

ARAŞTIRMA MAKALESİ

**TEKRARLAYAN GEBELİK KAYIPLARINDA SİTOGENETİK ANALİZ**

CYTOGENETIC ANALYSIS IN RECURRENT PREGNANCY LOSS

Işın KAYA<sup>1</sup>, Gülüzar Arzu TURAN<sup>2</sup>, Yeter Selma ÜLKER<sup>1</sup>, Mine GENÇ<sup>2</sup>, Esin KASAP<sup>2</sup>, Esra Bahar GÜR<sup>2</sup>, Berrin KORKUT<sup>2</sup>, Sümeyra TATAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bornova Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Genetik Tanı Merkezi, İZMİR

<sup>2</sup>Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İZMİR

**ÖZET**

Retrospektif olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, örnek grubumuz 2008-2012 Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Tanı Merkezi'ne Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'nden tekrarlayan gebelik kaybı nedeniyle gönderilen düşük materyallerinden oluşmuştur. 96 adet düşük materyalinden uzun süreli hücre kültürü yapılmıştır. 84 örnekte hücre kültürü başarılı, 12 örnekte başarılı olmamıştır. 84 örneğin sitogenetik analizi sonucunda örneklerin 56'sında (%67) normal kromozom kuruluşu, 24'ünde (%29) anormal kromozom kuruluşu, 2'sinde (%2) mozaik kromozom kuruluşu ve 2'sinde (%2) polimorfizm saptanmıştır. Anormal kromozom kuruluşunun % 96'sında sayısal anomali, %4'ünde yapısal anomali saptanmıştır. Sayısal anomaliler içinde %82.5 anöploid ve anöploidiler içinde en sık trizomi 16 'ya (%16) rastlanılmıştır. Normal karyotip saptanan olgularda %84 oranında 46,XX kromozom kuruluşu, %16 oranında 46,XY kromozom kuruluşu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Tekrarlayan gebelik kaybı, sitogenetik analiz

**ABSTRACT**

Our study was done retrospective, sample group has consisted abort materials that have received a diagnosis of recurrent pregnancy loss sent from Şifa University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology between 2008 and 2012. The long term cell culture has been done on 96 abort materials. The cell culture has become successful in 84 materials, culture has become failure in 12 materials. The result of cytogenetic analysis on 84 materials has been presented that in 56 of them (67%) normal karyotype, in 24 (29%) anormal karyotype, in 2 (2%) mosaic karyotype and in 2 (2%) polymorphism. It has been determined 96% numerical abnormality, 4% structural abnormality. It has been observed 82.5% aneuploidy in numerical abnormalities and so most common trisomy 16 (16%) in aneuploides. In the cases where normal karyotype have been determined 84% of them are 46,XX karyotype and 16% of them are 46,XY karyotype.

**Key Words:** Recurrent pregnancy loss, cytogenetic analysis

*Yazının alınma tarihi:09.01.2015, Kabul tarihi:23.03.2015,Online basım:01.04.2015*

**Yazışma Adresi**

Dr.Işın Kaya

Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bornova Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi, Genetik Tanı Merkezi  
İZMİR

E-mail: isintkaya@yahoo.com

Tel:0 5052724747

## GİRİŞ

Gebeliklerin %15-20'si kayıpla sonuçlanmaktadır. Büyük kısmı erken gebelik döneminde olmakla birlikte, 2. ve 3. trimester gebeliklerinde kayıp çok nadir değildir. Tekrarlayan gebelik kaybı 2 veya daha fazla gebelik kaybı olarak tanımlanmaktadır (1). Tekrarlayan gebelik kaybını geleneksel olarak menstrüasyon sonrası 20. gebelik haftasından önce ortaya çıkan üç veya daha fazla ardışık düşük olarak tanımlayan araştırmalar da mevcuttur (2). Yaklaşık kadınların %2-2,5 kadarında iki veya daha fazla gebelik kaybı görülmektedir. Erken gebelik kayıplarının %50'den fazlasında sitogenetik anomaliye rastlanılmaktadır(3,4,5). Tekrarlayan gebelik kayıplarının sitogenetik incelemesinde en sık sayısal anomaliye rastlanılmaktadır(6). Sayısal kromozom anomalileri içerisinde ise trizomiler en sık gözlenen anomalilerdir(6-9).

