

TEK GEN HASTALIKLARI NEDENIYLE PREİMLANTASYON GENETİK TANI UYGULANAN HASTALARIMIZIN RETROSPEKTİF ANALİZİ: ÜÇ YILLIK DENEYİMİMİZ

A Retrospective Analysis of Patients who Underwent Preimplantation Genetic Diagnosis Due to Single Gene Defects: Our Three Years Experience

Turgut AYDIN¹, Burak YÜCEL²

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, kliniğimizde farklı tek gen hastalıkları nedeniyle preimplantasyon genetik tanı (PGT) uygulanan hastalarımızın sonuçlarını değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Tüp bebek merkezimize başvuran 16 farklı tek gen hastalığı için 29 siklusta PGT uygulanan 22 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastaların sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi.

Bulgular: Ebeveynlerden birinde bilenen tek gen hastalığı bulunan 12 hastada, hastalığın yeni nesle aktarılmasını önlemek amacıyla, 16 siklusta toplam 114 embriyo üzerinde yapılan PGT sonrası 24 sağlıklı, 25 taşıyıcı, 65 hasta embriyo tespit edildi. Embriyo transfer yapılan 14 siklusta 10 gebelik elde edilmiş 9'u canlı doğumla sonlanmıştır. Hastalarımızdan 10 çiftte PGT beraberinde insan lökosit antijeni (HLA) doku tiplemesi yapılmıştır. 13 siklusta elde edilen toplam 130 embriyonun; 22'si sağlıklı 18'i taşıyıcı, 90 embriyo ise tek gen hastalığına sahip idi. Embriyo transferi yapılan 10 siklusta 5 gebelik elde edilmiş, 4'ü canlı doğumla sonlanmıştır.

Sonuç: İn-vitro fertilizasyon ile birlikte uygulanan PGT, genetik hastalığın yeni nesillere aktarımını riskine sahip çiftlere, sağlıklı gebelik için avantaj sunar. Tek gen hastalığı nedeniyle gebeliği sonlandırma riski ortadan kalkar. Bu avantajları yanında diğer in-vitro fertilizasyon endikasyonları ile en az benzer gebelik ve canlı doğum oranları sağlaması nedeniyle önerilmesi gereken bir seçenektir. Bazı özel durumlarda ise hayat kurtarıcı bir yöntemdir.

Anahtar Sözcükler: *Preimplantasyon Genetik Tanı; Tek Gen Hastalıkları; HLA Antijeni*

ABSTRACT

Aim: In this study, we aimed to determine the treatment results of patients who underwent preimplantation genetic diagnosis (PGD) due to single gene defects.

Material and Methods: The results of 29 cycles in 22 patients with 16 different single gene disorders were included into the analysis. The results of patients were evaluated retrospectively.

Findings: PGD without HLA tissue typing was performed to prevent the transmission of the single gene disorder to their offspring in twelve couples in whom a single gene defect was detected in a single partner. One hundred and fourteen embryos were obtained in 16 cycles. Twenty-four of them were healthy, 25 of them were genetic mutation carriers and 65 had genetic mutation. 22 embryos were transferred in 14 cycles and 10 pregnancies with 9 live births occurred. Additional HLA tissue typing was performed in 10 couples who underwent PGD. One hundred and thirty embryos were obtained in 13 cycles. Twenty-two of them were healthy and 18 were genetic mutation carriers and 90 embryos had SGD. Embryo transfer could be performed in 10 cycles and 5 pregnancies with 4 live births were obtained.

Result: PGD with in vitro fertilization allows the possibility of a healthy pregnancy for couples under the risk of transmitting single gene disorders to their offspring and it eliminates the risk of termination of pregnancy. With these advantages, it should be offered to couples with single gene disorders since it is shown to have similar pregnancy and live birth rates compared with other indications of in vitro fertilization. PGD is a life-saving procedure in some special cases.

