

TALASEMİ VE PREİMLANTASYON GENETİK TANI

Prof.Dr.Semra Kahraman, Dr.Yaman Sağlam, Bio.Hüseyin Karadayı, Dr.Güvenç Karlıkaya
Memorial Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi, İstanbul
skahraman@superonline.com

Genetik hastalık taşıyıcısı olan aileler veya daha önce genetik hastalığı olan bir çocuğa sahip ailelerde doğacak bebeğin hasta olma riskini anlayabilmek için amniosentez veya koryon villus biyopsisi yapılmaktadır. Bu uygulamalar, oluşmuş bir gebeliğin 3. veya 4. ayında yapılmakta ve sonuçlar ileri gebelik haftalarında elde edilmektedir. Etkilenmiş bir bebeğin tanımlanması gebeliği sonlandırmayı gerektirmekte, bu durum ailede fiziksel ve psikolojik travmalara yol açmaktadır. Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) henüz gebelik oluşmadan, implantasyon öncesi embriyolarda genetik hastalıkların tanımlanmasını sağlayan bir yöntemdir. Hasta embriyolar gebelik öncesi elimine edildiklerinden ilerleyen haftalarda gebelik terminasyonu engellenmiş olmaktadır. PGT bu yönü ile prenatal tanıya alternatif oluşturmaktadır. Ancak bu yöntemin uygulanabilmesi için in-vitro fertilizasyon (IVF) tekniklerinin kullanılması gereklidir. Böylece elde edilen embriyolar arasından sağlıklı olanlar seçilerek transfer edilip gebelik oluşması amaçlanmaktadır.

“Talasemi major” ülkemizde en sık görülen genetik hastalıktır. PGT ile talasemi dahil tüm hemoglobinopatiler ve moleküler tanısı yapılmış birçok genetik hastalık tanımlanabilmektedir.

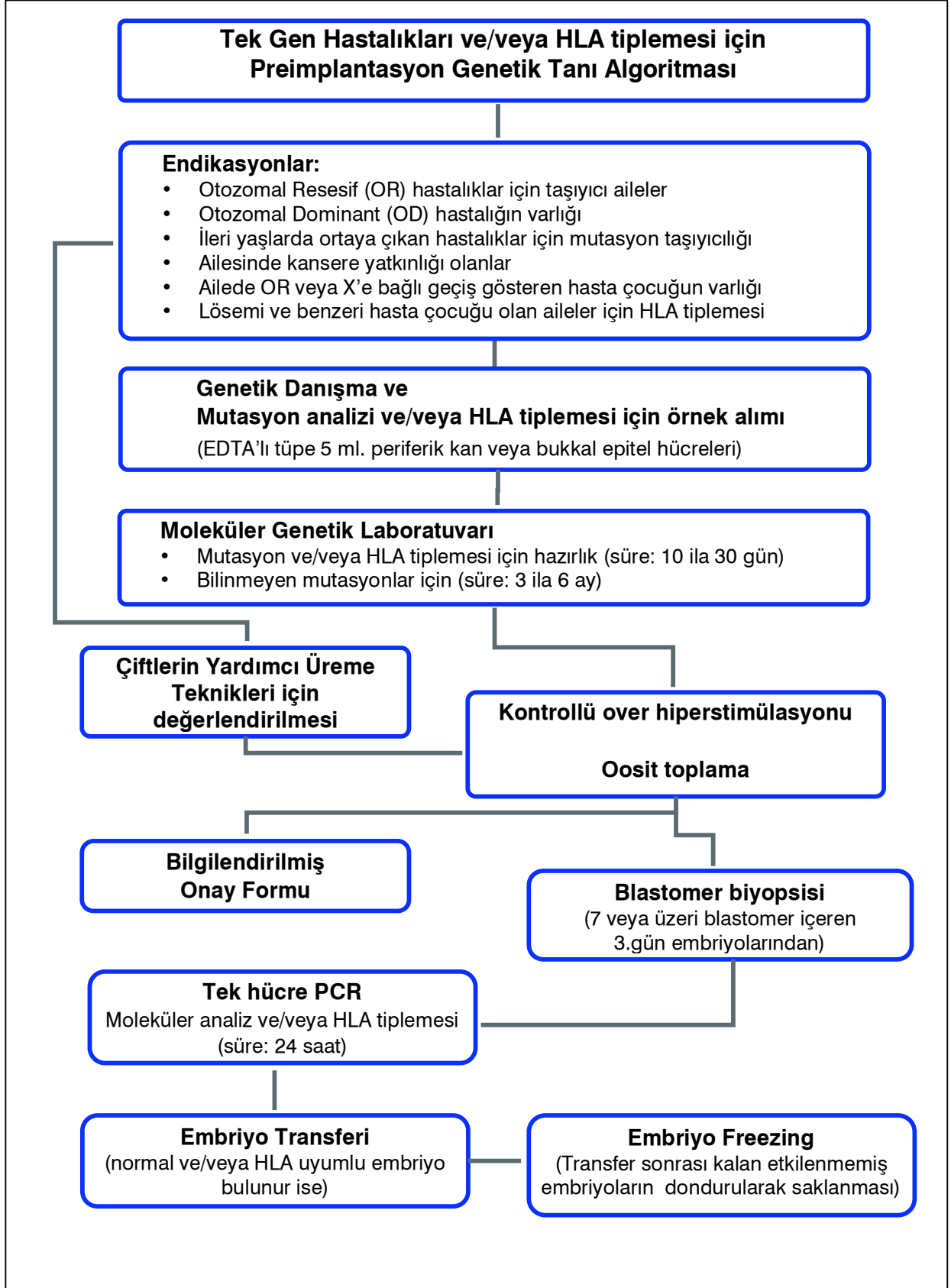
Kalıtsal hastalık taşıyıcısı olan çiftlerin tüp bebek yöntemi ile elde edilen embriyolarından alınan blastomerlerin DNA’sı “tek hücreden PCR” yöntemi ile çoğaltılmakta ve taranan hastalığa ait gen bölgesi dizi analizi yöntemi ile tanımlanabilmektedir. Sonuçta, kalıtsal hastalığı taşıyan embriyolar elenirken sağlıklı embriyoların transferi ile etkilenmemiş çocukların dünyaya gelmesi sağlanabilmektedir.

