

Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) Kimlere Yapılmalıdır

- 36 yaş ve üzeri yaştaki anne adaylarına
- İki veya daha çok tüp bebek uygulanmasına rağmen gebelik elde edilememiş çiftlere
- Tekrarlayan erken gebelik kayıpları (düşükleri) olan çiftlere (translokasyon taşıyıcılığı dışı sebepli)
- Dengeli translokasyon taşıyıcısı çiftlere
- Ailevi Akdeniz anemisi, Orak Hücre Anemisi, Kistik fibrozis, SMA gibi tanısı mümkün olan bazı tek gen hastalıkları yönünden risk taşıyan eşlere
- Aile bireyleri ile HLA uyumlu embriyonun seçilmesi
- Önceki gebeliklerinden genetik hastalıklı bir çocuk sahibi olan çiftlere
- Anöploidili (kromozom bozukluğu bulunan) gebelik öyküsü olan annelere
- Gonadal mozaizm (İki yada daha çok aynı anormalliğe sahip doğum ürününe rağmen eşlerin genetik test sonuçlarının normal olması) olgularına
- TESE olguları (şiddetli erkek infertilitesi ile birlikte olan olgular)
- Poor responder'lar (hiperstimulasyon protokolüne yetersiz cevap veren olgular)
- X kromozomuna bağlı geçiş gösteren hastalıkların tanısında

Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) yönteminin bazı endişe ve dezavantajları bulunmaktadır:

- Hazırlık ya da biyopsi aşamasında bazı teknik problemler yaşanabilir
- Başarılı bir IVF ve PGD işlemi yapılsa bile transfer sonrası gebelik oluşmayabilir.
- Tek bir hücrenin analiz sonuçları mozaizmden kaynaklı olarak teşhis edilememiş ya da sınırlı olabilir (embriyonun blastomerlerinde farklı içerikler olmasından dolayı). Bu nedenle prenatal teşhis ile sonuç onaylanmalıdır.
- Sadece belirli sayıda kromozom kontrol edilebildiğinden tüm kromozomal ve genetik anormallikler PGD ile teşhis edilemez.
- Sonuç olarak biyopsisi yapılmış hücrede sadece belirli bir test yapılabilmektedir. Test için alınmış tek bir hücre ile de genetik sorunların tümü taranamaz.

Embriyo Analiz Yöntemleri

PGT işlemi embriyoların 3 farklı gelişim evresinde uygulanabilir: döllenme öncesi ve sonrası dönemde polar hücre analizi, bölünme aşamasında blastomer analizi ve son olarak blastosist dönemde trofektoderm dokusu (trofoblast hücreleri) analizi (Şekil 1A,1B,1C). Bu yöntemler tek başlarına veya tanıyı doğrulamak amacıyla birlikte de kullanılabilir. Kullanılan biyopsi teknikleri ve laboratuvar çalışanlarının tecrübesi, biyopsi sonrası embriyo gelişiminde çok önemli rol oynar. Klinik, embriyoloji ve genetik laboratuvarının standartlarını yüksek tutması sonuçları etkileyen en önemli faktörlerin başında gelmektedir.



Şekil 1: Polar hücre biyopsisi (A), 8-10 hücreli bölünme aşamasında embriyoya uygulanan blastomer biyopsisi (B), blastosist aşamasında embriyoya uygulanan trofektoderm biyopsisi (C).

a. Polar hücre analizi

Polar hücreler yumurta hücresinin olgunlaşması ve döllenmesi sonrasında atılan yan ürünlerdir. IVF tedavisine giren 35 yaş ve üzeri kadınlarda 1. ve 2. polar hücrelerin analizi sonrasında, incelenen yumurtaların yarısından fazlası kromozomal bozukluk taşır. Özellikle Down Sendromlu bebek dünyaya getirme sıklığı 35 yaş ve üzeri kadınlarda oldukça hızlı bir artış gösterir. Bu nedenle polar hücrelerin kromozomal olarak incelenmesi ileri yaşta az sayıda yumurtası olan anne adaylarında anneden kaynaklanan kromozomal problemlerin tanısında önemli bir yere sahiptir.