Keywords: *Preimplantation Genetic Diagnosis; Single Gene Defects; HLA Antigens*

¹Tüp Bebek Ünitesi, Acıbadem Hastanesi, Kayseri

²Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul

Turgut Aydın, Uzm. Dr.
Burak Yücel, Uzm. Dr.

İletişim:

Uzm. Dr. Burak Yücel
Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve
Araştırma Hastanesi Turgut Özal Cd.
No:1, 34303 Altınşehir, Küçükçekmece,
İstanbul
Tel: 05326009554
e-mail:
drburakyucel@gmail.com

Geliş tarihi/Received: 21.09.2017
Kabul tarihi/Accepted: 26.10.2017

Bozok Tıp Derg 2017;7(4):42-5
Bozok Med J 2017;7(4):42-5

GİRİŞ

Preimplantasyon genetik tanı (PGT) ebeveynlerden birinde veya her ikisinde bilinen genetik anormalliğin embriyo yada oosite taşınmış mı diye taranmasıdır (1). Bu işlem yardımcı üreme teknikleri ile birlikte kullanıldığında, elde edilen embriyoların transfer öncesi genetik açıdan incelenerek, sadece sağlıklı olan embriyoların transfer edilmesini sağlar (2).

Tek gen hastalıkları (TGH), bir gende meydana gelen mutasyon sonucu ortaya çıkan tedavisi hemen hemen imkânsız kalıtsal hastalıklar grubudur. PGT ile kromozomların sayısal ve yapısal bozuklukları tespit edilebildiği gibi, genotipi tespit edilmiş; β -talasemi, orak hücre anemisi, kistik fibrozis, hemofili gibi bir çok tek gen hastalığının gebelik öncesi tanısında da kullanılır (3).

Tek gen hastalıkları için yapılan PGT bir tanı yöntemi olmasının yanı sıra, insan lökosit antijeni (HLA, Human Leukocyte Antigen) uyumlu embriyo seçimi ile beraber yapıldığında bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Sağlıklı embriyoların transferi sonucu oluşan gebeliklerden doğan sağlıklı kardeşlerden yapılan HLA uyumlu kemik iliği transplantasyonu (KİT), hayat kurtarıcı bir tedavidir (4).

Bu çalışmada, kliniğimizde farklı TGH endikasyonları ve TGH olmayıp KİT amaçlı HLA uyumlu donör kardeş için PGT uygulanan hastalarımızın sonuçları retrospektif olarak değerlendirildi.

MATERYAL VE METOD

Ocak 2013 - Ocak 2016 arasında Tüp Bebek Ünitimize başvuran ve 16 farklı TGH için 29 farklı siklusta PGT uygulanan 22 hasta çalışmaya dahil edildi.

Overyan stimülasyon için adetın üçüncü gününden başlanarak belirlenen gonadotropin dozları uygulandı. Foliküler gelişim düzenli aralıklarla bakılan vajinal ultrason ve serum östrojen seviyeleri ile izlendi. En az üç folikülün çapı 17 mm'ye ulaştığında ovulasyon insan koryonik gonadotropini ile tetiklendi. Bu uygulamayı takiben 35-36 saat sonra ultrason eşliğinde oosit

toplama işlemi gerçekleştirildi. Oosit toplama işlemi sonrası, olgun oositlere mikroenjeksiyon işlemi uygulandı ve 16-18 saat sonra oositlerin döllenmesi kontrol edildi. Döllenme sonrası embriyolar 24-28 saatler arsanda ve 64-67 saatleri arasında gelişim için değerlendirildi. Elde edilen embriyolardan 6-10 hücreli 3. gün embriyolarına PGT uygulandı.

