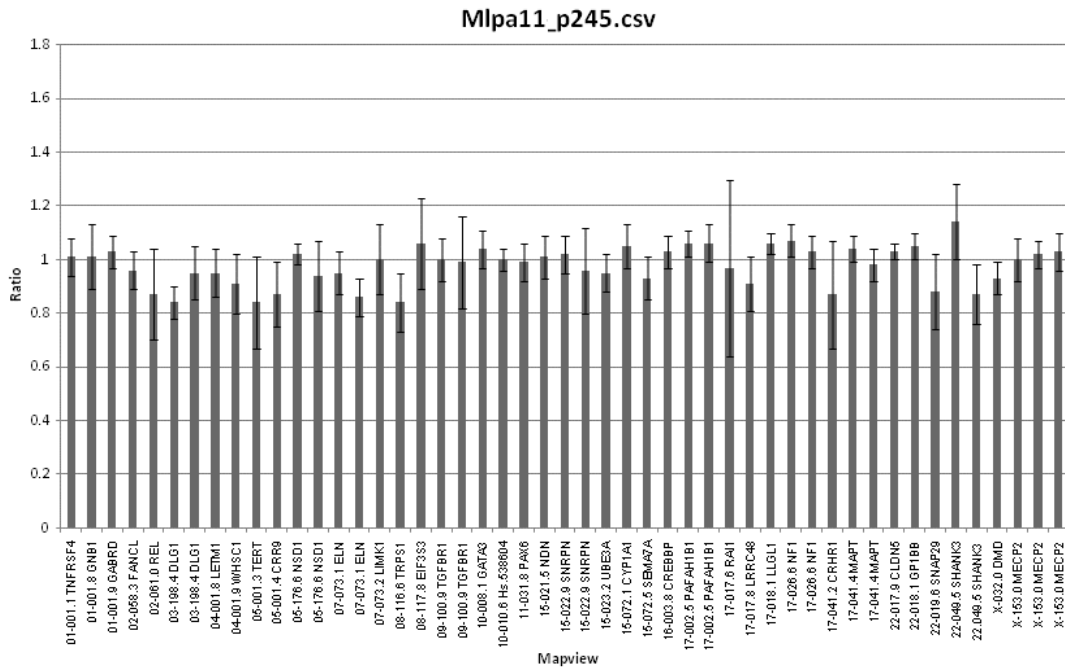
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-21: Olgu 11' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-22: Olgu 11' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 12

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:30, gebelik haftası:24, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, tek umbilikal arter, hiperekojen kardiak odak, mega sisterna magna

Uygulanan Girişim: Amniosentez

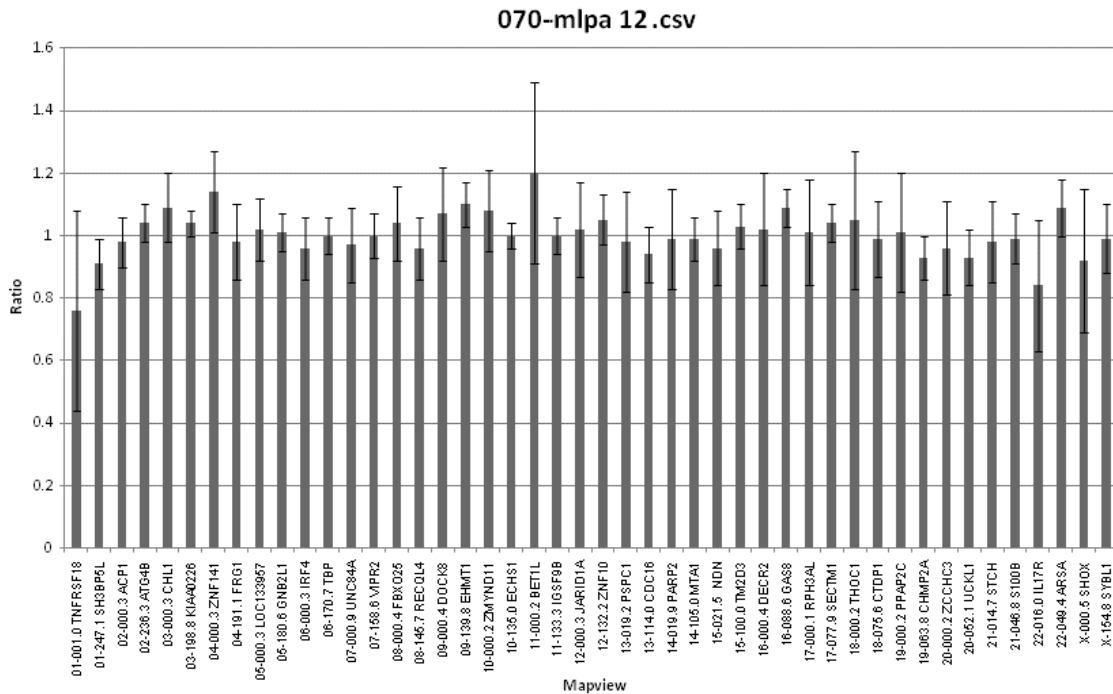
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

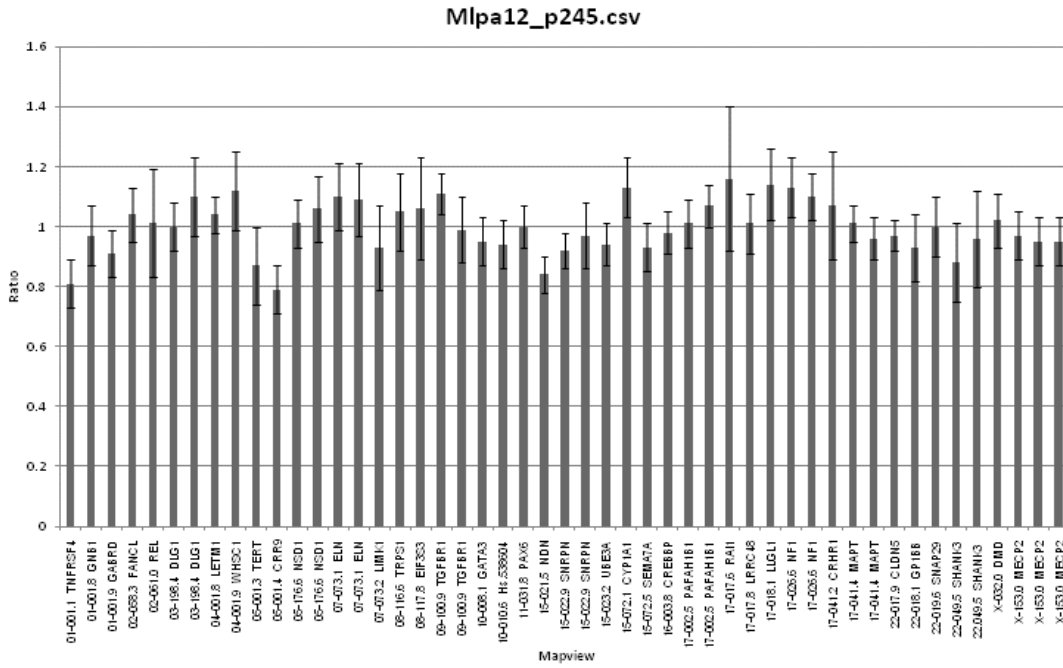
İzlem:

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-23: Olgu 12' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-24: Olgu 12' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 13

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:22, gebelik haftası:19, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, kötü obstetrik öykü (1 gebelik kaybı, 1 Sjögren-Larsen sendromlu çocuk)

Ultrason Bulguları: Hidrosefali, Dandy walker varyantı, tek taraflı yarık dudak

Uygulanan Girişim: Amniosentez

Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

İzlem: Tahliye sonrası muayene; hipertelorizm, burun kökü basık, ala naziler hipoplastik, sağ burun deliği küçük, sağburun deliğinden dudağa kadar pseudokleft, bilateral 5. el parmaklarında tek fleksiyon çizgisi ve klinodaktili, sağ el 2. parmakta tek fleksiyon çizgisi, dizlerde bilateral 10° ekstansiyon kontraktürü,, sağ ayakta pesekinarus,

OLGU 14

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:26, gebelik haftası:16, 1°kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, kötü obstetrik öykü (2 gebelik kaybı ,1 bilier atrezili ölü çocuk öyküsü)

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, iniensefali, kifoskolyoz, kistik higroma,ileri derecede cilt ödemi, vertebralarda kısalık, plasentada molar görünüm (parsiyel mol?).

Uygulanan Girişim:Korionik villus örneklemesi

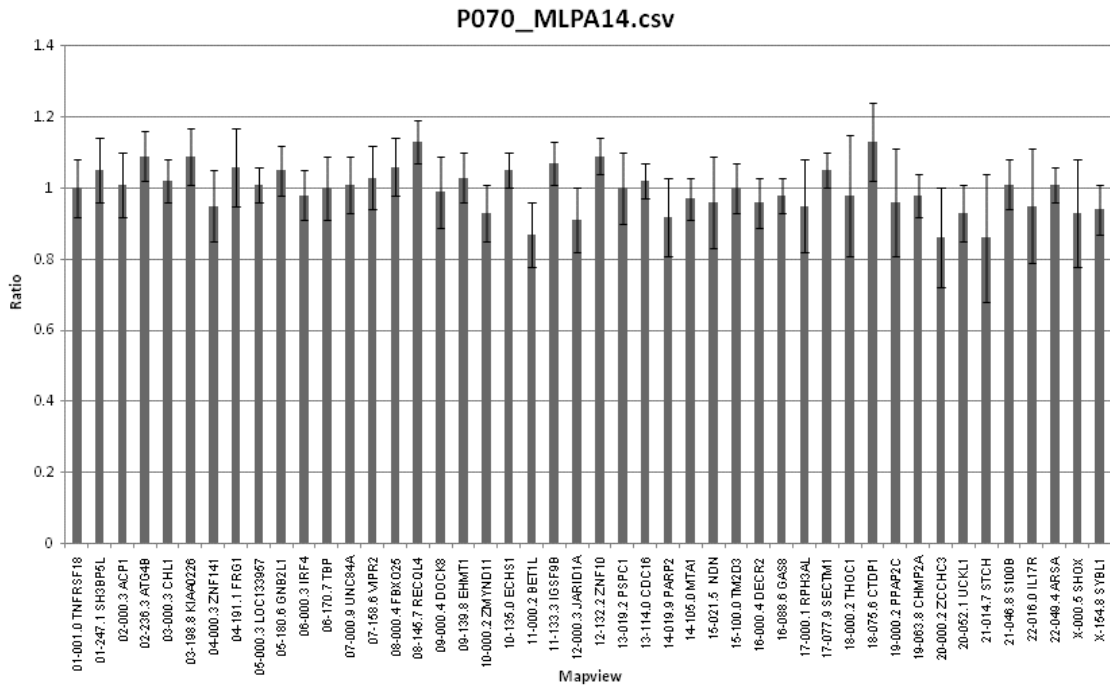
Fetal Karyotip: 46, XX.ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: KVÖ kültürü

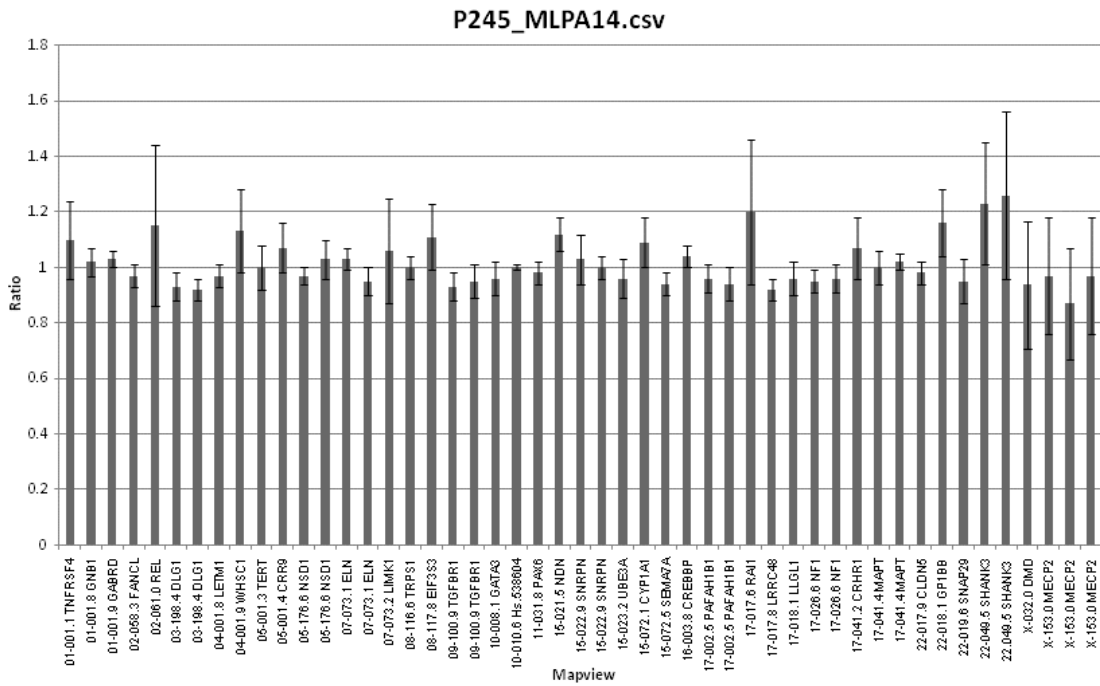
İzlem:Tahliye sonrası muayene; üçgen yüz, alın dar ve geriye doğu konumlu, prognatik mandibula, boyun kısa, ensede ileri derecede ödem, boyun hizasında iki adet kese kitle (kistik?), açıklığı sola bakan skolyoz, röntgen;serviko torakal bölgede ileriderece düzensizlik, açıklığı sola bakan skolyoz

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-27: Olgu 14' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-28: Olgu 14' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 15

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:31, gebelik haftası:24, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Holoprosensefali, nazal kemik yok, tek burun deliği, talemik füzyon, hipotelorizm, her iki böbrekte hafif ekojenite artışı

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

Fetal Karyotip: 46, XX.ish subtel(41x2)

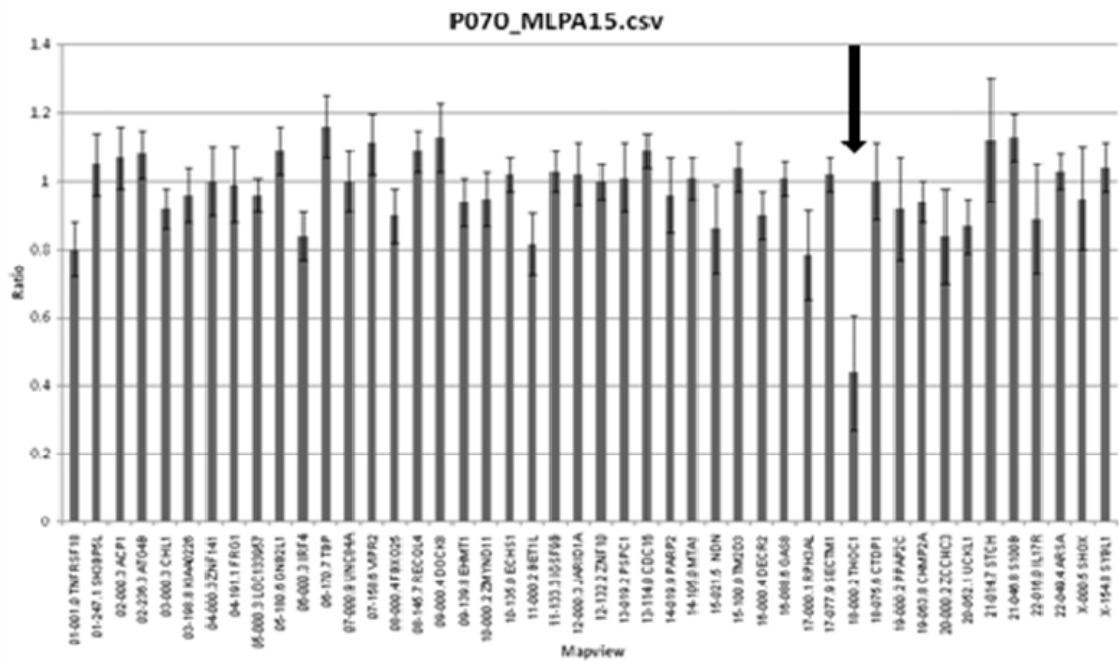
DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

İzlem: Tahliye sonrası muayenede hipotelorizm, tek burun deliği, kısa palpebral fissürler, egzoftalmi,dışa sarkık dil, mikrostomi

MLPA Sonucu; mlpa 18p subtel(P070)x1, (P245)x2

(SALSA P070 ile 18psub telomerik heterozigot delesyon ve SALSA P245 ile normal sonuç)

Doğrulama: MLPA çalışmasında olgunun 18. kromozom kısa kolunda *THO1* gen lokus bölgesinde delesyon saptanması nedeni ile 18. kromozomun kısa kolu sub telomerik FISH probu ile (TEL VYSİON-VYSIS) yapılan FISH çalışmasında sub telomerik delesyon doğrulanmıştır (Şekil 4-9).

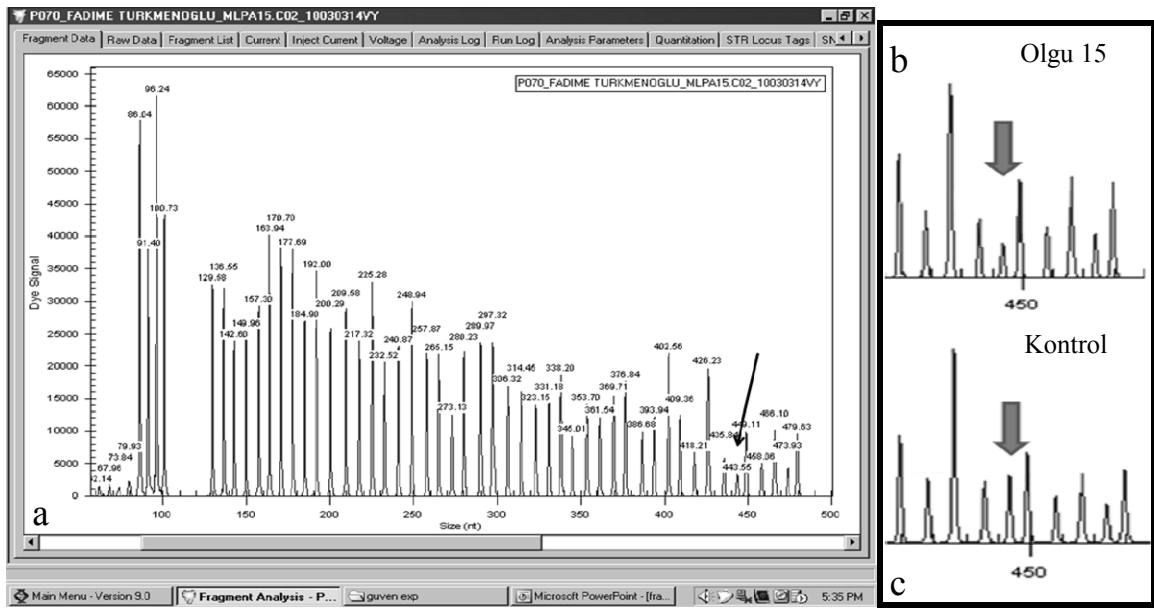


Grafik 4-29: Olgu 15' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

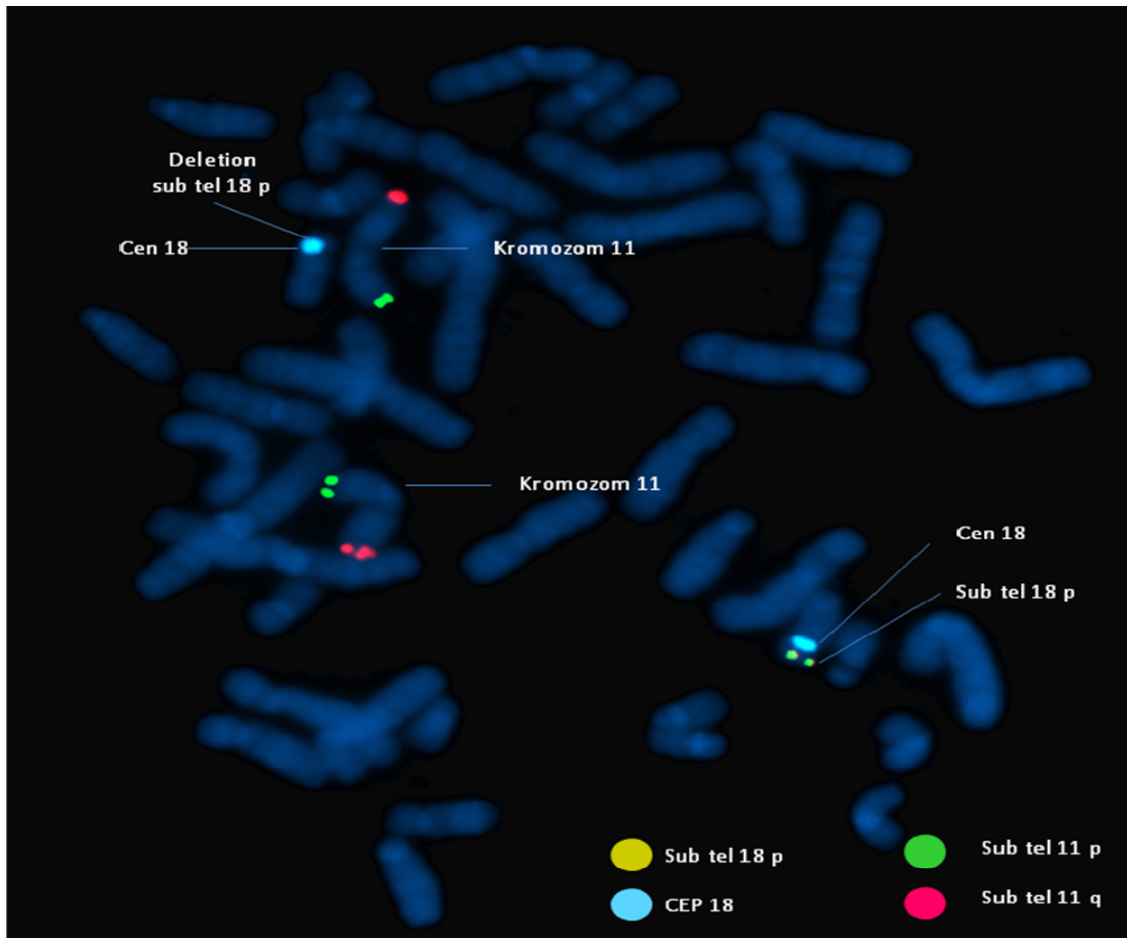
p070-02.03.2010 [Uyumluluk Modu] - Microsoft Excel

RESULTS P070-B1 MLPA problemiz lot 0808.txt		P070_MLPA15.csv		P070_MLPA15.csv		P070_MLPA15.csv		P070_MLPA15.csv		P070_MLPA15.csv	
Gen	Chr	Pos	Length	MLPA	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio	Ratio
17-000.1 RPH3AL	17	10000000	1000	33	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
7-077.9 SECTM1	7	70000000	1000	34	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
18-000.2 THOC1	18	18000000	1000	35	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
18-075.6 CTF01	18	18075000	1000	36	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
18-000.2 PPA02C	18	18000000	1000	37	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40

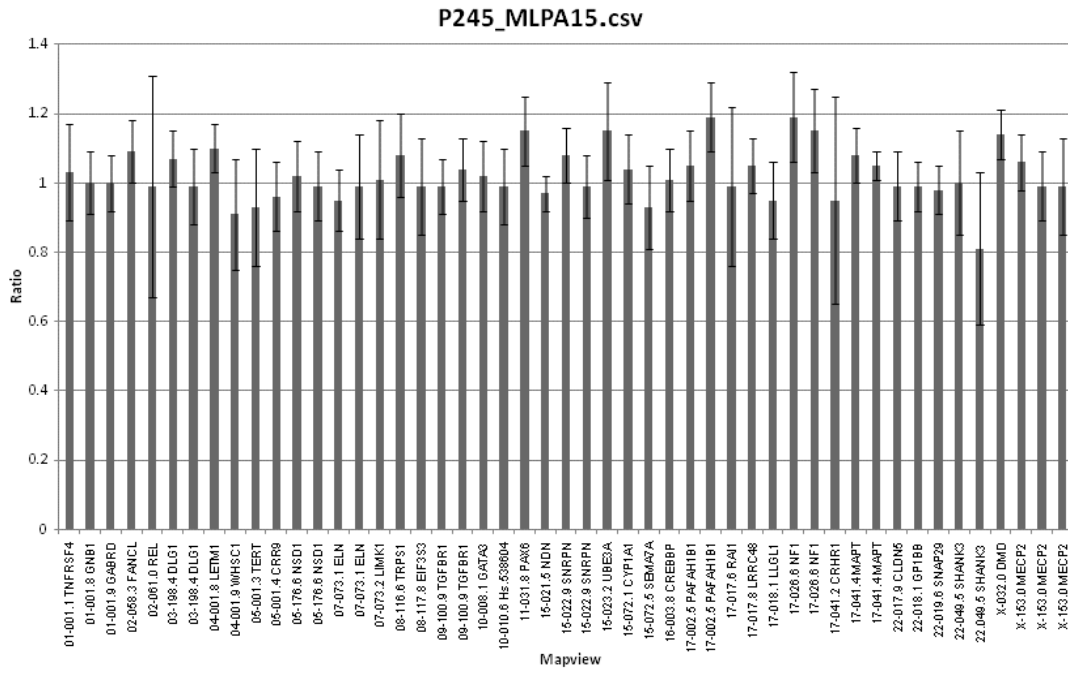
Şekil 4-8: Olgu 15' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın istatistiksel analiz görüntüsü



Şekil 4-9: Olgu 15' in P070 prob seti ile yapılan çalışmasının fragman pik görünümü a) tüm telomerik lokusların genel görüntüsü, b) olgunun *THOC1* lokusu yakın görünümü ve c) normal bireyin *THOC1* lokusu yakın görünümü



Şekil 4-10: Olgu 15'in 18 p subtelomerik prob (Tel vasyon; CEP 18, sub tel 18p, subtel 11p, subtel 11q/ VYSIS) ile yapılan FISH çalışması metafaz görüntüsü



Grafik 4-30: Olgu 15' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 16

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:27, gebelik haftası:28, 2° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, polihidramnios, mide cebi yokluğu, gözlenemeyen mesane, özefagus atrezisi , özefajial poş? sandal gap

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

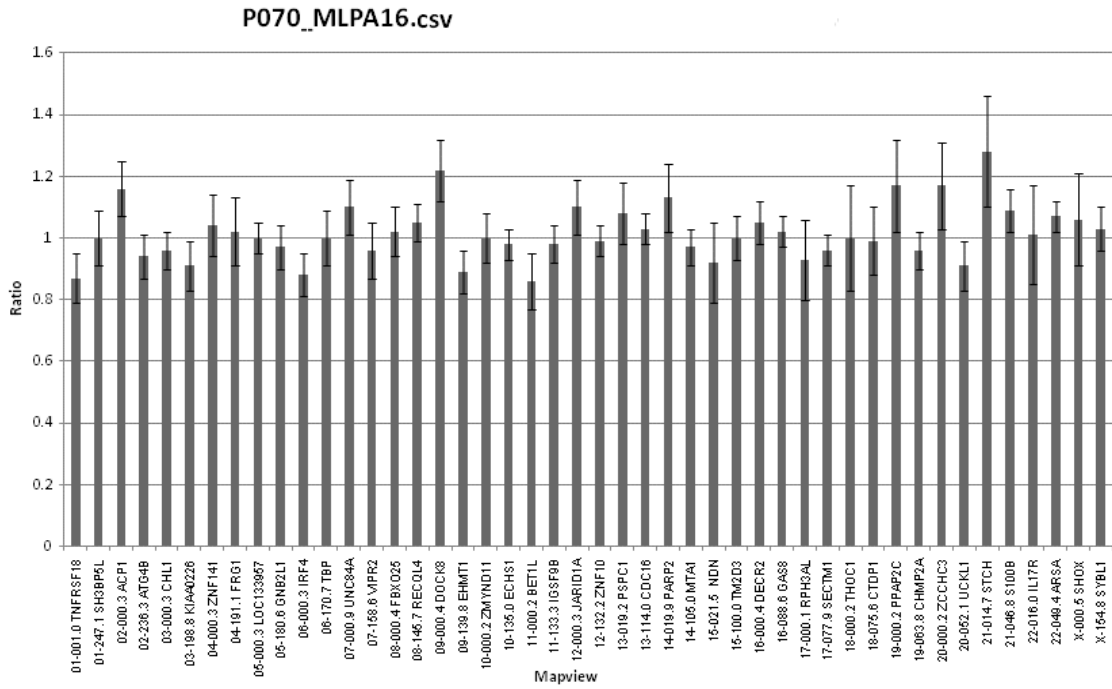
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kan kültürü

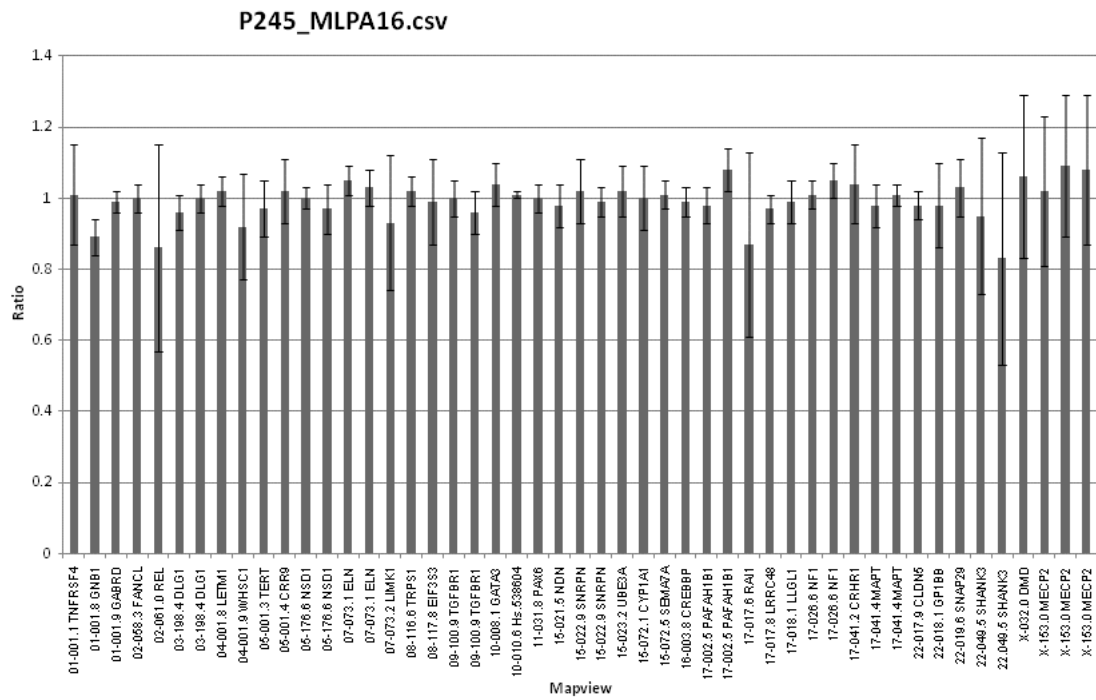
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)

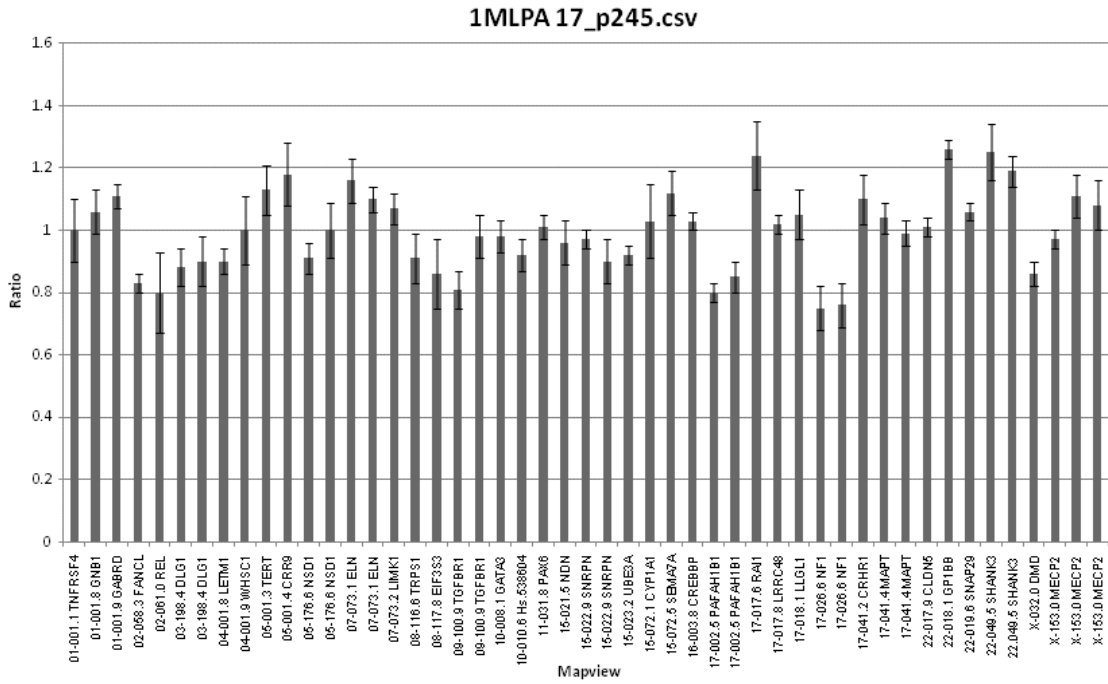


Grafik 4-31: Olgu 16' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-32: Olgu 16' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 17



Grafik 4-34: Olgu 17' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 18

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:26, gebelik haftası:23, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Ventrikülomegali, kardiak hiperekojenik odak, bilateral pelviektazi

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

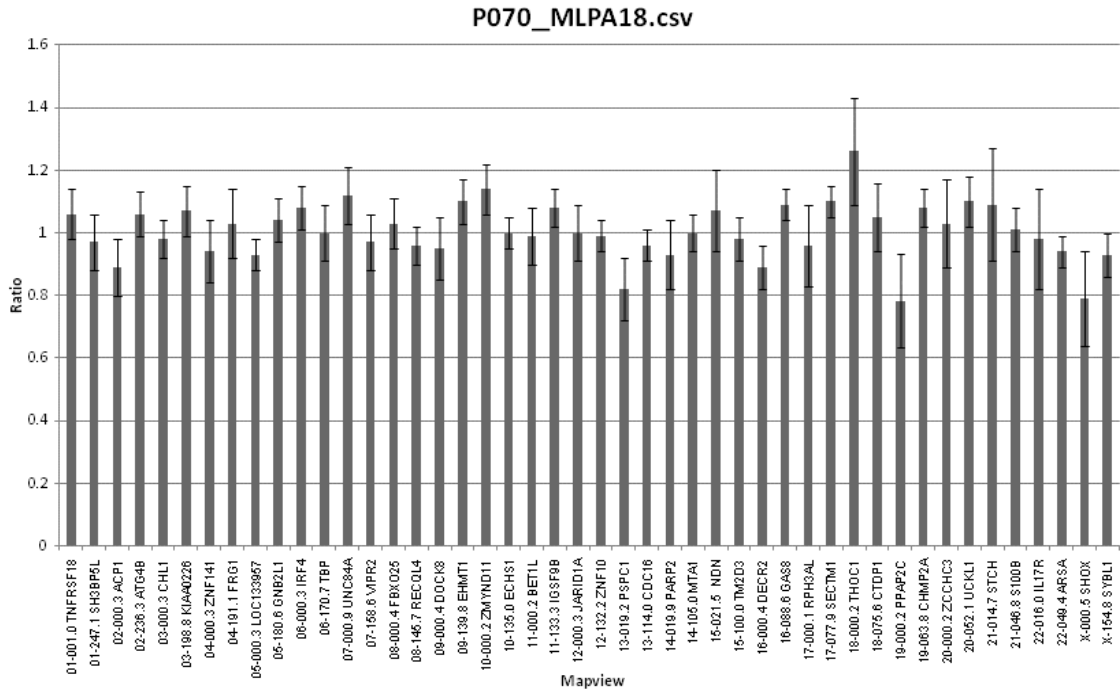
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

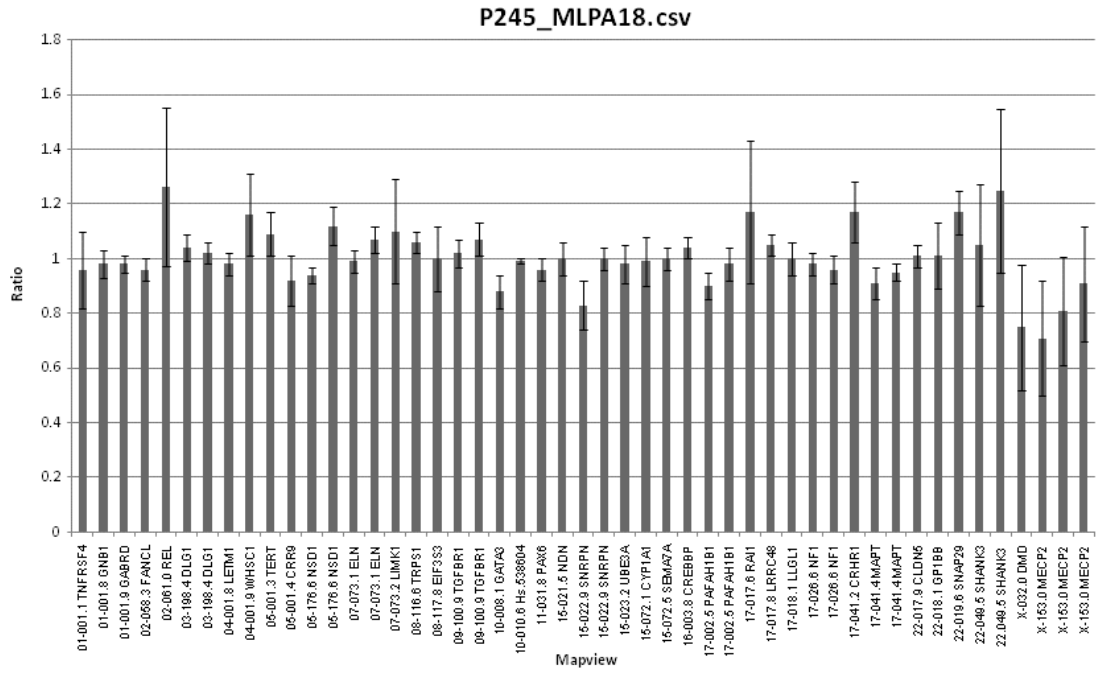
İzlem:

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-35: Olgu 18' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-36: Olgu 18' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 19

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:36, gebelik haftası:24, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği

Uygulanan Girişim: Amniosentez

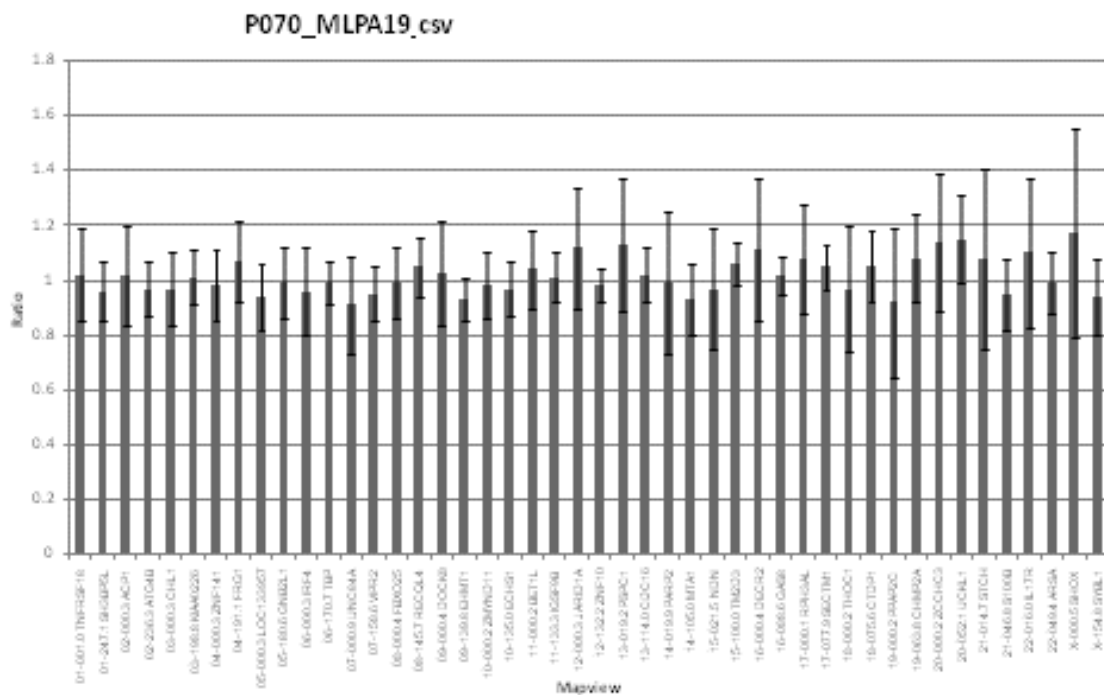
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2), nuc ish(RB1x2,D18Z1x2, D21S65x2, DXZ1x1, DYZ3x1)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

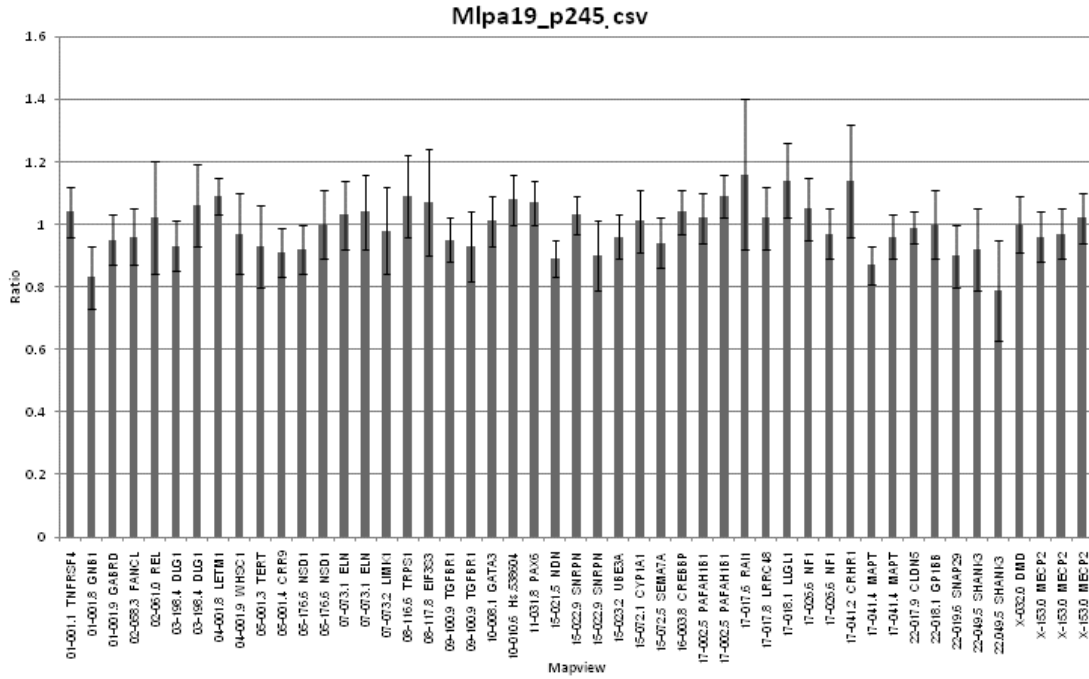
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-37: Olgu 19' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-38: Olgu 19' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 20

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:34, gebelik haftası:18, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, kısa femur tek umbilikal arter, küçük mide cebi

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2), nuc ish(RB1x2,D18Z1x2, D21S65x2, DXZ1x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

İzlem: 34.gebelik haftasında (fetal distress) sezeryan 1430gr doğum,

35 günlük muayene, periorbital dolgunluk, ince uzun dudak, uzun filtrum, mikrognati,sivri çene, kulaklar arkaya dönük, tüm vücutta kutis marmoratus, hipotiroidi (tefor tedavisi başlanmış)

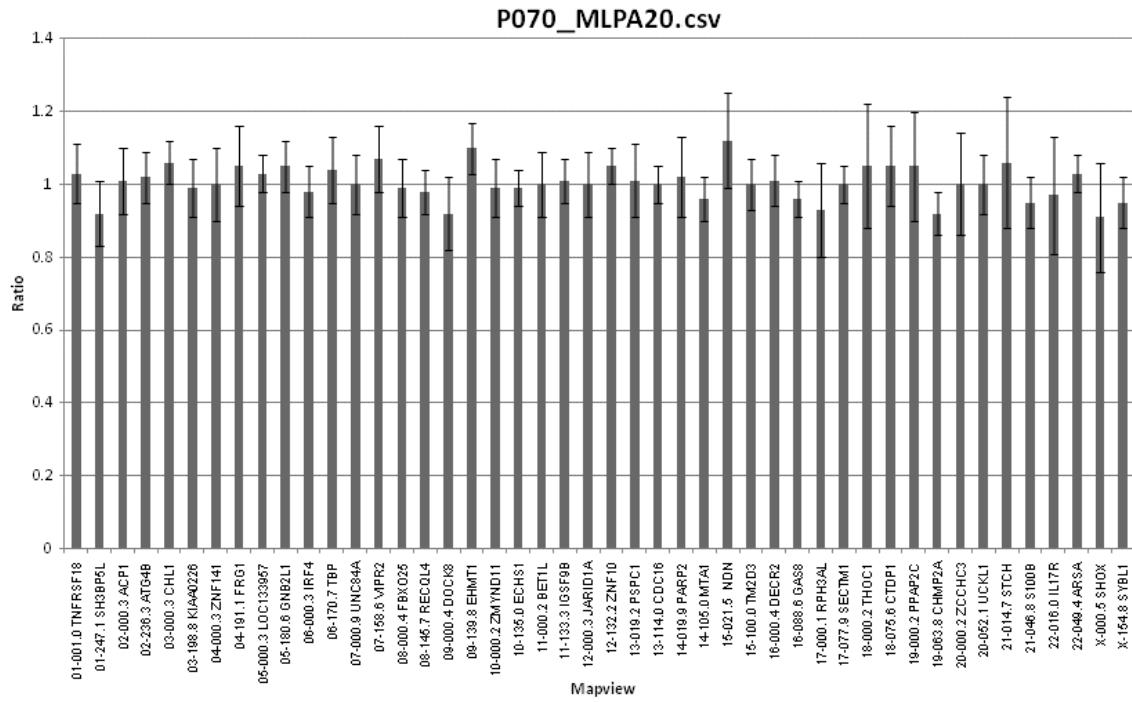
6 aylıkken yapılan EKO; küçük VSD

14 aylıkken yapılan EKO; periferik pulmoner stenoz,

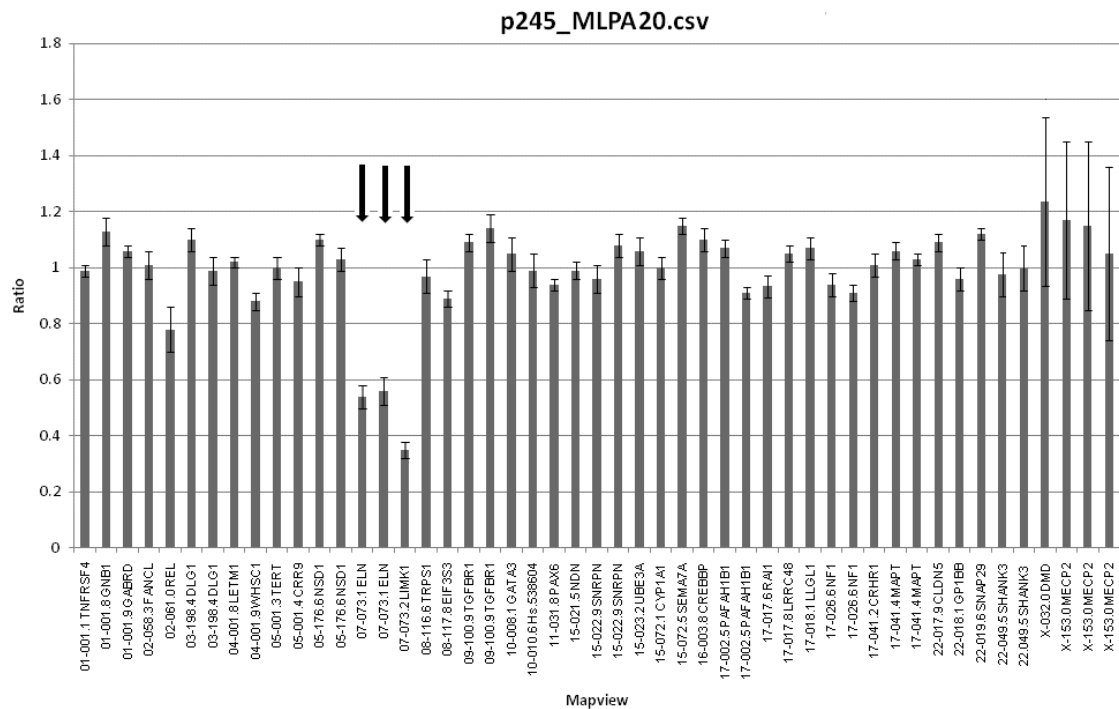
MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2, 7q11.23 (P245)x1

(P070 prob seti ile normal sonuç ve P245 prob seti ile 7q11.23 de heterozigot delesyon)

Doğrulama: MLPA çalışmasında olgunun 7. kromozom kısa kolunda *ELN* geni 1. ekson, 20. ekson ve *LIMK* gen lokus bölgelerinde delesyon saptanması nedeni ile (grafik 4-38, şekil 4-10, 4-11) Williams sendromuna özgü *ELN* gen lokus FISH probu ile (CYTOCELL) ile yapılan FISH çalışmasında delesyon doğrulanmıştır (şekil 4-12).



