

β -TALASEMİ OLGULARINDA PREİMLANTASYON GENETİK TANI (PGT)'NİN YERİ

Op. Dr. Güvenç Karlıkaya¹, Prof. Dr. Semra Kahraman¹

İstanbul Memorial Hastanesi, YÜT, Üreme Endokrinolojisi ve Genetiği bölümü Piyalepaşa blvd., 80270, Okmeydanı,
İstanbul, Türkiye
¹gguenc@yahoo.com

GİRİŞ

β –Talasemi, dünyada en sık görülen tek gen hastalıklarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık %3 ünün talasemik bir geni taşıdığı tahmin edilmektedir.

Talasemi taşıyıcısı aileler için, gebeliğin erken dönemlerinde, örneğin gebeliğin 10. haftası civarında CVS (koryonik villüs örnekleme) veya 16. haftası civarında amniosentez yöntemleri ile prenatal tanı mümkün olmakla beraber, eğer bebek etkilenmiş ise, aile gebeliğin sonlandırılması riski ile baş başa kalmaktadır. Bunun yanında, talasemi hastası çocuğa sahip olan aileler, çocuklarının tedavisinde kullanılmak üzere HLA uyumlu kök hücre transplantasyonu için uygun donör aramaktadırlar.

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) ve genetik alanlarındaki ilerlemeler genetik geçiş gösteren hastalıkların tanı ve tedavisi için yeni olanaklar sağlamaktadır. Preimplantasyon genetik tanı (PGT) sadece embriyodaki genetik hastalığın tanınmasına imkan sağlamakla kalmayıp aynı zamanda, hematopoetik kök hücre transplantasyonuna ihtiyaç duyan hasta birey için human leukocyte antigen (HLA) uyumlu embiyoların seçimine imkan sağlayan alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (1).

Günümüzde bir çok tek gen hastalığının PGT ile tanısı mümkün olmakla birlikte en çok uygulama alanı hematopoetik sistem hastalıkları özellikle, talasemiler olmaktadır (2). Bu durum, bulunduğu coğrafi konum ve akraba evliliklerinin sıklığı nedeniyle, ülkemiz için ayrıca önem kazanmaktadır (3). PGT, talasemi taşıyıcısı veya hasta çocuğa sahip olan aileler için oldukça umut veren bir tedavi yaklaşımı olmaktadır. Bununla beraber, mutasyon analizi ve/veya HLA tiplmesi için yapılacak PGT uygulamalarında; HLA uyumlu ve mutasyon taşımayan embriyo bulma zorunluluğu, yüksek sayıda oosit ve biopsi için uygun kalitede embriyo eldesi gibi başarıyı etkileyen birçok parametre daha önceki çalışmalarımızda değerlendirilmiştir (4). Bunun yanında, özellikle HLA tiplmesi yapılan olgularda, olası ileri kadın yaşı, embriyolarda anöploidi testlerinin eklenmesi gerekliliğini getirmektedir (5).

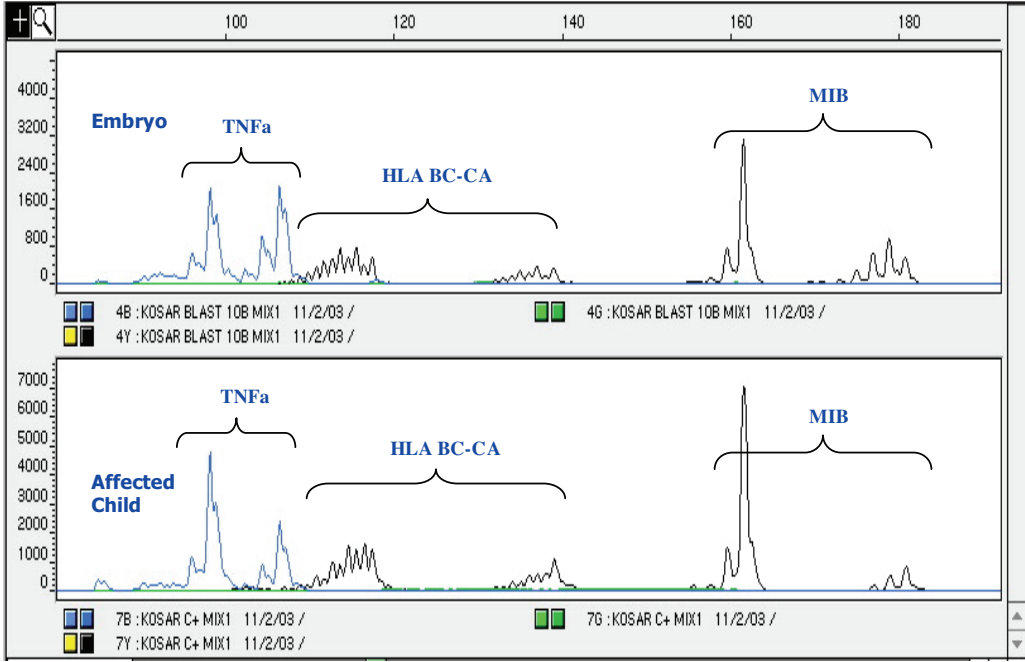
Bu çalışmada, İstanbul Memorial Hastanesi IVF ve Genetik Tanı merkezinde, talasemi ve/veya HLA tiplmesi tanısı amacıyla YÜT siklusuna alınan olguların değerlendirilmesi yapılmıştır .

