

## ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ SİTOGENETİK LABORATUVARINDA UYGULANAN YÖNTEMLERİN TANITILMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. İrfan BATAT (\*)  
Dr. Sinan SÖNMEZ (\*\*)

### ÖZET :

*Bu makalerde Tıp Fakültesi Sitogenik Laboratuvarında uygulanan yöntemler rapor edilmektedir.*

*Periferik kan kültürleriyle elde edilen mitotik kromozom preparatları, önerilen genel yöntemlerin aksine oda sıcaklığında başarıyla G- ve C-banlamaya tabi tutulmaktadır. Elde edilen preparatlar yapısal kromozom analizleri için yeterli rezolüsyonu sağlamaktadır.*

*Banlama işlemlerinin oda sıcaklığında yürütülmesi banlama kalitesinde standardizasyonu kolaylaştırmaktadır.*

### GİRİŞ :

1960'ların başlarından itibaren periferik kan kültürü yöntemlerinin gelişimi insan sitogenetik çalışmalarını hızla büyüyen bir ilgi alanı haline getirmiştir. Bu gelişmeler ülkemizde de yakından izlenmektedir.

Hsu (1) ilk defa insanda kromozom sayısını 48 olarak rapor etmiştir. Hatalı olmasına rağmen bu rapor insan sitogenetiğinde bir dönüm noktası oluşturmaktadır. Her ne kadar rapor edilen kromozom sayısı yanlışsada kullanılan teknikler bu alanda yeni ufuklar açmıştır. 1956'da Tijo ve Levan (2), önemli ölçüde Hsu'nun tekniklerini kullanarak embriyonik akciğer fibroblast kültürlerinde insan kromozom sayısını 46 olarak gözlediler. Bu gözlemler aynı yıl Ford ve Hamerton'un (3) testiküler biyopsi materyalinde de 23 çift mayotik kromozom saymasıyla doğrulanmıştır. 1956'da Ford ve Hamerton'un (4) bölünen hücreyi metafazda durdurmak için Colchicine ve 1960'da Nowell'in (5) lökositleri blast hale geçirmek için Phytohemagglutinin (PHA)

(\*) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D. Doç. Dr.

(\*\*) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Arş. Gör.

kullanmasıyla aşağı yukarı bu gün kullanılan sitogenetik tekniklerin temeli atılmıştır. Daha sonra, preparat yapımında havada kurutma (6) ve hipotonik kullanımının da (7) eklenmesiyle teknik bugünkü düzeyini ulaşmıştır.

İnsan sitogenetiğinde ikinci büyük aşama 1970'lerde **differential staining** veya **bantlama** denilen kromozomların farklı bölgelerinin farklı şekilde boyanmasıyla her bir kromozomun kolayca tanınabilmesidir. Böylece daha önceleri kromozomların sayısal değişimlerinden kaynaklanan genetik hastalıkların yanı sıra, özellikle hematolojik nitelikli, diğer genetik hastalıklarında da teşhis amacıyla kromozom analizlerinin kullanılabilmesinde kapı aralanmış oldu (8).

İlk defa kromozom bantlama yönteminin temelleri Caspersen ve arkadaşları tarafından atılmıştır (9). DNA'ya spesifik flouroscent bir boya olan **Quinacrine mustard** ile kromozomları boyadıklarında her bir kromozomun kendine özgü flouroscent blantlar oluşturduğunu görmüşlerdir. Kullanılan boyanın adına atfen bu yöntem **Q-bantlama** adı verilmiştir. Benzer blantlama modelleri preparatlar boyamadan önce gerekli muamelelere tabi tutulursa **Giemsa** ile de elde edilebilmektedir. Bugün **G-bantlama** denilen bu yöntem hemen hemen tüm sitogenetik laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmaktadır (10).

G-bantlama yönteminin yanı sıra karyotipteki belli kromozomlar üzerinde bulunan belli fonksiyonel bölgeleri analizlemeye yönelik değişik bantlama yöntemleri de geliştirilmiştir (10-11,12). Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Sitogenetik Laboratuvarında da G-bantlama yöntemi rutin olarak uygulanmaktadır.

