

# TEK GEN HASTALIĞI VE HLA UYUMUNDA PREİMLANTASYON GENETİK TANI: TEK MERKEZ DENEYİMİ

## Single Gene Disorder and HLA Matched Preimplantation Genetic Diagnosis: Single Center Experience

Ferda ALPASLAN PINARLI<sup>1</sup> (0000-0002-1034-614X), İskender KAPLANOĞLU<sup>2</sup> (0000-0001-8065-5143), İnci KAHYAOĞLU<sup>2</sup> (0000-0002-2283-9128), Hanife SAAT<sup>1</sup> (0000-0002-6087-5947), Hilal YILDIZ<sup>1</sup> (0000-0002-9932-5643), Songül HARŞIT<sup>1</sup> (0000-0002-6873-3345), Kadri Murat ERDOĞAN<sup>3</sup> (0000-0003-0097-1424), Serdar DİLBAZ<sup>2</sup> (0000-0001-9542-2799)

### ÖZET

**Amaç:** Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT)'da tek gen hastalıkları taraması ile kombine HLA doku tiplemesi tayini Talasemi Majör gibi yaşamı tehdit eden ve kordon kanı ve /veya kemik iliği nakli ile tam olarak tedavi edilebilen genetik hastalıklara sahip çocuklar için etkin bir yöntemdir. Bu çalışmada, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi Genetik Tanı Merkezi Preimplantasyon Genetik Tanı Laboratuvarında 2014-2017 Mayıs döneminde çalışan vakaların verileri sunulmuştur.

**Gereç ve Yöntem:** Laboratuvarımıza Sağlık Bilimleri Üniversitesi Etilik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Tüp Bebek Merkezinden gelen 6-8 blastomer aşamasındaki 3. Gün embriyolarından alınan biyopsi örneklerinde preimplantasyon genetik tanı uygulamaları yapılan 91 vakanın genetik analiz sonuçları, mutasyon tipleri, implantasyon ve gebelik başarıları ile canlı doğum oranları değerlendirildi. Biyopsi örneklerine uygulanan lizis işleminin ardından REPLI-g Advanced DNA Single Cell Kit (Qiagen, USA) ile Whole Genom Amplification (Biorad T100, USA) gerçekleştirildikten sonra mutasyonu taşıyan DNA fragmentlerinin ve HBB geni ile ilişkili 11 markırın belirlenebilir seviyeye kadar multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması yapıldı. Amplifikasyondan sonra DNA, normal DNA fragmentlerini mutasyonu taşıyan fragmentlerden ayırt etmeye olanak sağlayan mini-sekanslama tekniği ile kapiller elektroforez kullanılarak analiz edildi. Seçilmiş Linked Markerlar (STR: Short Tandem Repeat/ Kısa tekrar dizileri) mutasyonun tanısı için bir destek oluşturma ve bazı DNA kontaminasyonlarının belirlenmesi amacıyla kullanıldı. HLA tiplene analizlerinde uyumlu HLA genotiplerinin belirlenmesi için HLA kompleksi ile ilişkilendirilen 32 markır, multiplex PZR ile çalışılarak DNA fragmentleri kapiller elektroforez kullanılarak analiz edildi

**Bulgular:** 86 vaka Beta Talasemi (HBB geni), bir vaka Orak Hücreli Anemi (HBB geni), bir vaka Blackfan Diamond Anemisi (RPS19 geni), bir vaka akut lenfoblastik lösemi, bir vaka Ağır Konjenital Nötropeni (HAX1 geni) ve bir vaka Fankoni Aplastik Anemisi (FANCA geni) olmak üzere toplamda 91 vaka çalışıldı. Toplam çalışılan blastomer sayısı 328, transferi yapılan vaka sayısı 41, gebelik gerçekleşen vaka sayısı 12, gerçekleşen canlı doğum sayısı 8 ve kemik iliği nakil işlemi yapılan vaka sayısı 6 olarak saptandı. Canlı doğumların tümünde gerçekleştirilen ikinci genetik analizde sağlıklı/taşıyıcı gen ve HLA tipinde hasta kardeş ile tam uyum görüldü.