Talasemi ve lösemi gibi hastalıklarda, dizi analizi yöntemi ile sağlıklı embriyoların saptanmasının yanı sıra doku tiplemesi (HLA-typing) işlemi de aynı anda uygulanabilmekte ve embriyoların doku tipi belirlenebilmektedir. Talasemi hastalığı saptanmış çocuklara sahip ailelerde, anne, baba ve çocuğa ait doku tiplerinin belirlenmesinden sonra, hastalığı taşımayan embriyolar arasından doku tipi hasta çocuk ile uygun olanlar seçilebilmektedir. Bu yöntemle sağlanan gebeliklerde, sağlıklı doğan çocukların kordon kanı ve/veya kemik iliğinin kullanılabilmesi sayesinde hasta çocuklar tedavi edilebilmektedir. Aile bu şekilde prenatal tanı işlemi sonrasında uygulanabilecek gebelik sonlandırılmasına bağlı tıbbi ve psikolojik travmalardan da korunmaktadır.

Ayrıca; gebelik öncesi tanı, hasta kişilerin yaşam boyu karşılaştıkları sağlık problemleri, hastalıkların tedavisindeki güçlükler ve yüksek tedavi maliyetleri nedeniyle ailelerin sağlıklı çocuk sahibi olmalarını sağlaması ve hasta kişiler için tedavi şansı sunması nedeniyle çok önemli bir tekniktir. Günümüzde yapılmakta olan çalışmalar sonucunda hastalıkların genetik yapısının belirlenmesiyle birlikte çok daha fazla sayıda hastalığın embriyolarda tanımlanması mümkün olmuştur. Günümüzde 150’den fazla genetik hastalıkta PGT yapılabilmektedir.