Tüm blantlama yöntemleri gibi G-bantlama da belli tip DNA moleküllerinin kromozom boyunca organizasyonunu yansıtmaktadır. Buntlama yöntemleri kullanılan boyanın kromozomu oluşturan DNA tipleriyle değişik reaksiyonlar vermesi esasına dayanmaktadır. A-T baz çiftleriyle zengin DNA segmentleri, C-G baz çiftleriyle zengin segmentlerle alternatif bir şekilde kromozom üzerinde yerleşmiş durumdadır. Bu düzen hemen hemen tüm kromozomlar için spesifik bir model oluşturur. Ek olarak bazı segmentler de kromozomların belli bölgelerinde kendilerini sık sık tekrar ederler. Bunun sonucu olarak bantlama tekniklerinin çoğunda doğrudan DNA üzerine etkin olan ajanlar kullanılmaktadır (10).

Bu makalenin amacı laboratuvarımızda uygulanan sitogenetik yöntemleri, uygulama şartlarını ve ortamını tanıtmaktır.

## UYGULANAN YÖNTEMLER :

### Mitoz Plaklarının Elde Edilmesi :

Kromozom preparatları direkt olarak kemik iliğinden veya periferik kan kültürlerinden elde edilmektedir. Periferik kan kültürü için uygulanan yöntem aşağıda

özetlenmiştir.

1. Yaklaşık 1ml. heparinli venöz kan 5-6 ml. antibiyotik eklenmiş ve yaklaşık %20 oranında fetal dana veya koyun serumuyla takviye edilmiş **RPMI 1640** besiyerine konulur. Lökositlerin bölünmesini teşvik etmesi için phytohemagglutinin ortama önceden ilave edilir.

2. Plastik, steril tüplerdeki kan kültürleri 37°C'de bir inkubatörde 70 saat bekletilir.

3. 70. saatte kültürlerle 1-2 damla colchicine veya colcemid gibi bir mitotik inhibitör çözeltisi (5g/ml) ilave edilir.

4. Kültürler tekrar inkubatöre konulur ve 72. saatten önce hipotonik çözeltiye alınır. 10-15 dakika sonra **Carnoy fiksatif**i ile tesbit edilir.

5. Tespit işleminden sonra, kültürler son kez santrifüjlenip; dipte kalan beyaz pelet bir damlalıkla temiz ve ıslak lamlara yayılır, boyanmadan önce kurutulur.

Kültür yöntemleri ile ilgili detaylı bilgi için (11,13-17)'ye bakınız.

#### **Boyama Yöntemleri :**

Laboratuvarımızda uygulanan boyama yöntemlerinde **Giemsa** boyası kullanılmaktadır. Giemsa bileşimi itibariyle kompleks bir yapıya sahiptir. Bu nedenle yapısında bulunan boyar maddeler (Eosin, Azur B), değişik şartlarda (pH, ısı konsantrasyon gibi), değişik yapıları değişik şekillerde boyayabilir. Bu nedenle boyanacak preparatlara uygulanan ön muameleler, boyamanın sadece kalitesi açısından değil, boyanan bölgeler açısından da önem taşımaktadır(10,11). Laboratuvarımızda Giemsa ile gerçekleştirilen G-bantlama yöntemi aşağıdaki gibidir.

1. 1-2 gün süreyle havada kurutulup, yaşlandırılan preparatlar **Söransan tampo**nu ile hazırlanmış % 0,05'lik **Trypsin** (Difco) çözeltisi içerisinde 10-60 saniye bekletilir.

2. Tripsinden çıkarılan preparatlar akan musluk suyunda iyice çalkalanır.

3. Fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış % 4'lük Giemsa çözeltisi içerisinde 4-5 dakika tutulur.

4. Preparatlar musluk suyunda yıkanır ve kurutularak incelenir. Saklanacaksa kapatma işlemine tabi tutulur.

Reçetede adı geçen çözümlerin hazırlanışı için (11) ve (15)'e bakınız.

C-bantlamada da G-bantlamada olduğu gibi kromozomların **heterokromatin** bölgeleri koyu boyanmaktadır. G-Bantlamadan farklı olarak sentromerler ve Y kromozomunun distal ucu da boyanabilmektedir. Ayrıca oldukça yüksek oranda repetitif DNA içeren satellitleri ve bazı GC çiftlerince zengin segmentleri boyayabilmektedir (10).

C-bantlama için alkali bir Giemsa çözeltisi (pH=10.4) kullanılmaktadır. Aşağıdaki prosedür Aghamohammadi ve Savage (18,19)'dan modifiye edilmiştir.

1. Havada kurutulmuş preparatlar fosfat tamponu ile taze hazırlanmış % 7.5 luk Giemsa çözeltisine (pH=10,4) batırılır. Ortalama 4-5 dakika beklenir. Tamponun PH' sinin ayarlanmasında NaOH veya Ba(OH)<sub>2</sub> yerine 1N NH<sub>2</sub>OH kullanılmaktadır.