## GEREÇ VE YÖNTEM

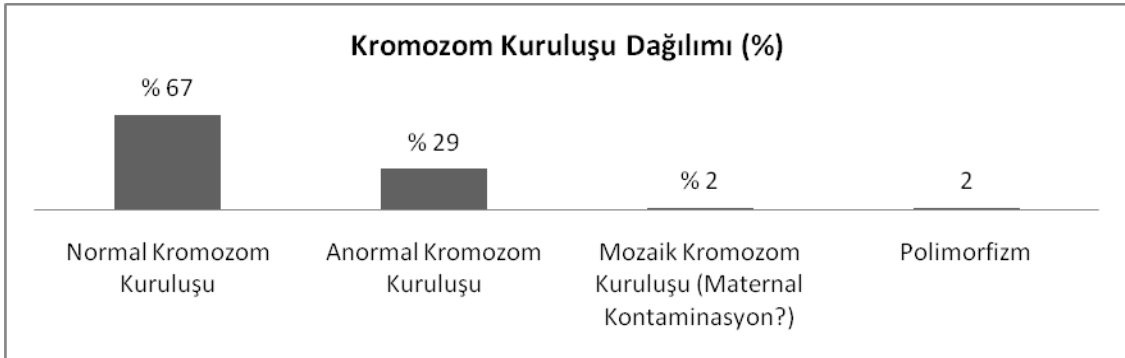
Çalışmayı oluşturan örnek grubu 2008-2012 Şifa Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Tanı Merkezine Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinden tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü ile (2. veya üzeri meydana gelen gebelik kaybı olarak dikkate alındı) gönderilen düşük materyallerinden oluşmuştur. Örnek grubunu oluşturan tüm olgulardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Sitogenetik çalışma için düşük materyalleri, içerisinde transport besiyeri bulunan falcon tüplerinde sitogenetik ünitemize ulaştırıldı. Koryonik villilerin ayrıştırılmasından sonra standart uzun süreli kültür ve harvest uygulama sı gerçekleştirildi. 3 ml besiyeri (BIOAMF-2 Medium-Biological Industries) ve 25 cm<sup>2</sup> kültür kapları kullanılarak hücreler 37 °C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Harvest işleminden 2,5 saat önce 100 mikrolitre kolsemid (colcemid solution, Gibco) uygulaması yapıldı.

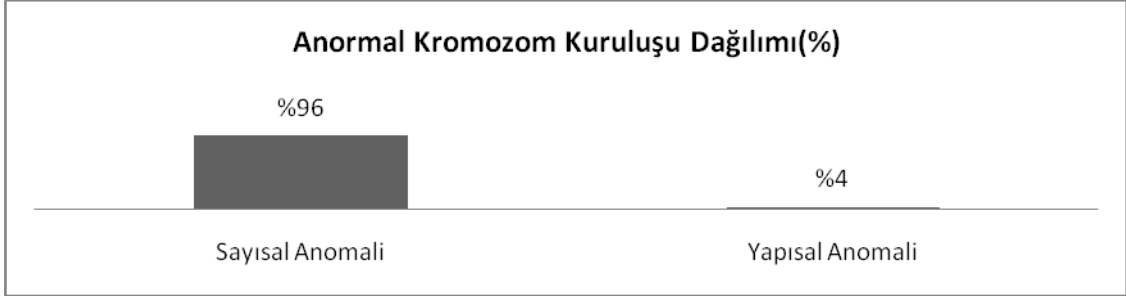
Hücreler bu süre sonunda santrifüj edildi, süpernatant atıldıktan sonra 10 ml hipotonik solüsyon (0,075 mol/l KCl) eklendi ve 35 dakika 37 °C de bekletildi. Süre sonunda 1:3 oranında asetik asit:metanol ile hazırlanan fiksatif solüsyonu ile 3-4 kez muamele edildi. Fiksatif solüsyonu içerisindeki hücrelerin lamaların üzerine damlatılarak yayılması ile hazırlanan preparatlarda Giemsa-Tripsin bantlama yöntemi ile boyanması gerçekleştirildikten sonra karyotyping sistemi ile kromozom analizi gerçekleştirildi. Analiz sonuçları International System For Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 1995 ve 2009'a göre rapor edildi. Her örnek için kromozom analizinde 20 metafaz plağı incelendi.

