

# Preimplantasyon Genetik Tanı

## PREIMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS

T. Umut K. DİLEK\*, Mesut ÖKTEM\*, Akgün YILDIZ\*

\*Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, ANKARA

### Özet

Preimplantasyon genetik tanı yardımcı üreme tekniklerinin bir parçası olarak 10 yıl kadar önce İngiltere de geliştirildi. Bu teknik ile X' e bağlı geçiş gösteren hastalıklar, trizomiler, sayısal ve yapısal somatik kromozom anomalileri ve bazı tek gen defektleri ortaya konabilmektedir. Preimplantasyon genetik tanı iki aşamalı bir teknik olup ilk aşamada oositden polar cisim veya klivaj dönemi embriyodan blastomer alınması ve daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya floresan in-situ hibridizasyon (FISH) ile değerlendirilmesi şeklindedir. Bu yazıda tekniğin ana prensiplerini, mevcut durumunu ve tanı konabilen genetik bozuklukların neler olduğunu tartışacağız.

**Anahtar Kelimeler:** Preimplantasyon genetik tanı,  
Embriyo biyopsisi, Floresan in-situ  
hibridizasyon tekniği (FISH),  
Polar cisim biyopsisi

T Klin Jinekoloj Obst 2002, 12:498-503

### Summary

Preimplantation genetic diagnosis was developed as a part of the assisted reproductive techniques in the UK 10 years ago. X-linked disorders, trisomy or other numeric and arrangement disorders of the somatic chromosomes and single gene defects are identified by this technique. Preimplantation genetic diagnosis is a two step technique. The first is to remove polar body from the oocyte or blastomere from the cleavage stage embryos and second is the polymerase chain reaction (PCR) or fluorescent in-situ hybridization (FISH). However preimplantation genetic diagnosis is expensive, sophisticated and experimental and there were a lot of questions about it. In this article we discuss main principles of technique and current status of preimplantation genetic diagnosis, types of genetic disorders which testing was developed.

**Key Words:** Preimplantation genetic diagnosis,  
Embryo biopsy, fluorescent in-situ  
hybridization technique (FISH),  
Polar body biopsy

T Klin J Gynecol Obst 2002, 12:498-503

Başta gelişmiş toplumlar olmak üzere kadınlarda çocuk sahibi olma yaşı giderek artmaktadır. Bunun sonucunda reproduktif dönemin sınırları giderek genişlemekte ve bu durumda başta anöploidiler olmak üzere genetik hastalıkların sıklığı da artmaktadır. Preimplantasyon genetik tanının amacı, yardımcı üreme teknikleri uygulanan hastalarda ister yaş, isterse altta yatan birtakım nedenler sonucu genetik hastalıkların ortaya çıkma riskinin olduğu durumlarda, bu riskin erken dönemde ortaya konmasıdır. İlk başarılı preimplantasyon genetik tanı 1968 yılında tavşanlarda trofoektoderm biyopsisi ile seks kromatini ve cinsiyet tayinine kadar uzanır. İnsanda ise ilk başarılı PGT, embriyo blastomer biyopsisi ile 4 hücreli aşamada cinsiyet tayini amacı ile yapılmıştır.

Preimplantasyon genetik tanının başlıca aşamaları genetik incelemenin yapılacağı hücrenin alınması ve bunu takiben Polymerase Chain Reaction (PCR) veya Fluorescent

in-situ Hybridization (FISH) gibi yöntemler kullanarak genetik tanı yoluna gidilmesidir.

### Teknik

#### Biyopsi İşlemi

PGT, implantasyon öncesi gelişim döneminde üç farklı hücre tipinde yapılabilir. Bunlar; oosit/zigot döneminde polar cisim, bölünme evresindeki embriyoda blastomer ve blastosist döneminde ise trofoektoderm hücreleridir.