2. Boyadan çıkartılan preparatlar musluk suyunda iyice yıkanır.

3. Kurutulup, aseton-ksilol ve ksilol serilerinden sonra **Kanada baslamı** veya **entellan** ile kapatılır.

Ayrıca kromozomlardaki sayısal değişimleri, kırıkları ve açıklıkları (gap) analizlemek için de, fosfat tamponu (pH=6.8-7.0) ile hazırlanmış % 4'lük Giemsa çözeltisi ile tüm boyama yapılmaktadır.

### **Kromozomal Analizler Ve Kullanılan Tekniklerin Uygulanması :**

Kromozomal anomaliler iki gruba ayrılır :

- 1- Sayısal değişimler
- 2- Yapısal değişimler

İnsan genetiği açısından ele aldığımızda kromozomlarda meydana gelen bu değişimlerin hemen hemen hepsi gerek **homozigot**, gerekse **heterozigot** durumda, çeşitli sağlık sorunlarına neden olduklarından sonraki nesillere aktarılma şansları çok düşüktür. Aneuploidi denilen sayısal değişimlerin büyük bir kısmı taşıyan bireyde çeşitli gelişim bozukluklarına neden olur. Bu bireyler bazı kongenital malformasyonlarla doğar ve kısa bir yaşam sürebilirler.

Diğer taraftan yapısal kromozom anomalileri (**delesyon**, **duplikasyon**, **inversiyon**, **translokasyon**), sayısal anomaliler kadar çarpıcı, kolay tanınabilen anomaliler olmamakla beraber, yarattığı sağlık sorunları açısından daha çok ilgi çekmektedir. Özellikle heterozigot durumda genetik transmisyonun mümkün oluşu, bazen fenotipe yansımaları ve gelişimin ileri safhalarına kadar ertelenebilmeleri toplum sağlığı açısından da önem taşımaktadır.

Gerek sayısal gerekse yapısal anomalilerin bazıları organizmada mozaik olarak da bulunabilirler. Bu durumda sitogenetik yöntemlerle tanınmaları ancak ilgili doku ve/veya

organlardan alınacak materyalin kültürü ve incelenmesi ile mümkündür.

**Mozaizm** durumunda mozaiklik gonadları da etkilerse, eğer steriliteye neden olmamışsa gelecek nesillere de aktarılabilir.

Bu genel bilgiler ışığında laboratuvarımızda uygulanan yöntemler gerek sayısal gerekse yapısal kromozom anomalilerinin analizine büyük ölçüde imkan vermektedir. Diğer bir deyişle periferik kan elemanlarından lökositlerin kromozomlarına yansıyan kromozom anomalilerini incelemek mümkündür. Bununla beraber preparat kalitesi ve kullandığımız mikroskobun kalitesi özellikle yapısal değişimlerin incelenmesinde önem taşımaktadır. Uyguladığımız yöntemlerin total rezolüsyonu 300-350 bantlık preparatlar- da tek bir banda kadar inebilmektedir. Klinik bulguların yönlendirmesi halinde ve şüpheli durumlarda senkronize kültürlerle yüksek rezolüsyonlu bantlama (**High resolution banding**) yapılabilen ve band sayısı 1200'e kadar çıkarılabilmektedir. Bu durumda subbantları incelemek mümkün olmaktadır. Bantların incelenmesi ve karyotip- lerin yapılmasında ISCN (21,22) sistemi uygulanmaktadır.

Laboratuvarımızda uygulanan G- ve C-bantlama yöntemlerinde kromozomların A-T baz çiftlerince zengin heterokromatik bölgeleri boyanmaktadır. Uygulama açısından bu iki bantlama yöntemi benzer sonuçlar vermekle beraber; C-bantlamada bazı G-C'den zengin segmentler de boyanır. G-bantlamadan farklı olarak C-bantlama ile setromerler, Y kromozomunun distal ucu ve satellitler de boyanır. Her ikisinde de replikatif DNA boyanmaktadır. Fakat C-bantlamada S-fazının son aşamasında sentelenen DNA'nın boyanması, **Kardeş Kromatid Değişimi (SCE)** analizlerinde G-bantlamadan daha kullanışlıdır (10,11).