**Sonuç:** Sonuçlarımız kemik iliği nakli ile tam kür sağlanan genetik hastalıkların tedavisinde ailede sağlıklı ve HLA uyumlu çocuk varlığının önemi açısından anlamlıdır. Diğer preimplantasyon genetik test uygulanan hastalıklarla karşılaştırıldığında transfer edilebilir blastomer bulma oranının düşük olduğu görülmüş ve bunun blastomerde iki farklı genetik seçim yapılması gerekliliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Preimplantasyon genetik tanı; HLA uyumu; Tek gen hastalığı; Multiplex polimeraz zincir reaksiyonu; Kısa tekrar dizileri markır; DNA sekans analizi

### ABSTRACT

**Purpose:** Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) of single gene disorders combined with HLA typing is an effective method for life-threatening genetic diseases such as Beta thalassemia major which can be treated with bone marrow transplantation. The aim of this study is to present the data of the cases evaluated between May 2014-May 2017 in the PGD Laboratory of Genetic Diagnosis Center, Dışkapı Yıldırım Beyazıt and Research Hospital, Health Sciences Faculty.

**Material and Methods:** We evaluated the results of genetic analysis, the success of implantation and pregnancy, and the rate of live births of 91 cases which was biopsied from blastomeres of 6-8 stage of the 3th day embryos. After the Whole Genome Amplification with REPLI-g Advanced DNA Single Cell Kit (Qiagen, USA) preceded by the lysis of biopsy samples, DNA fragments and HBB related 11 markers were amplified until the predicted level with polymerase chain reaction (PCR). After the amplification, DNA was analyzed with mini-sequencing technique using capillary electrophoresis in order to distinguish normal DNA fragments from the mutated ones. Selected linked markers were used to support the diagnosis of mutation and determinate DNA contaminants. HLA complex related 32 markers were studied with multiplex PCR and DNA fragments were analyzed using capillary electrophoresis in order to determinate compatible HLA genotypes in HLA typing analyses.

**Results:** We studied a total of 91 cases consisting of 86 cases of beta thalassemia (HBB gene), one case of sickle cell disease (HBB gene), one case of acute lymphoblastic lymphoma, one case of severe congenital neutropenia (HAX1 gene) and one case of Fanconi aplastic anemia (FANCA gene). The total number of blastomeres studied were 328, 41 cases were transferred, and there were 12 successful pregnancies with 8 live births. There were also 6 cases which were treated with bone marrow transplantation. The second genetic analysis of all live births revealed that healthy/carrier gene and HLA typing of affected sibling was full matched.

**Conclusion:** Our results have significant importance for the treatment of genetic disease which cure is possible with bone marrow transplantation in the presence of HLA matched sibling. The rate of transferable blastomere were lower than other genetically tested diseases; however, the reason of this difference was probably the necessity of making two different genetic selections.

**Key words:** Preimplantation Genetic Diagnosis, HLA Matching, Single Gene Disorder, Multiplex polimeraz chain reaction, Short Tandem Repeat Marker, Sequence analysis DNA

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dışkapı Yıldırım Beyazıt EAH, Genetik Tanı Merkezi, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Etilik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları EAH, Tüp Bebek Kliniği, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Etilik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları EAH, Tıbbi Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye

Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI, (MD, PhD)

İskender KAPLANOĞLU, Uzm. Dr.

İnci KAHYAOĞLU, Doç. Dr.

Hanife SAAT, Uzm. Dr.

Hilal YILDIZ, Biyo.

Songül HARŞIT, Biyo.

Kadri Murat ERDOĞAN, Uzm. Dr.

Serdar DİLBAZ, Prof. Dr.

### İletişim:

Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dışkapı

Yıldırım Beyazıt EAH, Genetik Tanı

Merkezi, Ankara

Tel: 0533 236 09 46

e-mail:

ferdapinarli@yahoo.com

Geliş tarihi/Received: 25.09.2018

Kabul tarihi/Accepted: 08.01.2019

DOI: 10.16919/bozoktip.463817

Bozok Tıp Derg 2019;9(2):52-7

Bozok Med J 2019;9(2):52-7

## Giriş

Yardımcı üreme tekniklerinin ve tüp bebek yönteminin gelişmesi ile birlikte, elde edilen embriyolarda henüz gebelik oluşmadan genetik inceleme yapmanın mümkün olduğu 1967'de ilk kez Edwards ve Gardner tarafından sıçan blastokistlerinde gösterilmiş ve dünyada ilk defa 1990 yılında İngiltere'de tek hücre polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği kullanılarak kalıtsal bir hastalık için uygulanmıştır (1, 2). Hastalığa sebep olan geni veya kromozomal bozukluğu gebelik oluşmadan önce test ederek sağlıklı embriyoların transfer edilmesi işlemine "Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT)" adı verilir. Bu işlem, yardımcı üreme teknikleri ile birlikte kullanıldığında, elde edilen embriyoların transfer öncesi genetik açıdan incelenerek sadece sağlıklı olan embriyoların transfer edilmesi ile birçok tek gen hastalığı ya da kromozomal nedenli genetik hastalığın önlenmesini sağlar (3).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2001 yılında geliştirilen embriyoda "Human Leukocyte Antigen (HLA)" tiplleme ve genetik tanı çalışmaları ile PGT, sadece tanı yöntemi olmakla kalmayıp, ailelerin sağlıklı bir bebeğe kavuşmasının yanı sıra hasta çocukların doğan kardeşlerinden alınan HLA uyumlu kök hücreler ile tedavi olabildiğini de sağlamıştır (4). Etik kaygıların varlığına rağmen, PGT ile kombine gerçekleştirilen preimplantasyon HLA analizi sağlıklı ve HLA uyumlu kardeşin doğması ile hasta kardeşler için bir tedavi seçeneğidir ve Beta Talasemi, Fankoni Anemisi, Wiscot Aldrich sendromu, Hiperimmünglobulin M sendromu ve X' e Bağlı Adrenolökodistrofi gibi birçok hastalıkta başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (5, 6). PGT+ HLA tiplemesi değerli bir tanı yöntemi olmakla birlikte bazen siklusa özel kısıtlamalar ve hastaya ya da hastalık tiplerine bağlı nedenler ile tüm çiftler için uygun olmayabilir. Bunun yanı sıra teorik olarak hem HLA uyumlu hem de mutasyon taşımayan embriyo bulma oranının 1/16 (1/4 x1/4) olduğu göz önüne alındığında, uygulanan siklularda fazla sayıda oosit ve biyopsi yapılabilecek kalitede embriyo elde edilmesi gerekliliği de ayrıca bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır. PGT + HLA tiplemesi çok basamaklı ve karmaşık bir teknik gerektirmektedir; bu uygulamaya geçmeden hematoloji ve transplantasyon uzmanlarının endikasyon doğrulanmalı, aile hasta çocuğu tedavi

eden hekim tarafından aydınlatılmalı, reproduktif kapasiteleri bir yardımcı üreme teknikleri (YÜT) uzmanı tarafından incelenmeli, klinik tanı için tek hücre PZR protokolü bulunan bir PGT laboratuvarı tarafından genetik değerlendirme yapılmalıdır. Aileye potansiyel YÜT/PGT sınırlamaları, işlem güvenliği, kesinlik ve başarı oranlarını kapsayan ayrıntılı genetik danışma verilmelidir. Her aşamada psikolojik değerlendirme ve destek sağlanmalı, bu süreçte çalışan olan tüm uzmanlar aileyi ayrıntılı olarak bilgilendirmelidir (7, 8). Tüm dünyada bugüne kadar yapılan PGT+HLA uygulamalarında alınan sonuçlar yüz güldürücüdür ve birçok hasta çocuğun transplantasyon sonrası sağlıklarına kavuştuğu bildirilmiştir. Biz de bu çalışmada, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi Genetik Tanı Merkezi Preimplantasyon Genetik Tanı Laboratuvarında 2014-2017 Mayıs döneminde çalışılan vakaların verilerini sunmayı amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Laboratuvarımıza Sağlık Bilimleri Üniversitesi Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Tüp Bebek Merkezi'nden gelen 6-8 blastomer aşamasındaki 3. Gün embriyolarından alınan biyopsi örneklerinde PGT uygulamaları yapılan 91 vakada genetik analiz sonuçları, implantasyon ve gebelik başarısı ile canlı doğum oranları değerlendirildi. Çalışmaya dâhil edilen vakaların kullanılacak verilere ait bilgilendirilmiş onamı alınarak Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi Klinik Etik Kurulundan 25.12. 2107 tarih ve 44/22 sayı ile etik kurul onayı alındı.