#### Blastomer Biyopsisi (Klivaj Evresi Biyopsisi)

Bu amaçla 3. günde ortalama 6-10 hücreden oluşan embriyolar kullanılmaktadır. İşlemin ilk safhası oosit veya embriyoyu çevreleyen zona pellucida'nın açılmasıdır. Zonanın diseksiyonu için halen üç yöntem kullanılmaktadır. Bunlar;

1-Asit tyrode solüsyonu,

- 2-Mekanik olarak parsiyel zona diseksiyonu,  
3-Lazer.

Bu yöntemler içinde en çok kullanılan lokal olarak asit tyrode uygulanmasıdır. Ancak asit tyrode kullanımı, meydana getirilen deliğin çapının kontrol edilmesinin zor oluşu, oositin gelişimini olumsuz yönde etkileyebilmesi ve polar cisim biyopsisinde uygun olmayışı gibi problemleri de getirmektedir .

Asit tyrode kullanılarak yapılan embriyo biyopsisinde alınan hücre interferans kontrast mikroskopu ile interfaz nükleusunun olup olmadığı açısından değerlendirilir. Eğer interfaz nükleusu mevcut ise embriyo hemen tekrar kültür ortamına transfer edilir. Eğer alınan hücrede nükleus izlenemiyorsa bu durumda 6-8 hücreli bu aşamada ikinci bir hücre alınabilir. Zona üzerinde açılan delik aspirasyon için kullanılacak pipet çapında, ancak blastomerin çapından küçük olmalıdır (1,2).

Bu yöntemin standart uygulamasında kullanılan 3 pipetli yöntem yerine, 2 pipetli yöntem kullanılarak geçen zamanın kısaltılması ve manipülasyon için yapılan işlem sayısını azaltılması mümkün olabilir. Bu yaklaşımda asit tyrode ile zona drilling ve aspirasyon için farklı pipetler kullanılması yerine hem drilling hem de aspirasyon için tek pipet kullanılması yoluna gidilir. Bu yöntemle işlem yapan Chen ve arkadaşları (2) zona diseksiyonu için asit tyrode kullanırken mikromanipülasyon için sadece 2 alet kullandıkları kendi serilerinde, iki pipetli yöntemin üç pipetli yöntemle göre daha kısa sürdüğü ancak iki grup arasında intakt blastomer elde edilmesi, blastosist aşamasına ilerleme açısından fark saptanmadığını bildirmişlerdir. İki pipetli yöntem konvansiyonel metot kadar etkilidir.

Zona mekanik yolla da disseke edilebilir. Embriyo bir yandan stabilize edilirken ilk kesi yapılır. Ardından embriyoya vertikal bir rotasyon yaptırılıp uygun pozisyon verilerek ikinci kesi yapılır ve bu yolla + veya V şeklinde zonada bir flap oluşturulur. Embriyo biyopsisi işlemini tamamlamak için embriyo hazırlanan flap saat 3 hizasına gelecek şekilde tekrar rotate edilip tekrar tutucu pipet ile stabilize edilir ve mikropipet ile zonada açılan flapden girerek seçilen blastomer hücre kitlesinden ayrılır. Mikro pipetin çekilmesi ile flap tekrar kapanır. Bu işleme üç boyutlu parsiyel zona diseksiyonu yöntemi denir (3).

Zona diseksiyonu için kullanılan alternatif yöntemlerden biri de nonkontakt lazer ile yapılan mikrodiseksiyondur. Bu zamana kadar yapılan hayvan deneylerinde polar cisim biyopsisinde konvansiyonel yöntemler kadar etkili olarak bildirilmekle birlikte insan embriyolarında yapılan çalışmalar sınırlıdır (4,5) ve yöntem için henüz FDA'dan onay alınmamıştır.

Klivaj evresinde yapılan embriyo biyopsisinde ortaya çıkan bir problem blastomerlerin giderek artan hücresel bağlantılar ile birbirlerine bağlanarak kompakt bir yapı

meydana getirmesidir. Bunun sonucunda embriyo biyopsisinin güçleşerek biyopsi zamanı uzatmakta ve blastomer lizisi artmaktadır. Bu amaçla bazı araştırmacılar tarafından Ca ve Mg içermeyen medyum kullanılması önerilmiştir. Bu yolla junctionlar zayıflamış ve embriyo kolaylıkla hücre kitlesinden uzaklaştırılabilmektedir (6).

