

TEK GEN HASTALIKLARINDA PREİMPLANTASYON GENETİK TANI

**Semra Kahraman, Hüseyin Karadayı, Güvenç Karlıkaya, Semra Sertyel,
Necati Fındıklı, Yaman Sağlam**

İstanbul Memorial Hastanesi, Yardımcı Üreme Teknikleri ve Üreme Genetiği Merkezi, İstanbul, Türkiye
skahraman@superonline.com.tr

Son yıllarda genetik bilimindeki gelişmeler sayesinde birçok genetik kökenli hastalık implantasyon öncesi dönemde embriyo üzerinde tanımlanabilmektedir. Embriyoların rahim içerisine transferinden önce gerçekleştirilen genetik analiz sonrası anomali taşımadığı tespit edilen embriyoların anne adayına transferine imkan tanıyarak sağlıklı gebelik elde edilmesini amaçlayan bu yöntemle gebelik öncesi genetik tanı (Preimplantasyon Genetik Tanı-PGT) adı verilmektedir.

PGT tahliye ile sonlandırılan gebeliklerde yaşanabilecek psikolojik, fizyolojik ve ardışık tahliye işlemleri sonucunda oluşabilen infertilite problemlerinin önlenmesi yönünde prenatal tanının erken bir formasyonu olarak kabul edilmektedir. Özellikle çiftlerin belirli bir genetik hastalık yönünden taşıyıcı bulunması durumunda PGT yöntemi ile hastalık taşıyan embriyoların elimine edilmesi ve sağlıklı embriyoların transferi ile sağlıklı çocuk sahibi olmak mümkündür.

Günümüzde PGT uygulamaları iki farklı yaklaşım olarak gerçekleştirilmektedir: Bunlardan ilki özellikle ilerlemiş maternal yaş, tekrarlayan erken dönem gebelik kayıpları, tekrarlayan implantasyon başarısızlıkları, şiddetli erkek infertilitesi ve translokasyon taşıyıcısı olduğu tespit edilmiş çiftlerde, artan anöploidi oranları nedeni ile uygulanan PGT-AT (Aneuploidy Detection-Anöploidi Tanımlaması) yöntemidir. Bu yöntemde oosit veya erken gelişim dönemi embriyolarından kutup cisimcikleri veya blastomer(ler) alınmak sureti ile, belirli kromozomlar floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi ile sayısal ve yapısal olarak incelenerek, kromozomal yönden normal bulunan embriyolar transfer işleminde kullanılmaktadır.

PGT-TGH (Single Gene Disorders-Tek Gen Hastalıkları) uygulamalarında ise, çiftlerden biri veya her ikisi genetik geçişli hastalık taşıyıcısı (otozomal dominant, otozomal resesif veya X'e bağlı) olarak tespit edildiği durumlarda, mutasyon veya kromozom anomalileri embriyolarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve dizi analizi gibi moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmekte ve çiftlerin sağlıklı çocuk sahibi olmaları sağlanmaktadır.

Tek Gen Hastalıklarında PGT uygulamaları ile günümüze kadar gerçekleştirilen yaklaşık 1500 sıklısta 300'den fazla sağlıklı gebelik elde edilmiştir. Gün geçtikçe artan sayıda gen dizilerinin ve genetik geçişli hastalıkların tanımlanması, tek gen hastalıklarında PGT uygulamaları endikasyonlarını arttırmaktadır. Tek Gen Hastalıklarında PGT endikasyonlarından bir kısmı Tablo 1'de verilmiştir. PGT sadece tek gen hastalıkları için değil, ailesel kansere yatkınlık (ailesel adenomatoz polipozis koli, meme kanseri, retinoblastoma, Li- Fraumeni Sendromu vb.), HLA genotiplemesi ve diğer farklı (Konjenital sağırılık, Akondroplazi, Otizm) endikasyonlar içinde uygulanmaktadır.

