Araştırma Makalesi / *Research Article*

İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi (Medical Journal of İzmir Hospital) 26 (1): 9-18, 2022

TURNER SENDROMLU HASTALARDA Y KROMOZOM DİZİLERİNİN FLORESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH) YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

MOLECULER ANALYSIS OF Y CHROMOSOME BY FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) METHOD IN TURNER SYNDROME PATIENTS

Abdullah Barış AKCAN[1] Osman Koray BODUROĞLU [2]

[1]Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi , Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD., Neonatoloji BD., Aydın, Türkiye
[2]Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD., Genetik BD., Ankara, Türkiye

Anahtar Sözcükler: Turner sendromu, floresan in situ hibridizasyon, y kromozomu
Keywords: Turner's syndrome, fluorescent in situ hybridization, y chromosome

Yazının alınma tarihi: 13.09.2021 Kabul tarihi: 11.11.2021 Online basım: 23.02.2022

ÖZ

Giriş: Turner Sendromu (TS), insanlarda kısa boy, seksüel infantilizm, streak gonadlar, primer amenore ve *somatik anomalilerle karakterize kromozomal bir hastalıktır. TS'lu bireylerin % 55'i nonmozaik 45,X karyotipine sahiptir. Hastaların %5'inde Y kromozomu taşıyan bir hücre dizisi vardır. Bu standart sitogenetik analizlerle gösterilemez. Bazı TS'lı bireylerde Y kromatinin tespiti gonadoblastom gelişmesi ile ilişkili olabilir. Bu yüzden TS'lu bireylerde Y kromatinin varlığının gösterilmesi önemlidir. Bu çalışmada floresan in situ hibridizasyon (FISH) analizi ile TS'lı bireylerden Y tüm kromozom probları (W.C.P: Whole Chromosome Prob) yardımıyla Y kromatini açısından mosaizm gösteren vakaların tespiti planlandı.*

Gereç ve Yöntem: *Genetik Ünitesi'nde izlenmekte olan 44 Turner sendromlu hastanın dosya kayıtlarından adres ve telefon numaralarına ulaşılarak çalışma için davet edildiler. Davet edilen 44 hastadan 28'i davete cevap vermiştir. Bu çalışmada, Y tüm kromozom prob (W.C.P: Whole Chromosome Prob) yardımıyla Y kromatini açısından mosaizm gösteren TS'lu hastaların tespiti planlanmıştır.*

Bulgular: *Çalışmaya katılan vakaların çoğunluğu (%71.42) klasik Turner sendromu karyotipi olan saf X monozomisi taşımaktaydı. İzole veya mozaik formlar halindeki diğer yapısal X kromozomu aberasyonları daha az sıklıkla temsil edilmekteydi. Turner sendromlu 28 vakada FISH metodu ile Y tüm kromozom prob (W.C.P: Whole Chromosome Prob) kullanılarak Y kromozom dizileri aranmış; 28 vakadan bir vakada (%3.5) Y kromozom dizisi tespit edilmiştir.*

Sonuç: *Turner Sendromlu bireylerin Y kromatini açısından taranması önerilmektedir. Bunun tespiti, Turner Sendromlu bireye özellikle gonadoblastom geliştirme riski açısından ileri klinik danışma ile bilgilendirmeyi ve yönlendirmeyi sağlayacaktır. Bu çalışma bunun önemini vurgulamak amacıyla yapılmıştır.*

SUMMARY

Introduction: *TurnerSyndrome (TS) is a frequently identified chromosomal disease in humans characterized by short stature, sexual infantilism, streak gonads,primary amenorrhea, and a number of somatic anomalies. Approximately 55% of TS individuals have a nonmosaic 45,X karyotype. In addition ,a cell line with a Y chromosome is present in 5 % of patients. That is undetectable by standart cytogenetic analysis. The identification of Y chromatin in some TS individuals has been associated with development of gonadoblastoma.*

Therefore, it is important to exclude the presence of Y chromatin in TS individuals.In this study, it was planned to detect cases with mosaicism in terms of Y chromatin with the help of Y whole chromosome probes (W.C.P: Whole chromosome Probe) from individuals with TS by fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis.

Material and Method: *The addresses and phone numbers of 44 patients with Turner syndrome who were being followed up in the Genetics Unit were contacted and invited for the study. Of the 44 invited patients, 28 responded to the invitation.In this study, it was planned to detect TS patients with mosaicism in terms of Y chromatin with the help of Y whole chromosome probe (W.C.P: Whole Chromosome Probe).*

Results: *The majority of the cases (71.42%) included in the study carried pure X monosomy, which is the classical Turner syndrome karyotype.Other structural X chromosome aberrations, in isolated or mosaic forms, were less frequently represented. Y chromosome sequences were searched in 28 cases with Turner syndrome by FISH method using Y whole chromosome probe (W.C.P: Whole Chromosome Probe). Y chromosome sequence was detected in one (3.5%) case of 28 cases.*

Conclusion: *It is recommended that individuals with Turner Syndrome be screened for Y chromatin. Detection of this will provide information and guidance to individuals with Turner Syndrome, especially in terms of the risk of developing gonadoblastoma, with advanced clinical consultation. This study was conducted to emphasize the importance of this.*

GİRİŞ

İlk tanımı 1938'de yapılan Turner Sendromunun (TS) insidansı 4000 ile 10000 canlı doğumda bir veya yaklaşık olarak her 2500 canlı kız bebek doğumunda birdir (1-3). Turner sendromu dişilerde en çok görülen kromozomal anomalilerden biridir. X kromozomunun yokluğu veya yapısal olarak anormal X kromozomuna sahip olmanın bir sonucudur.

