

## TALASEMİDE PRENATAL TANIDA KARŞILAŞILAN GÜÇLÜKLER VE PRENATAL TANI YÖNTEMLERİNDE GELİŞMELER

Prof. Dr. Ferda Özkinay

Hacettepe University Department of Pediatrics, Pediatric Hematology Unit, Ankara, Turkey  
e-mail: f.ferda.ozkinay@ege.edu.tr

---

### ABSTRACT

Prenatal diagnosis is the defining of abnormalities before birth using prenatal diagnostic tests. The type of genetic prenatal test depends on the inheritance pattern of the genetic disease. Thalassemias are autosomal recessively inherited monogenic diseases. Therefore molecular genetic tests are performed for the prenatal diagnosis of them.

Although numerous molecular DNA analysis techniques have been developed there are, still, a number of difficulties in their routine prenatal applications for thalassemia.

The problems encountered in the management of prenatal diagnosis of thalassemia can be divided into two groups in our country : 1. Socio-economic problems 2. Scientific problems.

Main socio-economic problems are:

not to have a health insurance

not to accept being a carrier of a genetic disease

difficulties in finding an appropriate health care center for molecular diagnosis

reluctance to having molecular test despite knowing their carrier situation

not to accept invasive prenatal procedure

to be against pregnancy termination in case of diagnosis affected fetus

Scientific problems in thalassemia prenatal diagnosis are:

Insufficient genetic counseling during initial diagnostic procedure (in first step health care centers)

Insufficiency in the health care service of tertiary health care centers due to the difficulties in finding educated physicians who have ability to perform all prenatal diagnostic procedures for thalassemia.

Difficulties in the interpretation of the molecular test results

Difficulties in excluding maternal contamination

Different conventional molecular techniques have been performed in thalassemia prenatal diagnosis in molecular laboratories. Among those allele specific oligonucleotide probe (ASO), amplification refractory mutation system (ARMS), restriction enzyme analysis and sequencing are the most commonly used techniques. Each technique has its own advantages and disadvantages. In some cases to use more than one technique is required for the diagnosis.

Recently a number of new techniques have been introduced to the area of prenatal diagnosis for thalassemia. Microarray systems, multiple ligation probe analysis (MLPA), real time PCR are the respectively new, rapid and accurate techniques that make the molecular diagnosis easier in ordinary cases and possible in some difficult.

Since the conventional invasive procedures performed to obtain fetal material may cause fetal loss, an intensive effort has been spent to develop noninvasive technique. Different scientific groups have tried to develop molecular diagnostic methods for genetic disease using Cell-free fetal DNA and fetal cells in the maternal circulation. Promising results have been obtained for beta thalassemia molecular diagnosis in some of these studies.

Prenatal Tanı, doğumdan sonra oluşma olasılığı olan herhangi bir anomalinin doğumdan önce prenatal tanı testleri yardımıyla tanımlanmasıdır.

Doğum öncesi tanıda kullanılacak genetik testin cinsi, fetusun risk içinde olduğu genetik hastalığın kalıtım biçimine göre değişir.

Tablo: Genetik hastalık grupları ve bu gruplara göre kullanılan genetik tanı testleri

Genetik Hastalıklar	Tanı Yöntemleri
Tek gen hastalıkları	Moleküler genetik
Kromozom bozuklukları	Sitogenetik, moleküler sitogenetik, moleküler genetik
Multifaktöriyel-poligenik kalıtılan hastalıklar	Moleküler genetik
Mitokondrial kalıtımla geçen hastalıklar	Moleküler genetik
Somatik mutasyonlar	Sitogenetik, moleküler sitogenetik, moleküler genetik

Talasemiler genetik hastalık grupları içinde tek gen hastalıkları grubuna gire. Tek gen hastalıkları Mendel kurallarına göre kalıtılan hastalıklardır. Talasemiler otozomal resesif kalıtılır. Ancak son yıllarda moleküler çalışmalarla nadir olarak otozomal dominant kalıtılan  $\beta$  talasemi aileleri de tarif edilmektedir. Hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  talaseminin ağır formları yaşam kalitesini oldukça bozan ve yaşam süresini kısaltan klinik tablo oluşturdukları için doğum öncesi tanı ile gebelik terminasyonuna gidilmesi etik kabul gören hastalıklardır. Talasemilerin tanısı ve prenatal tanısında moleküler genetik analiz yöntemleri kullanılır.