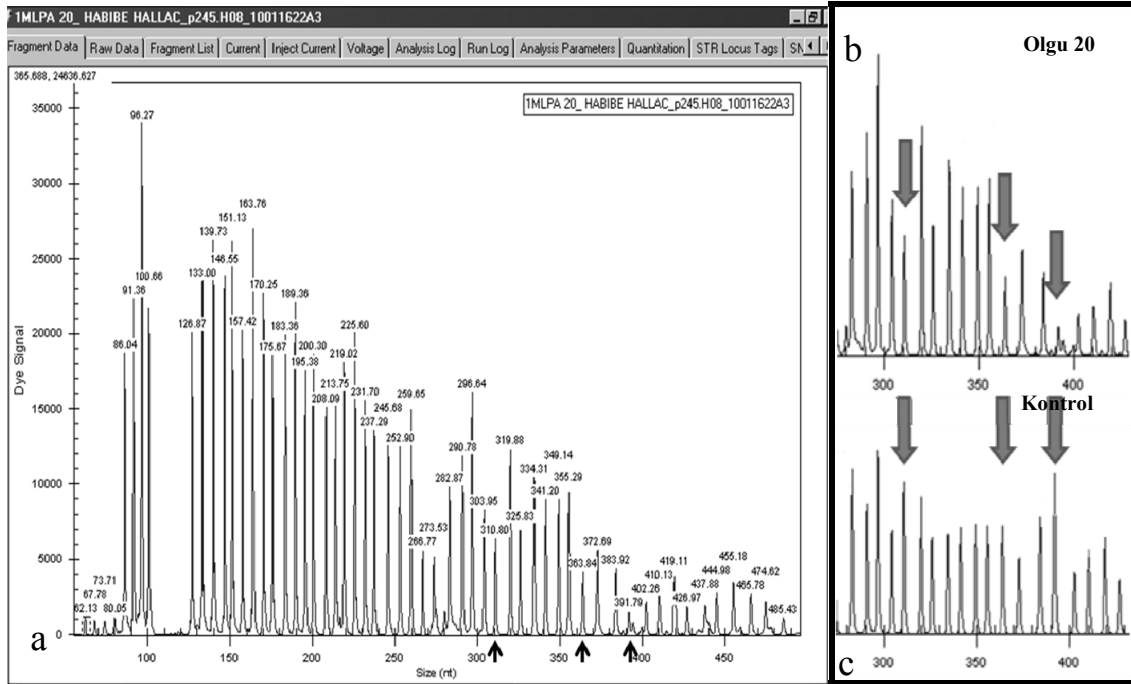
Grafik 4-39: Olgu 20' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



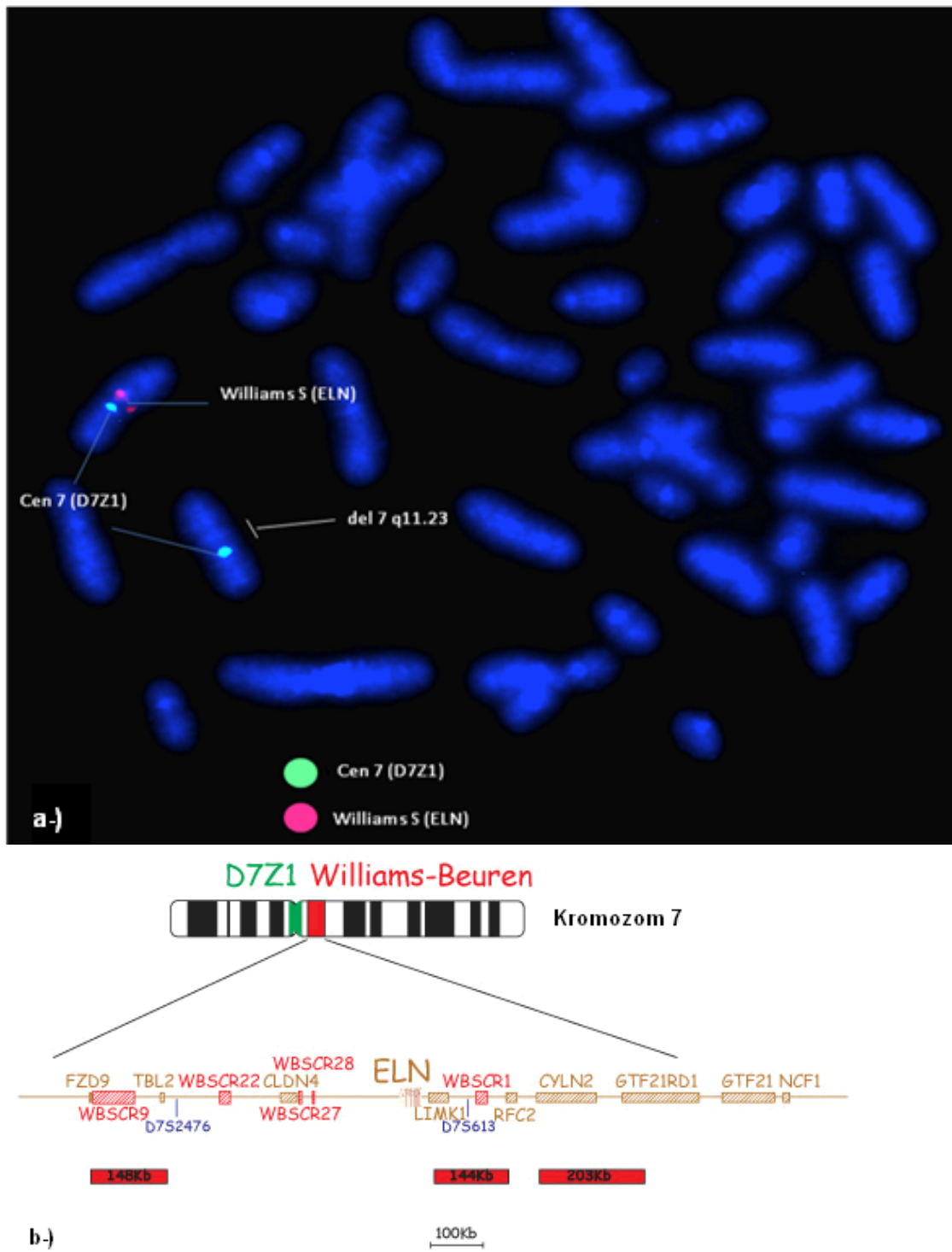
Grafik 4-40: Olgu 20' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

24.02.2010 p245 [Uyumluluk Modu] - Microsoft Excel									
RESULTS P245-A2 MLPA probemix lot 0209, 1008.txt									
P245-A2 MLPA probemix lot 0209, 1008.txt									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190
191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250
251	252	253	254	255	256	257	258	259	260
261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
271	272	273	274	275	276	277	278	279	280
281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
311	312	313	314	315	316	317	318	319	320
321	322	323	324	325	326	327	328	329	330
331	332	333	334	335	336	337	338	339	340
341	342	343	344	345	346	347	348	349	350
351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
361	362	363	364	365	366	367	368	369	370
371	372	373	374	375	376	377	378	379	380
381	382	383	384	385	386	387	388	389	390
391	392	393	394	395	396	397	398	399	400
401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
421	422	423	424	425	426	427	428	429	430
431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
451	452	453	454	455	456	457	458	459	460
461	462	463	464	465	466	467	468	469	470
471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
481	482	483	484	485	486	487	488	489	490
491	492	493	494	495	496	497	498	499	500
501	502	503	504	505	506	507	508	509	510
511	512	513	514	515	516	517	518	519	520
521	522	523	524	525	526	527	528	529	530
531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
541	542	543	544	545	546	547	548	549	550
551	552	553	554	555	556	557	558	559	560
561	562	563	564	565	566	567	568	569	570
571	572	573	574	575	576	577	578	579	580
581	582	583	584	585	586	587	588	589	590
591	592	593	594	595	596	597	598	599	600
601	602	603	604	605	606	607	608	609	610
611	612	613	614	615	616	617	618	619	620
621	622	623	624	625	626	627	628	629	630
631	632	633	634	635	636	637	638	639	640
641	642	643	644	645	646	647	648	649	650
651	652	653	654	655	656	657	658	659	660
661	662	663	664	665	666	667	668	669	670
671	672	673	674	675	676	677	678	679	680
681	682	683	684	685	686	687	688	689	690
691	692	693	694	695	696	697	698	699	700
701	702	703	704	705	706	707	708	709	710
711	712	713	714	715	716	717	718	719	720
721	722	723	724	725	726	727	728	729	730
731	732	733	734	735	736	737	738	739	740
741	742	743	744	745	746	747	748	749	750
751	752	753	754	755	756	757	758	759	760
761	762	763	764	765	766	767	768	769	770
771	772	773	774	775	776	777	778	779	780
781	782	783	784	785	786	787	788	789	790
791	792	793	794	795	796	797	798	799	800
801	802	803	804	805	806	807	808	809	810
811	812	813	814	815	816	817	818	819	820
821	822	823	824	825	826	827	828	829	830
831	832	833	834	835	836	837	838	839	840
841	842	843	844	845	846	847	848	849	850
851	852	853	854	855	856	857	858	859	860
861	862	863	864	865	866	867	868	869	870
871	872	873	874	875	876	877	878	879	880
881	882	883	884	885	886	887	888	889	890
891	892	893	894	895	896	897	898	899	900
901	902	903	904	905	906	907	908	909	910
911	912	913	914	915	916	917	918	919	920
921	922	923	924	925	926	927	928	929	930
931	932	933	934	935	936	937	938	939	940
941	942	943	944	945	946	947	948	949	950
951	952	953	954	955	956	957	958	959	960
961	962	963	964	965	966	967	968	969	970
971	972	973	974	975	976	977	978	979	980
981	982	983	984	985	986	987	988	989	990
991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000

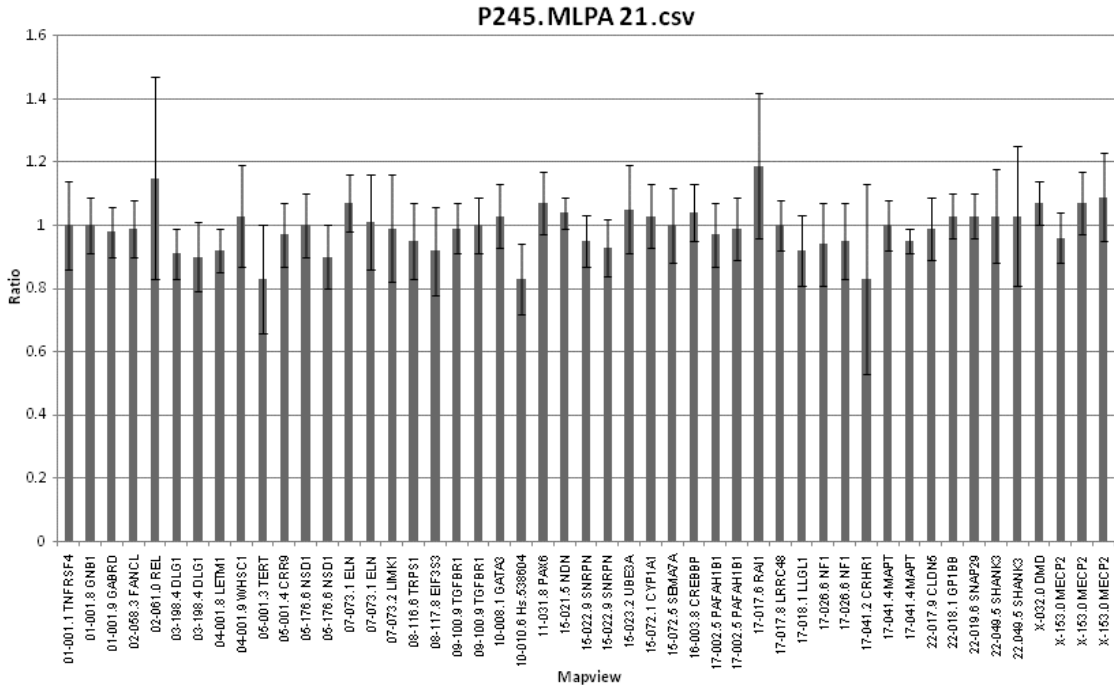
Şekil 4-11: Olgu 20'nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın istatistiksel analiz görüntüsü



Şekil 4-12: Olgu 20' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmasının fragman pik görüntüleri
a) tüm sendromik lokusların genel görüntüsü, b) olgunun *ELN* ekson 1(310 nt) , ekson 20 (364 nt) ve *LIMK* gen lokusu (391 nt) yakın görünümü ve c) normal bireyin *ELN* ekson 1(310 nt) , ekson 20(364 nt) ve *LIMK* gen lokusu (391 nt) yakın görünümü



Şekil 4-13: Olgu 20' nin a) Williams Sendromu lokus spesifik prob (Cytocell) ile yapılan FISH çalışması metafaz görüntüsü b-) kullanılan FISH probunun pozisyonel yerleşimi



Grafik 4-42: Olgu 21' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 22

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:21, gebelik haftası:19, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, situs inversus totalis, tek umbilikal arter, hiperekojen intestin, ambiguous genitale – hipospadias (tulip sign)

Uygulanan Girişim: Amniosentez

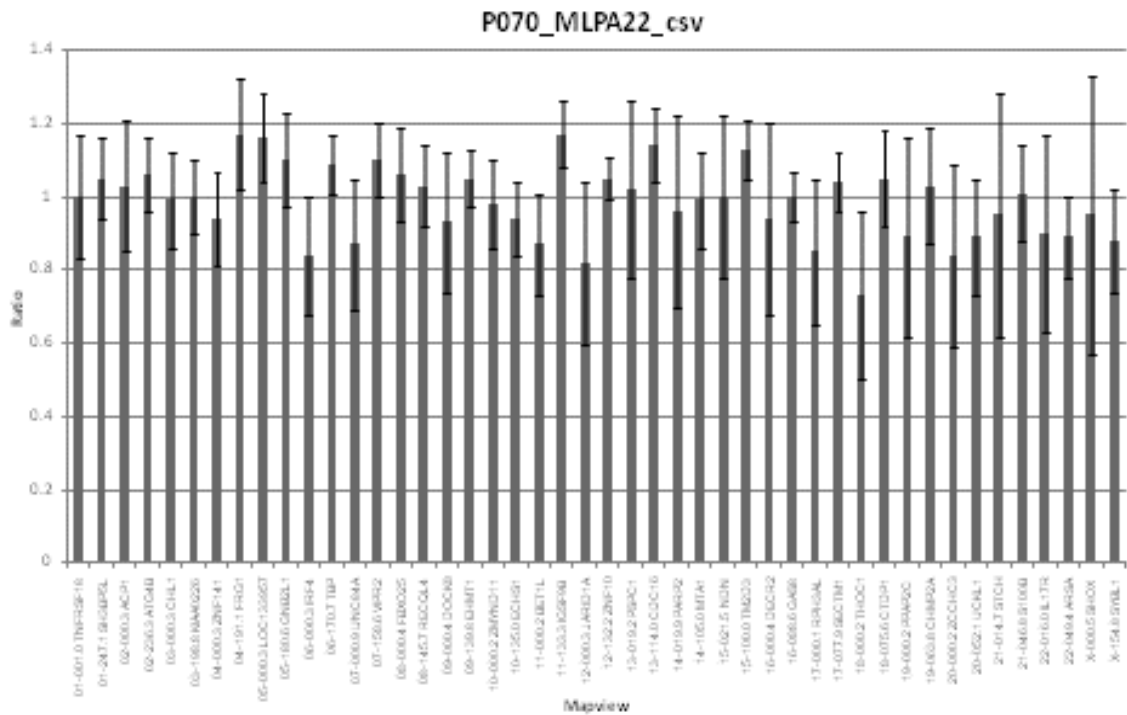
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

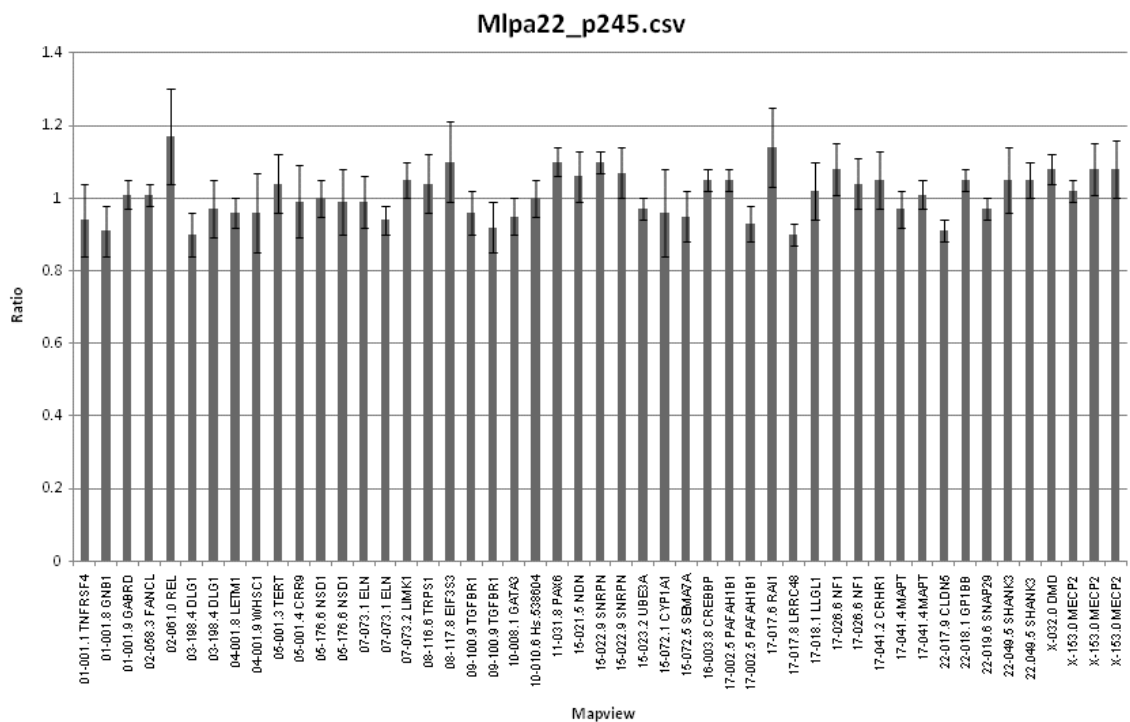
İzlem: Tahliye sonrası muayenede intrauterin gelişme geriliği, situs inversus totalis, penoskrotal hipospadias

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-43: Olgu 22' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-44: Olgu 22' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 23**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:21, gebelik haftası:22, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Bilateral hiperekojen böbrek, artmış ense plisi kalınlığı (7.9mm), tek umbilikal arter, sol elde postaksiyal polidaktili

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

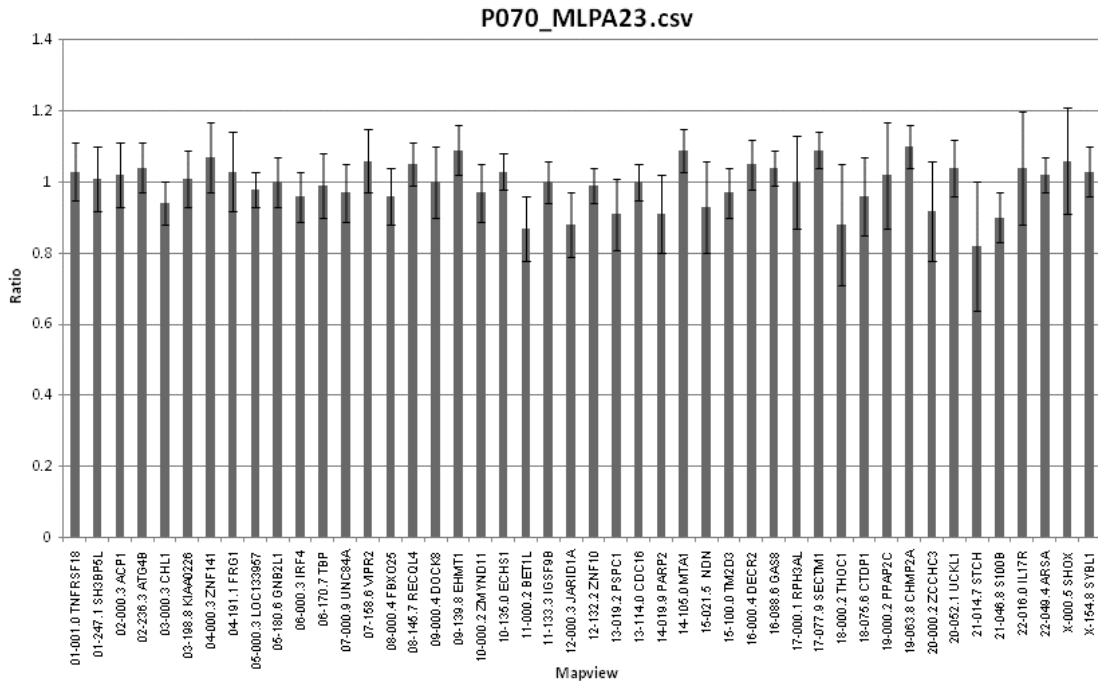
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

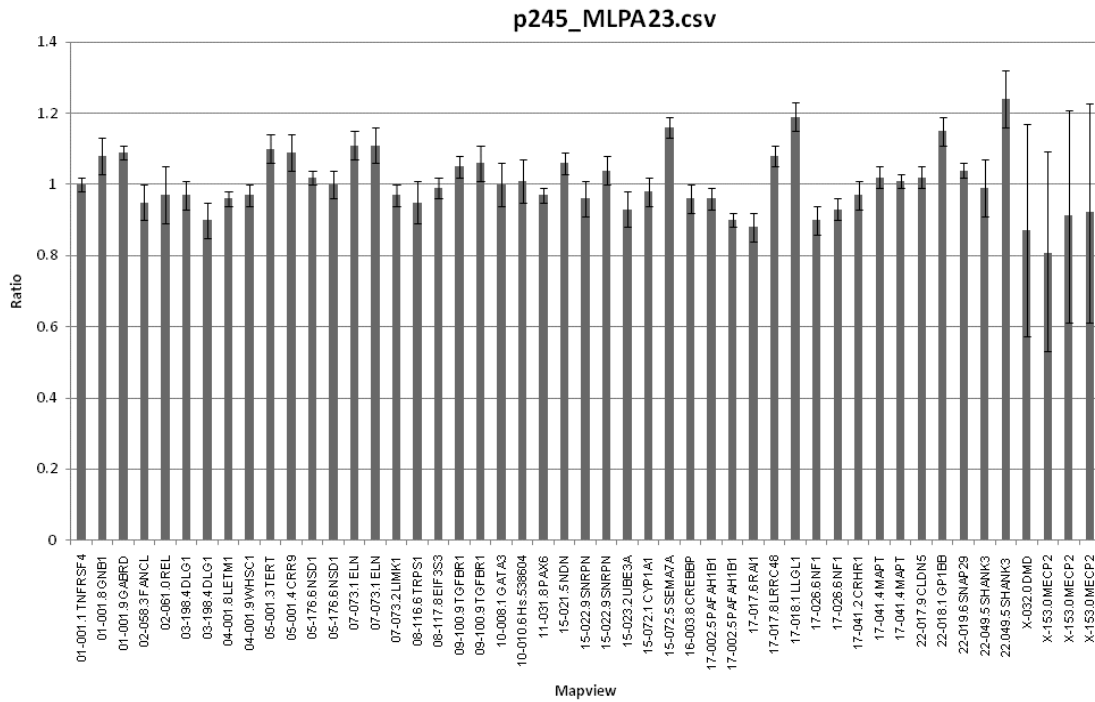
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-45: Olgu 23' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-46: Olgu 23' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU24

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:24, gebelik haftası:29, 1°kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, tek umbilikal arter, multistikistik displastik sağ böbrek, ağır hidrosefali, arka fossa kapalı, serebellum hipoplazik, lateral ventriküllerde dilatasyon, double bubble görüntüsü, bilateral radius aplazisi, trake-özefagial fissur?

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

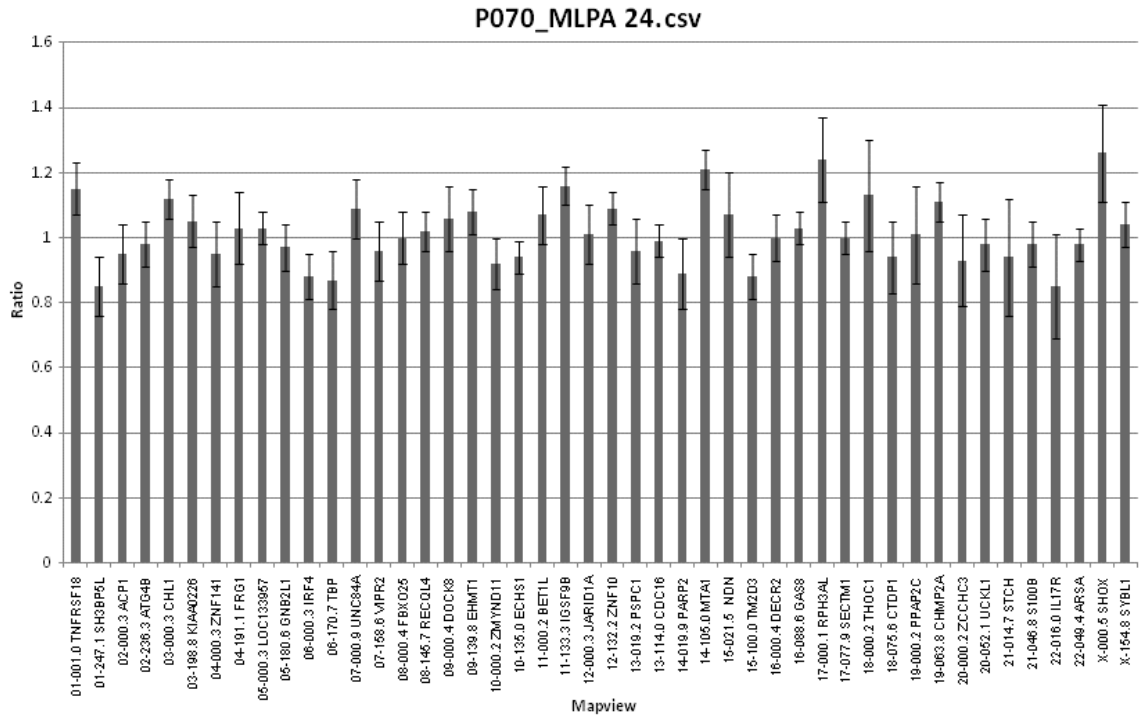
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

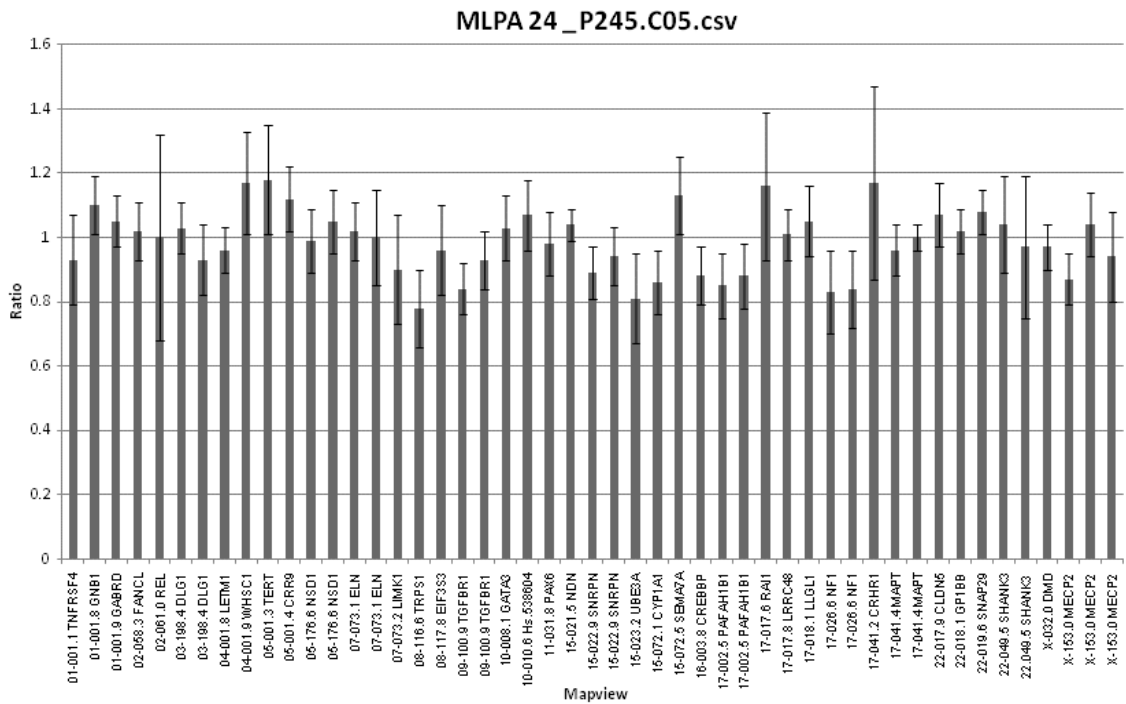
İzlem:-

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-47: Olgu 24' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-48: Olgu 24' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU25**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:33, gebelik haftası:28, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, kötü obstetrik öykü (1 yenidoğan ölümü, 1 intrauterin ölüm 8 aylık)

Ultrason Bulguları: Bilateral borderline ventrikülomegali

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

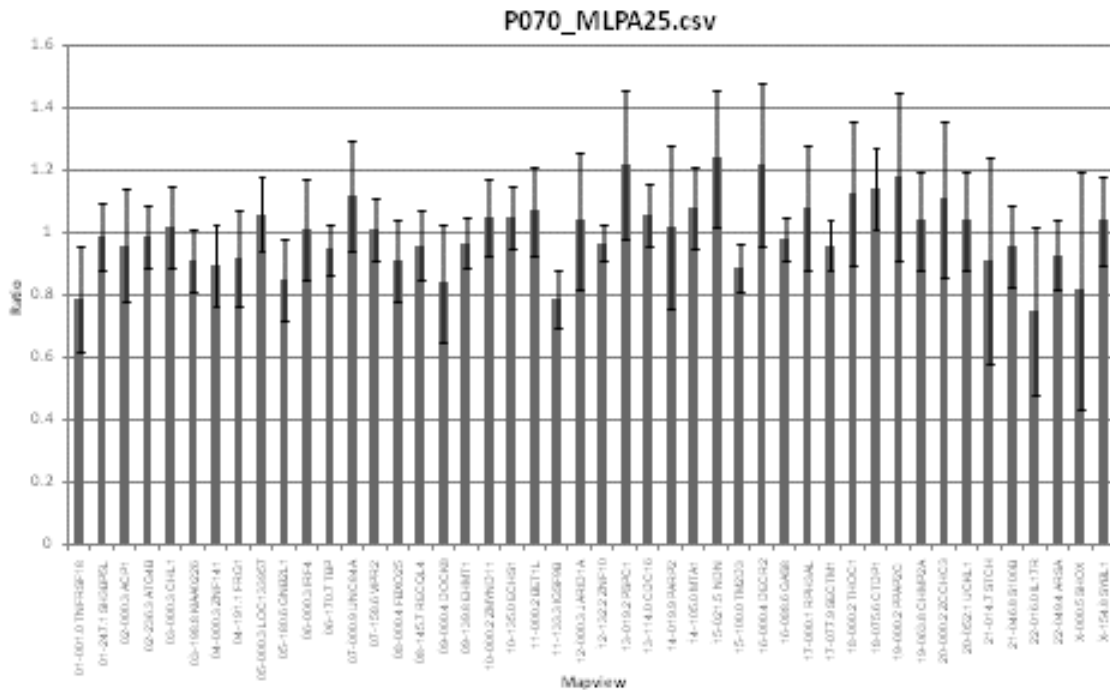
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

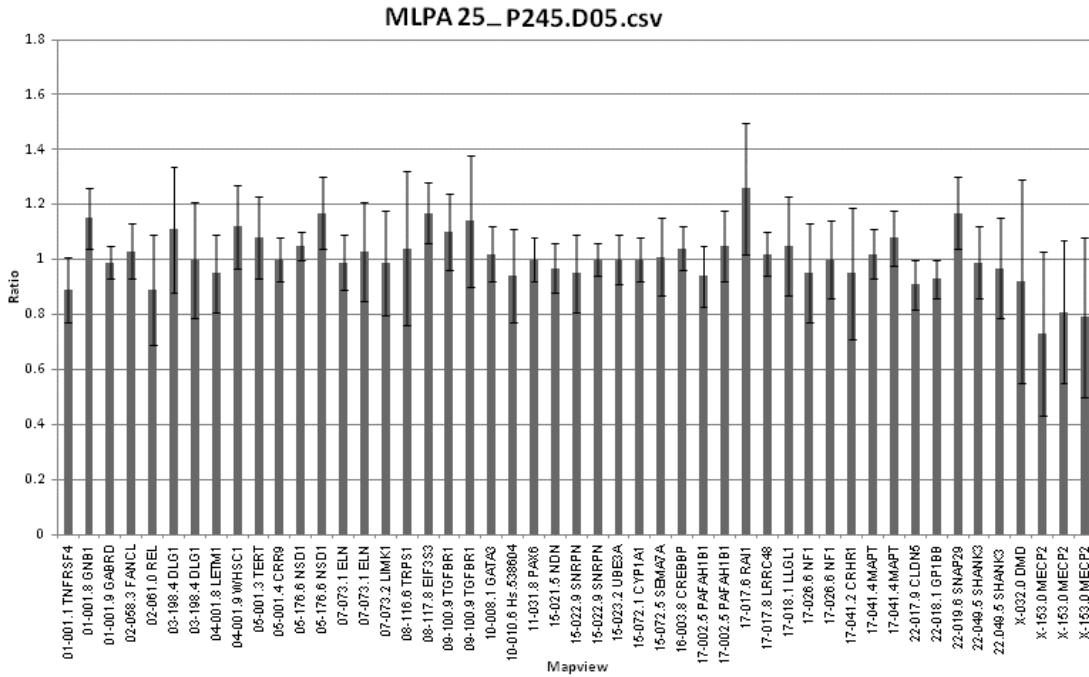
İzlem:-

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-49: Olgu 25' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-50: Olgu 25' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU26

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:25, gebelik haftası:30, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, kötü obstetrik öykü (2gebelik kaybı)

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, torako-lomber-sakral spina bifida, kifoskolyoz, arka fossa kapalı, bilateral multikistik displastik böbrek, perikardiyal effüzyon, anhidramnios

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

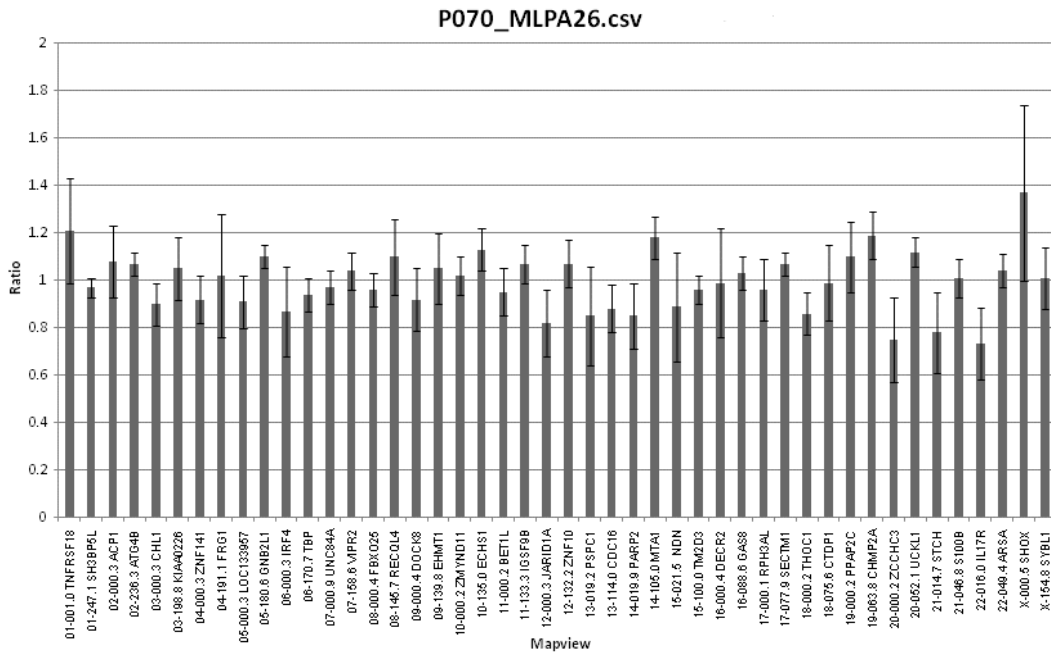
İzlem: Tahliye sonrası muayenedehipertelorizm, yukarı çekik palpebral fissürler, kulaklargeri yerleşikli, heliks kıvrımları düzleşmiş, bilateral 5. Parmak klinodaktilis, bilateral pesekinovarus, sırtta 6-6.5 cm spinabifida

Grafi; tüm kotlarda düzensizlik, torakal vertebralarda sayısal eksiklik, şekil bozukluğu, hemivertebral

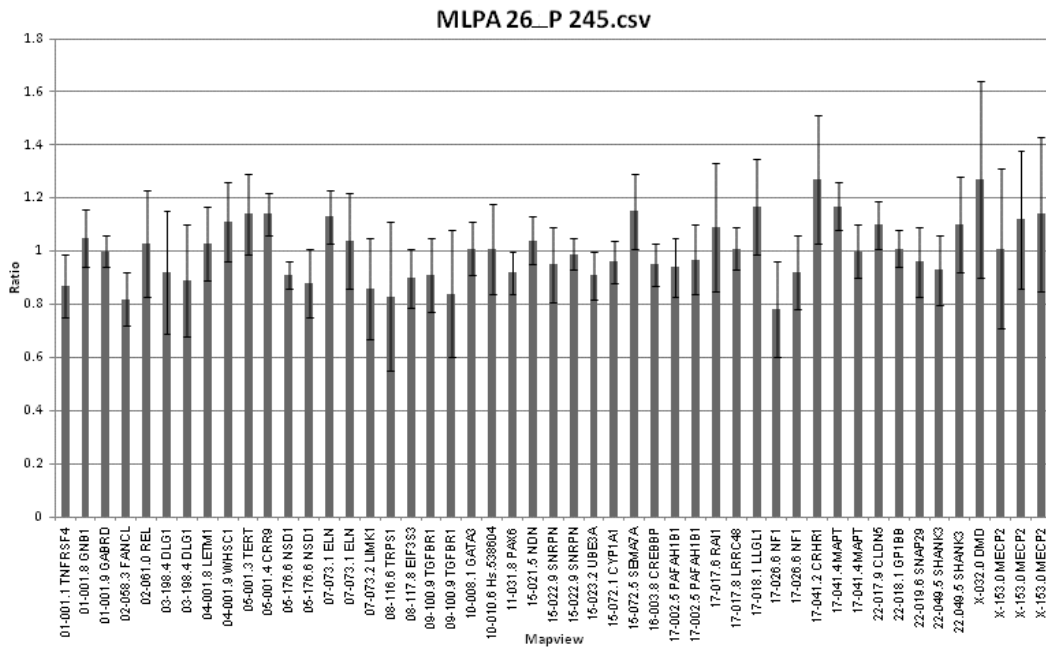
Tanı: Multiple konjenital anomali (MKA) A/T: Spondilokostal dizostozis?

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-51: Olgu 26' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-52: Olgu 26' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 27**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:30, gebelik haftası:32, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, hipotelorizm, solda renal fossa boş (pelvik böbrek?), atrio ventriküler septal defekt, dizler belirgin, bacak kasları atrofik, alın geride

Uygulanan Girişim: Fetal kan örneklemesi

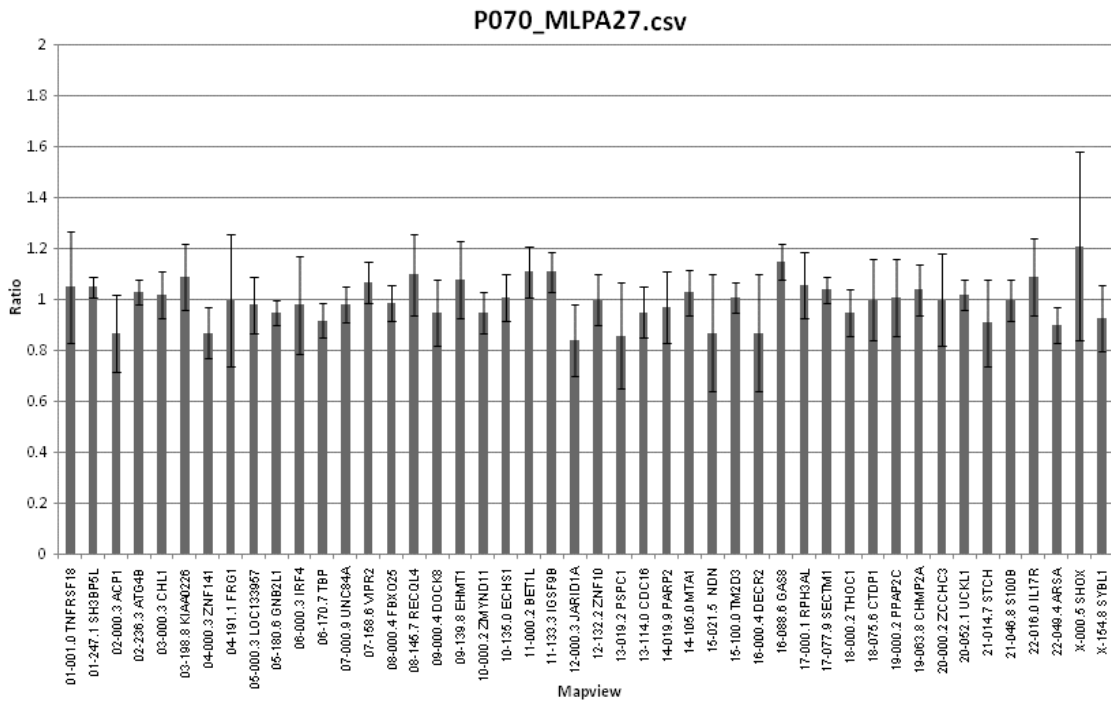
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

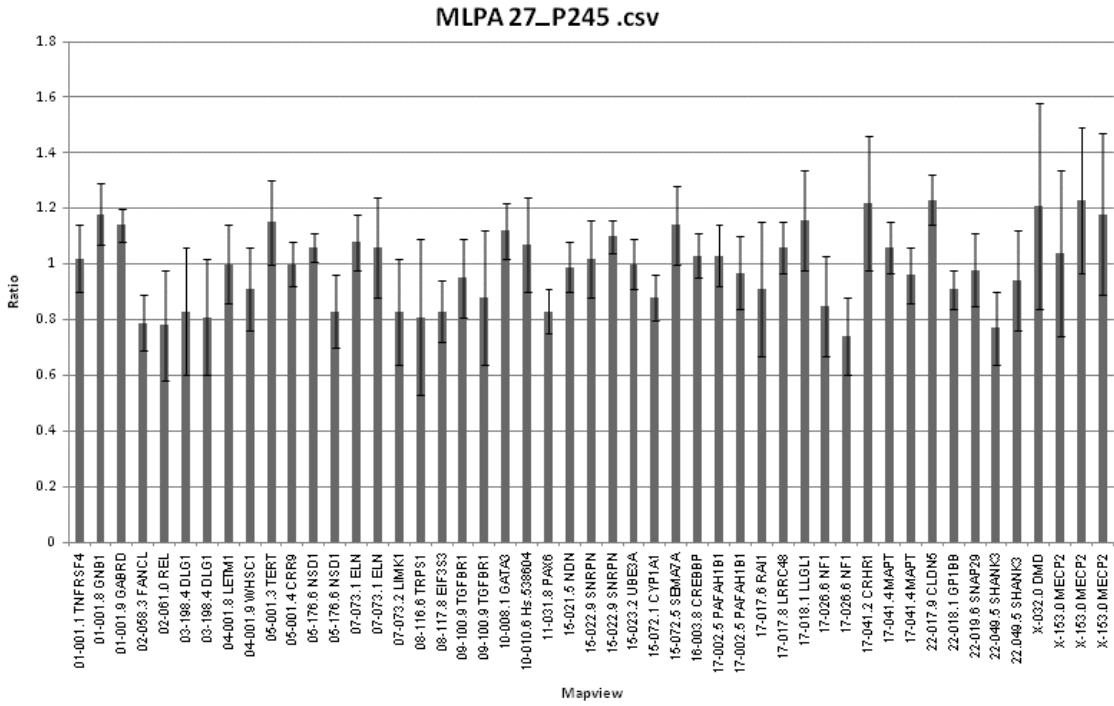
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-53: Olgu 27' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-54: Olgu 27' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 28

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:35, gebelik haftası:19, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı, ICSI gebeliği

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, tek umbilikal arter, bilateral ventrikülomegali, interhemisferik fissürde 4,5x9 mm kistik lezyon, basık burun yüksek ve düz alın, sakral hiperekojenik lezyon (tail?)

Uygulanan Girişim:Amniosentez

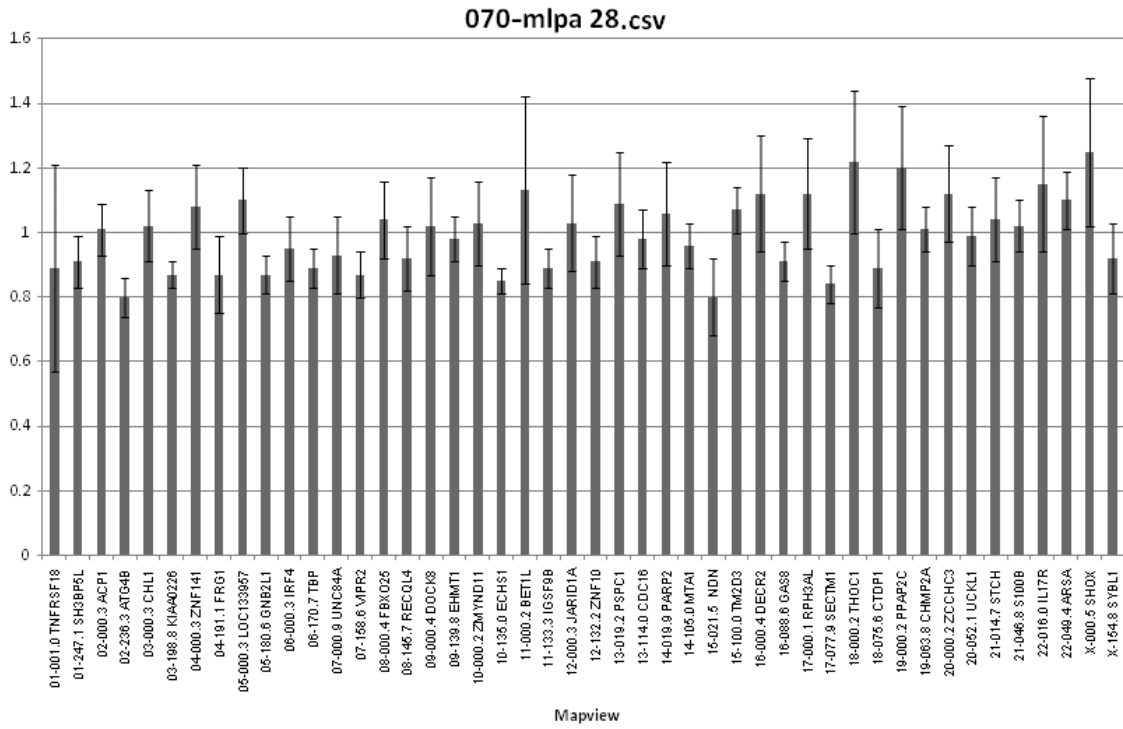
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücreleri (doğrudan)

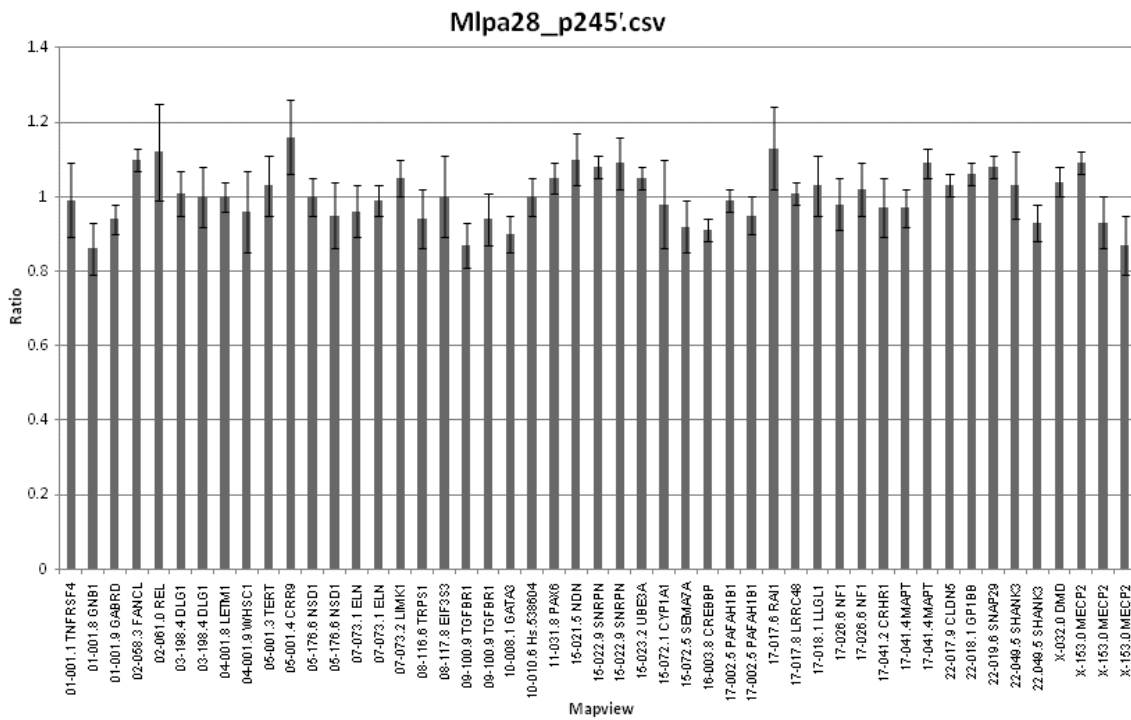
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-55: Olgu 28' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-56: Olgu 28' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 29**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:29, gebelik haftası:22, 1,5° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, oligohidramnios (ikiz gebelik, diğer fetusda tek umbilikal arter bulgusu)

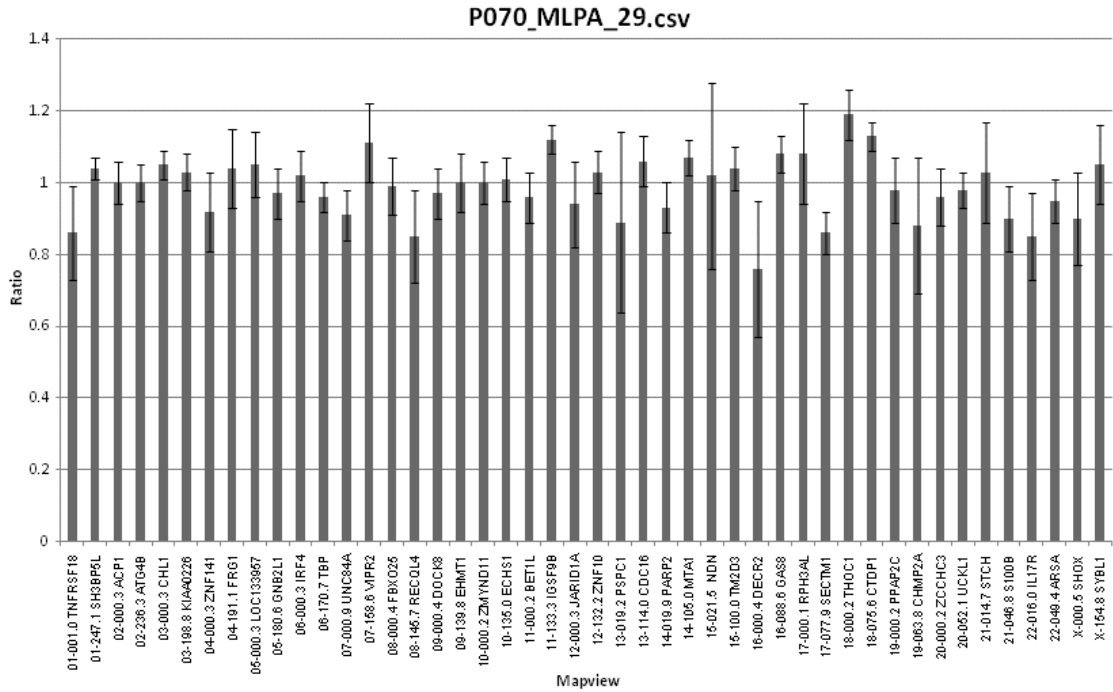
Uygulanan Girişim:Korionik villus örneklemesi**Fetal Karyotip:** 46,XX**DNA kaynağı:** KVÖ kültürü

İzlem:Tek umbilikal arter bulgusu olan ikiz eşinde yapılan amniosentez sonrası normal karyotip (46,XY) saptandı

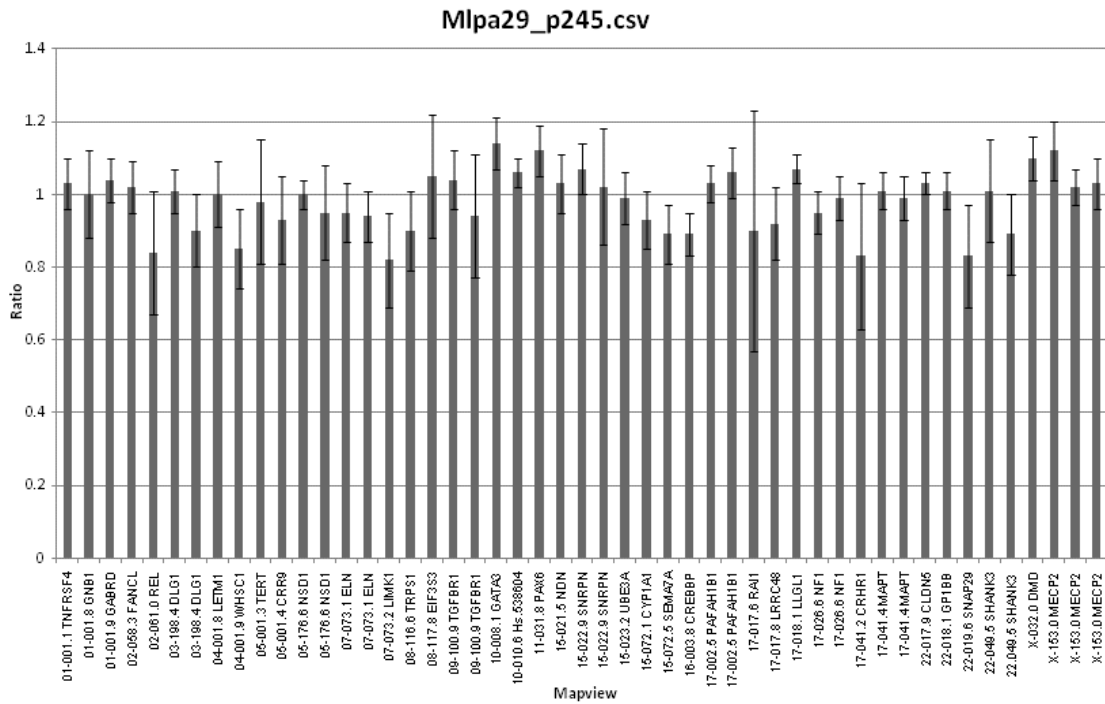
Prematür doğum ve neonatal ölüm, muayene ve otopsi yapılamadı

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-57: Olgu 29' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-58: Olgu 29' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 30

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:31, gebelik haftası:18, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, lateral ventrikülomegali, oligohidramnios, hiperekojen barsak, umbilikal arterde end diastolik akım kaybı, plasentada yaygın kanama odakları,

Uygulanan Girişim:Korionik villus örneklemesi

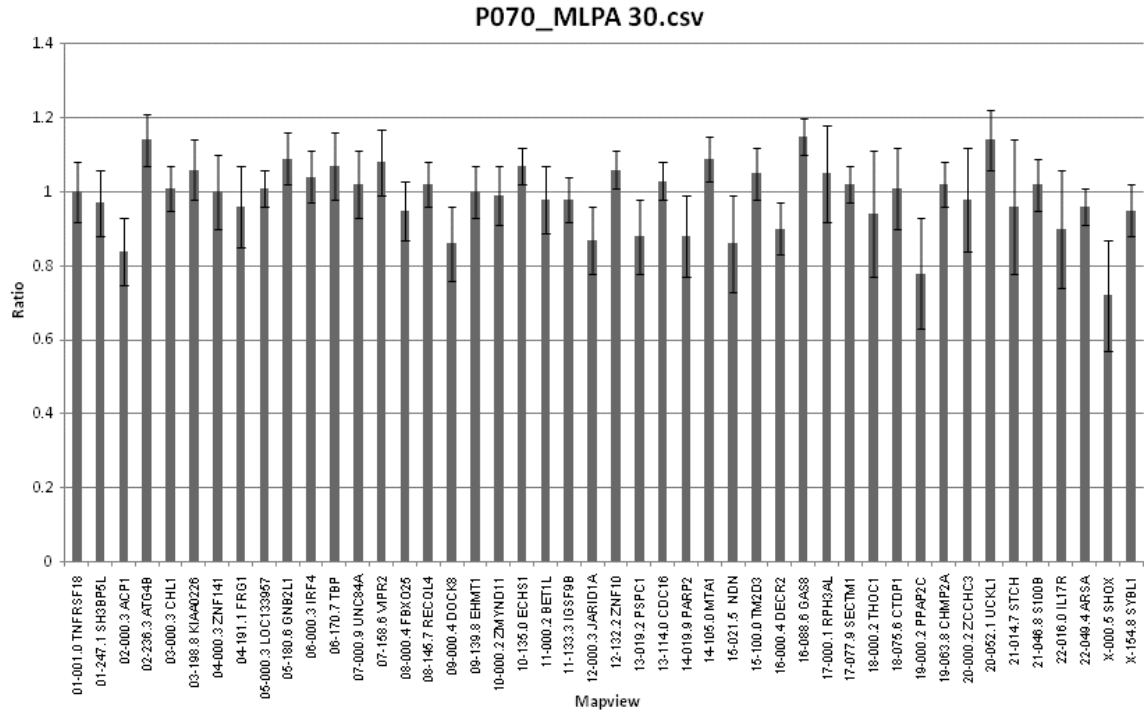
Fetal Karyotip: 46,XX

DNA kaynağı: KVÖ kültürü

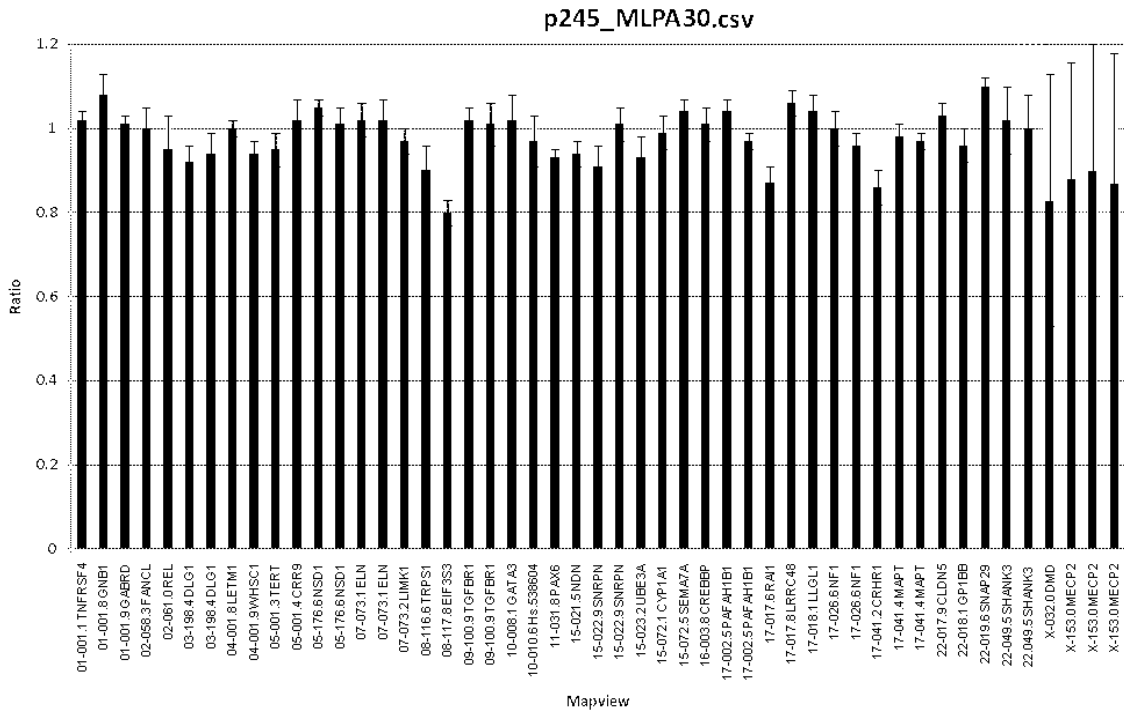
İzlem:Tıbbi tahliye olan fetus, muayene ve otopsiye alınamadı

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-59: Olgu 30' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-60: Olgu 30' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU31**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:27, gebelik haftası:31, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Hipoplastik sağ ventrikül, geniş ventriküler septal defekt, triküspit kapaklarda atrezi