Son zamanlarda birçok IVF merkezinde embriyoların blastosist dönemine kadar kültüre edilmesi durumunda, transfer sonrası gebelik oranlarının konvansiyonel metotlarla elde edilenlere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Ancak in vitro ortamlarda embriyoların sadece %40'ı blastosist aşamasına ulaşmaktadır. Eğer PGT için blastosist aşaması beklenemez olursa bu durumda genetik tanı şansı kaybedilebilir, biyopsi veya tanı başarısız olabilir. Blastosist yarıklığında trofektoderm hücreleri zona pellucida'nın dışına doğru çıkar. Bu durumda biyopsi kolaylıkla yapılabilir. Ancak in vitro ortamlarda insan embriyolarında spontan hatching oldukça nadirdir. Bu nedenle blastosist biyopsisi için mutlaka assisted hatching gereklidir. Mikromanipülasyon sistemine alınan embriyo, geniş kalibreli bir pipet ile iç hücre kitlesinin (Inner Cell Mass) olduğu tarafta stabilize edilir. Ardından ters taraftan genellikle saat 3 hizasından zona üzerine lazer veya mekanik araçlar ile delik açılır. Bunu takiben embriyo tekrar kültür ortamına konulur. Bir süre sonra kültür ortamı incelendiğinde trofektoderm hücrelerinin bu delikten dışarı herniye olduğu izlenir. Bu hücre kitlesi mekanik yolla veya lazer ile embriyodan ayrılır ve genetik incelemeye geçilir. Ancak blastosist kültürü tüm merkezlerde rutin kullanıma geçmemiştir ve kromozom materyalinin iç hücre kitlesinden farklı olabileceği ve yalancı pozitiflik ve negatiflikler taşıyabileceği unutulmamalıdır (1).

Polar cisim biyopsisi ise PGT' da kullanılan üçüncü yöntemdir. Bu kapsamda metafaz II aşamasında birinci polar cisim ve zigot aşamasındaki ikinci polar cisim mikromanipülasyon yöntemleri ile izole edilip FISH veya PCR ile değerlendirilir. Bu yolla ne birinci polar cisim ne de ikinci polar cismin alınmasının embriyonal gelişim ve implantasyon oranına olumsuz etkisi yoktur. Anne yaşına bağlı oluşan anöploidilerin büyük bir kısmı 1. mayozdaki nondisjunction'a bağlıdır. Oosit elde edildikten sonra erken kromatid ayrılması olduğu için alınan polar cismin 6 saat içinde fiksasyonu gereklidir. Ancak doğru tanı için ikinci polar cismin de değerlendirilmesi önerilir. Polar cismin biyopsisinde zona pellucida'nın açılması için kullanılan yöntemler blastomerin izolasyonu için kullanılanlardan farklı olup sık kullanılan bir yöntem olan asit tyrode solüsyonu tercih edilmemektedir. Bu amaçla genellikle mekanik yöntemler kullanılır.

Polar cisim alınırken eğer oosit ile aralarında sitoplazmik köprü olduğu izlenirse bu durumda biyopsiye bir süre ara verip inkübasyona biraz daha devam edilerek işlem tekrar denemelidir. Polar cismin alınmasını takiben

zona açıldığından dolayı bu olgularda IVF planlansa bile ICSI'ye geçilmesi önerilir (1).

### Genetik Değerlendirme

Kullanılan genetik tanı yöntemleri bir takım modifiye uygulamalara rağmen PCR ve FISH'dir.

#### Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR spesifik DNA sekansının yaklaşık ikiyüzbin kez çoğaltılmasına dayanan bir moleküler tanı yöntemidir. Bu amaçla oligonükleotid dizilerinden oluşan primerlere ihtiyaç vardır. DNA primeri daha önceden belirlenen ve orijinal DNA zincirinde aranan bölgeye karşılık gelerek tamamlayan birkaç yüz nükleotidden meydana gelen tek zincirli DNA parçasıdır. İşlemden önce primerler DNA'nın bulunduğu ortama eklenir. İşleme başlanabilmesi için DNA'nın denatüre edilerek çift sarmallı yapısının açılması gerekir. Daha sonra ortam soğutularak ortama önceden eklenen DNA primerleri ile DNA hibridizasyonunun olması beklenir. Ardından DNA polimerazın varlığında (Tag Polimeraz) DNA sentezi gerçekleşir. Bu döngüde sırası ile denatürasyon, hibridizasyon ve polimerizasyon aşamalarından geçerek DNA zinciri geometrik artışının olması sağlanır. Ardından elde edilen örneğe poliakrilamid jel elektroforezi (%10) 30 dakika süre ile uygulanıp bunu takiben ethidium bromide ile boyanarak ultraviyole ışığı altında değerlendirilir. PCR, PGT için ilk kullanılan moleküler genetik tanı yöntemidir. İlk olarak seks tayini için kullanılmıştır. PCR da karşılaşılan başlıca problemler, ortamın hücre ve DNA ile kontaminasyonu ve tek hücreden elde edilen düşük miktardaki DNA (6 pg) ile yapılan incelemenin sensitivitesidir. Böyle düşük miktardaki DNA içeriği ile yapılacak olan genetik değerlendirmenin spesifitesini arttırmak için ikinci bir grup PCR işlemine gidilebilir.

PCR tek gen hastalıklarının tanısında kullanılan başlıca yöntemdir. Ancak allel drop-out veya tercihi amplifikasyon PCR'ın güvenilirliğini azaltan bir faktördür.

PCR ile tanısı konan ilk hastalık Kistik Fibroz olup son yıllarda PCR kullanılarak PGT konabilen hastalıklar, Tablo 1'de verilmiştir (7-13).

PCR'ın sensitivitesini arttırmak için kullanılan bir yol da DNA primerlerinin flourosan ile işaretlenmesidir. Bu metot aynı esnada hem seks kromozomu tayini hem de kistik fibroz gen tayinine izin verir. Bu yolla DNA kontaminasyonunun olup olmadığının tespiti de mümkündür.

#### Fluorescent In-Situ Hybridization (FISH)

FISH, genellikle tek gen hastalıklarından çok otozomal ve seks kromozomlarında ortaya çıkan sayısal ve belirgin yapısal değişiklikleri ortaya koymak için kullanılan bir yöntemdir. Klasik sitogenetik yöntemlerin uygulanabilmesi için mitoz giren hücrelerin metafaz evresinde durdurulması gereklidir. Alınan blastomerin genetik değer-

**Tablo 1.** PCR ile preimplantasyon genetik tanısı mümkün olan hastalıklar

Kistik Fibroz
Bazı kalıtsal deri hastalıkları
Orak hücreli anemi,
Talassemiler,
Marfan sendromu,
Spinal müsküler atrofi, (SMA)
Frajil X sendromu,
Charcot Marie Tooth tip 1A,
Kalıtsal kanserler (Ailesel Polipozis Kolli)
Myotonik Distrofi,
Lesch Nyhan sendromu,
Konjenital Adrenal Hiperplazi,
Huntington Koresi
Tay-Sachs hastalığı
DiGeorge sendromu

lendirmesi için bu klasik değerlendirme yönteminin uygulanması teorik olarak mümkündür. Ancak blastomer nükleuslarının sadece %25'inde metafaz kromozomları izlenmesi, bantlama kalitesinin yetersiz oluşu ve tanıya kısa sürede gidilmesinin gerekli oluşu gibi nedenlerden dolayı klasik sitogenetik yöntemlerinin kullanımı uygun değildir. FISH yönteminde mikromanipülasyon yöntemleri ile elde edilen blastomer veya polar cisimde, interfaz nükleusunda DNA'nın belli bölgelerine spesifik, floresan ile işaretlenmiş probolar kullanılarak kromozomlarda ki sayısal ve eğer değerlendirilecek bölgeler yeterince büyük ise delesyon, translokasyon gibi gros değişiklikler saptanabilir. Aynı seansta farklı renkler ile işaretlenmiş birden fazla prob ile çalışılabilir veya yapılan bir yıkama işlemi takiben ikinci bir grup prob eklenerek incelenen kromozom sayısı artırılabilir. FISH'in başlıca avantajı ileri maternal yaşa bağlı olarak artışı beklenen anöploidiler ve X'e bağlı resesif geçiş gösteren hastalıklarda cinsiyet tayini ve mevcut imkanlar dahilinde belli kromozomlar (X, Y, 21, 13 v.b) için hazırlanan probolar kullanılarak o kromozomların sayısal anomalilerinin ortaya konabilmesidir.

