

Membran rüptürlü gebeliklerde amniyotik sıvı sızıntısından kromozom analizi için fetal hücre tespiti

Emre Zafer¹, John David Buek², Jean Gilles Tchabo³, Bassem Haddad⁴

¹Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Aydın

²Georgetown Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü, Washington, DC, ABD

³Virginia Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü, Arlington, VA, ABD

⁴Georgetown Üniversitesi Lombardi Kanseri Merkezi, Moleküler Sitogenetik Laboratuvarı, Washington, DC, ABD

Özet

Amaç: Bu çalışmada amniyotik membran rüptürlü gebeliklerde floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile prenatal kromozom analizi için vajinal olarak elde edilen amniyotik sıvı örneği kullanımının fizibilitesini değerlendirmektir.

Yöntem: Fetal cinsiyetin erkek olduğunun bilindiği 24 gebe çalışmaya dahil edildi. Tüm gebeler, miadında veya preterm gebelikte yapay (AROM) veya spontan (SROM) rüptüre membrana sahipti. Örnekler spekulum muayenesi sırasında amniyotik sıvı sızıntısından alındı ve lamalar, kromozom X ve Y'ye özel probalar kullanılarak FISH için hazırlandı. Fetal hücre tespiti oranı, XY çekirdekleri yüzdesi olarak hesaplandı. Örnek hacmi, mukus varlığı, kan varlığı, gestasyonel yaş, yapaya karşı spontan membran rüptürü ve örnek işlemeye kadar geçen süre, fetal hücre tespiti oranı bakımından karşılaştırıldı.

Bulgular: On iki AROM (%50) ve 12 SROM (%50) hastası mevcuttu. Bunlardan yalnızca ikisi (%8.3) preterm idi. Örneklerin altısı (%25) kanlıydı ve 16'sı (%66.6) makroskopik olarak müközdü. Teknik hataların (n=4) hariç tutulması sonrasında FISH ile tespit edilebilen erkek fetüslerin oranı %100 idi (%95 GA: %86, %100). Genel olarak fetal hücre tespiti oranı %6.4'tü. AROM sonrasında alınan örnekler, örnekte kan varlığı için düzenleme yapılmasının ardından SROM'a kıyasla daha yüksek sınırdaki fetal hücre oranına sahipti (p=0.07). Ayrıca kanlı örnekler, kanlı olmayan örneklerden anlamlı derecede daha yüksek fetal hücre yüzdesine sahipti (p=0.01).

Sonuç: İnterfaz FISH ile prenatal kromozom analizi için amniyotik sıvı alımı, membran rüptürlü hastalarda elverişli, invaziv olmayan ve makul bir yaklaşımdır ve endike olduğunda, fetüsün erkek olduğu bilinen gebeliklerde preterm erken membran rüptürü üzerinde başarılı olabilir. Dişi fetüslerde daha yüksek özgüllük ile fetal hücreleri ayırt etmeye yönelik moleküler analizin değerini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar sözcükler: Floresan in situ hibridizasyon, membran rüptürü, gebelik, vajinal.

Abstract: Fetal cell detection for chromosome analysis from leaking amniotic fluid in pregnancies with rupture of membranes

Objective: In this study, our goal was to assess the feasibility of using vaginally obtained amniotic fluid samples for prenatal chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) in pregnancies with ruptured amniotic membranes.

Methods: Twenty-four pregnant women with known male fetal gender were retrieved for the study. All had ruptured membranes either artificially (AROM) or spontaneous (SROM) at term or at preterm gestations (PPROM). Samples from leaking amniotic fluid were collected during speculum examinations and slides were prepared for FISH using probes specific for chromosomes X and Y. Fetal cell detection rate was calculated as percentage of XY nuclei. Specimen volume, presence of mucus, presence of blood, gestational age, artificial versus spontaneous rupture of membranes and time elapsed until specimen processing were compared with regard to fetal cell detection rate.

Results: There were 12 patients with AROM (50%) and 12 with SROM (50%). Only two of those were preterm (8.3%). Six of the specimens were bloody (25%) and 16 (66.6%) were macroscopically with mucus. The proportion of male fetuses identifiable by FISH was 100% (95% CI: 86%, 100%) after exclusion of technical failures (n=4). Overall, fetal cell detection rate was 6.4%. Samples collected after AROM had borderline higher percentage of fetal cells compared with SROM after adjusting for presence of blood in the sample (p=0.07). In addition, bloody samples had a significantly higher percentage of fetal cells than those that were not bloody (p=0.01).