MATERYAL VE METOD

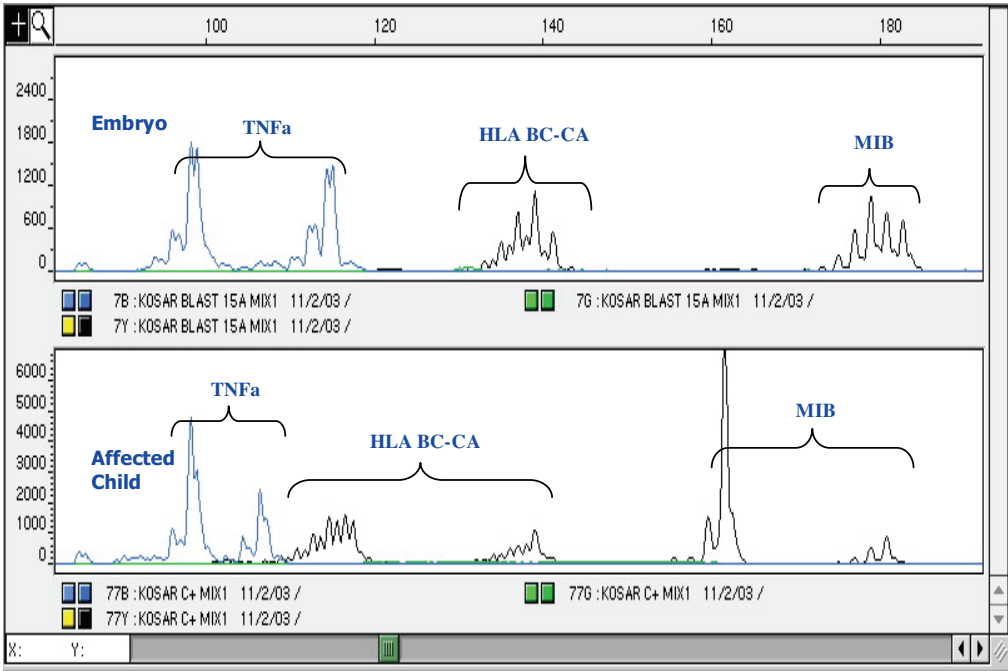
2004 –2008 yılları arasında, talasemi için PGT yapılan 26 çift 35 siklus, talasemi ve HLA tiplmesi için PGT yapılan 75 çift 155 toplamda 190 siklus değerlendirilmiştir.

Çiftler, 2005 ESHRE PGD Consortium 'da önerildiği şekilde, öncelikle, klinik genetik ve IVF uzmanı tarafından değerlendirilmiş, talaseminin özellikleri, tek hücre üzerinde tanımlanabilirliği, başarı şansları, riskler ve alternatif yöntemler hakkında bilgilendirilmiş ve yazılı onay formları alınmıştır (6) .