Fetus günümüzde hakları olan bir hasta konumuna gelmiştir. Pek çok genetik hastalıkta olduğu gibi talasemi riski taşıyan fetüste de yapılacak her türlü prenatal girişim ve tanı için izlenecek yol etik ve yasal olmalıdır.

Talasemide kullanılan prenatal tanı yöntemleri oldukça geliştirilmiş olmasına rağmen, uygulamada birçok güçlük karşılaşılabilmektedir.

Ülkemizde talasemide prenatal tanıda karşılaşılan güçlükler iki ana grupta özetlenebilir:

- a. Sosyal ve ekonomik güçlükler
- b. Bilimsel güçlükler

Bu iki grubu kesin bir şekilde birbirinden ayırmak mümkün değildir. Birçok durumda birbiri ile etkileşim içindedirler.

#### **A. Ülkemizde talasemi prenatal tanısında karşılaşılan sosyal ve ekonomik güçlükler**

1. Sağlık güvenlik kurumuna dahil olmama
2. Genetik hastalık taşıyıcılığını kabullenmemek
3. Sağlık kuruluşuna ulaşmada güçlük
4. Taşıyıcı olduklarını bildikleri halde mutasyon analizi yaptırmayı ihmal etme
5. Prenatal tanı işlemini kabul etmeme
6. Hasta fetus için gebelik terminasyonuna karşı olma

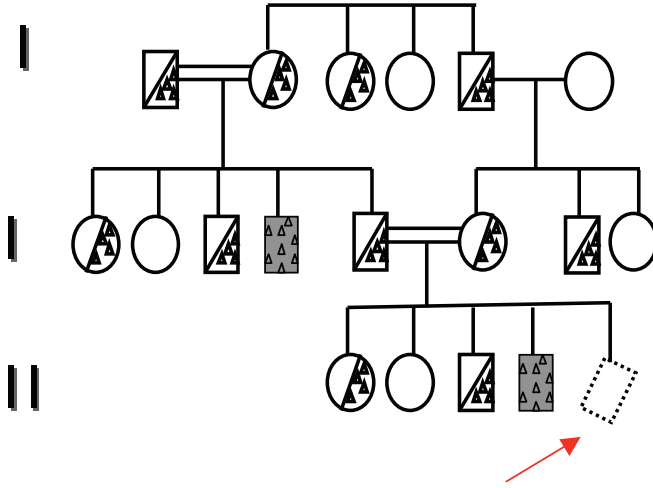
#### **B. Ülkemizde talasemi prenatal tanısında karşılaşılan bilimsel güçlükler**

##### **1- Prenatal tanı öncesi genetik danışma almada güçlükler**

Talasemi için taşıyıcılık riski, taşıyıcıların hasta çocuk sahibi olma riskleri hakkında birinci basamak sağlık hizmetleri kapsamında bilgi verilebilmeli, prenatal tanı planlanması durumunda ise olgular uzman bir ekipten genetik danışma almalıdır.

Bu amaçla bütün tıp fakültelerinde ayrıntılı olarak talasemi konusuna önem verilmeli, birinci basamakta hizmet veren pratisyen hekimler sorunun farkında olarak, yapılacakların neler olduğunu bilerek tıp fakültesinden mezun olmalıdır. Bu konudaki eğitimin standardizasyonu fakülteler arası eğitim konseyi toplantılarında tartışılarak organize edilebilir.