Conclusion: Amniotic fluid collection for prenatal chromosome analysis by interphase FISH is a feasible, non-invasive and reasonable approach on rupture of membranes patients and may be accomplished on preterm premature rupture of membranes with known male fetus pregnancies when indicated. Further studies are needed to assess the value of molecular analysis to differentiate fetal cells with higher specificity for female fetuses.

Keywords: Fluorescence in situ hybridization, membrane rupture, vaginal, pregnancy.

Yazışma adresi: Dr. Emre Zafer, Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Aydın. e-posta: dr.emrezafer@gmail.com

Geliş tarihi: 14 Şubat 2018; **Kabul tarihi:** 26 Mart 2018

Bu yazının atf künyesi: Zafer E, Buek JD, Tchabo JG, Haddad B. Fetal cell detection for chromosome analysis from leaking amniotic fluid in pregnancies with rupture of membranes. Perinatal Journal 2018;26(1):32-37.

©2018 Perinatal Tıp Vakfı

Bu yazının çevrimiçi İngilizce sürümü:
www.perinataljournal.com/20180261008
doi:10.2399/prn.18.0261008
Karekod (Quick Response) Code:



deomed®

Giriş

Bir genetik bozukluğun prenatal tanısı, herhangi bir gestasyonel yaşta değerli bir bilgidir. Mevcut birçok teknik, amniyosentez, koryonik villüs biyopsisi veya kordosentez gibi invaziv prosedür gerektirmektedir. Maternal kanda hücresiz fetal DNA testi, invaziv yaklaşım ihtiyacını önemli ölçüde azaltmış olsa da, anöploidiler için iyi bir tarama testi olarak görülmeye devam etmektedir. Bazı diğer yöntemler, intrauterin lavaj (IUL) ve mukus örnekleme ile transservikal hücre örnekleme (TCC) rutin kullanımları yönünden hâlen incelenmektedir.^[1-3] Bu erken çalışmalar, fetal kromozom analizinin sağlam membranlı erken gebeliklerde iyileşmiş trofoblastlar aracılığıyla mümkün olduğunu bildirmektedir. Ancak 2000'li yılların başından itibaren tıp literatüründe bu konuya olan ilgi azalmıştır.^[2]

Amniyotik sıvı, deskuame fetal hücreler içermektedir; fetüsün genetik, metabolik veya immünolojik testi istendiğinde amniyosentez yoluyla bu hücrelere ulaşılabilir. Preterm gebeliklerde membran rüptürüyle birlikte, tıpkı membran rüptürünün doğrulanması için rutin klinik uygulamada kullanılması gibi, amniyotik sıvı vajinal muayene yoluyla kullanılmaya başlamıştır. Bildiğimiz kadarıyla, şimdiye kadar vajinal yoldan elde edilen amniyotik sıvı sızıntısının prenatal tanı için kullanılmasının elverişliliğine yönelik hiçbir veri bulunmamaktadır. Amniyotik sıvıda fetal anöploid analizi, olabildiğince çok metafaz plağı elde etmek için hızlı şekilde bölünen hücrelere ihtiyaç duyan bir teknik olan geleneksel karyotipleme ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle daima steril bir örneğe ihtiyaç duymaktadır, çünkü bakteriyel ve fungal üreme fetal fibroblast kültürünü engelleyebilir. Ancak, floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve kantitatif-floresan polimeraz zincir reaksiyonu (QF-PCR) gibi moleküler teknikler ile kısa sürede çok sayıda hücre/molekül analiz ederken steril örnek ve kültür ihtiyacı ortadan kaldırılabilir. Bu nedenle çalışmamızda, FISH ile fetal kromozom analizi için amniyotik sıvı sızıntısı örnekleri kullanmanın fizibilitesini test etmeyi amaçladık. Ana amacımız, amniyotik membran rüptürlü hastalarda FISH ile prenatal kromozom analizi için vajinal olarak elde edilen amniyotik sıvı örneği kullanımının fizibilitesini değerlendirmektir. İkincil hedefimiz ise, fetal hücre tespiti oranını, örnek/hasta ile ilgili değişkenleri ve bunların fetal hücre tespiti oranı üzerindeki etkilerini gözlemlemektir.