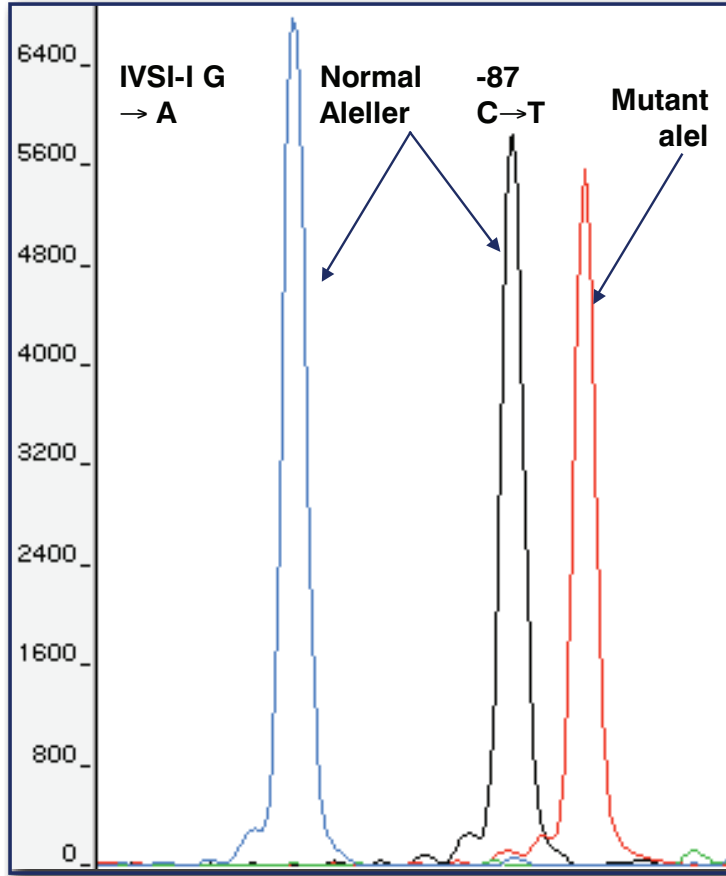
HLA çalışmasında yapılacağı olgularda HLA kompleksindeki informatif markerları tespit edebilmek amacıyla, aile bireyleri (anne, baba ve hasta çocuk) için STR haplotiplmesi yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda, HLA kompleksi üzerinde homojen olarak dağıtabileceğimiz minimum 12 STR markerı seçilmiştir. Talasemi taşıyıcılığı olan vakalar için ayrıca anne, baba ve hasta çocuğa ait mutasyonlar da ön hazırlık çalışması sırasında tespit edilmiş ve bu sayede



Hasta çocukla HLA uyumlu embriyoyu gösteren fragman analizi görüntüsü



Hasta çocukla HLA uyumsuz embriyoyu gösteren fragman analizi görüntüsü.



Çalışılan IVSI-1 G/A mutasyonu için normal, -87 C/T mutasyonu için taşıyıcı bir embriyoya ait Minisequencing analizi görüntüsü

Seçilen embriyolar, 4. veya 5. Gün transfer edilmiştir. Transfer edilecek embriyo sayısına, kadın yaşı, embriyo morfolojisi, etkilenmemiş ve/veya taşıyıcı embriyo sayısına ve endike ise HLA uyumlu embriyo sayısına göre karar verilmiştir. Fazla sayıda etkilenmemiş embriyo varsa dondurularak saklanması çifte önerilmiştir. Transfer sonrası, etkilenmiş ve/veya düşük kalitedeki transfer edilmemiş embriyolar, sonuçların confirmasyonu için tekrar analiz edilmiştir.

Gebelik sonucu olumlu gelen çiftlere, tanıların confirmasyonu için, klasik prenatal tanı yöntemlerine başvurması önerilmiştir .

BULGULAR

Sadece mutasyon analizi yapılan grupta anne yaşı ortalaması 33 ± 4.7 idi. Toplam 310 embriyo biopsi için uygundu ve bunların 281'inden (%90.6) sonuç alındı. 71 (%25.2), 130 (%46.3), 80 (%28.5) embriyo, sırasıyla, etkilenmemiş, taşıyıcı ve etkilenmiş olarak bulundu. Bütün olgularda embriyo transferi başarılı bir şekilde uygulandı. Bu olgulardaki ortalama transfer edilen embriyo sayısı 2.3 ± 0.8 idi. 16 olguda (46%) gebelik gerçekleşti. Bu gebeliklerin 6'sı tekil, 3'ü ikiz, 1 tanesi ise üçüz olarak gerçekleşti. 3 gebelik spontan düşük ile seyrederken, halen 3 gebelik daha sağlıklı olarak devam etmektedir.