b. Blastomer analizi

Döllenmeden yaklaşık 68-72 saat sonra ve en az 6-8 hücre aşamasına gelmiş embriyolara uygulanan bu yöntem (Şekil 1B), embriyonik gelişimin 3. gününde blastomer adı verilen hücrelerden birinin alınması ile gerçekleştirilir. Blastomer biyopsisi, anne/baba geçişli otozomal çekinik/baskın tek gen hastalıklarında, HLA doku tiplleme, translokasyon (yapısal kromozom anomalisi) taşıyıcılığı, ileri anne yaşı, tekrarlayan düşükler, tekrarlayan tüp bebek başarısızlıkları gibi geniş bir endikasyon grubuna uygulanabilmektedir.

c. Blastosist dönemde trofektoderm doku analizi

Son yıllarda daha çok tercih edilen bu yöntem, bir defada daha çok hücrenin analizinin yapılmasını ve gebelik oranlarının artırılmasını sağlamaktadır. Embriyonik gelişimin 3. gününde mekanik, kimyasal veya lazer yöntemlerinden biri kullanılarak meydana getirilen açıklık sayesinde (assisted hatching), embriyonik gelişimin 5. gününde kolaylıkla biyopsi yapılması sağlanır. Trofektoderm biyopsi yöntemi diğer yöntemlere göre birçok noktada üstünlük sağlar. İncelenen hücre sayısı genetik testlerde ve özellikle moleküler analizlerde kritik öneme sahiptir. Trofektoderm doku biyopsisi ile alınan ortalama 4-5 hücrenin analizi sonuç verme oranının yükselmesini sağlar ve tekniksel sorunları da minimuma indirmiş olur. Bu sayede embriyoda hem anneden hem de babadan gelebilecek genetik bilgiler embriyodan kritik hücreler alınmadan incelenmektedir. Embriyolar blastosist aşamasına kadar kültüre edildiklerinde kromozomal anomaliye sahip embriyolar elenir ve başlangıçtaki embriyoların ancak sınırlı bir bölümü blastosist aşamasına ulaşabilir. Ancak, gelişim sırasında elenen ve blastosiste ulaşamayan embriyoların hem

yüksek oranda genetik bozukluk taşıdığı hem de tutunma potansiyellerinin düşük olduğu göz önüne alındığında bu doğal seçim bir avantaj olarak değerlendirilmelidir. Yüksek implantasyon (ana rahmine tutunma) potansiyeli olan daha az sayıdaki embriyoların transferiyle çoğul gebeliklerin de engellenmesi sağlanmış olur.

Tek gen hastalıkları

Tek gen hastalıkları, tek bir gende meydana gelen mutasyon veya malformasyon sonucu oluşan hastalıklardır. Bugüne kadar yaklaşık 4000'e yakın tek gen hastalığı tanımlanmıştır. Otozomal dominant, otozomal resesif, X kromozomuna bağlı dominant ve resesif Y kromozomuna bağlı ve mitokondrial kalıtımla geçiş gösterebilirler.

Ülkemizde Akdeniz anemisi, beta-talasemi gibi otozomal resesif geçiş gösteren türde hastalıkların daha embriyo aşamasında (preimplantasyon tanısı) tanımlanması büyük önem arz etmektedir. Bu yöntem, ilgili kromozom bölgesinin tanımlandığı her tek gen hastalığı için uygulanabilir. Bunlara postnatal (doğum sonrası) ve/veya prenatal (doğum öncesi) tanı ile analiz edilebilen tek gen hastalıklarının tümü dahildir.

Tablo 1: PGT uygulanabilen hastalıkların listesi

OTOZOMAL RESESSİF

Kistik fibrozis (various mutations)
Tay Sachs hastalığı
 β -talassaemi
Orak hücreli anemi
Rh grubu tayini
Spinal müsküler atrofi
Adrenogenital sendrom
Konjental adrenal hiperplazi
Epidermolizis büllöza
Gaucher hastalığı
Fanconi anemisi
HLA uyumu
Üçlü tekrar hastalıkları
Frajile X
Miyotonik distrofi
Huntington hastalığı

OTOZOMAL DOMINANT

Marfan sendromu
Charcot-Marie Tooth hastalığı (type 1A)
Crouzons sendromu
NF2
Osteogenesis impeerfekta I and IV
Stickler sendromu
Tuberoz skleroz
Familyal adenomatöz polypozis koli
Li Fraumeni sendromu
Retinoblastoma