Uygulanan Girişim:Fetal kan örneklemesi

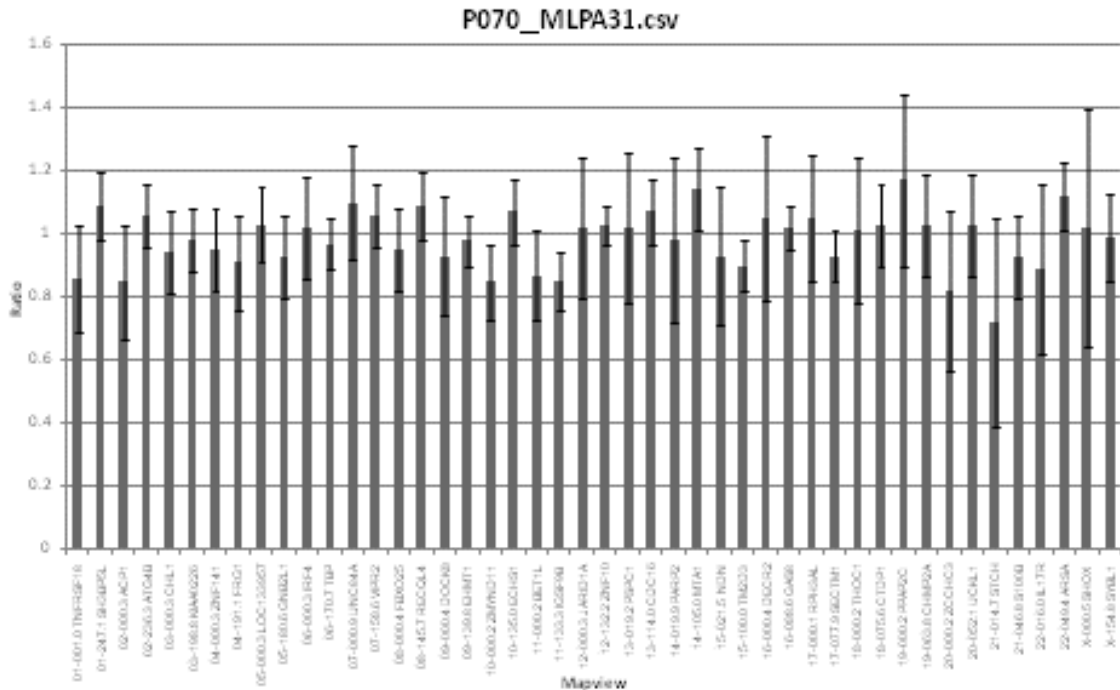
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

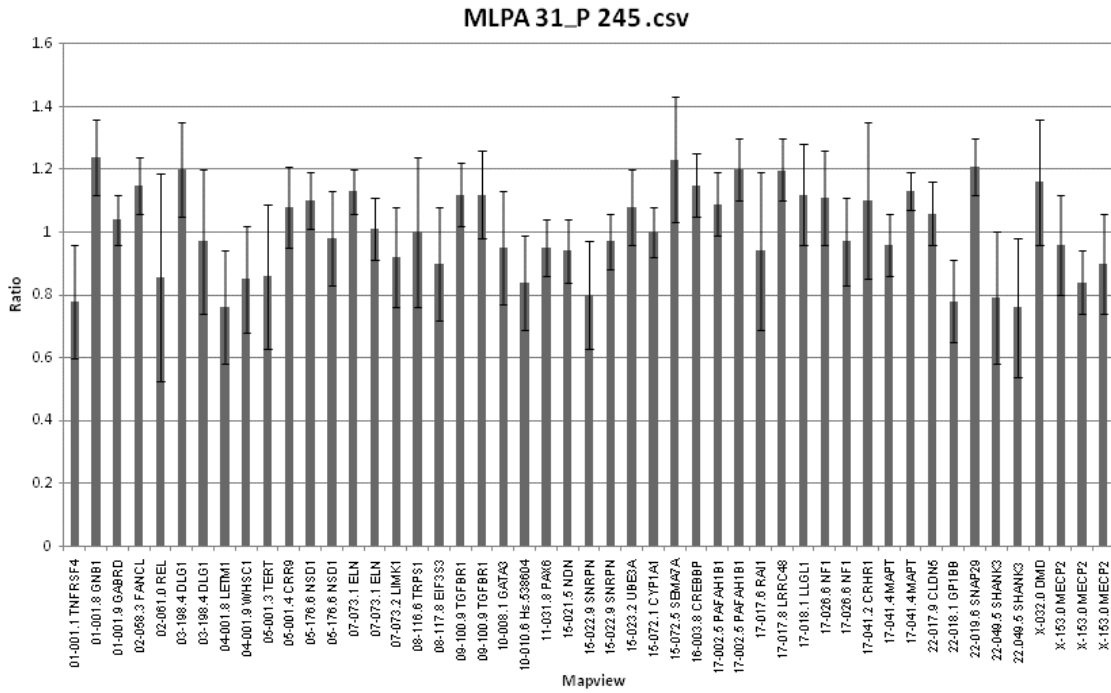
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-61: Olgu 31' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-62: Olgu 31' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 32

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:33, gebelik haftası:24, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, oligohidramnios, hiperekojen intestin, hiperekojen kardiak odak, her iki uterin arterde notch

Uygulanan Girişim:Korionik villus örneklemesi

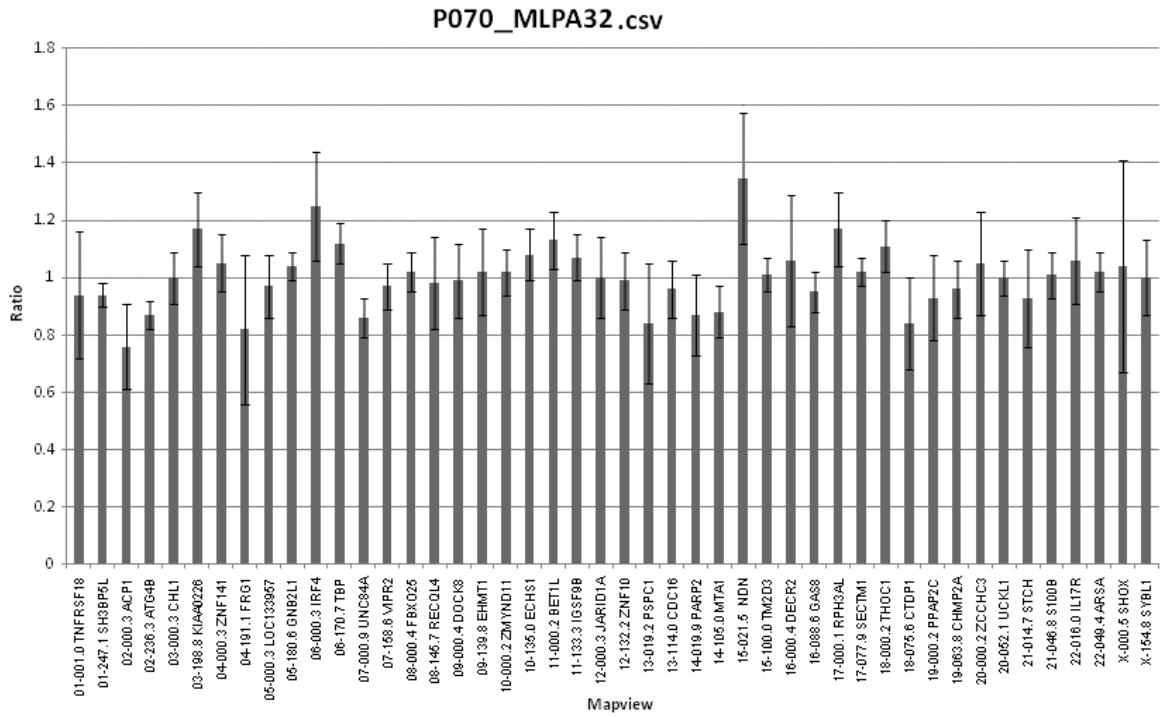
Fetal Karyotip: 46,XX

DNA kaynağı: KVÖ kültürü

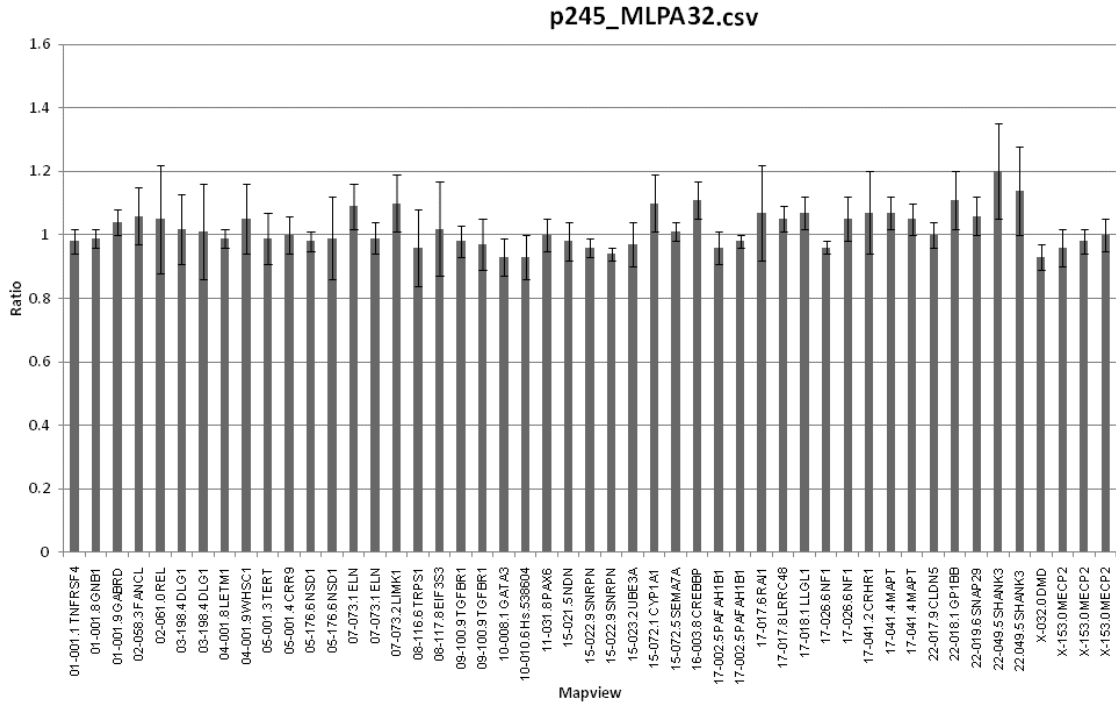
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-63: Olgu 32' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-64: Olgu 32' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 33**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:22, gebelik haftası:22, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, kötü obstetrik öykü (4 gebelik kaybı)

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, solda multikistik böbrek, sağ böbrekte basit tek kist

Uygulanan Girişim:Fetal kan örneklemesi

Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

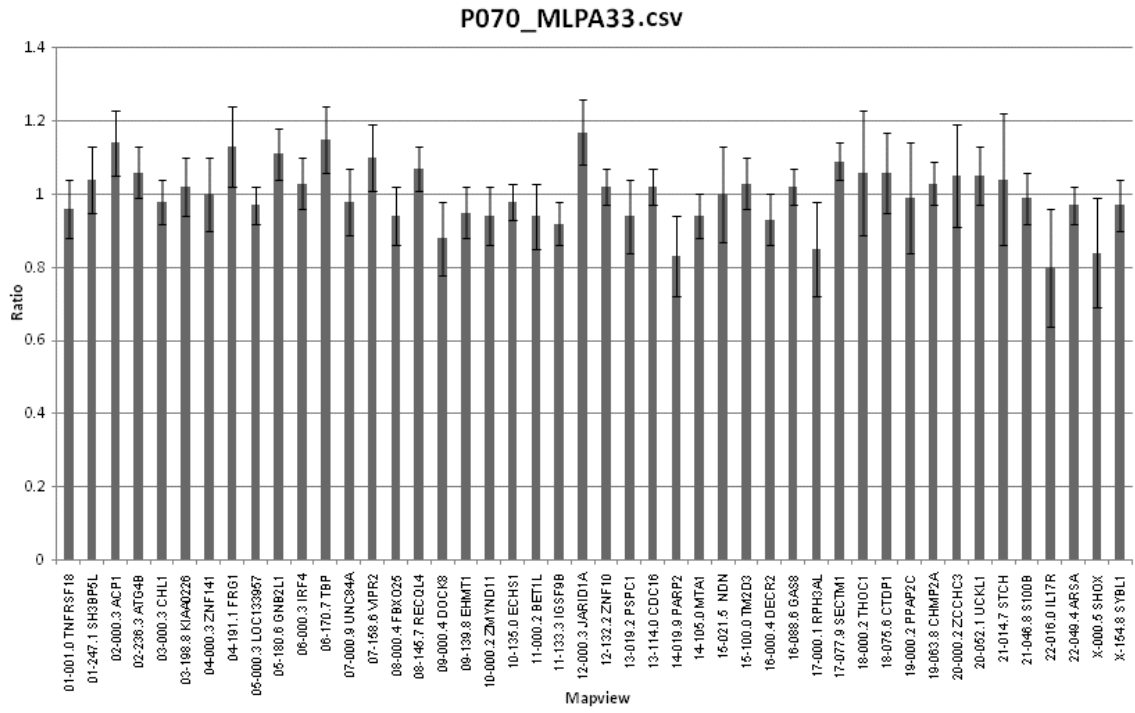
İzlem:38. Haftada 1300gr normal doğum, doğum sonrası muayenede; 6ay 10 günlük muayene bulguları: patent ductus arteriosus(opere), patent foramen ovale, büyüme gelişme geriliği, mikrosefali, multikistik displastik sol böbrek, dismorfizm (brakisefali, düz oksiput, frontal bossing, bitemporal darlık, hafif yüksek damak, sol elde çentikli simian ve hokey çizgisi), anormal iskelet bulguları (kısa ve ön arka çapı artmış göğüs kafesi, kalkın göğüs, bilateral ayak 2. parmaklar 1. ve 3.parmakların üzerinde, sakral kemiktedikey çizgilenme, sakral gamze)

Tanı: Multiple konjenital anomali/Mental retardasyon?

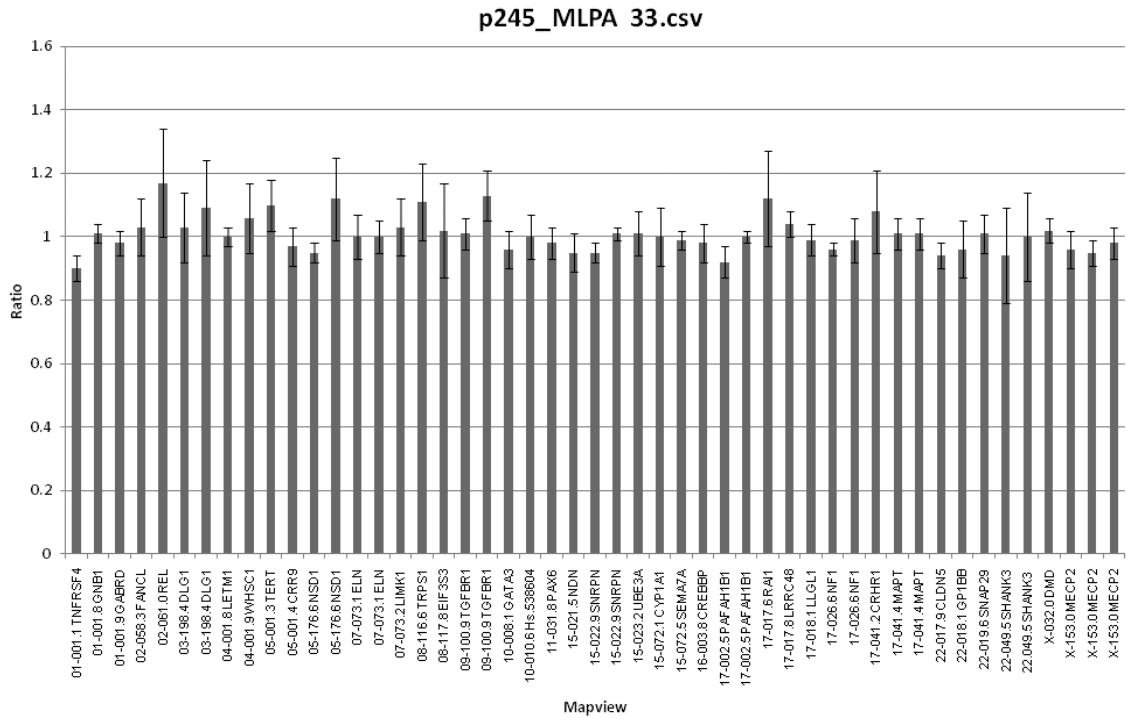
Ayırıcı tanı:Asfikse edici torasik distrofi

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-65: Olgu 33' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-66: Olgu 33' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 34

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:29, gebelik haftası:20, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Bilateral borderline ventrikülomegali, her iki ayakta talipes, solda dudak- damak yarığı, 3.ventrikül üstünde interhemisferik kist, persistan sol vena kava superior

Uygulanan Girişim:Amniosentez

Fetal Karyotip: 46,XY.ish 22.q11.2 (D22S75x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü (yeterli DNA elde edilemedi)

İzlem:Tahliye sonrası muayene; ense derisi bol, kaşlar belirgin yay şeklinde, sinofiris mevcut, hipertelorizm,palpebral fissürler yukarı çekik,burun kökü basık,solda burun deliğine kadar uzanan yarık dudak, komple yarık damak,.bilateral el 5. parmaklarda klinodaktili, 2., 3., 4. ve 5. el parmakları kısa, baş parmaklar uzun ve geniş,. ayaklarda bilateral peskinovarus, sağda plantar çizgi. Alt ekstremiteler hipomelik görünümde, skrotum hipoplastik (AT: akrofrontofasiyonazal dizostosis?)

Yeterli DNA elde edilemediği için MLPA çalışması yapılamadı

MLPA Sonucu;Yeterli DNA elde edilemediği için MLPA çalışması yapılamadı.

OLGU 35

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:22, gebelik haftası:18, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, 1. trimester tarama testinde 1:287 Down Sendromu riski

Ultrason Bulguları: Erken başlangıçlı intrauterin gelişme geriliği (utero-plasental yetmezlik?), hiperekijen barsak,ductus venosus dopplerine ters A dalgası,umblikal arter

dopplerinde end diastolik akım kaybı, sağ uterin arter dopplerinde notch, amniyotik mayii volümünde azalma

Uygulanan Girişim: Amniosentez

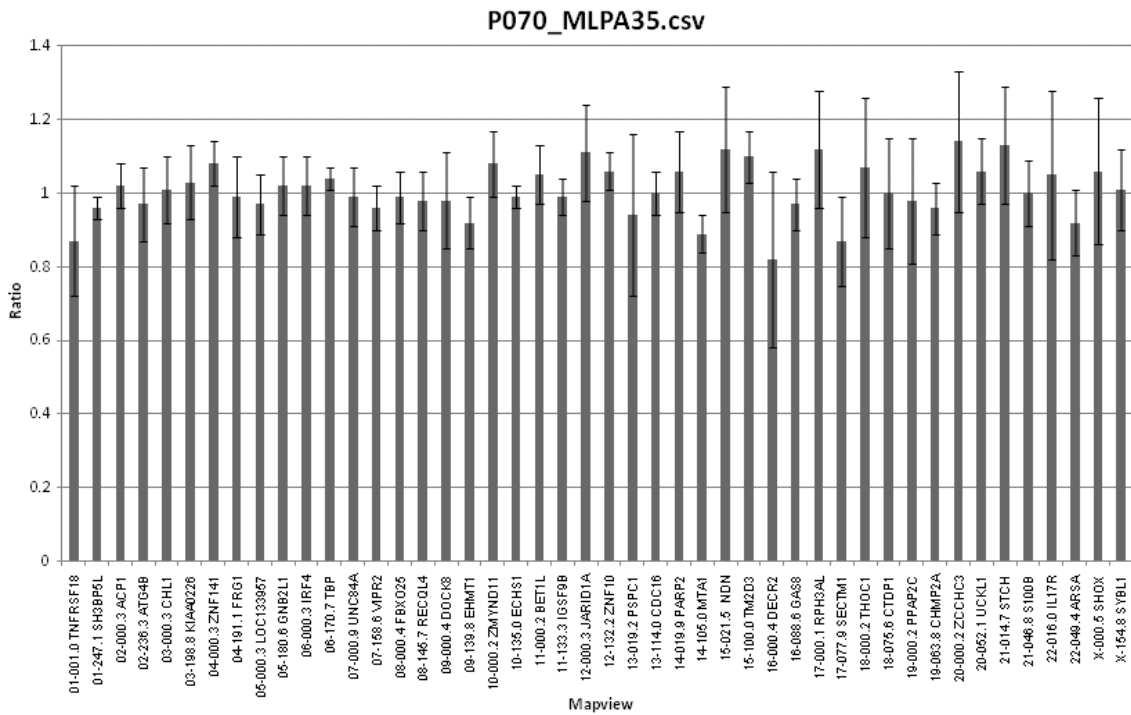
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

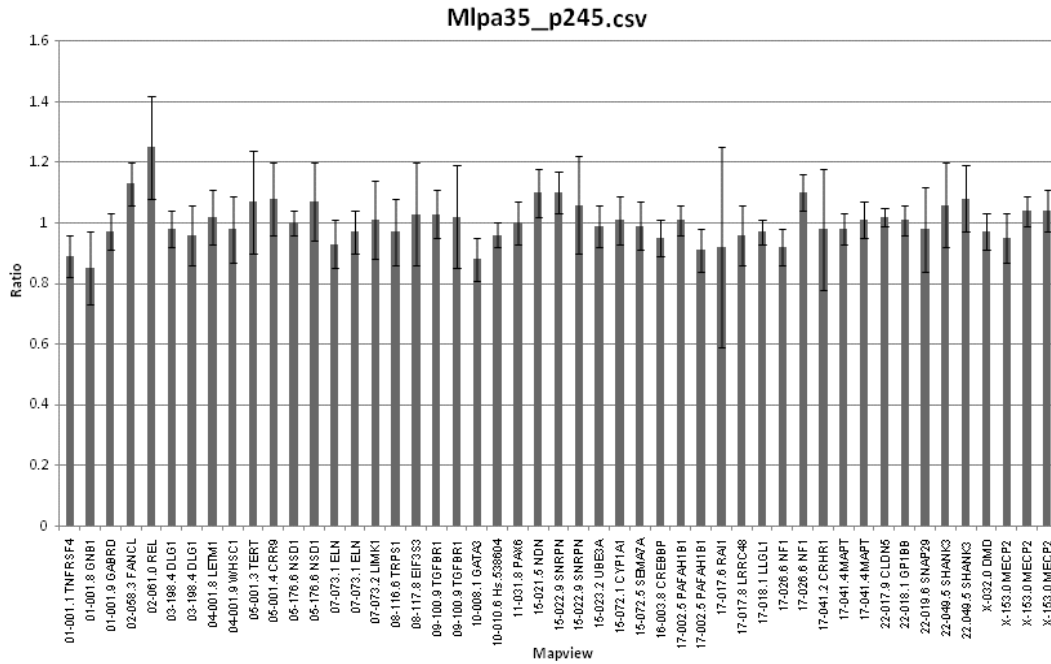
İzlem: Tahliye sonrası muayene; kaş ve kirpikler beyaz, büyük ağız, filtrum öne çıkık, bilateral pes planus

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-67: Olgu 35' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-68: Olgu 35' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 36

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:19, gebelik haftası:21, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Anhidramnios, tek umbilikal arter, kalpte büyük arter transpozüsyonu, ventriküler septal defekt

Uygulanan Girişim:Korion villus örnekleme

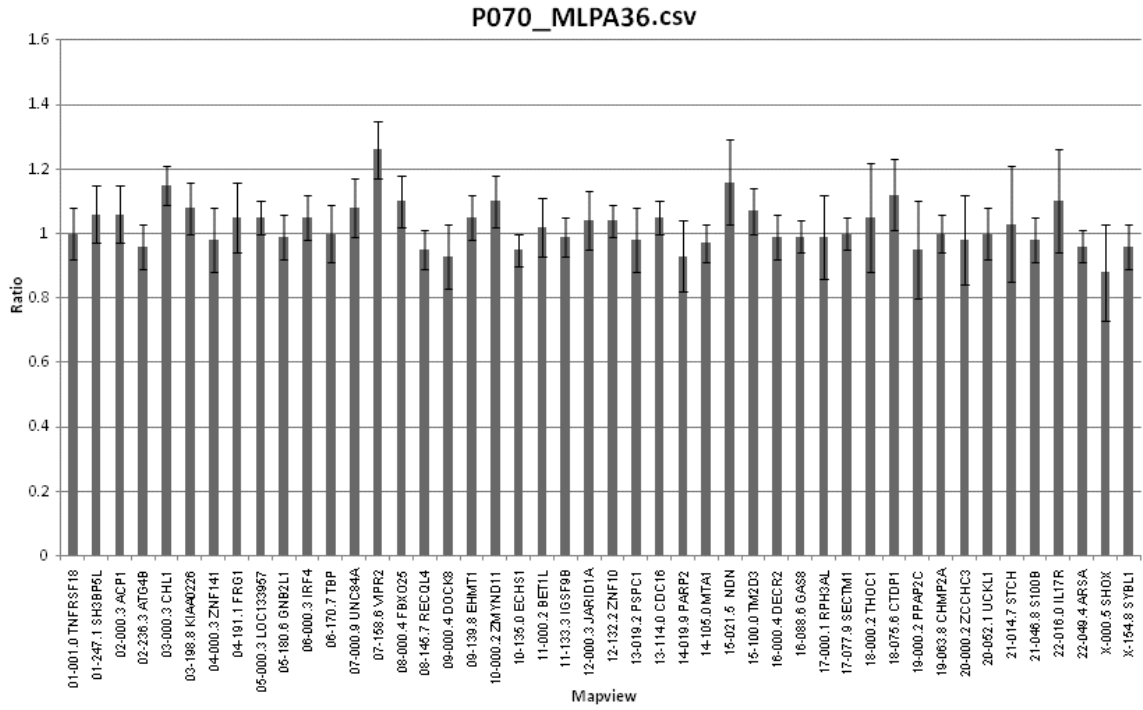
Fetal Karyotip: 46, XY. ish 22q11.2(D22S75x2)

DNA kaynağı: Korionik villus

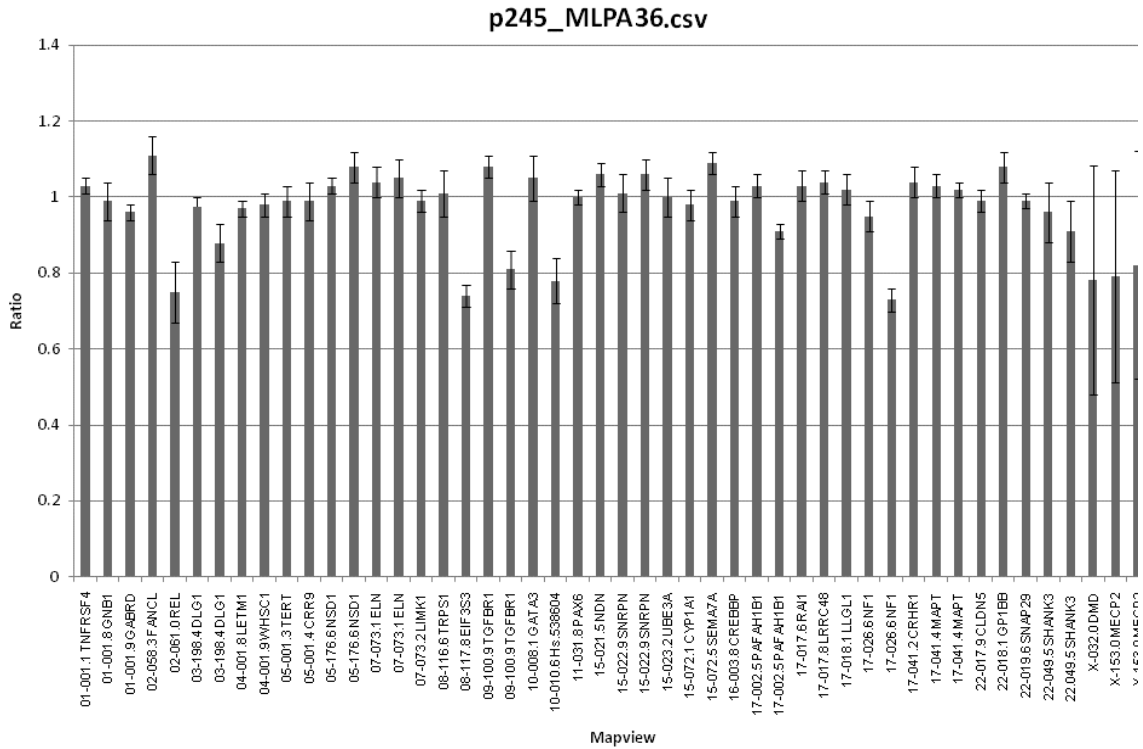
İzlem:Tahliye sonrası muayene ; alın dar geriye doğru, hipertelorizm, epikantus, geniş burun kökü ve kemeri, basık burun ucu, yüksek damak, sol kulak düşük ve heliks az gelişmiş, el ve ayaklarda perdelene, bilateral simian plantar çizgi, ayak 1. ve 2. parmaklar uzun, bilateral pes planus

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-69: Olgu 36' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-70: Olgu 36' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 37**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:25, gebelik haftası:20, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Erken başlangıçlı intrauterin gelişme geriliği (utero-plasental yetmezlik?), ductus venosus da A dalgası kaybı,

Uygulanan Girişim:Amniosentez

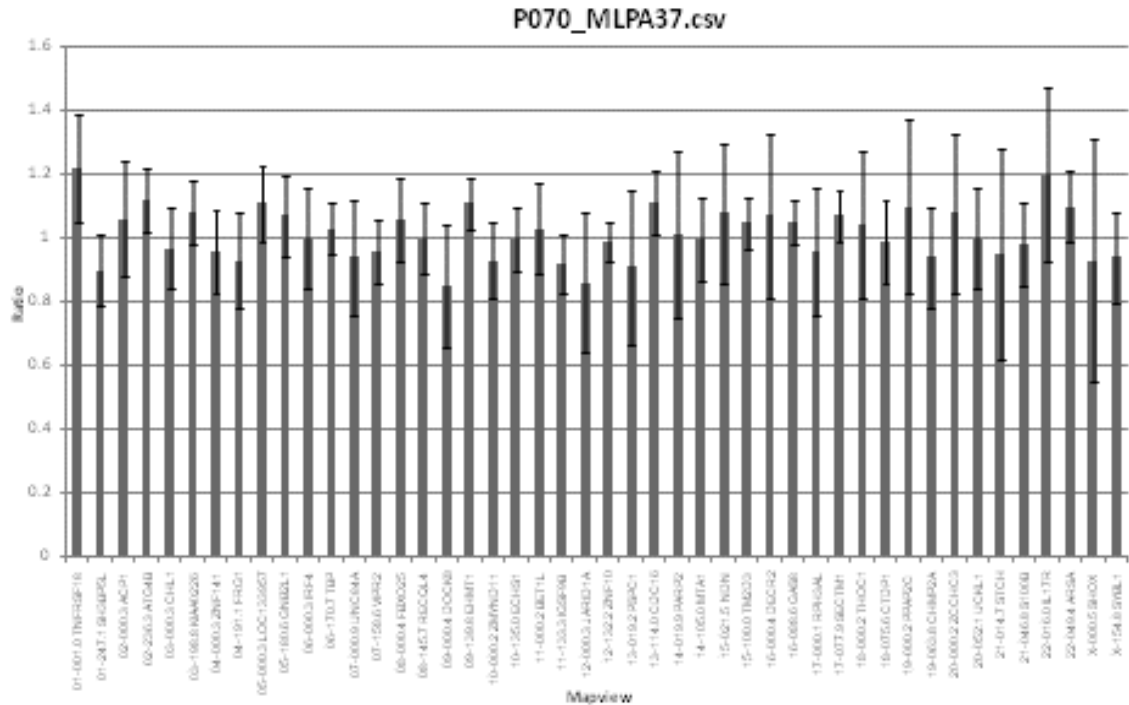
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

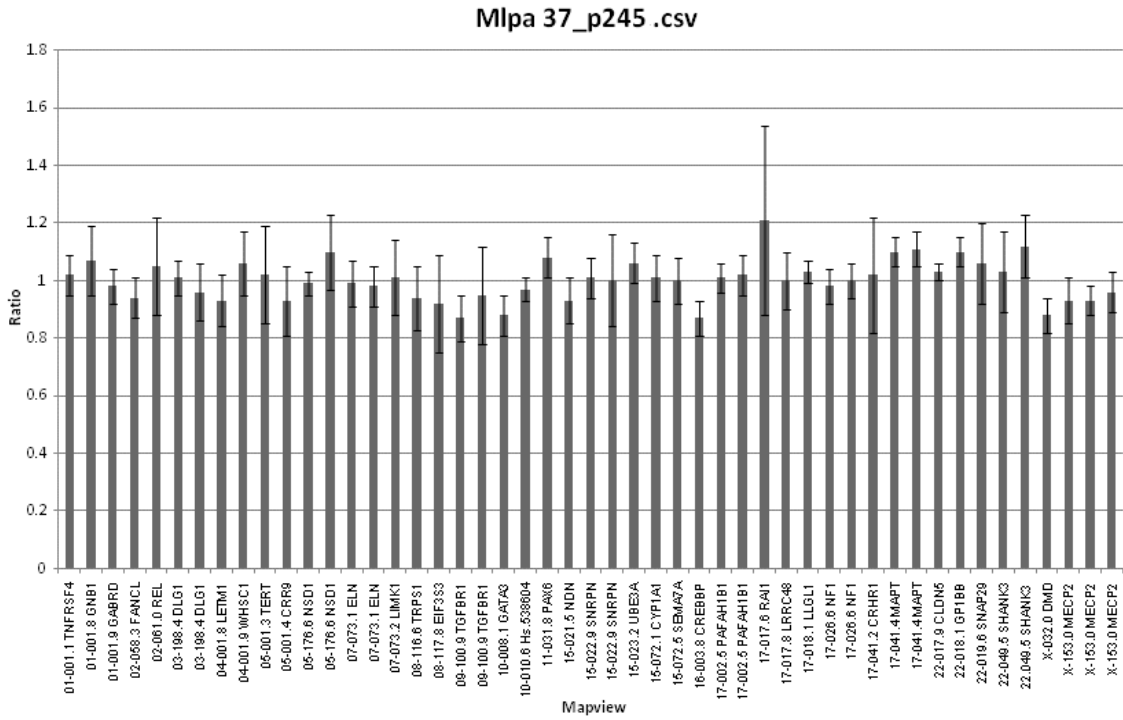
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-71: Olgu 37' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-72: Olgu 37' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 38

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:22, gebelik haftası:22, 1,5° kuzen evliliği (çift taraflı)

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, ikili testte 1:50 trizomi 18, 1:98 trizomi 21 riski, kötü obstetrik öykü (2 intrauterin ölüm, 1 anensefali nedeni ile tıbbi tahliye)

Ultrason Bulguları: İnterhemisferik 2 adet kist (şizensefali?), bilateral ventrikülomegali, serebellum hipoplazik, diyafragma hernisi, ense plisi kalınlığında artış

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

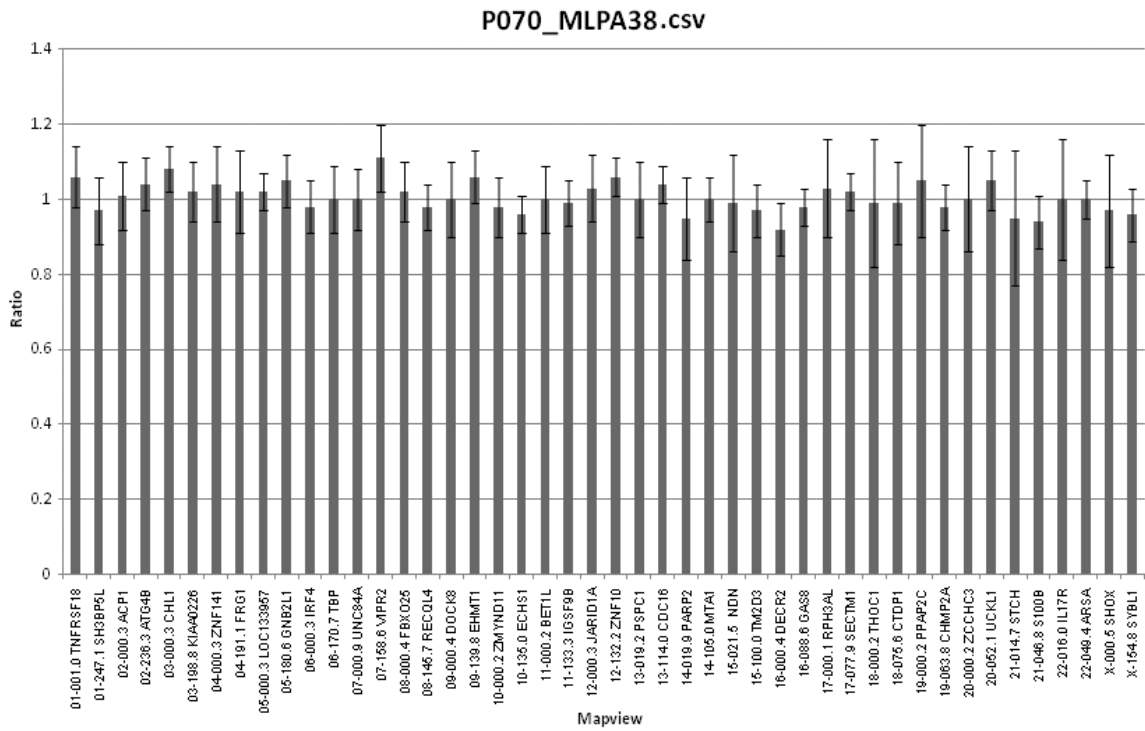
İzlem: Tahliye sonrası muayene; maserasyon nedeni ile dismorfoloji tam olarak değerlendirilememiş. Glabella ve burun kökü belirgin, balık ağzı mevcut, ense derisi bol, kollarda minimal alt segmentte belirgin kısalık mevcut, ayak parmaklarında pozüsyon

anomalisi, Röntgen; L3-L4 korpusları solda füzyon oluşturmuş, tibialarda minimal kısalık mevcut.

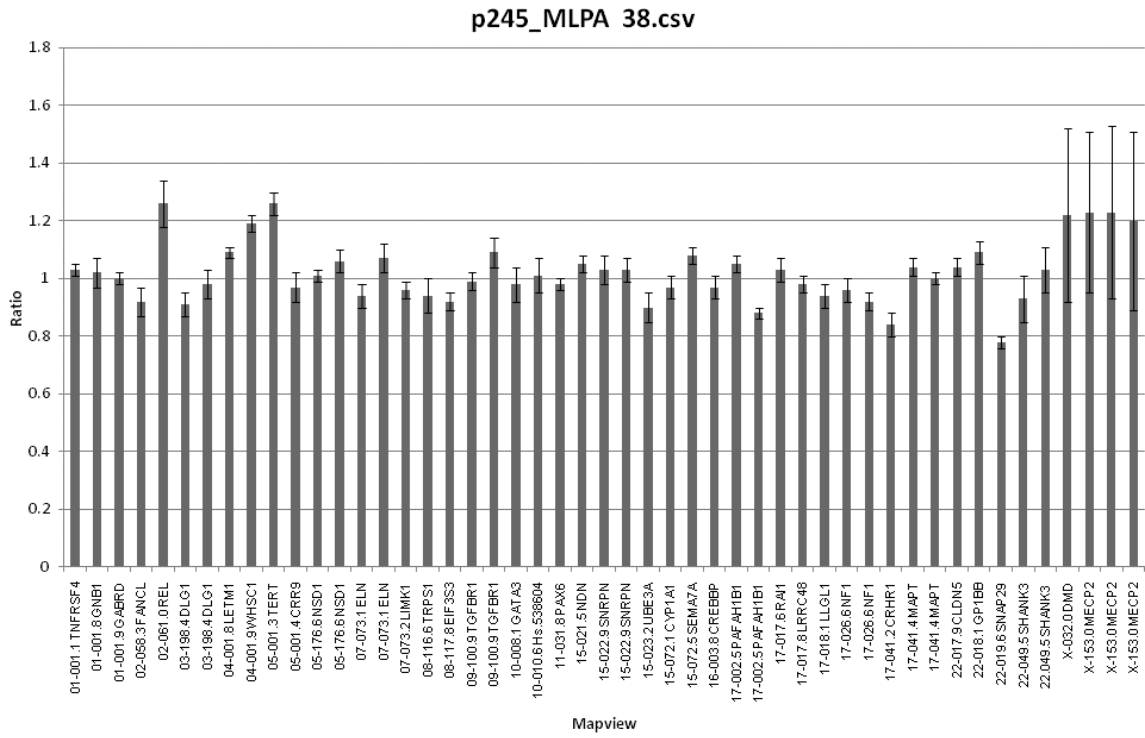
Otopsi sonucu; solda diyafragma hernisi, dalak mide ince barsaklar toraks içerisinde sol tarafta yerleşimli, kalp sağa doğru itilmiş, solda belirgin olmak üzere akciğer hipoplazisi, bikornus uterus, beyin sol lateral ventrikül çok geniş, sol tarafta parenkim incelmış, ense derisi kalın. Yaygın otoliz nedeni ile mikroskopik inceleme yapılamamış. Makroskopik anatomik tanı: solda diyafragma hernisi, solda belirgin pulmoner hipoplazi

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-73: Olgu 38' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-74: Olgu 38' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 39

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:26, gebelik haftası:23, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Erken başlangıçlı intrauterin gelişme geriliği, oligohidramnios

Uygulanan Girişim:Korionik villus örneklemesi

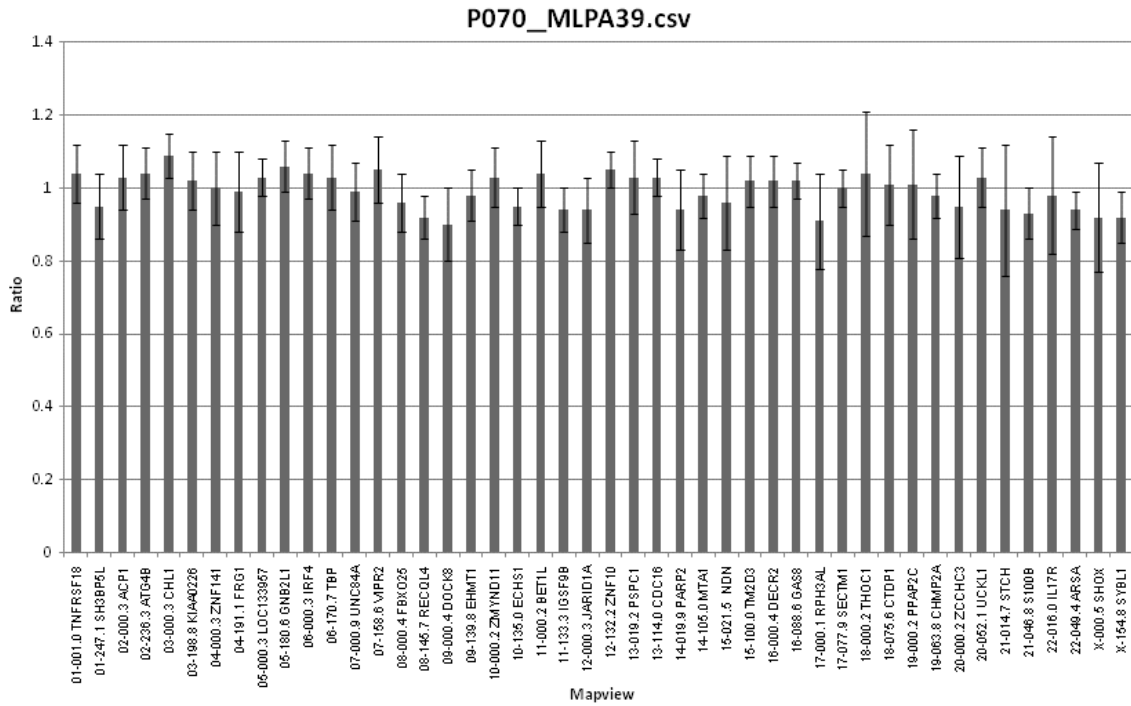
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Korionik villus

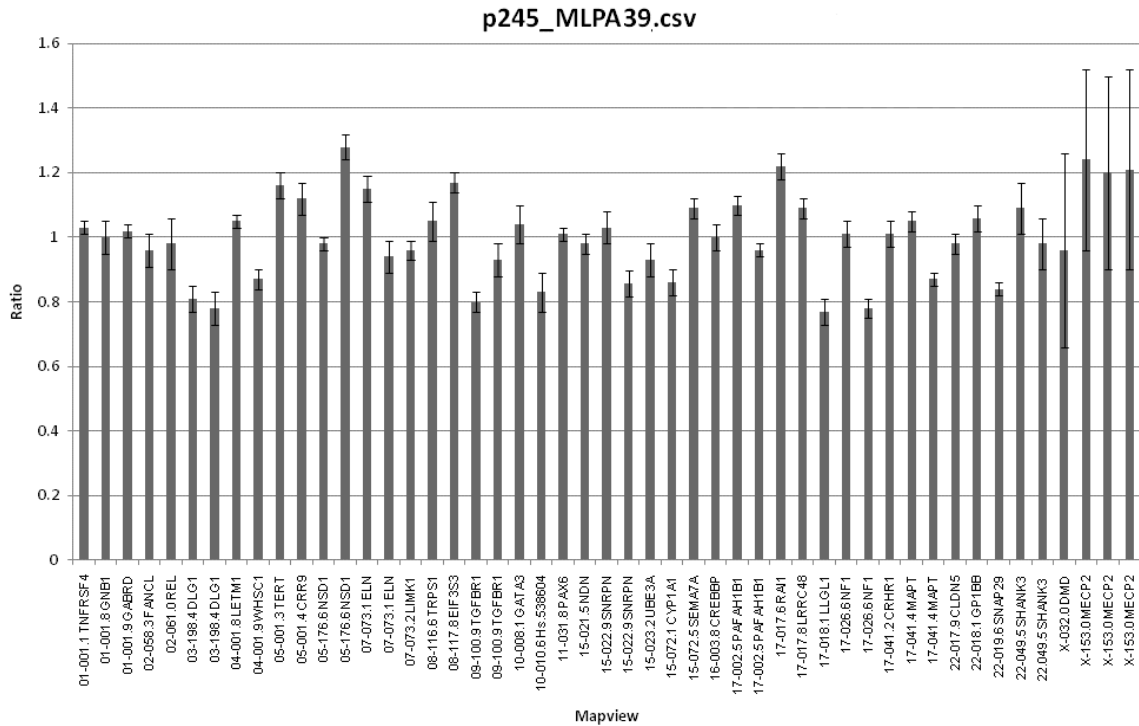
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlp (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-75: Olgu 39' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-76: Olgu 39' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 40**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:24, gebelik haftası:18, 2° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, oksipital ensefalosel, Dandi Walker varyantı, lateral ventriküller ve 3. ventrül dilate, arka fossa kapalı, oligohidramnios (dikoryonik diamniyotik ikiz gebelik, diğer fetus usg bulguları normal)

Uygulanan Girişim:Amniosentez

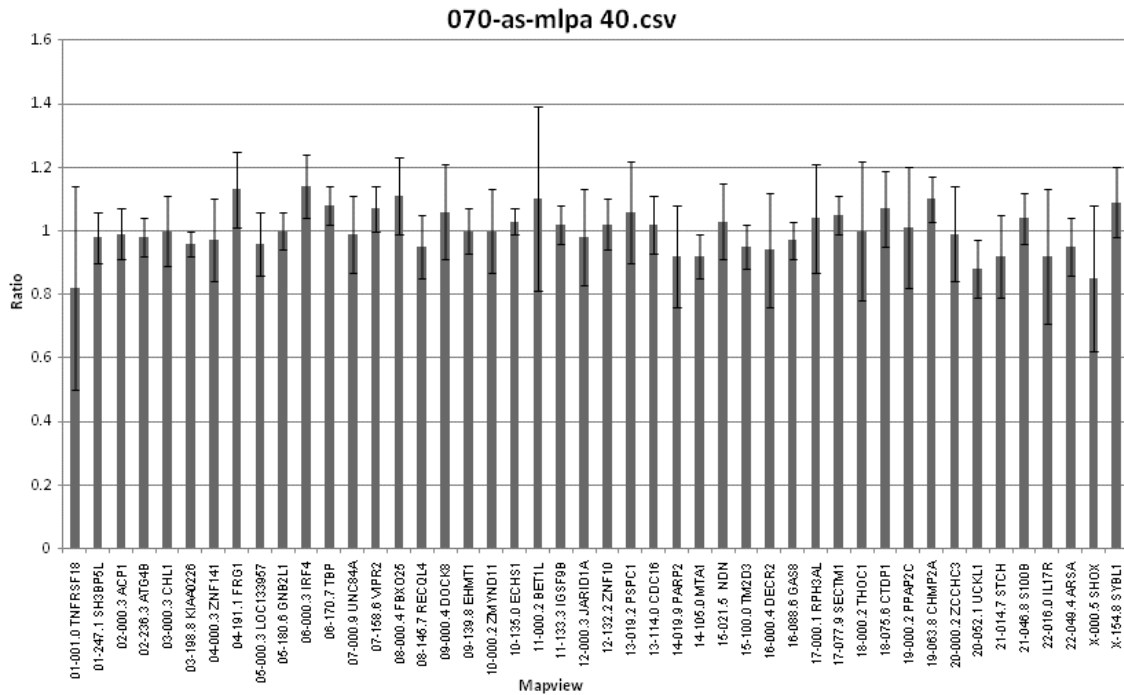
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

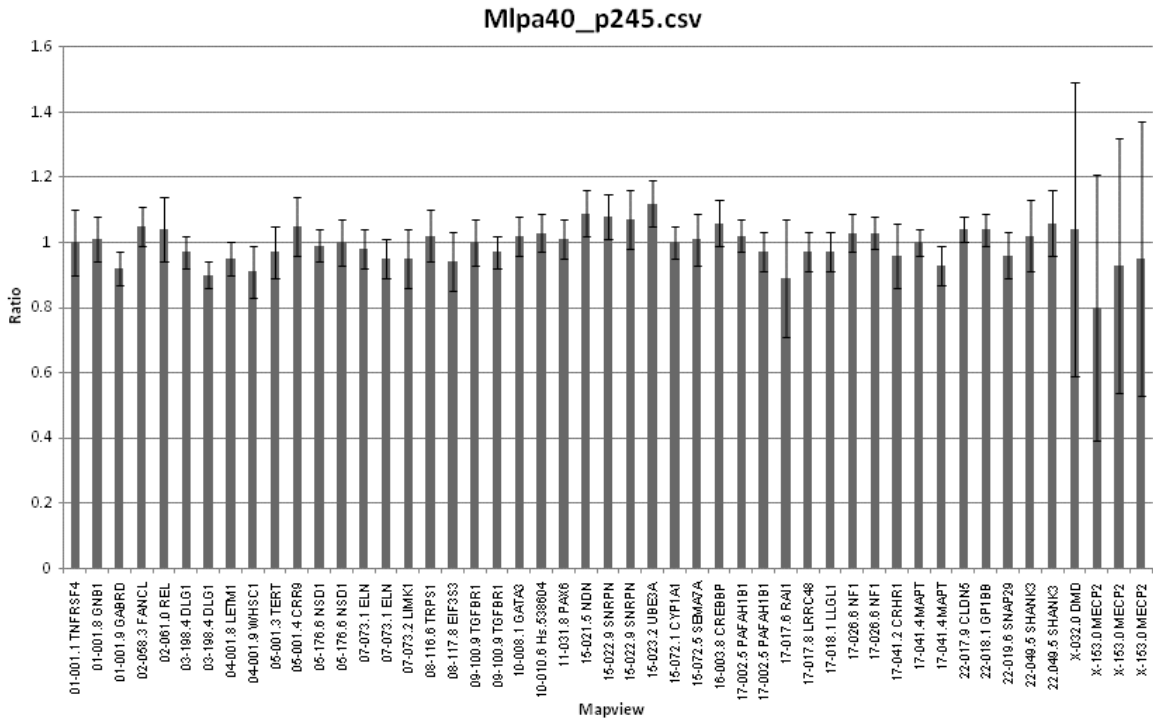
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-77: Olgü 40' ın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-78: Olgu 40' ın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 41

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:24, gebelik haftası:23, ?° uzak kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, hiperekojen intestin, hiperekojen kardiak odak

Uygulanan Girişim:Fetal kan örneklemesi

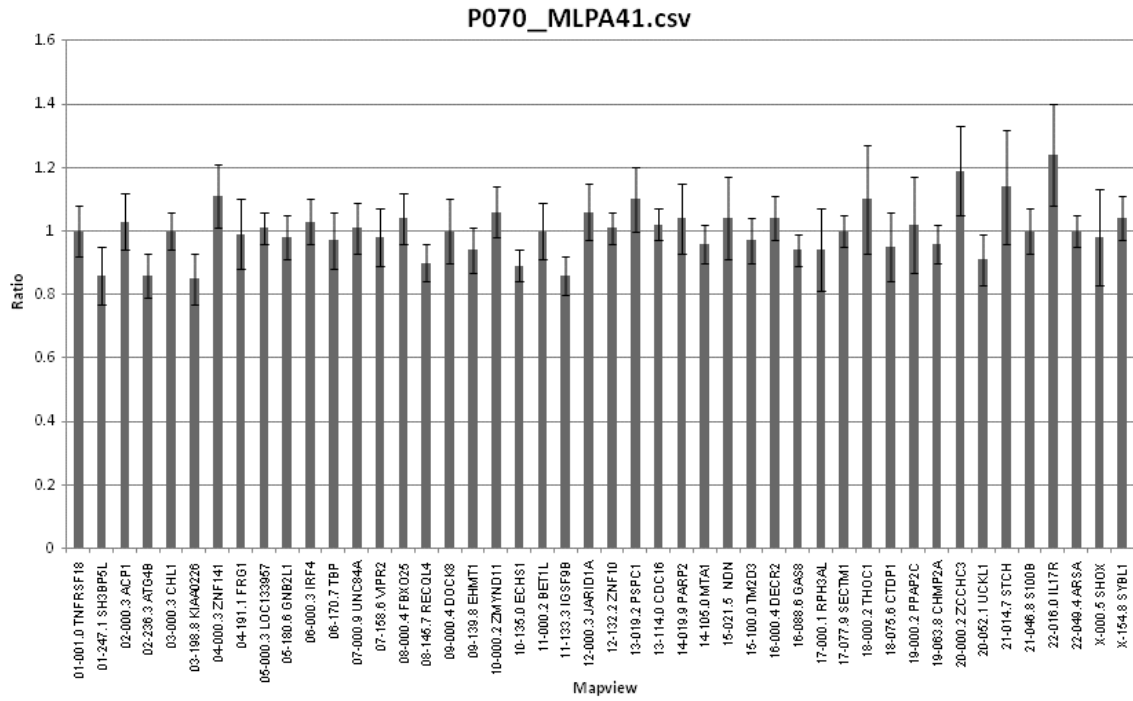
Fetal Karyotip: 46, XY

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

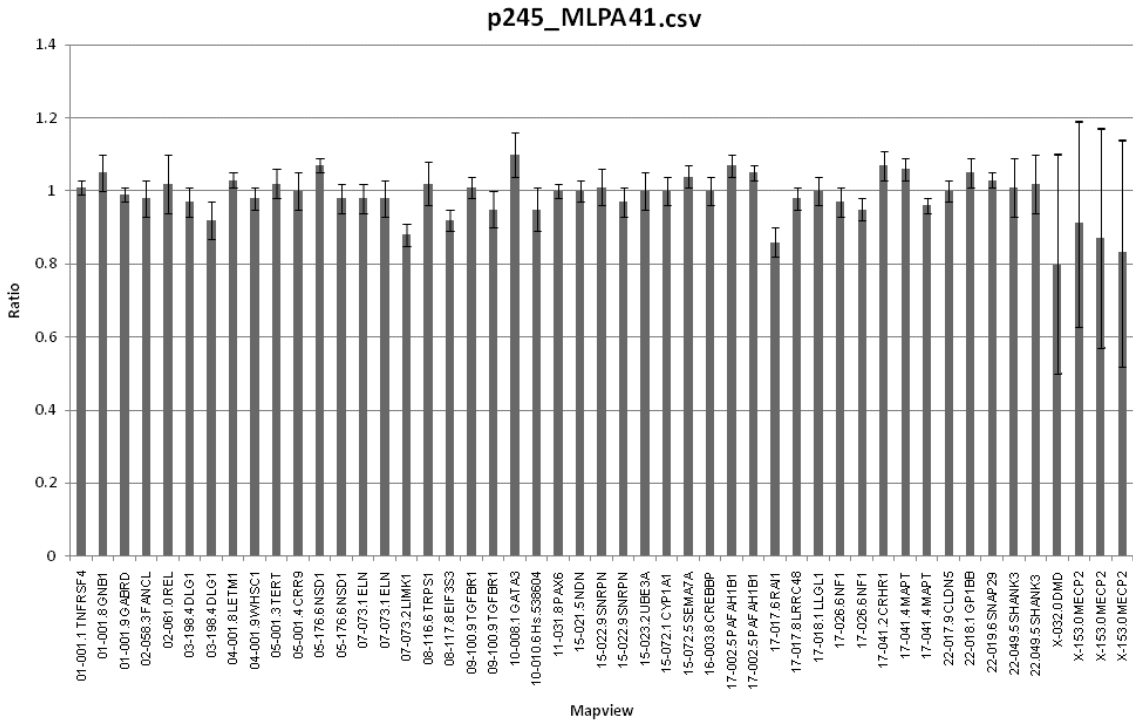
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-79: Olgu 41' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-80: Olgu 41' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 42**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:21, gebelik haftası:28, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Geniş ventriküler septal defekt, pulmoner stenoz, triküspit atrezisi, küçük sağ atriyum, hafif asit, ductus venozusta A dalgası kaybı, batında minimum asit