Mutasyon analizi ve HLA tiplemesinin beraber yapıldığı olgularda anne yaşı ortalaması 32 ± 4.9 idi. 1592 embriyoya biopsi uygulandı. 1300 (%81.6) embriyodan mutasyon analizi sonucu, 1436 (%90.2) embriyodan da HLA tiplemesi sonucu elde edilebildi. Bunlardan sadece 193 embriyonun HLA açısından uygun ve sağlıklı olduğu ve 60 embriyonun ise HLA uyumlu olmasına karşın hasta olduğu belirlendi. Sonuç olarak 34 tedavi siklusu (%22) transfer yapılmadan iptal edilmek zorunda kalındı. Bu gruptaki ortalama transfer edilen embriyo sayısı 1.5 ± 0.8 idi. 111 transfer siklusunun 44'ünde (%40) gebelik elde edildi. 16 gebelik spontan düşük ile sonuçlandı, 3 tekil gebelik ve 2 ikiz gebelik devam etmektedir. 20 tekil ve 3 ikiz doğum gerçekleşmiştir. Bilgilerimiz dahilinde şimdiye kadar 8 olguda kordon kanından elde edilen kök hücre transplantasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir.

TARTIŞMA

Günümüzde, yardımcı üreme teknikleri ve preimplantasyon genetik tanı alanındaki ilerlemeler, sadece infertil vakalarda sonuçların iyileştirilmesine yardımcı olmakla kalmayıp, genetik hastalık taşıyıcılığı olup bunu kendilerinden sonraki nesillere aktarma riski olan ailelerde sağlıklı çocuk veya bu türde hasta çocuklara doku uyumlu kardeş sahibi olmalarına imkan veren alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (10) Merkezimize bu amaçla başvuran çiftlerin büyük çoğunluğunu talasemi nedeniyle başvuran olgular oluşturmaktadır. Gerçekte, dünyada ve ülkemizde en sık görülen tek gen hastalığı olarak talasemiler, önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Ülkemizde bu konuyla ilgili olarak daha önce yapılan çalışmalarda beta talasemi taşıyıcılığının ortalama %2,2 olduğunu ancak bazı bölgelerde bu oranın %11 lere çıktığını ortaya koymaktadır (11) Genetik bölümümüzde talasemi veya başka çok değişik tek gen hastalıkları nedeniyle başvuran ailelerin genetik çalışmaları ve konsültasyonları yapılmaktadır. Preklinik genetik çalışmalar daha önce çalışılmış genetik hastalıklar için ortalama 1 ila 1,5 ay kadar sürmektedir.

Dünya literatürü ve bizim bulgularımız dikkatli incelendiğinde, birçok sınırlayıcı faktörün bu olgulardaki başarıyı etkilediğini görürüz. Daha önce yayınlanan çalışmalarımızda, tek hücre DNA çalışmalarının zorlukları (amplifikasyon güçlüğü veya başarısızlığı, kontaminasyon, ADO vb.) yanında YÜT siklusunun özelliklerinde (kadın yaşı ,elde edilen oosit sayısı, biyopsiye uygun embriyo sayısı, alınan blastomer sayısı, transfer günü vb.) sonuçları etkilediği tartışılmıştı (1,4). Daha fazla sayıda olgunun değerlendirildiği bu çalışmada, her iki grupta da kadın yaşları ortalaması farklılık göstermemekle birlikte, ileri kadın yaşı ,özellikle az sayıda matür oosit elde edilen HLA olgularında, iptal oranlarının daha yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Aynı zamanda ileri kadın yaşı olgularında embriyolarda artmış anöploidi oranlarının varlığı tanımlamayı bu yönde de genişletmek gerekliliğini getirmektedir(5). Sadece mutasyon analizi yapılan olguların mutasyon analiz sonuçlarına bakıldığında, mutasyon taşımayan veya heterozigot taşıyıcı embriyo oranlarının %71,5 ile, bir resesif karakterli genetik hastalıkta teorik oran olan %75'e yakın olduğu görülmektedir. Buna karşılık, mutasyon analizi sonuçlarına HLA uyumu da eklendiğinde transfer edilebilir embriyo bulma olasılığı teorik olarak yaklaşık %18 olmakla birlikte bizim çalışmamızda bu oran %13,4'e düşmektedir . Bu oranlar daha önceki çalışmalarla da uygunluk göstermektedir(12). Elde edilen sonuçlar göstermiştir ki özellikle HLA uyumunda incelenmesi gereken durumlarda biyopsi için uygun yaklaşık on embriyodan sadece bir tanesi transfer için uygun bulunabilmektedir. Görüldüğü üzere her iki grup arasındaki en önemli farklılığı tedaviye başlatılan siklusların transfer aşamasına ulaşabilme oranları oluşturmaktadır. Sadece mutasyon analizi yapılan sikluslarda, olguların hepsi transfer aşamasına ulaşırken, mutasyon analizi ve HLA tiplemesi yapılan olgularda, başlatılan siklusların %22'si transfer yapılmadan iptal olmuştur. Transfer yapılabilen sikluslarda ise gebelik oranlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir, dolayısıyla özellikle HLA uyumluluğu bulunan hasta grubunda transfer için uygun embriyo bulunduğu kabul edilebilir gebelik oranlarına ulaşabilmektedir (%45,7 ve %39,6). Bu durumun ailelerle işlem öncesinde konsülte edilmesi, sonuçların tartışılması gereklidir.

