

TEKRARLAYAN SPONTAN DÜŞÜKLERİ OLAN ÇİFTLERDE Y KROMOZOMU SENTROMERİK İNDEKSİ*

Dr.Gülşen Ökten**

ÖZET

Kadın eşlerde düşüğe neden olabilecek faktörlerin saptanmadığı, tekrarlayan spontan düşük öyküsü olan 25 çiftin erkeklerinde ve düşük öyküsü olmayan sağlıklı 25 çiftin erkeklerinde kromozom analizi yapıp Y kromozomuna ait sentromerik indeks saptandı.

Kontrol grubu için ortalama değerler 27.21 ± 1.85 iken, denek grubu için bunlar 22.32 ± 2.61 olarak bulundu. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel olarak önemli idi ($p < 0.05$). Kontrol grubunu oluşturan olgulara kıyasla spontan düşük öyküsü olan gruptaki erkek bireylerin Y kromozomunun uzun kolunun daha uzun (Yq+) olmasına karşın, ölçülen sentromerik indeksin daha düşük olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, Yq+ olan erkeklerin eşlerinde düşük riskinin fazla olduğu kanısına varılmıştır.

Bulgularımız, Yq polimorfizminin düşük gelişiminde önemli bir sitogenetik neden olabileceğini düşündürmektedir.

SUMMARY

THE CENTROMERIC INDEX OF Y CHROMOSOME IN COUPLES WITH RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION

Centromeric index Y chromosome has been determined in 25 male partners of couples without history of abortion and 25 male partners of couples giving history of abortion with unknown etiology.

* Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji - Genetik Anabilim Dalı çalışmalarından.

** Ondokuz Mayıs Üni. Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji - Genetik Anabilim Dalı Doçenti.

While the mean values of centromeric index of Y chromosome for the control group were 27.21 ± 1.85 those for the spontaneous abortion group were found to be 22.23 ± 2.61 . This difference between those two groups had a statistical importance ($p < 0.05$).

In contrast to the longer Yq of male individuals of the spontaneous abortion group the centromeric index was lower. As a result, it has been concluded that the sexual partners of males with Yq+ are under greater risk for spontaneous abortion.

Our findings, suggest that the increase in the long arm of Y chromosome could be an important cytogenetic factor in the genesis of repeated spontaneous abortion.

Key words: Y chromosome, Centromeric Index, Spontaneous abortion.

Anahtar kelimeler: Y kromozom, Sentromerik İndeks, Spontan düşük.

Kromozom yapısında rastlanılan ve klinik bir sorun yaratmayan çeşitlilik kromozom polimorfizmi olarak bilinir ve insanda polimorfizim gösteren yapı ya da sistemlerden sadece birisidir^{1,2}. İnsan popülasyonunun %30'unda kromozom polimorfizmi olduğu bildirilmiştir¹. Polimorfizim gösteren yapılar sentromerler, satellitler, Y kromozomu uzun kol (q) hacmi ve bazı kromozomlarda görülen frajil bölgelerdir^{1,2,3,4}.

İnsan Y kromozomunun uzun ya da kısa (p) kollarında heterojenite olduğu ve özellikle inaktif heterokromatinden oluşan uzun kolunun (Yq) polimorfizim gösterdiği saptanmış ve Yq hacim polimorfizmi olarak adlandırılmıştır⁶. Y kromozomunun uzun kolu translokasyona katılmayan DNA baz dizilerinden yapılmıştır. Polimorfizm, kromozom uzun kolunda görülen kısmi delesyon ya da insersiyonlara bağlı olarak oluşur. Bazı erkeklerde 18 no'lu kromozom kadar büyük olurken (Yq+), bazılarında çok daha küçük (Yq-) ve bir aksesuar kromozom niteliğindedir^{7,8}.