Embriyolarda genetik çalışmaya geçilmeden önce ailedeki mutasyonların ve HLA haplotiplerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Aileler bu amaçla merkezimize başvurdıklarında anne, baba ve hasta çocuktan kan örneği alınmakta ve alınan bu kandan da her bir bireye ait DNA izole edilmektedir. PGT blastomer biyopsisi adı verilen embriyonik gelişimin 3. gününde 6-8 hücreli hala gelmiş embriyonun blastomer adı verilen hücrelerinden bir veya iki tanesinin alınması ile uygulandı. Zeno pellicudanın delinmesinde lazer kullanıldı. Fiksasyonu (metanol /asetik asit 3:1) yapıldı. Embriyodan biyopsi yapıldıktan sonra, biyopsi yapılan hücre eritme (lysis) solüsyonun içine atılarak genomik DNA'nın serbest kalması sağlandı. Genetik analiz için sekanslama (dizileme) yöntemi kullanıldı. Bu yolla hastalığın bulunduğu DNA bölgesine özgü primeler kullanılarak milyonlarca kopya elde edilmesi sağlandı. Daha sonra dizileme yöntemi ile hastalığa neden olan mutasyonlara bakılarak sağlıklı, taşıyıcı ve hasta embriyo ayrımı gerçekleştirildi. KİT için verici sağlıklı kardeş amacıyla yapılan PGT ayrıca HLA uyumluluğu taranmıştır, aile bireylerinin HLA haplotipleri HLA gen kompleksi üzerindeki STR markerları (DNA molekülü üzerindeki tekrar bölgeleri) kullanılarak yapıldı.

SONUÇLAR

PGT uygulanan hastalar 2 farklı grupta incelendi:
1-Hem TGH'na bağlı mutasyon hem de KİT için sağlıklı verici kardeş amaçlı HLA uyumu için
2-2- HLA uyumu aranmaksızın TGH'na bağlı mutasyon aranması için Hastaların ortalama yaşları 33 idi. Toplamda 244 embriyoya PGT işlemi uygulandı. TGH mutasyonu bulunmayan veya taşıyıcı olup HLA uyumu da bulunan ya da HLA uyumuna bakılmaksızın TGH mutasyonu bulunmayan, 36 embriyonun transferi

Tablo 1: PGT Uygulanan hastaların retrospektif Analizi

	Hem TGH'na bağlı mutasyon hemde HLA uyumu aranan hastalar	HLA uyumu aranmaksızın TGH'na bağlı mutasyon aranan hastalar
Endikasyonlar	Hemofagositik Lenfositosis, Fankoni A, Beta talasemi, Lökosit adezyon defekti, Multiple herediter ekzositoz	İnfantil tip polikistik böbrek, Gangliosidoz Beta talasemi, Epidermolizis Bulloza, Krabbe hast., Mukopolisakkaridoz tip 3B Cockayne send., Mukopolisakkaridoz Tit 6, Mukopolisakkaridoz Tip 5A, mECKEL-gRUBER send, Kistik Fibrozis
Hasta sayısı	10	12
Siklus sayısı	13	16
Yumurta sayısı	170	158
Olgun yumurta sayısı	143	141
Embryo sayısı	130	114
Sağlıklı E-embryo sayısı	22	24
Taşıyıcı embryo sayısı	18	25
Hasta embryo sayısı	90	65
Transfer edilen sağlıklı HLA uyumlu embryo	6	15
Transfer edilen taşıyıcı HLA uyumlu embryo	8	7
Transfer yapılan siklus başına gebelik oranı	5/10	10/14
Canlı doğum oranı	4/5	9/10

yapıldı. Embriyo transferi yapılabilen 24 siklusta 15 gebelik (%62.5) elde edildi. Gebelik başına canlı doğum oranı ise 13/15 (%86.67) idi. Tüm hastaların ait sonuçlarının retrospektif analizi tablo 1'de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

PGT, İVF sikluslarının bir parçası olarak kullanıldığında çocuklarına ciddi bir genetik hastalığı aktarma riski taşıyan ebeveynlere, gebe kalmadan önce embriyolarının bu hastalık yönünden taranması imkanını vermektedir. Genetik bir hastalığın embriyoya geçişinin engellenmesi mümkün değilse de; PGT sonrası etkilenmemiş embriyoların transferi ile, ebeveynlerin gebelik sırasında girişimsel tanı testleri yaptırması gibi zor bir karardan ve etkilenmiş fetusun terminasyonuna kadar gidecek yıkıcı bir süreçten kurtulmaları sağlanmaktadır (5).