X'e bağlı

Lesch Nyhan sendromu
Duchenne kas distrofisi
Charcot-Marie Tooth hastalığı
Retinitis pigmentoza
Ornitin Transkarbamilaz
Hemofili
Agammaglobulinemi
Alport sendromu
Hunter sendromu MPSII
Oro-facial-digital sendrom tip I

Tek hücre PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) Yöntemi

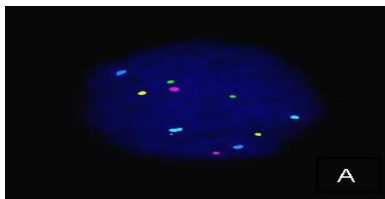
Biyopsi yapılarak alınan blastomer hücreleri, içerisinde lysis (eritme) solüsyonu bulunan PCR tüplerine aktarılmaktadır. Bu yolla serbest kalan saf DNA molekülü, hastalığın bulunduğu genetik bölgeyi milyonlarca kopya halinde çoğaltmaya yarayan özel dizayn edilmiş primerler kullanılarak Tek Hücre PCR'ı dediğimiz bir dizi enzimatik reaksiyon uygulanmakta ve bu işlemi takiben mutasyon analiziyle sağlıklı veya hastalıklı embriyolar ayırt edilebilmektedir.

Kullanılan yöntem tek bir zincirden oluşan genetik materyalden milyonlarca kopya çıkaracak kadar hassas dizayn edildiği için, dışarıdan gelebilecek her türlü kontaminasyona karşı titizlikle çalışılmalıdır. Laboratuvarımız, Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) ve Preimplantasyon Genetik Tanı Uluslararası Topluluğu (PGDIS)'nun kalite standartlarını takip etmektedir.

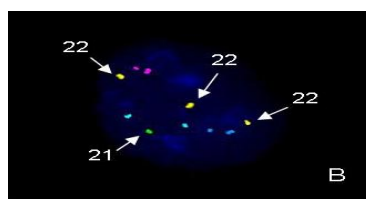
FISH tekniği

Anöplodi (sayısal kromozom bozuklukları) ve translokasyonların (yapısal kromozom bozuklukları) tayini için çoğunlukla FISH tekniği kullanılır. Bu teknik, biyopsi uygulanan hücrelerin cam lama fiksasyonu ile hücre çekirdeğinin eldesi, floresan işaretli prob uygulaması sonrası denatürasyon, hibridizasyon, hibridizasyon sonrası bağlanmayan problemlerin uzaklaştırılması için yıkama, kontrast madde (counterstain) uygulaması ve analiz aşamalarından oluşur. Merkezimizde 13,16,17,18,21,22, X ve Y kromozomlarından oluşan ve spontan düşüklerde en sık rastlanan komozomal anomalilerin tespitine dayanan paneller kullanılmakta, bu panel ile de embriyolarda oluşabilecek, kromozomal anomalilerin büyük bir bölümü saptanabilmektedir.

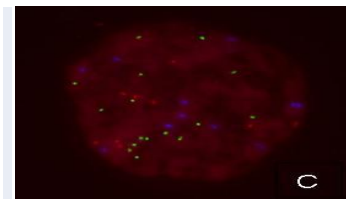
Sınırlı sayıda kromozomun incelendiği FISH yöntemine alternatif olarak karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH, comparative genomic hybridization) yöntemi embriyolarda tüm kromozomların incelenmesini mümkün kılar. Ancak, tekniğin önemli bir dezavantajı vardır o da işlemin uzun sürmesi (yaklaşık 4-5 gün) sebebiyle embriyonun dondurulması zorunluluğunu getirmesidir. Son yıllarda CGH ile aynı prensibe dayanan fakat array tabanlı bir sistem olan array-CGH yönteminin geliştirilmesi ile işlem süresi 48 saate kadar indirilmiş ve bir önceki yönteme göre çözünürlük de yükseltilmiştir. Tekniğin oldukça pahalı bir yöntem olması, optimizasyonunun zaman alması, sonuçların yorumlanması, analizdeki zorluklar, özel eğitilmiş personel ve uygun laboratuvar altyapısı gerektirmesinden dolayı rutin kullanımı ile ilgili tecrübeler çok sınırlı kalmıştır. Bu nedenle FISH tekniği ile sayısal ve yapısal anomalilerin tespiti, halen en yaygın, ekonomik ve pratik bir yöntem olma avantajını korumaktadır.