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

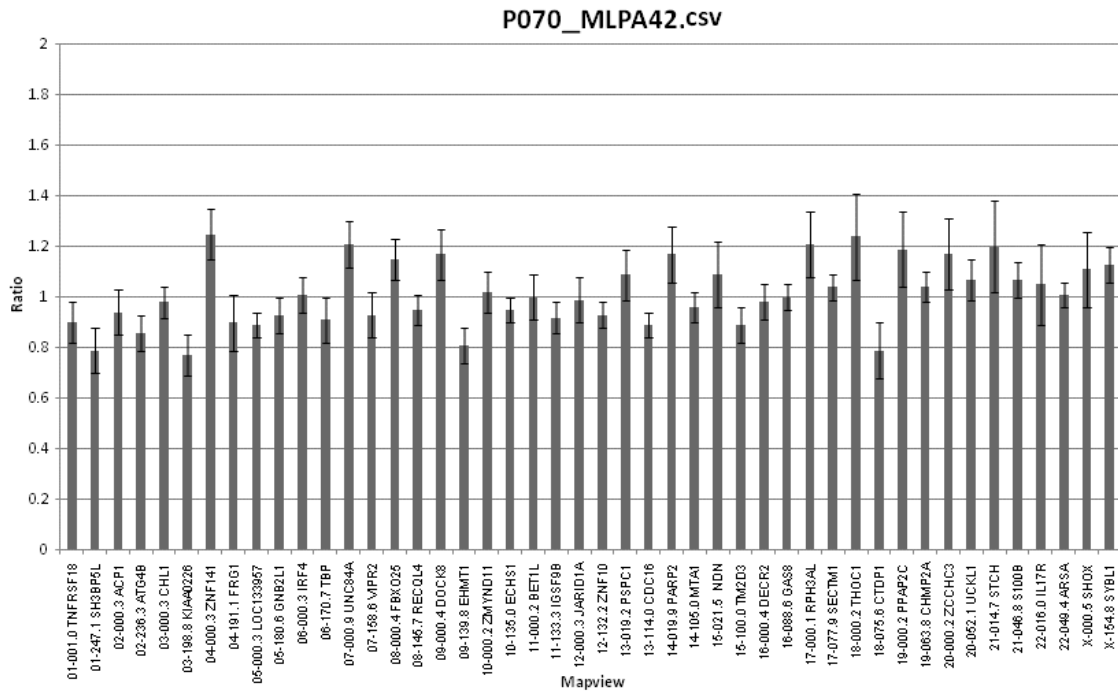
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2), ish 22q11.2(D22S75x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

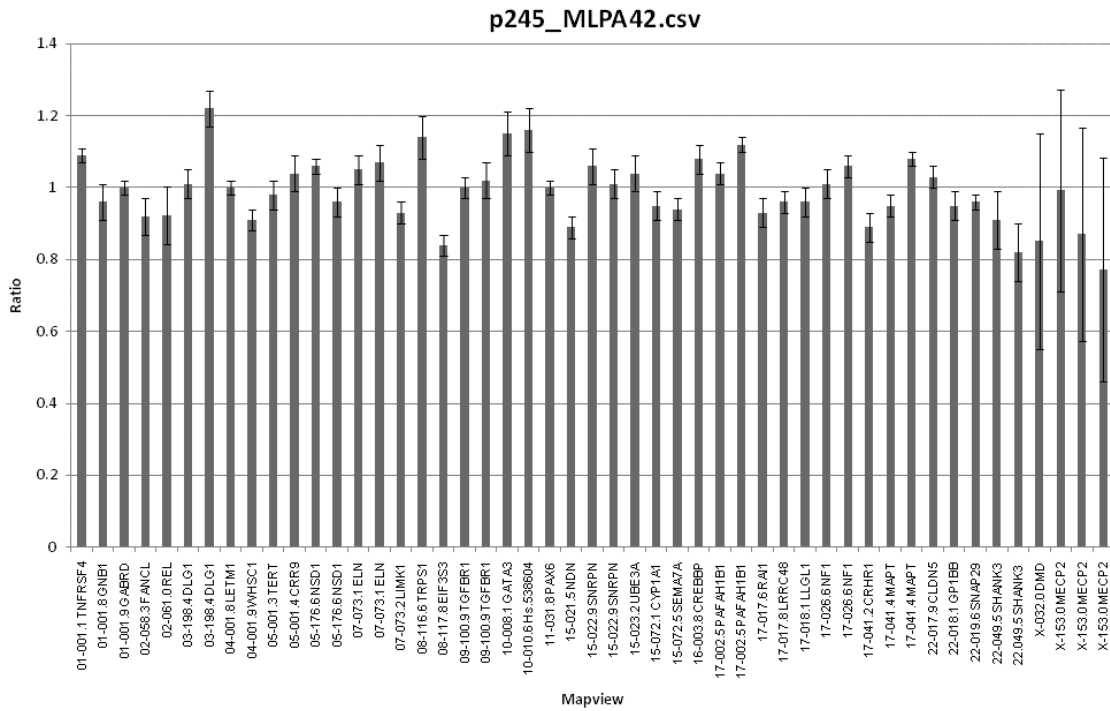
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-81: Olgu 42' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-82: Olgu 42' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 43

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:22, gebelik haftası:23, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, Dandy Walker varyantı, perikardiyal effüzyon, umbilikal arter end diastolik akım kaybı, ductus venosus da ters A dalgası, ambiguous genitali, kardiomyohipertrofi, kardiomegali (monokoryonik, diamniyotik ikiz gebelik, diğer fetusda normal usg bulguları)

Uygulanan Girişim:Amniosentez

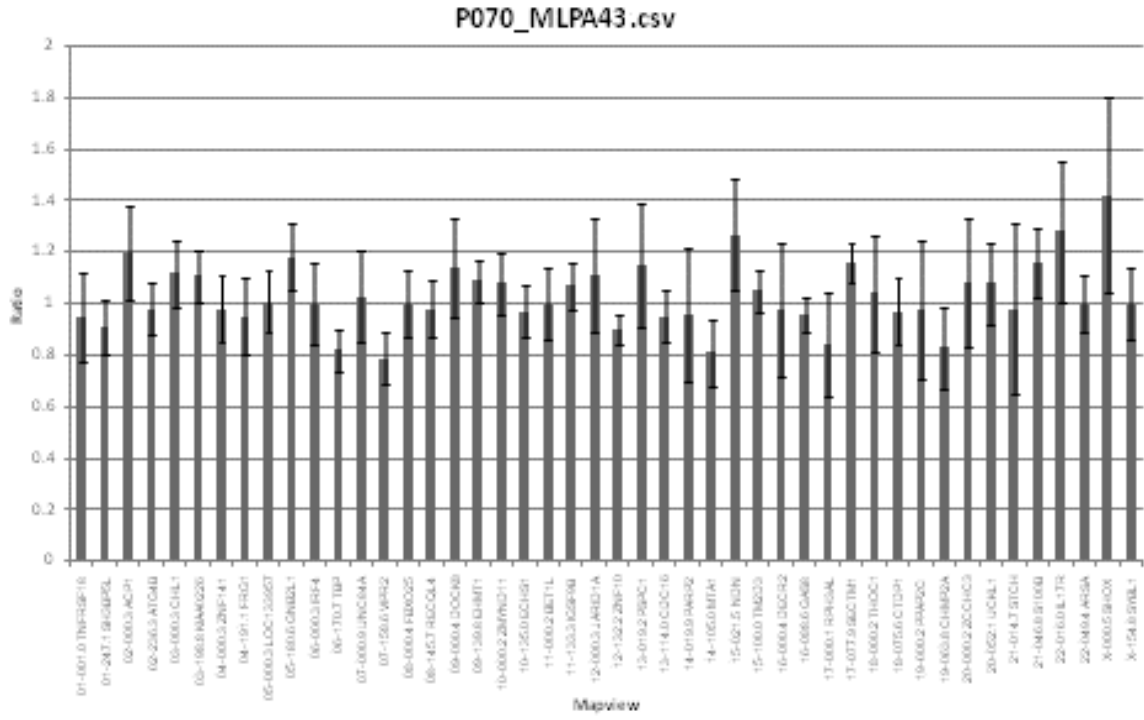
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

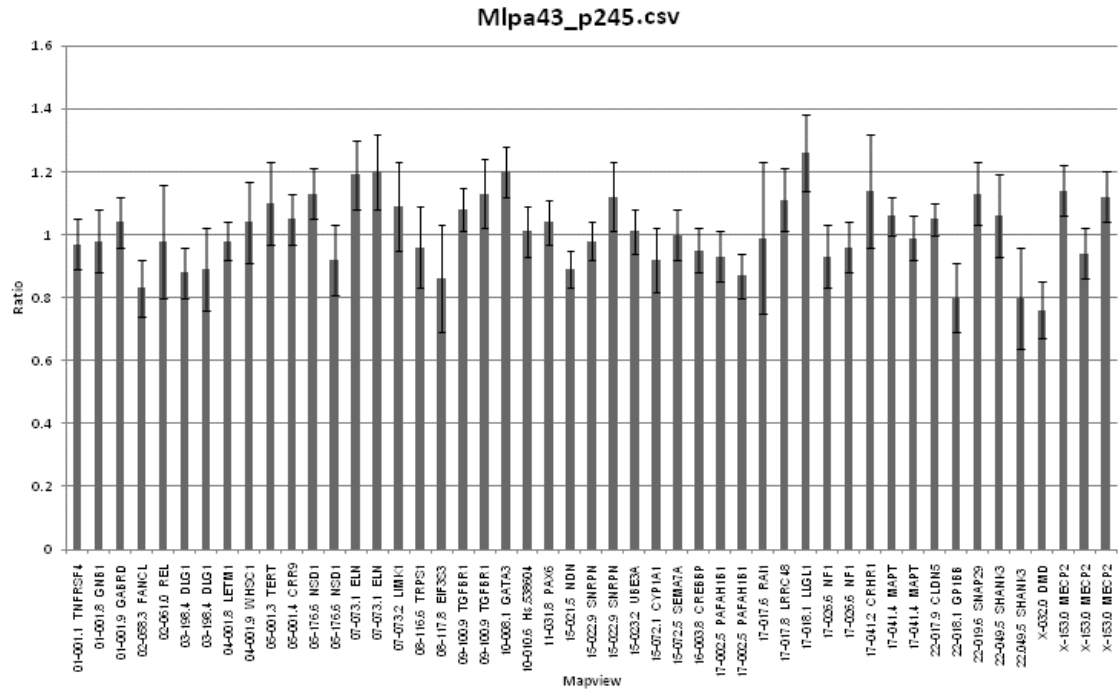
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-83: Olgu 43' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-84: Olgu 43' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 44**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:33, gebelik haftası:19, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, ICSI

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, tek umbilikal arter, hiperekojen intestin

Uygulanan Girişim:Amniosentez

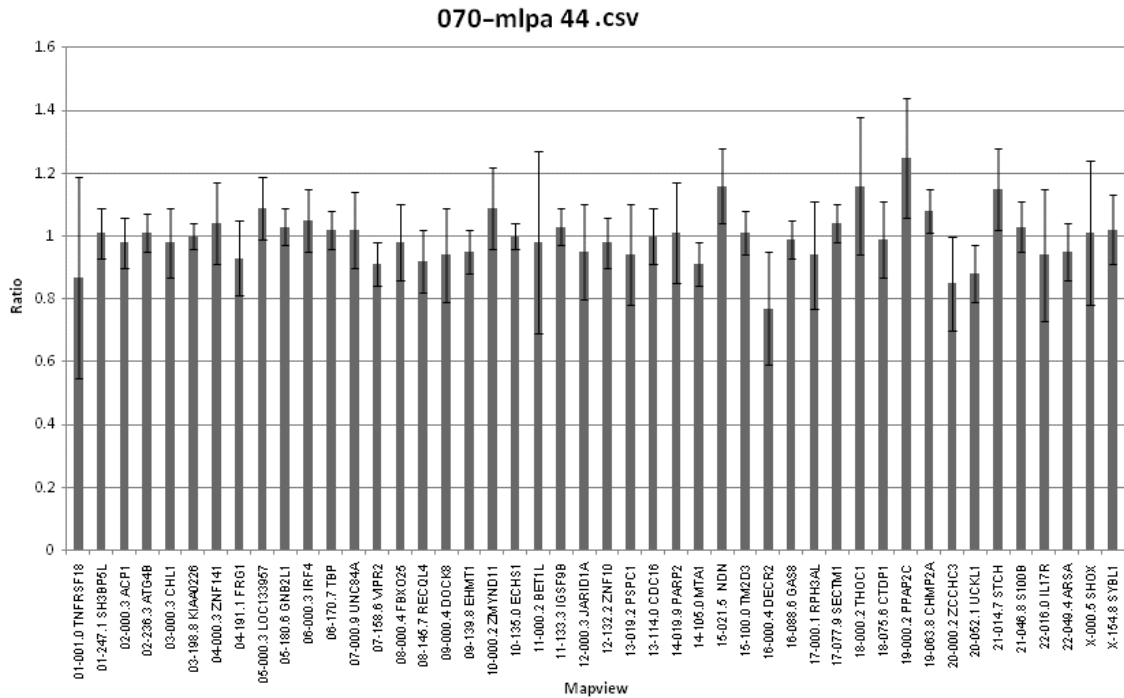
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

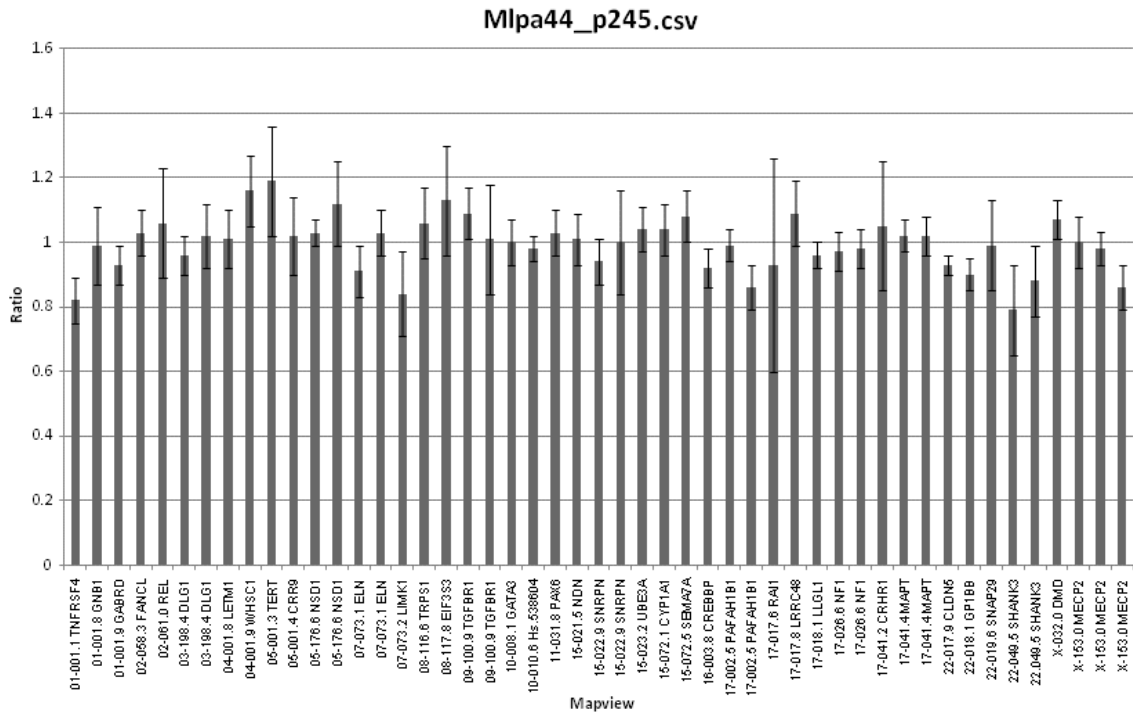
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-85: Olgu 44' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-86: Olgu 44' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 45

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:31, gebelik haftası:25, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, ağır hidrosefali, lizensafali, interhemisferik kist

Uygulanan Girişim:Fetal kan örneklemesi

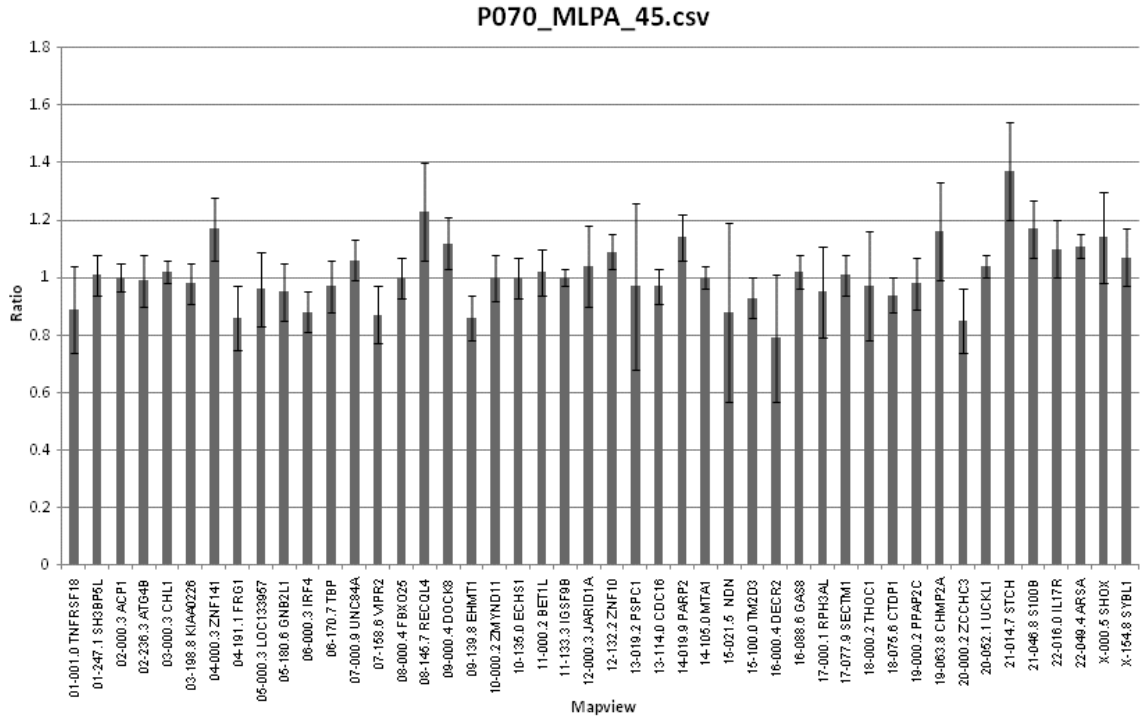
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2), ish 17p13.3(*LIS1*x2/*SMS*x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

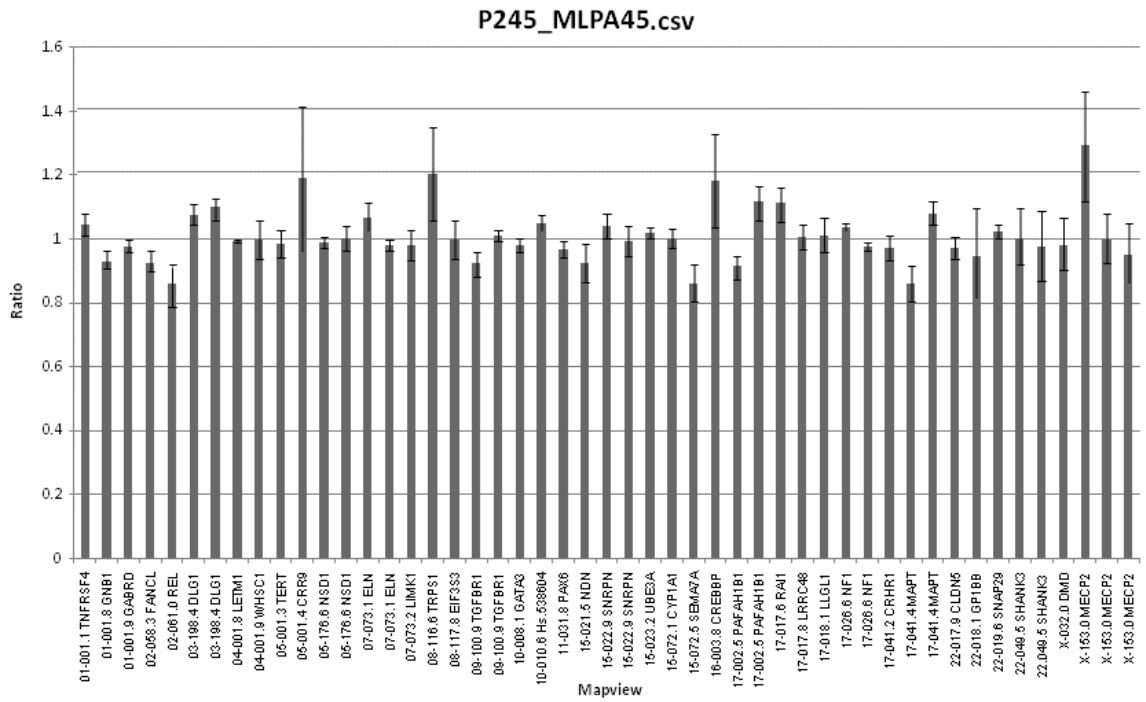
İzlem: Tahliye sonrası muayene; kranyum yüz oranı kranyum lehine artmış, periorbital şişkinlik, minimal uzun filtrum, balık ağzı görünümü, sağ elde hokey çizgisi, röntgen; normal

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-87: Olgu 45' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-88: Olgu 45' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 46**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:36, gebelik haftası:21, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı

Ultrason Bulguları: Minimal intrauterin gelişme geriliği, tek umblikal arter, unilateral pelviektazi,

Uygulanan Girişim:Amniosentez

Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

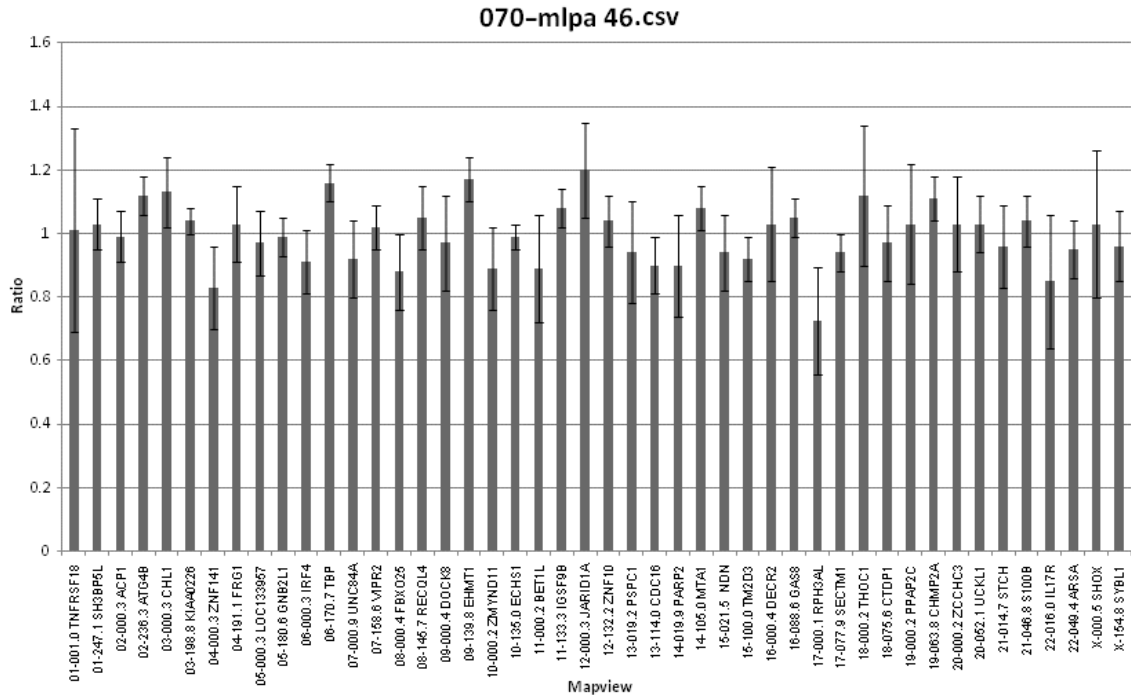
İzlem: Doğum sonrası muayene; 36. Gebelik haftasında sezeryan doğum(sefalopelvik uyumsuzluk) ,doğum ağırlığı 2260 gr, doğum boyu 47cm, doğum baş çevresi 32.5 cm

23 günlük kardiyoloji muayene: EKO; Atrial septal defekt (5.3 mm) , renal USG; sağ pelvis renaliste minimal dilatasyon (6mm)

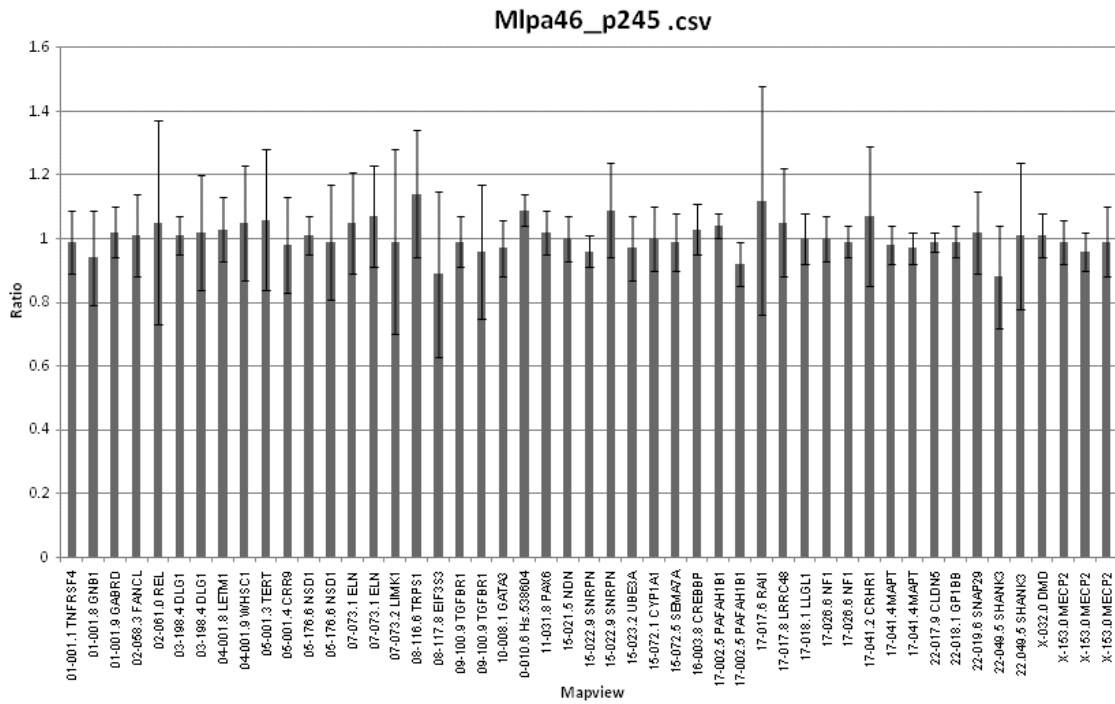
32 günlük muayene bulguları: ağırlık; 3420gr(25-50p), boy;50cm (25-50p), başçevresi; 34,8 cm (25-50p) fizik muayene; dismorfik bulgu yok, kardiyak (üfürüm 1,2/6 sistol) ve renal anomali nedeni ile kardiyoloji ve nefroloji takibi önerisi

MLPA Sonucu;MLPA (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-89: Olgu 46 daP070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-90: Olgu 46 daP245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 47**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:35, gebelik haftası:29, 1.5° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu,ileri anne yaşı, kötü obstetrik öykü (2 abortus, 1 hidrosefalili yenidoğan ölümü)

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, ağır hidrosefali, serebellum ve talamus hipoplazik, bilateral peskinovarus

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

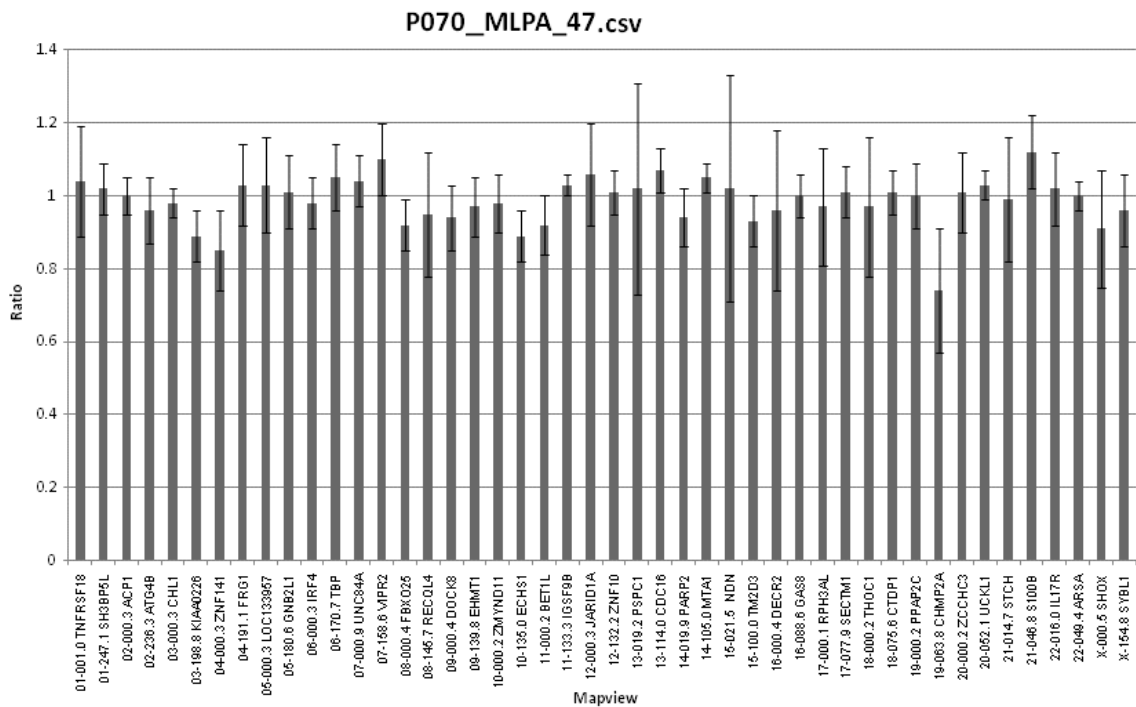
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

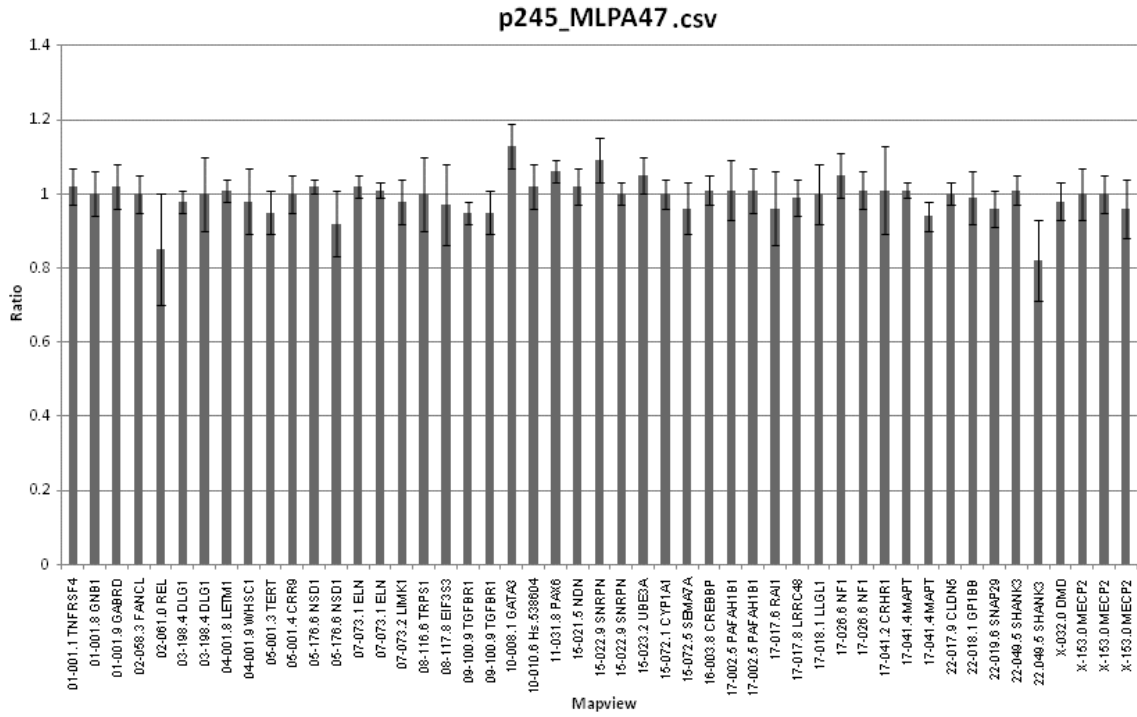
İzlem:Tahliye sonrası muayene; dismorfik özellik yok, bilateral göz kapakları ileri dercede ödemli bilateral rocker bottom feet, sacral dimple, röntgen: normal

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-91: Olgü 47' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-92: Olgu 47' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 48

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:25, gebelik haftası:26, 2° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, kistik higroma, tek umbilikal arter, kardiomegali, parsiyal korpus kallosum agenezisi

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

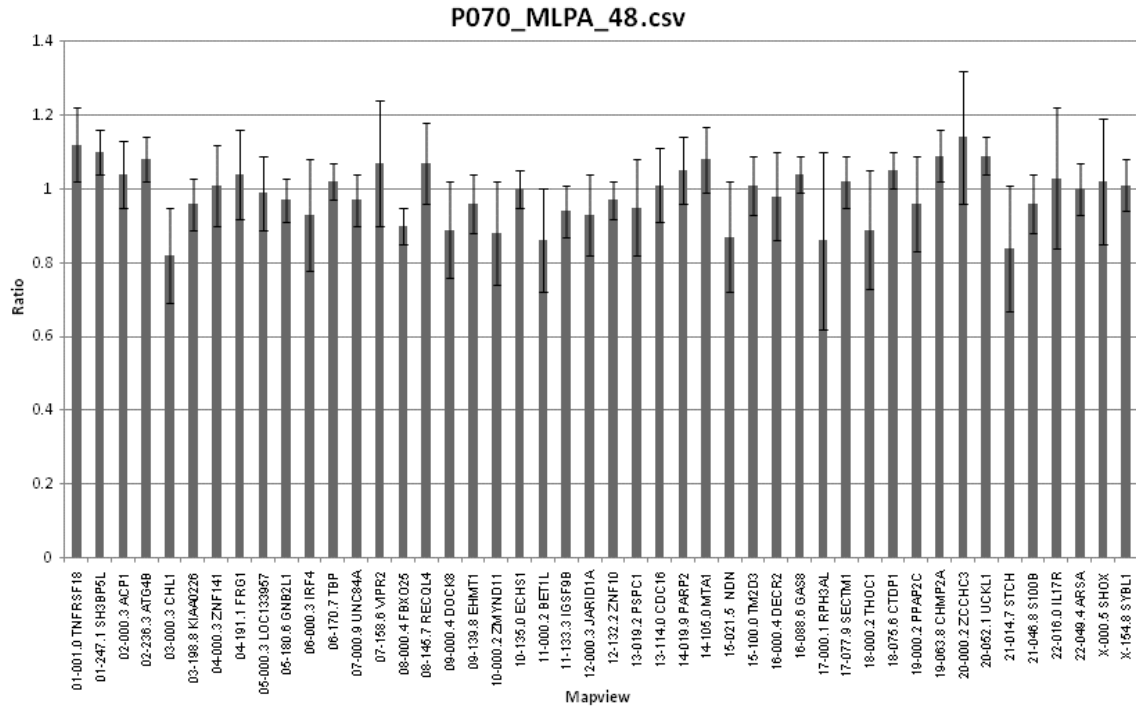
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

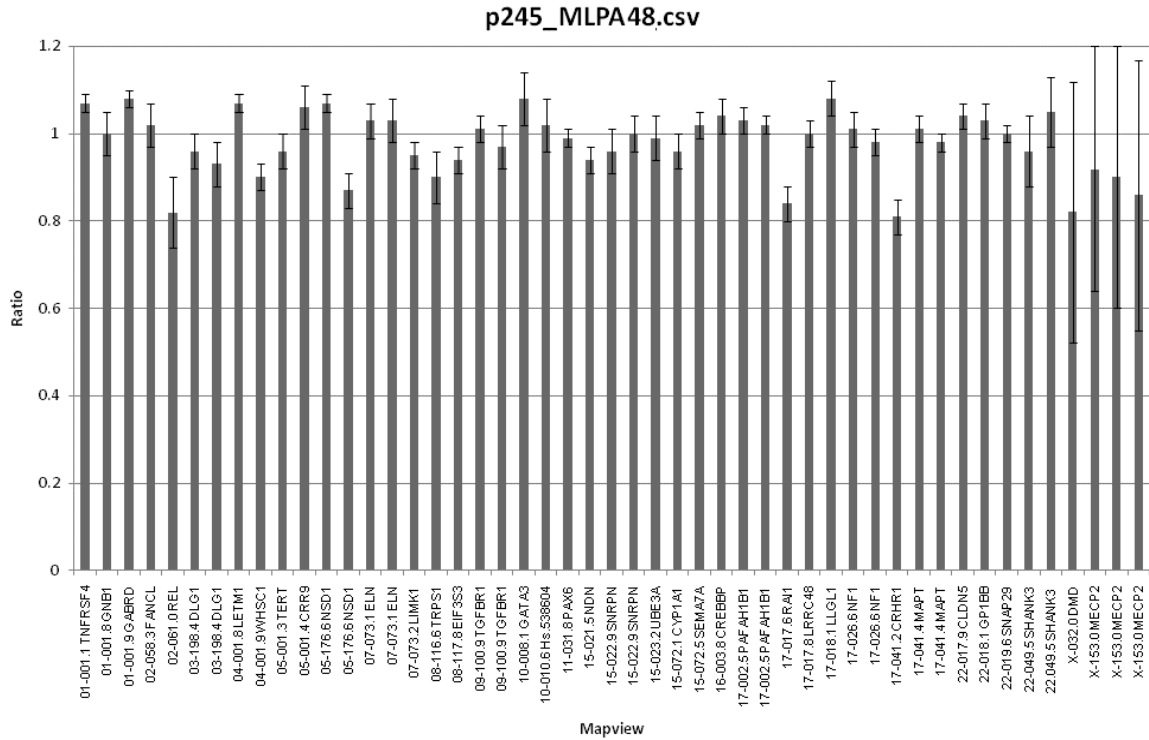
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-93: Olgu 48' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-94: Olgu 48' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 49**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:35, gebelik haftası:27, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, uterin arter dopplerlerinde notch (uteroplasental yetmezlik?), hiperekojenik intestin

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

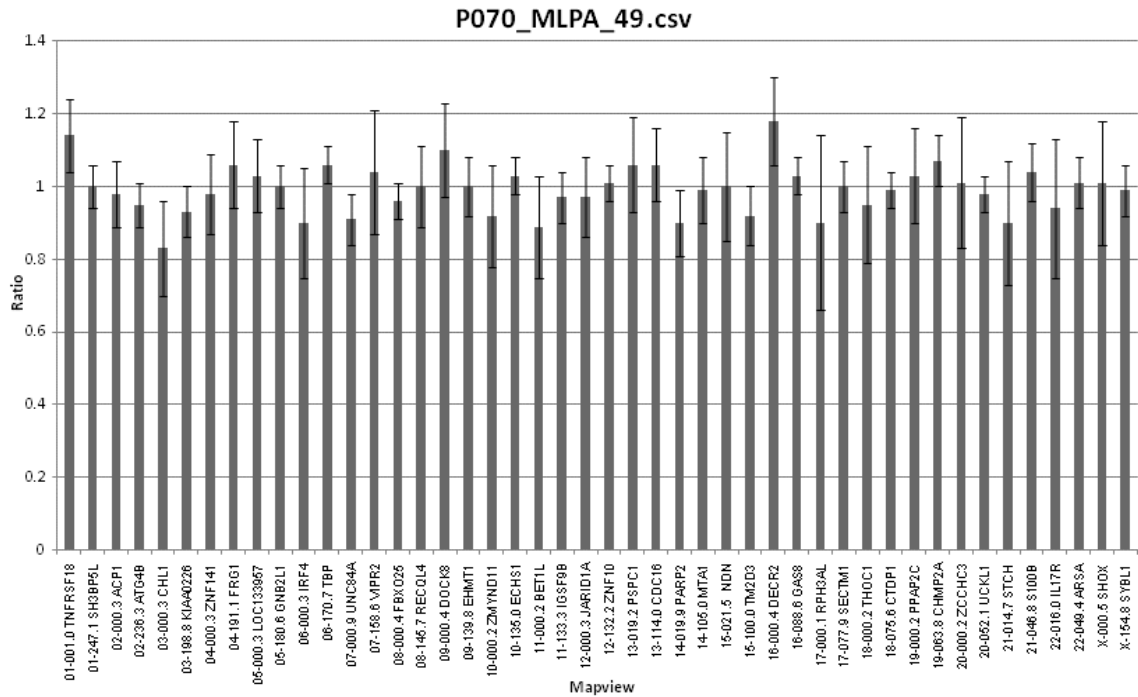
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

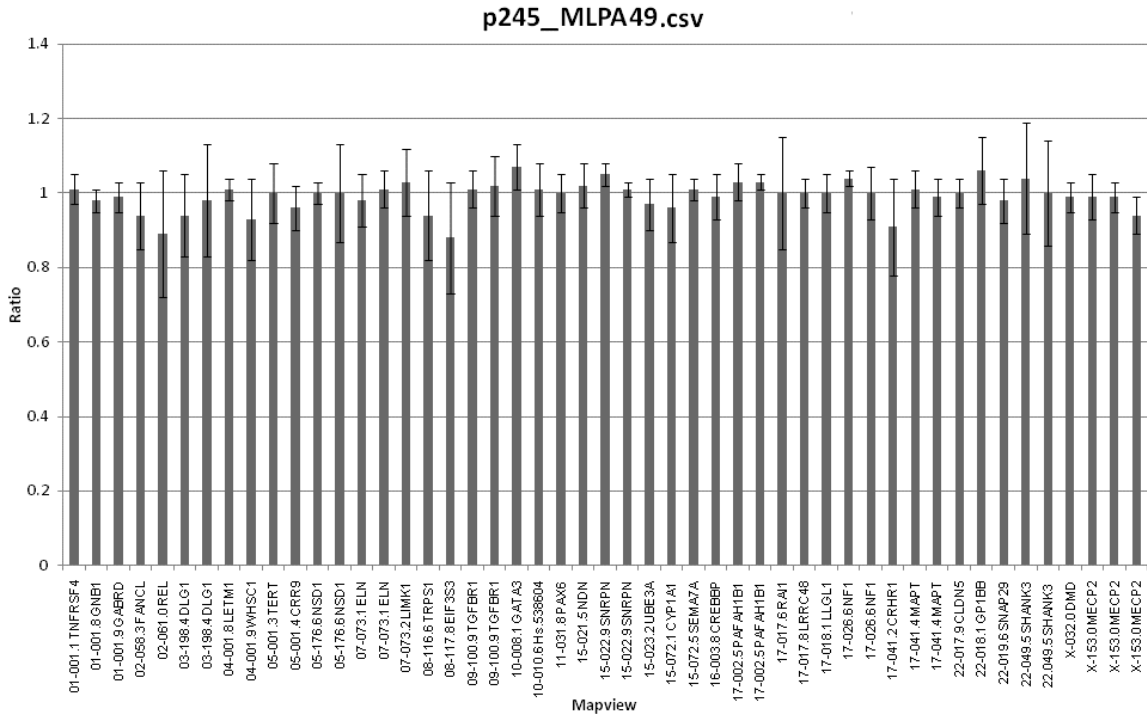
İzlem: 28 haftalık prematür doğum, muayene edilemedi.

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-95: Olgü 49' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-96: Olgü 49' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 50

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:31, gebelik haftası:25, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Aort koarktasyonu, sağventrikül dominansisi, pulmoner arter kapak sonrasında hafif dilatasyon

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

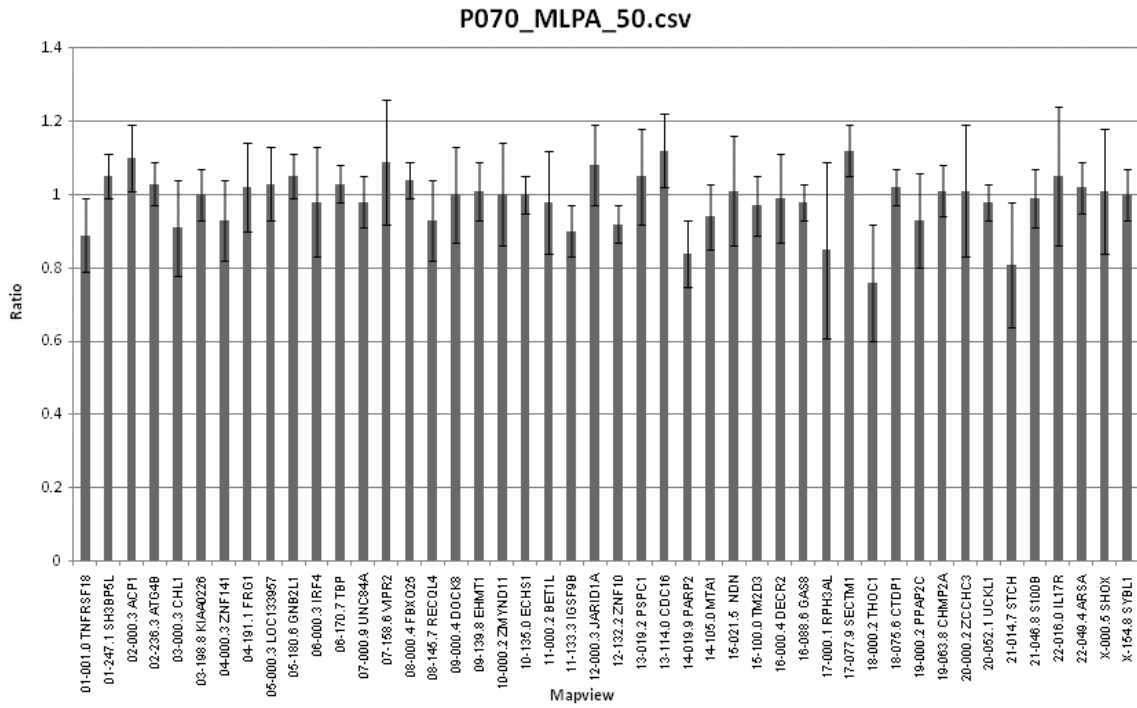
Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2), ish 22q11.2(D22S75x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

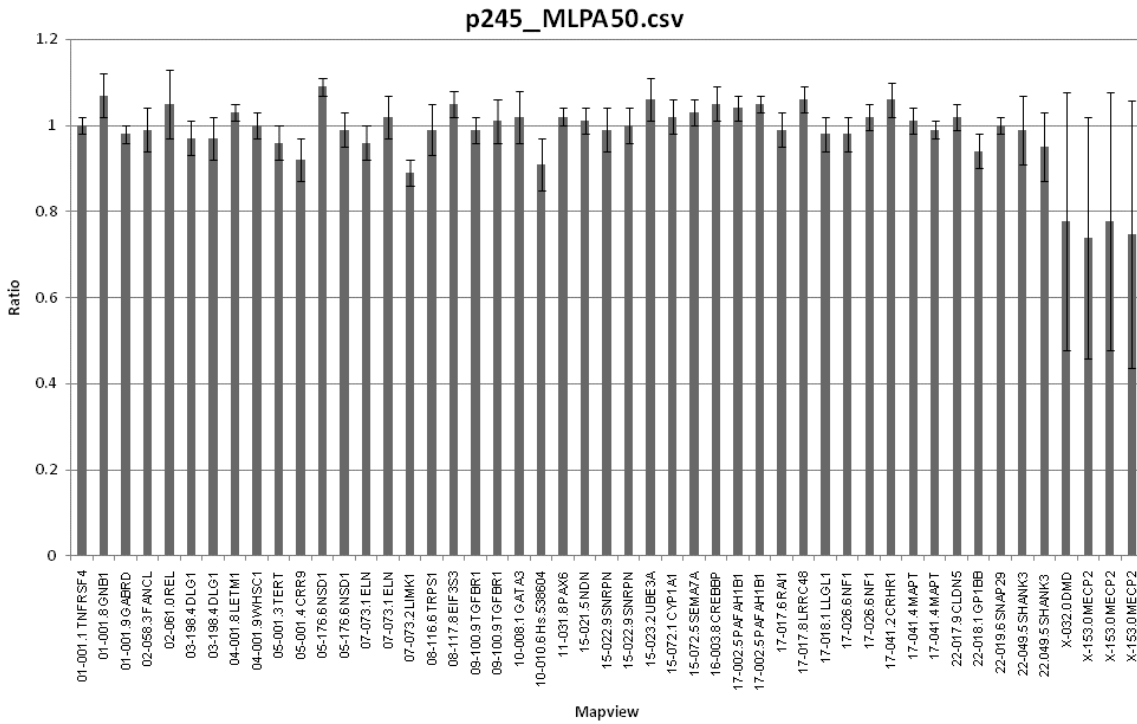
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-97: Olgu 50' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-98: Olgu 50' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 51**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı: 37, gebelik haftası: 20, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı, ICSI

Ultrason Bulguları: Hidrosefali, ince korpus kalllosum, orta hatta hiper ekojen hidronefrotik tek böbrek (at nalı böbrek?), kaliektazi, inlet ventriküler septal defekt, büyük damar çıkışları gösterilemiyor

Uygulanan Girişim: Amniosentez

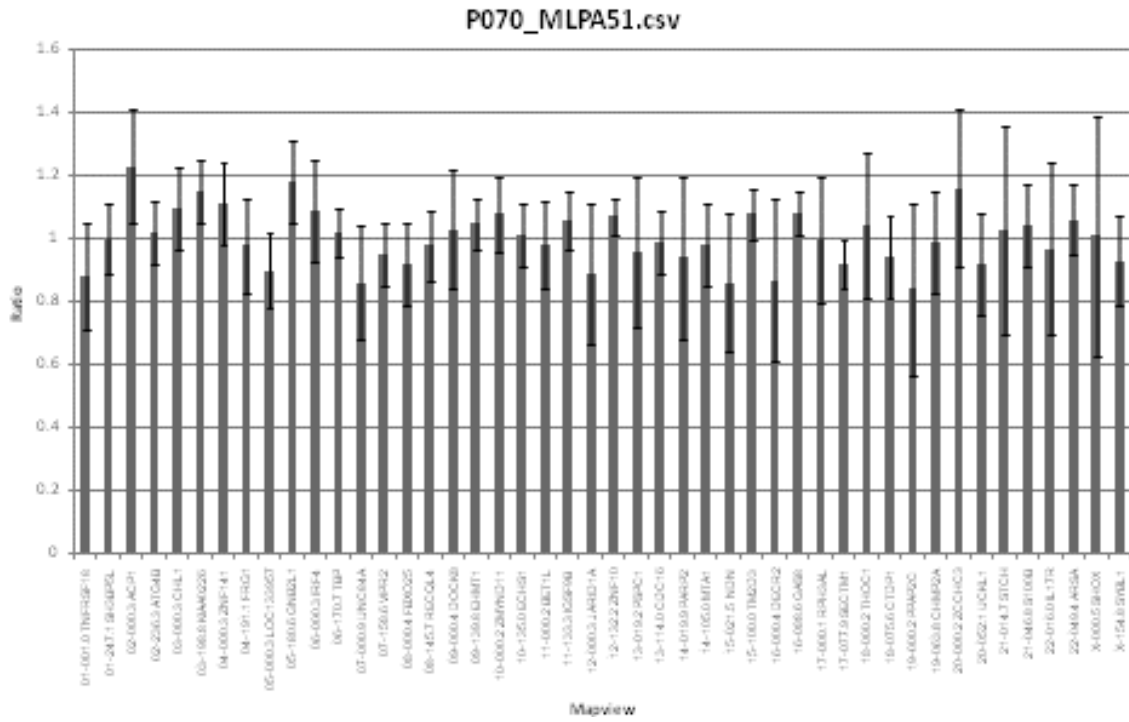
Fetal Karyotip: 46, XY

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

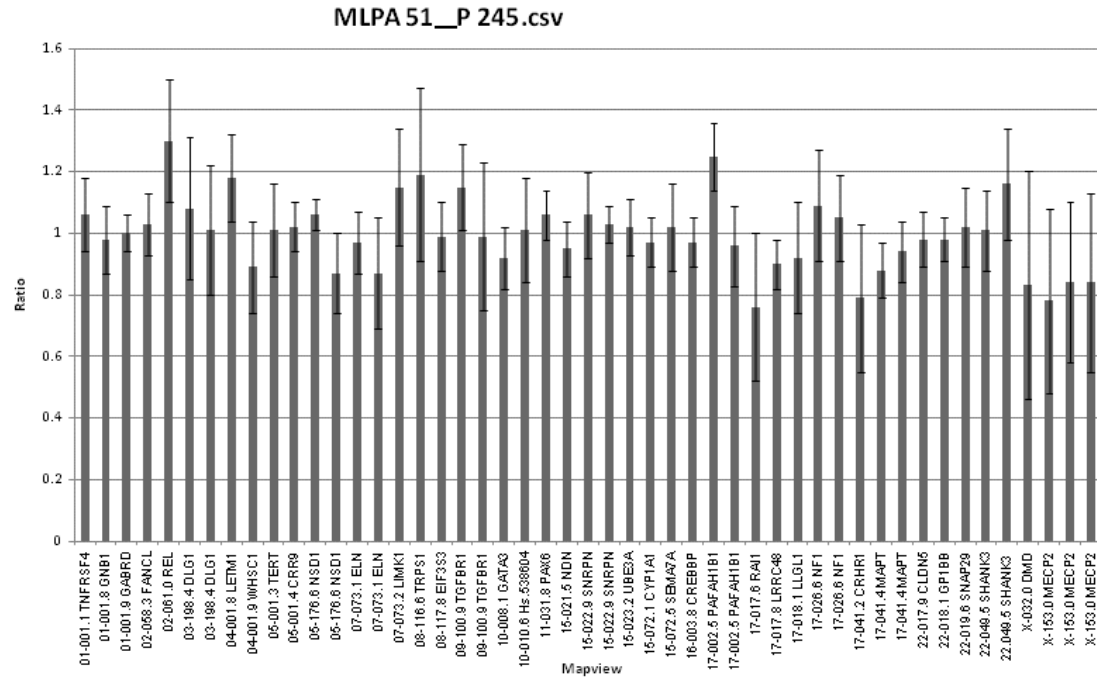
İzlem: Tahliye sonrası muayene; hafif retrognati, belirgin filtrum. Radyolojik inceleme; torakal 1,2,3,4. Vertebralarda düzensizlik, hemivertebral, servikal vertebra arkusları ayrık

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-99: Olgu 51' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-100: Olgu 51' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 52**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:22, gebelik haftası:21, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Ventrikülomegali, tek umbilikal arter, mide cebi görüntülenememiş, fallot tetralojisi (A/T çift çıkışlı sağ ventrikül?), radius hipoplazisi, sağ elde 1.parmak agenezisi, her iki radius afleksisi distal kemikler medial fleksiyonda ayaklarda postaksiyal polidaktili

Uygulanan Girişim:Korionik villus örneklemesi

Fetal Karyotip: 46, XX.ish 22q11.2(D22S75x2)