Biyopsi örneklerine uygulanan lizis işleminin ardından REPLI-g Advanced DNA Single Cell Kit ( Qiagen, USA) ile Whole Genom Amplification ( Biorad Thermal Cycler T 100, USA) gerçekleştirildikten sonra mutasyonu taşıyan DNA fragmentlerinin ve HBB geni ile ilişkili 11 marker, diğer genler için ise 10 markerın belirlenebilir seviyeye kadar PCR ile çoğaltılması yapıldı. Amplifikasyondan sonra DNA, normal DNA fragmentlerini mutasyonu taşıyan fragmentlerden ayırt etmeye olanak sağlayan mini-sekanslama tekniği ile kapiller elektroforez (ABI 3130, USA) kullanılarak analiz edildi. Seçilmiş Linked Markerlar (bağlantı belirteçleri) mutasyonun tanısı için bir destek oluşturma ve bazı DNA kontaminantlarının

belirlenmesi amacıyla kullanıldı. HLA tiplleme analizlerinde; uyumlu HLA genotiplerinin belirlenmesi için HLA kompleksi ile ilişkilendirilen 32 marker, multipleks PZR ile çalışılarak DNA fragmentleri kapiller elektroforez (ABI3130; USA) kullanılarak analiz edildi. Tüm sonuçlar; çalışılan blastomer, çoğaltılan blastomer, Allel Drop Out (ADO, tek bir alel bölgesinin PCR ile çoğaltılıp diğer allel ile ilgili bilginin elde edilememesi), heterozigote, homozigote, çalışılan hastalıklar, genler, transfer edilen blastomer, klinik hamilelik, canlı doğum ve gerçekleştirilen kemik iliği nakli sayısı tablolar haline getirilerek sunuldu (Tablo I-IV). Veriler IBM SPSS Statistics 16.0 istatistik programı kullanılarak analiz edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya 2014-2017 yılları arasında 86 vaka Beta Talasemi (HBB geni), 1 vaka Orak Hücreli Anemi (HBB geni), 1 vaka Blackfan Diamond Anemisi (RPS19 geni), 1 vaka Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), 1 vaka Ağır Konjenital Nötropeni (HAX1 geni) ve 1 vaka Fankoni Aplastik Anemisi (FANCA geni) olmak üzere toplam 91 vaka dâhil edildi (Tablo I). Beta Talasemide (HBB geni) 17 farklı mutasyon, Orak Hücreli Anemide (HBB geni) bir, Blackfan Diamond Anemisinde (RPS19 geni) bir, Fankoni Aplastik Anemisinde (FANCA geni) bir, Ağır Konjenital Nötropenide (HAX1 geni) bir mutasyon çalışıldı (Tablo II). Toplam çalışılan blastomer sayısı 328 , PZR ürünü elde edilen blastomer sayısı 302 (analiz edilebilen blastomer oranı %92), ADO oranı %9,47, kromozom 6 anoploidisi 26, kromozom 11 anoploidisi 21 olarak bulundu. Etkilenmiş heterozigot blastomer sayısı 112, homozigot blastomer sayısı 138, etkilenmemiş blastomer sayısı ise 78 olarak tespit edildi (Tablo III). Etkilenmemiş ve heterozigot etkilenmiş blastomerlerden (ALL hariç çalışılan vakaların hepsinin kalıtımı otozomal resesif olduğu için heterozigot blastomerler taşıyıcı olarak kabul edilmektedir) HLA uyumlu olup transferi yapılan vaka sayısı 41, gebelik gerçekleşen vaka sayısı 12, gerçekleşen canlı doğum sayısı 8 ve kemik iliği nakil işlemi yapılan vaka sayısı ise 6 olarak saptandı (Tablo IV).

**Tablo I:** PGT+ HLA Tiplleme Yapılan Vakalarda Hastalık Tipleri ve Sayıları.

HASTALIK	Gen	n
Beta Talasemi	HBB	86
Orak Hücreli Anemi	HBB	1
Blackfan Diamond Anemisi	RPS19	1
Fanconi Aplastik Anemisi	FANCA	1
Ağır Konjenital Nötropeni	HAX1	1
Akut Lenfoblastik Lösemi	-	1
Toplam		91

**Tablo II:** Toplam Çalışılan Blastomer Sayısı ve Genetik Testler Açısından Çalışmanın Sonuçlarının Sınıflandırılması.

BLASTOMER TÜRÜ	n
Toplam Blastomer	328
Amplifiye Olan Blastomer	302
Amplifiye Olmayan Blastomer	26
Kromozom 6 Anöploidisi	26
Kromozom 11 Anöploidisi	21
Heterozigot Etkilenen Blastomer	112
Homozigot Etkilenen Blastomer	138
Etkilenmemiş Blastomer	78
Allel Drop Out Oranı (%)	9,47