Verp ve ark.⁹ çocuk sahibi olamayan, iki ya da daha fazla düşük yapan ve normal çocuk sahibi olan kadınların eşlerinde yaptıkları araştırmalar sonucunda tekrarlayan spontan düşük öyküsü olan kadınların eşlerinde Y kromozomunun uzun kolunda artma (Yq+) saptamışlardır. Buna benzer bazı çalışmalarda Yq+ 'nın spontan düşüklere neden olabileceği bildirilmiştir^{10,11}. Bazı araştırmacılar, Y kromozomunun spontan düşük ve infertilite üzerindeki olası etkisini Y kromozomunun total uzunluğunu, F grubu kromozomlardan birinin total uzunluğuna oranlayarak yapmışlardır^{9,10,12}. İlk kez 1986'da Motulsky sentromerik indeks kavramını getirmiş ve yaptığı araştırmada Amerikan popülasyonunda Y kromozomunun sentromerik indeksini 27.17 ± 3.15 olarak bildirmiştir.

Sentromerik indeks, sentromerin kromozomdaki yerleşim ve hacmi

bakımından bir başka ifadesidir ve sadece yüksek organizasyonlu canlıların kromozomları için geçerlidir. Çünkü bu canlılar kromozomlarında lokalize Sentromerler bulundurlar. Lokalize sentromerlerin kromozomlara yerleşimi, türe özgü ve kuşaklar boyunca sabittir. Diğer iki tip nonlokalize (polisentromer, holosentromer ve noesentromerler gibi) sentromerlerin kromozomlara lokalizasyonları sabit olmadığı için bu tip sentromer taşıyan canlılarda kromozom sentromerik indeksini değerlendirmek mümkün değildir¹⁴.

Yapılan bazı araştırmalarda Y kromozom polimorfizminin spontan düşükle ilgili olabileceği belirtilmiş olmasına karşın^{9,10} bu çiftlerin kadın eşlerinin sitogenetik bulgularına ait verilerden söz edilmiştir. Yq hacim polimorfizminin spontan düşükle ilişkisi üzerine dış ülkelerde bazı araştırmalar yapılmış olmasına karşın, ülkemizde bu konuda yeteri kadar çalışma yapılmamıştır.

Çalışmamız, Y kromozom hacim polimorfizminin spontan düşükle ilgili olup olmadığını araştırmak için yapılmıştır.

Araştırmamızda, spontan düşük öyküsü olan kadınların eşlerinde sitogenetik anormallik saptanmış erkeklerle (denek grubu) düşük öyküsü olmayan çiftlerin erkeklerindeki (Kontrol grubu) Y kromozom hacim polimorfizmi oranlarını karşılaştırmayı ve düşük etiyojisinde, Y kromozom uzun kolundaki artışın (Yq+) ne derece katkısı olduğunu araştırmayı amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Bu prospektif araştırma, Eylül 1987 Aralık 1988 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran ve dışardan kromozom analizi için gönderilen hastalardan iki ya da daha fazla spontan düşük öyküsü olan 25 çiftin erkekleri (D.grubu) ve düşük öyküsü olmayan iki ya da daha fazla yaşayan sağlıklı çocuğu olan 25 çiftin erkekleri (K.grubu) olmak üzere toplam 50 erkek olguda Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarında yapıldı.

D.grubunda kadın eşde herhangi bir düşük nedeni saptanmış olan erkekler çalışma kapsamına alınmadı.

Çalışmada, Moorhead ve ark.ca modifiye edilen 72 saatlik mikrokültür lenfosit kültürü uygulandı¹⁵. Kromozom analizi için heparin çözeltisiyle ıslatılmış steril enjektörle alınan venöz kan kullanıldı.

Hücre kültürü için, Mc.Coy 5A Medium (80 ml), Fetal Calf Serum (20 ml).

Fitoheaglütinin - M (PHA-M) (2ml) veya Fitoheaglütinin -P (PHA-P) (2 damla) ve penisilin amin-streptomisin (1 ml) içeren karışım gerektiğinde pH 6.8-7.2'ye (%7.5 NaHCO₃ ile) ayarlanarak

4.6 ml olacak şekilde kültür şişelerine dağıtılmış ve dondurularak saklanmıştır. Kültür yapılacağı zaman bu besiyeri eritildikten sonra (her bir olgu için bir kültür şişesi kullanmak üzere) bir şişeye 0.4 ml kan konmuş 37°C etüvde 71 saat kültür yürütülmüştür. 71 saatin sonunda etüvden alınan kültür şişelerine 0.1 ml kolşisin (Dietilmetil kolşisin) ilave edilmiş ve tekrar etüve konmuştur. Bir saat sonra kültür sonlandırılmış ve periyodik rutin işlemler uygulanmıştır¹⁶.