Genetik danışma, genetik hastalık riski taşıyan kişi ve yakınlarının, hastalığın özellikleri, hasta olma, hastalığı taşıma veya sonraki kuşaklara geçirme olasılıkları hastalığın önlenmesi hastalıktan kaçınma yolları ve varsa tedavisi konularında bilgilendirilmesidir. Genetik danışma basamakları: 1. öykü alma ve aile ağacı çizme, 2. Klinik muayene, 3. Kesin tanı ve tanının doğrulanması, 3. Danışana danışman tarafından bilgi verilmesi, 5. izlem dir. Öykü alma ve aile ağacı çizme basamağında talasemi için ailenin kökeni, ailede talasemi ve benzeri tablo gösteren kişilerin olup olmadığı soruşturulur. Evrensel semboller kullanılarak çizilen aile ağacı en az üç kuşağı içermelidir. İyi çizilen bir aile ağacı doğru risk hesaplaması yapmayı ve risk içinde olanların belirlenmesini sağlar. Ülkemizde birinci basamak için aile ağacı oluşturma eğitimi yeterli görünmemektedir. Ayrıca birçok tıp fakültesinde genetik ve özellikle moleküler genetik dersleri, yeterli olmadığı veya klinik tablolar ile ilişki yeterli olarak anlatılamadığı için talasemi ailesi ile ilk karşılaşan kişi olan pratisyen hekim, temel moleküler kavramları anlamakta ve aileye aktarmakta bazı zorluklar yaşamaktadır. Örneğin bileşik heterozigotluk (compound heterozygosity) iki gen kopyasında ayrı mutasyonların taşınması demektir ve her iki kopya da bozuk protein kodladığı için hastalık tablosu ortaya çıkar. Bu durumun birinci basamakta hizmet veren hekimlere kavratılması gerekir.



Şekil 1. İdeal bir aile ağacı en az üç kuşağı kapsamalıdır.

Birinci basamakta  $\beta$  talasemide akrabalık olduğunda taşıyıcı çiftlerde aynı mutasyon olma olasılığı yüksek olmakla birlikte toplumumuzda taşıyıcılık yüksek olduğu için farklı mutasyonlar da taşınabileceği bilinmeli. Her iki taşıyıcı eşte de mutlaka mutasyon tayini yapılmalıdır. Ayrıca çocuk planlayan taşıyıcı çiftlerde mutasyonun bilinmesi zorunludur. Çiftlerde mutasyon analizi ideal olarak gebe kalmadan önce yapılır. Bazı hastalarda mutasyon analizleri uzun sürebilir ve gebelik esnasında yapılması gebeliğin ilerlemesine ve eğer hasta bir fetus var ise terminasyonun etik ve yasal dönemlerde yapılamamasına neden olabilir.

## 2-Prenatal tanı uygulanacak olguların ayrıntılı genetik danışma ve işlemler için uygun merkez bulamamaları

Prenatal tanı uygulanacak çiftler, talasemide deneyimli

- Hematolog
- Genetik uzmanı
- Kadın - doğum uzmanı
- Psikolog

bulunan bir ekip tarafından değerlendirilmeli ve izlenmelidir. Ülkemizde talasemide deneyimli böyle ekiplerin bulunduğu merkez sayısı şimdilik yeterli olmamakla birlikte, bu konuda organizasyon çalışmaları sürmektedir.

Prenatal tanı uygulanacak olan çiftler mutlaka genetik uzmanından genetik danışma almalıdır.

Prenatal genetik danışmada,

- Talasemi için fetal materyal elde edilme seçenekleri
- Uygulanacak işlemin riskleri
- DNA analizi yanında sitogenetik çalışmanın önemi
- Sonuçla ilgili olasılıklar

anlatılır.