Yöntem

Hasta popülasyonu

Bu çalışma, ABD'de Washington DC'deki Georgetown Üniversitesi Hastanesi ile Virginia Arlington'daki Virginia Hastane Merkezi'nde gerçekleştirilen iki merkezli gözlem çalışmasıydı. Çalışma, Georgetown Üniversitesi Hastane Etik Kurulu tarafından onaylandı (IRB 2008-43) ve her katılımcıdan yazılı onamlar alındı. Bu merkezlerin doğum kliniklerine rüptüre membran şikayetiyle gelen gebeler çalışmaya uygunlukları yönünden değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilme kriterleri, erkek fetal cinsiyet (ultrason veya amniyosentez/koryonik villüs örnekleme), miyada spontan membran rüptürü (>37 hafta; SROM), viyabilite sonrasındaki herhangi bir gestasyonel yaşta [(26+0)–(36+6)] preterm erken membran rüptürü (PPROM) veya miyada yapay (artifisyel) membran rüptürü (AROM) (>37 hafta) olarak belirlendi. Çalışmada hiçbir yapay membran rüptürü gerçekleştirilmedi; tamamı obstetrik endikasyondur. Tüm fetal cinsiyetler, daha sonra neonatal cinsiyetlerin postpartum incelemesi ile doğrulandı. Sadece aktif servikal tahliyesi ve sıvı birikmesi ile belirlenen aşkar membran rüptürlü olgular çalışmaya dahil edildi. Çalışma dışı bırakma kriterleri ise çoğul gebelik, dişi fetal cinsiyet, aktif vajinal kanama, yakın zamanda cinsel ilişki (son 7 gün), 24 haftadan önce erken membran rüptürü, 18 yaş altı maternal yaş ve plasental abrupsiyon, koryoamniyosentez ve güven verici olmayan fetal kalp hızı gibi hemen doğum gerektiren herhangi bir maternal/fetal durum idi.

Örnek alma

Örnekler, PPROM veya SROM'a yönelik tanılayıcı spekulasyon değerlendirme sırasında veya (AROM olgularında) membranlar operatör tarafından rüptüre edildikten hemen sonra alındı. Tüm membran rüptürü tanıları, birikmenin pozitif incelemesi, nitrazin testi ve mikroskop altında *ferning* paterni ile doğrulandı. Üç bulgunun tümüne sahip olan hastalarda rüptüre amniyotik membranlar olduğu düşünüldü. Spekulumdaki amniyotik sıvı birikmesini aspire etmek amacıyla iğnesiz steril şırıngalar kullanıldı. Örnekler hemen, fosfat tamponlu tuzlu çözelti (PBS) içeren bir tüpe aktarıldı. Örnek hacmi, mukus varlığı, kan varlığı, gestasyonel yaş (miyada karşı preterm) ve örnek işlemeye kadar geçen süre, fetal hücre tespiti oranı bakımından karşılaştırıldı. Tüm örnekler, alınmalarından itibaren ilk 5 gün içinde işlendi.

Floresan in situ hibridizasyon

Lam preparatları

Lam preparatları ve X ve Y kromozomlarına yönelik FISH analizi, daha önce literatürde açıklanan protokollere göre gerçekleştirildi.^[4] Kısaca, örnekler PBS eklendi ve 10 dakika boyunca 1000 RPM'de santrifüjlendi. Süpernatantlar ayrıldı ve çökelti hücreler yavaşça karıştırıldı. Örnek karışımları, temiz ve kuru lam üzerine damlatıldı. Her lama hipotonik solüsyon (50 mM potasyum klorür) eklendi ve 20 dakika boyunca 370°C'de inkübe edildi. Fazlalık hipotonik solüsyon döküldü ve bu adım tekrarlandı. Ardından lamlar 5 dakika boyunca 60°C'de kurutuldu. Etanol serileriyle dehidrasyon adımları sonrasında lamlar, FISH prosedürüne kadar -200°C'de saklandı.

Lamlarda ön işlem

Lamlar, 10 dakika boyunca %50 asetik asit ve %50 metanol fiksatif solüsyonda ve ardından 2.5 dakika boyunca 5 µl pepsin stoku (%10) / HCl solüsyonunda işlem gördü. Bir diğer etanol dehidrasyon serisi sonrasında formamit denatürasyon adımı tamamlandı.