Temiz soğuk ve ıslak lamalar üzerine pastör pipeti ile hücrelerin yayma işlemi yapılarak preparatlara Benn ve Perlen'in¹⁷ geliştirdikleri Tripsin-Giems (GTG) bantlama yöntemi uygulandı. Analiz iyi boya almış güzel dağılmış metafaz plakları 10x büyütme objektifiyle seçilip metafazların immersiyonda gözlenmesiyle yürütüldü. Bu işlemle her olgunun preparatlarından 30 metafaz sayıldı, modal kromozom sayısı ve kromozomlardaki sayısal ve yapısal düzensizlik bakımından incelendi.

Tripsin-Giems bantlama sonucu Y kromozomu G grubu kromozomlarından kolayca ayırd edildi, kısa ve uzun kolları ölçüldü. Bu işlem için, tabla ve oküler mikrometresi kullanılarak Y kromozomunu herhangi bir F grubu kromozomuna oranlamak yerine sentromerik indeks yöntemi¹⁸ kullanarak Y kromozomunun sentromerik indeksi belirlendi. Her olgu için sentromerik indeks, 6 farklı metafaz plâğındaki Y kromozomunun sentromerik indeks ortalamalarından elde edildi. Ölçümlerden elde edilen değerler kullanılarak C (Sentromerik indeks) = kısa kol (p) x 100/kısa kol (p) + uzun kol (q) formülüne göre ortalama Y kromozomu sentromerik indeksi hesaplandı. Elde edilen verilere iki grup arasındaki farkın önemlilik testi uygulandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Araştırmamızda, Kontrol ve Denek grubunu oluşturan olgularda modal Kromozom sayısı 46, XY olarak saptandı. Herhangi bir sayısal ve şekil düzensizliğine rastlanmadı.

Kadın eşlerde düşüğe neden olabilecek faktörlerin saptanmadığı iki ya da daha fazla düşüğü olan 25 çiftin erkeklerinde Y kromozom sentromerik indeksi hesaplandı ve elde edilen veriler düşük öyküsü olmayan çiftlerin erkeklerinden elde edilen Y kromozom sentromerik indeks bulgularıyla karşılaştırıldı. Her iki gruba ait Y kromozom sentromerik indeks verileri Tablo I'de bir arada verilmiştir.

Spontan düşük öyküsü olan çiftlerde Y kromozom indeksinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. Kontrol grubu için bu değer 23.90-30.63 arasında ve ortalama olarak 27.21 iken, spontan öyküsü olan çiftlerin erkeklerinde en düşük 17.13 ve en yüksek 26.41 değerleri arasında ve ortalama 22.32 olarak saptandı (Tablo I). Kontrol ve Denek grubu için elde edilen değerler Matulsky¹³'nin

normal populasyon için bildirdiği Y kromozom sentromerik indeksi olan 27.17 ± 3.15 değeriyle karşılaştırıldı ve iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

Ayrıca araştırmamıza konu olan spontan düşük öyküsü olan 25 çiftin 12 sağlıklı çocukları bulunurken, her ailede en az 2 ve en çok 5 spontan düşük olduğu gözlemlendi (Tablo II).

Tablo I: Denek Grubu ve Kontrol Grubu Erkek Olguların Y Kromozomu Sentromerik İndeksi Bakımından Karşılaştırılması.