PGT Uygulanmış Tek Gen Hastalıkları

Achondroplasia (FGFR3)	Hypophosphatasia (ALPL)
ADA (Adenosine Deaminase) deficiency	Incontinentia Pigmenti (KBKG-NEMO)
Adrenal hyperplasia	Kennedy Disease (AR)
Adrenoleukodystrophy (ABCD1)	Krabbe (GALC)
Agammaglobulinemia-Bruton (TyrsKnse)	LCHAD
Alpha Thalassaemia (HBA1)	Lesch-Nyhan (HPRT1)
Alpha-Antitrypsin (AAT)	Leukemia, Acute Lymphocytic (for HLA)
Alport Syndrome (COL4A5)	Leukemia, Acute Myelogenous (for HLA)
Alzheimer (very early onset-PSEN1)	Leukemia, Chronic Myelogenous (for HLA)
Beta Thalassaemia (HBB)	Leukocyte Adhesion Deficiency (ITGB2)
Bloom Syndrome (Blm)	Li-Fraumeni Syndrome (TP53)
Canavan Disease (ASPA)	Lymphoproliferative Disorder (X-linked)
Charcot-Marie-Tooth, type IA - IB	Marfan Syndrome (FBN1)
Charcot-Marie-Tooth Neuropathy - 2E	Menkes (ATP7A)
Charcot Marie Tooth Neuropathy - XL	Metachromatic Leukodystrophy (ARSA)
Choroideremia (CHM)	Mucopolysaccharidosis 2 (I-Cell)
Chronic Granulomatous Dz (CYBB)	Multiple Epiphyseal Dysplasia
Citrullinemia (ASS)	Myotonic dystrophy
Cleidocranial Dysplasia (RUNX2)	Myotubular myopathy
Congen. Adrenal Hyperplasia (CYP31A2)	Neurofibromatosis (NF1 & NF2)
Congen. Erythropoietic Porphyrria (UROS)	Niemann-Pick type C (NPC1)
Crigler Najjar (UGT1A1)	Ornithine Transcarbamilase Deficiency (OTC)
Cystic Fibrosis (CFTR)	Osteogenesis Imperfecta (COL1A1)
Darier Disease (ATP2A2)	Pachonychia Congenita (KRT16 & KRT6A)
Diamond Blackfan (DBA-RSP19)	Periventricular Heteropia (PH)
Duchenne muscular dystrophy (DMD)	Phenylketonuria (PKU)
Dystrophy Myotonica (DMPK)	Polycystic Kidney Disease (AR-PKD1) Polycystic
Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy	Kidney Disease (PKD1) Retinoblastoma 1 (RB1)
Epidermolysis bullosa	Retinitis pigmentosa
Epidermolytic Hyperkeratosis (KRT10) Factr	Rhesus blood group D (RHD)
F13 Deficiency (F13A1)	Rhizomelic Chondrodysplasia Puncta RCDP1
Familial Adenomatous Polyposis (APC)	Sacral Agenesis (HLXB9)
Familial Dysautonomia (IKBKAP)	Sanfilippo A (MPSIIIA)
Fanconi Anemia A (FANCA)	Sandhoff disease
Fanconi Anemia C (FANCC)	SCID-X1 (SevereCmbndImmuneDefic - IL2RG)
Fanconi Anemia F (FANCF)	Shwachman-Diamond Syndrome (SBDS)
Fanconi Anemia G (FANCG)	Sickle Cell (HBB)
Fragile X (FMR1)	Smith-Lemli-Opitz (SLOS)
Friedreich Ataxia I (FRDA)	Spinal muscular atrophy (SMN1)
Gaucher Disease (GBA)	Spinocerebellar Ataxia-3 (SCA3)
Glycogen Storage disease, type 1A	Spinocerebellar ataxia2 (SCA2)
Glutaric Acidemia - 2A	Tay-Sachs (HEXA)
Hemophilia A (F8)	Treacher Collins (TOCF1)
Hemophilia B (F9)	Tuberous Sclerosis 1 (TSC1)
Hunter syndrome (IDS)	Von-Hippel Lindau
Huntington Disease (HD)	Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS)
Hurler Syndrome (MPSI-IDUA)	X-linked hydrocephalus
Hyper IgM (CD40-ligand; TNFSF5)	



Kalıtsal bir hastalığa neden olan genetik bozukluğun embriyolarda tanımlanması için hastalığa neden olan genin yapısının belirlenmiş olması gerekmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu B-talasemi, Hemofili, Kistik Fibrosis, Orak Hücre Anemisi gibi hastalıklara sebep olan ve ayrıca p53 ve retinoblastoma gibi kanserle ilişkisi olan bir çok genin yapısı belirlenmiş ve bunların genetik tanısına yönelik yöntemler geliştirilmiştir.

Hastalığa neden olan gene ait DNA yapısı incelenmeden önce o gen bölgesinin çoğaltılması gerekmektedir. PCR adı verilen özel bir yöntem sayesinde incelenen gene ait bölgenin çok kısa bir süre içerisinde milyonlarca kopyası elde edilebilmekte ve yapısı incelenebilmektedir. Çoğaltılmış olan bu gen bölgeleri özel sistemler kullanılarak dizi analizi (DNA sequencing) işlemine alınmakta ve tüm baz dizileri belirlenebilmektedir.

Dizi analizi yöntemiyle hastalığa neden olan ve mutasyon adı verilen kalıcı değişiklikler çok daha hassas ve etkili bir şekilde saptanabilmektedir. Bu sistemde DNA örnekleri öncelikli olarak özel bazı boyalarla işaretlenir. Sonrasında işaretlenmiş DNA örnekleri bir lazer okuyucu tarafından belirlenir ve elde edilen veriler bilgisayara aktarılır. Böylece genetik yapıdaki bozukluk belirlenmiş olur. Günümüzde β -talasemi, orak hücre anemisi, kistik fibrozis, hemofili gibi hastalıklara neden olan mutasyonlar belirlenmiştir. Bu hastalıklarda dizi analizi yönteminin kullanılması ile diğer DNA analizlerinin aksine mutasyonların büyük bir kısmı tespit edilebilmektedir.

PGT ile tek gen hastalıklarının tanısı ve HLA tiplemesi ilk kez Türkiye’de İstanbul Memorial Hastanesi (İMİH) Genetik Tanı Merkezinde yapılmış, yaklaşık üç yılda 237 PGT siklusunda 29 farklı hastalık için çalışılmıştır. 2006 yılı sonuçlarımız itibarı ile merkezimiz bu konuda çalışan dünyadaki dört merkezden biri konumundadır.

Hastalıklara göre dağılım aşağıda tabloda verilmiştir; İşaretlenmiş olanlarda HLA tiplemesi de çalışılmıştır.

