

KORION VİLLUS ÖRNEKLERİNDEN KÜLTÜR HAZIRLIĞINDA  
PLASTİK LAMELLERİN ÜRETİM YÜZEYİ OLARAK KULLANIMI

TERZİOĞLU, O.

**ÖZET:** Korion Villus Örneklerinden (KVÖ) kültür hazırlığında plastik lamellerin kullanılabilirlikleri gözlenmiştir. Bu çalışmada KVÖ kültürünün 0.22mm çaplı Termonox plastik doku kültürü lamelleri üzerinde üretimi denenmiştir.

Kadın-doğum uzmanı tarafından alınan korion villus örnekleri yıkama ortamı içerisinde laboratuvara getirildi. Korion villuslar anneye ait parçalardan ayrıldıktan sonra 5cm. çaplı petri kapları içersine konuldu. Üzerlerine 0.2ml Chang ortamı ilave edildikten sonra 1mm büyüklüğünde parçalar olacak şekilde kesildi. 2ml. Chang ilave edilerek petri kabı kenarına toplandılar. Ters bakışlı mikroskopta doku parçacıklarının yoğunluğu gözlemlendi. Chang ortamı ilave edilerek hücre üremesine müsade edecek konsantrasyona ayarlandı. Daha önceden 3cm çaplı petri kaplarına yerleştirilmiş lameller üzerine 0.3 ml ilave edildi. %97 nem, %5 CO<sub>2</sub>'lik inkübatörde 4 saat bırakıldıktan sonra üzerlerine 1ml ortam eklendi. İnkübasyonun beşinci gününden itibaren, her gün 400 büyütmeli ters bakışlı mikroskopta kültürler incelendi. Yeterli bölünme gözlenen lameller alınıp, 1mm üzerine yapıştirıldı. Son aşamada bunlar boyanarak koromozomlar incelendi.

Plastik lamelde hazırlanan KVÖ kültürleri, 25cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarında hazırlanandan daha hızlı, kolay ve ucuz bulundu. Ülkemiz koşullarında temel kültür şartlarının sağlandığı laboratuvarlarda, kullanıma uygun bir yöntem olduğu sonucuna varıldı.

**ABSTRACT:** Orhan TERZİOĞLU, Dokuz Eylül University Medical Faculty, Medical Biology Dept. Using plastic coverslips as growth surface cultur preparation from chorion villus samples.

It is observed that the plastic coverslips may be used culturing surface in Chorion Villus Samples (CVS) culture. In the work we tried to prepare CVS culture on 22mm Termonox plastic tissue culture coverslips.

Chorion villus samples taken by gynaecologist transferred to the laboratory in the washing medium. The chorion villous was separated from

maternal tissue and placed in a plastic 5cm. diameter Petri dish. About 0.2 ml Chang medium was added and then the villous cutt in very fine fragments of less than 1mm<sup>2</sup> then 1 ml chang medium was added to the macerate and the dish was tilted . The tissue concentration thus obtained was examined under invertescope. By addition of the chang medium, the concentration of the suspension was adjusted to allow the growth of the cells on coverslips. 0.3 ml of tissue macerate was added on each coverslip placed in a 3 cm diameter petri dish. Following incubation for 4 hours at 37°C, %97 humidified, %5 CO2 incubator, 1 ml of medium was added. After 5 days of incubation, the culture was examined dayly with 400x invertescope. The coverslip was removed when sufficient number of divided cells were observed. Finally, the coverslip was attached on the slide and then stained and examined for chromosomes.

We found that the CVS culture method was less expensive and time consuming, more rapid and easier than the 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flask. Finally we found that, the method will be usafull in our country laboratories having basic condition.

Anahtar sözcükler: Korion villus Kromozom.

Key words: Chorion villus, Chromosomes

**GİRİŞ:** Kalıtsal hastalıkların yayılımının önlenmesinde temelde iki yol izlenebilmektedir. Birincisinde hastalar veya taşıyıcılar saptandığında, hastalığın çocuklarda görülme riski kendilerine açıklanarak önlem alınma yoludur. İkinci yöntemde ise risk taşıyan hamilelikte, çocuğa ait hücre, hücre artığı veya sıvıda doğum öncesi gerçekleştirilen çalışmalardır. Burada alınan örneğin fetusa ait olması kritik bir rol oynamaktadır. Doğum öncesinde özellikle ilk üç aylık dönem içerisinde belirli bir kalıtsal hastalığın taşınıp taşınmadığı ortaya konabilmektedir (1-4). Örneği ilerli yaşta hamile kalanlarda mongol çocuk doğurma riskinin arttığı koşullarda, hekimin öngörüsü ile alınan örnekte risk durumu saptanabilmektedir. Bu tip koşullarda annenin hamilelik süresince ruhsal sağlığı da desteklenmiş olmaktadır.

Bu çalışmamızda giderek yaygınlık kazanan korion villus örneğinde kromozom çalışması tekniğinde, daha ucuz, daha kolay ve daha az yer tutar olması dolayısıyla, plastik lamellerde üretim yöntemi başlangıç olarak araştırılmıştır. Teknik deneyim kazanılarak ülkemiz koşullarında yürütülmesi amaçlanmıştır.