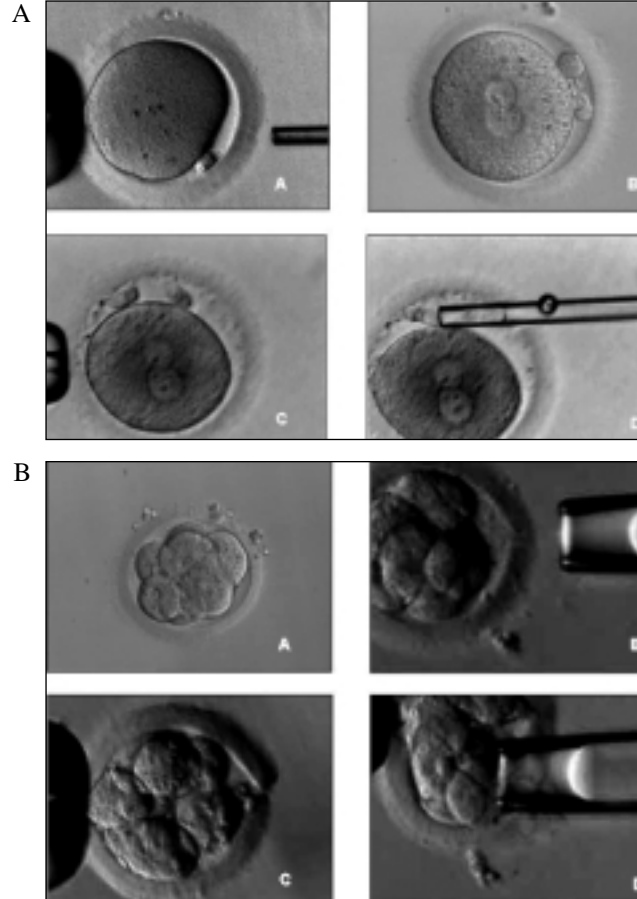
Tablo 1. PGT-SGD uygulanabilen genetik geçişli hastalıklardan bazıları

β-Talasemi	HLA Genotiplemesi
Orak Hücre Anemisi	Kistik Fibrozis
Spinal Musküler Distrofi	Miyotonik Distrofi
Fankoni Anemisi	Duchenne Musküler Distrofi
Hemofili A ve B	Epidermolizis Bullosa
Multiple Epiphyseal Displazia	Fenilketonüri (PKU)
Akondroplazi	X-linked Hidrosefali
Retinitis Pigmentoza	Gaucher Hastalığı
Retinoblastoma	Frajlil X
Adrenolökodistrofi	Huntington Hastalığı
Hurler Sendromu	Hunter Sendromu
OCT	Tay-Sach's Hastalığı
Alport Hastalığı	Alfa-1-antitripsin Eksikliği
Hipofosfatazya	Lesch Nyhan Sendromu
3-hydroxyacyl-coa Dehidrogenaz	Marfan Hastalığı
Machado-Joseph Hastalığı	Glikojen Depo Hastalığı
Koroideremi	X-linked otizm
Incontinentia Pigmenti	RhD sensitizasyonu
Adrenolökodistrofi	Osteogenezis imperfekta
CDG1C	Deri frajilitesi
Konjenital adrenal hiperplazi	Tüberoskleroz
Stickler Sendromu	Nörofibromatoz
Crouzon Sendromu	ZFX/ZFY
X-linked, agammaglobulinemi (XLA)	Spinal ve Bulbar musküler atrofi
FG Sendromu taşıyıcılığı	DAZ delesyonu
Oro-facial-digital syndrome type 1	Ataxia Telanjiektazi
Crouzon Sendromu	Familiyal Amyloidotic Polinöropati
Genodermatozis (PKP1)	Charcot-Marie-Tooth Tip IA
Sitrullinemi	Holoprozensefali (SSH gen)
Kelley-Seegmil Sendromu	X-linked epilepsi (paternal side)
Pelizaeus Merzbacher	Junctional epidermolizis bülloza
Hiperinsülinemik hipoglisemi PHH1	Fabry's Hastalığı
Bloom hastalığı	Anemi taşıyıcıları
FAP-Gardner	Santral kor hastalığı
CF+XL mental retardasyon (X2)	