Normal



Monozomi 21, Trizomi 22



Kompleks Anöploid

Şekil: Normal (A) ve Anormal (B, C) blastomer FISH görüntüleri: Analiz edilen kromozomlar; 13 (kırmızı), 16 (açık mavi), 18 (mavi), 21 (yeşil), 22 (sarı). “Normal” (A), “Monozomi 21, Trizomi 22” (B), ve “kompleks anöploid” (C) olarak değerlendirilen FISH görüntüleri.

Translokasyon Taşıyıcılığında PGT Öncesi Ön Hazırlık Çalışmasının Önemi

Translokasyon taşıyıcıları için yapılacak PGT çalışmalarından önce bir hazırlık aşamasının (set-up, ön hazırlık) tamamlanması gerekir. Bu aşamada, sitogenetik analizle translokasyon taşıyıcılığı saptanmış çiftlerde, FISH analiziyle kırık noktalarının doğrulanması, PGT çalışmasında kullanılacak problemleri belirlemek açısından çok önemlidir. Bunun için eşlerden kan alınıp kromozomların incelenmesi ve FISH yöntemiyle kromozomlar üzerindeki kırık noktalarının teyidinin yapılması gerekmektedir. Yine PGT işlemi öncesinde eğer çiftlerde baba adayını translokasyon taşıyıcısı ise, spermde yapılacak FISH analiziyle sperm hücrelerindeki normal veya dengeli/dengesiz gamet oranını saptamak mümkün olabilmektedir. Sperm FISH, özellikle resiprokal translokasyon taşıyıcılarının embriyolarında dengeli/dengesiz embriyo oranının tahmin edilmesinde ve tedavide yol gösterici olması bakımından oldukça faydalıdır.

Normal veya dengeli bir embriyonun bulunma şansının azlığına rağmen transfer ile sonuçlanan tedavilerde elde edilen gebelik oranları oldukça yüksektir. PGT, bu hasta grubunda gebelik oranını arttırmakta ve gebelik kayıplarını azaltmaktadır.

Set-up (ön hazırlık) aşamasının gerekli olduğu durumlar

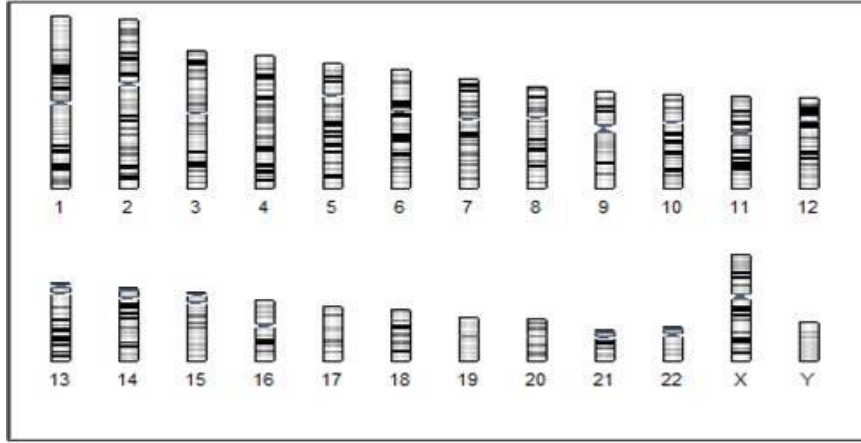
Kromozomal Hastalıklar	DNA Hastalıkları
Reciprokal translokasyonlar	Tek gen hastalıkları
Robertsonian translokasyonlar	Trinükleotid tekrar hastalıkları
İnversiyonlar	Kanser predispozisyonu
Delesyonlar	Late-onset hastalıklar
Marker kromozom	Mitokondrial hastalıklar

Mikroarray Yöntemi

Embriyolarda Genetik Tanı "Mikroarray Yöntemi"