Turner sendromu kısa boy, gonadaldisgenezis, tipik dismorfik özellikler, üriner,kardiyovasküler ve iskelet anomalileri ile karakterize; kayıp veya yapısal olarak anormal ikinci seks kromozomu ile karakterize bir sendromdur (1-3). TS hastaların %40-60'ın da ki karyotipik anomali monozomi 45, X' tir. Fakat mozaizm, Xp veya Xqdelesyonu ve X uzun kolunun izokromozomu gibi anomaliler de bulunmaktadır (4). Ek olarak, Y kromozomu TS'lı bireylerin % 5-6' sında bulunur, ilaveten % 3'ünde Y kromozomundan veya diğer bir kromozomdan türetilmiş marker kromozom (konvensiyonel sitogenetik metodlarla tespit edilemeyen yapısal olarak anormal kromozom) bulunur (5).

Y kromozomu insan genomundaki en küçük kromozomlardan biridir (Yaklaşık 60 Megabaz) ve haploid genomun %2-3'ünü temsil eder. Sitogenetik çalışmalar değişik Y bölgelerinin tespitini sağlamaktadır. Y kromozomu üzerinde bir veya daha fazla gen; GBY bölgesi (Y kromozomu üzerindeki gonadoblastom lokusu) disgenetik gonadlardan gonadoblastoma gelişmesinde rol oynayan kritik bölge olarak düşünülmektedir (6).

Gonadoblastoma, anormal gonadların en sık görülen neoplazmıdır ve sadece gonad kökenlidir. Gonadoblastoma vakaları 1-40 yaş arasındadır ve tipik özellikleri, seksüel gelişim bozukluğuyla birlikte, kongenital anormal gonadlara sahip olmalarıdır. Gözlenmiş olan gonad anomalileri, bilateral "çizgi" (streak) gonadlar, bir tarafta "çizgi" gonad,diğer tarafta bir testis veya belirsiz tipte anormal gonadlardır. Gelişim bozukluğu bulunan bir kişide, gonadoblastomanın oluşumu, bir Y kromozomunun varlığına bağımlıdır.

Herhangi bir gonad disgenezisi ve bir Y kromozomu bulunan vakanın, bir germ hücresi tümörü ve özellikle bir gonadoblastoma geliştirme olasılığı çok yüksektir. Gonadoblastomaların üçte biri bilateraldir ve bunlar, ancak mikroskopla görülebilecek kadar ufak olabilir. Gonadoblastomalar, çıkarılmadıkları takdirde, malign elemanlarca büyütülürler. Tümörün iri ve bilateral olması halinde dahi, gonadoblastoma içinden köken alan germinomanın metastazları çok seyrek görülür. (7).Disgenetik gonadları ve Y kromozom dizilerini içeren hücreleri olan bireylerde gonadoblastoma riski artar. TS'lı hastalarda prognoz karyotip tipine göre değişmektedir. Gonadoblastoma geliştirme riski ve pubertede virilizasyon riski Y kromozom dizileri içeren bireylerde artar (7-9). TS'lı bireylerde dış genital yapının virilizasyonu testis dokusunun varlığına işaret edebilir ve tahminen Y kromozom dizilerinin varlığını gösterir.

TS'lı bireyler Y kromozom mozaizmi açısından floresan in situhibridizasyon (FISH) yöntemini de içeren uygun sitogenetik yöntemle araştırılmalı-

dır. Eğer karyotip bilinmeyen kökenli bir marker kromozomu gösterirse Y kromozom DNA problarının kullanılacağı moleküler çalışmalar faydalı olabilir. Ayrıca eğer hastada kliteromegali veya doğumda maskulinize genital yapı, pubertede virilizasyon varsa Y kromozom mosaizm olasılığı araştırılmalıdır (10). Y kromozom mosaizmi varsa gonadoblastom veya disgerminom gelişme riski hayatın ikinci on yılında % 10-20'dir (7-10). Yaş artıkça risk artar, disgenetik gonadlarda gonadoblastoma gelişme riski %30'a kadar çıkar (9,11). Bu yüzden TS'lı bireylerde Y kromozom dizilerinin varlığının gösterilmesi önemlidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Genetik Ünitesi'nde izlenmekte olan 44 Turner sendromlu hastanın dosya kayıtlarından adres ve telefon numaralarına ulaşılarak çalışma için davet edilmişlerdir. Davet edilen 44 hastadan 28'i davete cevap vermiştir. Bu çalışmada, Y tüm kromozom prob (W.C.P: Whole Chromosome Prob) yardımıyla Y kromatini açısından mosaizm gösteren TS'lu hastaların tespiti planlanmıştır. Çalışma öncesi 12.09.2003 tarih ve LUT 03/24 sayılı etik kurul onayı alınmıştır.

Genetik Ünitesi tarafından tanı konularak izlenmekte olan çeşitli yaşlarda 28 Turner sendromlu hasta Y kromozom dizilerinin belirlenmesi amacıyla floresan in situ hibridizasyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Hastaların yaş aralığı 3 yıl 8 ay ile 30 yıl arasında ve ortalama yaş 15 yıl (± 5.30 SD) idi. Çalışmaya katılacak hastalardan floresan in situ hibridizasyon (FISH) metodu için antekubital venden 10-20 ml kan alınarak standart yöntemlerle FISH metodu ve Y tüm kromozom probları (W.C.P: Whole Chromosome Prob) yardımıyla Y kromozom dizileri aranmıştır. FISH analizi öncesinde tüm hastaların kromozom analizleri GTG bantlama yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. GTG bantlama yöntemiyle Y kromozomu olduğu gösterilen hastalar çalışmaya alınmamıştır.

Sitogenetik Analiz (GTG bantlama yöntemi) çalışma grubundaki hastaların kromozom analizi için kullanılan yöntem aşağıda özetlenmiştir: Alınan periferik kan örnekleri sodyum heparinli tüpler ya da 0.5cc sodyum heparinle yıkanmış enjektör içerisine alındı ve ekim yapılıncaya kadar oda sıcaklığında tutuldu. Örnek miktarı 1 yaş üzeri çocuk ve yetişkinler için 3-5 ml idi. Mikroorganizma kontaminasyonunu önlemek için alınan örnekler aynı gün ekildi ve 3 günden fazla oda sıcaklığında beklemiş örnekler ekim için tercih edilmedi.

