

Preimplantasyon genetik tanı: GATA sonuçları

Ümit Göktolga (*), Cem Korkmaz (*), Muhterem Bahçe (**), Seyit Temel Ceyhan (*), Uğur Keskin (*), İskender Başer (*)

Özet

Bu çalışmada, GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesinde Eylül 2005 ile Haziran 2007 arasında 6-8 blastomer aşamasındaki 3. gün embriyolarından biyopsi alınarak preimplantasyon genetik tanı uygulanmış 18 hasta ve genetik analiz sonuçları, implantasyon ve gebelik başarısı ile canlı doğum oranları değerlendirildi. Genetik inceleme aynı gün içerisinde flöresan in situ hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapıldı. Genetik analiz sonuçlarına ve embriyonal gelişime göre 1-3 arası embriyo transfer edildi. On sekiz hastanın in vitro fertilizasyon uygulamaları sırasında 209 oosit toplandı. Bu oositlerden matür olan 183 tanesine "intracytoplasmic sperm injection" işlemi uygulandı ve 127 embriyo elde edildi. Bu embriyolardan Grade I kalitede olan 83 embriyoya blastomer biyopsisi yapıldı. Preimplantasyon genetik tanı endikasyonları açısından hastalar incelendiğinde, 1 hastaya kromozomal anomali öyküsü, 11 hastaya tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, 5 hastaya tekrarlayan gebelik kaybı, 1 hastaya ise kriptozoospermi nedeni ile preimplantasyon genetik tanı uygulandı. Preimplantasyon genetik tanı uygulaması sonrası embriyo transferi uygulanan 16 hastanın 8'inde kimyasal gebelik oluşurken (%50), 5 hastada klinik gebelik tespit edildi (%31.3). Bu sonuçlar ışığında preimplantasyon genetik tanı, genetik hastalık riskine sahip ve/veya tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan çiftler için kromozomal anomalilerin in vitro tanısında etkin bir yöntem olarak görünmektedir.

Anahtar kelimeler: Gebelik, implantasyon, preimplantasyon genetik tanı

Summary

Preimplantation genetic diagnosis: the GATA experience
In this study, results of genetic analysis, success rates of implantation, pregnancy and live birth of 18 patients in whom preimplantation genetic diagnosis was performed by making biopsy in their 3rd day embryos with 6-8 blastomers at the Assisted Reproductive Techniques Unit of Department of Obstetrics and Gynecology of Gülhane Military Medical Faculty between September 2005 and June 2007 were evaluated. Genetic analysis was performed by fluorescent in situ hybridization method on the same day. According to the results of genetic analysis and embryonic growth, embryos with a number of 1 to 3 were transferred. Two hundred and nine oocytes were collected during in vitro fertilization procedures of 18 patients. Of these oocytes, intracytoplasmic sperm injection procedure was performed to 183, which were mature, and 127 embryos were achieved. Blastomere biopsy was performed to 83 of these embryos which had grade I quality. When the patients were analyzed according to the indications of preimplantation genetic diagnosis, 1, 11, 5 and 1 patients had a history of chromosomal anomaly, recurrent implantation failure, recurrent abortus and cryptozoospermia, respectively. Of the 16 patients performed embryo transfer after preimplantation genetic diagnosis, 8 (50%) and 5 (31.3%) patients had chemical and clinical pregnancy, respectively. In view of the results of the present study preimplantation genetic diagnosis seems to be an effective method in in vitro diagnosis of chromosomal anomalies of couples who have a risk of genetic disease and/or recurrent implantation failure.

Key words: Pregnancy, implantation, preimplantation genetic diagnosis

* GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD

**GATF Tıbbi Genetik BD

Ayrı basım isteği: Dr. Ümit Göktolga, GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Etlik-06018, Ankara

E-mail: ugoktolga@yahoo.com

Makalenin geliş tarihi: 22.06.2007

Kabul tarihi: 07.12.2007

Giriş

Preimplantasyon genetik tanı (PGT), in vitro fertilizasyon yöntemleri kullanılarak geliştirilmiş olan embriyolarda ortaya çıkabilecek potansiyel kromozomal anomalileri belirlemek amacıyla uygulanmaktadır.