DNA kaynağı: Koronik villus

İzlem: Tahliye sonrası muayene: multiple konjenital anomali; proptozis, supra orbital kemerlerde basıklık, belirgin filtrum, hafif retrognathi, sağ ön kol yay şeklinde radiale deviye ve kısa, bilateral el 1. parmak agenezisi, sağ el dirsek ve parmak eklemlerinde hareket kısıtlılığı, kuşkulu genitalya, anal atrezi. Radyolojik inceleme; bilateral ellerde 1 parmak metakarp ve falanks yapıları yok, sağ önkol radius ileri derecede solda hafif hipoplazi, sağulneada bowing ve kısalık, sacral vertebralarda 4 vertebra yapısı düzensiz

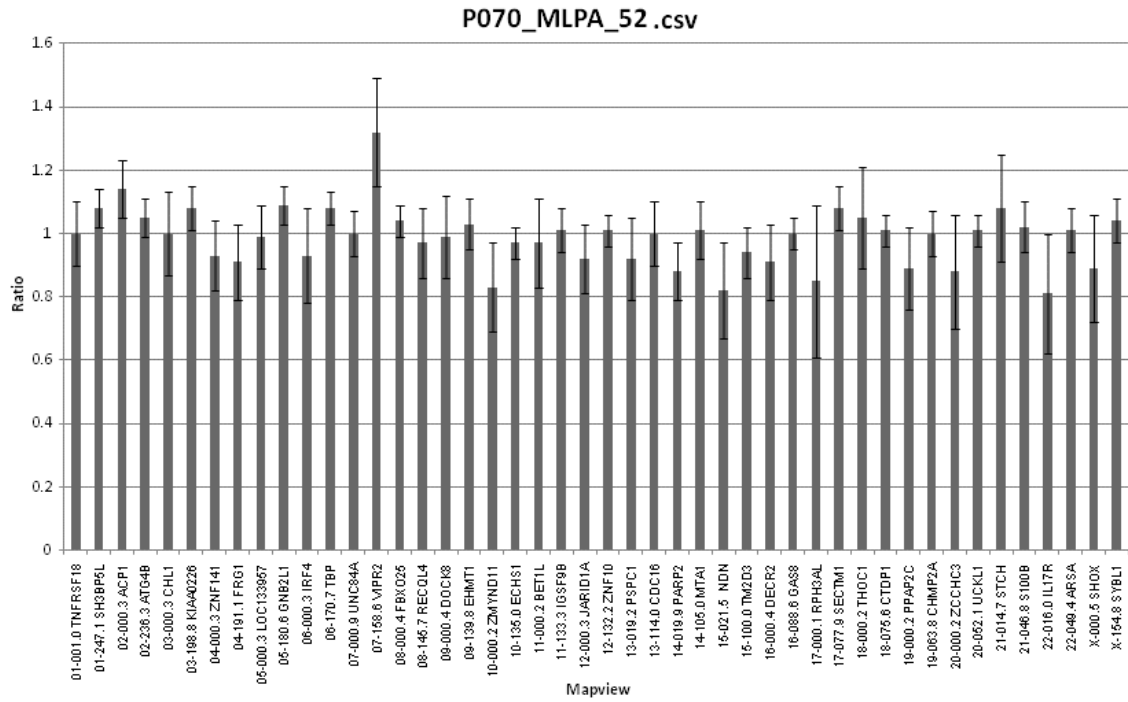
Ayırıcı tanı; VACTERL,

Duane Radial Ray Defekti,

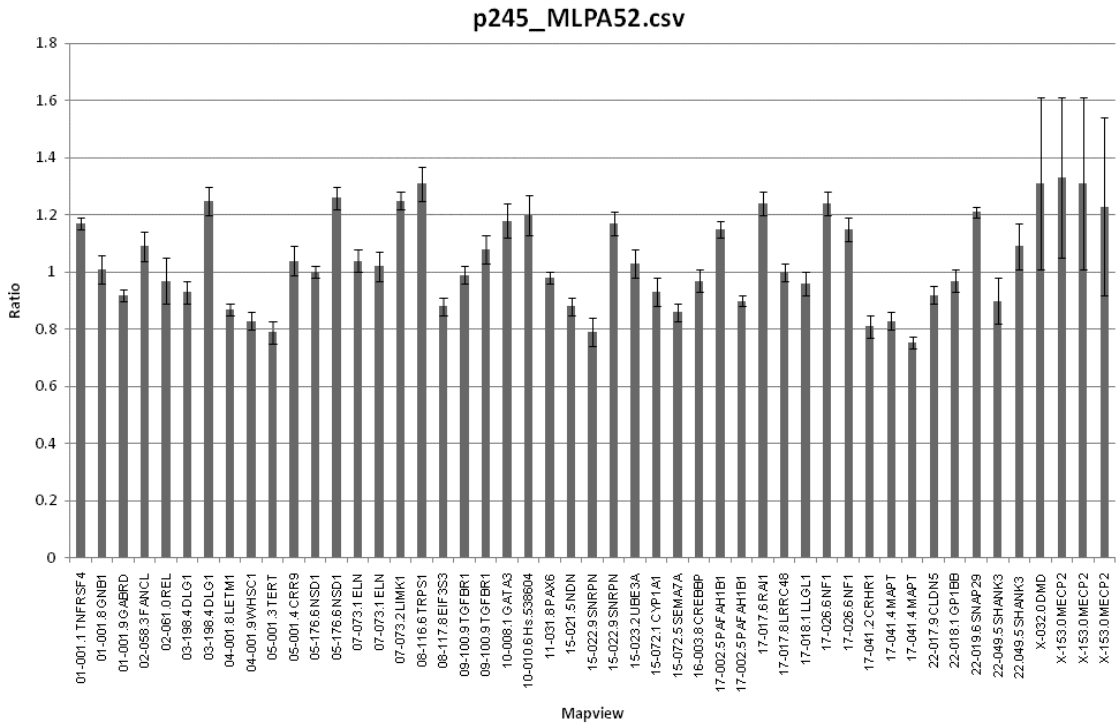
Holt-Oram Sendromu

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-101: Olgu 52' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-102: Olgu 52' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 53**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:24, gebelik haftası:32, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Asimetrik intrauterin gelişme geriliği (özellikle femoral kısalık belirgin), tek umbilikal arter

Uygulanan Girişim:Fetal kordon kanı

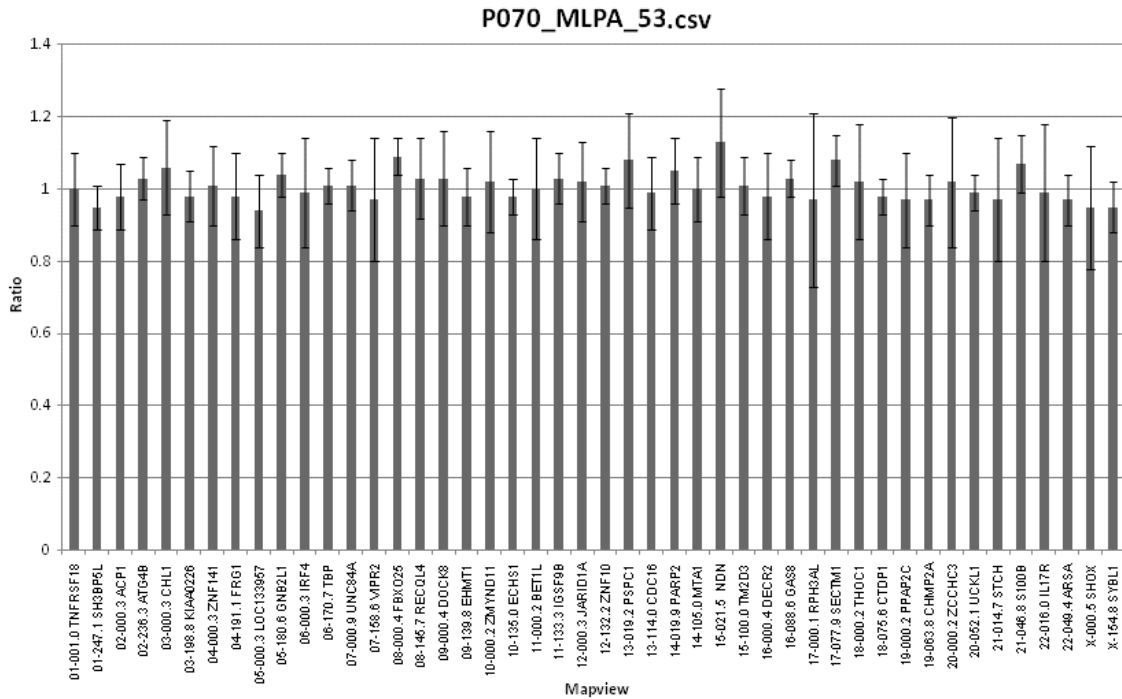
Fetal Karyotip: 46,XY

DNA kaynağı: Fetal kan örnekleme

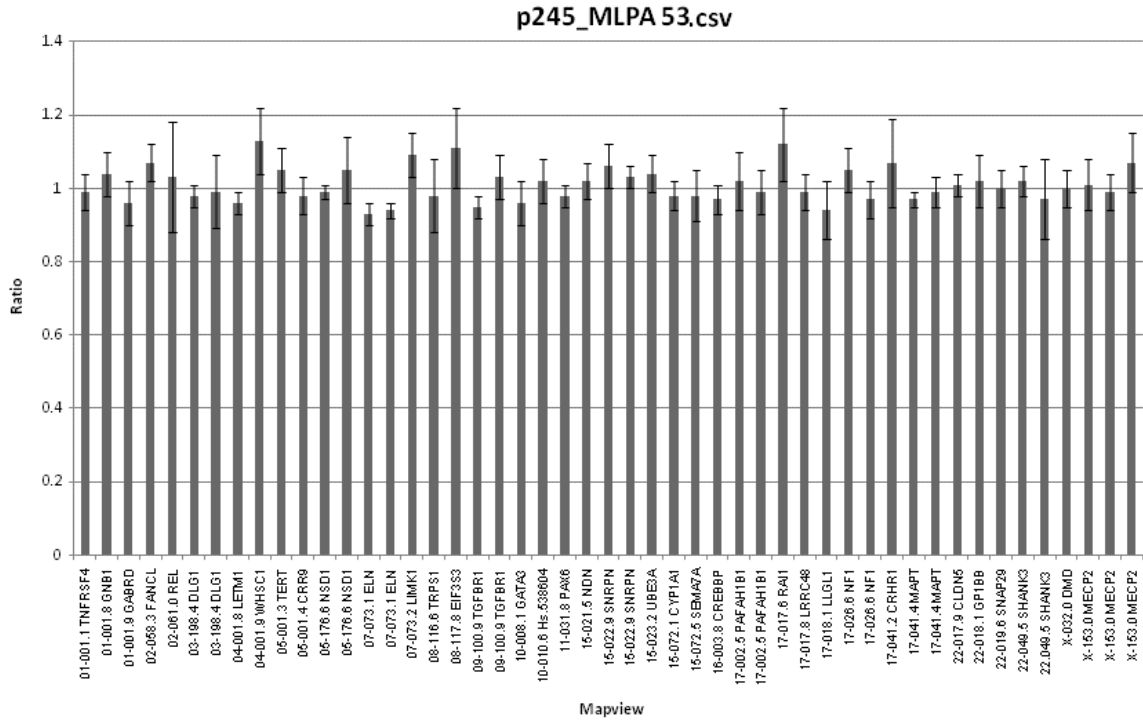
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-103: Olgu 53' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-104: Olgu 53' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 54

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:28, gebelik haftası:18, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, hiperekojen intestin, ductus venosus da A dalgası ileri derecede derin

Uygulanan Girişim:Amniosentez

Fetal Karyotip: 46, XX,inv(9)(p11.2.q13)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)

OLGU 55**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:34, gebelik haftası:23, ?° kuzen evliliği (uzak)

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, hiperekojen intestin (Monokoryonik diamnionotik ikiz gebelik, diğer fetusda normal usg bulguları)

Uygulanan Girişim:Korionik villus örneklemesi

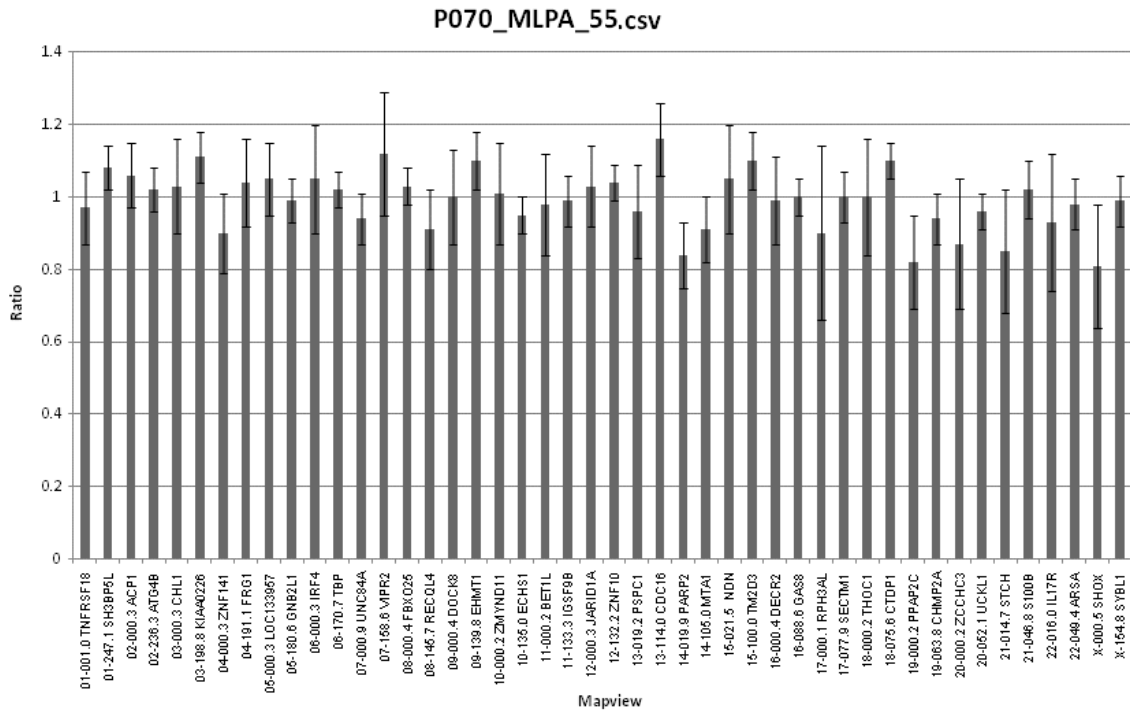
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Korionik villus

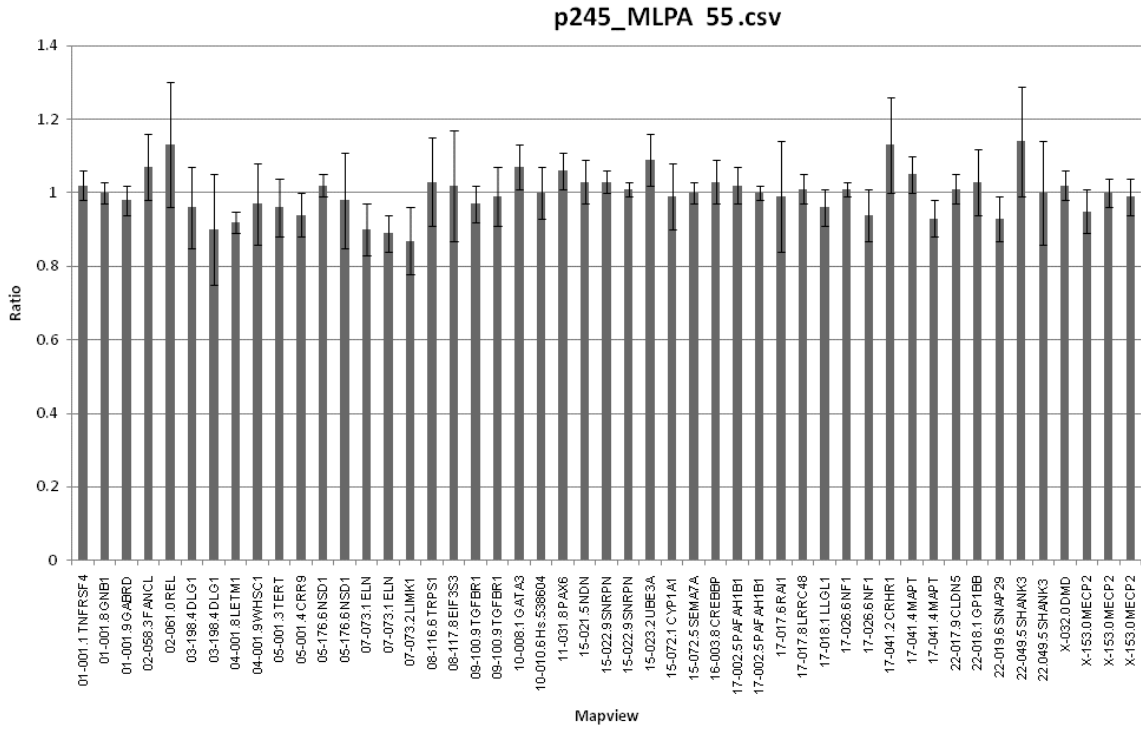
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-107: Olgu 55' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-108: Olgu 55' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 56

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:26, gebelik haftası:18, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, 1. Trimester tarama testinde 1:160, dörtlü tarama testinde 1:220 trizomi 21 riski,

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, hiperekojen intestin, perikardiyal effüzyon, tek umbilikal arter, oligohidramnios

Uygulanan Girişim:Korionik villus örneklemesi

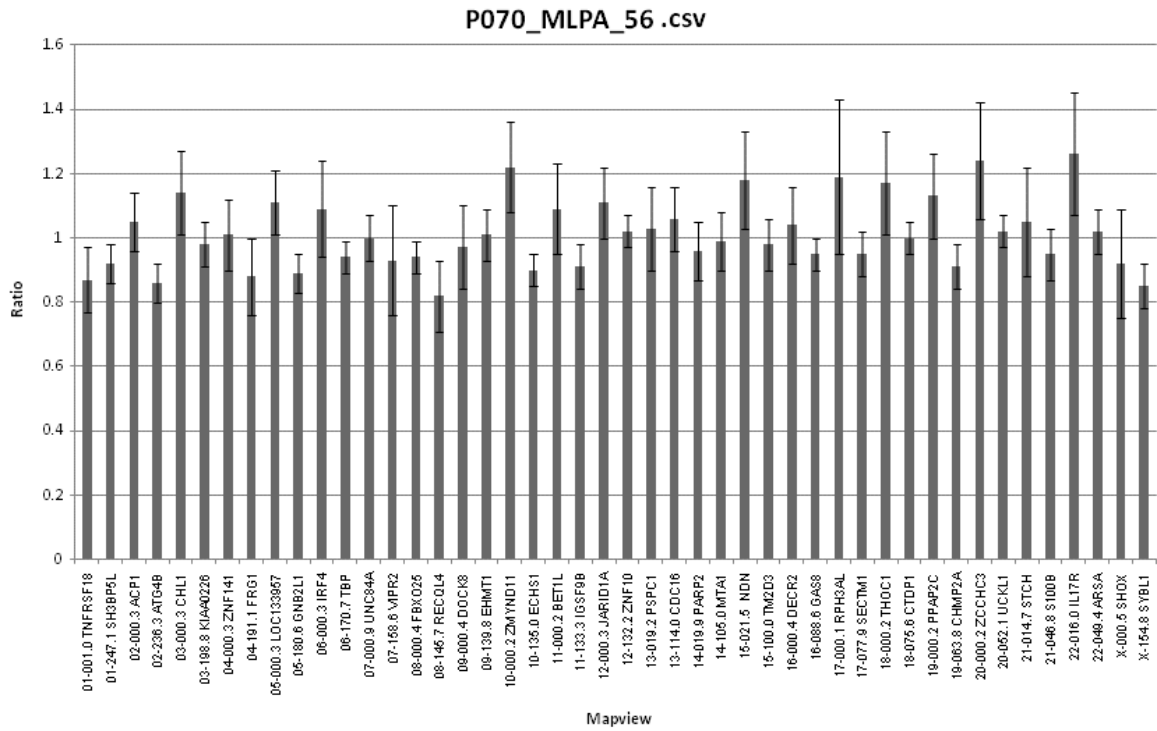
Fetal Karyotip: 46, XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: KVÖ kültürü

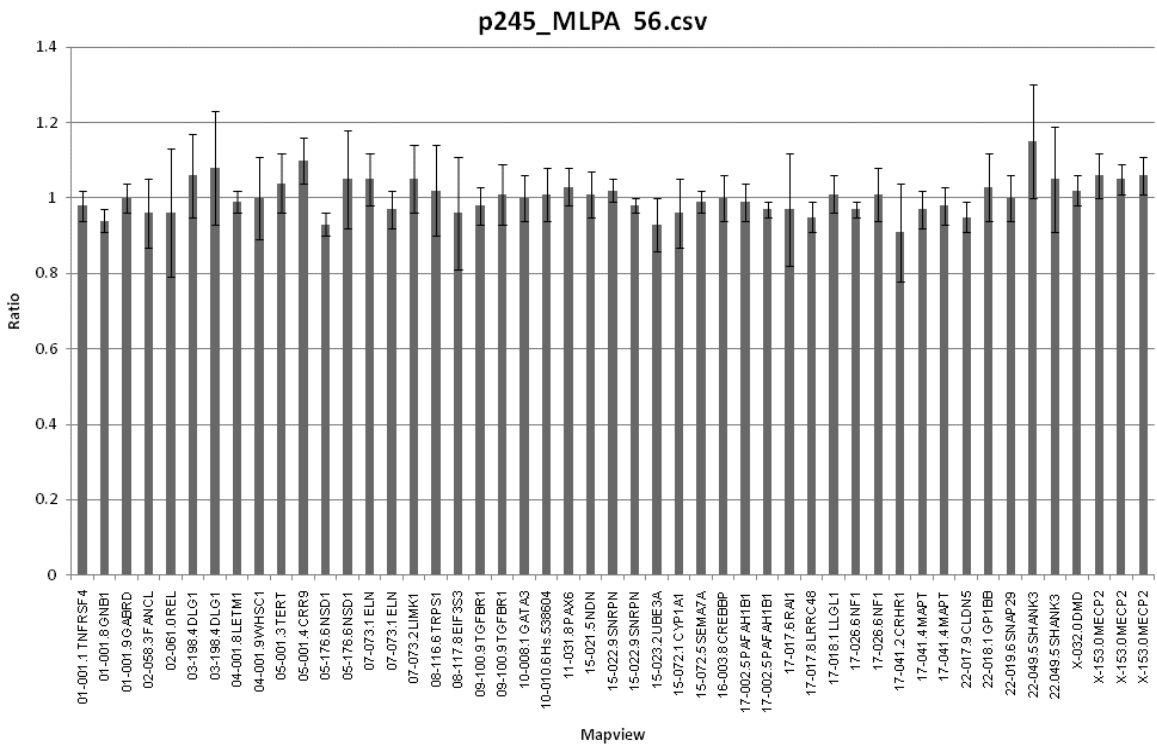
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-109: Olgu 56' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-110: Olgu 56' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 57**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:26, gebelik haftası:35, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, oligohidramnios, her iki ayakta peskinovarus, tek taraflı hidronefroz, ventriküler septal defekt

Uygulanan Girişim:Fetal kan örneklemesi**Fetal Karyotip:** 46, XY. ish subtel(41x2)**DNA kaynağı:** Fetal kordon kanı

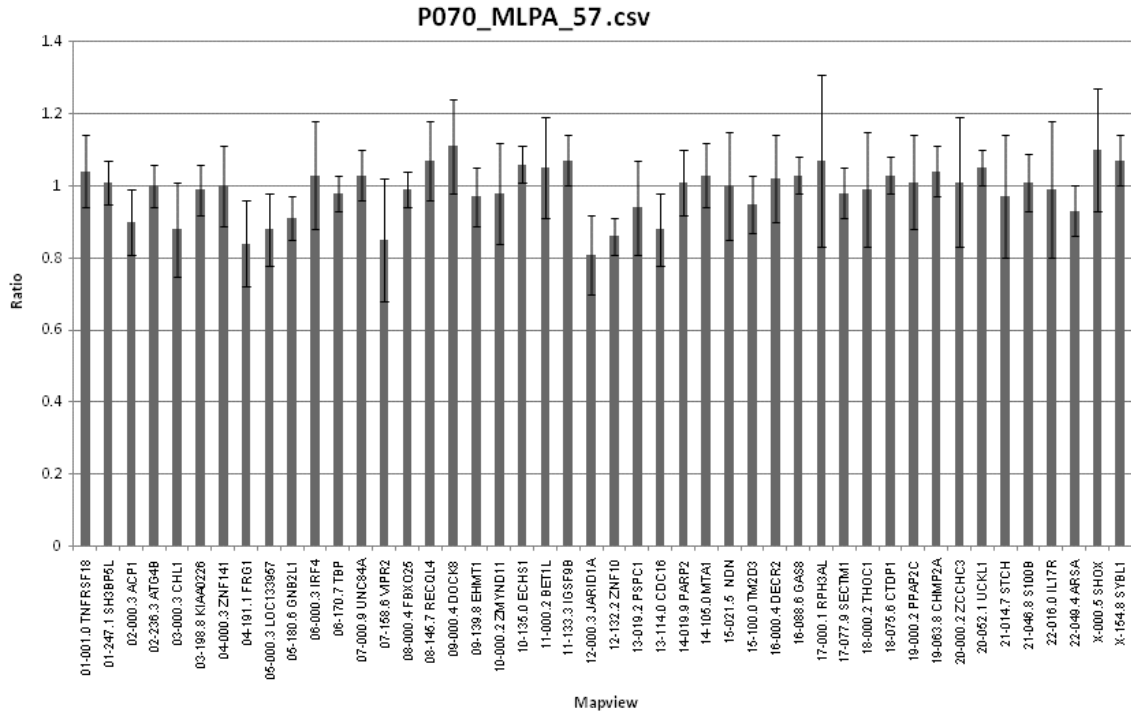
İzlem:Doğum sonrası muayene; 20 günlük haricen erkek, bilateral peskinovarus, her iki el 2.,3.,4. parmaklarda fleksiyon kontraktürü,proksimalde pterjiyum (baba ve babaannede her iki el aynı parmaklarda kontraksiyon var- ailevi kamptodaktili?)

USG; Solda inmemiş testis, her iki böbrek pelviyektazi, 1 günlük kardiyolojik

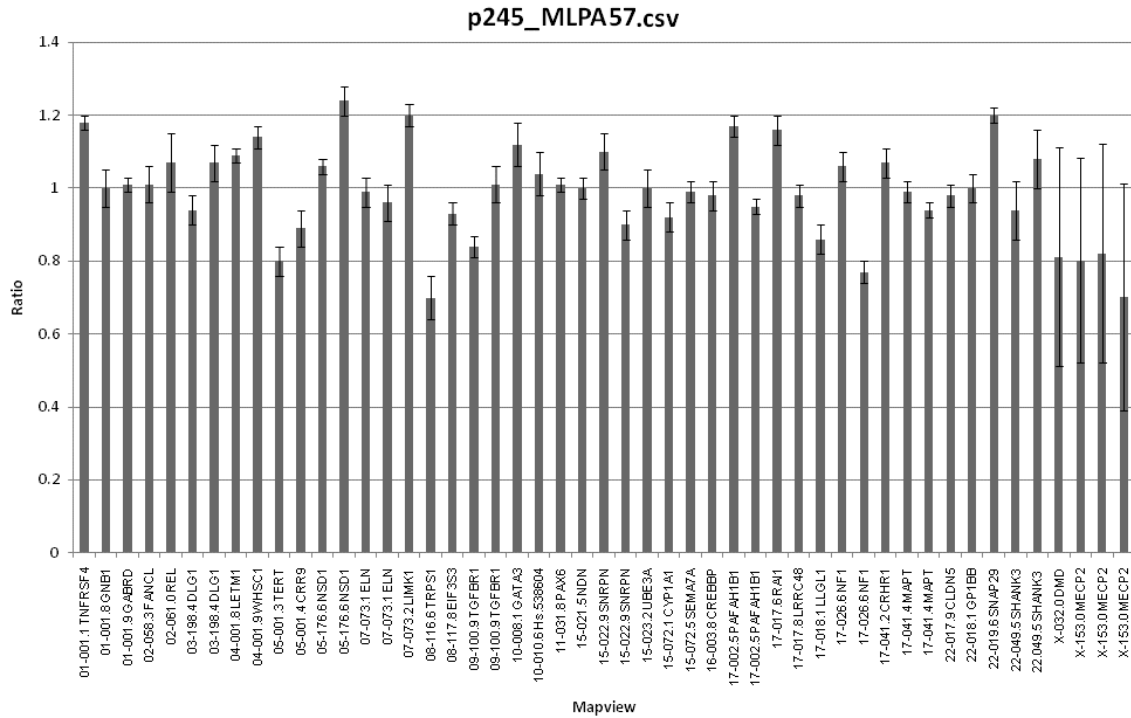
EKO; Mid-müsküler küçük ventriküler septal defect, PFO, PDA, biküspit aortic kapak

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-111: Olgu 57' nin P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-112: Olgu 57' nin P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 58**Demografik bilgiler;**

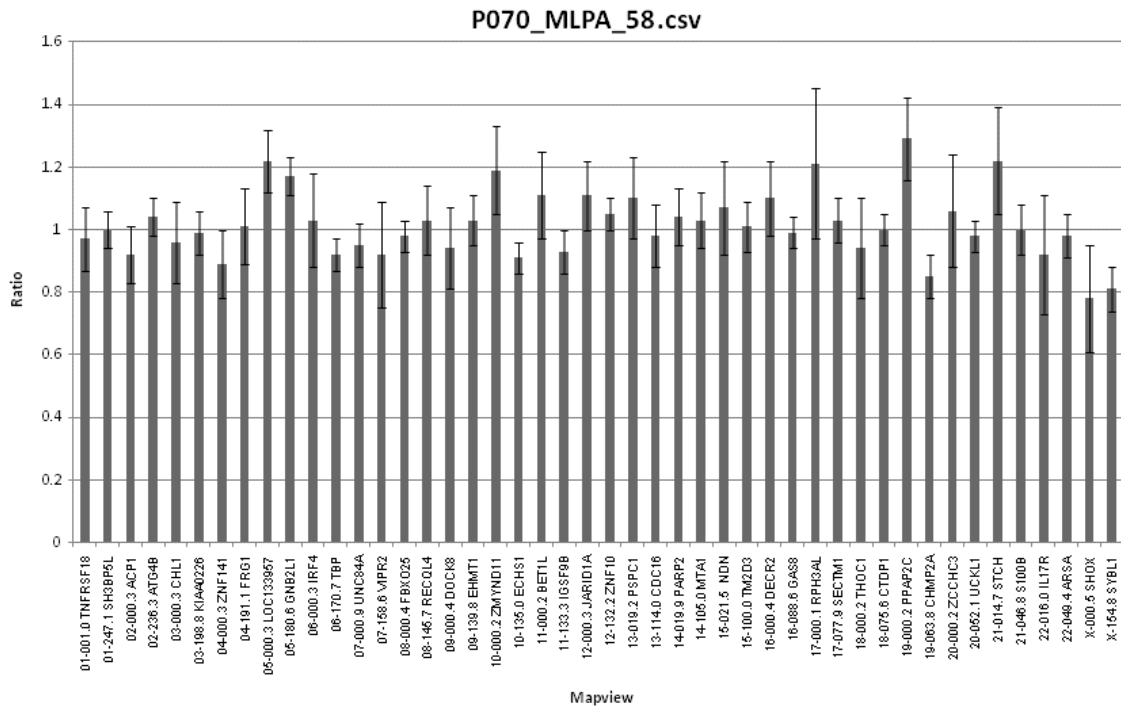
Anne yaşı: 32, gebelik haftası: 28, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

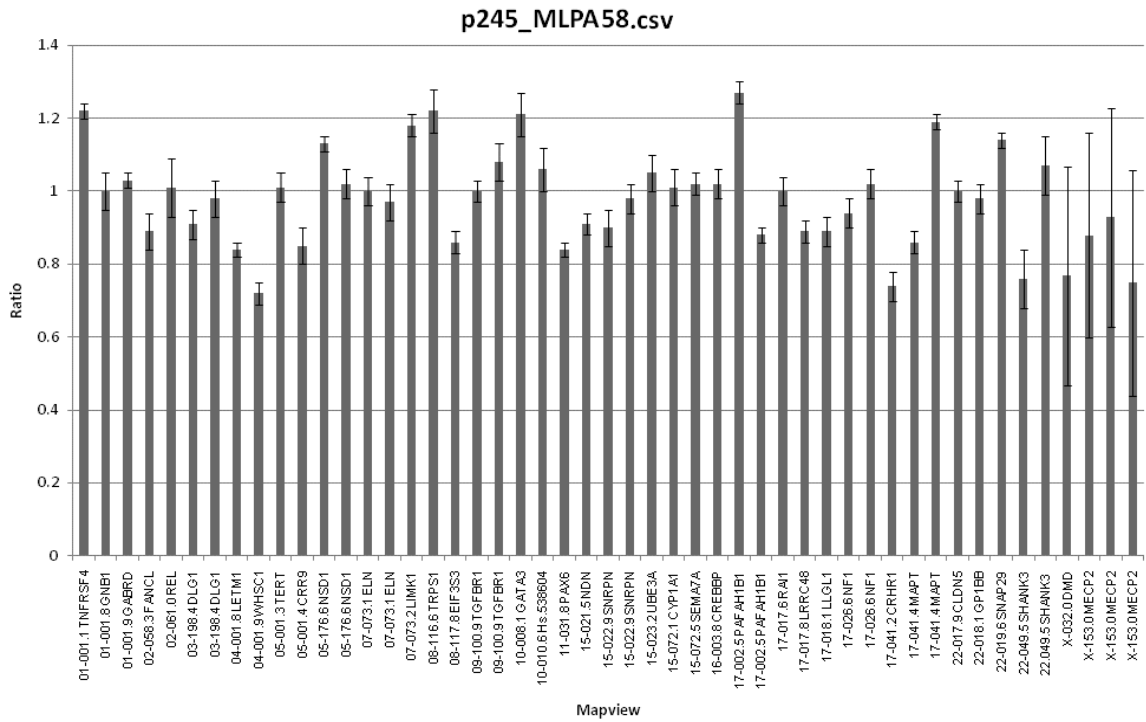
Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, sağda ventrikülomegali, plasentada fibrin depozasyonu ve maternal göllenme alanları (uteroplasental yetmezlik?) (Monokoryonik diamniyotik ikiz gebelik, diğer fetus normal usg bulguları)

Uygulanan Girişim: Fetal kan örnekleme**Fetal Karyotip: 46, XY. ish subtel(41x2)****DNA kaynağı: Fetal kordon kanı****İzlem: -****MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2**

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-113: Olgu 58' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-114: Olgu 58' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 59

Demografik bilgiler;

Anne yaşı: 23, gebelik haftası: 27, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, amniyotik sıvı volümü azalmış

Uygulanan Girişim: Fetal kan örnekleme

Fetal Karyotip: 46, XX

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

İzlem: Doğum Sonrası muayene; 36. gebelik haftasına sezeryan doğum (anhidramnios, mesane büyüklüğü, IUGR), doğum kilosu; 1480 gr

50 günlük muayene; tartı; 1430 gr(<3p), boy; 44 cm(<3p), baş çevresi; 26 cm (<3p), fizik muayene; mikrosefali, üçgen yüz yapısı, alın geriye doğru basık, mavi sklera, kemerli burun yapısı, düz filtrum, genişgingivalar, dar ve yüksek damak, retrognati,

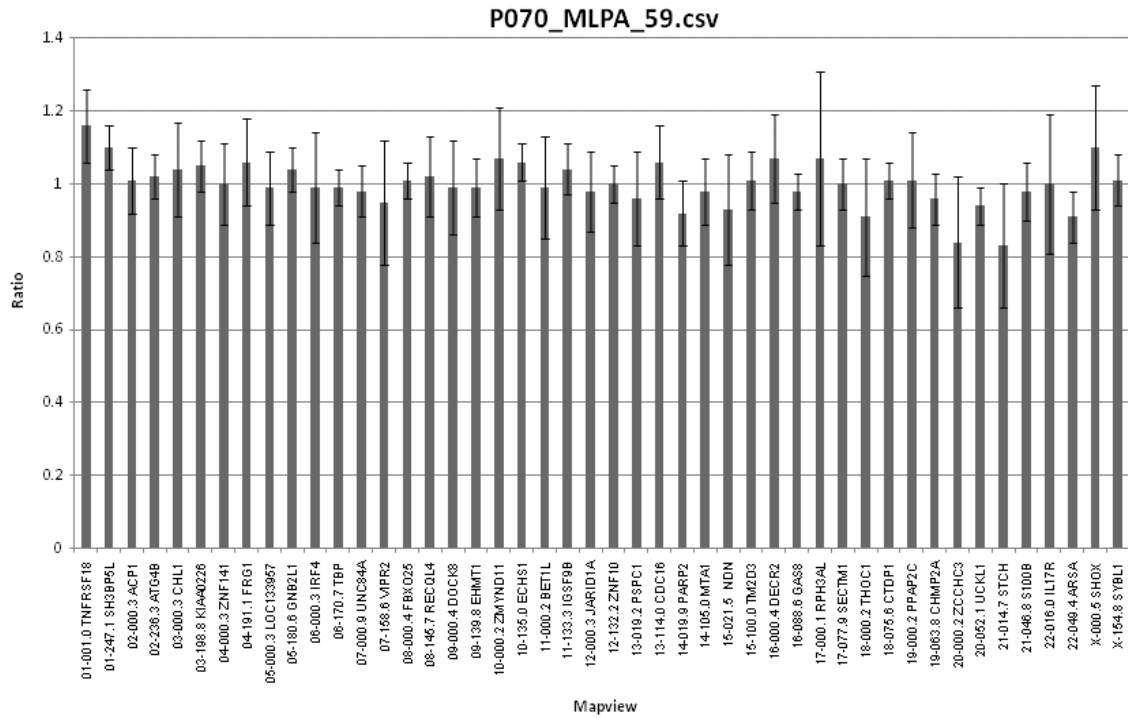
belirgin oksipital çıkıntı, sınırda düşük kulak, bilateral klinodaktili, sidney çizgisi, deri altı yağ dokusunda azalma, kalpte 2/6 sistolik üfürüm, haricen dışı, labia majörler hipoplazik

Kardiak muayene,EKO; Ventriküler septal defekt (apikal geniş), atriyal septal defekt (3mm) hafif pulmoner hipertansiyon

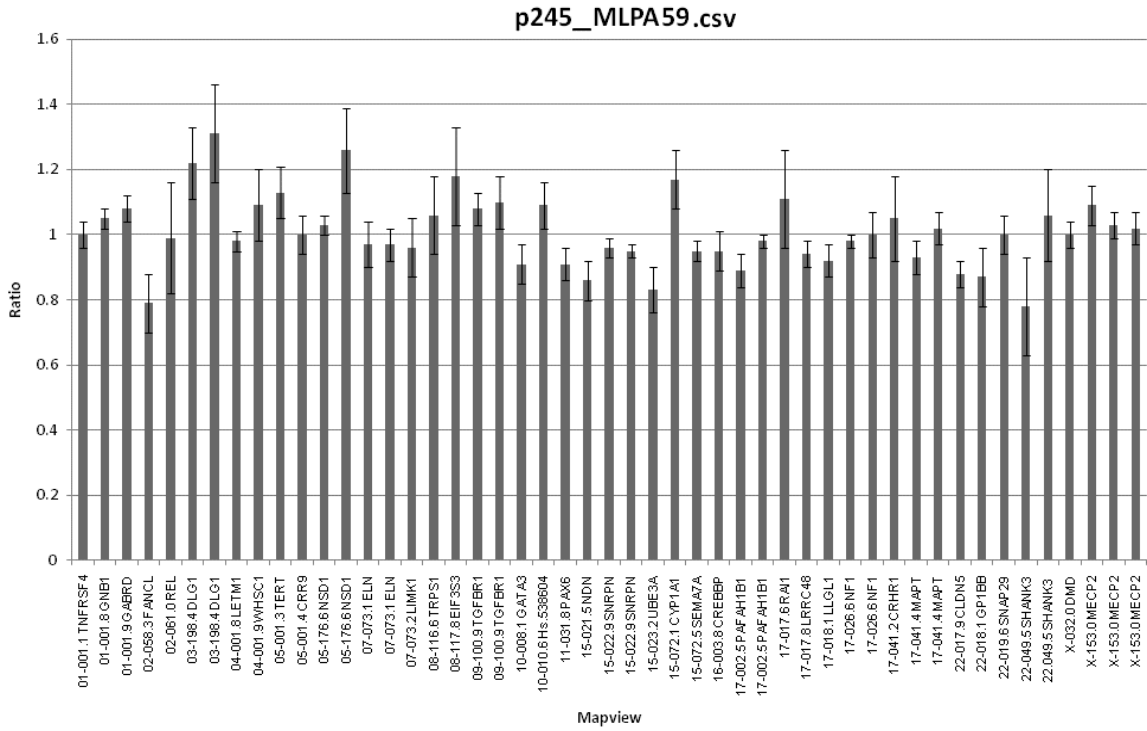
Doğum sonrası klinik tanı: Seckel Sendromu

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-115: Olgu 59' un P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-116: Olgu 59' un P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 60

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:21, gebelik haftası:27, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, tek umbilikal arter, kardiyak sağ dominansi, sağ atrium genişliği sola göre belirgin, plasenta kalın, plasentada intervilloz fibrin depozisyonları varlığı, sol renal agenezi?,

Uygulanan Girişim:Fetal kan örneklemesi

Fetal Karyotip: 46,XX.ish del 2qtel47(dj892G20+/dj1011017-/172113+)

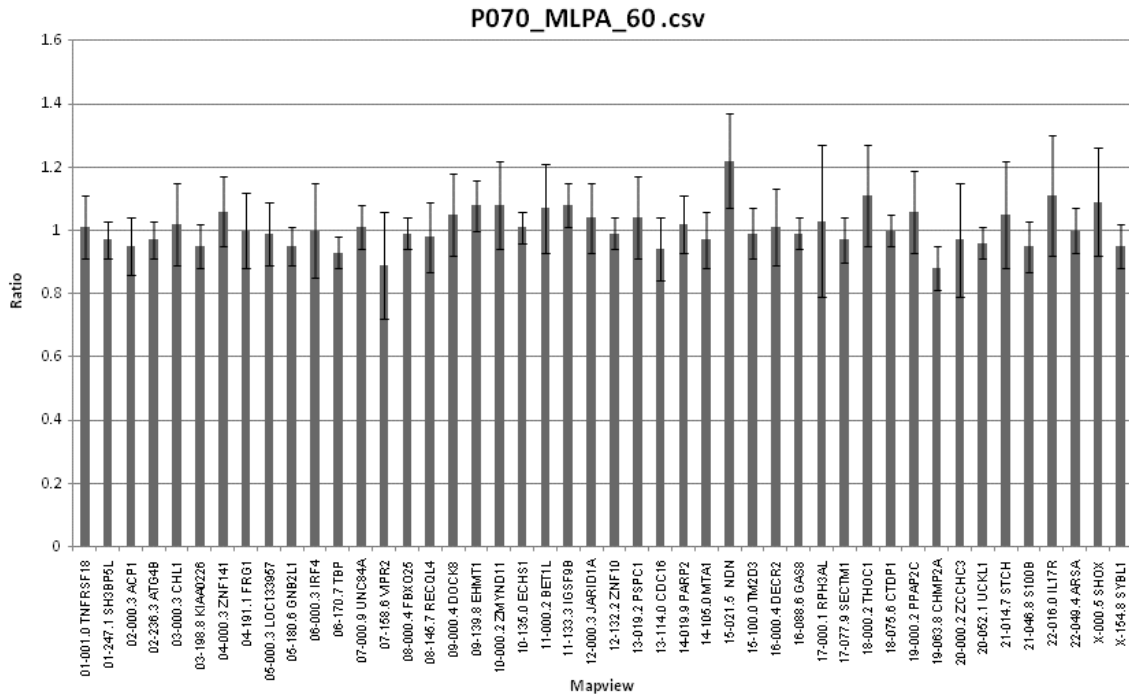
Karyotip Açıklama: Telomerik FISH probu (*multiprobe T-Cytocell*) ile polimorfik olarak bildirilen bölgede delesyon, kontrol probu ile yapılan çalışma normal (polimorfizm)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

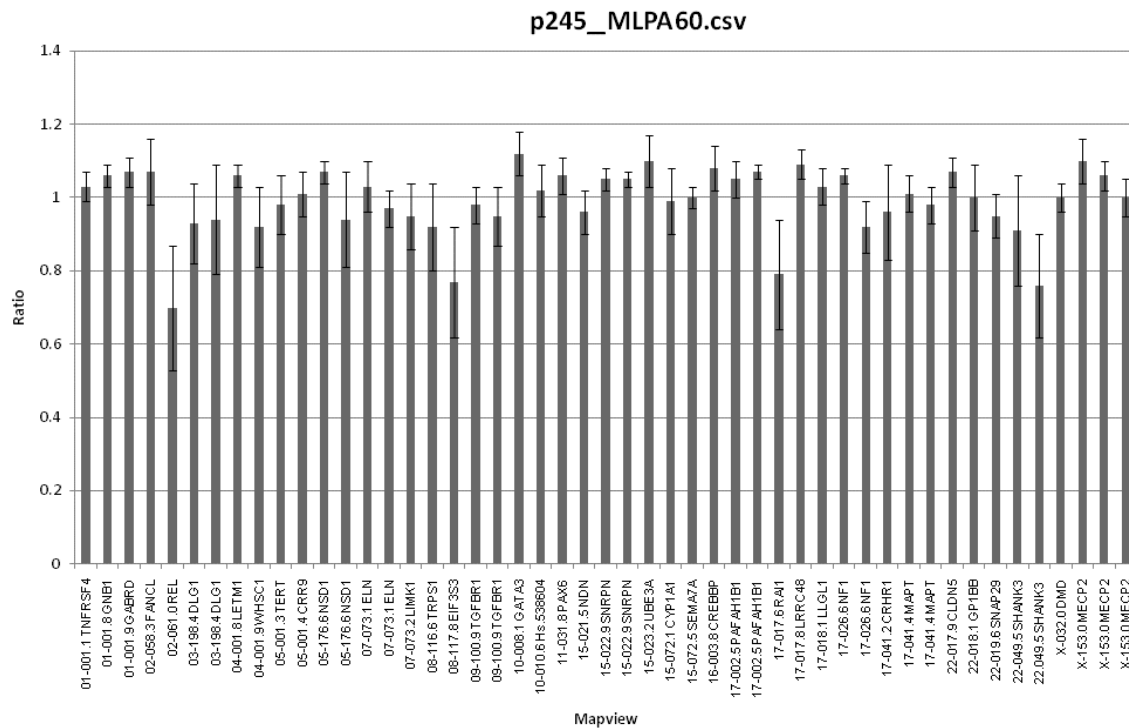
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-117: Olgu 60' ın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-118: Olgu 60' ın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 61**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı: 19, gebelik haftası: 29, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, ventriküler septal defekt, üç damar trakea kesitinde iki damar görüntüsünde (pulmoner atrezi?, fallot tetralojisi?, trunkus arteriosus?), hiperekojen intestin, , umbilikal arter dopplerinde end diastolik akım kaybı

Uygulanan Girişim: Fetal kan örnekleme

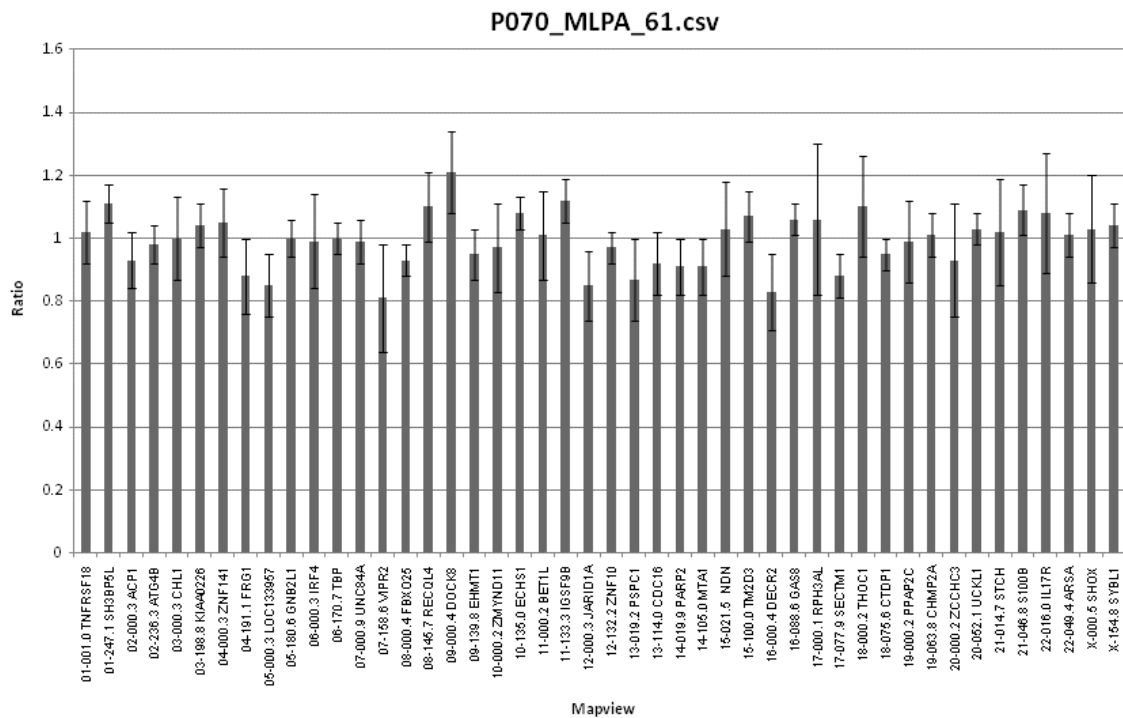
Fetal Karyotip: 46, XX. ish 22q11.2(D22S75x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

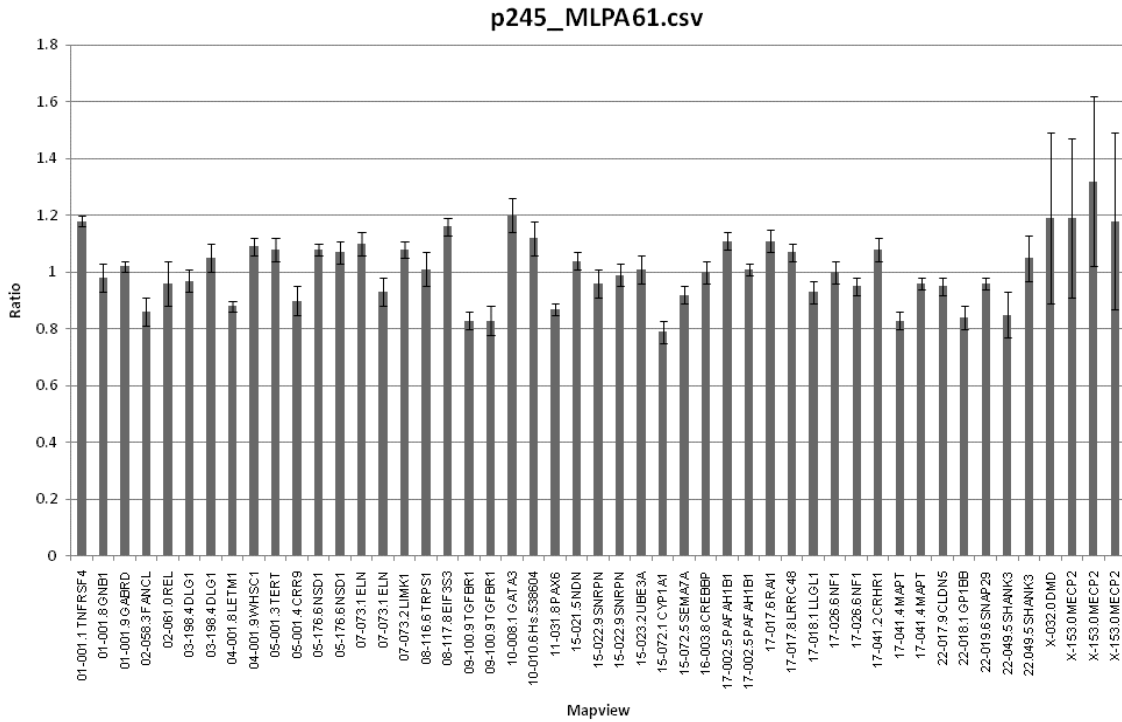
İzlem: Tahliye sonrası muayene; Normal dismorfoloji, ekstremiteler ve babygram normal

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-119: Olgu 61' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-120: Olgu 61' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 62

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:35, gebelik haftası:20, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı, üçlü testte 1:50 trizomi 21, 1:223 trizomi 18 riski, kötü obstetrik öykü (1 anensefali ve 1 hidrosefalili 2 gebelikte tıbbi tahliye)

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, bombe alın, burun kökü basık, dismorfik yüz görünümü

Uygulanan Girişim: Amniosentez

Fetal Karyotip: 46,XY. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Amniyotik sıvı hücre kültürü

Diğer: Akondroplazi açısından yapılan moleküler incelemede *FGFR3* geni 10. eksonda heterozigot G375C mutasyonu saptanmış

İzlem:-

MLPA Sonucu;Olgunun akondroplazi tanısı kesinleştikten sonra MLPA çalışmasından çıkarılmıştır

OLGU 63:

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:27, gebelik haftası:16, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, 1. trimester tarama testinde 1:81 trizomi 21 riski

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, kalın plasenta, plasentada fibrin depozisyonu ve maternal göllenme alanları (uteroplasental yetmezlik?), her iki uterin arterde notch, azalmış amniyotik sıvı volümü

Uygulanan Girişim:Amniosentez

Fetal Karyotip: 46, XX

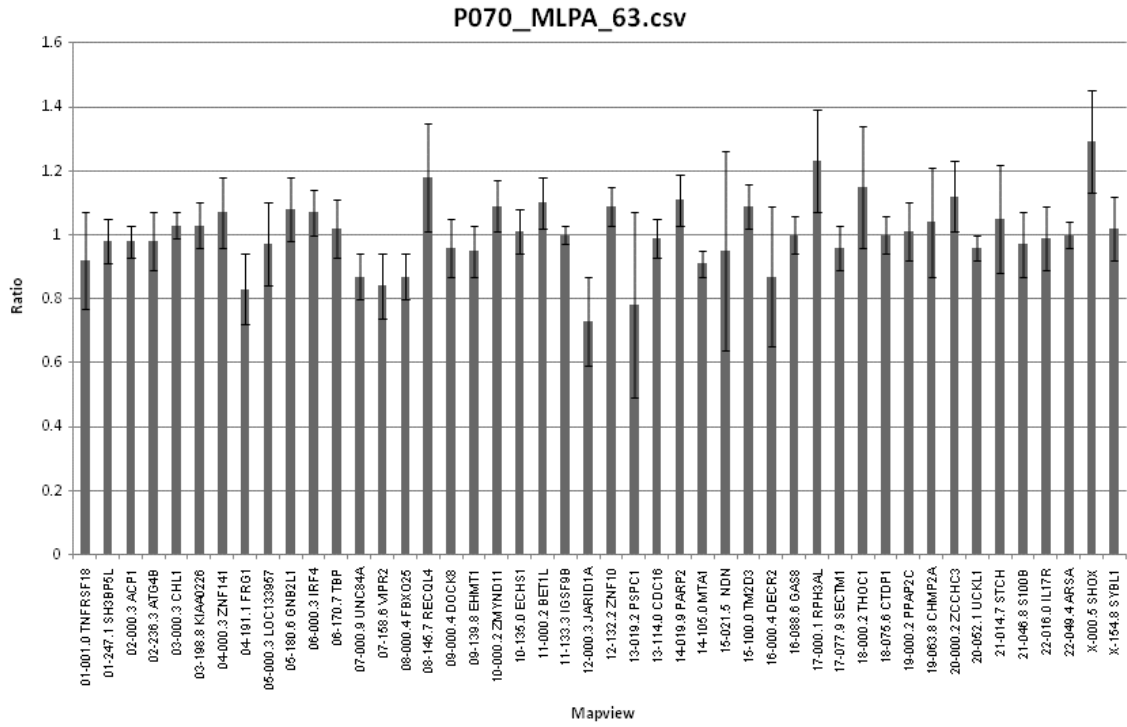
Diğer: Sub telomerik FISH çalışması kısmen başarısız. 1,2,3,4,8,10,15,21 ve ,X kromozomları için sonuç alınamamış, diğer kromozomlar normal.