Kan örnekleri için hazırlanan kültür ortamı ekim işlemi için oda sıcaklığına getirildi. Oda sıcaklığına gelen ortam, steril şartlarda üzerlerine hasta isimleri yazılmış steril kültür tüplerine 10'ar ml konuldu. Daha sonra içlerinde ortam bulunan tüplere periferik kan örnekleri steril yeşil uçlu enjektörler yardımı ile eklendi (26-30 Damla) (Her bir 10 ml 'lik kültür ortamında beyaz kan hücre konsantrasyonu ml'de 2 ile $4X10^6$ hücre olmalıdır). Kan ekleme işleminden sonra ağızları kapatılan tüpler 37°C deki etüve yerleştirildi ve 72 saat etüvde bekletildi. (Lenfosit hücreleri 72. saatte en yoğun metafaz aşamasına ulaşırlar).

Harvesting (Hasat) Çalışması: 72 saat sonra etüvden çıkarılan tüpler hafifçe karıştırıldı ve tüplere oda sıcaklığında 8 damla Colcemid damlatıldı. Tekrar karıştırılan tüpler 37 °C etüve yerleştirildi ve 35 dakika bu etüvde tutuldular. 35 dakika sonra etüvden çıkarılan tüpler 2500 rpm de 10 dakika santrifüj edildiler. Santrifüj işleminden sonra tüplerdeki süpernatan atıldı ve tüplere vortekste 37°C sıcaklığa getirilmiş 10 ml KCl eklendi. Daha sonra tüpler yeniden etüve yerleştirildi. 25 dakika etüvde tutulan tüplerdaha sonra yeniden 10 dakika 2500 rpm de santrifüj edildiler. Tüplerdeki süpernatan atıldı ve çökelti üzerine vortekste 10 ml, -20 °C bekletilmiş fiksatif eklendi. 1 gece 2-8 °C bekletilen tüpler ertesi gün 10 dakika santrifüj edildiler, süpernatan atıldı ve çökelti üzerine 7 ml fiksatif vortekste eklendi. Daha sonra bir kez daha santrifüj işleminden geçen tüplerde süpernatan atıldı ve 5 ml fiksatif vortekste eklendi. Son santrifüj işlemi ile tüpler yayma işlemine hazır hale getirildiler. Son fiksatif ekleme işleminden sonra preparatlara yayılmaya hazır hale gelen tüpler santrifüj edildiler. Süpernatan atıldı ve tüplerin içinde kalan çökelti birkaç damla fiksatif ile vortexlendi. Pipet yardımı ile tüp içerisinden alınan 1-2 damla materyal kuru ve temiz bir lam üzerine damlatma yada püskürtme yöntemiyle yayıldılar (Lamlar tercihen methanol içerisinde bekletilerek) Ortam şartları göz önünde bulundurularak preparatlar kuru ya da nemli bir ortamda kurumaya bırakıldılar.

Kuruyan preparatlar daha sonra 1 gece 60 °C de Pasteur fırınında bekletildiler. Böylece kromozomların ve hücre çekirdeklerinin lama fiksasyonu sağlandı. Bu işlemden sonra lamlar boyama işlemi için hazır hale geldiler.

0,4/10 ml trypsin distile suda eritildi ve 50 ml DB buffer ile karıştırıldı. Hazırlanan karışım bir şale içerisine alındı. 0,2gr/100ml methanol Leishman boyasından 1 birim GurrBufferden 3 birim olacak şekilde karıştırıldı. Hazırlanan boya bantlama işleminde kullanıldı. Eskitme işlemi tamamlanmış preparatlar 13-14 saniye şale içerisindeki trypsinde bekletildi, daha sonra hızlı bir şekilde su ile yıkanan preparatların üzerine 2-3 ml leishman boyası döküldü. 3 dakika boya ile muamele edilen preparatlar daha sonra yeniden sudan geçirildi ve kurumaları sağlandı. Kuruyan preparatlarda bantlamanın kalitesi ışık mikroskobu ile kontrol edildikten sonra preparatlar Xylen dolu bir şaleye konuldu. Xylenden geçirilen preparatlar üzerine birkaç damla Entellan damlatıldı ve preparatlar lamel ile kapatılarak yapıştırıldı. Yapıştırma işleminden sonra preparatlar karyotiplendirme için hazır hale geldiler.

Bu işlem için gereken malzemeler periferik kan kültür ortamı için özetle: RPMI-1640 MEDİUM 100 ml (SİGMA) saklama sıcaklığı 2-8 °C.; Fetal Bovine Serum 20 ml (SIGMA) saklama sıcaklığı –20 °C; Phytohmagglutinin 2 ml (BIOCHROM) saklama sıcaklığı –20 °C; L-Glutamine 2 ml (BIOCHROM) saklama sıcaklığı –20 °C; Gentamicin 0,2 ml (SIGMA) saklama sıcaklığı 2-8°C; 10 ml lik Steril Tüp (Grainier)

Harvesting İşlemleri Kimyasalları: Colcemid 8 damla (IRVINE SCIENTIFIC) saklama sıcaklığı 2-8 °C; Potasyum Klorür 10 ml saklama sıcaklığı oda sıcaklığı; Fiksatif 3 birim metil alkol 1 birim asetik asit(%99,6) (MERCK) saklama sıcaklığı– 20 °C

Bantlama Kimyasalları: Trypsin (BIOCHROM); Leishman Stain 0,2mg/100ml Methanol (SIGMA) saklama sıcaklığı oda sıcaklığı; GurrBuffer 1tb/1000ml distile su (GIBCO) saklama sıcaklığı oda sıcaklığı; DB Buffer 16 gr NaCl+0,4gr KH_2PO_4+4,378g Na_2HPO_4/2000 ml distile su; Xylen (MERCK) saklama sıcaklığı oda sıcaklığı

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi**:** Periferik kandan, kemik iliği, amniyon gibi mayilerden elde edilen kromozomlar üzerinde yapılan FISH çalışması kromozomların özel bazı floresan boyalar ile boyanması ve hibridizasyon işlemine dayanan bir çalışmadır. Kültür ekim işlemleri sonucu elde edilen preparatlarda bir gecelik eskitme işlemi uygulanmaz. Yayma ve kurutma aşamasından sonra preparatlar FISH için hazır hale gelirler.