**Tablo III:** Çalışılan genlerdeki mutasyon tipleri.

GEN	Mutasyon
HBB (Beta Talasemi)	IVS-I-1 G>A IVS-I-110 G<A -30 T>A + CODON 8 del AA CODON 44del C -30 T>A CODON 9ins G HBB Tüm Gen Delesyonu CODON 5del CT IVS-II-745 C>G CODON 37del T IVS-I-6 T>C IVS-I-5 G>C CODON 27 G>T CODON 6del CT CODON 9del A 5'UTR + 22 G>A CODON 39 C>T
HBB (Orak Hücreli Anemi)	CODON 7 A>T
RPS19	c.13dup A
HAX-1	EXON 2 (p.W44X c.130_131insA)
FANCA	EXON 6 del

**Tablo IV.** Çalışmanın genel sonuçları.

ÇALIŞMA SONUÇLARI	n	Oran ( %)
Çalışılan Blastomer	328	-
Amplifiye Olan Blastomer	302	302/328= 92
Transfer Edilen Blastomer (sağlıklı/taşıyıcı gen+ HLA uyumu)	41	41/302= 13,5
Klinik Hamilelik	12	12/41= 29,2
Canlı Doğum	8	8/41= 19,5
Gerçekleşen Kemik İliği Transplantasyonu	6	6/8= 75

## TARTIŞMA

Preimplantasyon genetik tanı, in vitro fertilizasyon yöntemleri kullanılarak geliştirilmiş olan embriyolarda var olan genomik değişimleri belirlemek amacıyla embriyoların transfer öncesi dönemde genetik testler aracılığı ile analiz edilmesidir (9). Tek gen hastalıklarında HLA uyumu ile birlikte PGT yapılması, bu genetik hastalıkların sık görüldüğü toplumlarda gerçekçi bir çözüm yaklaşımı olarak gündeme gelmiştir. PGT'yi HLA testi ile beraber uygulamak talasemi ve benzeri kalıtsal kemik iliği hastalıklarının kemik iliği transplantasyonu ile tedavisinde iyileşme sağlayabileceği gibi aynı zamanda kemik iliği transplantasyonu ile tedavi edilen edinsel kemik iliği hastalıklarının (aplastik anemi, malign kemik iliği hastalıkları v.b.) sağaltımında, özellikle doku tipi uyumlu verici bulunmadığı durumlarda etkin bir çözüm yöntemidir. Yardımcı üreme teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen PGT'de implantasyon öncesi evrede çok sayıda embriyo oluşturulur ve biyopsi ile alınan embriyonik hücrelerde genetik testler yapılarak seçilmiş embriyolar ile gebelik gerçekleştirilir. HLA tiplemesi tek başına yapılabildiği gibi, başka bir hasta çocuk doğma olasılığını dışlamak için PGT ile beraber de yapılabilir; bazı ülkelerde etik kaygılar nedeniyle HLA tiplemesi ancak PGT ile birlikte uygulanabilmektedir (7, 8).

Göreceli eski tarihine karşın, ilk PGT-HLA klinik olguları ancak 2001 yılında bildirilmeye başlanmıştır. Her yıl gerçekleşen siklus sayısı artmakla beraber, PGT-HLA halen az sayıdaki merkezde gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle bu tekniğin sonuçlarına ilişkin veriler hem

sayıca azdır hem de bölünmüş durumdadır. Metodoloji üzerine sistematik ve ayrıntılı yayınların yapılarak yardımcı üreme teknikleri ile genetik analizde farklı metodların karşılaştırıldığı ve kemik iliği nakli başarısını bildiren yayınların artması, PGT-HLA tekniğinin gerçek klinik yararını saptamada yardımcı olacaktır (9).