TGH, tek bir gende meydana gelen mutasyon veya malformasyon sonucu oluşan hastalıklardır. Bir çoğu ölümcül sonuçlara neden olabilir. Otozomal dominant, otozomal resesif, X kromozomuna bağlı dominant

ve resesif, Y kromozomuna bağlı ve mitokondrial kalımla geçiş gösterebilirler (6). Dört binden fazla TGH tanımlanmıştır (7). Ebeveynlerden her ikisinin otozomal resesif hastalıklar için hasta veya taşıyıcı olmaları, otozomal dominant hastalıklar için ise birinin hasta olması PGT endikasyonudur. Günümüzde geni bilinen tüm tek gen hastalıkları için PGT uygulanabilir (2).

Ülkemizde akraba evliliklerinin sık olması PGT'nin önemini artırmaktadır. Beta-talasemi gibi otozomal resesif geçiş gösteren hastalıkların sıklığı akraba evlilikleri ile artmaktadır (8). Bölgemizde sıklıkla görülen beta-talasemi dışında, kistik fibrozis, infantil tip polikistik böbrek, gangliosidoz, Krabbe hastalığı gibi nadir otozomal resesif hastalıklar içinde PGT işlemi yapıldı. Olgularımız arasında bulunan Multipl Herediter Ekzositoz ise otozomal dominant kalıtım gösteren bir hastalıktı. Günümüzde Beta-talasemi, Orak Hücre Anemisi ve Fankoni Anemisi gibi birçok ağır hematolojik hastalığın tek tedavi yolu Allojenik Kök Hücre transplantasyonudur. En iyi tedavi sonucu ise tamamen HLA uyumlu kardeş donörden yapılan transplantasyon neticesinde alınabilmektedir (9). Transplantasyon

HLA uyumlu kardeşten yapılmadığı takdirde yüksek morbidite oluşmakta ve hasta çocuğun hayatta kalma şansı düşmektedir. HLA uyumlu kardeşin göbek kordonundan alınan kanın mükemmel bir kök hücre kaynağı olduğu bildirilmiştir. Bundan dolayı, genetik olarak kan hastalığı taşıyıcısı olan ve hastalıklı çocuk dünyaya getirmiş olan ailelerin, hem sağlıklı olan hem de hasta kardeşinin tedavisine imkan sağlayabilecek yeni bir çocuk sahibi olabilmeleri amacıyla PGT yanında HLA tiplmesi de yapılmaktadır (4). Olgularımız arasında 10 çifte Beta-talesemi, Hemofagositik Lenfositosis, Fankoni A, Lökosit adezyon defekti ve Multipl Herediter Ekzositom endikasyonları ile PGT ve HLA doku tiplmesi yapılmıştır. 13 siklusta elde edilen toplam 130 embriyonun, 22'si sağlıklı 18'i taşıyıcı olarak bulunmuş, transfer yapılabilecek embriyo bulunan 10 siklusta 5 gebelik elde edilmiş bunlarında 4'ü canlı doğumla sonlanmıştır. Ebeveynlerden birinde bilenen tek gen hastalığı bulunan 12 hastada, hastalığın çocuklarına aktarılması amacıyla, HLA uyumu aranmadan 16 siklusta toplam 114 embriyo üzerinde yapılan PGT sonrası 24 sağlıklı, 25 taşıyıcı embriyo tespit edilmiş bunlarından 22'si 14 siklusta transfer edilmiş ve 10 gebelik elde edilmiştir. Bu 10 gebeliğin 9'unda canlı doğum olmuştur. Tüm bu hastalar dışında kliniğimizde, ayrıca, birer TGH olmayan, Akut Lenfoblastik Lösemi ve Miyelodisplastik Sendromlu kardeşlerine, KİT donörü olabilmesi için; mutasyon aranmaksızın, 2 hastamızda HLA uyumu için PGT uyguladık. 3 siklusta, 38 embriyonun 7 si HLA uyumlu idi ve bunların 5 transfer edildi. Transfer yapılan 3 siklusta 2 gebelik elde edildi ve bu 2 gebelik de canlı doğum ile sonlandı.