İnfertilite tedavisi ile oluşturulan, farklı gelişim aşamalarındaki embriyoların transfer öncesi dönemde kromozomal incelemesinin yapılması işlemidir. PGT konsepti, ilk olarak 1968 yılında Edwards tarafından ortaya atılmış olmasına rağmen, klinik önemi son 20 yılda in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarındaki ilerlemeler ile birlikte artmıştır (1). Embriyonun morfolojisi ve gelişim potansiyelinin iyi olmasının yanında, genetik yapısının da hayatta bağdaşır olması gerekmektedir. Flöresan in situ hibridizasyon (FISH) çalışmaları ile normal olarak gelişen preimplantasyon embriyoların blastomerleri incelendiğinde yaklaşık %30-65'inde en az bir hücrede anöploid saptanmıştır. Yüzde 25-60'ında ise kromozomal mozaizm gözlenmiştir (2,3). Transfer öncesi embriyoların incelenmesi ve kromozomal anomali tespit edilen embriyonun transferinin engellenmesi PGT'nin en önemli avantajlarından birisidir (4). Bu nedenle PGT, bazı çalışmalarda prenatal tanı yöntemlerine alternatif olarak öne sürülmektedir (5). Günümüzde PGT, yapısal kromozomal anormallikler (translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar, v.b.), tek gen defektleri, HLA tiplmesi ve geç başlangıçlı genetik predispozisyonu olan hastalıklar için kullanılmaktadır (6). Yapısal kromozomal anomaliler ve anöploidilerin var olduğu gebelikler klinikte fetal gelişim anomalileri ve abortus ile sonuçlanmaktadır. PGT embriyonal gelişimin farklı dönemlerine göre "polar body" biyopsisi (7,8), blastomer biyopsisi (9-11) ve blastokist biyopsisi (12) olmak üzere 3 farklı şekilde uygulanabilmektedir. FISH tekniği ile embriyodan alınan tek blastomer ile 9'a kadar kromozom taranabilmektedir. Çalışmamızda GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesinin preimplantasyon genetik tanı deneyimi, hastaların endikasyonları, PGT sonuçları ve implantasyon başarısı retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem

Hasta seçimi: GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesinde Eylül 2005 ile Şubat 2007 arasında preimplantasyon genetik tanı uygulanan 18 hasta çalışmaya dahil edildi. Çalışma retrospektif olarak analiz edildi. Hastalara PGT uygulama kararı, embriyolog, yardımcı üreme teknikleri konusunda deneyimli bir jinekolog ve genetik danışma ışığında alındı. Her hastaya PGT'de beklenen sonuçlar ve riskleri konusunda geniş bilgi verildi. Tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam formu alındı.

In vitro fertilizasyon siklusu ve PGT: Kontrollü ovarian stimülasyon protokolleri içerisinde 13 hastaya uzun protokol ve daha öncesinde azalmış ovarian cevaba

sahip 5 hastaya da kısa protokol uygulandı. Pituitar desensitizasyon amacı ile hastalara GnRH agonisti uygulandı. Ovarian stimülasyon amacı ile rekombinan FSH başlandı. Folliküler gelişim takibi TV-USG ve E2 takibi ile yapıldı. Folliküler gelişim yeterli seviyeye ulaştıktan sonra (17 mm üzerinde 3 ve üzerinde follikül varlığı) hastaya 10.000 IU "human chorionic gonadotropin" (hCG) verildi ve 36 saat sonra genel anestezi altında "Oocyte pick up" (OPU) işlemi uygulandı. Tüm hastalara sperm ile rezidüel kontaminasyonu ve polispermi olasılığını önlemek amacı ile "intrastoplasmic sperm injection" (ICSI) işlemi uygulandı. Daha sonra embriyonal gelişim izlendi ve üçüncü günde iyi morfolojiye sahip, 6-8 hücre aşamasına gelmiş olan embriyolardan blastomer biyopsisi yapıldı (tek hücre). Biyopsi işlemi sırasında Humagen marka mikropipet kullanılarak mekanik parsiyel zona diseksiyonu yöntemi uygulandı. Biyopsi uygulanan blastomerler %0.6 BSA içeren 0.047M KCl hipotonik içinde 30 sn bekletildikten sonra asetik asid/metanol kullanılarak stereo mikroskop (Olympus SMZ 1500) altında fikse edildi. Nükleuslar değerlendirildikten sonra 13, 16, 18, 21 ve 22 no.lu kromozomlara özgü prob karışımı (PB-Mix, Vysis) ile hibridize edildi. Hibridizasyon sonrası %0.3 NP-40 içeren 0.7XSSC solüsyonunda 2 dk yıkanarak 5 mikrolitre Antifade ile birlikte lamel ile kapatıldı. Flöresan mikroskopta (Nikon E-600) kullanılan problara uygun filtreler kullanılarak analiz edildi. Her bir kromozoma özgü iki adet sinyal saptanması durumunda normal kabul edildi. Bir adet sinyal bulunması durumunda monozomi, üç adet bulunması durumunda ise trizomi olarak değerlendirildi. Aynı blastomerde üç veya daha fazla kromozomu ilgilendiren bozukluklar ise kompleks anöploid olarak sınıflandırıldı. Genetik analiz sonuçlarına ve embriyonal gelişim değerlendirmesine göre embriyo transferleri 4. günde ultrasonografi eşliğinde, Gynetics (Belçika) marka yumuşak embriyo transfer kateteri kullanılarak gerçekleştirildi. Kaç embriyo transfer edileceğine genetik inceleme sonrasında normal sonuç verilen embriyo sayısına, hastanın yaşına ve fertilitte durumuna göre karar verildi. Transfer sonrasında luteal faz desteği için vajinal yolla progesteron ovül kullanıldı.