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücreleri (doğrudan)

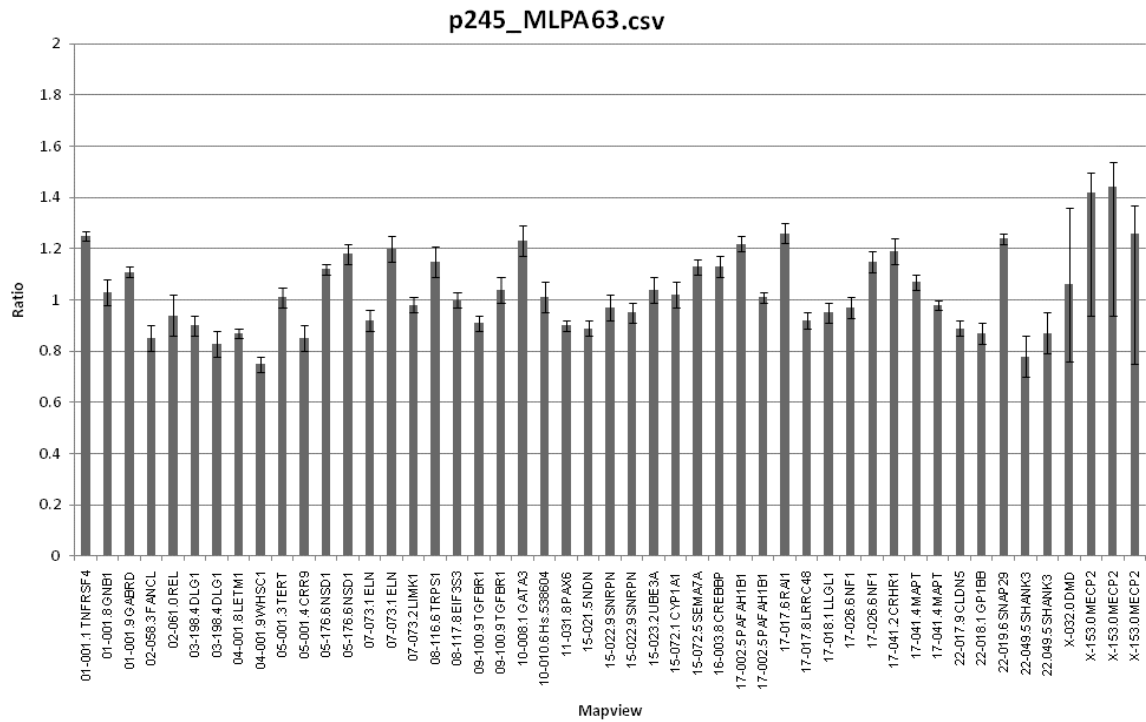
İzlem: Tahliye sonrası muayene;azalmış amniyotik sıvı volümüne bağlı potter yüzü (basık burun, mikrognaði, belirgin epikantal kanatlar, sağda hokey çizgisi, bilateral pesekinovaros, fırlak topuk.

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-121: Olgu 63' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-122: Olgu 63' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 64**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:30, gebelik haftası:31, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, 1.trimester taramasında 1:74 trizomi 21 , 1:35 trizomi13/18 riski

Ultrason Bulguları: İntrauterin gelişme geriliği, outlet VSD,

Uygulanan Girişim:Kordosentez

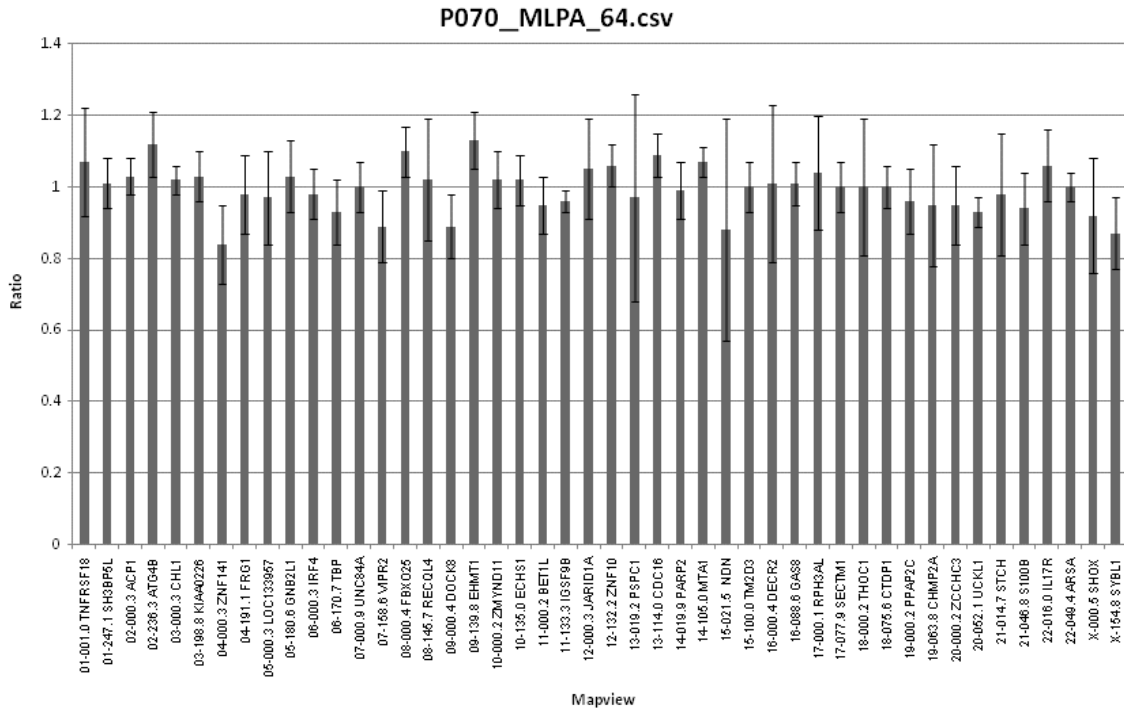
Fetal Karyotip: 46,XX. ish subtel(41x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

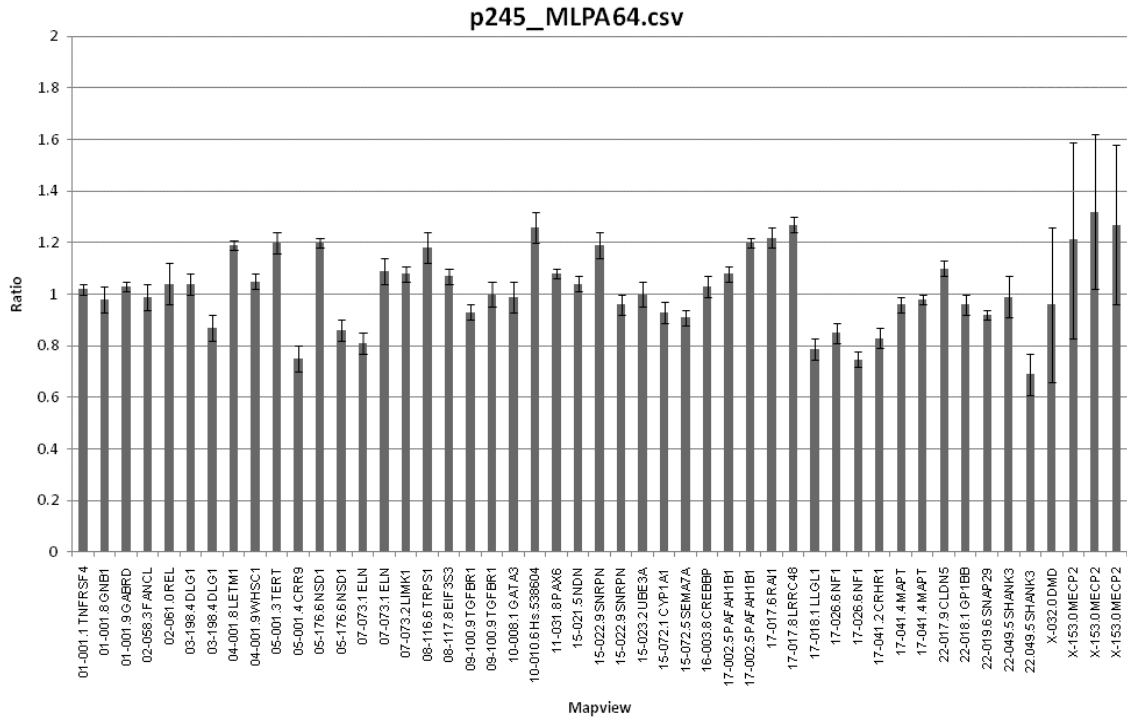
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-123: Olgü 64' ün P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-124: Olgu 64' ün P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 65

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:30, gebelik haftası:26, 1° kuzen evliliği

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Ventriküler septal defekt,sol aortik ark

Uygulanan Girişim:Fetal kan örnekleme

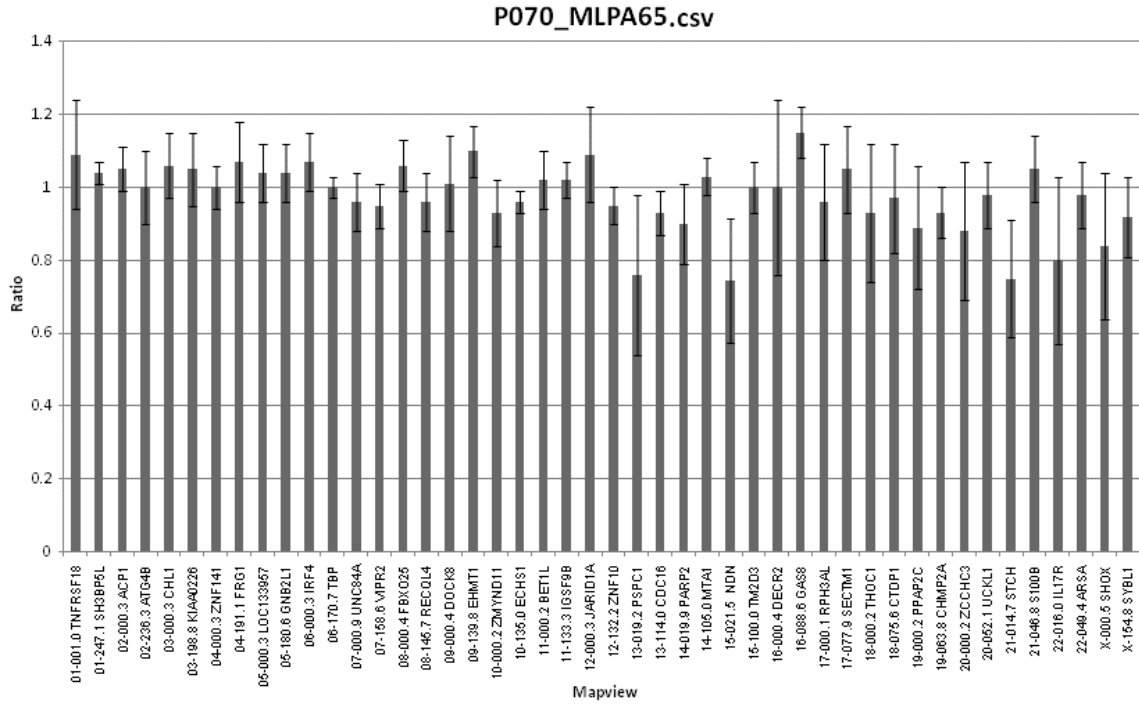
Fetal Karyotip: 46, XX. ish 22q11.2(*TUPLE1*x2)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

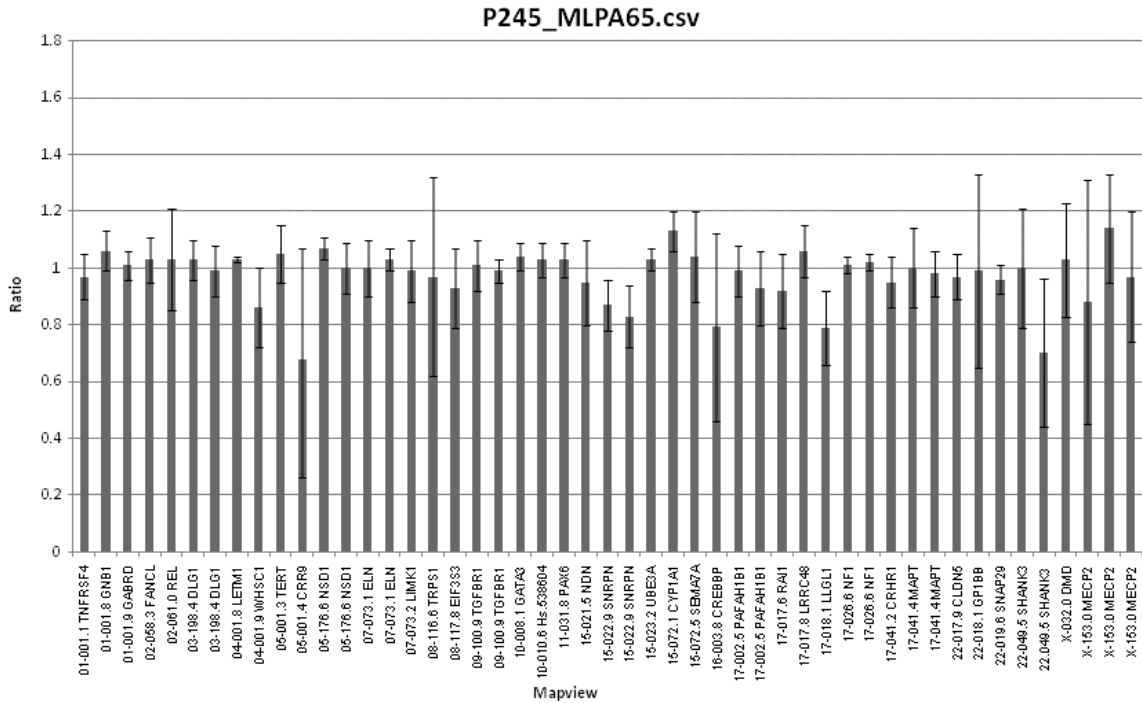
İzlem: Normal spontan doğum, doğum ağırlığı; 2920 gr (25-50p),boy;49cm(50p), baş çevresi; 34cm(50-75p), dismorfik özelliği yok, kardiyolojik muayene EKO; anevrizmal taban çapı 6mm olan VSD, hafif patent foramen ovale

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-125: Olgu 65' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-126: Olgu 65' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 66**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı: 43, gebelik haftası:27, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu:Patolojik ultrason bulgusu, ileri anne yaşı, kötü obstetrik öykü (1 mental retardasyonlu çocuk, 2 abort)

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, tek umblikal arter, hipospadias, amniyotik sıvı volümü azalmış,

Uygulanan Girişim:Amniyosentez ve fetal kan örnekleme (eş zamanlı)

Fetal Karyotip: 46,XY. ish subtel (41x2) (kordon kanı)

Amniyotik sıvı FISH sonucu: nuc ish(RB1x2,D18Z1x2, D21S65x2, DXZ1x1, DYZ3x1)

Diğer: Başka merkezde amniyotik sıvıdan yapılan kromozom analizinde 46,XY[22]/92,XXYY[52] mozaikliği saptanmış (yanlış pozitif sonuç?)

DNA kaynağı: Fetal kordon kanı

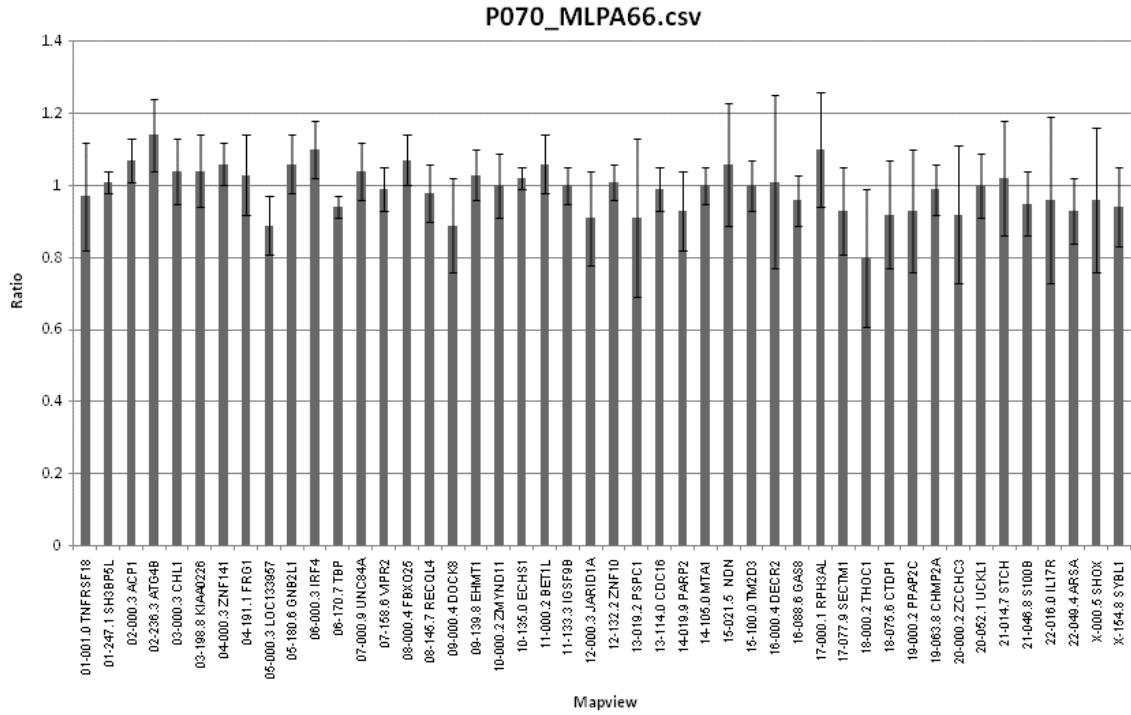
İzlem: Doğum sonrası muayene;36. gebelik haftasında makat gelişi nedeni ile sezeryan ile doğum, ve mekonyum aspirasyonu,Doğum tartısı;1480 gr(<10p), boyu;39cm (<10p), baş çevresi; 30 cm(<10p), fontanel çok açık, üçgen yüz görünümü, hipospadias, bifid skrotum, testisler bilateral inmiş, ekstremitelerde kısalık mevcut

Tüm batin ve beyin USG; normal,

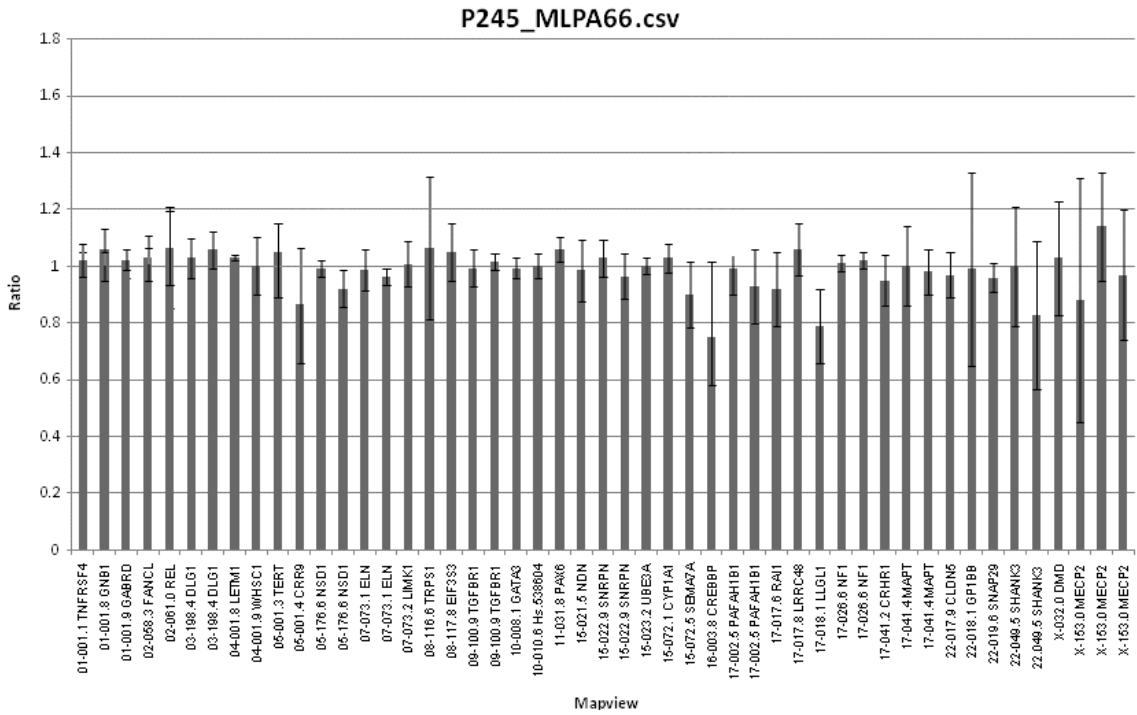
Kardiyolojik muayene EKO; sol ventrikülde aşırı trabekülasyon mevcut, küçük PDA (0,7mm), sol ventrikül noncompaction kardiyomiyopati için izlem önerisi

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-127: Olgu 66' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-128: Olgu 66' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 67**Demografik bilgiler;**

Anne yaşı:31, gebelik haftası:22, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, mikropenis

Uygulanan Girişim: Amniyosentez

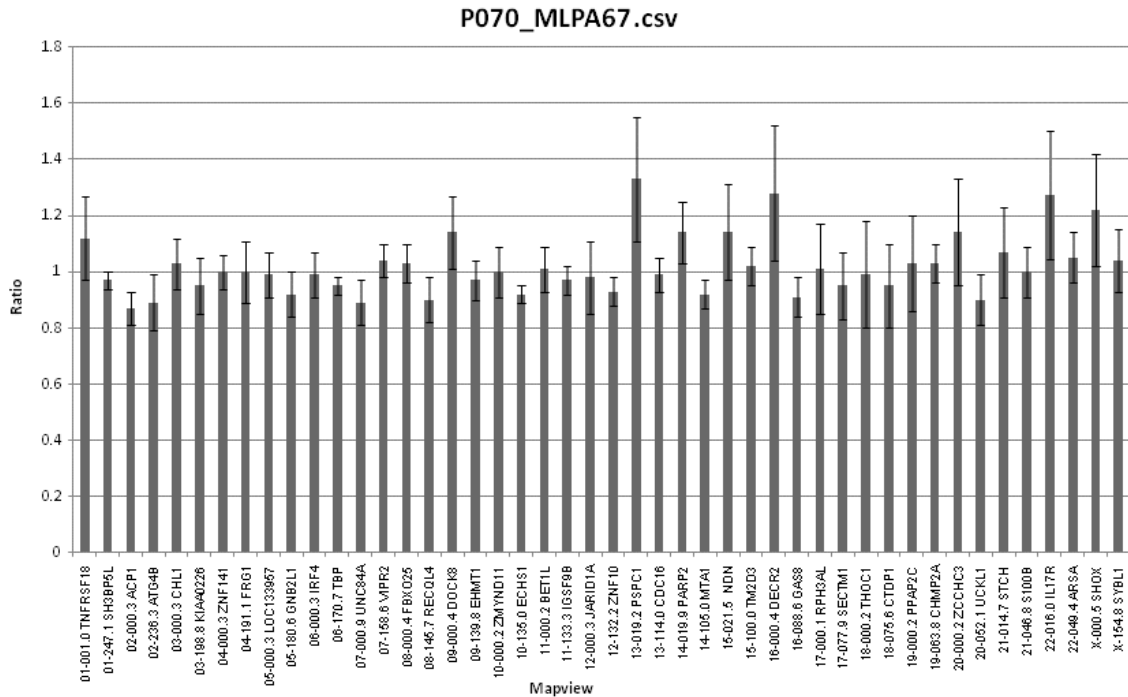
Fetal Karyotip: 46,XY. ish subtel (41x2)

DNA kaynağı: Amniotik sıvı hücre kültürü

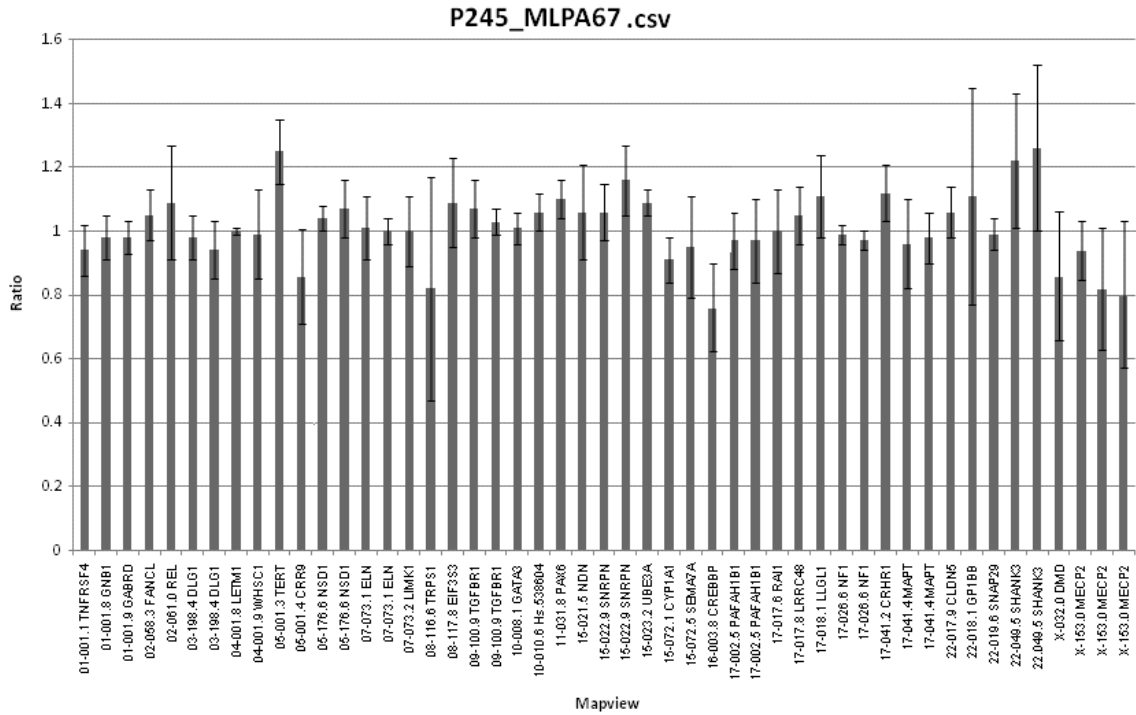
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-129: Olgu 67' nın P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-130: Olgu 67' nın P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

OLGU 68

Demografik bilgiler;

Anne yaşı:31, gebelik haftası:30, akraba evliliği yok

Fetal kromozom analiz endikasyonu: Patolojik ultrason bulgusu

Ultrason Bulguları: Simetrik intrauterin gelişme geriliği, amniyotik sıvı volümünde azalma, plasentada kalınlaşma

Uygulanan Girişim: Korionik villus örneklemesi

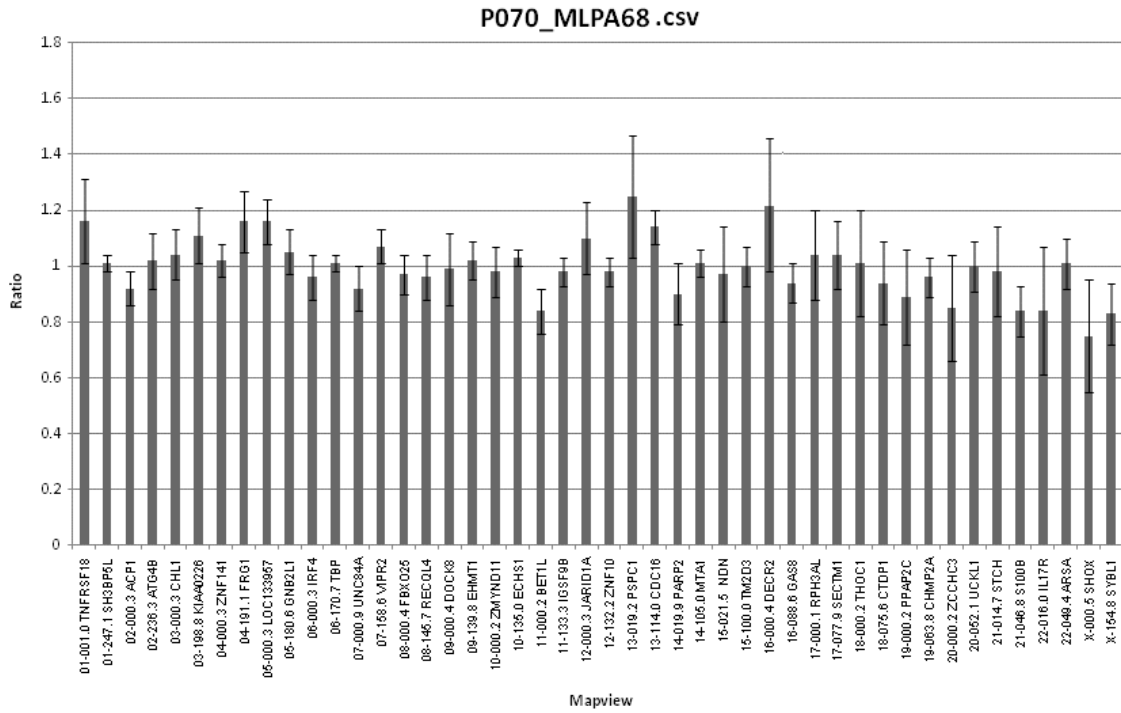
Fetal Karyotip: 46, XX

DNA kaynağı: Korionik villus hücre kültürü

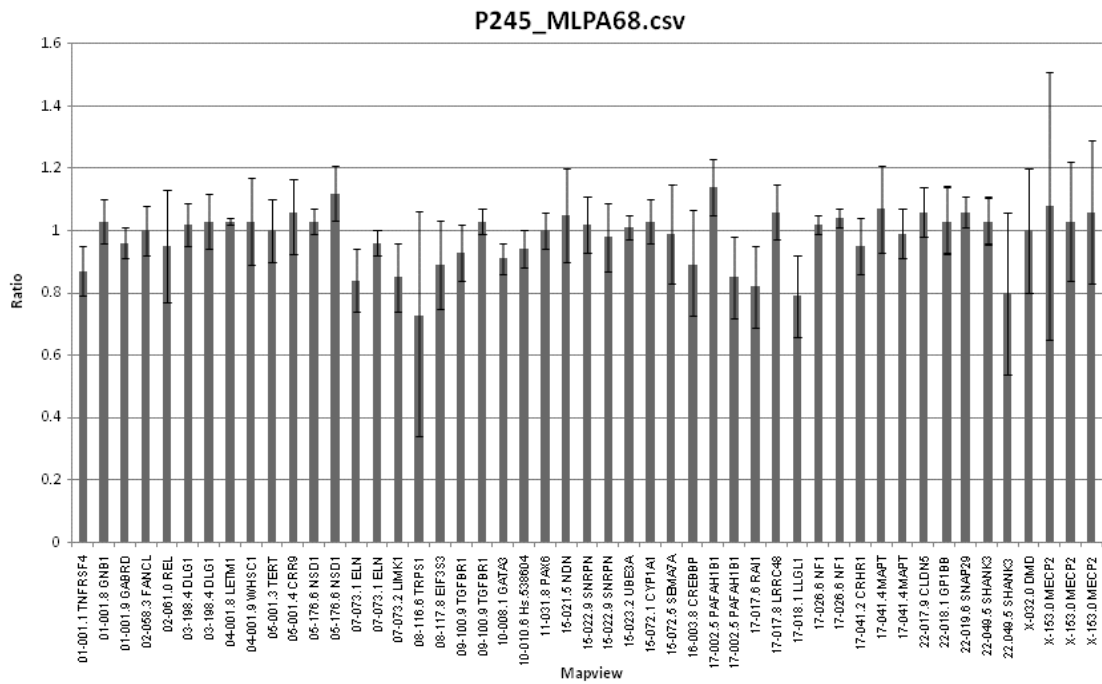
İzlem: -

MLPA Sonucu; mlpa (P070)x2,(P245)x2

(SALSA P070 ve SALSA P245 ile normal sonuç)



Grafik 4-131: Olgu 68' in P070 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği



Grafik 4-132: Olgu 68' in P245 prob seti ile yapılan çalışmanın analiz bar grafiği

5. TARTIŞMA

Günümüzde fetal kromozom anomalileri klasik sitogenetik tekniklerin yanı sıra moleküler sitogenetik, ve moleküler genetik gibi farklı yöntemlerle ve birçok farklı teknikle araştırılmaktadır. Fetal kromozom analizlerinde sık rastlanan sayısal kromozom anomalilerinin tanısında klasik sitogenetik tekniklerin yanı sıra FISH ve moleküler teknikler (QF-PCR) uzun zamandır kullanılmaktadır. Yapısal kromozom anomalilerinin tanısında HRBT tekniğinin yetersiz kaldığı <5 Mb büyüklüğündeki ve özellikle bant kalıbı özgün olmayan subtelomerik bölge anomalilerinin tanısında FISH tekniğinden yararlanılmaktadır. Klinik yönlendirmenin varlığında bazı mikrodelesyon sendromlarının da tanısı FISH tekniği ile konulabilmektedir. Bu nedenle kromozom analiz endikasyonu ve araştırılan anomalinin tipi (sayısal/yapısal) ve büyüklüğü kullanılacak tekniğin belirlenmesinde yönlendirici bir faktördür. Postnatal çalışmalarda klinik yönlendirme bilinen bir mikrodelesyon sendromuna işaret ediyorsa ve bu bölge için bir prob varsa FISH tekniği ile tanıya gidilmesi hızlı ve güvenilir bir yoldur. Özgün bir klinik tablonun olmadığı MKA/MR grubunda ise FISH tekniği ile yalnızca subtelomerik bölge anomalileri araştırılmaktadır. Bu grup olgularda FISH çalışmalarında sonuç elde edilememesi durumunda ileri moleküler teknikler ile genom boyu analizler yapılmakta ve klinik bulguları açıklayacak yeniden düzenlenmeler araştırılmaktadır.

Fetal kromozom analizlerinde, en yüksek kromozom anomali oranı parental yapısal kromozom anomalisi taşıyıcılarında, daha sonra ise patolojik ultrason bulgusu saptanan fetuslarda beklenmektedir. Başaran ve ark. (2008) endikasyonu kromozom anomalisi taşıyıcılığı olan 235 olgunun 122' sinde (%51,91) ve endikasyonu patolojik ultrason bulgusu olan 2.850 olgunun 334' ünde (%11,71) kromozom anomalisi saptamışlar, benzer şekilde diğer bir çalışmada Zhang ve ark. (2010a) 2.782 olguluk amniosentez serisinde 28 parental kromozom anomali taşıyıcılığı endikasyonlu olgunun 19' unda (%67,86) ve 288 patolojik ultrason bulgusu olan olgunun ise 34' ünde (%11,81) kromozom anomalisi saptamışlardır. Bilinen bir mikrodelesyon/duplikasyon sendromuna özgün ultrason patolojisi varlığında ise FISH veya MLPA tekniği ile tanıya ulaşmak mümkündür. Mikrodelesyon sendromlarında lokus spesifik FISH ve

subtelomerik FISH çalışmaları prenatal olgu gruplarında da çalışılmış ve farklı anomali oranları bildirilmiştir. Raymond ve ark. (1997) konotrunkal kalp anomalisi saptanan 5 fetusda FISH ile 22q11 mikrolelesyonu göstermişler ve bu anomalinin varlığında 22q11 delesyon insidansı ~%13 bildirmişlerdir (Devriendt ve ark. 1998). Kontos ve ark. (2008) VSD saptanan bir fetus da MLPA tekniği ile ve Krzeminska ve ark. (2009) ise aort darlığı ve intrauterin gelişme geriliği gösteren bir olguda FISH tekniği ile 7q11.23 mikrolelesyonunu göstererek prenatal dönemde Williams sendromu tanısı alan ilk olguları bildirmiştir. Özgün olmayan ancak kromozom anomalisi için yüksek risk oluşturan intrauterin gelişme geriliği saptanan olgularda da moleküler sitogenetik ve moleküler genetik tekniklerle farklı çalışmalar yapılmıştır. Chen ve ark. (2006) IUGG ya da major USG bulgusu olan, normal kromozom yapısı saptanan fetuslarda, Di George Sendromu ve subtelomerik bölge anomalileri için yapılan FISH incelemesinde %18 oranında mikrolelesyon göstermiştir. Modemont-Soler ve ark. (2010) 229 patolojik ultrason bulgusu olan ancak kromozom analizleri normal sonuçlanmış olguda subtelomerik MLPA prob setleri (SALSA P036 ve P070) ile yaptıkları çalışmada 3 olguda (%1,3) subtelomerik kriptik anomali saptamışlar ancak bunlardan sadece 1' inin klinik olarak anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Rosello ve arkadaşları (2010) 1. trimester tarama testlerinde kromozom anomalisi için yüksak risk taşıyan sitogenetik olarak normal kromozom yapısı saptanmış 49 olguda subtelomerik prob seti(SALSA P036) ve sendromik prob setleri (SALSA P064B ve SALSA P096) ile yapılan MLPA çalışmasında herhangi bir anomali saptamamışlardır. Goumy ve ark. (2010) kardiyak anomali saptanan ve sitogenetik çalışmalarda normal kromozom yapısı saptanmış, Di George lokus spesifik FISH probu ile delesyonu dışlanmış 61 fetusun 4'ünde (%6,5) MLPA tekniği ile submikroskopik kromozom anomalisi saptamışlardır. Bu anomaliler 1 olguda subtelomerik delesyon 18q ve subtelomerik duplikasyon 5p, 1 olguda subtelomerik delesyon 9p, 1 olguda del15q11 (Pradel Willi/Angelman Sendrom lokusu) ve atipik delesyon 22q11.2 (Di George Sendrom lokusu) olarak bildirilmiştir. Kjaergaard ve ark. (2010) retrospektif olarak yaptıkları çalışmada subtelomerik prob setleri (SALSA P036 ve P069) ve sendromik bölge prob seti (SALSA P064) ile yapılan MLPA çalışmasında, ultrason patolojisi saptanan 356 olgunun (109 KVÖ ve 247 AS) 9' unda (%2,52) sitogenetik olarak gösterilemeyen mikrolelesyon saptamışlar, bu delesyonların 7 sinin del 22q11, 1' inin del 15q11 ve 1' inin de del 4pter olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma

grubunda kardiyak anomalilerin en sıklıkla görülen anomali olduğu, 15 olguda patolojik ultrason bulgularının KVÖ girişiminden sonraki USG izlemlerinde saptandığı ve MLPA çalışmasının saklanan DNA örneğinden yapıldığını bildirmişlerdir. Kardiyak anomalisi bulunan 60 olgunun 6'sında (% 10) 22q11.2 mikrodelsiyonu saptamışlardır. Patolojik ultrason bulgusu olarak NT ölçümü $>3,5$ mm olan 57 olguda (54 KVÖ ve 3 AS) anomali saptamamışlar, NT yüksekliği olan fetuslarda MLPA çalışmasının tanıya anlamlı bir katkı sağlamadığını kanaatine varmışlardır.

MLPA'nın kopya sayısı değişikliklerinin araştırılmasında kullanımı diğer tekniklere göre bazı avantajlar sağlamaktadır. Bunlardan birincisi DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography) ve dizileme gibi nokta mutasyonunun araştırılmasında kullanılan tekniklerin, kopya sayısı değişikliğini belirlemede yetersiz kalmasıdır. Southern Blot analizi ise birçok büyük delesyon ve insersiyonların araştırılmasına olanak sağlamakla birlikte küçük delesyonlar için uygun değildir ve aynı zamanda büyük miktarda DNA örneğine ihtiyaç göstermektedir. Kırık noktası kesin bilinen delesyonları saptamakta PCR tekniği kullanılabilse de, çoğu kopya değişikliğinde kırık noktası bilinmediğinden bu teknik kullanılamamaktadır.

FISH tekniği ile MLPA teknikleri çözünürlük açısından karşılaştırıldığında, MLPA tekniği 50-70 nükleotidlik bir anomaliyi tanıyabilme gücüne sahip olduğundan daha avantajlı gözükmektedir. MLPA tekniğinin yüksek çözünürlük avantajı kullanılarak mikrodelsiyon sendromlarının yanısıra sık görülen ve intragenik delesyon ve duplikasyonların bulunduğu bazı tek gen hastalıkları (Duchenne, SMA, vd) için de prob setleri geliştirilmiştir. Daha ender rastlanan hastalıklar (herediter pankreatit, Antitrombin yetmezliği, Birt-Hogg-Dube Sendromu) için hazırlanarak satışa sunulmuş 300'den fazla ticari prob bulunmakta ve isteğe bağlı özel prob tasarımı yapılmaktadır.

Erjavec-Škerget ve ark. (2006), FISH, MLPA ve HR-CGH tekniklerini çözünürlük ve maliyet açısından karşılaştırmak amacıyla zeka geriliği olan ve kromozom anomalisi saptanmamış 100 olguyu değerlendirmişler. Bu olgulardan 10'unda (%10) anomali saptanmıştır. Yazarlar, bu çalışma sonuçlarına dayanarak subtelomerik FISH ve MLPA sonuçlarının uyumlu olduğunu, ancak HR-CGH tekniğinin bu iki tekniğe göre

daha düşük rezolüsyonlu olduğunu, FISH ile dengeli ve dengesiz düzenlenmelerin pozüsyonal durumu ile birlikte tanınmasının avantajlı olduğunu ancak uygulamanın yorucu olduğunu bildirmişlerdir. MLPA tekniğinin ise fiyat ve daha küçük değişimlere (~100 baz) hassas olması nedeniyle diğer iki tekniğe göre daha avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamız sonrasında MLPA test fiyatlarının görünen sarf ve kit harcamalarının, kontrol çalışmaları ve tekrar çalışmaları nedeni ile ~%50 oranında arttığı anlaşılmıştır. Diğer tekniklerle fiyat/verimlilik karşılaştırması yapılırken bu durum göz ardı edilmemelidir. FISH çalışmaları ile özellikle subtelomerik bölgelerin araştırılması zor, uzun süre mikroskop dikkati gerektiren ve teknik zorluklar içeren bir süreç olarak bilinmektedir. Subtelomerik anomalilerin araştırılmasında MLPA ve FISH tekniği, karşılaştırıldığında, MLPA tekniği uygulayıcılar için daha az yorucu, uygulaması kolay ve çok örneğin bir kerede çalışılmasına olanak sağlaması nedenleri ile daha avantajlı olduğu görülmüştür. Ancak daha ender görülseler de atipik delesyon ve duplikasyonların MLPA tekniği ile gösterilemeyeceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Mikrodelesyon sendromlarına yönelik FISH problemleri ile yapılan incelemelerde, her bir sendrom için ayrı bir FISH işlemi ve maliyeti bulunmaktadır. MLPA tekniğinde birçok mikrodelesyon/duplikasyon sendromunun aynı prob seti ile bir seferde birçok hastada çalışılabilmesi hem maliyet hem de zaman açısından daha avantajlı gözükmektedir.

Çalışmamızda MLPA çalışmasına alınan 66 olgudan 3'ünde (%4,5) kromozom anomalisi saptanmıştır. Bu anomalilerden 2'si (%3,03) subtelomerik MLPA prob seti (SALSA P070) çalışmasında saptanan subtelomerik anomalilerdir. Bunlar biri 18p subtelomerik delesyonu (olgu 15) ve diğeri 18q duplikasyonudur (olgu 10). Sendrom taramaya yönelik MLPA prob seti (SALSA P245) ile yapılan çalışmada 1 olguda 7q11.23 delesyonu (Williams Sendromu lokusu) idi. Çalışmamızda %4,5 olarak saptanan anomali oranı, olgu seçim kriterlerimize benzer olgu grubunda yapılmış bir çalışmada (Goumy ve ark. 2010) da oran %6,5 olarak saptanmıştı. Benzer olgu grubu ile yapılan bir diğer çalışmada (Gignac ve ark. 2006) 48 majör konjenital patoloji saptanan fetal doku örneğinin 2'sinde (%4) subtelomerik anomali saptanmıştı. Literatürde ve çalışmamızda multipl malformasyonlar taşıyan fetuslarda saptanan %3-6 subtelomerik anomali oranları

postnatal çalışmalarda MKA/MR olgu gruplarında yapılan FISH ve MLPA çalışma sonuçları ile uyumlu gözükmeştir. Bu olgu gruplarında subtelomerik anomali oranı subtelomerik FISH ile %4 ve MLPA tekniğı ile %3,3' lük anomali oranları çalışmamızda saptanmış olan %3,03 oranı ile uyumlu olarak değeriendirildi (Gignac ve ark. 2006 ve Goumy ve ark. 2010). Olgu seçimlerinin oldukça benzerlik gösterdiği dizin çalışmalarda ise çok değışken anomali oranları bildirilmektedir. Bu oranlar kullanılan dizin tekniğinin kapsadığı klon sayısı ve genomik alanın büyüklüğü kısacası çözünürlük gücü ile değışebilmektedir. Vialard ve ark. (2009), çalışmamızda kullanılan MLPA prob lokuslarına benzer tüm subtelomerik, mikrolelesyon sendromları lokuslarını, bazı kanser gen lokuslarını ve ilaveten bazı STS marker lokuslarını kapsayan dizin çalışmasında normal karyotipli 37 fetusun 4' ünde (%10,8) anomali [1 olgu del(22)(q11.2), 1 olgu der(8) t(8;11), 1 olgu del (1)(p36) ve 1 olgu dup (6)(p12.1p21.2)] saptandığını bildirmişlerdir. Çalışma grubumuzu oluştururken USG de DGS lehine kardiyak bulgusu olan ve delesyon saptanan olgular dışlanmıştı. Bu nedenle çalışma grubumuzda 22q11.2 delesyonu saptanmaması atipik delesyonlar dışında beklenen bir sonuçtur. Vialard ve ark., nın çalışma grubunda 22q11.2 delesyonları açısından ön inceleme yapılmadığından kardiyak anomalili olgularda en sıklıkla saptanan bu delesyonu bulmuşlardır. dup(6)(p12.1p21.2) bölgesinin de bizim prob setimizin tanıyamayacağı bir bölgede olması göz önünde bulundurulmalıdır. Bu iki olgu dışlandığında Vialard ve arkadaşlarının anomali oranı %5,4 olacaktı ki bu oran çalışma grubumuzla uyumlu olacaktı.

Majör konjenital anomalili olguların dahil edildiğı normal karyotipli 26 olgunun 622 lokusu kapsayan 1.887 klon içeren dizin platformu (signature chip v4.0) ve 24 olgunun ise 1.500 lokusu kapsayan 4.685 klon içeren dizin seti (Signature whole genome chip) ile çalışıldığı diğeri bir çalışmada, toplam 50 olguda klinik olarak anlamlı 1 (%2) anomali [dup(22)(q13.3q13.31)] gösterilmiştir (Kleeman ve ark., 2009). Aynı çalışmada 3 olguda (%6) polimorfik CNV saptanmıştır. Çalışma grubumuza en yakın olgu grubu içeren bir çalışmada (Shaffer ve ark., 2008), 110 normal karyotipli patolojik ultrason bulgusu olan olguda subtelomerik, perisentromerik ve sendromik alanları içeren BAC dizin seti (signature chip v1.0- 4.0) ile, 2 olguda (%1,8) anomali saptanırken 12 olguda

(%7,9) polimorfik CNV saptandığını bildirilmiştir. Bu çalışmada saptanan anomali oranları çalışmamızda saptanan anomali oranı ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda saptanan anomalilerden, 18p subtelomerik bölge (*THOC1* gen bölgesi) delesyonu saptanan olgumuz (olgu 15), ağır patolojik ultrason bulguları (Holoprosensefali, talemik füzyon, nazal kemik yokluğu, tek burun deliği, hipotelorizm, her iki böbrekte hafif ekojenite artışı) olması nedeni ile çalışma tamamlanmadan tıbbi tahliye ile sonlandı. Tanı aşamasında kullanılan her iki teknik de (MLPA ve FISH) 18p11.32 bandında lokalize olan *THOC1* gen bölgesine özgü dizileri araştırmaktadır. *TREX* kompleksinin (transkripsiyon eksport kompleksi) sub üniti olan *THO* kompleksinin sub ünidadır. *TREX* kompleksi kırılmış mRNA ile polimeraz enziminin transkripsiyonun elongasyon aşamasındaki taşınmasında görev yapmaktadır (Strasser ve ark. 2002). 18p terminal delesyonu ve holoprosensefali birlikteliği ilk olarak Johnson ve Bachman (1976) tarafından gösterilmiştir. Sonraki dönemde Overhauser ve ark. (1995) 18p terminal delesyonu taşıyan 6 holoprosensefali olgusunda FISH ve STR marker analizleri ile 6 Mb'lık kritik bölge tanımlamışlardır. Gripp ve ark. (2000) aynı olgu grubu ve buna ilave olarak ekledikleri iki olgu ile birlikte toplam 8 olguda yaptıkları FISH, 18p11.31 bant bölgesi içinde holoprosensefali ile ilişkili 4. gen olarak *TGIF* genini tanımlamışlar ve fare modeli çalışmaları ile çalışmaları ile nöral eksen determinasyonu ile ilişkisini bildirmişlerdir. 18p delesyonu gösterilen olgumuzda fetal ultrasonografide holoprosensefali varlığı *TGIF* geni ile ilişkili parsiyel bir monozomi olduğunu düşündürmektedir. 18. kromozomun kısa kolu terminal bölgesi ile *TGIF* geni arasında yaklaşık 3,5Mb lık bir kromozom segmenti bulunmaktadır. Bu durumda olgumuzda saptanan delesyonun $\geq 3,5$ Mb büyüklükte olduğu kabul edilebilir. MLPA çalışmasında delesyon saptanması üzerine olguda 18p/q subtelomerik (VYSIS) probu ile FISH incelemesi yapıldı ve delesyonun varlığı görüldü. Bunun üzerine olgunun önceden incelenmiş kromozom görüntüleri ve Multiprob telomerik FISH çalışma sonuçları tekrar değerlendirildiğinde rutin çalışmada GTG bantlamada fark edilemeyen, 18. kromozomlardan birinin kısa kolunun göreceli yaklaşık 1/3-1/4 oranında daha kısa olduğu Multiprob FISH çalışmasında ise yetersiz metafaz sayısı ve/veya hatalı sinyal yorumlanması nedeni ile delesyonun saptanamadığı anlaşıldı. 18. kromozomun kısa kolunun toplam boyutunun ~15Mb olduğu göz önüne alınırsa, sitogenetik olarak

sonradan görülebilen 4-7Mb büyüklüğündeki bir delesyonun rutin incelemelerde gözden kaçabileceği bir kez daha vurgulanmış oldu. Bu delesyonun Multiprob FISH sisteminde de gözden kaçması bu incelemenin prenatal preparatlarda uygulamasının metafaz azlığı nedeniyle çok güç ve yorucu olması nedeniyle atlanabileceği biçiminde yorumlandı. Olgumuzdaki delesyonun kırık noktasının daha ayrıntılı belirlenebilmesi için ileri moleküler çalışmalar (dizin, STR analizleri, SNP analizleri, vb) planlandı.

18p delesyon sendromu (MIM 146390) sık rastlanan ve klinik olarak iyi tanımlanmış sendromlardan biridir. İlk kez 1963 yılında de Grouchy ve arkadaşları tarafından tanımlanan 18p delesyon sendromu sonraki yıllarda fenotip ve genotip ilişkisi açısından ayrıntılı olarak da incelenmiştir (Turleu 2008; Wester ve ark. 2006). FISH çalışmalarının ve moleküler tekniklerin katkısı ile sitogenetik olarak gösterilemeyen olgularda da sub mikroskobik delesyonlar saptanmaktadır (Bendavid ve ark. 2007). 18p delesyon sendromunun klinik bulguları arasında gelişme geriliği, düşük doğum ağırlığı, yuvarlak yüz, büyük displastik kulaklar, hipertelorizm, geniş burun köprüsü, yukarı dönük burun delikleri, mikrognati, konjenital kalp anomalileri, mikropenis, hipoplastik testis, gonadal disgenezi, klinodaktili, zeka geriliği, distoni bildirilmektedir (MIM 146390). 18p monozomisi taşıyan olguların %10-15' inde holoprozensefali ve ağır merkezi sinir sistemi anomalileri bildirilmiştir (Overhauser ve ark.1995). Prenatal dönemde sitogenetik incelemelerle saptanmış dengesiz tranlokasyon ürünü parsiyel monozomi 18 ve izokromozom 18q olguları bildirilmiştir (Sutton ve ark. 1986; de Pater ve ark. 1997; Kim ve ark. 2004; Graf ve ark. 2002; McGhee ve ark. 2001). Literatür araştırması (pubmed, ECARUCA vb.) sonucunda, olgumuzun prenatal çalışmalarda saptanmış 18p terminal bölgesi için submikroskobik de novo delesyon gösteren ilk olgu olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda bir olguda (olgu 20) MLPA SALSA P245 sendromik prob seti ile *ELN* geni 1. ve 20. ekson ve *LIMK* geni lokusunda heterozigot delesyon saptandı. Bu iki gen mikrolelesyon sendromunda (MIM 194050) kayba uğrayan gen bölgesindeki genlerden olup *ELN* geni supralavular aort stenozu ve elastin arteriopatisi ile, *LIMK* geni ise bu sendromda fenotipik bulgu olan zeka geriliği ile ilişkilendirilen genlerdir. Birbiri ile örtüşmeyen ancak komşu üç farklı klondan elde edilen toplam 1Mb lık bir bölgede

450 kb lık bölümü (*ELN* geni ve *LIMK* geni dahil) kapsayan (Şekil4-12b), Williams-Beuren sendromuna özgün olarak hazırlanan FISH probu (Cytocell) MLPA tekniği ile saptanan bu delesyonun doğrulaması amacıyla kullanıldı. Bu çalışmada delesyonun varlığı FISH tekniği ile de gösterildi ve böylece delesyon büyüklüğünün minimum 1Mb boyutunda olduğu (probun dağıldığı alan büyüklüğü) varsayılabilir. Olgumuzda prenatal ultrasonografide saptanan intrauterin gelişme geriliği, kısa femur, tek umblikal arter, küçük mide cebi bulguları nedeniyle fetal kromozom analizi yapılmıştı. Kromozom yapısı normal saptandığından anomalileri nedeniyle MLPA çalışması amacıyla DNA sı bankalanmıştı. Olgumuz, MLPA çalışması henüz tamamlanmadan 34. gebelik haftasında fetal distress nedeni ile sezeryan doğumla 1.430 gr doğdu. Doğum sonrasında 35 günlük muayenede periorbital dolgunluk, ince uzun dudak, uzun filtrum, mikrognati, sivri çene, kulaklar arkaya dönük, tüm vücutta cutis marmoratus, hipotiroidi (tefor tedavisi başlanmış) tespit edildi. 6 aylıkken yapılan eko çalışmasında küçük VSD, 14 aylıkken yapılan eko çalışmasında periferik pulmoner stenoz saptandı. İntrauterin gelişme geriliği WS için prenatal dönemde sıklıkla bildirilen bir bulgu olmasına rağmen genetik veya genetik olmayan birçok hastalığa eşlik eder. Olgunun prenatal USG bulgularının hiçbirisi WS için özgün değildir ve prenatal incelemeler sırasında WS ön tanıda düşünülmemiştir. Olgumuzda prenatal dönemde saptanmayan ancak doğduktan sonra farklı dönemlerde yapılan ekografide saptanan ventriküler septal defekt ve periferik pulmoner stenoz da bu sendromda sıklıkla rastlanan bulgulardır. Doğum sonrası yapılan klinik muayene bulgularına dayanarak postnatal FISH tekniği ile 22q11.2 delesyon incelemesi de yapılmış ve normal sonuç elde edilmiştir. MLPA çalışması sonucu ile olgu klinik açıdan tekrar değerlendirildiğinde bulguların WS ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Williams-Beuren sendromu supralvalvular aort stenozu (SVAS), zeka geriliği ve özgün yüz bulguları ile Williams ve arkadaşları tarafından (1961) yılında tanımlanmıştır. Beuren ve ark. (1962) bu bulgulara ilave olarak diş anomalileri ve periferik pulmoner arter stenozu bulguları da taşıyan benzer bir sendrom tanımlamış, Black, JA., Bonham-Carter ve ark. (1963) ortak bulguları SVAS ve hiperkalsemi olan ve yüz bulgularının benzer olduğu görülen bu iki sendromun aslında aynı sendrom olduğunu bildirmiştir. Williams sendromu 7. kromozomun q11.23 bölgesinde bulunan 28 geni kapsayan 1,5 ile 1,8 Mb büyüklüğünde bir bölgenin heterozigot delesyonu ile oluşan bir contiguous

(bitişik-komşu) gen delesyonu hastalığıdır (Ewart ve ark. 1993). Bu bölgede bulunan Elastin geni, elastin arteriopati ve SVAS sendromu, *BAZ1B* genin delesyonu hiperkalsemi ve hiperkalsiüri, *GTF2RD1* geni kranyo fasial patolojiler, *LIMK1*, *CLIP2* ve *GTF21* genleri ise zeka gerilikleri ile ilişkilendirilmiştir (OMIM #194050) Olguların %99' unda içinde *ELN* geninin de olduğu 7q11.23 bölgeye özgün problemler ile yapılan FISH analizlerinde saptanan delesyon ile tanı koyulabilmektedir. Williams sendromu yenidoğan sıklığı 1/7500-20.000 bildirilmektedir (Stromme ve ark. 2002; Grimm ve Wesselhoeft 1980; Ferrero ve ark. 2007) . Sadler ve ark. (2001) Williams sendromlu olguların %75' inde saptanan SVAS bulgusu cinsiyete göre değerlendirildiğinde erkeklerde kız olgulara göre daha ağır bir klinik tablo ortaya çıkardığı bunun da hormonal etkileşimle açıklanabileceği bildirilmiştir. Eronen ve ark. (2002) FISH ile tanı almış 75 olgulu çalışmada Williams sendromu için kardinal bulgu olan SVAS' ın olguların %53' ünde bulunduğunu, diğer kardiovasküler bulgu olarak olguların %41' inde Pulmoner arterial stenoz (PAS), %11' inde mitral kapak anomalisi ve %2'sinde ise Fallot tetralojisi olduğunu bildirmişlerdir. Olgumuzda doğum sonrası eko çalışmasında saptanan VSD ve Periferik Pulmoner stenoz anomalilerinin prenatal dönemde saptanamamış olması olası bir durumdur. Williams sendromu'nun özgün dismorfik ve kalp bulguları nedeniyle postnatal dönemde klinik yönlendirme ile sitogenetik ve moleküler sitogenetik çalışmalarda kolaylıkla tanınabilmektedir. Moleküler yöntemlerden mikrosatellit analizleri ve MLPA çalışmaları ile de daha ayrıntılı bir delesyon profili gösterilebilmektedir (von Beust ve ark. 2000). Van Hagen ve ark. (2007) klinik olarak Williams ön tanısı almış 63 olguyu ticari FISH problemleri ve MLPA prob seti (SALSA P029-Williams sendromuna spesifik) ile araştırmış olguların 53' ünde her iki teknikle de delesyonu göstermişler, 1 olguda FISH ile saptamayan atipik ve küçük bir delesyon MLPA ile gösterilebilmiştir. Araştırmacılar MLPA tekniğinin FISH tekniği ile kıyaslandığında daha hızlı ve küçük delesyonları göstermede daha etkin olduğunu ancak 9 olguda her iki teknikle de delesyonun saptanamadığını ve tanının kesinleşmediğini bildirmiştir. Kontos ve ark. (2008) prenatal olarak VSD saptanan fetusta sitogenetik çalışmanın normal saptanması sonrasında SALSA P064 mikrolelesyon sendrom prob seti ile yaptıkları MLPA çalışmasında *CYLN2*, *FZD9*, *STX1A*, *LIMK1* ve *ELN* geni lokuslarını içeren piklerde delesyon saptamışlar ve bu sonucu FISH çalışması ile doğrulayarak Williams sendromu tanısı koymuşlardır. Prenatal olarak Williams sendromu

tanısı alan bu ilk olgunun tanısının SALSA P064 prob seti kullanılarak MLPA tekniği koyulması, prenatal bulguların bu sendrom için özgün olmadığına işaret etmektedir. Krzeminska ve ark. (2009) prenatal ultrasonografide WS için özgün olan SVAS bulgusu saptadıkları fetusun kromozom analizinin normal sonuçlanması sonrasında WS düşünülmüş olarak yaptıkları FISH çalışmasında 7q11.23 lokusunda delesyon saptayarak prenatal dönemde tanı alan ikinci Williams sendromu olgusunu bildirmişlerdir. Yapılan literatür araştırmasında olgumuzun prenatal olarak tanı alan üçüncü Williams sendromu olgusu olduğu anlaşılmıştır. Olgumuzun bu iki prenatal olgudan farkı, prenatal ultrasonografide kardiyak anomali saptanmamış olmasıdır.