	Hastalık Adı	Siklus		Hastalık Adı	Siklus
1	β Thalassemia	156	16	Fragile-X	2
2	Cystic Fibrosis	7	17	Huntington	1
3	Sickle Cell Anemia	7	18	H-IGM	1
4	SMA Type1	8	19	MTHFR	1
5	San Filippo Type IIIA	5	20	Neimann Pick (SMPD1)	1
6	San Filippo Type IIIB	1	21	Li-Fraumeni (p53)	1
7	NF1	3	22	Charcot-Marie Tooth	1
8	FMF	3	23	Retino Blastoma	1
9	Mucopolysaccharidosis (MPS6)	2	24	Wiscott Aldrich Syndrome	1
10	G6PD	1	25	Histiocytosis	3
11	Spastic Paraplasia	1	26	Diamond Blackfan Anemia	8
12	LMD	1	27	X Linked ALD	3
13	Tuberoclerosis	1	28	ALL	7
14	Tay Sacs	1	29	AML	8
15	FVII	1		TOPLAM	237

Beta-Talasemide Genetik Yapı

Hemoglobini oluşturan fraksiyonlar Anormal Hemoglobinler bahsinde verilmiştir. Bu genler 11. ve 16 kromozomda yer almaktadırlar. 11. kromozomda Beta globin kümesi yer almaktadır ve bu bölgeyi LCR bölgesi "Locus Controlling Region" kontrol etmektedir.

Bu genlerin dizi analizi gerçekleştirilmiş olup, bu güne kadar 150'nin üzerinde Beta Talassemia mutasyonu tanımlanmıştır. Bunların analizi değişik moleküler teknikler kullanılarak yapılmaktadır. Türkiye'de en sık görülen beta talasemi mutasyonları:

- IVS I -110 G/A (41.07 %)
- IVS II -1 G/A
- IVS II -745 C/G
- COD 8 -AA
- COD 8/9 +G
- IVS I -6 T/C
- IVS I -1 G/A'dır.

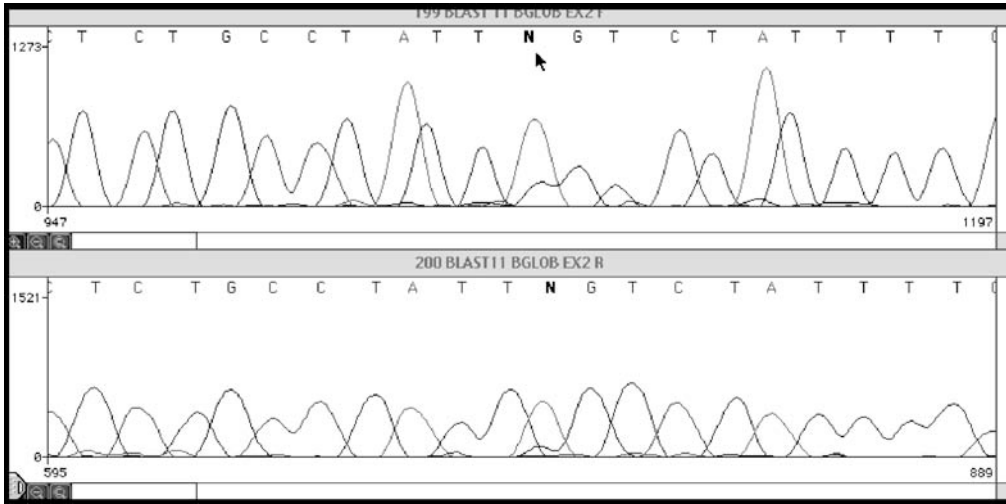
Bu mutasyonlar ile klinik gidiş arasında çok yakın bir ilişki mevcuttur Bunların dışında sadece Türkiye'de belirlenen mutasyonlar bulunmaktadır. Ör: COD 74/75 -C; 22-24 delesyon; 13 bp del; COD 9/10 +C.

Beta-Talasemide Klinik- Mutasyon İlişkisi

Klinik	B-Talasemi Aleli
1. Sessiz B-Talasemi	-101 C/T
2. Hafif B-Talasemi	-87 C/G
	-30 T/A Promotor
	-28 A/C mutasyon
	IVS I -6 T/C
	AATAAA-AATGAA (Poly A mutasyonu)
3. Orta Ağırlıkta	COD8 -AA
	IVS II -1 G/A (Yüksek HbF)
4. Ciddi B-Talasemi	IVS I -110 G/A

İMİH Genetik Tanı Merkezinde çalışılmış Talasemi mutasyonları aşağıda verilmiştir;

1	IVS I -110 G/A	11	COD8/9 +G
2	IVS I -6T/C	12	IVS I -5 T/C
3	IVS I -1 G/A	13	IVS I -5 G/C
4	COD39 C/T	14	Poly A
5	COD6 A/T	15	COD82 -G
6	COD8 -AA	16	COD44 -C
7	IVSII -1 G/A	17	IVS I -130 G/C
8	IVSII -745 C/G	18	COD17 A/T
9	COD5 -CT	19	COD30 G/C
10	-30 T/A	20	- 86 C/A