Yardımcı üreme tekniklerine başvuran bir grup hasta ister yaşa bağlı isterse tekrarlayan abortuslar gibi nedenler ile preimplantasyon genetik tanıya ihtiyaç duyabilir. Hastalar içerisinde fenotipik olarak normal olan translokasyon taşıyıcıları gibi ileriki kuşaklara kromozomal düzensizlikleri aktarma riski olan bireyler FISH ile saptanabilir. FISH ile kromozomlardaki sayısal değişiklikler, Robertsonian tipi translokasyonlar, resiprokal translokasyonlar, inversiyon ve gonadal mozaizimler saptanabilmektedir. Mevcut prob setleri ile blastomerde X, Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22'nci kromozomlar incelenebilir (1). Aynı şekilde multicolor FISH problemleri ile polar cisimde de 13, 18 ve 21. kromozomlar işaretlenebilir. Ancak farklı kromozomların tutulabilmesi ve farklı kırılma noktalarının kişisel farklılıklar gösterebilmesi nedeni ile tüm translokasyonları sapt-

mak için universal bir modelin kullanımı her zaman mümkün olmamakta ve her çift için farklı prob setlerinin kullanımı gerekebilmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için şu anda 2 yöntem denenmektedir. Bunlardan biri interfaz konversiyonu olup bu metotta ikinci polar cisim veya blastomerden alınan nükleus enükle bir oosite nakledilerek interfaz aşamasındaki nükleusun metafaz aşamasına dönüşümü sağlanmaktadır. Bazı hallerde metafaz kromozomlarının karyotiplemesi güç olabilmektedir. Bu durumda spektral karyotipleme veya multicolor FISH uygulanabilir. Diğer yöntem ise karşılaştırmalı hibridizasyon olup burada hem test DNA'sı hem de kontrol DNA'sı farklı renklerle işaretlenip aynı ortama konarak metafaz ayrılmasına bırakılır. Eğer taşıyıcı kadınsa bu durumda polar cisimde kromozom boyaması bölgeye spesifik problemler ile kombine edilir.

40'lı yaşlara yaklaştıkça kadınlarda mayoz bölünme sırasında ortaya çıkan kromozomal değişikliklere de bağlı olarak fertilitede azalma olduğu bilinmektedir. Son yıllarda IVF'e giden kadınlarda oosit veya elde edilen embriyoların anöploidiler açısından değerlendirilmesi tartışılmaktadır. Ancak uygulanan prosedürlerin teknik sınırlamaları ve bu hastalardan zaten az sayıda embriyo elde edilmesi gibi nedenlerle uygulanacak böyle bir yöntemin faydaları açık değildir. Bu yöntemin IVF'e giden reproduktif dönemin sonlarındaki kadınlarda fayda sağlayıp sağlamayacağını ortaya konması için uluslararası çok merkezli klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Seks kromozomlarının belirlenmesi ile özellikle X'e bağlı geçiş gösteren hastalıkların tayini ve postnatal dönemde hastalanacak olan erkek embriyoların eliminasyonu mümkündür. Bu amaçla FISH kullanılması durumunda tekniğin yeterliliği blastomer başına %90.5 eğer alınan blastomerin nükleusu net olarak izleniyorsa %95'tir. Tekniğin başarısızlık oranı ise %1.2'dir (14).