Çalışmada bir olgumuzda (olgu 10) MLPA subtelomerik prob (SALSA P070) ile yapılan çalışmada 18. kromozom q23 bandı *CTDPI* probunda triallelik sinyal saptandı. Bu sonuç üzerine 18. kromozom subtelomerik probu (Vysis) ile yapılan FISH çalışması normal sonuçlandı. Saptanan duplikasyonun doğrulanması amacı ile olguda “Affimetrix cyto chip2.7” ile dizin çalışması yapıldı. Sonuçlar Affimetrix “Chromosome Analysis Suite” (ChAS) programında analiz edildi. Bu çalışmada 18q23 bandında *CTDPI* geninin büyük bir bölümünü içine alan yaklaşık 75 kb büyüklüğünde bir bölge için tetrazomi varlığı gözlemlendi. İlgili veri tabanlarında tetrazomi gözlenen bölgeye özgü biyoinformatik çalışmada kullanılan CNV (Copy Number Variation) veritabanı (<http://projects.tcag.ca/cgi-bin/variation/gbrowse/hg18/>) araştırıldığında: aynı bölge ile örtüşen ve benzer büyüklükte bildirilen anlamlı bir kopya sayısı değişikliği olmadığı görüldü. Decipher V5.1 de yapılan biyoinformatik analizde, olgumuzdaki duplikasyon lokusunu kapsayan bölge için doz artışı bildirilen 3 farklı olguya rastlandı. Bu olgulardan ilki (Decipher olgu no # 1581) normal kromozom sonucu olmakla birlikte dizin çalışmasında 18. kromozomun kısa kolu total delesyonu ve 18. kromozomun q kolu için total duplikasyon gösteren, aile çalışması yapılmamış ve multipl konjenital anomalili bir olgu idi. Bu bulgular izokromozom 18q anomalisine işaret etmektedir. Periferik kan kromozom analizlerinde izo18q kromozomuna rastlanmaması ancak dokusal mozaizizm ile açıklanabilir. Decipher’in tüm p kol delesyonu ve q kol trizomisi olgusu ile 18q23 bandında 75 kb lık tetra allelik değişim saptanan olgumuzun klinik bulgularının karşılaştırılmasının doğru olmayacağı düşünüldü. Decipher veritabanındaki ve olgumuzla aynı allelde, aynı doz değişimi saptanan diğer bir olgu, kromozom analizi normal

sonuçlanan ancak dizin çalışmasında 18q12.3-q23 bölgesi için ~37Mb lık duplikasyon ve aynı zamanda 5p13.2-15.33 bölgesi için ~36Mb lık bir bölge için delesyon bildirilmiş (Decipher olgu no # 256304) olgudur. Bu olgunun ailevi dengeli yapısal kromozom anomalisinin dengesiz ürünü olduğu bildirilmiş, ancak ailenin sitogenetik sonuçları veritabanında yer almamıştır. Bu kadar büyük 2 anomali taşıyan olguda fenotipik bulgu olarak sadece atrio-ventriküler septal defekt (AVSD) bulgusunun bildirilmesi bir diğer veritabanı sorunu olarak değerlendirilmelidir. Decipher veritabanında olgumuzla aynı lokusta duplikasyon saptanan üçüncü olgu (Decipher olgu no # 4152) 13q11-q33 arasında 16 Mb lık bir bölge için duplikasyon ve aynı zamanda 18q21.31-qter arasında kalan 22 Mb lık bölge için duplikasyon gösteren, fenotipik bulgusu olmayan bir olgu bildirilmiştir. Bu olgudaki sitogenetik çalışma sonucunun bulunmaması, oldukça büyük duplikasyon gösteren bu olguda fenotipik bulgu olmaması değerlendirilmiş ve bildirilen kopya sayısı değişimlerinin polimorfik kopya sayısı değişimleri olabileceği düşünülmüş, bu olguya ait verinin hatalı olma olasılığı da göz ardı edilmemiştir. Koolen ve arkadaşlarının (2004) açıklanamayan zeka geriliği olan 210 olguda subtelomerik prob seti (P036) ile yaptığı MLPA çalışmasında, gelişme geriliği (-3,5SD) orta derecede zeka geriliği ve mikrosefali(-2,5 SD) olan bir olguda 18q subtelomerik bölgede *FLJ21172* klon probunda duplikasyon saptanmış anne baba değerlendirmelerinde annenin de aynı duplikasyonu taşıdığı gözlenmiş ve annenin oğlu ile benzer fenotipi taşıdığı [mikrosefali (-4SD), boy kısalığı (-2,5SD) ve orta derecede zeka geriliği] bildirilmiştir. Ailedeki bu duplikasyonun büyüklüğü hakkında, bu prob seti ile bilgi edinilemez. Bu durumda saptanan ailevi duplikasyonun büyüklüğü hiçbir gen lokusunu içermeyecek kadar küçük ya da anlamlı sayılabilecek ve fenotipi etkileyebilecek kadar büyük de olabilir. Olgumuzda dizin çalışması ile duplikasyonun *CTDPI* geninin bir bölümünü içerdiğinin belirlenmiş olması ve Koolen ailesinin klinik bulguları ile olgumuzun -IUGG dışında klinik fenotiplerin benzememesi nedeni ile bu 2 olgunun genotip fenotip ilişkileri açısından karşılaştırılmasını uygun bulmadık. Diğer bir çalışmada (Isidor ve ark.,2008) multiple konjenital anomali (Korpus kallosum yokluğu, serebellar hipoplazi, Dandy Walker malformasyonu ve retrognati) saptanarak sonlandırılan bir olguda prenatal ultrasonografik bulgulara ek olarak kardiyak anomali(VSD, hipoplastik aortik ark), anormal akciğer lobülasyonu, safra kesesi yokluğu ve dismorfik bulgular saptanmıştır. Olguda P036 ve P069 subtelomerik prob setleri ile yapılan MLPA çalışmasında 18q

subtelomerik bölgede duplikasyon saptanmıştır. Babada da aynı duplikasyonun bulunduğu gösterilmiştir. Araştırmacının indekste yaptığı Affymetrix 244K dizin çalışmasında bu duplikasyonun telomere 145 kb uzaklıkta, yaklaşık 450Kb büyüklüğünde olduğu ve 7 gen (*Q8N7E7*, *CTDPI*, *Q6ZVY3*, *KCNG2*, *PQLC1*, *bTXNL4A* ve *C18orf22*) içerdiği belirlenmiştir. Araştırmacının, dizin analizini babada da uygulayıp uygulamadığı bildirilmemiştir. Bu nedenle, MLPA'da saptanan ve dizin incelemesinde tek bireyde gösterilen artışın her iki bireyde de büyüklüğü, içerdiği gen sayısı ve kırık noktalarının aynı olup olmadığı konusunda bilgi sunulmamıştır. Araştırmacı, saptadığı duplikasyonun hastalıkla ilişkili bir değişim mi yoksa ailevi bir polimorfizm olup olmadığı konusunda net bir sonuca ulaşamamıştır. Bildirilen olgudaki klinik bulgular bizim olgumuzun ile uyuşmamakta ancak saptanan duplikasyon bölgesinin bir bölümü örtüşmektedir. Ancak olguda birçok genin etkilenmiş olması olgumuzdan farklı bir durum olup bunun iki olgudaki fenotipik farkları açıklayabileceği ya da her iki olguda da duplikasyon ve fenotipik bulguların birlikteliğinin rastlantısal (koincidans) olduğu düşünülmüştür.

Olgumuzda saptanan 75 Kb büyüklüğündeki kopya sayısı artışının içerdiği *CTDPI* geni biyoinformatik olarak incelendiğinde RNA polimeraz II' nin A subüniti C terminal domaini fosfataz enzimini kodlar. Bu gen Konjenital Katarakt, Fasial Dismorfizm ve Nöropati (CCFDN) hastalığı (MIM#604168) ile ilişkilendirilmiş tek gendir (Varon ve ark., 2003). CCFDN otozomal resesif kalıtılan bir hastalık olup, *CTDPI* geninin her iki alelinde oluşan mutasyonlar ile ortaya çıkmaktadır. *CTDPI* geninin parsiyel ya da total duplikasyon ya da allelik doz artışı ile ilgili bir veri literatürde bulunmamaktadır. Veritabanlarında yapılan incelenmede olgumuzda saptanan ~75 Kb lık tetra allelik bölgede *CTDPI* geninden başka bir gen ya da hastalık ilişkili bir lokus bulunmadı. Olgumuzda prenatal ultrasonografide saptanan diyafragma hernisi ve gelişme geriliğinin MLPA da saptanan ve dizin çalışması ile doğrulanan kopya sayısı değişikliği ile doğrudan ilişkilendirmek bugün için mümkün gözükmemektedir. MLPA ve dizin çalışmalarında belli oranda polimorfik değişikliklerin saptandığı bilinmektedir (Koolen ve ark. 2004; Stegmann ve ark. 2008; Monfort ve ark. 2006; Menten ve ark. 2006; Hayashi ve ark. 2010; Ballif ve ark. 2007; Shao ve ark. 2008; Lu ve ark. 2007, 2008). Olgunun anne babasının 1. derece kuzen olması, bu bölge için her iki ebeveynin tri allelik kalıtım göstermesi ve fetusa bunun tetra allelik olarak kalıtılmış olması gözönüne

alınması gereken bir durumdur. Bu nedenlerle olgumuzda saptanan kopya sayısı artışının polimorfik bir durum olma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülmüş ve bu durumun aydınlatılabilmesi için anne ve babanın DNA örneklerinde dizin çalışmaları planlanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada örneklerin biriktirilip belli bir süre sonra çalışılması nedeni ile çalışma sonuçları prenatal dönem sonrasında elde edildiğinden ve sonuçların prenatal dönemde değerlendirilme şansı olmamıştır. Anomali saptanan üç olgudan birinde (olgu15; del18pter) gebelik ağır patolojik bulgular nedeni ile tıbbi tahliye ile sonlandırılmıştır. Diğer olgu (olgu 10); dup18q (olası polimorfizm) erken doğum sonrası diyafragma hernisi nedeni ile opere edilmiş ve post operatif dönemde eks olmuştur. Üçüncü olgu ise (olgu 20; del 7q11.23) erken doğum sonrası yapılan eko çalışmalarında kalp anomali ve periferik pulmoner stenoz saptanmış, kontroller sırasında çalışma tamamlandığından, Williams Sendromu tanısı kesinleşerek genetik danışması verilmiş ve tıbbi izlem altına alınmıştır.

Yapılan bu çalışmada MLPA tekniğinin prenatal örneklerde (amniotik sıvı, korion villus örneği ve fetal kordon kan örneği) kültür edilmemiş doku ve kültür hücrelerinden elde edilen DNA materyallerinde başarı ile uygulanabildiği görüldü. Uygulama sırasında örneklerden elde edilen DNA' ların nicelik ve nitelik olarak tekniğin başarısını önemli ölçüde etkilediği görüldü. MLPA tekniği aynı anda birkaç prenatal örnekte çalışılmasının kontrol, tekrar sayısı ve dolayısıyla maliyeti düşüreceği, veri analizlerini kolaylaştıracağı için önemli olduğu anlaşıldı. Sub telomerik bölgelerin çalışılmasında olduğu gibi, araştırılan her bir lokus için sadece birer hedef prob içeren MLPA çalışmalarında, eş zamanlı olarak alternatif ikinci bir prob seti ile aynı bölgelerdeki komşu bölgelerin taramasının tekniğin daha etkin sonuçlar elde edilmesini sağlayacağı anlaşıldı. Literatürde subtelomerik taramalar amacı ile iki farklı subtelomerik prob setinin (P036 ile P070 ya da P036 ile P069) paralel uygulandığı çalışmaların yanı sıra tek prob seti uygulanan ancak anormal sonuç elde edilmesi durumunda diğer prob setinin uygulandığı çalışmalar da mevcuttur (Palomeras ve ark. 2006; Stegmann ve ark. 2008). Ahn ve ark. (2007) zeka geriliği bulunan 50 olguluk subtelomerik MLPA prob seti ile yaptığı çalışmada önerdiği algoritmada, iki proba yapılan çalışmada anormal sonuç çıktığında

FISH ile doğrulanması durumunda kesin sonucun raporlanması ve parental çalışmaların bu durumlarda yalnızca FISH ile incelenmesinin yeterli olacağı ancak olguda FISH ile sonucun doğrulanmadığı durumlarda anormal sonucun raporlandırılmasını ve parental incelemelerin ise MLPA tekniği ile yapılması gerektiği belirtilmektedir. belirtilmektedir. Olgulara iki ayrı prob setinin aynı anda uygulanması durumunda anomalinin her iki proba da gösterilmesinin, MLPA çalışmasının doğrulanması olarak da kabul edilebilir. Öte yandan aynı bölgenin iki farklı lokusuna bakılan bu çalışmalarda aynı bölge için uyumsuz iki farklı sonuç elde edilmesi de olasıdır. Bu durumda MLPA problemlerinin her bir bölgenin ayrı lokuslarını hedef alan hem doğrulama amaçlı hem de saptanan değişimin boyutlarını araştırma amacı ile üretilen diğer MLPA problemlerini kullanmak mümkündür. Diğer bir doğrulama seçeneği de moleküler metodlar ile saptanan değişimlerin varlığı ve büyüklüğünün araştırılmasıdır.

Prenatal olgularda MLPA çalışmalarının uygulanmasında; a. ailevi taşıyıcılık nedeni ile yapılan fetal incelemeler ve b. tarama amaçlı yapılan çalışmalar olarak iki grupta değerlendirilmelidir. Taşıyıcılık nedeni ile (örneğin: Duchenne/Becker müsküler distrofisi) aynı lokuslar için birden fazla ve bilinen anomaliler araştırılıyorsa saptanan anomalilerin klinik etkileri kesin olduğu için sonuçların değerlendirilmesi daha kolay olabilmektedir. Diğer taraftan bilinen bir taşıyıcılığın olmadığı (örneğin patolojik ultrasonografi bulgusu varlığı) durumlarda tarama amaçlı yapılan çalışmaların sonuçlarının değerlendirilmesinde ve anomalilerin yorumlanmasında daha özenli olma zorunluluğu bulunmaktadır. Çalışmamızda doz artışı saptanan olguda olduğu gibi, literatürde de fenotip - genotip ilişkisi tam olarak kurulamayan sonuçlar bildirilmektedir. Diğer yandan MLPA ile duplikasyon saptanan olgularda FISH tekniğinin doğrulama amaçlı kullanımının başarısız olması durumunda - tandem duplikasyonlar buna bir örnek oluşturur - mutlaka alternatif tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenlerle prenatal uygulamalarda çalışmayı yapan merkezin, doğrulama için birden fazla tekniği (FISH, STR analizleri, kantitatif PCR çalışmaları, dizin çalışmaları) kısa sürelerde uygulayabilir altyapısı olması gereklidir.

Çalışma sonrasında yapılan değerlendirmede MLPA tekniğinin dizin çalışmalarına göre hedefe yönelik olup daha az çözünürlükle tarama yapabilmesi bir

dezavantaj olarak görülmüştür. Dizin çalışmalarında saptanan değişimin büyüklüğü daha kesin bir doğrulukla ve birçok noktadan sonuç alındığından kendi iç doğrulaması ile elde edilmektedir. Her iki moleküler teknikde de polimorfizmler ve klinik etkisi henüz tam olarak bilinmeyen sonuçların alınmasının prenatal çalışmalarda genetik danışmayı zorlaştırdığı ve aileye ek psikolojik sorunlar getirebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle kromozom anomalisi riskinin yüksek olduğu seçilmiş endikasyonlu olgu gruplarında bu tekniklerin uygulanmasının daha uygun olacağı kanısındayız.

Bu tez çalışması sonrasında MLPA tekniği patolojik ultrason bulgusu saptanan kromozom analizleri normal sonuçlanmış fetuslarda özellikle subtelomerik bölge analizleri açısından subtelomerik FISH analizlerine göre daha uygulanabilir bulundu. Ancak burada FISH çalışmasının olgu bazında yapılabilmesi mümkün iken MLPA'nın grup halinde yapılmasının daha doğru ve maliyet açısından daha uygun olduğu halde bunun prenatal çalışmalarda sonucu geciktirebileceği de unutulmamalıdır. Prenatal süreçte birkaç özgün bulgusu olan sendrom haricinde çoğu için yönlendirici klinik bulgu olmadığından FISH tekniği ile sendrom tanısı çoğu zaman mümkün olamamaktadır. Oysa MLPA tekniği ile bilinen mikrolezyon/duplikasyon sendromlarını bir kerede taramak mümkündür. İki prob seti kullanımı ile MLPA tekniğinin % 4,5 anomali saptama oranı prenatal dönemde etiyolojisi aydınlanmamış olgularda ailelere önerilebilir bir yöntem olarak görünmektedir.

Yakın gelecekte prenatal ve postnatal olguların genomik kopya sayısı değişikliklerinin araştırılmasında dizin tekniklerinin rutin bir teknik olarak kullanılması olası gözükmemektedir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçların daha net ve anlaşılabilir olmasında yeni çalışmalarla her geçen gün artan bilgi birikiminin ve zenginleşen veritabanlarının katkısı büyük olacaktır. Bu tez çalışması literatüre prenatal olgularda saptanan iki delesyon ve bir duplikasyon bilgisinin eklenmesi, çalışılan laboratuvarda uygulanan tekniklerin yerleştirilmesi ve çalışma süresince bilgi birikiminin artmasına aracı olmuştur.

KAYNAKLAR

1. ACOG Committee Opinion No. 446: array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis. (2009). *Obstet Gynecol.* Nov;114(5):1161-3.
2. Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C, Mann K. (2007). Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med Genet.* Mar 5; 8:9.
3. Aldred MA, Vijayakrishnan J, James V, Soubrier F, Gomez-Sanchez MA, Martensson G, Galie N, Manes A, Corris P, Simonneau G, Humbert M, Morrell NW, Trembath RC. (2006). BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat.*, Feb.27(2):212-3.
4. Alvarez K, Kash SF, Lyons-Weiler MA, Kim HJ, Peterson LE, Mathai B, Hagenkord JM, Monzon FA. (2010). Reproducibility and performance of virtual karyotyping with SNP microarrays for the detection of chromosomal imbalances in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol.* Sep;19(3):127-34.
5. Anderlid B-M, Schoumans J, Anneren G, Sahlen S, Kyllerman M, Vujic M, Hagberg B, Blennow E, Nordenskjöld M. (2002). Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am J Med Genet* 107:275–284.
6. Aradhya S, Manning MA, Splendore A, Cherry AM. (2007). Whole-genome array-CGH identifies novel contiguous gene deletions and duplications associated with developmental delay, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A.* Jul 1;143A(13):1431-41.
7. Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Stolte M, Entius MM, Löff S, Back W, Kaufmann A, Keller KM, Blaas SH, Siebert R, Vogt S, Spranger S, Holinski-Feder E, Sunde L, Propping P, Friedl W. (2007). High proportion of large genomic deletions and a genotype phenotype update in 80 unrelated families with juvenile polyposis syndrome. *J Med Genet.* Nov;44(11):702-9
8. Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, Holmberg E, Tulinius M, Nordling M. (2006). Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* Dec;16(12):830-8.
9. Azim M, Khan AH, Khilji ZL, Pal JA, Khurshid M. (2003) Chromosomal abnormalities as a cause of recurrent abortions: a hospital experience. *J Pak Med Assoc.* Mar;53(3):117-9.
10. Baig S, Ho SS, Ng BL, Chiu L, Koay ES, Leow GH, Gole L, Kothandaraman N, Chan J, Sun X, Chan YH, Rauff M, Su LL, Biswas A, Choolani M. (2010). Development of quantitative-fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies in 1,000 samples in Singapore. *Singapore Med J.* Apr;51(4):343-8.
11. Baker E, Hinton L, Callen DF, Aitken M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woolatt E, Haan E. (2002). Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet* 107:285–293.

12. Balakrishnan A, von Neuhoff N, Rudolph C, Kamphues K, Schraders M, Groenen P, van Krieken JH, Callet-Bauchu E, Schlegelberger B, Steinemann D. (2006). Quantitative microsatellite analysis to delineate the commonly deleted region 1p22.3 in mantle cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*. Oct;45(10):883-92.
13. Ballarati L, Recalcati MP, Bedeschi MF, Lalatta F, Valtorta C, Bellini M, Finelli P, Larizza L, Giardino D. (2009). Cytogenetic, FISH and array-CGH characterization of a complex chromosomal rearrangement carried by a mentally and language impaired patient. *Eur J Med Genet*. Jul-Aug;52(4):218-23.
14. Ballif BC, Sulpizio SG, Lloyd RM, Minier SL, Theisen A, Bejjani BA, Shaffer LG. (2007). The clinical utility of enhanced subtelomeric coverage in array CGH. *Am J Med Genet A*. Aug 15;143A(16):1850-7.
15. Baptista J, Mercer C, Prigmore E, Gribble SM, Carter NP, Maloney V, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. (2008). Breakpoint mapping and array CGH in translocations: comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. *Am J Hum Genet*. Apr;82(4):927-36
16. Baroncini A, Rivieri F, Capucci A, Croci G, Franchi F, Sensi A, Battaglia P, Aiello V, Calzolari E. (2005) FISH screening for subtelomeric rearrangements in 219 patients with idiopathic mental retardation and normal karyotype. *Eur J Med Genet*. Oct-Dec;48(4):388-96.
17. Basaran S, Engur A, Aytan M, Karaman B, Ghanbari A, Toksoy G, Yuksel A, Cankat D, Kervancioglu E, Wollnik B, Bahceci M, Yuksel-Apak M. (2004). The results of cytogenetic analysis with regard to intracytoplasmic sperm injection in males, females and fetuses. *Fetal Diagn Ther*. Jul-Aug;19(4):313-8.
18. Basaran S. Tekrarlayan fetal kayıpları olan çiftlerde sitogenetik bulgular (2011). *Henüz Yayınlanmamış veriler*
19. Başaran S. (2008). Gebelikte tarama testleri ve fetal kromozom analiz sonuçları (Sözlü sunum) .Uluslararası katılımlı VII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. *Program ve bildiri özet kitabı* 06-09 Mayıs.
20. Battaglia A, Bianchini E, Carey JC. (1999). Diagnostic yield of the comprehensive assessment of development delay/mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *Am J Med Genet*82:60–66.
21. Baumer A, Balmer D., Binkert F, Schinzel A. (2000). Parental origin and mechanisms of formation of triploidy: a study of 25 cases. *European Journal of Human Genetics*; 8, 911–917
22. Beke A, Barakonyi E, Belics Z, Joó JG, Csaba A, Papp C, Tóth-Pál E, Papp Z. (2008). Risk of chromosome abnormalities in the presence of bilateral or unilateral choroid plexus cysts. *Fetal Diagn Ther*.23(3):185-91.
23. Bendavid C, Dubourg C, Pasquier L, Gicquel I, Le Gallou S, Mottier S, Durou MR, Henry C, Odent S, David V. (2007). MLPA screening reveals novel subtelomeric rearrangements in holoprosencephaly. *Hum Mutat*. Dec;28(12):1189-97.
24. Berg JS, Potocki L, Bacino CA. (2010). Common recurrent microduplication syndromes: diagnosis and management in clinical practice. *Am J Med Genet A*. May;152A(5):1066-78.

25. Bertini V, Valetto A, Uccelli A, Tarantino E, Simi P. (2004). Ring chromosome 21 and reproductive pattern: a familial case and review of the literature. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5):e1-5..
26. Beunders G, van de Kamp JM, Veenhoven RH, van Hagen JM, Nieuwint AW, Sistermans EA. (2010). A triplication of the Williams-Beuren syndrome region in a patient with mental retardation, a severe expressive language delay, behavioural problems and dysmorphisms. *J Med Genet*. Apr;47(4):271-5
27. Beuren AJ, Apitz J, Harmjanz D.(1962). Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation* 27: 1235–1240.
28. Beutler E, Gelbart T, Kuhl W. (1990). Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques*.; Aug;9(2):166.
29. Bittel DC, Kibiryeva N, Butler MG. (2007). Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities *Genet Test*11, 467-475.
30. Black, J. A., Bonham-Carter, R. E. (1963).Association between aortic stenosis and facies of severe infantile hypercalcemia. *Lancet* 282: 745-749,
31. Blennow E, Bui TH, Kristoffersson U, Vujic M, Annerén G, Holmberg E, Nordenskjöld M.(1994), Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39 105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn*. Nov;14(11):1019-28.
32. Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccone F. (2004). Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum Mutat*. Apr;23(4):368-78
33. Bonifacio S, Centrone C, Da Prato L, Scordo MR, Estienne M, Torricelli F. (2001). Use of primed in situ labeling (PRINS) for the detection of telomeric deletions associated with mental retardation. *Cytogenet Cell Genet*93:16–18.
34. Bonnet C, Andrieux J, Béri-Dexheimer M, Leheup B, Boute O, Manouvrier S, Delobel B, Copin H, Receveur A, Mathieu M, Thiriez G, Le Caignec C, David A, de Blois MC, Malan V, Philippe A, Cormier-Daire V, Colleaux L, Flori E, Dollfus H, Pelletier V, Thauvin-Robinet C, Masurel-Paulet A, Faivre L, Tardieu M, Bahi-Buisson N, Callier P, Mugneret F, Edery P, Jonveaux P, Sanlaville D. (2010). Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. *J Med Genet*. Jun;47(6):377-84.
35. Boormans EM, Birnie E, Oepkes D, Galjaard RJ, Schuring-Blom GH, van Lith JM. (2010). MLP and Karyotyping Evaluation (M.A.K.E.) Study Group. Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification and karyotyping in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol*. Feb;115(2 Pt 1):297-303.
36. Borgione E, Giudice ML, Galesi O, Castiglia L, Failla P, Romano C, Ragusa A, Fichera M. (2001). How microsatellite analysis can be exploited for subtelomeric chromosomal rearrangement analysis in mental retardation. *Am J Med Genet* 38:E1.
37. Borrell A, Fortuny A, Lazaro L, Costa D, Seres A, Pappa S, Soler A.(1999).First-trimester transcervical chorionic villus sampling by biopsy forceps versus mid-

- trimester amniocentesis: a randomized controlled trial project. *Prenat Diagn.* Dec;19(12):1138-42.
38. Bourgeois M, Benezech M. (1977). Cytogenetic survey of 600 mentally retarded hospitalized patients. *Encephale*3:189–202.
 39. Bray IC, Wright DE. (1998). Estimating the spontaneous loss of Down syndrome fetuses between the times of chorionic villus sampling, amniocentesis and livebirth. *Prenat Diagn.* Oct;18(10):1045-54
 40. Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. (1998). A chromosomal deletion map of human malformations. *Am J Hum Genet.* Oct;63(4):1153-9.
 41. Brewer C, Holloway S, Zawalnyski P, Schinzel A, FitzPatrick D. (1999). A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality--and tolerance of segmental aneuploidy--in humans. *Am J Hum Genet.* Jun;64(6):1702-8.
 42. Bryndorf T, Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Karhy R, Kallioniemi A, Christensen B, Lundsteen C, Philip J. (1995). Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am J Hum Genet* 57: 1211–1220.
 43. Cacheux V, Tachdjian G, Druart L, Oury JF, Sérero 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.* Feb;14(2):79-86.
 44. Callier P, Faivre L, Pigeonnet S, Quilichini B, Marle N, Thauvin-Robinet C, Mosca AL, Masurel-Paulet A, Rousseau T, Sagot P, Laurent N, Mugneret F. (2009). Contribution of array CGH in prognosis and genetic counselling of prenatally diagnosed supernumerary ring chromosome 20. *Prenat Diagn.* Oct;29(10):1002-5.
 45. Chen CP, Chen M, Ko TM, Ma GC, Tsai FJ, Tsai MS, Wu PC, Lee CC, Chen LF, Wang W. (2010). Prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a small supernumerary marker chromosome derived from chromosome 8. *Taiwan J Obstet Gynecol.* Dec;49(4):500-5.
 46. Chen M, Hwu WL, Kuo SJ, Chen CP, Yin PL, Chang SP, Lee DJ, Chen TH, Wang BT, Lin CC. (2006). Subtelomeric rearrangements and 22q11.2 deletion syndrome in anomalous growth-restricted fetuses with normal or balanced G-banded karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol.* Dec;28(7):939-43.
 47. Cho EH, Park BY, Cho JH, Kang YS. (2009). Comparing two diagnostic laboratory tests for several microdeletions causing mental retardation syndromes: multiplex ligation-dependent amplification vs fluorescent in situ hybridization. *Korean J Lab Med.* Feb;29(1):71-6.
 48. Cirigliano V, Voglino G, Cañadas MP, Marongiu A, Ejarque M, Ordoñez E, Plaja A, Massobrio M, Todros T, Fuster C, Campogrande M, Egozcue J, Adinolfi M. (2004). Rapid prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies by QF-PCR. Assessment on 18,000 consecutive clinical samples. *Mol Hum Reprod.* Nov;10(11):839-46.
 49. Clarkson B, Pavenski K, Dupuis L, Kennedy S, Meyn S, Nezarati MM, Nie G, Weksberg R, Withers S, Quercia N, Teebi AS, Teshima I. (2002). Detecting

- rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *Am J Med Genet* 107:267–274.
50. CNV (Copy Number Variation) database. <http://projects.tcag.ca/cgi-bin/variation/gbrowse/hg18/>, 17.12.2010- 17:00
 51. Cockwell A, MacKenzie M, Youings S, Jacobs P. (1991). A cytogenetic and molecular study of a series of 45,X fetuses and their parents. *J Med Genet*, 28: 151-155
 52. Colleaux L, Rio M, Heuertz S, Moindrault S, Turleau C, Ozilou C, Gosset P, Raoult O, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Amiel J, Le Merrer M, Picq M, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Cornelis F, Vekemans M, Munnich A. (2001). A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur J Hum Genet* 9: 319–327.
 53. Concolino P, Mello E, Toscano V, Ameglio F, Zuppi C, Capoluongo E. (2009). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the detection of CYP21A2 gene deletions/duplications in congenital adrenal hyperplasia: first technical report. *Clin Chim Acta*. Apr;402(1-2):164-70.
 54. Cora T, Demirel S, Acar A. (2000). Chromosomal abnormalities in mentally retarded children in the Konya region—Turkey. *Genet Coun.* 11:53–55.
 55. Crouse J, Amorese D. (1987). Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate. *Focus* 9; (2): 3–5.
 56. Curry CJ, Stevenson RE, Aughton D, Byrne J, Carey JC, Cassidy S, Cunniff D, Graham JM Jr, Jones MC, Kaback MM, Moeschler J, Schaefer GB, Schwartz S, Tarleton J, Optiz J. (1997). Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am J Med Genet*. 72: 468–477.
 57. Daniel A, Hook EB, Wulf G. (1989). Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *Am J Med Genet*. May;33(1):14-53.
 58. Daniel A, Wu Z, Bennetts B, Slater H, Osborn R, Jackson J, Pupko V, Nelson J, Watson G, Cooke-Yarborough C, Loo C. (2001). Karyotype, phenotype and parental origin in 19 cases of triploidy. *Prenat Diagn*. Dec;21(12):1034-48.
 59. Davies AF, Kirby TL, Docherty Z, Ogilvie CM. (2003). Characterization of terminal chromosome anomalies using multisubtelomere FISH. *Am J Med Genet A*. Aug 1;120A(4):483-9.
 60. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P, Bonaglia MC, Anichini C, Ferrero GB, Silengo M, Fazzi E, Zatterale A, Fischetto R, Previderé C, Belli S, Turci A, Calabrese G, Bernardi F, Meneghelli E, Riegel M, Rocchi M, Gueneri S, Lalatta F, Zelante L, Romano C, Fichera M, Mattina T, Arrigo G, Zollino M, Giglio S, Lonardo F, Bonfante A, Ferlini A, Cifuentes F, Van Esch H, Backx L, Schinzel A, Vermeesch JR, Zuffardi O. (2007). Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet*. Dec;44(12):750-62.
 61. de Grouchy J., Turleau C. (1984). *Clinical Atlas of Human Chromosomes*. 2nd ed. New York: John Wiley (Pp. 308-313.)
 62. de Pater JM, Scheres JM, Brons J. Abnormal chromosome 18 in prenatal diagnosis with holoprosencephaly. *Prenat Diagn*. 1997 Sep;17(9):887-8.

63. de Vries BB, White SM, Knight SJ, Regan R, Homfray T, Young ID, Super M, McKeown C, Splitt M, Quarrell OW, Trainer AH, Niermeijer MF, Malcolm S, Flint J, Hurst JA, Winter RM. (2001). Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet.* Mar;38(3):145-50.
64. DECIPHER database. <http://decipher.sanger.ac.uk/>
65. Devriendt K, Fryns JP, Mortier G, van Thienen MN, Keymolen K. (1998) .The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J Med Genet.* Sep;35(9):789-90.
66. Dikow N, Nygren AO, Schouten JP, Hartmann C, Krämer N, Janssen B, Zschocke J. (2007). Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA *Mol Cell Probes*3, 208-215.
67. Dunø M, Hove H, Kirchhoff M, Devriendt K, Schwartz M. (2004). Mapping genomic deletions down to the base: a quantitative copy number scanning approach used to characterise and clone the breakpoints of a recurrent 7p14.2p15.3 deletion. *Hum Genet.* Nov;115(6):459-67.
68. Durban M, Benet J, Boada M, Fernández E, Calafell JM, Lailla JM, Sánchez-García JF, Pujol A, Egozcue J, Navarro J. (2001). PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update.* Nov-Dec;7(6):591-602.
69. Eiben B, Trawicki W, Hammans W, Goebel R, Epplen JT. (1998).A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat Diagn.* Sep;18(9):901-6.
70. Elghezal H, Hidar S, Mougou S, Khairi H, Saâd A. (2007). Prevalence of chromosomal abnormalities in couples with recurrent miscarriage *Fertil Steril.* Sep;88(3):721-3.
71. Engels H, Wohlleber E, Zink A, Hoyer J, Ludwig KU, Brockschmidt FF, Wiczorek D, Moog U, Hellmann-Mersch B, Weber RG, Willatt L, Kreiss-Nachtsheim M, Firth HV, Rauch A. (2009). A novel microdeletion syndrome involving 5q14.3-q15: clinical and molecular cytogenetic characterization of three patients. *Eur J Hum Genet.* Dec;17(12):1592-9.
72. Erjavec-Skerget A, Stangler-Herodez S, Zagorac A, Zagradisnik B, Kokalj-Vokac N. (2006). Subtelomeric chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation: applicability of three molecular-cytogenetic methods. *Croat Med J.* Dec;47(6):841-50.
73. Eronen, M., Peippo, M., Hiippala, A., Raatikka, M., Arvio, M., Johansson, R., Kahkonen, M. (2002).Cardiovascular manifestations in 75 patients with Williams syndrome. *J. Med. Genet.* 39: 554-558,
74. Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, Christodoulou C, Koumbaris G, Kallikas I, Georgiou I, Velissariou V, Patsalis PC. (2010). Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Mol Cytogenet.* Nov 26;3: 24.
75. Evans MI, Henry GP, Miller WA, Bui TH, Snidjers RJ, Wapner RJ, Miny P, Johnson MP, Peakman D, Johnson A, Nicolaides K, Holzgreve W, Ebrahim SA, Babu R, Jackson L. (1999). International, collaborative assessment of 146,000

- prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. *Hum Reprod.* May;14(5):1213-6
76. Ewart AK, Morris CA, Atkinson D, Jin W, Sternes K, Spallone P, Stock AD, Leppert M, Keating MT. (1993) Hemizygosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet.* Sep;5(1):11-6.
 77. Faas BH, Nillesen W, Vermeer S, Weghuis DO, de Leeuw N, Smits AP, van Ravenswaaij-Arts CM. (2008). Detection of cryptic subtelomeric imbalances in fetuses with ultrasound abnormalities. *Eur J Med Genet.* Nov-Dec;51(6):511-9.
 78. Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM. (2001). Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 3:416-421.
 79. Felix TM, Leite JC, Maluf SW, Coelho JC. (1998). A genetic diagnostic survey in a population of 202 mentally retarded institutionalized patients in the south of Brazil. *Clin Genet.* 54: 219-223.
 80. Ferguson-Smith MA, Yates JR. (1984). Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses *Prenat Diagn.* Spring;4 Spec No:5-44
 81. Fernández L, Lapunzina P, Arjona D, López Pajares I, García-Guereta L, Elorza D, Burgueros M, De Torres ML, Mori MA, Palomares M, García-Alix A, Delicado A. (2005). Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet.* Oct;68(4):373-8.
 82. Ferrero GB, Biamino E, Sorasio L, Banaudi E, Peruzzi L, Forzano S, di Cantogno LV, Silengo MC. (2007). Presenting phenotype and clinical evaluation in a cohort of 22 Williams-Beuren syndrome patients. *Eur J Med Genet.* Sep-Oct;50(5):327-37
 83. Flejter WL, Finlinson D, Root S, Nguyen W, Brothman AR, Viskochil D. (1996). Familial ring (19) chromosome mosaicism: case report and review. *Am J Med Genet.* Dec 18;66(3):276-80.
 84. Flint J, Wilkie AOM, Buckle VJ, Winter RM, Holland AJ, McDermid HE. (1995). The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet* 9:132-139.
 85. Forabosco A, Percesepe A, Santucci S. (2009). Incidence of non-age-dependent chromosomal abnormalities: a population-based study on 88965 amniocenteses. *Eur J Hum Genet.* Jul;17(7):897-903
 86. Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Knecht AC, Gerssen-Schoorl KB, Wouters CH, Hansson KB, Hochstenbach R, Madan K, van der Veen F, Goddijn M. (2005). Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ.* Jul 16;331(7509):137-41.
 87. Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P, Brown-John M, Cao M, Chan S, Charest DL, Farnoud N, Fernandes N, Flibotte S, Go A, Gibson WT, Holt RA, Jones SJ, Kennedy GC, Krzywinski M, Langlois S, Li HI, McGillivray BC, Nayar T, Pugh TJ, Rajcan-Separovic E, Schein JE, Schnerch A, Siddiqui A, Van Allen MI, Wilson G, Yong SL, Zahir F, Eydoux P, Marra MA. (2006). Oligonucleotide

- microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet.* Sep;79(3):500-13.
88. Frydman N, Romana S, Le Lorc'h M, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G. (2001). Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Hum Reprod.* Nov;16(11):2274-7.
 89. Fryns J.P., Kleczkowska A., van Den Berghe H. (1986). Paracentric inversions in man. *Hum genet.* Jul;73(3):205-13.
 90. Fryns JP, Van Buggenhout G. (1998). Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* Dec;81(2):171-6.
 91. Gardner RJM. Sutherland G.R.(2004).*Chromosome abnormalities and genetic counseling.* Oxford University Press, New York
 92. Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B. (2001). Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod.* Jan;16(1):82-90.
 93. Gerdes T, Kirchhoff M, Lind AM, Vestergaard Larsen G, Kjaergaard S. (2008). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis- experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y. *Prenat Diagn.* Dec;28(12):1119-25.
 94. Giardino D, Corti C, Ballarati L, Colombo D, Sala E, Villa N, Piombo G, Pierluigi M, Faravelli F, Gueneri S, Coviello D, Lalatta F, Cavallari U, Bellotti D, Barlati S, Croci G, Franchi F, Savin E, Nocera G, Amico FP, Granata P, Casalone R, Nutini L, Lisi E, Torricelli F, Giussani U, Facchinetti B, Guanti G, Di Giacomo M, Susca FP, Pecile V, Romitti L, Cardarelli L, Racalbutto E, Police MA, Chiodo F, Rodeschini O, Falcone P, Donti E, Grimoldi MG, Martinoli E, Stioui S, Caufin D, Lauricella SA, Tanzariello SA, Voglino G, Lenzini E, Besozzi M, Larizza L, Dalprà L. (2009). *De novo* balanced chromosome rearrangements in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* Mar;29(3):257-65.
 95. Gignac J, Danis K, Tihy F, Lemyre E. (2006). Prenatal detection of subtelomeric rearrangements by multi-subtelomere FISH in a cohort of fetuses with major malformations. *Am J Med Genet A.* Dec 15;140(24):2768-75.
 96. Gijbbers AC, Lew JY, Bosch CA, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, den Hollander NS, Kant SG, Bijlsma EK, Breuning MH, Bakker E, Ruivenkamp CA. (2009). A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *Eur J Hum Genet.* Nov;17(11):1394-402.
 97. Goddijn M, Joosten JH, Knecht AC, van der Veen F, Franssen MT, Bonsel GJ, Leschot NJ. (2004). Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod.* Apr;19(4):1013-7.
 98. Goumy C, Gouas L, Pebrel-Richard C, Véronèse L, Eymard-Pierre E, Debost-Légrand A, Haoud K, Tchirkov A, Vago P. (2010). Prenatal detection of cryptic rearrangements by multiplex ligation probe amplification in fetuses with ultrasound abnormalities. *Genet Med.* Jun;12(6):376-80.

99. Graf MD, Gill P, Krew M, Schwartz S. (2002). Prenatal detection of structural abnormalities of chromosome 18: associations with interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) and maternal serum screening. *Prenat Diagn.* Aug;22(8):645-8.
100. Gribble SM, Prigmore E, Burford DC, Porter KM, Ng BL, Douglas EJ, Fiegler H, Carr P, Kalaitzopoulos D, Clegg S, Sandstrom R, Temple IK, Youings SA, Thomas NS, Dennis NR, Jacobs PA, Crolla JA, Carter NP.(2005). The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J Med Genet.* Jan;42(1):8-16.
101. Grimm T, Wesselhoeft H. (1980) .The genetic aspects of Williams-Beuren syndrome and the isolated form of the supraaortic stenosis. Investigation of 128 families .*Z Kardiol.* Mar;69(3):168-72
102. Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, Richieri-Costa A, Zackai EH, Massagué J, Muenke M, Elledge SJ. (2000). Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet.* Jun;25(2):205-8.
103. Gross SJ, Bajaj K, Garry D, Klugman S, Karpel BM, Marie Roe A, Wagner BJ, Zhan J, Apfelroth SD, Schreiber-Agus (2011). Rapid and novel prenatal molecular assay for detecting aneuploidies and microdeletion syndromes. *Prenat Diagn.* Mar;31(3):259-66. doi: 10. 1002/pd.2674.
104. Gunn SR, Mohammed M, Reveles XT, Viskochil DH, Palumbos JC, Johnson-Pais TL, Hale DE, Lancaster JL, Hardies LJ, Boespflug-Tanguy O, Cody JD, Leach RJ. (2003). Molecular characterization of a patient with central nervous system dysmyelination and cryptic unbalanced translocation between chromosomes 4q and 18q. *Am J Med Genet A.* Jul 1;120A(1):127-35.
105. Gustavson KH, Holmgren G, Blomquist HK. (1987). Chromosomal aberrations in mildly mentally retarded children in a northern Swedish country. *Ups J Med Sci*44:154–168.
106. Hahnemann JM, Vejerslev LO. (1997). Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)--diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCROMIC 1986-1992. *Prenat Diagn.* Sep;17(9):801-20.
107. Han SH, An JW, Jeong GY, Yoon HR, Lee A, Yang YH, Lee KP, Lee KR. (2008). Clinical and cytogenetic findings on 31,615 mid-trimester amniocenteses. *Korean J Lab Med.* Oct;28(5):378-85.
108. Hartge D, Hoffmann U, Schröer A, Weichert J. (2010). Three- and four-dimensional ultrasound in the diagnosis of fetal tetralogy of fallot with absent pulmonary valve and microdeletion 22q11. *Pediatr Cardiol.* Oct;31(7):1100-3
109. Hasegawa T, Harada N, Ikeda K, Ishii T, Hokuto I, Kasai K, Tanaka M, Fukuzawa R, Niikawa N, Matsuo N. (1999). Digynic triploid infant surviving for 46 days. *Am J Med Genet.* Dec 3;87(4):306-10.
110. Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. (2011). Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by

- two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet.* Feb;56(2):110-24
111. Hersh JH, Barch MJ, Yen FF, Axelrod JA, Gowans G, Sears L, Parsian A. (2001). The association of subtelomeric deletions and severe mental retardation. *Am J Hum Genet* 69(Suppl): 330.
 112. Hollox EJ, Akrami SM, Armour JA. (2002). DNA copy number analysis by MAPH: molecular diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn.* Jul;2(4):370-8.
 113. Hong KE, Kim JH, Moon SY, Oh SK. (1999). Chromosomal abnormalities in child psychiatric patients. *J Korean Med Sci* 14:377–385.
 114. Hoppman-Chaney NL, Dawson DB, Nguyen L, Sengupta S, Reynolds K, McPherson E, Velagaleti. G. (2010). Partial hexasomy for the Prader-Willi-Angelman syndrome critical region due to a maternally inherited large supernumerary marker chromosome. *Am J Med Genet A.* Aug;152 A(8):2034-8.
 115. Hou JW, Wang TR, Chuang SM. (1998). An epidemiological and aetiological study of children with intellectual disability in Taiwan. *J Intellect Disabil Res* 42: 137–143.
 116. Hsu LY, Yu MT, Richkind KE, Van Dyke DL, Crandall BF, Saxe DF, Khodr GS, Mennuti M, Stetten G, Miller WA, Priest JH. (1996). Incidence and significance of chromosome mosaicism involving an autosomal structural abnormality diagnosed prenatally through amniocentesis: a collaborative study. *Prenat Diagn.* Jan;16(1):1-28.
 117. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet.* Sep;36(9):949-51.
 118. Isidor B, Winer N, Joubert M, Boisseau P, Le Caignec C, Bocéno M, Fallet C, David A, Rival JM. (2008). Inherited 18q23 duplication in a fetus with multiple congenital anomalies. *Eur J Med Genet.* 2008 May-Jun;51(3):231-8.
 119. Izraeli S, Pfeleiderer C, Lion T. (1991). Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res.* November 11; 19(21): 6051
 120. Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. (1992). Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* Feb;29(2):103-8.
 121. Jacobsen A, Arnold N, Weimer J, Kiechle M. (2000). Comparison of comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization in ovarian carcinomas: possibilities and limitations of both techniques. *Cancer Genet Cytogenet.* Oct 1;122(1):7-12.
 122. Johnson, G., Bachman, R. (1976). A 46,XY,del(18)(pter-p1100:) cebocephalic child from a 46,XX,t(12;18)(18pter-18p1100::12qter-12pter) normal parent. *Hum. Genet.* 34: 103-106,
 123. Joly G, Lapierre JM, Ozilou C, Gosset P, Aurias A, de Blois MC, Prieur M, Raoul O, Colleaux L, Munnich A, Romana S, Vekemans M, Turleau C. (2001). Comparative genomic hybridisation in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet* 60:212–219.
 124. Joyce CA, Dennis NR, Cooper S, Browne CE. (2001). Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with

- idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-banding and FISH. *Hum Genet.* Oct;109(4):440-51.
125. Kaiser P. (1984). Pericentric inversions. Problems and significance for clinical genetics. *Hum Genet.* 68(1):1-47.
 126. Kanno J, Hutchin T, Kamada F, Narisawa A, Aoki Y, Matsubara Y, Kure S. (2007). Genomic deletion within GLDC is a major cause of non-ketotic hyperglycinaemia *J Med Genet* **44**, 3.
 127. Karaman B, Aytan M, Yilmaz K, Toksoy G, Onal EP, Ghanbari A, Engur A, Kayserili H, Yuksel-Apak M, Basaran S. (2006). The identification of small supernumerary marker chromosomes; the experiences of 15,792 fetal karyotyping from Turkey. *Eur J Med Genet.* May-Jun;49(3):207-14.
 128. Kim JW, Chang EM, Song SH, Park SH, Yoon TK, Shim SH. (2010) Complex chromosomal rearrangements in infertile males: complexity of rearrangement affects spermatogenesis. *Fertil Steril.* Jan;95(1):349-352.e5.
 129. Kim YM, Cho EH, Kim JM, Lee MH, Park SY, Ryu HM. (2004). Del(18p) syndrome with increased nuchal translucency in prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* Mar;24(3):161-4.
 130. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. (2007). MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8 of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet* Jan-Feb;50(1):33-42
 131. Kjaergaard S, Sundberg K, Jørgensen FS, Rohde MD, Lind AM, Gerdes T, Tabor A, Kirchhoff M. (2010). Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenat Diagn.* Oct;30(10):995-9.
 132. Kleeman L, Bianchi DW, Shaffer LG, Rorem E, Cowan J, Craigo SD, Tighiouart H, Wilkins-Haug LE. Use of array comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic anomalies and normal metaphase karyotype. *Prenat Diagn.* 2009 Dec;29(13):1213-7.
 133. Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J. (1999). Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet.* Nov 13;354 (9191):1676-81.
 134. Kodama Y. (1982) Cytogenetic and dermatographic studies on severely handicapped patients in an institution. *Acta Medica Okayama* 36:383–397.
 135. Kontos H, Manolakos E, Malligiannis P, Plachouras N, Ploumis N, Mihalatos M, Orru S, Anastasiadou E, Petersen MB. (2008). Prenatal diagnosis of a fetus with 7q11.23 deletion detected by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) screening. *Prenat Diagn.* Jun;28(6):556-8.
 136. Koolen DA, Nillesen WM, Versteeg MH, Merkx GF, Knoers NV, Kets M, Vermeer S, van Ravenswaaij CM, de Kovel CG, Brunner HG, Smeets D, de Vries BB, (2004). Sistermans EA. Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet.* Dec;41(12):892-9.
 137. Kooper AJ, Faas BH, Feuth T, Creemers JW, Zondervan HH, Boekkooi PF, Quartero RW, Rijnders RJ, van der Burgt I, van Kessel AG, Smits AP. (2009).