PGT ülkemizde de belirli merkezler tarafından uygulanmakta ve sonuçları bildirilmektedir. Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden Göktolga ve ark.'ın 2007 yılında yayınlanan 18 vakalık serisinde embriyolar arasında iyi morfolojiye sahip olan 101 embriyodan üçüncü günde blastomer biyopsisi alınmış, anöploidi açısından 13, 16, 18, 21 ve 22. kromozomlara "Flüoresan İn-situ Hibridizasyon (FISH)" yöntemi ile bakılarak normal sonuca sahip 37 embriyo (%29,1) transfer edilmiştir. PGT uygulanan 18 hastanın ikisinde kromozomal olarak normal embriyo bulunamaması nedeni ile embriyo transferi yapılamamıştır. Diğer 16 hastanın 8'inde kimyasal gebelik olduğu (%50), beş hastada klinik gebelik saptandığı (%31,3), klinik gebeliklerin ikisi abortus ile sonuçlanırken (bir erken abortus, bir geç abortus) (%12,5), üçünün terme kadar ulaştığı ve canlı doğum gerçekleştiği (%18,8) bildirilmiştir (10). Bu sonuçlar bizim verilerimiz ile karşılaştırıldığında klinik gebelik (sırasıyla %31,3; %29,2) ve canlı doğum oranlarının (sırasıyla %18,8; %19,5) çok yakın olduğu görülmektedir. Transfer edilen embriyo oranları karşılaştırıldığında ise bizim oranlarımızın daha düşük olduğu (sırasıyla %29,1 ve %13,5), bunun da embriyoda hem tek gen mutasyonu hem de HLA taraması yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Aydın ve ark. da merkezlerinde farklı tek gen hastalıkları nedeniyle PGT uygulanan hastalarının değerlendirmesini 2017 yılında yayınlamışlardır. Bu çalışmaya 16 farklı tek gen hastalığı için 29 siklusta PGT uygulanan 22 hasta dâhil edilmiştir. Ebeveynlerden birinde bilenen tek gen hastalığı bulunan 12 hastada, 16 siklusta toplam 114 embriyo üzerinde yapılan PGT sonrası 24 sağlıklı, 25 taşıyıcı, 65 hasta embriyo saptanmıştır. Embriyo transferi yapılan 14 siklusta 10 gebelik elde edilmiş ve 9'u canlı doğumla sonuçlanmıştır. Hastalardan 10 çifte PGT beraberinde HLA doku tiplemesi yapılmış, 13 siklusta elde edilen

toplam 130 embriyonun; 22'si sağlıklı, 18'i taşıyıcı, 90'ı ise tek gen hastalığına sahip olarak bulunmuştur. Embriyo transferi yapılan 10 siklusta 5 gebelik elde edilmiş, 4'ü canlı doğumla sonuçlanmıştır (11).

Kahraman ve ark. 2014 yılında yayınladıkları çok merkezli retrospektif çalışmalarında 10 farklı tanıdaki 44 hasta çocuğun tedavisinde HLA uyumlu PGT tekniği kullanılarak doğan bebeklerden elde edilen hematopoietik kök hücre kullanıldığını bildirmişlerdir. Bu seride 242 çiftte toplam 461 siklus gerçekleştirilmiştir: 192 çiftte (Grup 1) 371 siklusta (80,5%) HLA uyumu ve mutasyon taraması; 50 çiftte (Grup 2) 90 siklusta (19,5%) yalnızca HLA testi yapılmıştır. Biyopsi yapılan toplam 3973 embriyodan 3556'sında (%89,5) tanı başarıyla konulmuştur. Yalnızca HLA testi yapılan 2. Grupta, analiz edilen embriyoların %17'si HLA uyumlu ve transfer edilebilir bulunurken, mutasyon testi de gerçekleştirilen 1. Grupta embriyoların %11,9'u hastaliksız ve HLA uyumlu olarak belirlenmiştir. Siklüslerin 275'inde (%59,6) en azından bir embriyo uygun bulunarak transfer edilmiş ve transfer başına gerçekleşen gebelik oranı %52,98 olmuştur. Gerçekleşen 80 doğumda 94 sağlıklı bebek dünyaya geldiği, 90 bebeğin kardeşleri ile HLA uyumlu olduğu bildirilmiştir. İki ailenin üç bebeği HLA identik olmayan embriyolardan ailelerin onayı ile dünyaya gelmiş, bir HLA identik olmayan bebeğin ise hatalı tanı sonucu doğduğu bildirilmiştir (6). Bu veriler bizim sonuçlarımızla karşılaştırıldığında tanı koyma (sırasıyla %89,5; %92) ve sağlıklı/ taşıyıcı gen + HLA uyumlu embriyo bulma oranının (sırasıyla %11,9; %13,5) çok yakın olduğu görüldü. Bizim verilerimizde farklı olarak canlı doğan bebeklerde tekrarlanan genetik testlerde sağlıklı/taşıyıcı gen + HLA tiplemede tam uyum olduğu saptandı.