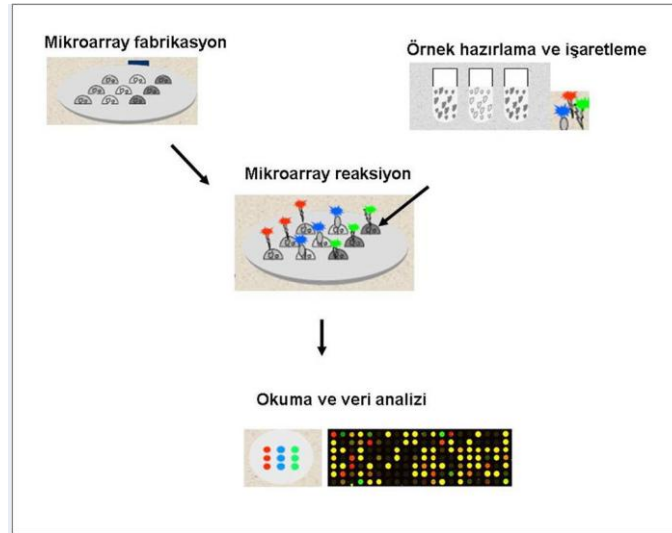
Sınırlı sayıda kromozom incelenebilen eski yöntemlere göre birçok yönde üstünlük taşıyan mikroarray (aCGH) yöntemi Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Tüp Bebek ve Genetik Laboratuvarı'nda hizmete sunuldu.

Preimplantasyon dönemi embriyolarında kromozom bozukluklarına oldukça sık rastlanılmaktadır. İnsanda en sık görülen anormallikler trizomi 21 (Down Sendromu), trizomi 16, trizomi 13 (Patau Sendromu) ve Trizomi 18 (Edwards Sendromu); cinsiyet kromozomlarına ait en sık görülen anormallikler monozomi X (Turner Sendromu) ve XXY (Klinefelter Sendromu) 'dur.



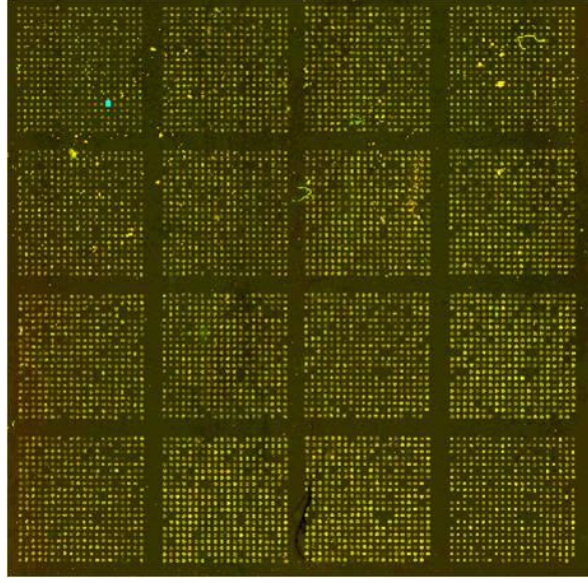
Şekil 1: Anneden ve babadan aktarılan 23 çift toplam 46 adet kromozomun görüntüsü.

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH), DNA miktarındaki değişiklikleri saptayan moleküler genetik bir yöntemdir. Bu teknik ile tüm genomda kromozom veya kromozom bölgelerindeki artma veya azalmalar saptanabilir ve hücrenin bütün kromozomları incelenebilir. Mikroçiplerin kullanıldığı a-CGH yönteminde, DNA miktarındaki değişiklikler yüksek çözünürlükte incelenilir bu nedenle oldukça güvenilir bir yöntemdir (Şekil 3).



Şekil 3: Array-Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (aCGH) Yöntemi

DNA mikroarrayleri cam, plastik veya silikon gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde oluşturulmuş mikroskobik DNA dizi noktacıklarıdır. Bir mikroarrayde bu noktacıklardan on binlerce bulunabilir (Şekil 4). Bu sayede aynı anda kromozomlar üzerindeki birçok bölgenin incelenmesi mümkün olur. İşlem süresinin kısa olması ve analiz sürecinin bilgisayar programları sayesinde daha otomatik bir şekilde yapılması sonucu kromozomlarla ilgili veriler 12-24 saat gibi kısa sürelerde elde edilebilmektedir. Bu sayede sonuçlar embriyoların dondurulmasına gerek kalmadan transfer gününden önce elde edilmektedir.



Şekil 4: a-CGH yönteminde kullanılan mikroçiplerin görüntüsü