Fetal materyal elde etmede klasik olarak korionik villus biyopsisi (CVS), amniyosentez, kordosentez gibi invazif yöntemler kullanılır. CVS 9-12 gebelik haftasında, amniyosentez 14-16. gebelik haftasında, kordosentez ise 18-22 gebelik haftasında yapılır. Erken gebelikte yapıldığı için, talasemi için fetal materyal elde etmede en uygun işlem CVS olarak kabul edilir. Bu işlemler bu

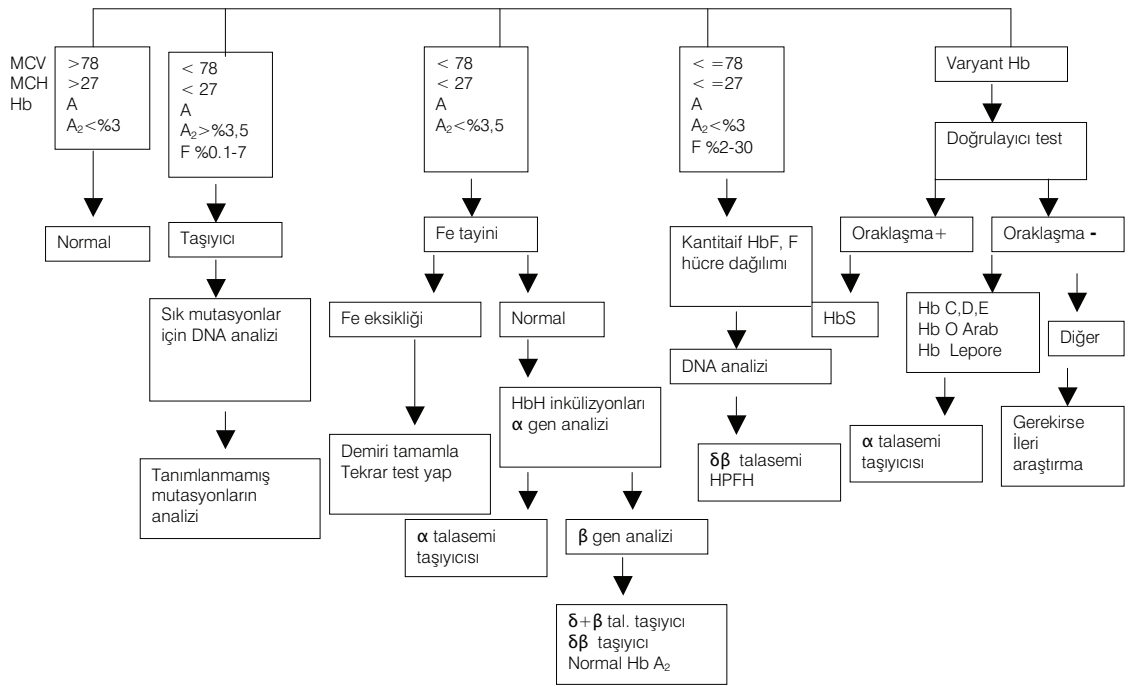
konuda deneyimli bir kadın hastalıkları ve doğum uzmanı tarafından yapılmalıdır. Ülkemizde bu işlemlerin tümünün her merkezde uygulanmadığı, özellikle CVS yapılmasında yeterli eğitilmiş uzman olmadığı görülmektedir.

Bazı aileler çeşitli nedenlerle son yıllarda uygulanmaya başlayan preimplantasyon genetik tanısı (PGT) seçmek istemektedir. Talasemi için PGT uygulayan merkezlerin sayısı çok azdır. PGT işlemi özel genetik danışmayı ve bu konuda eğitim almış bir ekip çalışması gerektirir.

### 3-Talasemide moleküler genetik yorumlama zorlukları

Prenatal genetik danışmada globin genleri ve düzenleyici bölgelerindeki kompleks yapıların fenotipi etkileyebileceği söylenmelidir. Hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  globin zincirlerini kodlayan genlerin bulunduğu bölgeler karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu bölgelerde pseudogenler ve embriyonal dönemden postnatal yaşamın sonuna kadar değişik dönemlerde aktif olan ve olmayan genler vardır. Fenotipi etkileyen bazı moleküler ilişkilerin açıklanması için literatür henüz yetersizdir ve yayınlanmış olgu sayısı azdır. Ayrıca kesin tanıya ulaşmak ve genetik danışma için en ileri düzeyde veri toplamak için izlenecek yol haritasını uygulamada olanaklar yetersizdir. Talasemilerde tanıda izlenecek yol haritası tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 2: Talasemide hemoatolojik çalışmalarda yol haritası



Tablo 2 de verilen yol haritasında tanı için yapılması önerilen tetkiklerin hepsinin, eksiksiz olarak yapılabildiği merkez sayısı ülkemizde çok azdır.