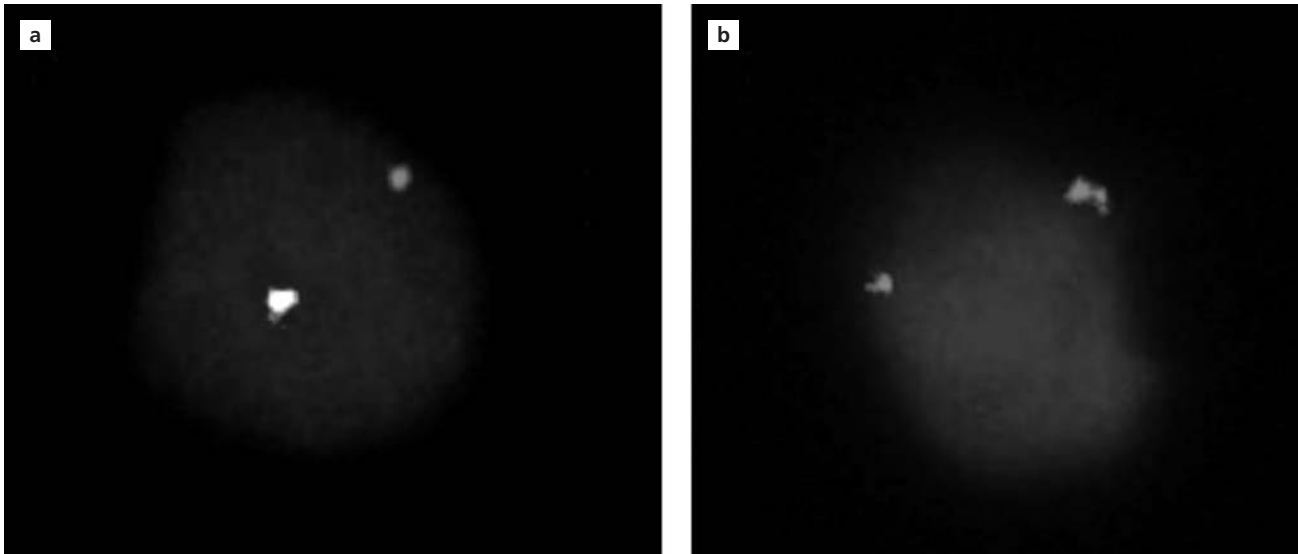
Prob ön işlemleri ve tespit adımları

Her bir lam için, her cinsiyet kromozomu (X ve Y) başına 1 µl sentromerik prob içeren toplam 20 µl hibridizasyon karışımı hazırlandı ve 10 dakika boyunca 800°C'de

denatüre edildi. Denatürasyon sonrasında prob karışımları, nemlendirme haznesinde gece boyunca 370°C'de inkübe edildi. Ertesi gün lamlar, sertlik yıkaması için formamit ile işlem gördü ve tuz-sodyum sitrat (SSC) tamponuyla durulandı. Her lama 100 µl engelleme solüsyonu eklendi ve üzerlerine lamel kapatıldı. 370°C'de 30 dakikalık inkübasyon sonrasında lameller kaldırıldı. Her lam için, 1 µl avidin-FITC + 1 µl fare anti-digoksinini içeren 100 µl tespit solüsyonu eklendi ve lamlar 45 dakika boyunca 370°C'de inkübe edildi.

Floresan mikroskopisi

X ve Y kromozomlarına yönelik sentromerik problemler ile hibridize edilen lamlar, karanlık oda ortamında floresan mikroskop altında analiz edildi. Her lam (hasta) için, 200 interfaz çekirdek sayıldı. Bir interfaz çekirdekteki bir yeşil ve bir kırmızı sinyallik patern, erkek cinsiyet olarak kaydedildi (XY, **Şekil 1a**). İki kırmızı sinyale sahip çekirdekler, dişi çekirdek olarak sayıldı (XX, **Şekil 1b**). Tüm örneklerde maternal hücre kontaminasyonu (XX) beklendiğinden, erkek ve dişi sinyal paternleri lam başına sayıldı ve yüzdeler "fetal hücre tespiti oranı" olarak kaydedildi. Örneğin XX [194]/XY[6] sinyale sahip sayılan 200 çekirdekli bir hastanın lamı, o örnekte %3 fetal hücrenin bulunduğu şeklinde kaydedildi. Sinyal artefaktlarının olası etkisini en aza indirmek amacıyla, bir hücrenin erkek fetal hücre içerdiği sonucuna varmak için hasta başına XY sinyal paterni içeren en az üç interfaz çekirdeği



Şekil 1. Bir kırmızı ve bir yeşil sinyal taşıyan bir XY çekirdeğinin FISH görüntüsü (a) ve iki kırmızı sinyal taşıyan diğerk XX çekirdeği (b).

arandı. FISH problemlerinin sinyal özellikleri, önce erkek ve dişi kontrol kan örnekleri ile test edildi.