Uygulama**:** FISH için hazır hale gelmiş preparatlar oda sıcaklığında ışıksız ortamlarda saklandılar. Yayma işleminden sonra bir yada birkaç gün bu şartlarda tutulan preparatlar daha sonra FISH işlemlerine tabi tutuldular. FISH iki günlük bir süreç içerisinde yapıldı. Birinci gün sabahında sıcak su banyosu (benmari) çalıştırılarak benmarideki su sıcaklığının 72-73 °C gelmesi sağlandı. Eskitme solüsyonu bir şale ile 37 °C lik etüve yerleştirildi ve ağzı kapatıldı. Preparat kutusu içine bir miktar nemli gazlı bez yerleştirilerek nemli bir yatak hazırlandı ve bu yatak 37 °C deki etüve yerleştirildi. Öğleden sonra bir şale içerisinde taze olarak hazırlanan denatürasyon solüsyonu bir süre 37 °C lik etüvde bekletildikten sonra 72-73 °C deki benmariye yerleştirildi ve denatürasyon solüsyonunda bu sıcaklığa ulaşması sağlandı. Bu işlemler sırasında FISH yapılacak preparatlar etüvdeki eskitme solüsyonuna yerleştirildiler ve 30 dakika burada tutuldular. Kullanılacak prob –20 °C den çıkarıldı ve eritildi. Kısmen karanlık bir ortamda ışık görmeyecek şekilde yeterli miktarda prob (her hasta için 10 μl) alındı ve bir ependorf tüp içerisine konuldu. Stok prob tekrar –20 °C 'ye kaldırıldı. Ayrılan prob alüminyum folyo ile sarıldı ve denatürasyon işlemi için hazır hale geldi. Eskitme solüsyonundan çıkarılan preparatlar daha önceden şale içinde hazırlanmış %70, %80 ve %95 lik oda sıcaklığındaki alkol serisinden 2 şer dakika geçirildi. Son alkolden geçirme işleminden sonra ependorf tüpüne ayırdığımız probdenatürasyon için benmariye yerleştirildi ve prob 10 dakika bu sıcaklıkta tutuldu. %95'lik alkolden çıkarılan preparatlar kurutuldu ve benmaride 72-73 °C deki denatürasyon solüsyonuna yerleştirildiler. 3 dakika bu sıcaklıkta tutuldular.

Denatürasyon işlemi tamamlanan preparatlar hızlı bir şekilde denatürasyon solüsyonundan çıkarıldı ve sırası ile –20 °C sıcaklıktaki %70, %80, %95'lik alkol serisinden 2 şer dakika geçirildiler. Soğuk alkol serisinden çıkan prepa-

ratlar kurutuldu, bu sırada benmaride 10 dakika tutulan problar çıkarıldı, kısmen ışıksız bir ortamda 10 ar μl prob preparatlara mikropipet yardımıyla damlatıldı. Hızlı bir şekilde preparatların üzeri lamel ile kapatıldı ve lamelin kenarları yapıştırıldı. Yapıştırma işleminden sonra preparatlar daha önceden hazırlanıp etüve yerleştirilmiş olan nemli yatağa yerleştirildi ve yine 37 °C deki etüve kaldırıldı. Preparatlar bir gece etüvde bekletildi. Sabah benmari açıldı ve içine bir şale ile 40-50 ml kadar 0,5 SSC yerleştirildi, benmari ısısının 72-73 °C'ye gelmesi sağlandı. Bu ısıya gelen benmariye etüvden çıkarılan preparatlar üzerlerindeki lameller çıkarılarak yerleştirildi. Daha sonra preparatlar içinde oda sıcaklığında 50 ml 1X PBD çözeltisi bulunan şaleye yerleştirildi ve bir dakika burada tutuldular. Kurutulan preparatlar boyama işlemi için hazır hale geldiler.

Boyama: Preparatlar 0,5 SSC içerisinde benmariye yerleştirildikleri sırada – 20 °C den çıkarılan DAPI boyası ve ANTİFADE oda sıcaklığında bir süre bekletildikten sonra kısmen karanlık bir ortamda 2 birim DAPI 8 birim Antifade her preparat için 10 μl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan boya ependorf tüpü içinde alüminyum folyoya sarılarak ışıkla teması engellendi. 1 X PBD den çıkarılan preparatlar kurutuldu ve üzerlerine hızlı bir şekilde 10 μl DAPI-Antifade karışımı damlatılarak üzerleri bir lamel ile kapatıldı. Analiz için hazır hale gelen preparatlar alüminyum folyo ile sarılarak ışık ile temasları önlendi ve analiz işlemleri için karanlık ortamda saklandılar. Analiz işleminin uzun sürmesi gibi durumlarda diğer preparatlardaki sinyallerin kaybolmasını önlemek için preparatlar –20 °C de saklandılar. Analizi tamamlanmış preparatlarda daha sonra yeniden kullanılmak üzere – 20 °C de karanlık bir ortamda saklandılar.