Literatür bilgilerine göre bu çalışma, talasemi ve HLA tiplemesi için PGT yapılan en geniş seridir. Bu bilgiler ışığında PGT nin, talasemi hastalığını aktarabilme riski olan aileler ve hasta çocukları için, hem sağlıklı hemde doku uyumlu kardeşler elde edebilmek açısından çok önemli bir teknik olduğunu söyleyebiliriz. Bunun yanında, ileri anne yaşı ve düşük over rezervi gibi IVF tedavisinin başarısına etki eden faktörler, dahada önemlisi hem HLA uyumlu hemde sağlıklı embriyo bulma konusundaki kısıtlılık ve buna bağlı tedavi iptalleri riski çiftlerle tedavi öncesinde mutlaka tartışılmalıdır. Bu konu ile ilgili jinekologlar yanında, klinik genetik uzmanları, hematoloji uzmanları, pediatri uzmanları talasemi taşıyıcısı aileleri bu teknik konusunda bilgilendirmelidir.

KAYNAKLAR

1. Fiorentino F, Biricik A, Nuccitelli A, De Palma R, Kahraman S, Iacobelli M, Trengia V, Caserta D, Bonu MA, Borini A, Baldi M. Strategies and clinical outcome of 250 cycles of Preimplantation Genetic Diagnosis for single gene disorders. *Hum Reprod.* 2005 Nov 25
2. Sermon K, Moutou C, Harper J, Geraedts J, Scriven P, Wilton L, Magli MC, Michiels A, Viville S, De Die C. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. *Hum Reprod.* 2005 Jan;20(1):19-34.
3. Ince HH, Ayyıldız O, Kalkanlı S, Batun S, Muftuoğlu E. Molecular basis of beta-thalassemia mutations in Diyarbakir in the southeastern region of Turkey. *Hemoglobin.* 2003 Nov;27(4):275-8.
4. Kahraman S, Karlıkaya G, Sertyel S, Karadayı H, Findikli N. Clinical aspects of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders combined with HLA typing. *Reprod Biomed Online.* 2004 Nov;9(5):529-32.
5. S Rechitsky, A Kuliev, T Sharapova, K Laziuk, S Ozen, I Barsky, O Verlinsky, I Tur-Kaspa, Y Verlinsky. HLA typing with aneuploidy testing. *Preimplantation Volume 12, No 1 January 2006*
6. Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, Moutou C, Robinson MD, Schmutzler AG, Scriven PN, Sermon KD, Wilton L; ESHRE PGD Consortium. ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Hum Reprod.* 2005 Jan;20(1):35-48.
7. Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Donmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod.* 2002 Dec;17(12):3193-200.
8. Fiorentino F, Biricik A, Karadayı H, Berkil H, Karlıkaya G, Sertyel S, Podini D, Baldi M, Magli MC, Gianaroli L, Kahraman S. Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching. *Mol Hum Reprod.* 2004 Jun;10(6):445-60.
9. Fiorentino F, Magli MC, Podini D, Ferraretti AP, Nuccitelli A, Vitale N, Baldi M, Gianaroli L. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod.* 2003 Jul;9(7):399-410.
10. Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, Kuliev A. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil Steril.* 2004 Aug;82(2):292-4.
11. Tadmouri GO, Basak AN. Beta-thalassemia in Turkey: a review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. *Hemoglobin.* 2001 May;25(2):227-39.
12. Kuliev A, Verlinsky Y. Preimplantation HLA typing and stem cell transplantation: report of International Meeting, Cyprus, 27-8 March, 2004. *Reprod Biomed Online.* 2004 Aug;9(2):205-9.