Floresan in situ hibridizasyonunun uygulanması sırasında karşılaşılan sınırlamalar Tablo 2 verilmiştir. Preimplantasyon genetik tanı sırasında karşılaşılan önemli bir problem preimplantasyon embriyolarda karşılaşılan önemli orandaki mozaisizmdir. Bu durumda ortaya şu soru çıkmaktadır. Acaba preimplantasyon genetik tanı sırasında genetik olarak değerlendirilen blastomer DNA'sı embriyonun genetik yapısını ne ölçüde temsil etmektedir? Hatalı tanı riski rölatif olarak düşük olmakla birlikte eğer iki blastomer değerlendirilecek olursa bu risk daha da azalır.

### Polar Cisim Biyopsisi

Kadında her iki mayoz bölünme sonucunda iki küçük polar cisim oluşur. Birinci mayoz ovulasyonu takiben oluşur ve bir oosit ile birinci polar cisim oluşur. Oluşan birinci polar cisim haploid yapıda olup oositteki genetik yapının komplementerini içerir ve kondanse yapıdadır. İkinci polar cisim fertilizasyonu takiben ortaya çıkar,

**Tablo 2.** FISH yönteminin uygulanması sırasında karşılaşılan problemler

Mozaisizm, Yanlış negatiflik, Multinükleer blastomerler, Fiksasyon sırasında mikronükleusun kaybı, Polimorfizm
--

dekondanse yapıdadır ve nükleus yapısını oluşturur. Polar cisim analizleri bir takım avantajlar taşır. Bunların başında polar cismin alınmasının embriyonun implantasyon ve gebelik oluşum potansiyeline olumsuz etkisinin olmayışı gelmektedir. Gebelikte ve doğum sonrası yapılan sitogenetik incelemeler, ortaya çıkan sayısal ve morfolojik kromozomal anomalilerin büyük kısmının 1. mayoz sırasında ortaya çıkan aberasyonların sonucu olduğunu göstermiştir. Erkek gamette, II. mayoz bölünme ve postzigotik mitoz bölünmelerin kromozomların sayısal ve yapısal bozukluklarına olan katkısının daha düşük olduğu izlenmiştir. Ancak farklı kromozomlar için bu oran değişiklik gösterebilir. Polar cisim biyopsisinin önemli bir avantajı da polar cisimlerin oosit pick-up'ından kısa bir süre sonra veya ICSI'yi takiben alınabilmesi olup zaman faktörü açısından blastomer biyopsisine üstünlük taşır. Başlıca dezavantajı ise paternal ve postzigotik anöploidinin saptanamamasıdır.

Verlinsky ve arkadaşlarının bir çalışmasında 34 yaşın üzerinde yardımcı üreme teknikleri uygulanan kadınlarda birinci ve ikinci polar cisimleri değerlendirmek için FISH ile 13, 18 ve 21. kromozomlar işaretlenmiştir. Sadece her iki mayoz bölünme de ortaya çıkan anomaliler saptanmakla kalmamış birinci mayoz sırasında ortaya çıkan ve anöploidilerden sorumlu olabilecek olan non-disjunction bulguları araştırılmıştır. Toplam 598 siklusta 3,651 oosit veya zigot değerlendirilmiş, 2,952'sinde (%80.9) FISH başarılı olmuş, fertilize embriyolardan 1681'i normal (%46), 1271'i anöploid (%35) olarak kabul edilmiştir. Embriyoların 1433'ü (%39) transfer edilebilir durumda olup toplam 557 transfer yapılmış ve 119 gebelik elde edilmiştir. Otuzbeş gebelik ise spontan abortus ile sonuçlanmış (%29,3), 78 canlı doğum gerçekleşmiş, transfer başına gebelik yüzdesinin %21,3, siklus başına ise %19,9 olduğu bildirilmiştir (15). PGD yapılmayan Londra'daki St. Thomas hastanesinde 35 yaş üzerinde IVF yapılan 208 kadında gebelik hızı, 31 hastada zayıf stimülasyon nedeniyle yapılan siklus iptaline rağmen %22'dir (16).