- Detection of chromosome aneuploidies in chorionic villus samples by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Mol Diagn.* Jan;11(1):17-24
138. Kosztolányi G, Brecevic L, Bajnóczky K, Schinzel A, Riegel M. (2011). Mosaic supernumerary ring chromosome 1 in a three-generational family: Ten-year follow-up report. *Eur J Med Genet.* Mar-Apr;54(2):152-6
 139. Kriek M, White SJ, Bouma MC, Dauwerse HG, Hansson KB, Nijhuis JV, Bakker B, van Ommen GJ, den Dunnen JT, Breuning MH. (2004). Genomic imbalances in mental retardation. *J Med Genet.* Apr;41(4):249-55.
 140. Krzeminska D, Steinfeld C, Cloez JL, Vibert M, Chery M, Menzies D, Gilbert-Dussardier B. (2009). Prenatal diagnosis of Williams syndrome based on ultrasound signs. *Prenat Diagn.* Jul;29(7):710-2.
 141. Lamb AN, Lytle CH, Aylsworth AS. (1999). Low proportion of subtelomeric rearrangements in a population of patients with mental retardation and dysmorphic features. *Am J Hum Genet* 65(Suppl):A169
 142. Lapaire O, Lu XY, Johnson KL, Jarrah Z, Stroh H, Cowan JM, Tantravahi U, Bianchi DW. (2007). Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant. *Prenat Diagn.* Jul;27(7):616-21.
 143. Le Caignec C, Boceno M, Saugier-Verber P, Jacquemont S, Joubert M, David A, Frebourg T, Rival JM. (2005). Detection of genomic imbalances by array based comparative genomic hybridisation in fetuses with multiple malformations. *J Med Genet.* Feb;42(2):121-8.
 144. Lee C, Iafrate AJ, Brothman AR. (2007). Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet.* Jul;39(7 Suppl):S48-54.
 145. Lee Sg, Park Ts, Lim G, Lee Ka, Song J, Choi Jr. (2010). Constitutional pericentric inversion 9 and hematological disorders: a korean tertiary institution's experience over eight years. *Ann Clin Lab Sci.* Summer;40(3):273-7.
 146. Lejeune J, Turpin R, Gautier M. (1959). Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med.* Apr 7-14;143(11-12):256-65.
 147. Lenzini E, D'Ottavio G, Città A, Benussi DG, Petix V, Pecile V. (2007). Prenatal diagnosis of Miller-Dieker syndrome by ultrasound and molecular cytogenetic analysis. *Clin Genet.* Nov;72(5):487-9
 148. Leung WC, Lam YH, Wong Y, Lau ET, Tang MHY. (2002). The effect of fast reporting by amnio-PCR on anxiety levels in women with positive biochemical screening for Down syndrome-a randomized controlled trial. *Prenat Diagn* 22: 256–259.
 149. Leung WC, Waters JJ, Chitty L. (2004). Prenatal diagnosis by rapid aneuploidy detection and karyotyping: a prospective study of the role of ultrasound in 1589 second-trimester amniocenteses. *Prenat Diagn.* Oct;24(10):790-5.
 150. Lewin P, Kleinfinger P, Bazin A, Mossafa H, Szpiro-Tapia S. (2000). Defining the efficiency of fluorescence in situ hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27407 prenatal diagnoses. *Prenat Diagn.* Jan;20(1):1-6.
 151. Liang P., Zeng Y., Yin B., Lin Q., Cai J., Zhang W. (2009). Study on the incidence of chromosomal abnormalities in 10325 infertility patients who resort to IVF/ICSI. *Fertility and Sterility Supp.* Sept. 92: 3, 14-15

152. Liehr T, Claussen U, Starke H. (2004). Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res.*;107(1-2):55-67.
153. Liehr T, Mrasek K, Weise A, Dufke A, Rodríguez L, Martínez Guardia N, Sanchís A, Vermeesch JR, Ramel C, Polityko A, Haas OA, Anderson J, Claussen U, von Eggeling F, Starke H. (2006). Small supernumerary marker chromosomes-progress towards a genotype-phenotype correlation. *Cytogenet Genome Res.*;112(1-2):23-34.
154. Liehr T, Wegner RD, Stumm M, Martin T, Gillessen-Kaesbach G, Kosyakova N, Ewers E, Hamid AB, von Eggeling F, Hentschel J, Ziegler M, Weise A. (2010). Small Supernumerary Marker Chromosomes 1 With a Normal Phenotype. *J Chin Med Assoc. Apr*;73(4):205-7.
155. Lopez-Valdes JA, Nieto K, Najera N, Cervantes A, Kofman-Alfaro S, Queipo G. (2009). Mix gonadal dysgenesis associated with ring Y chromosome mosaics in a phenotypic male. *Sex Dev.*;3(4):177-82.
156. Lu X, Shaw CA, Patel A, Li J, Cooper ML, Wells WR, Sullivan CM, Sahoo T, Yatsenko SA, Bacino CA, Stankiewicz P, Ou Z, Chinault AC, Beaudet AL, Lupski JR, Cheung SW, Ward PA. (2007). Clinical implementation of chromosomal microarray analysis: summary of 2513 postnatal cases. *PLoS One. Mar* 28;2(3):e327.
157. Lu XY, Phung MT, Shaw CA, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Stankiewicz P, Kang SH, Lalani S, Chinault AC, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. (2008). Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics. Dec*;122(6):1310-8.
158. Luquet I, Mugneret F, Athis PD, Nadal N, Favre B, Abel C, Chelloug N, Lespinasse J, Portnoi MF, Joyé N, Dupont JM, Lebbar A, Bresson JL, Fellmann F, Siffroi JP, Chantot-Bastaraud S, Chiesa J, Amblard F, Devillard F, Jeandidier E, Boceno M, Rival JM, Bellec V, Lallaoui H, Delobel B, Croquette MF, Benzacken B. (2002). French multi-centric study of 2000 amniotic fluid interphase FISH analyses from high-risk pregnancies and review of the literature. *Ann Genet. Apr-Jun*;45(2):77-88.
159. Madan K, Nieuwint AW, van Bever Y. (1997). Recombination in a balanced complex translocation of a mother leading to a balanced reciprocal translocation in the child. Review of 60 cases of balanced complex translocations. *Hum Genet. Jun*;99(6):806-15.
160. Madan K, Seabright M, Lindenbaum RH, Bobrow M. (1984). Paracentric inversions in man. *J Med Genet. Dec*;21(6):407-12.
161. Madan K. (1995). Paracentric inversions: a review. *Hum Genet. Nov*;96(5):503-15.
162. Mademont-Soler I, Morales C, Bruguera J, Madrigal I, Clusellas N, Margarit E, Sánchez A, Soler A. (2010). Subtelomeric MLPA: is it really useful in prenatal diagnosis? *Prenat Diagn. Dec*;30(12-13):1165-9.
163. Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Badenas C, Sánchez A, Martinez F, Fernandez I, Fernández-Buriel M, Milà M. (2007). MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet Med. Feb*;9(2):117-22.

164. Makino T, Tabuchi T, Nakada K, Iwasaki K, Tamura S, Iizuka R. (1990). Chromosomal analysis in Japanese couples with repeated spontaneous abortions. *Int J Fertil.* Sep-Oct;35(5):266-70.
165. Maya I, Davidov B, Gershovitz L, Zalstein Y, Taub E, Coppinger J, Shaffer LG, Shohat M. (2010). Diagnostic utility of array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in a prenatal setting. *Prenat Diagn.* Dec;30(12-13):1131-7.
166. McFadden DE, Kalousek DK. (1991). Two different phenotypes of fetuses with chromosomal triploidy: correlation with parental origin of the extra haploid set. *Am J Med Genet*38:535–538
167. McGhee EM, Qu Y, Wohlferd MM, Goldberg JD, Norton ME, Cotter PD. (2001). Prenatal diagnosis and characterization of an unbalanced whole arm translocation resulting in monosomy for 18p. *Clin Genet.* Apr;59(4):274-8.
168. Melnyk AR, Ahmed I, Taylor JC. (1995). Prenatal diagnosis of familial ring 21 chromosome. *Prenat Diagn.* Mar;15(3):269-73.
169. Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L, Janssens S, De Paepe A, De Moor B, Moreau Y, Marynen P, Fryns JP, Mortier G, Devriendt K, Speleman F, Vermeesch JR. (2006). Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet.* Aug;43(8):625-33.
170. Merla G, Brunetti-Pierri N, Micale L, Fusco C. (2010). Copy number variants at Williams-Beuren syndrome 7q11.23 region. *Hum Genet.* Jul;128(1):3-26
171. Meza-Espinoza JP, Anguiano LO, Rivera H. (2008). Chromosomal abnormalities in couples with reproductive disorders. *Gynecol Obstet Invest.*;66(4):237-40.
172. MIM 146390. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/146390>, Erişim 11.03.2010-10:00
173. MIM 194050. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/194050>, Erişim 11.03.2010-11:00
174. MIM 604168. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/604168>, Erişim 11.03.2010-12:00
175. Miller O.J., Therman E.(2001).*Human Chromosomes . 4th.Edition.* Springer, Verlag -Newyork
176. Milunsky A.,Milunsky J.M. (2010). *Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment.*6th ed. John Wiley&Sons Ltd. West Sussex
177. Miura S, Miura K, Masuzaki H, Miyake N, Yoshiura K, Sosonkina N, Harada N, Shimokawa O, Nakayama D, Yoshimura S, Matsumoto N, Niikawa N, Ishimaru T. (2006). Microarray comparative genomic hybridization (CGH)-based prenatal diagnosis for chromosome abnormalities using cell-free fetal DNA in amniotic fluid. *J Hum Genet.*;51(5):412-7
178. Monfort S, Orellana C, Oltra S, Roselló M, Guitart M, Martínez F. (2006) Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med.* Jun;147(6):295-300.
179. Monfort S, Orellana C, Oltra S, Roselló M, Guitart M, Martínez F. (2006) Evaluation of MLPA for the detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *J Lab Clin Med.* Jun;147(6):295-300.

180. Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Amice V, Le Martelot MT, Roche S, Valéri A, Derrien V, Amice J, De Braekeleer M. (2004). Chromosomal abnormalities in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. A study of 370 couples and review of the literature. *Int J Androl.* Jun;27(3):178-82.
181. Munné S, Escudero T, Sandalinas M, Sable D, Cohen J. (2000). Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet.* 90(3-4):303-8.
182. Nacheva EP, Grace CD, Bittner M, Ledbetter DH, Jenkins RB, Green AR. (1998). Comparative genomic hybridization: a comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet.* Jan 15;100 (2):93-105.
183. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D, Mansur C, Marks K. (1992). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ.* Apr 4;304(6831):867-9.
184. Nussbaum R.L., McInnes R R, Willard HF.(2004).*Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6th Edition.*Saunders.Philadelphia
185. Opitz JM, Kaveggia EG, Laxova R, Pallister PD. (1982). The diagnosis and prevention of severe mental retardation, Vol II. In: *Proceedings, International Conference on Preventable Aspects of Genetic Morbidity*, Cairo. p 117–138.
186. Overhauser J, Mitchell HF, Zackai EH, Tick DB, Rojas K, Muenke M. (1995). Physical mapping of the holoprosencephaly critical region in 18p11.3. *Am J Hum Genet.* Nov;57(5):1080-5.
187. Pai GS, Thomas GH, Mahoney W, Migeon BR. (1980). Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet.* Dec;18(6):436-44.
188. Palomares M, Delicado A, Lapunzina P, Arjona D, Amiñoso C, Arcas J, Martinez Bermejo A, Fernández L, López Pajares I. (2006). MLPA vs multiprobe FISH: comparison of two methods for the screening of subtelomeric rearrangements in 50 patients with idiopathic mental retardation. *Clin Genet.* Mar;69(3):228-33.
189. Papoulidis I, Manolakos E, Siomou E, Kefalas K, Thomaidis L, Liehr T, Vetro A, Athanasiadis A, Zuffardi O, Petersen MB. (2010). A fetus with ring chromosome 21 characterized by aCGH shows no clinical findings after birth. *Prenat Diagn.* Jun;30(6):586-8.
190. Park CK, Kim J, Yim SY, Lee AR, Han JH, Kim CY, Park SH, Kim TM, Lee SH, Choi SH, Kim SK, Kim DG, Jung HW. (2011). Usefulness of MS-MLPA for detection of MGMT promoter methylation in the evaluation of pseudoprogression in glioblastoma patients *Neuro Oncol.* Feb;13(2):195-202
191. Patsalis PC, Kousoulidou L, Männik K, Sismani C, Zilina O, Parkel S, Puusepp H, Tõnisson N, Palta P, Remm M, Kurg A. (2007). Detection of small genomic imbalances using microarray-based multiplex amplifiable probe hybridization. *Eur J Hum Genet.* Feb;15(2):162-72
192. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. (2004).The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures.*Hum Reprod Update.* 2005 Jan-Feb;11(1):15-32.
193. Pettenati MJ, Rao PN, Phelan MC, Grass F, Rao KW, Cosper P, Carroll AJ, Elder F, Smith JL, Higgins MD, Butler M. G., Luthardt , F., Keitges, E., Jackson-Cook, C.,Brown J, Schwartz S., van Dyke D. L, Palmer C. G. (1995). Paracentric

- inversions in humans: a review of 446 paracentric inversions with presentation of 120 new cases. *Am J Med Genet*. Jan 16;55(2):171-87.
194. Phelan MC, Crawford EC, Bealer DM. (1996). Mental retardation in South Carolina III: Chromosome aberrations. *Proc Greenwood Genet Ctr* 15: 45–60.
 195. Pickering DL, Eudy JD, Olney AH, Dave BJ, Golden D, Stevens J, Sanger WG. (2008). Array-based comparative genomic hybridization analysis of 1176 consecutive clinical genetics investigations. *Genet Med*. Apr;10(4):262-6.
 196. Popp S, Schulze B, Granzow M, Keller M, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Brough M, Hager HD, Tariverdian G, Brown J, Kearney L, Jauch A. (2002). Study of 30 patients with unexplained developmental delay and dysmorphic features or congenital abnormalities using conventional cytogenetics and multiplex FISH telomere (M-TEL) integrity assay. *Hum Genet*. Jul;111(1):31-9.
 197. Porfiri E., Secker-Walker LM, Hoffbrand AV, Hancock JF. (1993). DCC tumor suppressor gene is inactivated in hematologic malignancies showing monosomy 18. *Blood* 81: 2696-2701
 198. Portnoi MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalán A, Biran-Mucignat V, Malan V, Finkel L, Roger G, Ducrocq S, Gold F, Taillemite JL, Marlin S. (2005). 22q11.2 duplication syndrome: two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet A*. Aug 15;137(1):47-51.
 199. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. (2006). Molecular diagnosis of Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific melting analysis and methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification *Clin Chem* 52, 1276-83.
 200. Rakha EA, Armour JA, Pinder SE, Paish CE, Ellis IO. (2005). High-resolution analysis of 16q22.1 in breast carcinoma using DNA amplifiable probes (multiplex amplifiable probe hybridization technique) and immunohistochemistry. *Int J Cancer*. May 1;114(5):720-9.
 201. Rasmussen K, Nielsen J, Dahl G. (1982). The prevalence of chromosome abnormalities among mentally retarded persons in a geographically delimited area of Denmark. *Clin Genet* 22:244–255.
 202. Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rüschemdorf F, Nürnberg P, Reis A, Trautmann U. (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A*. Oct 1;140(19):2063-74.
 203. Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. (2006). Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet*. Jun;43(6):478-89.
 204. Raymond FL, Simpson JM, Mackie CM, Sharland GK. (1997). Prenatal diagnosis of 22q11 deletions: a series of five cases with congenital heart defects. *J Med Genet* 34:679–682
 205. Redeker EJ, de Visser AS, Bergen AA, Mannens MM. (2008). Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders *Mol Vis* 14, 836-840.
 206. Redon R, Baujat G, Sanlaville D, Le Merrer M, Vekemans M, Munnich A, Carter NP, Cormier-Daire V, Colleaux L. (2006) Interstitial 9q22.3 microdeletion:

- clinical and molecular characterisation of a newly recognised overgrowth syndrome. *Eur J Hum Genet*. Jun;14(6):759-67.
207. Riegel M, Baumer A, Jamar M, Delbecque K, Herens C, Verloes A, Schinzel A. (2001). Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum Genet* 109:286–294.
 208. Rio M, Molinari F, Heuertz S, Ozilou C, Gosset P, Raoul O, Cormier-Daire V, Amiel J, Lyonnet S, Le Merrer M, Turleau C, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Vekemans M, Munnich A, Colleaux L. (2002). Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. *J Med Genet*. Apr;39(4):266-70.
 209. Roberts P, Williams J, Sills MA. (1989), A case of two inversion (10) recombinants in a family. *J Med Genet*. Jul;26(7):461-4.
 210. Rooms L, Reyniers E, van Luijk R, Scheers S, Wauters J, Kooy RF. (2004). Screening for subtelomeric rearrangements using genetic markers in 70 patients with unexplained mental retardation. *Ann Genet*. Jan-Mar;47(1):53-9.
 211. Roselló M, Ferrer-Bolufier I, Monfort S, Oltra S, Quiroga R, Martínez F, Gonzalvo M, Benac A, Perales A, Orellana C. (2010). Prenatal study of common submicroscopic "genomic disorders" using MLPA with subtelomeric /microdeletion syndrome probe mixes, among gestations with ultrasound abnormalities in the first trimester. *Eur J Med Genet*. Mar-Apr;53(2):76-9.
 212. Rossi E, Piccini F, Zollino M, Neri G, Caselli D, Tenconi R, Castellan C, Carrozzo R, Danesino C, Zuffardi O, Ragusa A, Castiglia L, Galesi O, Greco D, Romano C, Pierluigi M, Perfumo C, DiRocco M, Faravelli F, Bricarelli FD, Bonaglia MC, Bedeschi MR, Borgatti R. (2001). Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet*38:417–420.
 213. Roux C, Tripogney C, Morel F, Joanne C, Fellmann F, Clavequin MC, Bresson JL. (2005). Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res*. 111(3-4):291-6.
 214. Sahinoglu Z, Uludogan M, Sayar C, Turkover B, Toksoy G. (2004)Second trimester choroid plexus cysts and trisomy 18. *Int J. Gynaecol Obstet*. Apr;85(1):24-9.
 215. Sahoo T, Cheung SW, Ward P, Darilek S, Patel A, del Gaudio D, Kang SH, Lalani SR, Li J, McAdoo S, Burke A, Shaw CA, Stankiewicz P, Chinault AC, Van den Veyver IB, Roa BB, Beaudet AL, Eng CM. (2006). Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities using array-based comparative genomic hybridization. *Genet Med*. Nov;8(11):719-27.
 216. Salahshourifar I., Shahrokhshahi N., Tavakolzadeh T., Beheshti Z., Gourabi H. (2009). Complex chromosomal rearrangement involving chromosomes 14 and 22 in an infertile male: case report and literature *J Appl Genet* 50(1), 69–72
 217. Sambrook J., Russell D. (2001). Molecular Cloning; A laboratory manual (3rd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York,
 218. Sasagawa I, Nakada T, Terada T, Katayama T. (1989). Robertsonian translocation associated with azoospermia. *Urol Int*. 44(6):379-80.
 219. Schinzel A. (1993a). Trisomy 8 and trisomy 9 are distinctly different clinical entities. *Am J Med Genet*.46: 603–4

220. Schinzel A. (1993b). Karyotype-phenotype correlations in autosomal chromosomal aberrations. *Prog Clin Biol Res.* 384:19-31
221. Schinzel A. Tetrasomy 12p (Pallister-Killian syndrome). (1991). *J Med Genet.* Feb;28(2):122-5.
222. Schinzel A: (2001). *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man.* Berlin: Walter de Gruyter
223. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cuisset JM, Sukno S, Labalme A, Duban-Bedu B, Plessis G, Jaillard S, Dubourg C, Henry C, Lucas J, Odent S, Pasquier L, Copin H, Latour P, Cordier MP, Nadeau G, Till M, Edery P, Andrieux J. (2009). Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur J Med Genet.* Sep-Oct;52(5):291-6.
224. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification *Nucleic Acids Res* 30, e57.
225. Schwartz CE, Phelan MC, Pulliam LH, Wilkes G, Vanner LV, Albiez KL, Potts WA, Rogers RC, Schroer RJ, Saul RA, Prouty LA, Dean JH, Taylor HA, Stevenson RE. (1988). Fragile X syndrome: incidence, clinical and cytogenetic findings in the black and white populations of South Carolina. *Am J Med Genet* 30: 641–654.
226. Scotet V, Duguépéroux I, Audrézet MP, Audebert-Bellanger S, Muller M, Blayau M, Férec C. (2010). Focus on cystic fibrosis and other disorders evidenced in fetuses with sonographic finding of echogenic bowel: 16-year report from Brittany, France. *Am J Obstet Gynecol.* Dec;203(6):592.
227. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* Jul 23;305(5683):525-8.
228. Sellner LN, Taylor GR. (2004). MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. *Hum Mutat.* May;23(5):413-9.
229. Shaffer LG, Bejjani BA. (2004). A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update.* May-Jun;10(3):221-6.
230. Shaffer LG, Bejjani BA. (2004). A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update.* May-Jun;10(3):221-6.
231. Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, Torchia BA, Theisen A, Ballif BC, Bejjani BA. (2008). Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn.* Sep;28(9):789-95.
232. Shaffer LG, Coppinger J, Alliman S, Torchia BA, Theisen A, Ballif BC, Bejjani BA. (2008). Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens. *Prenat Diagn.* Sep;28(9):789-95.
233. Shaikh TH. (2007). Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genet Med.* Sep;9(9):617-25.
234. Shao L, Shaw CA, Lu XY, Sahoo T, Bacino CA, Lalani SR, Stankiewicz P, Yatsenko SA, Li Y, Neill S, Pursley AN, Chinault AC, Patel A, Beaudet AL,

- Lupski JR, Cheung SW. (2008). Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: a study of 5,380 cases. *Am J Med Genet A*. Sep 1;146A(17):2242-51.
235. Shashi V, Golden WL, Allinson PS, Blanton SH, von Kap-Herr C, Kelly TE. (1996). Molecular analysis of recombination in a family with Duchenne muscular dystrophy and a large pericentric X chromosome inversion. *Am J Hum Genet*. Jun;58(6):1231-8.
 236. Simon-Bouy B, Taillandier A, Fauvert D, Brun-Heath I, Serre JL, Armengod CG, Bialer MG, Mathieu M, Cousin J, Chitayat D, Liebelt J, Feldman B, Gérard-Blanluet M, Körtge-Jung S, King C, Laivuori H, Le Merrer M, Mehta S, Jern C, Sharif S, Prieur F, Gillessen-Kaesbach G, Zankl A, Mornet E. (2008). Hypophosphatasia: molecular testing of 19 prenatal cases and discussion about genetic counseling. *Prenat Diagn*. Nov;28(11):993-8.
 237. Sismani C, Armour JAL, Flint J, Girgalli C, Regan R, Patsalis PC. (2001). Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using multiprobe telomeric FISH and the new MAPH telomeric assay. *Eur J Hum Genet*9:527-532.
 238. Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C, Clayton-Smith J, Kingston H, Campbell RHA, Flint J, Donnai D, Biesecker L. (1999). Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet*36:405-411.
 239. Slavotinek AM. (2008). Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet*. Aug;124(1):1-17
 240. Sleurs E, De Catte L, Benatar A (2004). Prenatal diagnosis of absent pulmonary valve syndrome in association with 22q11 deletion. *J Ultrasound Med*23:417-422
 241. Sogaard M, Tümer Z, Hjalgrim H, Hahnemann J, Friis B, Ledaal P, Pedersen VF, Baekgaard P, Tommerup N, Cingöz S, Duno M, Brondum-Nielsen K. (2005). Subtelomeric study of 132 patients with mental retardation reveals 9 chromosomal anomalies and contributes to the delineation of submicroscopic deletions of 1pter, 2qter, 4pter, 5qter and 9qter. *BMC Med Genet*. May 17;6:21.
 242. Soler A, Morales C, Badenas C, Rodríguez-Revenga L, Carrió A, Margarit E, Costa D, Borrell A, Goncé A, Milà M, Sánchez A. (2008). A retrospective and theoretical evaluation of rapid methods for detecting chromosome abnormalities and their implications on genetic counseling based on a series of 3868 CVS diagnoses. *Fetal Diagn Ther*; 23(2):126-31.
 243. Somerville MJ, Mervis CB, Young EJ, Seo EJ, del Campo M, Bamforth S, Peregrine E, Loo W, Lilley M, Pérez-Jurado LA, Morris CA, Scherer SW, Osborne LR. (2005). Severe expressive-language delay related to duplication of the Williams-Beuren locus. *N Engl J Med*. Oct 20;353(16):1694-701.
 244. Souter VL, Glass IA, Chapman DB, Raff ML, Parisi MA, Opheim KE, Disteché CM. (2003). Multiple fetal anomalies associated with subtle subtelomeric chromosomal rearrangements. *Ultrasound Obstet Gynecol*. Jun;21(6):609-15.
 245. Spengler S, Schönherr N, Binder G, Wollmann HA, Fricke-Otto S, Mühlenberg R, Denecke B, Baudis M, Eggermann T. Submicroscopic chromosomal imbalances

- in idiopathic Silver-Russell syndrome (SRS): the SRS phenotype overlaps with the 12q14 microdeletion syndrome. *J Med Genet.* 2010 May;47(5):356-60.
246. Srsen S, Misovicova N, Srsnova K, Volna J. (1989). Chromosome aberrations in a group of mentally retarded persons. *Cesk Psychiatr.* 85: 9–16.
 247. Stefanova I, Jenderny J, Kaminsky E, Mannhardt A, Meinecke P, Grozdanova L, Gillessen-Kaesbach G. (2010). Mosaic and complete tetraploidy in live-born infants: two new patients and review of the literature. *Clin Dysmorphol.* Jul;19(3):123-7.
 248. Stegmann AP, Jonker LM, Engelen JJ. (2008). Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *Eur J Med Genet.* Mar-Apr;51(2):93-105.
 249. Stoeva RE, Grozdanova LI, Vermeesch JR, Kirchhoff M, Fryns JP, Ivanov IS, Patcheva IH, Dimitrov BI, Krastev TB, Linev AJ, Stefanova MT. (2008) Clinical and molecular-cytogenetic studies of cryptic chromosome aberrations in individuals with idiopathic mental retardation and multiple congenital malformations. *Folia Med (Plovdiv).* Oct-Dec;50(4):55-62.
 250. Stoll C, Garne E, Clementi M. (2001). EUROSCAN Study Group. Evaluation of prenatal diagnosis of associated congenital heart diseases by fetal ultrasonographic examination in Europe. *Prenat Diagn.* Apr;21(4):243-52.
 251. Strachan T., Read A. (2010). *Human Molecular Genetics 4th Ed.* Garland Science, Taylor, New York
 252. Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* 417: 304-308,
 253. Stromme P, Bjornstad PG, Ramstad K. (2002). Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol.* 17: 269–71
 254. Sung PL, Chang SP, Wen KC, Chang CM, Yang MJ, Chen LC, Chao KC, Huang CY, Li YC, Lin CC. (2009). Small supernumerary marker chromosome originating from chromosome 10 associated with an apparently normal phenotype. *Am J Med Genet A.* Dec;149A(12):2768-74.
 255. Sutton SD, Ridler MA. Prenatal detection of monosomy 18p and trisomy 18q mosaicism with unexpected fetal phenotype. *J Med Genet.* 1986 Jun;23(3):258-9.
 256. Taylor A.C. (1997) Titration of heparinase for removal of the PCR-inhibitory effect of heparin in DNA samples. *Molecular Ecology.* 6;383-385.
 257. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, Lese CM, Rita D, Wyandt H, Gersen S, White B, Schoonmaker MM. (2001). Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn.* Apr;21(4):293-301.
 258. Thuresson AC, Bondeson ML, Edeby C, Ellis P, Langford C, Dumanski JP, Annerén G. (2007). Whole-genome array-CGH for detection of submicroscopic chromosomal imbalances in children with mental retardation. *Cytogenet Genome Res.*;118(1):1-7.

259. Tinkle BT, Walker ME, Blough-Pfau RI, Saal HM, Hopkin RJ. (2003). Unexpected survival in a case of prenatally diagnosed non-mosaic trisomy 22: Clinical report and review of the natural history. *Am J Med Genet A*. Apr 1;118A(1):90-5.
260. Tjio, J. H. and Levan, A. (1956). The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1-6
261. Tonk VS. (1997). Moving towards a syndrome: a review of 20 cases and a new case of non-mosaic tetrasomy 9p with long-term survival. *Clin Genet*. Jul;52(1):23-9.
262. Tseng JJ, Chou MM, Lo FC, Lai HY, Chen MH, Ho ES. (2006). Detection of chromosome aberrations in the second trimester using genetic amniocentesis: experience during 1995-2004. *Taiwan J Obstet Gynecol*. Mar;45(1):39-41.
263. Turleau C. (2008). Monosomy 18p. *Orphanet J Rare Dis*. Feb 19;3:4.
264. Uhrig S, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik D, Cohen M, Muller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR. 1999. Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am J Hum Genet* 65:448-462.
265. Van den Veyver IB, Beaudet AL. (2006). Comparative genomic hybridization and prenatal diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. Apr;18(2):185-91.
266. Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, Romano C, Delle Chiaie B, Mortier G, Menten B, Destrée A, Maystadt I, Männik K, Kurg A, Reimand T, McMullan D, Oley C, Brueton L, Bongers EM, van Bon BW, Pfund R, Jacquemont S, Ferrarini A, Martinet D, Schrandt-Stumpel C, Stegmann AP, Frints SG, de Vries BB, Ceulemans B, Kooy RF. (2009). Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet*. Mar-Jun;52(2-3):94-100.
267. Van Dyke DL, Weiss L, Roberson JR, Babu VR. (1983) The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *Am J Hum Genet*. Mar;35(2):301-8.
268. van Hagen JM, Eussen HJ, van Schooten R, van Der Geest JN, Lagers-van Haselen GC, Wouters CH, De Zeeuw CI, Gille JJ. (2007). Comparing two diagnostic laboratory tests for Williams syndrome: fluorescent in situ hybridization versus multiplex ligation-dependent probe amplification. *Genet Test*. Fall;11(3):321-7.
269. Van Hemel JO, Eussen HJ. (2000). Interchromosomal insertions. Identification of five cases and a review. *Hum Genet*. Nov;107(5):415-32.
270. Van Opstal D, Boter M, de Jong D, van den Berg C, Brüggewirth HT, Wildschut HI, de Klein A, Galjaard RJ. (2009). Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *Eur J Hum Genet*. Jan;17(1):112-21.
271. Varon R, Gooding R, Steglich C, Marns L, Tang H, Angelicheva D, Yong KK, Ambrugger P, Reinhold A, Morar B, Baas F, Kwa M, Tournev I, Guerguelcheva V, Kremensky I, Lochmüller H, Müllner-Eidenböck A, Merlini L, Neumann L, Bürger J, Walter M, Swoboda K, Thomas PK, von Moers A, Risch N, Kalaydjieva L. (2003). Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA

- polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet.* Oct;35(2):185-9
272. Vermeesch JR, Fiegler H, de Leeuw N, Szuhai K, Schoumans J, Ciccone R, Speleman F, Rauch A, Clayton-Smith J, Van Ravenswaaij C, Sanlaville D, Patsalis PC, Firth H, Devriendt K, Zuffardi O. (2007) Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *Eur J Hum Genet.* Nov;15(11):1105-14.
 273. Vialard F, Molina Gomes D, Leroy B, Quarello E, Escalona A, Le Sciellour C, Serazin V, Roume J, Ville Y, de Mazancourt P, Selva J. (2009). Array comparative genomic hybridization in prenatal diagnosis: another experience. *Fetal Diagn Ther*;25(2):277-84.
 274. Vicić A, Roje D, Strinić T, Stipoljev F. (2008). Trisomy 1 in an early pregnancy failure. *Am J Med Genet A.* Sep 15;146A(18):2439-41.
 275. Viot G, Gosset P, Fert S. (1998). Cryptic subtelomeric rearrangements detected by FISH in mentally retarded and dysmorphic patients. *Am J Hum Genet* 63(Suppl):A10.
 276. Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet.* 2010 May;47(5):289-97.
 277. von Beust G, Laccone FA, del Pilar Andrino M, Wessel A. (2000). Clinical aspects and genetics of Williams-Beuren syndrome. Clinical and molecular genetic study of 44 patients with suspected Williams-Beuren syndrome. *Klin Padiatr.* Nov-Dec;212(6):299-307
 278. Vorsanova SG, Koloti D, Sharonin VO, Soloviev V, Yurov YB. 1998. FISH analysis of microaberrations at telomeric and subtelomeric regions in chromosomes of children with mental retardation. *Am J Hum Genet.* 63(Suppl):A154.
 279. Warburton D. (1991). De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* Nov;49(5):995-1013.
 280. Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW. (1993). Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet.* May;52(5):854-65.
 281. Ward BE, Hayden MW, Robinson A. (1988). Isochromosome 12p mosaicism (Pallister-Killian syndrome): newborn diagnosis by direct bone marrow analysis. *Am J Med Genet.* Dec;31(4):835-9.
 282. Wester U, Bondeson ML, Edeby C, Annerén G. (2006). Clinical and molecular characterization of individuals with 18p deletion: a genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet A.* Jun 1;140(11):1164-71.
 283. Williams JC, Barratt-Boyes BG, Lowe JB. (1961). Supravalvular aortic stenosis. *Circulation.* Dec; 24: 1311-8.
 284. Witters I, Devriendt K, Legius E, Matthijs G, Van Schoubroeck D, Van Assche FA, Fryns JP. (2002). Rapid prenatal diagnosis of trisomy 21 in 5049 consecutive uncultured amniotic fluid samples by fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Prenat Diagn.* Jan;22(1):29-33.

285. Wu KD, Chiu PC, Li SY, Chen JY, Chao MC, Ko FJ, Wang TR, Hsiao KJ. 1991. Chromosomal and biochemical screening on mentally retarded school children in Taiwan. *Jpn J Hum Genet* 36: 267–274.
286. Wu KD, Wu SW, Liu IW. (1984). A cytogenetic survey of mentally retarded children in Taiwan: final report on the incidence of chromosome abnormalities. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China—Part B. Life Sci* 8: 83–88.
287. Xu J, Chen Z. (2003). Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. Feb 15;117C(1):15-24.
288. Yang YH, Ju KS, Kim SB, Cho YH, Lee JH, Lee SH, Choi OH, Chun JH, Kim JI, Kim HJ, Sohn YS. (1999). The Korean collaborative study on 11,000 prenatal genetic amniocentesis. *Yonsei Med J*. Oct;40(5):460-6.
289. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, Yamada T, Tsuda I. (1999). Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J Clin Lab Anal*.;13(3):133-40.
290. Yu W, Ballif BC, Kashork CD, Heilstedt HA, Howard LA, Cai WW, White LD, Liu W, Beaudet AL, Bejjani BA, Shaw CA, Shaffer LG. (2003). Development of a comparative genomic hybridization microarray and demonstration of its utility with 25 wellcharacterized 1p36 deletions. *Hum Mol Genet* 12:2145–2152.
291. Zeugin JA, Hartley JL. (1985). Ethanol Precipitation of DNA. *Focus*; 7 (4): 1–2.
292. Zhang L, Zhang XH, Liang MY, Ren MH. (2010a). Prenatal cytogenetic diagnosis study of 2782 cases of high-risk pregnant women. *Chin Med J (Engl)*. Feb 20;123(4):423-30.
293. Zhang Y, Dai Y, Tu Z, Li Q, Zhang L, Wang L. (2009). Array-CGH detection of three cryptic submicroscopic imbalances in a complex chromosome rearrangement. *J Genet*. Dec;88(3):369-72.
294. Zhang YZ, Xiong H, Wang XZ, Wang S, Luo J, Wang JM, Jiang YW, Chang XZ, Pan H, Qi JG, Li WZ, Yuan Y, Wu XR. (2010b). Genotype, phenotype analysis and follow-up study on patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Beijing Da Xue Xue Bao*. Dec 18;42(6):661-666.

FORMLAR

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

SİTOGENETİK, MOLEKÜLER SİTOGENETİK ve MOLEKÜLER İNCELEMELER (MLPA) İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU *

Proje Adı: "Multiple Patolojik Ultrason Bulgusu Saptanan Fetuslarda Kromozomların Subtelomerik Bölgelerinin Multiprobe Telomer Sistem ve MLPA Yöntemleri ile Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması"

Tarih:

Bu inceleme, Perinatoloji Bilim Dalında yapılan Ultrasonografik incelemelerde özellikle intra uterin gelişme geriliği ve birden fazla patolojik bulgu saptanan ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine gönderilen ve tanı amaçlı yapılan kromozom analizlerinde normal kromozom yapısı kromozomların olası mikro anomaliler açısından daha detaylı incelenmesi amacı ile yapılacak ek incelemelerden oluşmaktadır. Bu ek incelemelerin yapılmasına izin vermeden önce sizleri çalışmanın amacı, riskleri ve yararları konusunda bilgilendirmek istiyoruz.

Aşağıdaki **Moleküler Sitogenetik ve Moleküler İncelemeler için Bilgilendirilmiş Onay Formunu** okuduktan sonra çalışmaya katılma kararı vererseniz formu lütfen imzalayınız.

1.Yapılacak işlemin tanımı : İnceleme Gebeliğinizde ultrason patolojisi olduğu halde normal kromozom yapısı saptanması durumunda kromozom anomalilerinin ileri düzeyde aydınlatılmasını amaçlamaktadır. Bu çalışmalar İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülecektir.

İleri moleküler sitogenetik ve moleküler analizlerin yapılması için hastaların tanı amacı ile önceden alınmış olan mevcut doku örnekleri kullanılacaktır. Örnekler üzerinde FISH (Floresan in situ hibridizasyon) ve MLPA yöntemleri ile çalışılacaktır. Bu yöntemin esası DNA'nın komplementlerini oluşturabilme özelliğine dayanmaktadır. İşlemden önce örnekler mikroskop lamaları üzerine yayılarak preparat hazırlanacaktır. Anomaliye özgün laboratuvarımızda hazırlanmış ve işaretlenmiş problerle bu preparatlar hibridizasyona sokulacaktır. Ertesi gün hibrit sinyaller floresan mikroskoplarda uygun filtreler yardımı ile görüntülenecek ve bu sinyallerin yardımı ile daha önce ailenizde saptanmış olan kompleks kromozom anomalisinin kırık noktaları aydınlatılacaktır.

Eldeki örneklerin yetersiz olması ya da kullanılamaması durumunda hastadan yeniden doku örnekleri almamız gerekebilir. Bu durumda hasta ve aile bilgilendirilecek ve izni alınacaktır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Bu incelemeler için sizden alınan kanlardan ve/veya deri biyopsisinden elde edilecek örneklerinizin saklanması konusunda lütfen aşağıdaki seçeneklerden birini seçiniz:



a.Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra bölümünüz örnek bankasında saklanması için veriyorum.....

b.Elde edilen doku örneğimin çalışma bittikten sonra imha edilmesini istiyorum

Doku örneğiniz saklandığı takdirde size sorulmadan, izniniz alınmadan hiçbir şekilde başka bir çalışma için kullanılmayacaktır

2. Olası riskler ve faydalar :

Kordon Kanı alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) İğne-batmasına bağlı olarak az bir acı duyulması. (2) İğne batması sonrasında çok nadiren enfeksiyon gelişebilir. (3) düşük riski olabilir (%1).

Koryon Biyopsisi alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) Biyopsi alınan bölgede çok hafif bir acı hissi duyulabilir (2) biyopsi bölgesinde çok nadiren enfeksiyon gelişebilir (3) düşük riski olabilir(%1).

Amniyotik sıvı alınması sırasında oluşabilecek riskler: (1) Biyopsi alınan bölgede çok hafif bir acı hissi duyulabilir (2) biyopsi bölgesinde çok nadiren enfeksiyon gelişebilir (3) düşük riski olabilir (1/200).

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası riskler: Size ait genetik bilgi kesinlikle gizli kalacaktır. Genetik bilginin kullanılmasına bağlı olarak sosyal, ekonomik ve psikolojik sorunlar ortaya çıkabilir.

İnceleme sonunda elde edilecek sonuçlar istediğiniz takdirde size bildirilecektir. Ancak bu bilgiyi öğrenmeyi reddetmek her zaman hakkınızdır. Bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin iznimize bağlı olacaktır. Genetik testlerin önemli bir riski de bu testler sonucunda anne yada babanın biyolojik kimliğinin saptanmasıdır. Bu durumlarda da gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır.

Olası yararlar :Bu incelemelerin esas amacı gebeliğinizde normal saptanan kromozom yapısına ilave anomaliler saptanabilmesi ve daha detaylı araştırmak ve genotip-fenotip ilişkisinin anlaşılmasına yardımcı olacak bilgilere ulaşmaktır.

Diğer seçenekler: Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Uygulanacak işlemin yapısı ve amacı hakkında, olası riskleri ve yararları tarafımdan ,

(Doktor Adı)

hastaya,

(Aile Adı)

(Tanık Kişi)

anlatılmıştır. Sorulan sorular tarafımdan cevaplandırılmış ve cevaplandırılmaya devam edilecektir.

Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek yeni riskler ve/veya yararlar tarafımdan katılımcıya iletilecektir.

Tarih :



ETİK KURUL KARARI
T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 2731

Tarih : 24/10/2008

Konu : Prof.Dr.Seher BAŞARAN hk,

Sayın, Prof.Dr.Seher BAŞARAN
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

İlgi : 15.08.2008 tarihli, 113 sayılı yazınız,

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz, Bio.Msc.Güven TOKSOY'un yürüteceği 2008/2468 protokol numaralı "Fetal kromozom anomalilerinin tanısında "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification" tekniğinin etkinliğinin araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 24.09.2008 tarihli, 09 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.
 Bigilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. Zafer ARI
İstanbul Tıp Fakültesi
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 24/09/2008

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 9

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Seher BAŞARAN'ın üstlendiği, Bio.Msc.Güven TOKSOY'un yürüteceği 2008/2468 protokol numaralı "Fetal kromozom anomalilerinin tanısında "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification" tekniğinin etkinliğinin araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Zafer ARI

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM (İzinli)

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN (Katılmadı)

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU

Biokimya A.D

Prof.Dr. Çiçek BAYINDIR (İzinli)

Patoloji A.D., Nöropatolojik B.D

Prof.Dr. Yeşim ERBİL (Katılmadı)

Genel Cerrahi A.D.

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK

İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR (İzinli)

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER

Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK (Katılmadı)

Hukukçu

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Güven	Soyadı	Toksoy
Doğ.Yeri	Kazancı	Doğ.Tar.	08.03.1969
Uyruğu	TC	TC Kim No	42752056416
Email	toksoyg@gmail.com	Tel	00905426309999

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İ.Ü.Sağlık Bilimler Ens. Genetik Programı	2011
Yük.Lis.	İ.Ü.Sağlık Bilimler Ens. Genetik Programı	1999
Lisans	İ.Ü.Fen Fak. Biyoloji Bölümü	1995
Lise	KeçiörenÇevre Sağlığı Meslek Lisesi	1986

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Biyolog- Sitogenetik Lab Sorumlusu	Zeynep KamilKadın ve Çocuk Hastalıkları Eğ. Araş. Hastanesi	2002-
2. Uzman Biyolog-	Aristogen Genetik Tanı Merkezi - Almanya	2001-2002
3. Biyolog- Sitogenetik Lab Sorumlusu	Zeynep KamilKadın ve Çocuk Hastalıkları Eğ. Araş. Hastanesi	1995-2001
4. Röntgen Teknisyeni	Sağlık bakanlığına bağlı değişik hastaneler	1986-1995

Yurtiçi Ve Yurtdışı Eğitim Çalışmaları

GÖREV TÜRÜ	Kurum	ÇALIŞMA DÖNEMİ
SKY FISH tekniği uygulamalarının optimizasyon	Basel Üniveristesi, Çocuk Hastanesi	2001 (1 ay)

çalışmaları	Genetik Bölümü İsviçre	
Sitogenetik eğitimi amaçlı staj	İ.Ü. Çocuk Sağlığı Enstitüsü Tıbbi Genetik Bilim Dalı	1996 (6Ay)

Projeler

Görevi	Projenin Adı	Proje kaynağı	Tarih
Yardımcı araştırmacı	Kraniyofasiyel malformasyonlara klinik ve bilimsel yaklaşım)	ERA-NET Research Programmes on Rare Diseases, 6 ıncı çerçeve programı (TUBITAK sponsorluğunda)	2008-2011
Yardımcı araştırmacı	Multiple patolojik ultrason bulgusu saptanan fetuslarda kromozomların sub-telomerik bölgelerinin multiprob telomer sistem ve MLPA yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak araştırılması	Bu proje, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri kod no.: 1515/2008 tarafından desteklenmektedir	2008-2010
Yardımcı araştırmacı	13.kromozomun q12.2-q13 bölgesinin Moebius Sendromu ile olan ilişkisinin araştırması	Bu proje, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri kod no.: 480/14062007 tarafından desteklenmiştir.	2007-2009

Dil Bilgisi

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	56	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows	Çok iyi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
PSI sitogenetik analiz programı	Çok iyi
Applied imaging sitogenetik analiz programı	Çok iyi
File Maker Veritabanı programı	Çok iyi
Adobe Photoshop	İyi
Free Hand	Zayıf

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar:

1. Sahinoglu Z, Yuksel A, Uludogan M, Bilgic R, **Toksoy G.** (2011). Left Diaphragmatic Eventration Associated with Ipsilateral Pulmonary Sequestration and Intrathoracic Kidney in a Fetus: Reviewing the Prenatal Diagnosis and Etiopathogenesis. *Fetal Pediatr Pathol.* Mar 24.
2. Uzunucu A, Karaman B, **Toksoy G**, Uyguner ZO, Candan S, Eris H, Tatli B, Geckinli B, Yuksel A, Kayserili H, Basaran S. (2009). Molecular genetic screening of MBS1 locus on chromosome 13 for microdeletions and exclusion of FGF9, GSH1 and CDX2 as causative genes in patients with Moebius syndrome. *Eur J Med Genet.* May 19.
3. Uzunucu A, Candan S, **Toksoy G**, Uyguner ZO, Karaman B, Eris H, Tatli B, Kayserili H, Yuksel A, Geckinli B, Yuksel-Apak M, Basaran S. (2009). Mutational screening of BASP1 and transcribed processed pseudogene TPPsig-BASP1 in patients with Möbius syndrome. *J Genet Genomics.* Apr;36(4):251-6.
4. Türköver BB, Sayar C, **Toksoy G**, Elçioğlu N. (2009). A report of a patient with duplication of 7p13-->pter and deletion of 2p23-->pter due to a maternal 2p;7p translocation. *Turk J Pediatr.* Mar-Apr;51(2):174-9
5. Sahinoğlu Z, Uludoğan M, Arık H, Aydın A, Küçükbaş M, Bilgiç R, **Toksoy G.** (2007). Prenatal ultrasonographic features of limb body wall complex: A review of etiopathogenesis and a new classification. *Fetal pediatr.pathol.* May-June 26 (3) 135-51
6. Aker FV, Berkman ZM, Aydingoz I, Hakan T, **Toksoy G.** (2005). Pineal germinoma associated with multiple congenital melanocytic nevi: a unique presentation. *Neuropathology.* Dec;25(4):336-40.
7. Karaman B, Aytan M, Yilmaz K, **Toksoy G**, Onal EP, Ghanbari A, Engur A, Kayserili H, Yuksel-Apak M, Basaran S. (2006). The identification of small supernumerary marker chromosomes; the experiences of 15,792 fetal karyotyping from Turkey. *Eur J Med Genet.* May-Jun;49(3):207-14.
8. Basaran S, Engur A, Aytan M, Karaman B, Ghanbari A, **Toksoy G**, Yuksel A, Cankat D, Kervancioglu E, Wollnik B, Bahceci M, Yuksel-Apak M. (2004). The results of cytogenetic analysis with regard to intracytoplasmic sperm injection in males, females and fetuses. *Fetal Diagn Ther.* Jul-Aug;19(4):313-8.
9. Sahinoglu Z, Uludogan M, Sayar C, Turkover B, **Toksoy G.** (2004). Second trimester choroid plexus cysts and trisomy 18. *Int J Gynaecol Obstet.* Apr;85(1):24-9.

Sözlü Sunum:

1. Aslanger AD, Kayserili H, **Toksoy G**, Karaman B, Başaran S, Uyguner O. (2010). How to approach lissencephaly/subcortical band heterotopia spectrum. *Clinical Genetics* 78(1) Abstract of the 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Genetics Society with International Participation December 1-5,2010 p. 13(2/05)
2. **Toksoy G**, Engür A, Kırgız M, Özkan K, Dehgan T, Başaran S. (2006). Doğal ve ICSI gebelik kayıplarında kromozom anomalileri. *VII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Bildiri Kitabı* s:77.Kayseri
3. Sayar C, **Toksoy G**, Söylemez MA, Berkil H, Yılmaz K, Türköver B. (2006). 45,X[9]/46,X,idic(Y)(q11.2)[36] Karyotipine Sahip Bir Olgu. *VII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. Bildiri Kitabı* s:72Kayseri
4. **Toksoy G**, A. Engür, M. Aytan, A. Ghanbari, K. Özkan, T. Dehgan, A. Cenani, S. Başaran (2004). 6926 Amniyotik Sıvı Örneği Sitogenetik Sonuçları. *VI. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Bildiri Kitabı* Antalya
5. Karaman, B, Aytan M, Yılmaz K, Önal EP, **Toksoy G**, Engür A, Ghanbari A, Kayserili H, Yüksel-Apak M, ve Başaran S.(2002)“Fetal Karyotip analizinde saptanan marker kromozomların aydınlatılması: 20 olgunluk seri sonuçları”, *V. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, Bildiri Kitabı* s.56, Konya,.

Poster

1. Özgür H, **Toksoy G**, Altunoğlu U, Kayserili H, Başaran S, Uyguner O. (2010).Novel de novo splice site mutation in EFNB1 gene cause craniofrontonasal syndrome. *Clinical Genetics* 78(1). Abstract of the 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Genetics Society with International Participation December 1-5,2010 p. 25(A32),
2. Sayar C, **Toksoy G**, Laleli Ş.E. Turkover B, Duman N, Yeşil GŞ, Demirel B, Sarak K, Tükün A,. (2010) A Case with Terminal Deletion on Long Arm of Chromosome 1. 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Society with international Participation. *Clinical Genetics*.Nov-Dec-78(supp. 1) 17-41
3. Duman N, **Toksoy G**, Laleli ŞE, Sayar C, Turkover B, Yeşil GŞ, Turan S, Baran E, Tükün A Identification of 18q12.2-q21.1 Deletion: A Case Report. 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Society with international Participation. *Clinical Genetics*.Nov-Dec-78(supp. 1) 17-41
4. Yeşil GŞ, Sayar C, **Toksoy G**, Turkover B, Duman N, Demir Ü, Güngörmüş S, Deniz E. (2010). A Case Report With A Rare 8p Duplication. 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Society with international Participation. *Clinical Genetics*.Nov-Dec-78(supp. 1) 17-41
5. **Toksoy G**, Turkover B, Laleli ŞE, Yeşil GŞ, Sayar C, Duman N, Şimşek E, Deniz E, Tükün A (2010). A Case With Duplication 2q. . 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Society with international Participation. *Clinical Genetics*.Nov-Dec-78(supp. 1) 17-41
6. Uyguner ZO, **Toksoy G**, Baş F, Darendeliler FF, Aycan Z, Çetinkaya E, Berberoğlu M, Silkar Z, Yüksel B, Darcan Ş, Ercan O, Evliyaoğlu O, Çetinkaya S, Şen Y, Atabek E, Bundak R. (2010). Molecular analysis of the *PROPI* gene in the cohort of Turkish patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency. *Clinical Genetics*, 78(1) Abstract of the 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Genetics Society with International Participation, December 1-5, p. 96(L05)
7. **Toksoy G**, Röthlisberger B, Turkover B, Sayar C, Huber AR, Miny P.(2009)Interstitial deletion 4q due to a complex rearrangement involving chromosomes 1, 2, 4, 8, 14 and 16. *7th European Cytogenetics Conference*. Stockholm, 4.-7.7
8. Üzümcü, A, **Toksoy G**, Candan Ş, Uyguner ZO, Karaman B, Eriş H, Kayserili H, Geçkinli B, Yüksel-Apak M, Başaran S. (2008). Moebius sendromu ile 13q11.2-q13.1 kromozomal

- bölgesi ilişkisinin delesyon haritalaması yöntemi ile incelenmesi. *VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi*, 06-09 Mayıs , Çanakkale (poster),.
9. **Toksoy G**, Türköver B, Sayar C, Söylemez MA, Yardımcı T, Tarhan N, Cesur S, Uludogan M. (2007).Unusual prenatal case with multiple marker chromosomes. *Chr Res*, Vol 15 Suppl. 1, p 127
 10. Başaran, S., **Toksoy G**, B. Karaman, M. Aytan, A. Engür, H. İ. Kalelioğlu, R. Has, E. Ermiş, K. Aydın ve A. Yüksel. (2007). The proportion of various types of chromosome anomalies detected in amniotic fluid samples; The results of a series with 17655 cases,” 6th European Cytogenetics Conference (6th ECC). July 7-10, İstanbul-Turkey. *Chromosome Research*, 12.26-P,.
 11. Yardımcı T, Türköver B, Sayar C, Söylemez MA, **Toksoy G**, Uludoğan M, Tandoğan B. (2007) Case presentation: The pregnancies of a Down Syndrome mother.6.*European Cytogenetics Conference*, İstanbul
 12. Sayar C, **Toksoy G**, Yardımcı T, Sahinoglu Z. (2007). A prenatal case of a 46,XX[44]/48,XX,+2xmar[11].ish(D14Z1/D22Z1+,WCP+)mat. karyotype, with marker chromosome effects on the phenotypes in three generations. 6.*European Cytogenetics Conference*, İstanbul
 13. Söylemez MA, **Toksoy G**, Sayar C, Giray A, Yardımcı T, Turkover B. (2007). A dysmorphic newborn with partial monosomy of 7q36->qter and partial trisomy of p24->pter The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting. San Diego
 14. Söylemez MA, **Toksoy G**, Sayar C, Giray A, Yardımcı T, Turkover B. (2007). A dysmorphic newborn with partial monosomy of 7q36àq ter and partial trisomy of p24->pter. The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting. San Diego
 15. **Toksoy G**, Türkover B, Sayar C, Söylemez M, Yardımcı T, Giray A. (2006). A case of intrachromosomal insertion on chromosome 7 involving five breakpoints. Eurpean Human Genetics Conference, Amsterdam. *European Journal of Human Genetics*. Vol 14 Supp 1. May:179
 16. Kırız M, Engür A, Özkan K, **Toksoy G**, Dehgan T, Başaran S. (2006). Biyokimyasal Tarama Testlerinde Amniyotik Sıvıda Saptanan Kromozom Anomalileri.. *VII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi*. Bildiri Kitabı s:72 Kayseri
 17. Söylemez MA, Sayar C, Türköver B, **Toksoy G**, Yardımcı T, Giray A. (2006). A new syndrome? A case report with short broad terminal phalanges. Eurpean Human Genetics Conference, *European Journal of Human Genetics*. Vol 14 Supp 1. May:156
 18. Soylemez MA, Sayar C, Turkover B, **Toksoy G**, Yardimci T. (2006). A Novel Mechanism between Diabetes Mellitus Complications and Procalcitonin Gene Expression. *Molecular Therapy*.13, S86[[ndash]]S86; doi: 10.1016/j.ymthe.
 19. Soylemez MA, Sayar C, Türköver B, **Toksoy G**, Yardımcı T, Giray A. (2006). A new syndrome? A case report with short broad terminal phalanges. European Human Genetics Conference, Amsterdam
 20. Soylemez MA, Sayar C, Turkover B, **ToksoyG**, Yardimci T. (2005). A Novel Mechanism between Diabetes Mellitus Complications and Procalcitonin Gene Expression, *Molecular Therapy* s346
 21. Karaman B, Aytan M, Yılmaz K, Engür A, **Toksoy G**, Önal EP, Kayserili H, Apak M.Y, Bşaran S. (2005). Fetal kromozom analizlerinde saptanan marker kromozomlar. *Fetal Tıp Prenatal Tanı Kongresi*, Bildiri Kitabı. s:109 Antalya
 22. **Toksoy G**, Engür A, Aytan M, Ghanbari A, Özkan K, Dehgan T, Cenani A, Başaran S. (2004). Fetal Kromozom Anomalilerinin Sınıflandırılması;6926 Amniyotik Sıvı Örneği Sonuçları. *VI. Ulusal prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi- Antalya*. Bildiri Kitabı, s:74

23. Karaman B, A.Ghanbari, A.Engür, M.Aytan, K.Yılmaz, **G.Toksoy** , H.Kayserili, M. Yüksel Apak, S.Basaran. (2002) Fetal karyotip analizlerinde saptanan marker kromozomların aydınlatılması: 20 olguluk seri sonuçları. *V. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi*, Bildiri Kitabı, Konya
24. Yardımcı T, Sayar C, **Toksoy G**, Sarak K, Alkanat F, Şen A. (2002). A case report: Amyoplasia "Classical artrogryposis". *V. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi*, Konya
25. Türköver B, **Toksoy G**, Sayar C. (2000). Okulo-Aurikulo-Vertebral Spektrum' a Uyan Bir Olgu. *IV. Ulusal Prenatal Tanı ve Genetik Kongresi*, İzmir
26. **Toksoy G**, Aytan M, Kılıç G, Karaman B, Basaran S, Apak MY. (1999). İdentification of de novo structural chromosome abnormalities using "Chromoprobe Multiprobe " slide technique. *2nd European Cytogenetics Conference*, Vienna
27. Kılıç G, Karaman B, Başaran S, **Toksoy G**, Hacıhanefioğlu S, Apak M.Y. (1998). De Novo Kromozom Anomalilerinin Tanısında Yeni Bir Sistem "Chromoprobe Multiprobe". *3. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi- Marmaris*, Bildiri Kitabı s:116
28. **Toksoy G**, Uludoğan M, Özden S, Kuyumcuoğlu U, Cantekin D, Başaran S. (1998). Zeynep Kamil Hastanesi İlk Yıl Kromozom Analiz Sonuçları.III. *Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi*. Bildiri Kitabı s:111, Muğla

Sertifika Bilgileri:

1. 2006 Iso 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi Projesi –Dökümantasyon Eğitimi .(2006).SİSTEM Yönetim Danışmanlığı Ltd.Şti.
2. Iso 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi Projesi – ISO-14001 Çevre Yönetim Sistemi Eğitimi (2006). SİSTEM Yönetim Danışmanlığı Ltd.Şti.
3. Iso 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi İç Denetmen Eğitimi.(2004).Türk Standartları Enstitüsü
4. Iso 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi Eğitimi.(2004).Türk Standartları EnstitüsüIso 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi EğitimiTürk Standartları Enstitüsü