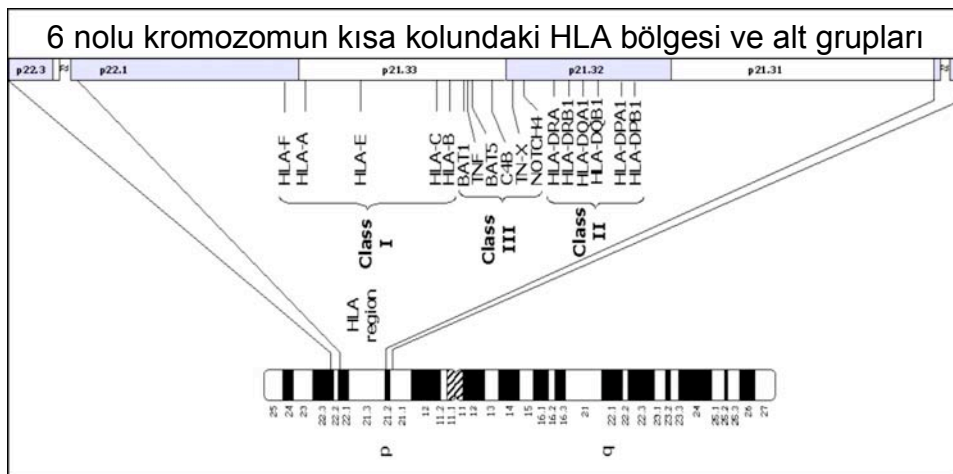


Dizi Analizi ile embriyoya ait hücrede IVS I-110 mutasyonunun saptanması HLA nedir?

İlk kez lökositlerde gösterilmiş olmalarından dolayı “Human Leukocyte Antigens-İnsan Lökosit Antijenleri (HLA)” olarak adlandırılan antijen grubudur. HLA antijenlerinin oluşması, organizmada “Majör Histokompatibilite kompleksi-(MHC)” adı verilen bir gen bölgesinin kontrolü altındadır. Üç ana gruba ayrılan bu bölgede;

- MHC Sınıf-I (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G),
- MHC Sınıf-II (HLA-DR, -DP, -DQ, -DO, -DN) ve
- MHC Sınıf-III (C2, C4A, C4B, PF, TNF- a, b) antijenleri yer almaktadır.

İnsanda 6 nolu kromozom (6p21.3) üzerinde bulunan MHC gen bölgesindeki HLA allelleri ve ürünleri HLA antijeni olarak ifade edilirler. HLA antijenleri kişiye göre farklılık gösterirler. HLA antijenlerinin en önemli kullanım yeri doku ve organ transplantasyonlarında, doku uygunluğunun araştırılmasıdır. Ayrıca, babalık tayininde, kan grubu antijenleri ile birlikte kullanılabilir. Son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan diğer konu HLA antijenlerinin hastalıklarla olan bağlantısıdır. Belirli HLA tipleri bazı hastalıklarda yüksek sıklıkta görülmektedir. İnsanlarda enfeksiyonlara yatkınlıktan genetik faktörler sorumlu olduğu kadar, patojen antijenlere karşı hücresel ve sistemik bağışıklıkta da yine genetik geçiş söz konusudur.



HLA Uyumlu olan embriyoların seçimi ve transferi

PGT yöntemi ile belirli HLA tipine sahip embriyolar saptanarak transfer edilebilmektedir. Bu teknik ilk olarak Verlinsky ve ekibi tarafından (2001) kızları Fankoni anemisi olan bir çiftte PGT yöntemi kullanılarak uygulanmıştır (otozomal resesif geçiş özelliği gösteren bu tür hastalıklarda kemik iliği etkilendiğinden hematopoiesis için transplantasyona gerek vardır). Kord kanı transplantasyonu, şayet verilen kord kanı HLA açısından alıcıya uygunsa etkin bir seçenektir.

Günümüzde bu tür hamileliklerde uygulanan PGT sonucuna göre her IVF denemesinde sınırlı sayıda embriyonun transfer edileceği düşünülecek olursa, embriyoların sadece tek gen hastalığı açısından değil HLA uygunluğu açısından da seçilmesi gerekmektedir. Böylelikle yüzde 18' i HLA açısından uygun olacak embriyoların seçimi yapılır.