### Klivaj Evresi Biyopsisi-Blastomer Analizi

Klivaj evresi biyopsisi ve blastomer incelemesi preimplantasyon genetik tanı yöntemleri içerisinde en çok uygulananlarıdır. Bir takım modifikasyonları olmakla

birlikte blastomer eldesi düşük kayıp oranları ile sağlanabilmekte ve bu yolla genetik inceleme için diploid genetik materyal elde edilebilmektedir. Başlıca dezavantajı transfer öncesinde FISH için gerekli zamanın kısıtlı olmasıdır. Klivaj dönemi embriyosunda anöploidi taramasında başlıca handikap birçok çalışmada Multicolour FISH yöntemi ile yapılan genetik değerlendirmede de gösterildiği gibi mozaizisizmdir. Bu tip kromozomal değişiklikler nükleer anomaliler içeren embriyolarda daha siktir ve multinükleer blastomer içeren embriyoların transfer edildiği kadınlarda gebelik hızı düşüktür. Munne ve arkadaşlarının (1998) bir çalışmada FISH analizinin hatalı tanı oranı %15'dir (17). Gianoroli ve arkadaşları (1999) ileri maternal yaş, tekrarlayan IVF başarısızlığı, dengeli translokasyonlar gibi karyotipik değişiklikler nedeni ile 86 çifti ve 116 siklusu blastomer analizi ve FISH kullanarak değerlendirmişlerdir (18). Burada elde edilen blastomerleri iki gruba ayırmışlardır. Birinci grupta FISH için X, Y, 13, 16, 18, 21. kromozomlar için , ikinci grubu ise bunlara ek olarak 14, 15, 22. kromozomlar için proba işaretlemişlerdir. Klivaj dönemi biyopsisi ve FISH' in diagnostik yeterliliği %82.3 olarak saptanmıştır (18). Her iki grupta embriyoların %50'si anöploid olarak saptanmış, implantasyon ve gebelik hızları her iki grupta da birbirine yakın olarak seyretmiş, implantasyon hızı 1. grupta %24.5, 2. grupta %23.6, siklus başına gebelik hızı 1. grupta %26.8, 2. grupta ise %28 olarak saptanmıştır. Her iki grupta transfer edilen toplam 91 embriyodan 36 gebelik elde edilmiş, bu gebeliklerin ikisi spontan abortus ile sonuçlanmış ve 22 canlı doğum gerçekleşmiştir. Bu iki grupta da gebelik kaybı %5.8 olarak bulunmuştur. İkinci gruptaki hastaların yaş ortalaması birinci gruba göre daha yüksektir (1. grupta 35.4 iken 2. grupta 37.2) (18).

ESHRE' nin 1997 yılında Edinburgh'daki toplantısında Preimplantasyon Genetik Tanı (PGT) konsorsiyumunun kurulmasına karar verildi. Bu konsorsiyumun 1999 yılındaki toplantısında 12 merkezde 323 çifte ait 392 PGT siklusunun verileri değerlendirilmiş. Genetik değerlendirme için olguların 54'ünde FISH diğer olgularda ise PCR uygulanmış. Tespit edilen toplam 110 fetal kesenin 58' inin tek, 21'inin ikiz, ikisinin üçüz, birinin ise dördüz olduğu bildirilmiş. 11 gebelik ise birinci trimesterde kaybedilmiş. Olgulara ait veriler değerlendirildiğinde tespit edilen kromozom anomalilerinin başında resiprokal translokasyonların geldiği izlenmiş.

Toplam 70 konseptusta preimplantasyon genetik tanı, prenatal genetik tanı yöntemleri ile konfirme edilmiştir. Uygulanan PGT yöntemleri bazında ele alındığında FISH yapılan 76 konseptusun 45'inde (%59) ve PCR yapılan 34 konseptusun 25'inde (%64) tanı konfirme edilmiştir. 70 gebelikten sadece birinde hatalı tanı konulmuş. Tanıları prenatal veya postnatal dönemde konfirme edilen bu toplam 70 gebelik içinde hatalı tanı yüzdesi sadece %1,4'dür (19).