PGT ile kombine HLA doku tiplmesi uygulamaları, PGT yöntemini sadece tanı amaçlı veya etkilenmiş gebelik eldesini önleyici bir yöntem olmaktan çıkarmış, ayrıca tedavi amacıyla da kullanılabilen bir yöntem haline getirmiştir. Temel amaç, bir yandan etkilenmemiş embriyo seçimi ile sağlıklı bir bebeğin dünyaya getirilmesi, diğer yandan da HLA uyumu nedeni ile allogenetik hematopoetik kök hücre transplantasyonu uygulaması ile hasta kardeş için tümüyle tedavi imkanı sağlanmasıdır. Sonuçlar özellikle b-Talasemi olgularında bu yöntemle elde edilen kök hücrelerin nakli sonrası eğer hasta çocukta hepatomegali ve portal fibrozis gelişmemiş ise %90 oranında başarı sağlanabileceğini göstermektedir.

Gerek anöploidi tanımlaması, gerekse tek gen hastalıklarında tanımlama için gerekli olan kutup cisimcikleri ve blastomerler biyopsi işlemi ile elde edilmektedir. PGT uygulamalarının başarısı ve sağlıklı gebelik eldesi tanının doğruluğu kadar biyopsi işlemi sonrası embriyoların etkilenmeden iyi gelişimine de bağlıdır. Bu nedenle biyopsi işlemlerinin embriyonik gelişimin en az düzeyde etkilenebileceği, aynı zamanda da tanı için

gerekli sürenin sağlanacağı dönemde uygulanması gerekir. Kutup cisimcikleri biyopsisi oosit toplama işleminden hemen sonra (1. kutup cisimciği biyopsisi) fertilizasyon değerlendirmesinden sonra (2. kutup cisimciği biyopsisi), embriyo biyopsi işlemi ise embriyo gelişiminin 3. günü 7-8 blastomer aşamasında uygulanmaktadır. Daha az sayıda blastomer içeren embriyolarda uygulanan biyopsi işleminin embriyo gelişimini büyük oranda aksattığı veya durdurduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Figür 1.de kutup cisimcikleri biyopsisi ve embriyo biyopsi işlemi görülmektedir.



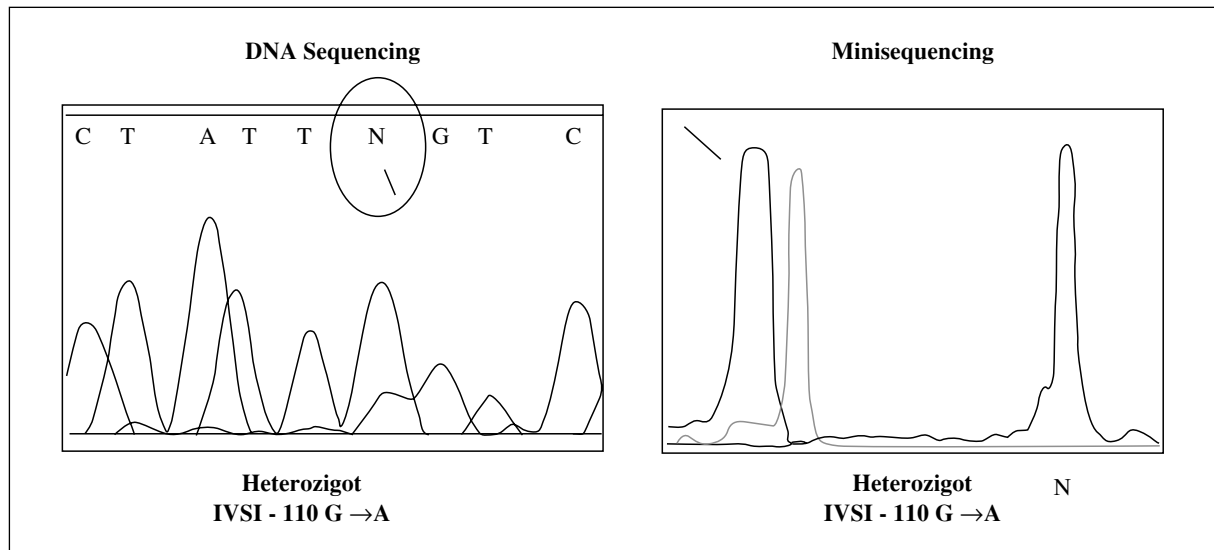
Figür 1. a) A. 1.nci kutup cisimciği biyopsisi; B. Fertilize oosit; C,D. 1.nci ve 2.nci kutup cisimcikleri biyopsisi b) A. Embriyo biyopsi işlemi için uygun klivaj dönemi embriyo; B,C,D. Embriyo biyopsi işlemi.