Aile No	Y KROMOZOM İNDEKSİ	
	Denek Grubu	Kontrol Grubu
1	22.38	29.01
2	25.12	27.27
3	21.31	26.91
4	24.00	25.73
5	26.41	28.00
6	25.00	26.32
7	24.88	27.03
8	20.16	29.41
9	21.40	26.25
10	20.00	28.10
11	25.12	27.10
12	19.19	24.21
13	19.00	25.00
14	23.21	23.90
15	22.83	26.11
16	20.02	27.25
17	24.15	27.55
18	23.62	29.11
19	19.71	30.04
20	23.42	25.91
21	25.01	30.63
22	25.41	27.22
23	18.16	29.98
24	17.13	24.23
25	21.32	28.07

SD: 2.61
 $\bar{X} : 22.32 = 22.32 \pm 2.61$

SD: 1.85
 $\bar{X} : 27.21 = 27.21 \pm 1.85$

Tablo II: Denek Grubunu Oluşturan Çiftlerin Spontan Düşük ve Sağlıklı Çocuk Sayısı ve Dağılımı.

Aile No.	Spontan Düşük Sayısı	Sağlıklı Çocuk Sayısı
1 - V.K.	2	-
2 - H.S.	2	-
3 - E.M.	3	-
4 - K.L.	3	-
5 - K.N.	2	-
6 - E.S.	2	-
7 - F.H.	2	-
8 - HC.	2	-
9 - M.N.	2	-
10 - M.S.	2	-
11 - A.A.	2	3
12 - A.N.	4	-
13 - M.A.	3	-
14 - İ.N.	2	-
15 - H.A.	2	-
16 - N.M.	3	-
17 - A.A.	2	2
18 - R.B.	2	1
19 - G.S.	4	-
20 - S.A.	2	-
21 - G.A.	2	-
22 - H.N.	3	1
23 - A.A.	4	-
24 - G.Z.	5	2
25 - G.S.	3	1
Toplam	66	12

TARTIŞMA

İnsanda Y kromozomunun uzun kolu genetik olarak inaktif, konstitütif (interkalar) heterokromatinden yapılmıştır. C-bantlama ile koyu ve heterojenite gösteren bir bant verir. Aynı karakterdeki bandı insan 1,9 ve 16 no'lu kromozomları da göstermektedir⁸.

Bardsen ve Varela¹⁹, Martin Lucas ve ark.¹² Gümüş boyama, N-bantlama yöntemleriyle erkeklerin Y kromozomu uzun kolunda satellit (Yqs) bulunduğunu göstermişler ancak bu yapı ile infertilite arasında bir bağlantı kuramadıklarını rapor etmişlerdir.

Hoehn ve Kurnit²⁰, Goodfellow ve ark.²¹ yaptıkları epidemiyolojik çalışmalarında, insan Y kromozomunun uzun kolunun polimorfizm gösterdiğini bildirmişler ve buna bağlı olarak düşük nedenlerini araştırmışlardır. Bu konuda bu güne kadar yapılan bütün çalışmalar Y kromozomunu F grubu kromozomlara oranlamak şeklinde (Y/F) yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda Y kromozomunun uzun kolunun populasyonlara özgü olarak heterojenite gösterdiği ve aynı popülasyonda spontan düşük öykülü çiftlerin erkek bireylerinde ise bu heterojenitenin Yq^+ şeklinde olduğu ve diğer heterojenitelerin ise Yq^- ve Yqs olduğu bildirilmiştir^{5 10 12 20}.

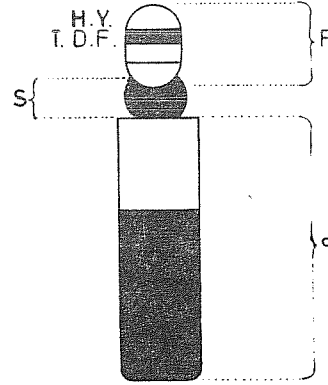
İnsan Y kromozomuna ait hacim polimorfizmi saptanırken sentromerik indeks yönteminin daha güvenilir olduğu kanısındayız. Bu konuda şimdiye kadar yapılan çalışmalarda olduğu gibi Y kromozomunda olası polimorfik yapının tesbitinde kromozomun F grubu kromozomlarla oranlanması daha az güvenilir olsa gerek. Çünkü, Y/F oranlanmasından elde edilen farklı değerler Y kromozomuna bağlı olabileceği gibi F grubu kromozomlara da bağlı olabilir. Böylece, Y kromozomu normal olsa bile F grubu kromozoma ait mikro ya da makro delesyon-insersiyon bu değerlerin normalden sapma göstermesine yetecektir. Bu durumda elde edilen farklı değerlerin Y kromozomuna maledilmesi hatalı olur. Biz araştırmamızda Y kromozomunu F grubu kromozomlara kıyaslamadık, sadece kromozomun kendi kollarını birbirlerine oranlayarak olası hataları minimuma indirmeye çalıştık.