Siklus değerlendirmesi: Transfer sonrası 11. günde gebelik tespiti için kandan beta HCG ölçümü yapıldı (Kimyasal gebelik). Daha sonra transvajinal ultrasonografi ile son adet tarihine göre 7. haftada fetal pol ve fetal kardiyak aktivitenin izlenmesi ile klinik gebelik teyit edildi. Daha sonra hastalar rutin kontrollere çağırıldı. Hastalara PGT sonuçlarının teyidi amacı ile prenatal sitogenetik tanı amaçlı amniyosentez önerildi. Prenatal

takip bilgileri hasta kartlarından ve hastaların kendilerinden elde edildi. Verilerin analizinde SPSS for Windows 13.0 paket programı kullanıldı.

Bulgular

Çalışma süresince 22 hastaya PGT protokolü planlandı. Dört hastanın siklusu çeşitli nedenler ile (2 hastada azalmış ovarian cevap, 1 hastada artmış ovarian hiperstimülasyon riski ve 1 hastada aile kararı nedeni) iptal edildi. On sekiz hastaya preimplantasyon genetik tanı (PGT) işlemi uygulandı. PGT endikasyonları arasında kromozomal anomalili bebek öyküsü, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kaybı, kriptozoospermi bulunmaktaydı. PGT protokolü uygulanan kadınların ortalama yaşı 33.6 ± 4.1 yıl (Değer aralığı: 24-40) iken, erkeklerin ise 35.8 ± 3.7 yıl (Değer aralığı: 28-42) idi. OPU işlemi sırasında toplam 209 oosit elde edildi. Bu oositlerden matür olan (metafaz II) 183 tanesine ICSI işlemi uygulandı. Dondurulmuş embriyo kullanılmadı. Ortalama MII oosit sayısı 10.1 idi. Yüz seksen üç ICSI işlemi sonrası toplam 127 embriyo elde edildi. Embriyolar arasında iyi morfolojiye sahip olan 101 embriyoya üçüncü günde blastomer biyopsisi uygulandı. Normal sonuca sahip 37 (%29.1) embriyo transfer edildi. PGT uygulanan 18 hastanın ikisinde kromozomal olarak normal embriyo bulunmaması nedeni ile embriyo transferi yapılmadı. Diğer 16 hastanın 8'inde kimyasal gebelik oluştu (%50). Beş hastada klinik gebelik saptandı (%31.3). Klinik gebeliklerin ikisi abortus ile sonuçlanırken (bir erken abortus, bir geç abortus) (%12.5), üçü terme kadar ulaştı ve canlı doğum gerçekleşti (%18.8). On sekiz PGT uygulanan hastanın üçünde çoğul gebelik elde edildi (%18.8). Çoğul gebeliklerin ikisi canlı doğum ile sonuçlanırken, biri abortus ile sonuçlandı. Terme ulaşan iki adet ikiz gebelik diamiyotik dikoryonik ikiz gebelik idi. Üçüz gebelik saptanmadı.

PGT uygulanan hastaların endikasyonları ve PGT sonuçları Tablo I'de özetlenmiştir. PGT uygulanan iyi görünümdeki 101 embriyodan 41 tanesi normal kromozomal yapıya sahip idi (%40.6). Diğer 60 embriyoda ise farklı kromozomal bozukluklar saptanmıştır (Tablo I). Ünitimizde uygulanan PGT sonuçları içerisinde en sık rastlanılan kromozomal bozukluk monozomiler idi (29/41) (%70.7).