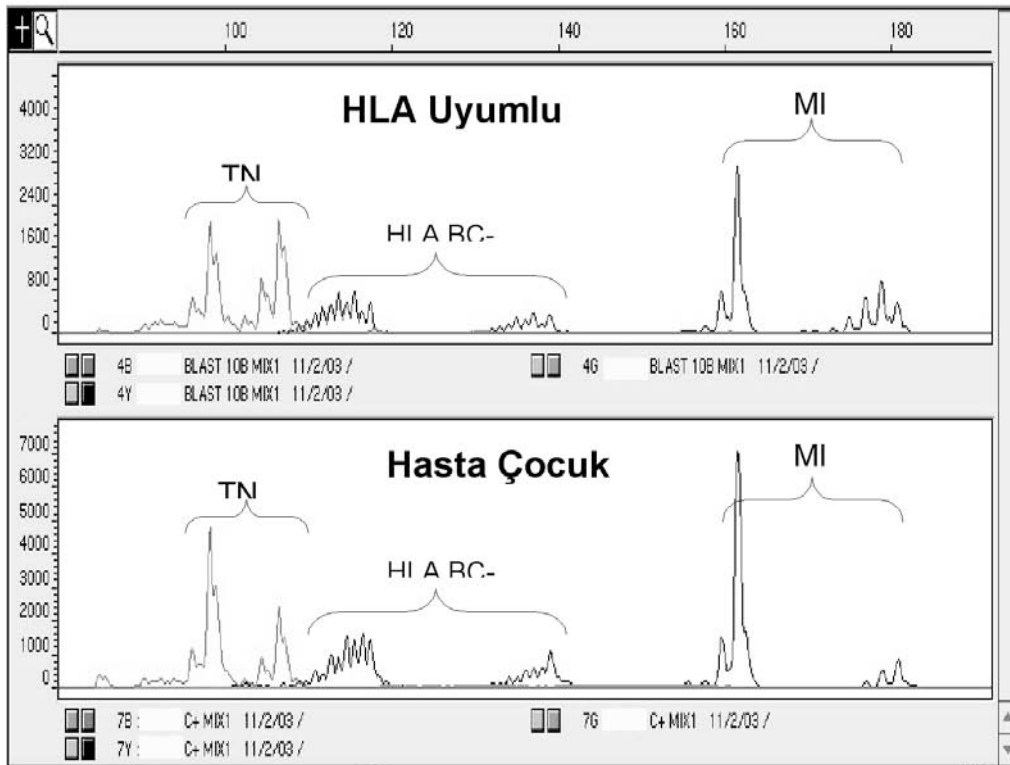
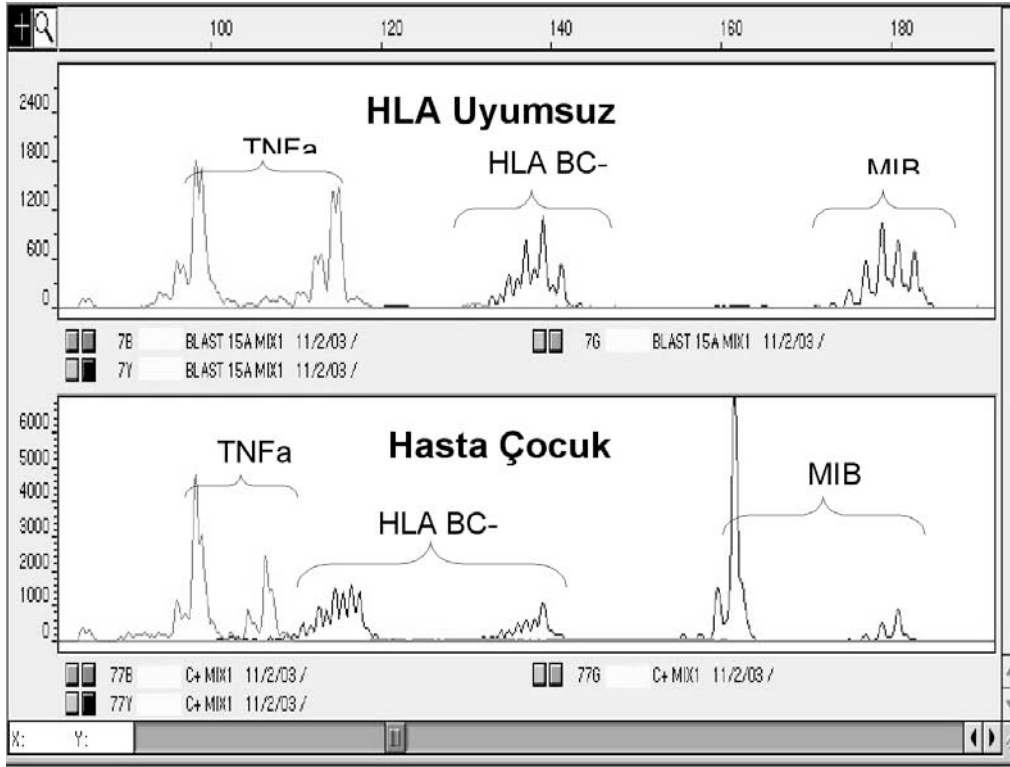
ART ve PGT kombinasyonu uygulanacak çiftlerde önceden yapılacak değerlendirmeler tedaviden elde edilecek sonuçların belirlenmesi ve çiftlerin doğru bilgilendirilmesi açısından önemlidir. Özellikle embriyoda PGT ve HLA doku tipleni yapılacak olgularda bu koşullara uygun embriyo elde etme oranı %18 civarında olduğundan bu çiftlerin yumurtalık rezervi yönünde çok iyi değerlendirilmesi gerekmektedir.

Taşıyıcılığın yüksek olduğu ülkelerde, Preimplantasyon Genetik Tanı talasemili çocuk doğumlarını önlemede prenatal tanı yöntemlerine göre avantajlı bir seçenek haline gelmiştir. PGT işlemiyle beraber HLA doku tipleni de yapıldığında, genetik hastalık açısından sağlıklı ve etkilenmiş kardeşiyle HLA uyumlu bir doğuma olanak tanımaktadır. Doğum sırasında göbek kordonundan elde edilen verici kök hücreleri veya kemik iliğinden elde edilecek hematopoetik kök hücreler hastalıklı kardeşe nakledilerek kalıcı tedavi sağlanabilmektedir.