Biyopsi işlemi sonrası elde edilen kutup cisimcikleri veya blastomer(ler) steril koşullarda tüpler içerisine alınarak litik solüsyonlar yardımı ile çekirdek içerisindeki blastomere ait DNA yapısının işleme uygun hale getirilmesi sağlanır. Tek Gen Hastalıklarında PGT uygulaması gerçekleştirmek için multipleks, nested ve floresan PCR teknikleri DNA analizi için kullanılan ara yöntemlerdendir. Adı geçen PCR teknikleri ile çoğaltılan ilgili gen bölgesi, restriksiyon enzim analizi, dizi analizi veya minisequencing yöntemleri kullanılarak hastalık taşıyıp taşımadığı yönünden değerlendirilir. Figür 2’de dizi analizi ve minisequencing yöntemleri kullanılarak tespit edilen b-globin genine ait IVS-I-110G>A mutasyonu görülmektedir. Hastalık taşımadığı tespit edilen embriyolar bulundukları gelişim günü ve hasta özellikleri dikkate alınarak embriyo transferi işleminde kullanılmaktadır.

Tek gen hastalıklarında PGT uygulamaları son derece iyi organize edilmesi ve önceden detaylı planlanması gereken işlemlerdir. Bu nedenle klinik, in vitro fertilizasyon ve genetik laboratuvarı birimlerinin uygulamalar için özel tasarlanmış teknik altyapı ve bilgi birikimine sahip olması ve konusunda deneyimli personel tarafından idare edilmesi gerekmektedir. Uygulamalar sırasında uyulması gereken temel kurallar ve