## BULGULAR

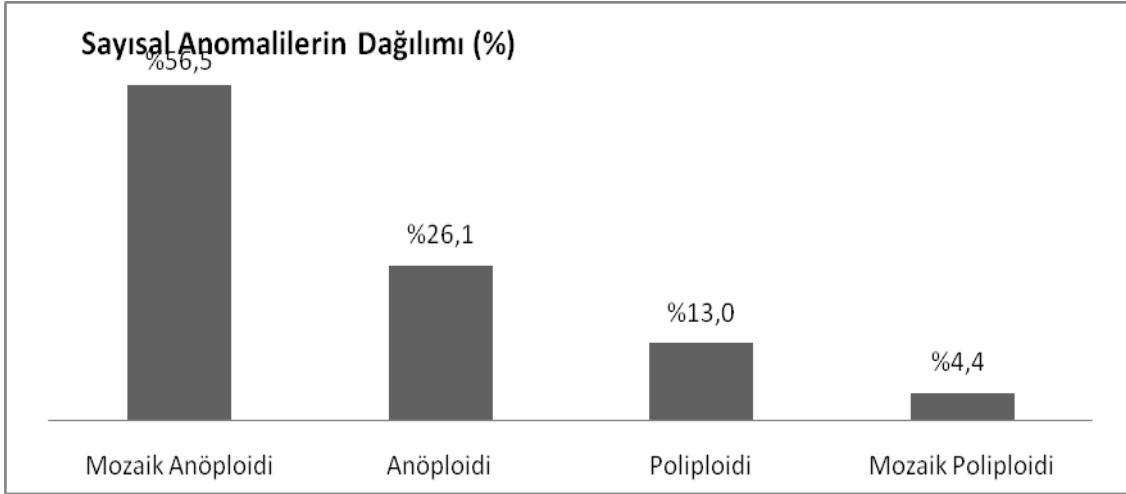
2008-2012 yılları arasında tekrarlayan gebelik kaybı örneği olan 96 adet düşük materyali sitogenetik analiz amacıyla merkezimize gönderildi. Haftası belirtilerek gönderilen düşük materyallerinin en az haftalık olanı 7, en fazla olanı 15 haftalık idi. Olgular içinde en az 2, en fazla 6 düşük öyküsü mevcuttu. 96 adet düşük materyali örneğinden uzun süreli hücre kültürü gerçekleştirildi. Örneklerin 12 tanesinde hücre kültürü sonucunda hücre çoğalması elde edilemedi. Uzun süreli kültürü başarılı olan 84 örneğin sitogenetik analizi gerçekleştirildi, örneklerle ait kromozom kuruluşu oranları grafik 1'de belirtildi.



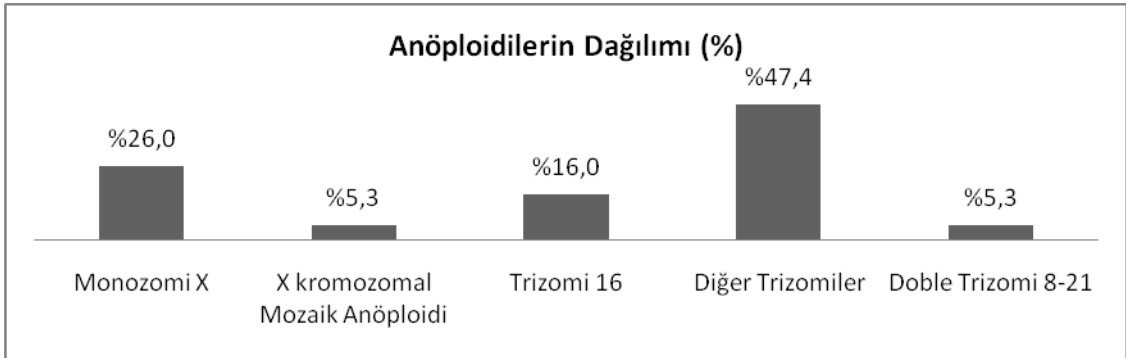
**Grafik 1:** Abortus materyallerinin sitogenetik analiz sonuçlarına ait oranlar  
Normal kromozom kuruluşu saptanan materyallerin 47'sinde (%84) 46 XX kromozom kuruluşu, 9' unda (%16) 46 XY kromozom kuruluşu saptandı.  
Anormal kromozom kuruluşunun % 96'sında sayısal anomali, %4'ünde yapısal anomali saptandı (Grafik 2)