FISH Kimyasalları**:** Prob 10 μl (ONCOR) saklama sıcaklığı: -20 °C; Floresan Boya DAPI + Antifade 10 μl (ONCOR) saklama sıcaklığı: -20 °C; Eskitme solüsyonu: 50 ml 2XSSC+%0,5 NP-40 (ONCOR+SIGMA) saklama sıcaklığı: oda sıcaklığı; Denatürasyon Solüsyonu: Form amid 25,5ml (ONCOR) + 20XSSC 3,5 ml (ONCOR) + Distile Su 7 ml Taze olarak kullanılır; 1. Gün Yıkama Solüsyonu: %70,80,95 lik Etil Alkol 50 ml (MERCK) saklama sıcaklığı: oda sıcaklığı+-20 °C; 2. Gün Yıkama Solüsyonu: 1 X PBD 50 ml (ONCOR) saklama sıcaklığı : 2-8 °C

Hastalarda Y kromozom dizileri açısından FISH analizi, klasik sitogenetik yöntemlerle elde edilen metafaz kromozom preparatlarında "Total chromosome DNA Probe; Chromosome Y, Red" (CP5624-RW; ONCOR) ,ayrıca Y tüm kromozom probları (W.C.P: Whole Chromosome Prob; COATASOME Total Chromosome Probes) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

Etik Beyan: Bu çalışmada ulusal ve uluslararası etik kurallara uyulmuştur. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 12.09.2003 tarih ve LUT 03/24 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Araştırma esnasında olgulardan ve reşit olmayan olguların velilerinden araştırmaya katılım için bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

İstatistiksel analiz: İstatiksel analizler bilgisayar yardımı ile "SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows version 11.0" kullanılarak yapılmıştır. Sayısal değerler için sonuç ortalama ± standart sapma ve medyan olarak verilirken nominal değerler için % olarak ifade edilmiştir.

BULGULAR

Hacettepe Üniversitesi Genetik Ünitesi'nde izlenmekte olan 28 Turner sendromlu vaka çalışmanın bütününde yer almıştır.

Çalışmaya katılan bireylerin yaş aralığı 3 yıl 8 ay ile 30 yıl arasında değişmekte, ortalama yaş 15 yıl (± 5.30 SD) idi. Hastalık tanımlandığında ise hastaların yaşları 7 ay-26 yıl arasında, ortalama yaş 9.7 yıl (± 5.13 SD) arasında değişmekteydi.

Vakaların tanı aldıkları zaman tespit edilen başlıca somatik anomaliler ve görülme oranları Tablo 1' de verilmiştir.

Çalışmaya katılan 28 Turner sendromlu vakanın karyotipe göre dağılımı Tablo 2'de görülmektedir. Çalışmaya katılan vakaların çoğunluğu (% 71.42) klasik Turner sendromu karyotipi olan saf X monozomisi taşımaktaydı. İzole veya mozaik formlar halindeki diğer yapısal X kromozomu aberasyonları daha az sıklıkla temsil edilmekteydi.

Turner sendromlu 28 vakada FISH metodu ile Y tüm kromozom prob (W.C.P: Whole Chro-

mosome Prob) kullanılarak Y kromozom dizileri aranmış; 28 vakadan bir vakada (%3.5) Y kromozom dizisi tespit edilmiştir.

28 vakanın karyotipi, FISH metodu ile analiz edilen metafaz sayısı, Y kromozom dizisi tespit edilip edilmediği Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Vakaların tanı aldıkları zaman tespit edilen başlıca somatik anomaliler ve görülme oranları

Tanı Bulguları	Sayı	Yüzde
Boy Kısalığı	24	85.71
Saç Çizgisi Düşüklüğü	18	64.28
CubitusValgus	18	64.28
Metakarp Kısalığı	9	32.14
Yele Boyun	9	32.14
Toraks Anomalisi	13	46.42
Artmış Nevüs	5	17.85
Lenfödem	2	7.14

Tablo 2. Vakaların karyotipe göre dağılımı

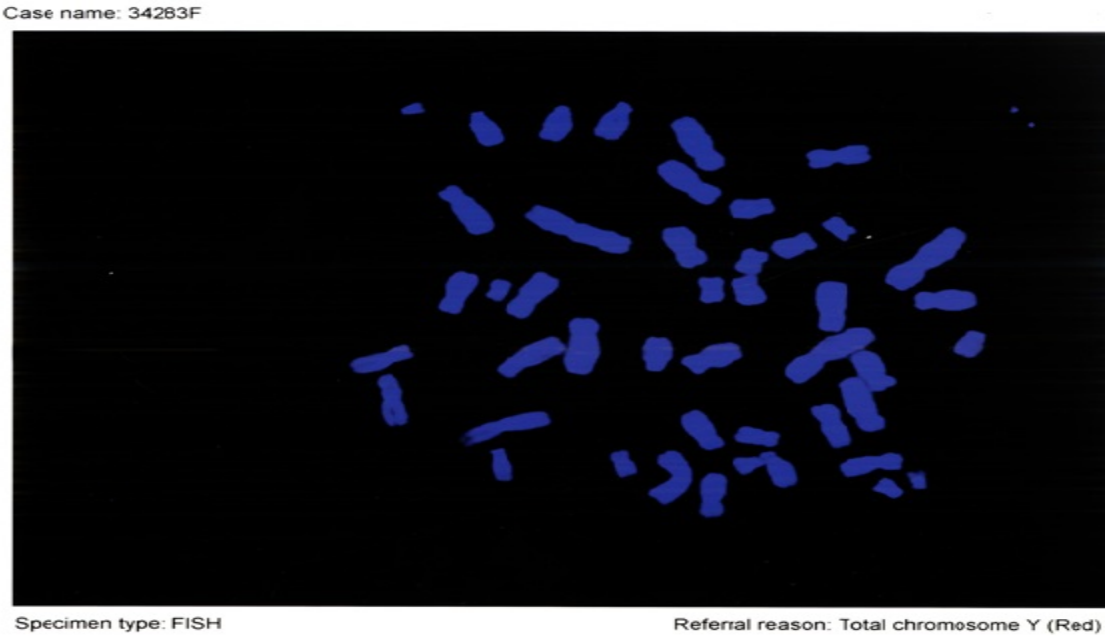
Karyotip	Vaka Sayısı	Yüzde
45 X	20	71.42
46 X iso X	3	10.71
45 X / 46 X iso X	3	10.71
45 X / 46 XX	1	3.6
45 X; 46 X,r(X)	1	3.6