Mevcut endikasyonlar arasında, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı nedeni ile PGT uygulanan hastalar kendi içinde değerlendirildiğinde (11 hasta), toplam 120 ICSI işlemi uygulanmış olup, 84 embriyo elde edilmiştir. İyi morfolojik görünüme sahip 68 embriyoya PGT işlemi uygulanmıştır. Yirmi sekizi normal olarak

rapor edilirken, 22 tanesinde monozomi saptanmıştır. Bu gruptaki 7 hastanın ikisinde klinik gebelik saptanmış olup, canlı doğum ile sonuçlanmıştır. İki hastada kromozomal olarak normal embriyo gelişmediği için transfer uygulanamamıştır. Üç hastada ise implantasyon gerçekleşmemiştir.

Tartışma

Sınırlı sayıda olgu ile yaptığımız çalışmamızda, GATF Kadın Hastalıkları ve Doğum AD Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesinde PGT protokolü uygulanan hastaların PGT endikasyonları ve sonuçları ile gebelik başarısını değerlendirmeye çalıştık. Bu konu ile ilgili yapılmış diğer çalışmalar incelendiğinde en sık PGT endikasyonlarının ileri anne yaşı, tekrarlayan gebelik kayıpları ve implantasyon başarısızlıkları olduğu görülmektedir. İlerleyen anne yaşı ve gebelik kayıpları arasında bugün için bilinen tek faktör yaşla birlikte artan anöploidi oranlarıdır. Çalışmamızda, OPU işlemi sırasında toplanan ortalama oosit sayısı 11.6 olarak saptanmıştır ve bu sonuç literatürde mevcut diğer çalışmalara benzer oranda bulunmuştur. Çalışmamızda ortaya çıkan %31.3 oranındaki klinik gebelik oranı literatürde mevcut olan klinik gebelik oranlarından (%21-28) daha yüksektir (16-18). Bu durumun nedeni hasta seçimindeki özen ve hasta sayısının kısıtlı olması olabilir. Bununla birlikte %18.8'lik canlı doğum oranı, farklı çalışmalarda bildirilen sonuçlarla (%19-24) benzer bulunmuştur (13-15). Çalışmamızda, 3. günde en az 6 hücreli aşamaya ulaşmış ve morfolojisi iyi olan embriyolara blastomer biyopsisi ile PGT uygulaması yapılmıştır. Mc Arthur ve ark. tarafından retrospektif olarak yapılmış çalışmada, 5-6 günde trofoektoderm biyopsisi uygulanmış, implantasyon oranı %26, abortus oranı %7 olarak bulunmuştur. Çoğul gebelik ise izlenmemiştir (16). Munne ve ark. yaş ve tekrarlayan abortus endikasyonu olan hastalarda 35 yaş üzerindeki PGT uygulamasının başarı oranının daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (17). Otuz beş yaş üstünde PGT uygulanan hastalarımızdan sadece birinde gebelik elde edilmiştir. Çalışmamızda siklusa alınan hastaların iptal oranı incelendiğinde %18.2 (4/22) olarak saptanmıştır; bu oran diğer çalışmalarda geniş aralıkta bulunmuştur. Etselle ve ark. %33 (18), Pickering ve ark. %18 (19) siklus iptal oranı bildirirken, "Eurepaen Consortium" %6.6 (20) iptal oranı bildirmiştir.

Günümüzde ciddi ve tedavisi mümkün olmayan genetik hastalıklar için riske sahip; ileri anne yaşı ve tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan çiftler için PGT uygulaması çok önem kazanmıştır. Bu çalışma GATA Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezinde son

Tablo I. Preimplantasyon genetik tanı uygulanan hastaların endikasyonları ve preimplantasyon genetik tanı sonuçları