PGT işlemi için 7 veya daha fazla blastomer içeren, tüp bebek yöntemi ile elde edilmiş embriyolardan blastomer biyopsisi yapılması gerekir. Daha az sayıda blastomer varlığında biyopsi ile alınacak bir veya iki blastomer embriyonun ileri gelişimini yavaşlatabilmektedir. Embriyo biyopsisi için uygun embriyo gelişiminin sağlanmasında seçilecek ovulasyon indüksiyon protokolü kadar IVF embriyoloji laboratuvarındaki in-vitro koşulların uygun olması da önemli rol oynamaktadır.



Embriyo Biyopsisi Aşamaları
PGT yönteminde hasta çocuk ile doku (HLA) uyumlu embryoların tespit edilmesi;



	Hastalık Adı	Siklus (n)	Vaka (n)	Gebelik (n)
1	β Thalassemia	127	68	31
2	Wiscott Aldrich Syndrome	1	1	1
3	Histiocytosis	3	1	1
4	Diamond Blackfan Anemia	8	2	2
5	X-Linked ALD	3	3	1
6	ALL	7	7	1
7	AML	8	4	2
	TOPLAM	157	86	39 (%36.1)

İMİH Genetik Tanı Merkezinde HLA tiplemesi çalışılmış hastalıklar

İMİH Genetik Tanı Merkezinde HLA tiplemesi çalışılmış hastalıklar

PGT adaylığı bulunan çiftlerde implantasyon ve gebelik eldesi yönünde başarıyı etkileyen birçok faktör söz konusudur. Bu faktörler PGT yapılmaksızın ART uygulanacak çiftlerdeki başarıyı etkileyen faktörlerle benzerlik göstermektedir. Aradaki en önemli fark genetik hastalık ve kromozom bozukluğu olan ve yüksek oranda anormal embriyo tanımlanan olgularda, transfer edilebilecek embriyo olmaması veya çok düşük sayıda normal embriyo bulunabilmesidir. Özellikle yumurtalık rezervi kısıtlı olan genç veya ileri yaştaki kadınlar ve embriyoda genetik hastalık için mutasyon analizi ve HLA doku tiplemesi yapılan çiftlerde az sayıda transfer için uygun embriyo elde edilmektedir.

PGT başarısı yönünden riskli olan durumlar:

- Azalmış yumurtalık rezervi
- İleri kadın yaşı
- Geç veya erken yumurtalık yetmezliği (POF)
- Geçirilmiş yumurtalık cerrahisi
- Şiddetli endometriozis
- Daha önce ART' ye kötü yanıt
- Ağır sigara kullanıcısı olmak
- Obezite
- PGT ve HLA doku tiplemesinin birlikte yapıldığı olgular
- PGT endikasyonuna ilaveten çiftin infertilite sorununun bulunması

ART ve PGT kombinasyonu özellikle talasemi tanısı ve HLA doku grubu uygunluğu saptanması amacı ile uygulandığında ciddi teknolojik alt yapı ve bilgi birikimi gerektirdiğinden zaman alıcı, yorucu ve yüksek maliyetli işlemler olduğundan seçilecek çiftlerin ART için uygunluğu önem kazanmaktadır.

PGT ve ART uygulaması yapılacak çiftlerde yumurtalık rezervi yönünden önemli kriterler:

- Yaş
- Yumurtalık rezervinin değerlendirilmesi
- USG ile bazal antral folikül sayısı
- Bazal hormon değerleri

- Önceki ART uygulamasına yanıt
- Detaylı pelvik ultrasonografi
- Detaylı semen analizi
- Vücut kitle indeksinin belirlenmesi
- Mutasyon taraması

Bu amaçla menstruel siklusun erken döneminde (2. veya 3. gün) yapılacak olan ultrasonografik yumurtalık rezerv değerlendirmesi ve bazal hormon incelemesi (FSH ve E2) ART' ye alınacak yanıtı önceden tahmin etmek yönünde değerli bilgiler sağlamaktadır. Her iki yumurtalıkta toplamda 10'un altında follikülü bulunan ve/veya E2 ve FSH hormon değerlerinin normalden yüksek bulunduğu olgularda muhtemel kötü yumurtalık yanıtı hakkında önceden bilgilendirme yapılması gereklidir.

Yaş ve yumurtalık rezervinin değerlendirilmesi çifte verilecek olan uygun Konrollü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH) protokolünün seçilmesi için önemlidir. Kötü yanıt verebilecek olgularda henüz ideal bir ilaç protokolü gösterilmemiş olmasına rağmen yumurtalık baskılanmasının daha ılımlı olduğu protokoller tercih edilmelidir.