Tablo 3. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) metodu ile vakaların çalışılması

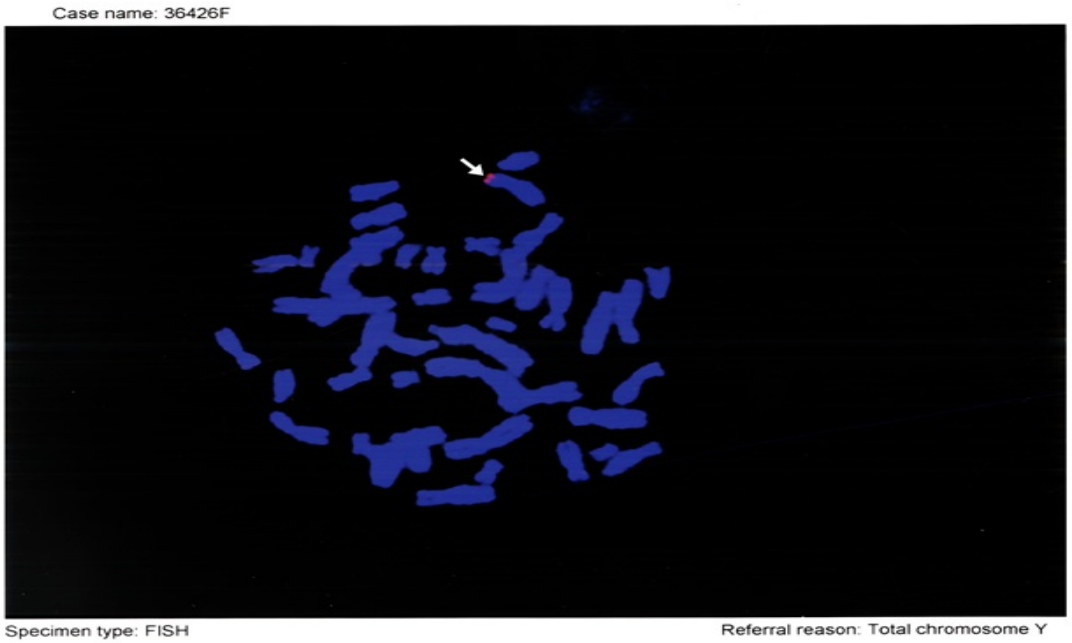
Vaka No	Karyotip	Metafaz Sayısı	FISH-Y Kromatin
1	45 X	25	_
2	45 X	22	_
3	45X/46XisoX	21	_
4	45X/46XisoX	20	_
5	45 X	24	_
6	45 X	25	_
7	45 X	20	_
8	45 X	20	_
9	45X/46XX	24	_
10	45 X	23	_
11	46 X iso X	21	_
12	45 X	21	_
13	45 X	20	_
14	45 X	22	_
15	46 X iso X	23	_
16	45 X	25	Pozitif Y(+)
17	45 X	20	_
18	45 X	20	_
19	45 X	24	_
20	46 X iso X	22	_
21	45 X	21	_
22	45 X/46 X iso X	20	_
23	45 X	23	_
24	45 X	21	_
25	45 X; 46 X,r(X)	25	_
26	45 X	25	_
27	45 X	24	_
28	45 X	21	_

Şekil 1'de Vaka 1, Y kromozom dizisi açısından FISH analizi ile taranması gösterilmiştir. Bu vakada Y kromozom dizisi tespit edilememiştir.

Şekil 2'de ise Vaka 16, Y kromozom dizisi açısından FISH analizi ile taranması gösterilmiştir. Y kromozom dizisi bu vakada tespit edilmiştir.



Şekil 1. Vaka 1, Y kromozom dizisi açısından FISH analizi ile taranması.



Şekil 2. Vaka 16, Y kromozom dizisi açısından FISH analizi ile taranması. Y kromozom dizisi bu vakada tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Farklı karyotipe sahip çok sayıda Turner Sendromlu bireyde değişik sayıda çalışmalar yapılmış ve uygulanan yönteme göre bağlı olarak Y kromozom dizisi tespit etme oranı % 6.9-60 arasında değişmektedir (2,6,12). Gelişim bozukluğu bulunan bir kişide gonadoblastomanın oluşumu, bir Y kromozomunun varlığına bağımlıdır. Herhangi bir gonad disgenesisi ve bir Y kromozomu bulunan vakanın, bir germ hücresi tümörü ve özellikle bir gonadoblastoma geliştirme olasılığı çok yüksektir. Disgenetik gonadları ve Y kromozom dizilerini içeren hücreleri olan bireylerde gonadoblastoma riski artar.

TS'lı hastalarda prognoz karyotip tipine göre değişmektedir. Gonadoblastoma geliştirme riski ve pubertede virilizasyon riski Y kromozom dizileri içeren bireylerde artar (7-9). TS'lı bireylerde eksternal genital yapının virilizasyonu testis dokusunun varlığına işaret edebilir ve tahminen Y kromozom dizilerinin varlığını gösterir. TS hastalarında Y içeren bir hücre dizisi varsa, gonadal tümörler için yüksek risk taşırlar. Bu nedenle TS hastaları, SRY, DYZ1, DYZ3, DYS132, ZFY, TSP gibi Y kromozomu ve Y'ye özgü diziler için taranır. Rutin sitogenetik analiz, gizli Y kromozomu dahil hücre dizilerini her zaman ortaya çıkarmaz. Bu nedenle TS olgularında tanı sürecinin bir parçası olarak, neoplazm risklerini değerlendirmek için daha fazla analiz gerekebilir. Bu karmaşık teknikler, gonadlar ve bukkal hücreler gibi periferik kan ve/veya dokuların polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) ve FISH analizinden oluşur. Gizli Y kromozom mozaisizmi bu yaklaşımla tespit edilebilir.(6,13).