Talasemide mutasyon saptanamaması riski düşürmekle birlikte ortadan kaldırmaz.  $\beta$  globin gen bölgesinde >1000 değişiklik tarif edilmiştir. Birçok laboratuvar bunların tümünü test edememektedir. Prenatal genetik danışma sırasında ayrıca %100 sensitif ve %100 doğrulukta test olmadığı

belirtilmelidir. Moleküler tanıda DNA dizi analizi gold standart olarak belirtilmektedir. Fakat, özellikle teknik nedenlerle heterozigotları tanımak zor olabilir. Nadiren talasemiler globin genlerinden farklı bölgelerdeki defektler sonucu olabilir ve dizisi yapılan bölgede bulunmayabilir, ayrıca bir alleldeki büyük delesyonlar veya primer bağlanma bölgesindeki delesyon/nokta mutasyonları nedeniyle PCR ile DNA çoğaltılamaz ve yanlış tanıya yol açar.

Prenatal genetik danışmada genotipe göre fenotipi tahmin zorlukları olduğunu yukarıda belirtmiştik. Beta talasemide fenotipi etkileyen moleküler özellikleri 3 grupta toplamak mümkündür. 1. Primer:  $\beta$  globin gen mutasyonları 2. Sekonder: Globin sentezinde rol alan diğer genler. 3. Tersiyer: Globin sentezi dışında hastalığın komplikasyonları üzerine etkili genler

Primer olarak beta talasemi mutasyonunun kendi özelliği fenotipi etkiler. Mutasyonlar gizli, hafif ve ağır mutasyon olarak taşıyıcılardaki duruma göre sıralanmakla birlikte, bazen ortaya çıkacak tabloyu önceden tahmin zor olabilir. Hafif ya da gizli iki mutasyon bileşik heterozigotluk durumunda ağır tablo yapabilir. Örnek: IVS2-645 / Poly A AATAA >AATAGAAynı mutasyon kombinasyonu hafiften ağıra değişen tablo yapabilir. Aynı mutasyon kombinasyonu farklı hastalarda hafiften ağıra değişen tablo yapabilir. Örnek: HbE/  $\beta$ talasemi. Dominant exon 3 mutasyonlarında tabloda diseritropoezden, ağır hemolitik anemiye kadar değişebilir.

Sekonder olarak fenotipi etkileyen faktörler globin zincirlerini kodlayan genlerin moleküler yapısıdır.  $\alpha$  globin gen delesyonları klinik tabloyu hafifletir. Örnek: HbE/  $\beta$ talasemi.  $\gamma$  globin gen mutasyonları klinik tabloyu değiştirir Örnek: G $\gamma$  geni -158 C – T promotör mutasyonu hematopoetik stresde HbF sentezini artırır. 6. kromozom üzerinde ve X kromozomu üzerinde  $\gamma$  globin sentezini etkileyen transkripsiyon faktörü kodlayan genlerin yapısı da fenotipi etkiler.

Tersiyer olarak hastalığın gidişini, komplikasyonları etkileyen çeşitli metabolik sistemlerle ilgili genlerdir. Örneğin bunlar arasında bilirubin metabolizmasında rol oynayan, UGT1 geni (TA)7 polimorfizmi, Fe metabolizmasında rol oynayan C282Y gen polimorfizmleri, kemik metabolizmasında önemli olan vitamin D reseptör (VDR) geni, östrojen reseptör (ESR) geni, kollagen genleri polimorfizmleri ve ICAM, HLA, TNF gibi genlerin polimorfizmleri sayılabilir.