TGH'nın gebelik öncesi tanısı amacıyla PGT uygulanan çiftlerde genellikle herhangi bir infertilite sebebi bulunmamaktadır. Bu çiftlere uygulanan IVF sikluslarında, TGH yönünden sağlıklı bir embriyo bulunduğu takdirde yüksek gebelik ve canlı doğum oranları elde ediliyor gibi görünmektedir. Çalışmamızdaki bu bulgunun desteklenmesi için daha geniş hasta popülasyonlarında çalışmalara ihtiyaç vardır. Ek olarak, son yıllarda tek gendeki mutasyonun yanında aynı embriyoda eş zamanlı olarak anöploid taraması da yapılarak gebelik şansı artırılmaktadır (10).

Sonuç olarak, daha önceki çalışmalarında gösterdiği gibi, tek gen hastalıklarında ve HLA uyumlu KİT için sağlıklı gebelik elde etmede PGT iyi bir yöntemdir (8, 9, 11). IVF ile birlikte uygulanan PGT, genetik hastalığın yeni nesillere aktarımı riskine sahip çiftlere, sağlıklı gebelik için avantaj sunar. Genetik hasarlı embriyo riskini ortadan kaldırır. TGH nedeniyle gebeliği sonlandırma riski ortadan kalkar. Tüm bu avantajları yanında diğer IVF endikasyonları ile en az benzer gebelik ve canlı doğum oranları sağlaması nedeniyle önerilmesi gereken bir seçenektir. Bazı özel durumlarda ise hayat kurtarıcı bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Berger VK, Baker VL. Preimplantation diagnosis for single gene disorders. *Semin Reprod Med.* 2014;32(2):107-13.
2. Munne S, Wells D. Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2002;14(3):239-44.
3. Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet.* 2004;363(9421):1633-41.
4. Kahraman S, Beyazyurek C, Yesilipek MA, Ozturk G, Ertem M, Anak S, et al. Successful haematopoietic stem cell transplantation in 44 children from healthy siblings conceived after preimplantation HLA matching. *Reproductive biomedicine online.* 2014;29(3):340-51.
5. Hu X, Wang J, Li Y, Wang Y, Ding C, Zeng Y, et al. Clinical Considerations of Preimplantation Genetic Diagnosis for Monogenic Diseases. *PLoS One.* 2015;10(9):e0139613.
6. Ropers HH. Single gene disorders come into focus--again. *Dialogues Clin Neurosci.* 2010;12(1):95-102.
7. Saudi Mendeliome G. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol.* 2015;16:134.
8. Ayrim A, Kafali H. Preimplantasyon Genetik Tarama / Tanı Testi Uygulanan IVF Olgularının Retrospektif Analizi. *Yeni Tıp Dergisi* 2015:25-8.
9. Kahraman S, Beyazyurek C, Ekmekci CG. Seven years of experience of preimplantation HLA typing: a clinical overview of 327 cycles. *Reproductive biomedicine online.* 2011;23(3):363-71.
10. Zimmerman RS, Jalas C, Tao X, Fedick AM, Kim JG, Pepe RJ, et al. Development and validation of concurrent preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders and comprehensive chromosomal aneuploidy screening without whole genome amplification. *Fertility and sterility.* 2016;105(2):286-94.
11. Ekici C. Preimplantasyon Genetik Tanı. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2014;3 (2):49-53.