**Grafik 2:** Abortus materyallerinde saptanan anormal kromozom kuruluşu oranları  
Sayısal anomalilerin %82.5'inde anöploidi % 17.5 'inde poliploidi saptandı. 6 olguda anöploidi (%26.1), 13 olguda mozaik anöploidi (%56.5), 3 olguda poliploidi (%13) ve 1 olguda mozaik poliploidi (%4.4) olarak saptandı (Grafik 3).



**Grafik 3:** Abortus materyallerinde kromozomal sayısal anomali oranları  
Anöploidiler içinde Monozomi X olgusu bir örnekte tek kromozom kuruluşu şeklindeken, dört olguda mozaik kromozom kuruluşu şeklindeydi (%26). X kromozomal mozaik anöploidi bir olguda gözlemlendi. Anöploidiler içinde en sık 16. kromozoma ait trizomiye (%16) rastlanıldı. Ayrıca 2,4,8,10,12,13,14,15 ve 21. kromozoma ait trizomiler (%47.3) saptandı. Çalışma grubumuzda sadece bir örnekte 8. ve 21. kromozomların double anöploidisi saptandı (tüm olgular içinde %1,2, anöploidiler içinde %5), triple anöploidi gözlenmedi (Grafik 4).



**Grafik 4:** Abortus materyallerinde sayısal anomalilerin dağılım oranları  
Poliploidi saptanan olgular, triploidi karyotiplerini içermekteydi. Ayrıca tetraploidiye rastlanılmadı. XX/XY mozaik kromozom kuruluşu saptanan 2 olguda maternal kontaminasyon olasılığı dikkate alındı. Yapısal kromozom anomalisi olarak tek örnekte 46,XX / 46,XX, del(15)(q?) karyotipi saptandı (%4). Çalışma grubumuzda translokasyona rastlanılmadı. Polimorfizm olarak 1. ve 16. kromozoma ait heterokromatin artışı saptandı. Double anöploidi saptanan mozaik karyotipe sahip örnekte 9. kromozoma ait perisentrik inversiyon saptandı.