Bütün bu sayılan fenotipik spektrum üzerine etki eden faktörler talasemilerde prenatal genetik danışmayı zorlaştırmaktadır. Bunlarda hangi ölçüde bahsedilmesi gerektiği ve testlerde kullanılması gerektiği henüz bilinmemektedir.

#### 4- Prenatal tanıda anne kontaminasyonu

Prenatal moleküler tanıda özellikle fetal materyal olarak CVS kullanıldığında anne hücrelerinin kontaminasyonu nedeniyle anne DNA sını çoğaltmak ve yanlış olarak hasta veya homozigot normal bir fetus için annenin genotipini vermek olasılığı vardır. Bunu ortadan kaldırmak için koryonik villuslar mikroskop altında anne hücrelerinden iyi ayıklanmalı, çoğaltılan DNA da STR veya VNTR markerleri ile kontaminasyon mutlaka elimine edilmelidir.

#### Talasemide DNA Analizinde Kullanılan Bazı Yöntemler

- ASO (allel spesifik oligonükleotid)-prob metodu (DB(dot blot), RDB (Reverse dot blot))
- ARMS ( Amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi)
- Restriksiyon enzim analizi (RFLP)
- DNA Dizi Analizi
- Gap-PCR
- Southern Blot Analizi
- Single strand confirmational polymorphism (SSCP)
- Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)
- Heterodupleks analizi

- DNA mikroarray uygulamaları
- MLPA (multipl ligasyon prob analizi)
- Real time PCR

Talasemi tanı/prenatal tanısında kullanılan yöntemlerin herbirinin avantaj ve dezavantajları vardır. Bu metotlardan en sık olarak kullanılanları ASO-prob metotları, özellikle RDB (Reverse dot blot) metodu, ARMS metodu ve DNA dizi analizi metotlarıdır. Her laboratuvar kendi deneyimine göre benzer testlerden birini seçmektedir. Ancak bazı olgularda tanı için birden çok yöntemi kullanmak gerekebilir. Beta talasemi moleküler tanısında izlenen yol, genellikle, önce RDB, ARMS gibi yöntemlerle bilinen mutasyonlar taramak, eğer mutasyon bulunamaz ise mutasyonun en içindeki lokalizasyonunu belirlemek için SSCP, DGGE yöntemlerini kullanmak ve mutasyon olduğu saptanan bölgeye dizi analizi uygulamaktır. Otomatize ve hızlı dizi analizi cihazlarının olduğu bazı laboratuvarlarda dizi analizi ilk uygulanan yöntem olabilmektedir.

Gen içindeki ve komşu bölgelerdeki büyük delesyonlar dizi analizi ile saptanamaz. Bu durumda Gap-PCR, Southern Blot veya MLPA yöntemlerini uygulamak gerekir.

Yeni yöntemlerden biri olan MLPA yönteminin delesyonların ve duplikasyonların analizinde pratik bir teknik olduğu belirtilmektedir. MLPA yöntemi ile birçok bölgedeki delesyonu birden aramak mümkündür. Ancak delesyonun kesin sınırlarını anlamada yetersizdir.

MLPA da kullanılan problemler iki bölüme ayrılır 1) Sentetik oligonükleotid 2) Faj M13' den elde edilen tek zincirli DNA. Her prob hedef DNA dizisini tanıyan özel bir dizi içerir ve her prob universal problemlerle çoğaltılır probda bulunan Stuffer adı verilen özgün dizinin uzunluğu her probda farklıdır ve elektroforezle ayrılması sağlar. Genomik DNA'nın bu problemlerle PCR işlemine tabi tutulmasından sonra kapiller elektroforez yapılır ve özel bir program yardımı ile elektroforez sonuçları değerlendirilir.

Son yıllarda beta talasemi moleküler tanısında yaygın kullanılmaya başlayan, güvenilir yöntemlerden biri de real time PCR dir. Bu metod real time PCR ile elde edilen erime eğrisi (melting Curve) analizine dayanır.. Farklı dizilerin ayırımı hibridizasyon ısılarına dayanarak yapılır. Kısa sürede doğru yanıt alınır.