Elde edilen sonuçlar ve işlemin güvenilirliği, genetik hastalık taşıyıcısı çiftlerin sağlıklı çocuk sahibi olmalarının yolunu açmaktadır, sağlıklı ve/veya HLA uyumlu embriyolar bulunduğu takdirde kabul edilebilir gebelik sonuçlarına ulaşmak mümkündür,

Sonuç olarak; Preimplantasyon Genetik Tanı ve HLA tiplemesi işlemi, hematopoetik kök hücre transplantasyonuna ihtiyaç duyan hemoglobino patili çocukların tedavisi için umut verici ve etkili bir tedavi yöntemidir.

Kaynaklar

1. Baetens P, Van de Velde H, Camus M, Pennings G, van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers I. (2005) HLA-matched embryos selected for siblings requiring haematopoietic stem cell transplantation: a psychological perspective. *Reprod Biomed Online* 10(2):154-63.
2. Edwards RG. (2004) Ethics of PGD: thoughts on the consequences of typing HLA on embryos. *Reproductive Biomedicine Online* 9; 222-224.
3. Fiorentino F, Kahraman S, Karadayi H, Biricik A, Sertyel S, Karlikaya G, Saglam Y, Podini D, Nuccitelli A, Baldi M. (2005) Short tandem repeats haplotyping of the HLA region in preimplantation HLA matching. *Eur J Hum Genet* 13(8):953-958.
4. 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. *Mol Hum Reprod* 10; 445-460.
5. Fiorentino F., Magli M.C., Podini D., Ferraretti A.P., Nuccitelli A., Vitale N., Baldi M., and Gianaroli L. (2003) The minisequencing method: An alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders. *Mol Hum Reprod* 9: 399-410.
6. Gaziev J, Lucarelli G. (2005) Stem cell transplantation for thalassaemia. *Reprod Biomed Online* 10; 111-115.

7. Kahraman S, Karlikaya G, Sertyel S et al. (2004) Clinical aspects of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders combined with HLA typing. *Reproductive Biomedicine Online* 9; 529-532.
8. Kahraman S, Findikli N, Karlikaya G, Sertyel S, Karadayi H, Saglam Y, Fiorentino F. (2006) Medical and social perspectives of preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders and/or HLA typing. *Reproductive Biomedicine Online*; (accepted for publication).
9. Kuliev A and Verlinsky Y. (2004) Preimplantation HLA typing and stem cell transplantation: report of international meeting Cyprus. 27-28 March 2004. *Reproductive Biomedicine Online* 9; 205-209.
10. Kuliev A, Rechitsky S, Tur-Kaspa I et al. (2005) Preimplantation genetics: improving access to stem cell therapy. *Annals New York Academy of Sciences* 1054; 223-227.
11. Kuliev A, Verlinsky Y. (2005) Place of preimplantation genetic diagnosis in genetic practice. *American Journal of Medical Genetics* 134; 105-110.
12. Kuliev A, Rechitsky S, Verlinsky O, Tur-Kaspa I, Kalakoutis G, Angastiniotis M, Verlinsky Y. (2005) Preimplantation diagnosis and HLA typing for haemoglobin disorders. *Reprod Biomed Online* 11(3):362-370.
13. Pennings G, de Wert G. (2003) Evolving ethics in medically assisted reproduction. *Human Reproduction Update* 9; 397-404.
14. Pennings G, Schots R and Liebaers I. (2002) Ethical considerations on preimplantation genetic diagnosis for HLA typing to match a future child as a donor of hematopoietic stem cells to a sibling. *Human Reproduction* 17; 534-538.
15. Qureshi N, Foote D, Walters MC, Singer ST, Quirolo K, Vichinsky EP. (2005) Outcomes of preimplantation genetic diagnosis therapy in treatment of beta-thalassemia: A retrospective analysis. *Ann N Y Acad Sci.*1054:500-503.
16. Rechitsky S, Kuliev A, Tur-Kaspa I, Morris R, Verlinsky Y. (2004) Preimplantation genetic diagnosis with HLA matching. *Reprod Biomed Online* 9(2):210-221.
17. Rechitsky S, Kuliev A, Sharapova T et al. (2006) Preimplantation HLA typing with aneuploidy testing. *Reproductive Biomedicine Online* 12; 89-100
18. Simon A, Schenker JG. (2005) Ethical consideration of intentioned preimplantation genetic diagnosis to enable future tissue transplantation. *Reproductive Biomedicine Online* 10; 320-324.
19. Simpson JL. (2001) Changing indications for preimplantation genetic diagnosis (PGD) *Molecular and Cellular Endocrinology* 183 (suppl.1); S69-S75.
20. 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 beta-thalassaemia in combination with HLA matching of embryos. *Hum Reprod* 19(3):700-8. Epub 2004 Jan 29.
21. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W et al. (2000) designer babies – are they a reality yet? Case report: Simultaneous preimplantation genetic diagnosis for Fanconi anemia and HLA typing for cord blood transplantation. *Reproductive Biomedicine Online* 1; 31.
22. Verlinsky Y, Rechitsky S, Sharapova T, Morris R, Taranissi M, Kuliev A. (2004) Preimplantation HLA testing. *JAMA* 291(17);2079-85.