## SONUÇ :

Laboratuvarımızda uygulanan sitogenetik yöntemler genel olarak kliniklerden gelebilecek rutin isteklere cevap verebilecek düzeye ulaşmıştır. Bu yöntemlerin uygulanabilmesinde en kritik aşama kültür aşamasıdır. Bu aşamanın başarısı için gerekli tüm çabanın sarfedilmesi gereklidir. Bu işlemden karşımıza çıkan en önemli sorun kontaminasyon olmaktadır ki; bunun da kaynağı genellikle hastadan örnek alınması sırasında gerekli titizliğin gösterilmemesidir. İkinci önemli problem, alınan örneğin laboratuvara gereken süratle ulaştırılamamasıdır. Bu durum büyük oranda hücre ölümlerine neden olmakta ve blast sayısını düşürmektedir.

Periferik kan kültürleri ile yapılan çalışmalar; periferik kan hücrelerine yansımayan mozaik durumlar dışında hemen hemen her tip kromozomal anomalinin tanınmasına yeterlidir.

## SUMMARY :

### DESCRIPTION AND EVOLUATION OF THE CYTOGENETIC METHODS IMPLIMENTED FOR THE CYTOGENETIC LABORATORY OF THE FACULTY OF THE MEDICINE OF ATATÜRK UNIVERSITY

In this paper, cytogenetic methods implimented in the cytogenetic laboratory of the faculty of medicine are reported.

On the mitotic chromosome silides obtained from peripheric whole blood micro-cultures.

G- and C-bandings were succefully applied at room temperature contrary to the widely suggested head pretreatments. The slides were provided satisfactory resolution for structural chromosome analysis.

Carrying out the whole procedures at room temperature simplifies the standardization in banding quality.

## KAYNAKLAR :

1. Hsu, T.C. Mammalian chromosomes in vitro: I. The karyotype of man. *J. Hered.* 43: 167-172, 1952.
2. Tijo, J.H. and A. Levan. The chromosome number of man. *Hereditas.* 42: 1-6, 1956.
3. Ford, C.E. and J.L., Hamerton. The chromosomes of man. *Nature* 178: 1020-1023, 1956.
4. Ford, C.E. and J.L. Hamerton. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 31: 247-251, 1956.
5. Nowell, P.C. Phytohemagglutinin an inhibitor of mitosis in culture of normal human leucocytes. *Cancer Res.* 20: 462-466, 1960.
6. Rothfels, K.H. and Siminovich. An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian celss grown invitro. *Stain Technol.* 33: 73-77, 1958.
7. Hungerford, D.A. Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Tecol.* 40: 33-338, 1965.
8. Larson, L. Human chromosome analysis: Methodology and applications. *Am.J. Med. Technol.* 49: 687-698, 1983.

9. Caspersson, T., S. Forber, G.E. Foley et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 49: 219-222, 1968.
10. Miller, O.J. Chromosomal basis of inheritance. In A.E.H. Emery and D.L. Rimoin (Eds). *Principles and Practice of Medical Genetics*. Vol. 1: 77-93, 1990.
11. Rooney, D.E. And B.H. Czepulkowski (Eds.). *Human Cytogenetics: A Practical Approach*. IRL Press. Oxford. 1986.
12. Davies, K. E. *Human Genetic Diseases: A Practical Approach*. Oxford. 1986.
13. Şaylı, B.S. *Medikal Sitogenetik*. Ankara. 1986.
14. Başaran, N. *Tıbbi Genetik*. Anadolu Üniv. Yay. Eskişehir. 1983.
15. Lüleci, G., S. Başaran, G. Bağcı, İ. Keser. *Sitogenetik Uygulama Yöntemleri*. (Pratik El Kitabı). Antalya. 1989.
16. Parker, R.C. *Methods of Tissue Culture* (3. th ed.). Harper and Row, N.Y., 1961.
17. Merchant, D.J., R.H. Kahn and W.H. Murphy. *Handbook of Cell and Organ Culture*. Burgess Publ. Co., Mineapolis, 1964.
18. Aghamohammadi, S.Z. and J.R.K. Savage. A pulse BrdU methods for S.C.E. *Mutation Res.* 216: 259-266, 1989.
19. Aghamohammadi, S.Z. and J.R.K. Savage. BrdU pulse/reverse staining protocols for investigating chromosome replication. *Chromosoma*, 99: 76-82, 1990.
20. Emery, A.E.H. and D.L. Rimoin (Eds). *Principles and Practice of Medical Genetics*.: 2. nd ed. (2. vol). Churchill Livingstone, London, 1990.
21. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Birth Defects: Original Article Series*. Vol. IXV. No.8, The National Foundation, New York, 1978.
22. ISCN. An International System for Human Cytogenetic nomenclature-High Resolution Banding. *Birth Defects: Original Article Series: Vol. XVII, No: 5, March of Dimes Birth Defects Foundation, New York, 1981.*