**GEREÇLER VE YÖNTEMLER:** İlk üç aylık dönemin 10-12 haftaları arasında ultrason eşliğinde kadın doğum uzmanı 5-15 mg korion villus örneği alarak içerisinde 100 000 IU/ml penicillin ve 100 000 pg/ml streptomisin

içeren (M 199 Gibco BRL, Uxbridge UB8 2Y6, Middlesex, England) içinde laboratuvara en geç bir saate içinde ulaştırıldı. 4 saat 37°C, %97 nem ve %5 CO<sub>2</sub>'de inkübe edildi. Ters bakişli mikroskop altında anneye ait parçalar ayrıldı. Chang A ve B (Hana Biologic, Inc. Alameda, California 94501, U.S.A) taze hazırlanmış ortam ilave edilerek bir kez yıkandı ve 5cm çaplı steril petri kabına alındı. 0.2ml Chang ortamı ilave edilerek sonra, parçalar tek yöne, bastırmadan arđışık olarak steril bistürü ucu ile laminar akım steril ortamında 1mm<sup>2</sup> büyüklüğünde kesildi. Kesme işleminin en geç iki dakika içerisinde bitirilmesi sağlandı. 2 ml komple Chang ortamı ilave edilerek toplandı ve ters mikroskopta parça yoğunluğu gözlemlendi. 3cm<sup>2</sup> çaplı alana 15-20 parça/ 0.3 mg düşecek şekilde ayarlanmak üzere (gerekli ise) Chang ilave edildi. Enjektörle alınan suspansiyondan 0.3 ml daha önce 3 cm çaplı petrilere yerleştirilmiş 22 mm çaplı plastik kültür lamelleri (Termonox) üzerine ilave edildi. Petrilere 4 saat süre ile 37°C de %5 CO<sub>2</sub> %95 nem ortamında inkübe edildiler. Ters mikroskopta parçaların tutunduğu gözlemlendiğinde üzerlerine 1ml Chang ilave edilerek inkübasyona kaldırıldılar. Kültürlerin rengi her gün gözlemlendi. Beşinci günden itibaren sallantısız olarak ters mikroskopta Üreme açısından gözleme alındılar.

Yeterli bölünme gözlenen lameller alınıp lam üzerine yapıştırıldılar. Bundan sonra gimza bantlama yöntemi ile boyanıp incelemeye alındılar (5-6).

**BULGULAR:** Her bir lamel üzerinde en az beş parçanın tutunduğu saptandı. Üreme beşinci günde görüldü. Ancak en fazla mitoz yedinci ve sekizinci gün saptandı. Çalışılan beş örneğin değişik serilerinde, on ilâ yirmi fibroblastta bir mitoz gözlemlendi. İnce iğne görünümünde, nuklear bölgeleri genişçe hücreler sağlıklı bir kültürün olduğunun kanıtı kabul edildi. Bunlar arasında uzantılı hale gelmemiş, nispeten yuvarlak ve koyu olanlarsa mitozu giren hücreler olarak saptandı.

Boyama sonrasında her bir lamelde en az 30 metafaz bantlanmış olarak görüldü. Kromozomlar kısmen toplu olarak bulundu. Bantlama kriteri olarak 1,9,13,18. Kromozomlardaki bantlar ilk basamakta kontrol edildiler. Gözlenen olgular içerisinde bir tane (47,XY, 21+) trizomi 21 saptandı.

**TARTIŞMA VE SONUÇ:** Korion villus örneklerinden hazırlanan kültürde kromozom çalışması, risk faktörlerinin önceden doğru hesaplanması durumunda faydalı bir yöntem olarak gözlemlendi. Buradaki risk sadece fetusun kalıtsal bozukluk taşıması ile ilgili değil, aynı zamanda annenin durumu ile de ilgili olarak dikkate alınmalıdır. Villus örneği alınması bu konuda iyi yetişmiş kadın doğum uzmanını gerektirmektedir. Koşulların iyi olduğu ülkelerde %3-7 düşük (5) tehdidi olabilmektedir. Örneğin lamel üzerinde üretime alınması 25 cm<sup>2</sup> lik standart kapaklı doku

kültürü şişelerine oranla daha düşük maliyetli olmaktadır. Örnek, az bile olsa birden fazla kültür hazırlanabilmektedir, kontaminasyon ihtimaline karşı daha güvenceli çalışılmaktadır. Kültür şişesinden hücrelerin kaldırılması için tripsinlizasyon basamağı kullanılmayıp doğrudan lamellerle çalışılması da zaman yönünden tasarruf sağlanmaktadır. Bütün bu nedenlerle korion villus örneklerinde kromozom çalışmasını laboratuvar şartlarımızda, lamel üzerindeki kültürlerde yaparak, rutin hizmet çalışmasında kullanmayı planlamaktayız.

**TEŞEKKÜR:** Bu çalışmayı gerçekleştirmemiz için olanak sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (İzmir) ile Imperial College Medical School (London) ilgililerine teşekkür ederim.

#### KAYNAKLAR

1. Dunatan, G.R. Screening for fetal and Genetic Abnormality.: Social and Ethical Issues. *J. Med. Genet.* 1988; 25(5): 290-293.
2. Curtis, A. et al. confirmation of prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA typing of fetal tissues. *J. Med. Genet.* 1988; 25(2): 79-82.
3. Brambati, B. et al. First trimester fetal diagnosis of genetic disorders: Clinical evaluation of 250 cases. *J. Med. Genet.* 1985; 22(2): 92-99.
4. Simoni, G. et al. Efficient direct chromosome analysis and enzyme determination from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Hum. Genet* 1983; 63 (2): 349-357.
5. Rooney, D.E. and Czepulkawski, B.H. *Human Cytogenetics. A. Practical Approach.* IRL Press. Oxford. 1986.
6. Rooney, D.E. *Kişisel bilgi iletişimi.* Imperial College, Medical School, St. Mary Hospital Cytogenetics Laboratory. London. 1989.