İstatistik

FISH ile erkek olarak tanımlanabilen erkek çocukların oranı, tam olarak %95 güven aralığı ile tahmin edildi. Ayrıca, bu oranın %80'den büyük olup olmadığını test etmek için, kesin tek taraflı binom gerçekleştirildi. Fetal hücrelerin ortalama yüzdesi, t-testi ve ANOVA kullanılarak her bir örnek özelliği (membran rüptürü türü, doğum türü, hacim, mukus varlığı, kan varlığı ve işleme kadar geçen süre) bakımından karşılaştırıldı. Fetal hücrelerin yüzdesiyle ilişkili özellikleri belirlemek için lineer regresyon kullanıldı.

Bulgular

Çalışmaya, gebelik haftaları 240/7 ile 410/7 arasında değişen toplam 28 gebe dahil edildi. Teknik sorunlar nedeniyle dört hastada FISH analizi gerçekleştirilemedi. Bu nedenle, son analize 24 hasta dahil edildi. On iki (%50) hastada örnekler yapay membran rüptürü sonrasında alındı; geri kalan gebelerde (%50) spontan membran rüptürü vardı. Sadece iki (%8.3) hasta preterm idi; bir hastada 31. gebelik haftasında PPRM vardı ve diğer hasta, 30. gebelik haftasında PPRM nedeniyle preterm doğum yaptı. Örneklerin 6 tanesi (%25) kanlı, 16'sı (%66.6) makroskopik olarak müközdü.

Teknik hataların (n=4) hariç tutulması sonrasında FISH ile tespit edilebilen erkek çocukların oranı %100 bulundu (%95 GA: %86, %100) (p=0.005). Fetal hücrelerin oranı hesaplandığında (XY sinyalleri), genel fetal hücre tespiti oranı %6.4 saptandı (%2.7–21.8). **Tablo 1**'de, her bir örnek özelliği için (gestasyonel yaş, örnek hacmi, mukus varlığı, kan varlığı, yapaya karşı spontan membran rüptürü, örnek işlemeye kadar geçen süre) fetal hücrelerin ortalama yüzdesi gösterilmektedir. Kanlı örnekler, kanlı olmayan örneklerden anlamlı derecede daha yüksek fetal hücre yüzdesine sahipti (p=0.01). Ayrıca AROM sonrasında alınan örnekler, SROM'a kıyasla sınıra yakın şekilde anlamlı derecede daha yüksek fetal hücre oranına sahipti (p=0.07). Kaydedilen özellikler bakımından fetal hücre yüzdesinde hiçbir anlamlı farklılık gözlemlenmedi. Son lineer regresyon modeli, sadece membran rüptürü türünü ve kanı içermiştir. Düzeltilen ortalama değerler ve %95 güven aralıkları **Tablo 2**'de gösterilmektedir. Membran rüptürü türüne göre düzeltildikten sonra kanlı örnekler, kan içermeyen örneklere

Tablo 1. Fetal hücrelerin örnek özelliklerine göre ortalama değerleri ve %95 güven aralıkları (n=24).

	n	Ortalama	%95 GA	p değeri
Membran rüptürü türü				0.07
AROM	12	8.3	(4.3, 12)	
SROM	12	4.6	(3.0, 6.3)	
Doğum türü		0.60		
Miad	22	6.7	(4.3, 9.0)	
Preterm	2	4.6	(-6.6, 16)	
Hacim				0.16
<2 ml	10	6.2	(2.4, 9.9)	
2–4 ml	10	5.1	(4.0, 6.2)	
>4 ml	4	11	(-3.1, 25)	
Mukus				0.93
Yok	10	6.4	(3.0, 9.7)	
Var	14	6.6	(3.4, 9.8)	
Kan				0.01
Yok	13	4.2	(3.4, 4.9)	
Var	11	9.2	(4.9, 14)	
İşleme kadar geçen süre				0.36
>24 saat	17	4.7	(3.2, 6.1)	
<24 saat	7	7.2	(4.2, 10)	

AROM: Yapay membran rüptürü; SROM: Spontan membran rüptürü

kıyasla anlamlı derecede daha yüksek ortalama fetal hücre yüzdesine sahipti (p=0.01).