Araştırmamızda Y kromozom indeksi kontrol grubunu oluşturan erkek olgularda 27.21 ± 1.85 ve spontan düşük öyküsü olan çiftlerin erkeklerinde 22.32 ± 2.61 olarak saptandı. Elde edilen bu farklı değerler Matulsky'nin normal popülasyonda Y kromozom indeksi olarak bildirdiği 27.17 ± 3.15 değeri ile karşılaştırıldı ve iki grup arasındaki farkın önemlilik testi sonucu kontrol grubu için önemli bir fark bulunmazken, Denek grubu için bu fark önemli idi ($p < 0.05$).

Kanımızca, Y kromozomuna ait elde edilen heterojenitenin hepsi aynı kromozomun sadece uzun kolundan kaynaklanmaktadır. Bunun nedenleri şöyle özetlenebilir. Oküler mikrometre ile yapılan ölçümlerde uzun koldaki heterojeniteleri bariz bir şekilde görmek mümkün-

dür. Şayet, kısa kolda bir delesyon düşünülürse bu ailelerin sağlıklı, hatta spontan düşükle de sonlansa bir çocuk sahibi olmaları beklene-
mez. Y kromozomunun kısa kolunda herhangi bir delesyon olmasını
beklemiyoruz, çünkü bu kolda insan testis gelişimini veren genler
ve insan Y kromozom antijenlerini belirleyen genler lokalize olmuş-
lardır^{6,9} (Şekil 1). Denek grubunu oluşturan erkek bireylerin testis
gelişimi normal ve başarılı bir seksüel gelişimi olduğu için Y kromo-
zomu kısa kolunda herhangi bir heterojenitenin olmadığı ve elde
edilen farklı değerlerin Y kromozomunun uzun kolundaki heterojeni-
teden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Araştırmamızda Y kromozomun uzun kolunun normalden daha uzun
olduğu tesbit edilmiştir, buna bağlı olarak da sentromerik indeks
düşük ölçülmüştür. Y kromozomun uzun kolunun daha uzun olmasına
neden olan etkenin transpozon genler olabileceği ve bu genlerin
gebelik döneminde fetusun herhangi bir kromozomuna transloke olabi-
lecekleri ve spontan düşükle sonlanan olguların kromozomlarında
sayı yada yapı anomalisine neden olabileceği düşünülmüştür. Ancak,
bu durumda spontan düşük materyalinin hepsinin 46,XY karyotipinde
olmaları beklenir.



- H.Y. : İnsan Y kromozom antijenleri
T.D.F. : Testiküler Determinant Faktörleri
P. : Kısa kol
q. : Uzun kol
S. : Sentromer
C. : Sentromerik indeks

$$C = \frac{P \times 100}{P + q}$$

Şekil 1. İnsan Y. Kromozomunun Genetik Haritası.

Sonuç

Paternal çeşitli yapısal kromozom düzensizliklerinde spontan düşük riskinin arttığı bilinmektedir ²².