Moleküler analizlerde çok büyük ilerleme sağlayan microarray platformları çok sayıda mutasyonun aynı anda bakılmasına ya da birden fazla hastayı aynı anda değerlendirmeye olanak veren sistemlerdir . Beta talasemi tanısında da bu sistemlerin kullanıma girdiği görülmektedir.

### **Noninvazif prenatal tanı**

Birçok genetik hastalıkta olduğu gibi talasemi prenatal tanısında da fetal materyal invazif yöntemlerle elde edilmektedir ve her bir yöntemin belli oranda (CVS için 1/200-300) sağlam fetusun kaybı riski vardır. Bu nedenle noninvazif yöntemlerle fetal materyal elde etme çalışmaları hızla devam etmektedir. Bu konuda ilk çalışmalar 1975 yılında başlamıştır. Bu dönemde anne kanında dolaşan fetal hücreler izole edilmeye çalışılmıştır. Daha sonra 1997 de ilk kez anne kanında serbest fetal DNA olduğu gösterilmiştir. Günümüzde dünyanın birçok yerinde farklı gruplar bu konu üzerinde çalışmaktadır. Anne kanında dolaşan serbest fetal DNA'nın zenginleştirilerek izole edilmesi ve farklı moleküler analiz tekniklerinin uygulanması ile, bileşik heterozigotluk riski olan fetusda babada bulunan mutasyonun tanımlanmasının başarıyla yapıldığı çalışmalar mevcuttur. Yöntem uzun uğraş gerektiren, zor, pahalı ve henüz çok geniş serilerde uygulanmış bir yöntem olmasa da gelecekte birçok genetik hastalığın tanısında uygulanacağı öngörülmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Weatherall D J. PHENOTYPE–GENOTYPE RELATIONSHIPS IN MONOGENIC DISEASE: LESSONS FROM THE THALASSAEMIAS. *Nature rev.* 2001 ( 2):345-354.
2. Old JM. Screening and genetic diagnosis of hemoglobin disorders. *Blood Reviews.* 2003;17, 43-53
3. Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin. Lab. Haem.* 2004, 26, 159–176
4. Xiaofeng GU, and Yitao ZENG. A Review of the Molecular Diagnosis of Thalassemia. *Hematology*, 2002 Vol. 7 (4), pp. 203–209
5. Georgi D. E. DOMINANTLY INHERITED b-THALASSEMIA, *Hemoglobin*, 2007, 31 (2):193–207.
6. Kutlar F. DIAGNOSTIC APPROACH TO HEMOGLOBINOPATHIES. *Hemoglobin*, 31 (2):243–250, 2007
7. Birgens H. Rolf L.D The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67: 11–26
8. Hahn S, Yan Zhong X, Holzgreve W. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Neonatal Medicine* (2008) 13, 57-62
9. Galbiati S, Foglieni B, Travi M et al. Peptide-nucleic acid-mediated enriched polymerase chain reaction as a key point for non-invasive prenatal diagnosis of b-thalassemia. *Haematologica* 2008 Apr; 93(4):610-614.
10. Thein SL. Genetic modifiers of b-thalassemia. *Haematologica* 2005; 90:649-660
11. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetzis M, et al. Rapid Screening of Multiple  $\beta$ -Globin Gene Mutations by Real-Time PCR on the LightCycler: Application to Carrier Screening and Prenatal Diagnosis of Thalassemia Syndromes. *Clinical Chemistry* 2003, 49:5:769–776
12. Tadmouri Go, Tüzmen Ş, Özçelik H. Molecular and population genetic analysis of b-thalassemia in Turkey. *Am. J. Hematol.* 1998, 57:215-220.
13. Tungwiwat W et al. Application of maternal plasma DNA analysis for noninvasive prenatal diagnosis of Hb E-thalassemia. *Translational research.* 2007.06.006-31.9
14. Li, Y. et al. Detection of paternally inherited fetal point mutations for b-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 2005, 293, 843-9.