Tartışma

Çalışmamızın sonuçları, FISH ile fetal kromozom analizinin membran rüptürlü gebeliklerde amniyotik sıvı sızıntısı üzerinde prenatal sitogenetik tanı için elverişli bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ayrıca, amniyotik sıvı sızıntısında fetal hücreye yönelik genel yüzden FISH analizi için yeterli olduğunu gözlemledik.

Fetal genetik bozuklukları tespit etmek için prenatal tanı, gebelik esnasında herhangi bir zamanda bilinçli karar vermek amacıyla istenir. Tatmin edici olmayan du-

Tablo 2. Lineer regresyon modelinden hesaplanan düzeltilmiş ortalama değerler ve %95 güven aralıkları (n=24).

	Ortalama	%95 GA	p değeri
Membran rüptürü türü			0.07
AROM	8.3	(5.8, 11)	
SROM	5.0	(2.5, 7.6)	
Kan			0.01
Yok	4.3	(1.8, 6.7)	
Var	9.1	(6.4, 12)	

AROM: Yapay membran rüptürü; SROM: Spontan membran rüptürü

yarlılık/özgüllük seviyeleri tarayıcı testlerin kendine özgü dezavantajı iken, prosedürle ilişkili komplikasyonlar invaziv tanılayıcı testlerde bir problem teşkil edebilir. Maternal kandaki hüresiz fetal DNA testindeki son gelişmelerin iyi olduğu düşünülmektedir fakat test şu an için pahalı bir tarama testidir.^[5] Birinci trimester boyunca servikal kanalda trofoblast varlığının gözlemlenmesi, alternatif prenatal tanılayıcı örnekleme yöntemleri için araştırmacılara ilham vermiştir.^[6-8] Bunun sonucunda çalışmalar, iki TCC örnekleme tekniği ile elde edilen trofoblastlarda FISH ve moleküler analizin fizibilitesini ortaya koymuştur.^[6] IUL tekniğinde araştırmacılar, steril bir esnek kateteri (Pipelle) interval servikal os noktasına kadar ilerleterek, az miktarda steril tuz solüsyonuyla durularak ve tekrar geri alarak, genetik analiz için trofoblastları elde etmeyi başarabilmiştir. IUL sadece birinci trimesterde mümkündür ve gebeliğin planlı olarak sonlandırılması öncesinde hastalar üzerinde test edilmiştir.^[9,10] Bir diğer teknik ise, (genellikle sito fırça ile) servikal mukus alımı ve prenatal genetik testi için ters mikroskop altında trofoblastların tespit edilmesidir.^[3,11-13] IUL ile gerçekleştirilen TCC'nin 7-12. gebelik haftasındaki gebelerde mukus örnekleme ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, IUL ile erkek embriyolarda fetal hücre tespiti oranı %2-90 (ortalama %40) ve doğru cinsiyet tespiti %90.2 rapor edilmiştir. Ayrıca, servikal mukus örnekleme ile erkek embriyolarda fetal hücre tespiti oranı %1-4 ve doğru cinsiyet tespiti %56 bulunmuştur.^[14] Bir başka çalışmada immünohistokimya kullanılmış ve bu çalışma sonucunda, HLA-G boyaması ile birinci trimester intrauterin gebelikte 37 servikal mukus örneğinin 35'inde trofoblastların kolayca tespit edilebildiği görülmüştür.^[15]

Çalışmamızda, hedef popülasyon membran rüptürlü gebe hastalardı. Tıbbi literatürde (PubMed veritabanı) benzer bir çalışma ile karşılaşmadığımızdan, sonuçlarımızı diğerleri ile kıyaslamak mümkün değildi. IUL ile TCC veya mukus örnekleme yöntemleri, ilk trimesterde sağlam membranlı hastalar üzerinde prenatal fetal hücre tespiti ve tanı fizibilitesini test etmiştir.