Genetik yönden yüksek risk saptanan çiftlerde rutin sitogenetik araştırma esnasında Y kromozomu hacim polimorfizminin incelenerek spontan düşüğü olan çiftlerde bu faktörün de elemine edilmesinin uygun olacağı kanısındayım.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular, Y kromozomun uzun kolunun spontan düşük öykülü olgularda yüksek derecede hacim heterojenitesi göstermesi dolayısıyla Y kromozom uzun kolunun normalden daha uzun olması ve buna bağlı olarak sentromerik indeksinin düşük ölçülmesi, Yq⁺ 'nın spontan düşüklere rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Connor JM, Ferguson-Smith MA. *Essential Medical Genetics*, Oxford, 30,34, 1985.
2. Robinson Ja, Buckton KE, Spowat G, Newton M, Jacobs PA. The segregation of human chromosome polymorphism. *Ann Hum Genet* 40: 113-121, 1976.
3. Pantzar JT, Allanson JE, Kolousek DK, Poland BJ. Cytogenetic findings in 318 couple with repeated spontaneous abortion; a review of experience in British Columbia. *Am J Med Genet* 17: 615-620, 1984.
4. Rao SR, Vasantha K, Thelma BK, Juyal RC, Jhanwar SC. Heterochromatin variation and sex chromosome polymorphism in *Nesokia indica*: A population study. *Cytogenet Cell Genet* 35 (4): 233-237, 1983.
5. Cavalli FJ, Mattevi MS, Erdmann B, Sbalgverio IJ, Maia NA. Quantitative analysis of C bands in chromosome 1,9,16 and Y in Japanese males. *Hum Hered* 34: 62-64, 1984.
6. Langmaid H, Laurance KM. Deletion of the long arms of the Y chromosome with normal male development and intelligence. *J Med Genet* 11: 208-211, 1974.
7. Lau YF, Schanberg S. A male specific DNA probe detects heterochromatin sequences in a familial Yq⁺ chromosome. *Am J Hum Genet* 36(6): 1394-1396, 1984.
8. Kuznetsova JM, Zaritskiaia MI. Polimorphism of heterochromatin regions of chromosomes 1,9,16 and Y in long lived persons and in persons of various ages from 2 areas of the Soviet Union. *Tsitol Genet (U.S.S.R.)* 20(6): 409-416, 1986.

9. Verp MS, Rzeszotarski MS, Martin AO, Simpson JL. Relationship between Y-Chromosome length and first-trimester spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 145: 433-438, 1983.
10. Genet P, Genet FB. The influence of the length of the human Y Chromosome on spontaneous abortions. A prospective study in family Y lines with inherited polymorphic Y chromosomes; *Annales De Genetique* 28(3): 143-148, 1985.
11. Verma RS, Shan JV, Dasik H. Size of Y Chromosome with abortion risk. *Obstet Gynecol* 61: 633-634, 1983.
12. Martin L, Perez CA, Abrisqueta JA. Origin and Structure of Satellited Y chromosome. *Ann Genet* 27(3): 184-186, 1984.
13. Motulsky V. *Human Genetics*. Berlin Heidelberg, 20-70, 220-224, 1986.
14. Jurgen SF. Cytogenetics, plants, animals, humans. *Library of Congress Cataloging in Publication Data* 38, 39, 1980.
15. Moorhead DD, Nowell PC, Melman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparation of lymphocytes cultured from Human Peripheral Blood. *Exp Cell Res* 20: 613, 1960.
16. Ökten G. Normal kişiler ve bazı kromozom düzensizliklerinde Salin Giemsa Metoduyla özel kromozom bantlarının demonstrasyonu. *Ank Tıp Fakt Mecmuası* 28: 1-26, 1975.
17. Benn PA, Perle MA. Chromosome staining and banding techniques. *Hum Cytogenet* 57, 84, 1978.
18. Rooney DE, Czepulkowski BH. *Human Cytogenetics, a Practical Approach* 57, 83, 1987.
19. Bardson B, Varola M. Yqs in an American family of Scottish descent. *Hum Genet* 60: 387-388, 1982.
20. Hoehn H, Kurnit DM. Intra individual Y Chromosome heteromorphism. *Hum Genet* 71: 278-279, 1985.
21. Goodfellow P, Darling S, Wolfe J. The human Y chromosome. *J Med Genet* 22: 329-344, 1985.
22. Arif K, Ökten G. Tekrarlayan spontan düşüklere olan çiftlerde Sitogenetik Araştırma. *Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi* 3: 32-37, 1989.