Kakourou ve ark'nın. Ağustos 2001-Eylül 2015 tarihleri arasında başvuran olguları inceledikleri uluslararası çok merkezli retrospektif çalışmalarına 364 çiftten 704 siklüs alınmıştır. Bu seride çiftlerin %81,3'ü HLA tiplemesi ile tek gen hastalığının (%58,6 beta-talasemi) mutasyon taramasını talep etmişlerdir. Toplamda 5532 embriyo analiz edilmiştir. Siklüslerin çoğunda taze oosit kullanılarak (%94,9) üçüncü günde embriyo biyopsisi (%85,3) yapılmıştır. 4343 embriyoya genetik analiz

yapılabilmiş (%78,5) ve 677'si genetik olarak uygun bulunmuştur (yalnızca HLA uyumu olanlar %15,4, sağlıklı/ taşıyıcı gen + HLA uyumlu olanlar %11,6) (9). Bu veriler bizim sonuçlarımızla karşılaştırıldığında sağlıklı/taşıyıcı gen + HLA uyumunun (sırasıyla %11,6; %13,5) benzer olduğu görülmüştür. Çalışmada toplam 598 embriyonun transferi gerçekleştirilmiş ve bunların içinde tek başına HLA uyumu ve sağlıklı/ taşıyıcı gen+HLA uyumlu bulunarak transfer edilen embriyoların sayısı 397 olmuştur. Bu transferlerden 164 HCG pozitif gebelik tespit edilmiş (gebelik/embriyo transferi oranı %41,3) ve bunların 136'sı canlı doğumla sonuçlanmıştır (canlı doğum/embriyo transferi oranı %34,4) (9). Bu verileri kendi sonuçlarımız ile birlikte değerlendirdiğimizde ise gebelik oranının (sırasıyla %41,3; %29,2) ve canlı doğum oranının (sırasıyla %34,4; %19,5) bizim sonuçlarımızdan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun nedeninin Kakourou ve ark.'ın yayınladığı seride hem sadece HLA uyumlu embriyo hem de sağlıklı/taşıyıcı gen+ HLA uyumlu embriyo verilerinin birlikte verilmesi olduğu düşünülmüştür.

PGT adaylığı bulunan çiftlerde implantasyon ve gebelik eldesi yönünde başarıyı etkileyen birçok faktör söz konusudur. 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 ile embriyoda genetik hastalık için mutasyon analizi ve HLA doku tiplemesi yapılan çiftlerde transfer için uygun embriyo az sayıda elde edilmektedir. Azalmış yumurtalık rezervi, ileri kadın yaşı, geç veya erken yumurtalık yetmezliği, geçirilmiş yumurtalık cerrahisi, şiddetli endometriozis, ağır sigara kullanıcısı olmak, obezite, PGT ve HLA doku tiplemesinin birlikte yapıldığı olgular, PGT endikasyonuna ilaveten çiftin infertilite sorununun bulunması PGT başarısı yönünden riskli olan durumlar arasında sayılmaktadır. (12)

Biz bu çalışmada toplam 91 vakadan elde edilen 328 blastomerden (ortalama blastomer oranı =  $328/91=3,6$ ) genetik analizi yapılabilmiş 302 blastomerin sonuçlarını içeren verileri sunduk. PZR sonrası blastomer sayısının 302 olduğu, bunlardan sadece 41 tanesinin (sağlıklı /taşıyıcı +HLA uyumlu) transfere

uygun olarak bulunduğu göz önüne alındığında yaklaşık olarak %13,5 oranında bir uygunluk yakalandığı saptandı. Teorik olarak iki otozomal resesif alleli bir arada saptama olasılığı (örn: sağlık beta globülin geni ve HLA uyumu)  $1/4 \times 1/4 = 1/16 = \% 0,06$  iken taşıyıcı ve sağlam allelin birlikteliğinin HLA uyumu ile birlikte kabul görebilmesi sayesinde beklenen tahmini oran  $3/4 \times 1/4 = 3/16 = \%18,7$ 'dir. Bizim de transfere uygun olarak saptadığımız %13,5 blastomer oranının beklenen orana (genetik şans faktörü de hesaba katıldığında) yakın gerçekleştiği görüldü. Bu blastomerlerin tümü nakledildi ve bunlardan 12'sinde klinik hamilelik gelişti (~% 29-30). Klinik hamilelik gelişenlerden 8'i doğumla sonuçlandı ve doğan bebeklerden 6'sından kemik iliği nakli gerçekleştirildi (%75). Kalan iki vakanın birinde hasta çocuk kaybedildi, biri ise makale yazıldığı sırada henüz nakile alınmamıştı.