Gonadoblastoma pubertede virilizasyona yol açabilir. Varlığı genellikle Y kromozom dizilerinin varlığı ile birliktedir. Mevcut kılavuzlar, yüksek gonadoblastom riski taşıyan bireyleri saptamak için Y kromozomu materyali testinin yalnızca marker kromozom barındıran ve virilizasyon sergileyen TS'lu hastalarda yapılmasını önermektedir (14,15). Ancak kriptik Y kromozom materyalinin TS'lu hastalarda gonadoblastom için bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir. Bu yüzden yüksek gonadoblastom riski taşıyan bireyleri saptamak için TS'lu tüm hastalarda kriptik Y kromozomu materyali taramasının önerilmesi gerektiği tartışılmaktadır (15).

2020 yılında yapılan bir yayında Y kromozom materyali olan TS'lu (TS +Y) hastaların artmış tümör riski nedeniyle tanıda profilaktik gonadektomi önerilmesi tartışılmıştır (8). Bu çalışmada Y kromozom materyali olan TS'lu hastalarda spontan telarş, spontan menarş oranları, gonadal tümör ve malignensi prevelansı belirlenmeye çalışılmış ve gonadektomi ile ilgili tartışmalara yer verilmiştir. Bu çok merkezli kohortta, TS + Y'li kızların %42'si kendiliğinden puberteye girmiş ve %11'inde gonadal işlevi destekleyen spontan menarş görülmüştür. Tümör riski önceki raporlara benzer bulunmuştur.Bilgilendirilmiş karar vermeyi başarmak için gonadektomi hakkındaki tartışmalar gonadal fonksiyon ve tümör riski potansiyelini içermeli ve multidisipliner ekiplerin tanı anında gonadal yönetimi hakkında güncel kılavuzlar sunmasını önermektedirler. Hastalar ve aileleri kendileri için en önemli olan faktörleri tartmalı ve multidisipliner bir ekibin desteğiyle bilinçli bir karar vermelidir.

2015 yılında yapılan bir yayında 60 TS hastası Y kromozomu ve gonadoblastoma-Y-lokus (GBY) açısından araştırılmış ve 7 hastada GBY lokusu tespit edilerek takibe alınmışlardır. Standart sitogenetik kromozom analizinde Y kromozomu belirtisi olmayan Turner hastalarında GBY lokusunun varlığı, hassas moleküler yöntemler ile ortaya çıkarılabilir (16).Binder ve ark. 53 hastada (17); Coto ve ark. 18 hastada (18); Fernandez ve ark. 25 hastada (19) sırası ile Y kromatin materyalini % 3.3, % 26.6, % 9.1 oranında bulmuşlardır. 2016 yılında literatür taranarak yapılan bir araştırmada TS hastalarda moleküler teknikler kullanarak Y kromozom dizileri ve gonadoblastom prevalansını değerlendirilmiştir. Bu verilere göre, karyotiplerinden bağımsız olarak TS hastalarında Y-kromozom dizilerini saptamak için moleküler analiz endikedir. Bu sekanslar açısından pozitif olan hastalarda gonadoblastom açısından takip gerekliliği belirtilmiştir (20). Patricia Canto ve ark. (21) 107 tane 45,X karyotipine sahip bireyi Y kromozom dizileri açısından araştırmışlar 10 hastada (%9.3) Y kromozom dizileri tespit etmişlerdir. Bu 10 hastadan 6 tanesine gonadektomi uygulanmış bir hastada gonadoblastoma, bir hastada da disgerminom tespit etmişlerdir (%33).

Hacettepe Üniversitesi Genetik Ünitesi tarafından tanı konularak izlenmekte olan çeşitli yaşlarda 28

Turner sendromlu olguya ulaşılmıştır. Yaş aralığı 3 yıl 8 ay ile 30 yıl arasında, ve ortalama yaş 15 yıl (± 5.30 SD) idi. 28 Turner sendromlu vakada FISH metodu ile ve Y tüm kromozom probları (W.C.P: Whole Chromosome Prob) yardımıyla Y kromozom dizileri aranmış; sonuçlar tablo 3' de gösterilmiştir. 28 vakadan bir vakada (%3.5) Y kromozom dizisi tespit edilmiştir (Şekil 1 ve 2).Vaka 16, Y kromozom dizisi açısından FISH analizi ile taranması gösterilmiştir. Y kromozom dizisi bu vakada tespit edilmiştir (Karyotip:45 XO). Vakaya gonadektomi önerilmiş ve rutin kontrollerle hasta takibe alınmıştır (Şekil 2).

TS'lı bireyler Y kromozom mosaizmi açısından floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemini de içeren uygun sitogenetik yöntemle araştırılmalıdır. Eğer karyotip bilinmeyen kökenli bir marker kromozomu gösterirse Y kromozom DNA problarının kullanılacağı moleküler çalışmalar faydalı olabilir. Ayrıca eğer hastada kliteromegali veya doğumda maskulinize genital yapı, pubertede virilizasyon varsa Y kromozom mosaizm olasılığı araştırılmalıdır (10). Bu tür özellikler gösteren TS'lı bireyler Y kromozom dizileri varlığı açısından ileri moleküler sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerle değerlendirilmelidir. Klinik sitogenetiğin en önemli sorunlarından birisi, konvensiyonel bantlama yöntemiyle tespit edilemeyen kromozomal materyalin originini ortaya çıkarmaktır. Bu tip marker kromozomların klasifikasyonu, fenotip-karyotip ilişkisini ortaya çıkarma da ve hastaları, özellikle Y kromozom dizisi taşıyanları artmış gonadal malignansi riski konusunda uyarma açısından önemlidir. FISH metodu, marker kromozomun ortaya çıkarılmasında kolay, güvenilir, efektif bir yöntemdir.