Çalışmamızın ilgi çekici bir bulgusu da, kanlı örneklerin, kanlı olmayan örneklerden anlamlı derecede daha yüksek fetal hücre yüzdesine sahip olmasıydı (p=0.01). Vajinal olarak elde edilen amniyotik sıvı sızıntısı, fetal olarak türetilmiş hücrelerin yanı sıra lökosit, makrofaj, skuamöz ve kolumnar epitel gibi maternal olarak türetilmiş hücreler içerebilir. Bu bulgunun ardındaki sebep bi-

linmemektedir; ancak kanın kökeninin maternalden çok fetal olduğu düşünülebilir. IUL'nin birinci trimesterde kullanıldığı bir çalışmada, kan kontaminasyonunun trofoblast varlığı ile korele olduğu bildirilmiştir.^[10] Amniyotik sıvı sızıntısı örneklerinde trofoblast varlığı oranını test etmemiş olsak da, yüzdelerin göz ardı edilebilir bir seviyede olduğu sonucuna varmaktayız çünkü trofoblast bulaşması, desidua bazalis ve parietalis füzyonu sonrasında birinci trimesterin sonunda durmaktadır.^[9] Bu nedenle, (TCC ve koryonik villüs örnekleme olduğu gibi) trofoblastların yerine doğrudan fetal hücrelerden faydalanmak, sınırlı plasental mozaizm riskini en aza indirmektedir.

Çalışmamızın sonuçları, AROM sonrasında alınan örneklerin, örnekte kan varlığı için düzenleme yapılmasının ardından SROM'a kıyasla daha yüksek sınırdaki fetal hücre oranına sahip olduğunu göstermiştir (p=0.07). Bu bulgu savunulabilir, çünkü membran rüptürünün olması yakındır ve örnek alımı AROM'da yenidir. Ancak sonuçlar, fetal hücrelerin SROM'lu hastalarda %100 tespit edilebilir olduğuna ve bu nedenle yüksek yüzdeli fetal hücre ihtiyacını ortadan kaldırdığına da işaret etmektedir.

Çalışmamızda, örnek alımı ve FISH analizi adımları aynı operatör (sorumlu yazar) tarafından gerçekleştirilmiştir ve bu da yanlışlık kaynağı olabilir. Ancak bu bir fizibilite çalışmasıdır ve birbiriyle karşılaştırmada körlemeyi gerektirecek hiçbir hasta grubu bulunmamaktadır. Sperm kontaminasyonu olasılığı, üzerinde düşünülecek bir başka soru işaretidir ve sperm hücresi varlığını ekarte etmek amacıyla mikroskop altında servikal mukus örneklerini değerlendiren daha önceki çalışmalarda da dile getirilmiştir.^[10] Bunun yerine hastalarımıza, son vajinal cinsel birliktelik zamanını sorduk ve yakın zamanda bir cinsel birleşme yaşayanları çalışmaya dahil etmedik. Ayrıca, bir sperm hücresinin haploid çekirdeği sadece bir sinyal verecektir ve tek çekirdekte iki sinyale (kırmızı ve yeşil) sahip fetal hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Ayrıca tüm fetüslerin mozaik olmayan XY erkekleri olduğunu ve cinsiyet kromozom anöploidilerine sahip olmadıklarını varsaydık.

Mevcut yaklaşımda, tek başına FISH analizi veya geleneksel karyotipleme, maternal hücre kontaminasyonu nedeniyle dışı fetal cinsiyetli hastalara uygulanamaz. Ancak, QF-PCR testlerinde gerçekleştirildiğinde, kısa tekrar dizisi (STR) analizi ile bu engelin üstesinden kolayca gelinebilir.^[16] Maternal hücre kontaminas-

yonu bir dezavantaj olarak görülmemelidir; amacımız, maternal hücreyle kontamine olduğu zaten beklenen amniyotik sıvı örneklerde fetal hücre (kromozom) tespiti oranlarını değerlendirmektir. Teknik hataların (n=4) hariç tutulması sonrasında, %6.4'lük (%2.7–21.8) genel hücre tespiti oranıyla, tüm bu örneklerde fetal hücreleri (XY taşıyıcı interfaz çekirdekler) gözlemleyebildik. Bu maternal hücre kontaminasyonu miktarı ise makul görülmektedir. Ancak her SROM hastası için tespit edilen fetal hücreler, moleküler sitogenetik (FISH) teknik ve dişi fetal cinsiyetli hastalarda kullanılacak PCR tekniği için yeterli miktardan daha fazladır.