## SONUÇ

Çalışmamızda, tek gen hastalığı ve HLA uyumunun belirlenmesinde 3. gün blastomerlerinden; 91 ailede, 328 blastomer üzerinde gerçekleştirilen multipleks PZR + STR markır + Sanger Dizileme yöntemlerini kullanarak elde ettiğimiz verileri sunarak ülkemizdeki bu konuda yapılan yayınlara katkı sunmayı hedefledik. Bu verilerin en önemli özelliklerinden biri tek gen hastalığında mutasyon taraması ve HLA tiplemesi yaptığımız bu vakalarda 3.gün biyopsisinin kısıtlı zaman ve hücreye olanak vermesi nedeniyle aynı anda anöploidi taramasının yapılmamış olmasıdır. Gelişen embriyo dondurma ve genetik analiz teknolojileri sayesinde 5. gün embriyosundan (blastokistlerden) biyopsi alıp, embriyoyu test tamamlana kadar dondurup, Yeni Nesil Dizileme (Next Generataion Seqencing; NGS) teknolojileri kullanarak aynı anda anöploidi taraması, tek gen analizi ve HLA uyumu bakmak mümkün hale gelmiştir (13-15). Bu teknikle transfer edilebilecek embriyo sayısı daha az bulunabilecek olmakla birlikte implantasyon oranının artması canlı doğum oranını da birlikte arttıracaktır. NGS hassas, kapsayıcı ve yarar-maliyet oranı yüksek bir genetik analiz yöntemi olarak, invazif olmayan prenatal tanı da dâhil olmak üzere yaygın olarak kullanılabilir hale gelmiştir. (16). HLA tiplemesi ile PGT/PGS (Preimplantasyon Genetik Screening) uygulamalarına aynı anda olanak vermesi sayesinde NGS teknolojilerine ilgi giderek artmaktadır ve PGT uygulamalarında daha çok yer bulacaktır.

## REFERANSLAR

1. Edwards RG, Gardner RL. Sexing of live rabbit blastocysts. *Nature*. 1967; 6;214(5088):576-7.
2. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990; 19;344(6268):768-70.
3. Munne S, Wells D. Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2002;14(3):239-44.
4. Verlinsky Y, Rechitsky S, Schoolcraft W, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis for Fanconi anemia combined with HLA matching. *JAMA*. 2001 27;285(24):3130-3.
5. Kahraman S, Karlıkaya G, Kumtepe Y, Sertyel S, Karadayı H, Fındıklı N, et al. Tek gen hastalıklarında preimplantasyon genetik tanı ve HLA doku tiplemesi uygulamalarının klinik değerlendirmesi. *Türk Fertilite Derg*. 2004;12 (1): 43-53.
6. 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. *Reprod Biomed Online*. 2014; 29(3):340-51.
7. Kakourou G, Vrettou C, Kattamis A, Destouni A, Poulou M, Moutafi M, et al. Complex preimplantation genetic diagnosis for beta-thalassaemia, sideroblastic anaemia, and human leukocyte antigen (HLA)-typing. *Syst Biol Reprod Med*. 2016;62(1):69-76.
8. Kakourou G, Vrettou C, Moutafi M, Traeger-Synodinos J. Preimplantation HLA matching: The production of a Saviour Child. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;44:76-89.
9. Kakourou G, Kahraman S, Ekmekci GC, Tac HA, Kourlaba G, Kourkouni E, et al. The clinical utility of PGD with HLA matching: a collaborative multi-centre ESHRE study. *Human Reprod* 2018;33(3):520-30
10. Göktoğa Ü, Korkmaz C, Bahçe M, Ceyhan ST, Keskin U, Başer İ. Preimplantasyon genetik tanı: GATA sonuçları. *Gülhane Tıp Dergisi* 2007;49: 245-9.
11. Aydın T, Yücel B. Tek Gen Hastalıkları Nedeniyle Preimplantasyon Genetik Tanı Uygulanan Hastalarımızın Retrospektif Analizi. *Bozok Tıp Dergisi* 2017; 7(4):42-5.
12. Kahraman S, Ekmekçi CG. Talasemi ve Hemoglobinopatilerde Preimplantasyon Genetik Tanı Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 2010;3(1):44-9.
13. Rechitsky S, Pakhalchuk T, San Ramos G, Goodman A, Zlatopolsky Z, Kuliev A. First systematic experience of preimplantation genetic diagnosis for single-gene disorders, and/or preimplantation human leukocyte antigen typing, combined with 24-chromosome aneuploidy testing. *Fertil Steril*. 2015;103(2):503-12.
14. Goldman KN, Nazem T, Berkeley A, Palter S, Grifo JA. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for monogenic disorders: the value of concurrent aneuploidy screening. *J Genet Couns*. 2016;25:1327-37.
15. Sermon K. Novel technologies emerging for preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17:71-82
16. Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT Jr. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil Steril* 2013;99:1377-84 e1376.