Preimplantasyon genetik tanı	Preimplantasyon genetik tanı uygulanan embriyo sayısı	Preimplantasyon genetik tanı sonucu
Yaş ve kromozomal anomali öyküsü	6	3 normal, 1 monozomi 18, 2 kompleks anöploidi
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	6	4 normal, 1 monozomi 16, 1 monozomi 18
Tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü	5	2 normal, 1 trizomi 13, 1 trizomi 18, 1 nükleus yok
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	5	4 normal, 1 monozomi 18
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	4	1 normal, 1 monozomi 16, 2 monozomi 18
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	5	1 normal, 1 anöploidi, 1 monozomi 21, 1 monozomi 22, 1 tetrozomi 18
Tekrarlayan gebelik kaybı	6	2 normal, 2 anöploidi, 1 monozomi 21,
Tekrarlayan gebelik kaybı	4	3 normal, 1 monozomi 13
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	5	3 normal, 1 monozomi 13, 1 triploidi
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	6	3 normal, 1 monozomi 13, 2 monozomi 16
Kriptoospermi	3	3 oositte de nükleus yok
Tekrarlayan gebelik kaybı	4	2 normal, 1 monozomi 18 monozomi 5p, 1 trizomi 13
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	7	3 normal, 1 monozomi 13, 1 monozomi 16, 2 trizomi 21
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	4	1 trizomi 16, 1 monozomi 16, 1 trizomi 21, 1 adet 3 nükleuslu
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	8	3 kompleks anöploidi, 2 monozomi 16, 1 monozomi 18, 1 trizomi 18, 1 kaotik
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	8	4 normal, 4 monozomi 16
Tekrarlayan gebelik kaybı	5	1 normal, 1 trizomi 16, 1 monozomi 18, 1 kompleks anöploidi, 1 nükleus yok
Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı	10	5 normal, 2 monozomi 16, 1 monozomi 21, 1 monozomi 22, trizomi 16

dönemde yapılmış olan PGT uygulama sonuçlarını içermektedir. Sonuç olarak, PGT uygulaması zor ve masraflı bir tanı yöntemidir. Bu nedenlerle PGT uygulamasıyla sağlıklı gebelik elde etme şansını artırmak için uygun hasta seçimi önem kazanmaktadır. PGT konusundaki deneyimlerin artması ve uygun endikasyonlar ile uygulanması halinde gebelik ve canlı doğum oranlarının daha da artacağına inanıyoruz.

Kaynaklar

1. Gardner RL, Edwards RG. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature* 1968; 218: 346-349.
2. Munne S, Weier H-UG, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994; 51: 373-379.
3. Delhanty JDA, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RML. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997; 99: 755-760.
4. Grace J, Toukhy T, Scriven P, et al. Three hundred and thirty cycles of preimplantation genetic diagnosis for serious genetic disease. I. Clinical considerations affecting outcome. *BJOG* 2006; 113: 1393-1401.
5. Katz MG, Fitzgerald L, Bankier A, Savulescu J, Cram DS. Issues and concerns of couples presenting for preimplantation genetic diagnosis (PGT). *Prenat Diagn* 2002; 22: 1117-1122.
6. Sermon KD, Michiels A, Harton G, et al. ESHRE PGT Consortium data collection VI: cycles from January to December 2003 with pregnancy follow-up to October 2004. *Hum Reprod* 2007; 22: 323-336.
7. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, et al. Polar body based preimplantation diagnosis for X-linked genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 38-42.
8. Kuliev A, Verlinsky Y. Meiotic and mitotic non-disjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 401-407.
9. Clement-Sengewald A, Buchholz T, Schutze K, Berg U, Berg ED. Non-contact, laser-mediated extraction of polar bodies for prefertilization genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 183-194.
10. Munne S, Wells D. Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002; 14: 239-244.
11. Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2000; 20: 1030-1037.
12. De Boer KA, Catt JW, Jansen RPS, et al. Moving to blastocyst biopsy for preimplantation genetic diagnosis and single embryo transfer at Sydney IVF. *Fertil Steril* 2004; 82: 295-298.
13. Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, et al. ESHRE PGT Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow up to October 2003. *Hum Reprod* 2006; 21: 3-21.
14. Vandervorst M, Staessen C, Sermon K, et al. The Brussels' experience of more than 5 years of clinical preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 364-373.
15. de Die-Smulders CE, Land JA, Dreesen JC, Coonen E, Evers JL, Geraedts JP. Results from 10 years of preimplantation-genetic diagnostics in The Netherlands. *Ned Tijdschr Geneesk* 2004; 148: 2491-2496.
16. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* 2005; 84: 1628-1636.
17. Munne S, Chen S, Fischer J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35

- years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005; 84: 331-335.
18. Feyereisen E, Steffann J, Romana S, et al. Five years' experience of preimplantation genetic diagnosis in the Parisian Center: outcome of the first 441 started cycles. *Fertil Steril* 2007; 87: 60-73.
 19. Pickering S, Polidoropoulos N, Caller J, Scriven P, Ogilvie CM, Braude P. Preimplantation Genetic Diagnosis Study Group. Strategies and outcomes of the first 100 cycles of preimplantation genetic diagnosis at the Guy's and St. Thomas' Center. *Fertil Steril* 2003; 79: 81-90.
 20. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: data collection IV: May- December 2001. *Hum Reprod* 2005; 20: 19-34.