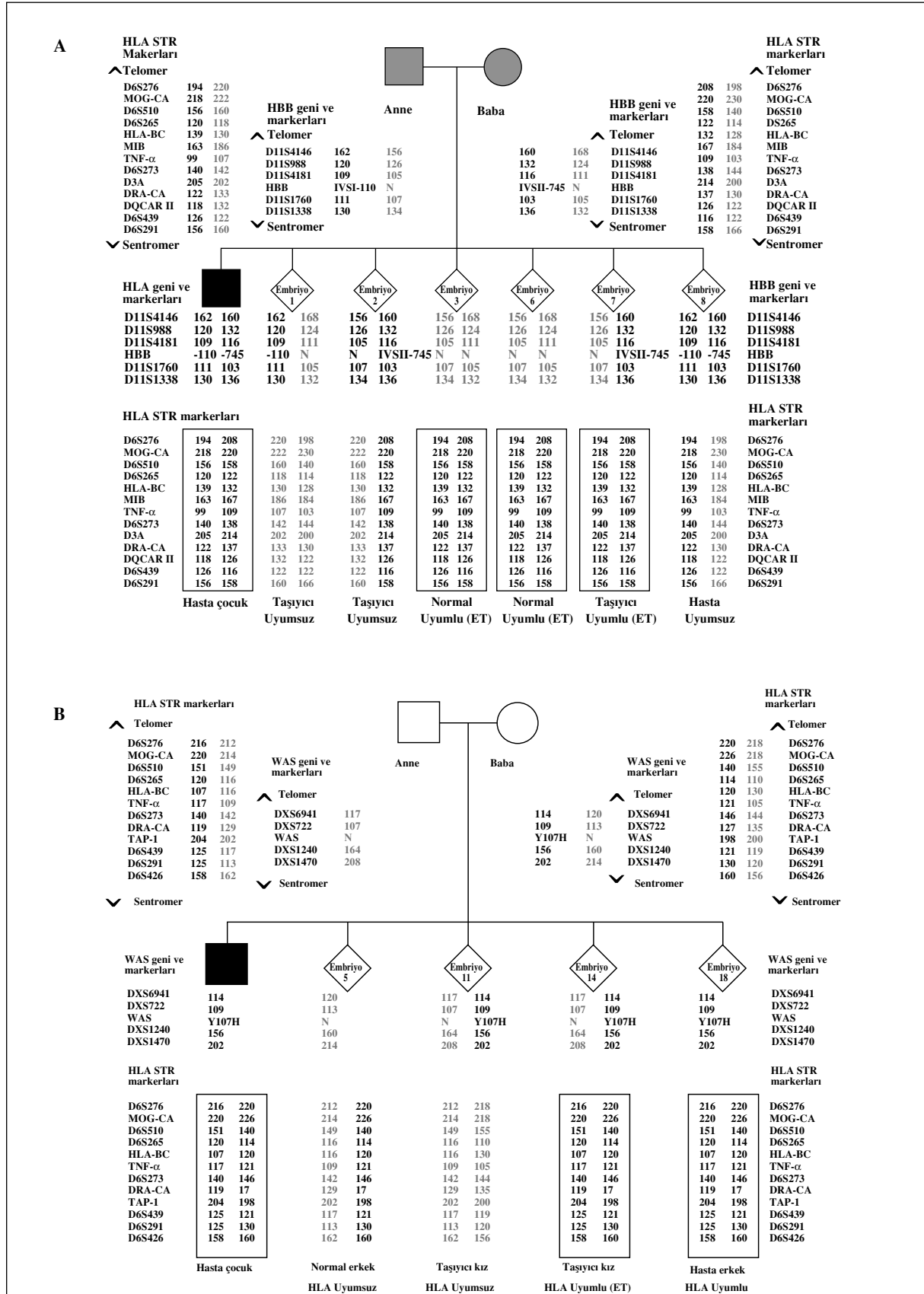
parametreler PGDIS (Uluslararası Preimplantasyon Genetik Tanı Derneği) ve ESHRE Preimplantasyon Genetik Tanı Konsorsiyumu tarafından detaylı olarak belirtilmektedir. Teknik altyapı eksikliği veya işlem sırasında oluşan suboptimal koşullar uygulamanın ve gerçekleştirildiği YÜT siklusunun başarı şansını etkilemektedir. Tek gen hastalıklarında gerçekleştirilen PGT uygulamaları sırasında en sık gözlenen problemler kontaminasyon, ADO (Alelik Drop-Out-alellerden sadece birinin amplifikasyonu) problemleridir. Laboratuvar içerisinde ve çalışma alanlarında özel kıyafetler ve önlemler sayesinde kontaminasyon ihtimalini en aza indirmek mümkündür. Günümüzde gerek ADO gerekse kontaminasyonu önlemek için teknik içerisinde gerçekleştirilecek değişiklikler ve ilave metodlar da uygulanmakta ve bu problemlerden doğabilecek negatif etkiler en aza indirilmektedir.