Belirtildiği üzere çalışmamızda, vajinal olarak elde edilen amniyotik sıvı sızıntısı örneklerini fetal hücre örnekleme için kullandık. Bu yaklaşımın invaziv olmayan yapısı bir avantajdır. Açık bir şekilde, sadece membran rüptürlü hastalara uygulanabilir. PPRM yönetimi, devam eden gebeliğin veya hızlı doğumun risklerinin ve avantajlarının değerlendirilmesini gerektirmektedir. Oligo-anhidramniyoslu PPRM veya PPRM ve hasta tercihi gibi, prenatal tanının endike olduğu ve invaziv tekniklerin elverişli olmadığı belirli klinik ortamlarda, bu yöntem değerli olabilir.

Sonuç

İnterfaz FISH ile prenatal kromozom analizi için amniyotik sıvı alımı, membran rüptürlü hastalarda elverişli ve makul bir yaklaşımdır ve fetüsün erkek olduğu bilinen gebeliklerde preterm erken membran rüptüründe başarılı olabilir. Dişi fetüs taşıyan hastalarda dişi fetal hücrelerin doğru şekilde ayırt edilmesi amacıyla moleküler analiz kullanımını test etmek için ek çalışmalar yapılmalıdır.

Çıkar Çakışması: Çıkar çakışması bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

1. Chang SD, Lin SL, Chu KK, Hsi BL. Minimally-invasive early prenatal diagnosis using fluorescence in situ hybridization on samples from uterine lavage. *Prenat Diagn* 1997;17:1019–25.
2. Adinolfi M, Sherlock J. Fetal cells in transcervical samples at an early stage of gestation. *J Hum Genet* 2001;46:99–104.
3. Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Bucciantini S, Barciulli F, Scarselli G. Fetal cells in cervical mucus in the first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 2003;23:168–71.
4. Klinger K, Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Am J Hum Genet* 1992;51:55–65.
5. Grace MR, Hardisty E, Dotters-Katz SK, Vora NL, Kuller JA. Cell-free DNA screening: complexities and challenges of clinical implementation. *Obstet Gynecol Surv* 2016;71:477–87.
6. Adinolfi M, Sherlock J, Tutschek B, Halder A, Delhanty J, Rodeck C. Detection of fetal cells in transcervical samples and prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities. *Prenat Diagn* 1995;15:943–9.
7. Adinolfi M, Sherlock J. First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation. *Hum Reprod Update* 1997;3:383–92.
8. Bussani C, Cioni R, Scarselli B, Barciulli F, Bucciantini S, Simi P, et al. Strategies for the isolation and detection of fetal cells in transcervical samples. *Prenat Diagn* 2002;22:1098–101.
9. Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Barciulli F, Bucciantini S, Simi P, et al. Detection of fetal cells in intrauterine lavage samples collected in the first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn* 2002;22:52–5.
10. Cioni R, Bussani C, Conti E, Buzzoni C, Bucciantini S, Mattei A, et al. The presence of trophoblastic cells in intrauterine lavage samples: lack of correlation with maternal and obstetric characteristics. *Prenat Diagn* 2008;28:1064–7.
11. Katz-Jaffe MG, Mantzaris D, Cram DS. DNA identification of fetal cells isolated from cervical mucus: potential for early non-invasive prenatal diagnosis. *BJOG* 2005;112:595–600.
12. Sifakis S, Ghatpande S, Seppo A, Kilpatrick MW, Tafas T, Tsiouras P, et al. Prenatal diagnosis of trisomy 21 through detection of trophoblasts in cervical smears. *Early Hum Dev* 2010;86:311–3.
13. Fang CN, Kan YY, Hsiao CC. Detection of fetal cells from transcervical mucus plug before first-trimester termination of pregnancy by cytokeratin-7 immunohistochemistry. *J Obstet Gynaecol Res* 2005;31:500–7.
14. Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Bucciantini S, Marchionni M, Scarselli G. Comparison of two techniques for transcervical cell sampling performed in the same study population. *Prenat Diagn* 2005;25:198–202.
15. Imudia AN, Suzuki Y, Kilburn BA, Yelian FD, Diamond MP, Romero R, et al. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study. *Hum Reprod* 2009;24:2086–92.
16. Bussani C, Scarselli B, Cioni R, Bucciantini S, Scarselli G. Use of the quantitative fluorescent-PCR assay in the study of fetal DNA from micromanipulated transcervical samples. *Mol Diagn* 2004;8:259–63.