SONUÇ

Y kromozom mosaizmi varsa gonadoblastom veya disgerminom gelişme riski hayatın ikinci on yılında % 10-20'dir. Yaş artıkça risk artar, disgenetik gonadlarda gonadoblastoma gelişme riski %30'a kadar çıkar (7-11). Bu yüzden TS'lı bireylerde Y kromozom dizilerinin varlığının gösterilmesi önemlidir. TS'lı bireylerin Y kromatini açısından taranmasını önerilmektedir (10,14). Bunun tespiti, TS'lı bireye özellikle gonadoblastom geliştirme riski açısından ileri klinik danışma ile bilgilendirmeyi ve yönlendirmeyi sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Wiedemann HR, Glatzl J. Follow-up of Ullrich's original patient with "Ullrich-Turner" syndrome. Am J MedGenet 1991; 41(1): 134-6.
2. Gravholt CH, Viuff MH, Brun S, Stochholm K, Andersen NH. Turner syndrome: mechanisms and management. Nat Rev Endocrinol 2019; 15(10): 601-14.
3. Milbrandt T, Thomas E. Turner syndrome. Pediatr Rev 2013; 34(9): 420-1.
4. Bondy CA. Turner's syndrome and X chromosome-based differences in disease susceptibility. Gend Med 2006; 3(1): 18-30.
5. Bispo AV, Burégio-Frota P, OliveiradosSantos L, Leal GF, Duarte AR, Araújo J, et al. Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case. Reprod Fertil Dev 2014; 26(8): 1176-82.
6. Kurnaz E, Çetinkaya S, Savaş-Erdeve Ş, Aycan Z. Detection of the SRY gene in patients with Turner Syndrome. J Gynecol Obstet Hum Reprod 2019; 48(4): 265-7.
7. Kido T, Lau YF. Roles of the Y chromosome genes in human cancers. Asian J Androl 2015; 17(3): 373-80.
8. Dabrowski E, Johnson EK, Patel V, Hsu Y, Davis S, Goetsch AL, et al. Turner Syndrome with Y Chromosome: Spontaneous Thelarche, Menarche, and Risk of Malignancy. J Pediatr Adolesc Gynecol 2020; 33(1): 10- 4.
9. Zelaya G, LópezMarti JM, Marino R, Garcia de Dávila MT, Gallego MS. Gonadoblastoma in patients with Ullrich-Turner syndrome. Pediatr Dev Pathol 2015; 18(2): 117-21.
10. Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, Dekkers OM, Geffner ME, Klein KO et al. International Turner Syndrome Consensus Group. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International TurnerSyndrome Meeting. Eur J Endocrinol 2017; 177(3): G1-G70.
11. Gravholt CH, Fedder J, Naeraa RW, Müller J. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85(9): 3199-202.

12. Silva-Grecco RL, Trovó-Marqui AB, Sousa TA, Croce LD, Balarin MA. Identification of Y-Chromosome Sequences in Turner Syndrome. Indian J Pediatr 2016; 83(5): 405-9.

13. Cortés-Gutiérrez EI, Herrera-Bartolo R, Dávila-Rodríguez MI, Palacios-Saucedo GC, Vargas-Villarreal J, Romero-Villarreal JB. Molecular detection of cryptic Y-chromosomal material in patients with Turner syndrome. Oncol Rep 2012; 28(4): 1205-10.

14. Bondy CA; Turner Syndrome Study Group. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. J Clin Endocrinol Metab 2007; 92(1): 10-25.

15. Kwon A, Hyun SE, Jung MK, Chae HW, Lee WJ, Kim TH et al. Risk of Gonadoblastoma Development in Patients with Turner Syndrome with Cryptic Y Chromosome Material. Horm Cancer 2017; 8(3): 166-73.

16. Knauer-Fischer S, Besikoglu B, Inta I, Kneppo C, Vogt PH, Bettendorf M. Analyses of Gonadoblastoma Y (GBY)-locusand of Y centromere in Turner syndrome patients. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2015; 123(1): 61-5.

17. Binder G, Koch A, Wajs E, Ranke MB. Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? J Clin Endocrinol Metab 1995; 80(12): 3532-6.

18. Coto E, Toral JF, Menéndez MJ, Hernando I, Plasencia A, Benavides A et al. PCR-based study of the presence of Y-chromosome sequences in patients with Ullrich-Turner syndrome. Am J Med Genet 1995; 57(3): 393-6.

19. Fernández R, Méndez J, Pásaro E. Turner syndrome: a study of chromosomal mosaicism. Hum Genet 1996; 98(1): 29-35.

20. deMarqui AB, da Silva-Grecco RL, Balarin MA. Prevalência de sequências do Y e de gonadoblastoma em síndrome de Turner [Prevalence of Y-chromosome sequences and gonadoblastoma in Turner syndrome]. Rev Paul Pediatr 2016; 34(1): 114-21.

21. Canto P, Kofman-Alfaro S, Jiménez AL, Söderlund D, Barrón C, Reyes E et al. Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45, X karyotype and Y chromosome sequences. Cancer Genet Cytogenet 2004; 150(1): 70-2.

Sorumlu yazar

Abdullah Barış AKCAN (Doç. Dr.)
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD.,
Neonatoloji BD, Aydın, Türkiye
barisakc@hotmail.com
Tel: +90 256 214 20 40
Fax: +90 256 213 60 64
ORCID: 0000-0003-0181-1166

Osman Koray BODUROĞLU (Profesör) ORCID: 0000-0001-6260-1942)