Tek gen hastalıklarında PGT uygulamaları ile kombine gerçekleştirilen HLA doku tiplemesi işlemleri ise daha detaylı işlemler ve ileri düzeyde deneyim ve teknolojik imkanlar gerektirmektedir. İşlem öncesi çiftler ve hasta çocuk üzerinde mutasyon taşıdığı belirlenen aleller ve HLA gen bölgesinde yer alan polimorfik STR işaretçileri kullanılarak öncül genetik testler yapılır. Testlerin sonucunda hem incelenen genetik hastalık hem de doku uygunluğu yönünden en güvenli şartlar ve uygun haplotipler belirlenerek çift YÜT siklusuna alınır. Siklus sırasında elde edilen embriyolar, tek gen hastalıklarında gerçekleştirilen PGT uygulamalarında olduğu gibi incelenerek sağlıklı ve hastalık taşıyan kardeş ile aynı doku uyumuna sahip embriyolar embriyo transferi işlemi için belirlenir. Figür 3'te merkezimizde tedaviye alınan iki farklı olguda (Wiscott Aldrich Sendromu ve b-talasemi) HLA doku tiplemesi için kullanılan STR işaretçileri, işlem için uygun olan ve olmayan haplotip örnekleri ile uygun haplotipler kullanılarak gerçekleştirilen embriyo ve hasta çocuk HLA doku uyumu analizi sonucu görülmektedir.



Figür 2. Konvansiyonel DNA dizi analizi ve minisequencing teknikleri ile (IVS-I-110 G>A) β -talasemi mutasyonunun taranması

Bugüne kadar dünya genelinde uygulanan 150'den fazla PGT ile kombine doku tiplemesi uygulaması ve işlem sonrası elde edilen sağlıklı gebelikler yöntemin güvenli bir tedavi metodu olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Tablo 2). Bununla birlikte hasta veya siklus ile ilişkili parametrelere bağlı olarak başarı şansı değişebilmektedir. Teorik olarak incelenen embriyonun otozomal resesif bir hastalık yönünden sağlıklı ve HLA genotipi yönünden uyumlu olma olasılığı %18'dir. Bu oran ile bağlantılı olarak merkezimizde gerçekleştirilen uygulamalar klinik ve siklus seyri yönünden incelendiğinde, elde edilen başarılı sonuçların büyük ölçüde over rezervi ve maternal yaş ile bağlantılı olduğu, artan yaş ve düşük over rezervi olgularında başarı şansında azalma gözlenebilmektedir. İstanbul Memorial Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) ve Üreme Genetiği Merkezinde gerçekleştirilen Tek Gen Hastalıklarında PGT uygulamalarına ait sonuçlar Tablo 3'te görülmektedir.



Figür 3. a) Wiscott Aldrich Sendromu taşıyıcısı olguda HLA doku tiplemesi için kullanılan STR işaretçileri. b) β -talasemi taşıyıcısı olguda HLA doku tiplemesi için kullanılan STR işaretçileri

Günümüzdeki imkanlar doğrultusunda DNA baz analizi yapılabilen tüm genetik hastalıkları embriyoda tanımlamak mümkündür. Ayrıca teknik açıdan bakıldığında, bugün PGT işlemlerinde kullanılan dizi analizi cihazları ile gerçekleştirilen ve sınırlı sayıda DNA bölgesinin incelenmesine izin veren protokollerin yerlerini yakın gelecekte DNA mikroçip teknolojilerine bırakması ile, yüzlerce hastalık veya anomalinin biyopsi işlemi sonrası elde edilen tek bir blastomerde eşzamanlı olarak tanımlanabilmesi mümkün görünmektedir.