## TARTIŞMA

Erken gebelik kayıplarının %50'den fazlasında sitogenetik anomaliye rastlanılmaktadır (3,5). Tekrarlayan gebelik kayıplarının sitogenetik incelemesinde en sık sayısal anomali saptanmaktadır (6). Literatürde sayısal anomaliler içinde anöploidiler yaklaşık % 82, poliploidiler %14 oranında verilmiştir(5). Bizim çalışma grubumuzda anöploidi oranımız (%82,5) literatürdeki ile hemen hemen aynı oranda, poliploidi oranımız (%17) ise yaklaşık değerlerdedir. Sayısal kromozom anomalileri içerisinde trizomiler en sık gözlenen anomalilerdir(6-9). Bizim çalışma serimizde de en sık trizomi olguları gözlenmiştir. Trizomi olgularında en sık 16. kromozomun trizomisine rastlanılmaktadır (3). Kendi grubumuzda trizomi ve mozaik trizomiler içinde en sık 16. kromozom trizomisi (%16) tespit edilmiştir. Literatürde double trizomi rastlanma oranı % 0.21-2.8 arasındadır(10). Örnek grubumuzda (tüm olgular içinde) tek örnekte 8. ve 21. kromozomların double anöploidisi (%1.2) saptanmıştır. Anöploidilerin yaklaşık %12' sinde monozomi gözlenmektedir ve yaklaşık %10 kadarını monozomi X oluşturmaktadır, bunu takiben de monozomi 21 gelmektedir(5). Örnek grubumuzda monozomi X olgularına yaklaşık % 26 oranında rastlanmıştır. Bu oran literatürdeki oranın yaklaşık iki katıdır. Çalışmamızda monozomi 21 olgusuna rastlanılmamıştır. Anomali saptanan düşük materyallerinde yapısal kromozom anomalileri yaklaşık %4 oranındadır(5). Örnek grubumuzda bu oran literatürdeki ile aynı orandadır. Kromozomal polimorfizmler kromozomların spesifik segmentlerinde gösterilen yapısal varyantlardır.1,9,16 numaralı kromozomların oldukça değişken sentromerik bölgelerini, Y kromozomunun distal ucunu ve akrosentrik kromozomların satellitlerini ve kısa kollarını ilgilendirmektedir (11-12).Polimorfizmlerin çoğunlukla klinik önemi olmadığı ve popülasyondaki genetik varyasyonların çoğundan sorumlu olduğu bilinmektedir(13). Son zamanlardaki çalışmalar polimorfizmlerin reproduktif yetersizlik ve spontan düşüklere olası ilişkisinden bahsetmektedir (14-16). Analiz gerçekleştirdiğimiz grubumuzda 1. ve 16. kromozomların sentromerik bölgelerindeki heterokromatin bölge artışı şeklinde polimorfizm tespit edilmiştir. Normal kromozom kuruluşu saptanan örneklerde 46, XX karyotip %84 oranında, 46 XY karyotip %16 oranında belirlenmiştir. Literatürde 46, XX sonuçların 46,XY olanlardan fazla olduğu ortaya konulmuştur(9,17-19). Genellikle maternal kontaminasyon neden olarak düşünülmüştür ancak genomik imprinting, X inaktivasyon kusurları ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Evdokimova (2000) XY embriyolarda maternal X kromozomu genlerinin ekspresyonunun XX embriyolarla karşılaştırıldığında erken embriyonik dönemde daha stabil gelişimi desteklediğini ileri sürmektedir(16). Eiben (1987) bazı öploid dişi gebeliklerin abortusla sonlanmasının X kromozomu inaktivasyonundaki kusur ile ilgili olduğunu ileri sürmüştür (20). Hem Xic (X inactivation cen-

ter)mutasyonu hem de dişi konsepsiyonlardaki X kromozom genlerinin artmış dozajı erken dönemde ölüme neden olmaktadır. Edward (2004) dişi preimplantasyon fare embriyolarında X inaktivasyon kusuru sonucunda komplet gelişim bozukluğu olduğunu gözlemiştir (21). 46, XX kromozom kuruluşunun yüksek oranda görülmesinin sadece maternal kontaminasyon sonucu olmayıp farklı nedenlerle de ortaya çıkabileceği aklı gelmelidir. Çalışmamızda uzun süreli hücre kültür başarıları elde ettiğimiz düşük materyali örneklerinin sitogenetik analiz sonuçlarımız monozomi X olguları dışında literatürde yer alanlarla karşılaştırıldığında yaklaşık benzer oranlardadır. Düşük materyali örneklerinden gerçekleştirilen hücre kültürü her zaman başarılı olamamaktadır. Bizim çalışma grubumuzda da 12 materyalin hücre kültürü başarılı olamamıştır. Bu durumlarda array CGH (Array Comparative Genomic Hybridization), array tabanlı genomik kazanç ve kayıpların belirlenmesine olanak sağlayan bir test seçeneği (22,23) olarak önerilebilir. Sonuç olarak konvensiyonel sitogenetik analiz tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olanlarda düşük materyallerindeki olası kromozomal düzensizliklerin ortaya konulmasında temel genetik çalışma olma özelliğini korumaktadır. Ortaya konabilen kromozomal değişimler genetik danışmanın odak noktasını oluşturarak ailelerin sonraki gebelik planlamalarında yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKLAR

- 1) Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. *Human Reproduction* 2012; 27(8): 2297-303.
- 2) Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Human Reproduction* 2006; 21(9): 2216-22.
- 3) Pflueger MVS. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. Gersen SI, Keagle MB, editors. 2nd ed. New York: Humana press; 2005:p. 323-45.
- 4) Carp H. Recurrent Pregnancy Loss: Towards More Accurate Diagnosis and Treatment. *IMAJ* 2001; 3(7): 528-32.
- 5) Levy B, Hirschhorn K, Kardon N. Chromosome Abnormalities in Spontaneous Abortions. *Madame Curie Report*. Landes Bioscience, 2007.
- 6) Goddijn MM, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillière's Best Practice and Research. Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2000; 14(5):855-65.
- 7) Nagaishi M, Yamamoto T, Iinuma K, Shimomura K, Berend SA, Knops J. Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan. *J Obstet Gynaecol Res* 2004; 30(3): 237-41.

- 8) Ökten G, Kara N, Tural Ş, Güneş S, Güven D, Koçak İ, et al. Düşük örneklerinde sitogenetik analiz sonuçları. *J. Exp. Clin. Med* 2012; 29: 113-15.
- 9) Brajenović-Milić B, Petrović O, Krašević M, Ristić S, Kapović M. Chromosomal Anomalies in Abnormal Human Pregnancies. *Fetal Diagn Ther* 1998; 13(3): 187-91.
- 10) Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, Bustamante-Aragones A, Cantalapiedra D, Diaz-Recasens J, et al. Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach. *Human Reproduction* 2006; 21(4): 958-66.
- 11) Harrison CJ, Jack EM, Allen TD, Harris R. Investigation of human chromosome polymorphisms by scanning electron microscopy. *Journal of Medical Genetics* 1985; 22(1): 16-23.
- 12) Wyandt HE, Tonk VS. Human Chromosome Variation. Heteromorphism and Polymorphism. Springer Science+Business Media B.V. 2011. Chapter 2. Pp.7-32.
- 13) Ocak Z, Özlü T, Ozyurt O. Association of recurrent pregnancy loss with chromosomal abnormalities and hereditary thrombophilias. *African Health Sciences* 2013; 13(2): 447-52.
- 14) Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online* 2005; 11(6): 726-32.
- 15) Chopade S, Chopade DK, Harish Harde H. Impact of Chromosomal Heteromorphisms on Recurrent Miscarriages. *Human Genet Embryol*, 2012; 2:1.
- 16) Purandare H, Fernandes NV, Deshmukh SV, Chavan S. Heterochromatic Variations and Pregnancy Losses in Humans. *Int J Hum Genet*. 2001; 11(3): 167-75.
- 17) Evdokimova VN, Nikitina TV, Lebedev IN, Sukhanova NN, Nazarenko SA. Sex ratio in early embryonal mortality in man. *Ontogenez*. 2000; 31(4): 251-57.
- 18) Hassold T, Quillen SD, Yamane JA. Sex ratio in spontaneous abortions. *Ann Hum Genet*. 1983; 47(pt1): 39-47.
- 19) Halder A, Fauzdar A. Skewed sex ratio and low aneuploidy in recurrent early missed abortion. *Indian J Med Res*. 2006; 124(1): 41-50.
- 20) Eiben B, Borgmann S, Schübbe I, Hansmann I. A cytogenetic study directly from chorionic villi of 140 spontaneous abortions. *Hum Genet*. 1987; 77(2): 137-41.
- 21) Edwards RG. New outlooks on gene activation and X inactivation in mouse embryos. *Reprod Bio Med Online* 2004; 8(2): 248-50.
- 22) Gao J, Liu C, Yao F, Hao N, Zhou J, Zhou Q, et al. Array-based comparative genomic hybridization is more informative than conventional karyotyping and fluorescence in situ hybridization in the analysis of first-trimester spontaneous abortion. *Molecular Cytogenetics* 2012; 5:33.
- 23) Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH) - Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *European Journal of Human Genetics* 2001; 9(7): 539-47.