Ülkemizde her yıl talasemi, anemi gibi kalıtsal hastalık taşıyan yüzlerce çocuk dünyaya gelmektedir. Bu olgularda günümüz koşullarında sağlanabilen nihai çözüm kordon kanı veya kemik iliği nakli işlemleridir. Her ne kadar tedavide başarı şansı yüksek olsa da, nakil için gereken hasta çocuk ile doku uyumu gösteren materyal son derece kısıtlıdır. Tek gen hastalıklarında PGT işlemleri ile kombine gerçekleştirilen HLA doku tipleme uygulamaları sayesinde, çiftler hem sağlıklı bir çocuk sahibi olabilmekte hemde yeni doğan çocuk hasta kardeşi için tedavi umudu olabilmektedir. Bu uygulamalar ile yakın zamana kadar tanı amaçlı kullanılan PGT teknikleri önemli ve potansiyel bir tedavi aracı haline de gelmiştir.

Tablo 2. Mart 2004 tarihi itibarıyla Dünya genelinde günümüze kadar gerçekleştirilen PGT-TGH ve kombine HLA uygulamaları

Endikasyon	Siklus	Gebelik
Fankoni Anemisi	39	5
Talasemi	61	7
X'e bağlı hiper IgM	5	2
Wiscott-Aldrich Sendromu	2	1
X'e bağlı hipohidrotik ektodermal displazi	1	1
X'e bağlı adrenolökotrofi	1	0
Diamond-Blackfan anemisi	4	2
Aplastik anemi	2	0
Lösemi	32	7
TOPLAM	147	25

Tablo 3. İstanbul Memorial Hastanesi YÜT ve Üreme Genetiği Merkezinde Mayıs 2003- Ocak 2005 tarihleri arasında gerçekleştirilen PGT-TGH ve kombine HLA doku tipleme uygulamaları.

a. Endikasyonlara göre dağılım		b) Genel siklus verileri	
Endikasyon	Siklus	Siklus sayısı	74
β talasemi	7	Kadın yaşı	31.4
Orak Hücre Anemisi	5	MII oosit sayısı	12.4
San Filippo Hastalığı	2	Fertilizasyon oranı (%)	86
Mukopolisakaridoz	1	ET yapılan siklus sayısı	49
G6PD	1	ET iptal edilen siklus sayısı	25
FMF	2	Transfer edilen embriyo sayısı	116
NF1	1	Gebelik oranı (%)	32.7
Spinal Musküler Atrofi	4		(16/49)
Kistik Fibroz	2		
β talasemi+HLA	43		
Wiskott-Aldrich + HLA	1		
Blackfan-Diamond + HLA	2		
ALL (HLA Tipleme)	3		
TOPLAM	74		

Referanslar

1. Fiorentino F, Biricik A, Karadayi H, Berkil H, Karlikaya G, Sertyel S, Podini D, Baldi M, Magli MC, Gianaroli L, Kahraman S.. 2004 Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching. *Molecular Human Reproduction* 9, 399-410.
2. Kahraman S, Karlikaya G, Sertyel S, Karadayi H, Findikli N. 2004 Clinical aspects of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders combined with HLA typing. *Reproductive Biomedicine Online* 9,529-532
3. Kuliev A and Verlinsky Y. 2004a Thirteen years' experience of preimplantation diagnosis: report of the Fifth International Symposium on Preimplantation Genetics. *Reproductive BioMedicine Online* 8, 229-235.
4. Kuliev A and Verlinsky Y. 2004b. Preimplantation HLA typing and stem cell transplantation: report of International Meeting, Cyprus 27-28 March 2004. *Reproductive BioMedicine Online* 9, 205-209
5. Rechitsky S, Kuliev A, Tur-Kaspa I, Morris R, Verlinsky Y. 2004 Preimplantation genetic diagnosis with HLA Matching. *Reproductive BioMedicine Online* 9, 210-221.
6. Van de Velde H, Georgiou I, De Rycke M, Schots R, Sermon K, Lissens W, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I.. 2004 Novel universal approach for preimplantation genetic diagnosis of b-thalassaemia in combination with HLA matching of embryos. *Human Reproduction* 19, 700-708.
7. Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Farraretti AP, Kuliev A 2004 Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis. *Fertility and Sterility* 82,302-303
8. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. 2001 Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA* 285, 3130-3133.