Fetal seks tayini özellikle X'e bağlı geçiş gösteren hastalıkların prenatal tanısı açısından önem taşımaktadır. X'e bağlı resesif geçiş gösteren 300'den fazla monogenik hastalık bildirilmiştir. Preimplantasyon genetik tanı ile fetal cinsiyetin saptanması ile özellikle erkek embriyoların eliminasyonu mümkündür. Preimplantasyon genetik tanı amacı ile FISH ve PCR kullanılabilir. Fetal seks determinasyonu için bu iki yöntemin karşılaştırıldığı bir çalışmada PCR ile belirlenen sonuçlar FISH ile de doğrulanmıştır (20). FISH'in yöntem olarak genomik kontaminasyona daha az maruz kalması ve kromozomların sayısal olarak değerlendirilebilmesi PCR'a olan üstünlüğüdür. Ancak FISH, alman blastomerin polinükleer olduğu hallerde hatalı tanıya yolaçabilir. Eğer hastalık için spesifik primerler var ise PCR PGT için tercih edilen metot olmalıdır (20).

Kadın veya erkeğin translokasyon taşıyıcısı olması bir grup sorunu da beraberinde getirmektedir. Resiprokal veya Robertsonian tipi translokasyon taşıyıcılarında normal populasyona göre daha yüksek oranda infertilite görülmekte olup kromozom anomalili çocuk ve multipl spontan abortus şanssızlığına sahiptir. IVF-ET yapılması planlanan bu gibi hastalarda preimplantasyon genetik tanı ile anöploidiler (Trizomi 21 vakalarının %5'ini Robertsonian tipi translokasyonlar meydana getirir) ve X'e bağlı geçiş gösteren hastalıklar ekarte edilebilir ve normal embriyoların transferi ile gebeliğin devam ettirilebilme şansı da artar. Bu amaçla kullanılacak tek güvenilir preimplantasyon genetik tanı yöntemi interfaz nükleuslarda translokasyon tipleri için geliştirilen spesifik problemler ile yapılacak olan floresan in situ hibridizasyondur. Munne ve arkadaşları (1998) maternal orjinli translokasyonları tespit için birinci polar cisim kromozomlarını oosit pick-up' ını takiben 6 saat içinde kromozom boyama problemlerini kullanarak FISH ile değerlendirmişlerdir (21). Üç translokasyon taşıyıcısı kadından toplanan 31 oositte elde edilen 23 birinci polar cisim değerlendirilmiştir. Normal oositlere IVF-ET uygulanmış ve üç kadın gebe kalmıştır. Üçüncü gebenin gebeliği 7. haftada abortus ile sonlanmış ve abortus materyalinin sitogenetik incelemesinde dengeli translokasyon taşıyıcısı olduğu saptanmıştır. Diğer iki gebenin ikiz gebelikleri ise terme ulaşmıştır. İkinci gebenin bebeklerinden biri karyotipik olarak normal iken, diğerinin babada mevcut olan dengeli translokasyon nedeni ile aynı şekilde dengeli translokasyon taşıdığı saptanmış. Aynı araştırmacılar iki yıl sonra yaptıkları başka bir çalışmada PGT ile translokasyon taşıyıcılarında spontan abortusların %95' den %13'e düştüğünü bildirmişlerdir. Eğer embriyoların %50'den fazlası normal ise gebelik şansı daha fazladır. Robertsonian tipi translokasyonlarda resiprokal translokasyonlara göre anormal gamet sayısı daha az ve gebelik şansı daha yüksektir. Translokasyonların telomerik problemler kullanarak %6 hata hızı ile tanısı konabilmektedir (22).

Blastomer biyopsisini veya polar cisim biyopsisini takiben embriyoların dondurularak saklanması ve daha sonra çözdürülerek transferi daha önceki embriyo transferleri başarısız olan hastalarda mantıklı bir yaklaşım olarak görünmektedir (23). Ancak çözdürülerek tekrar bu embriyoların kullanılmasını takiben viabiliteyi embriyo biyopsisi yapılmayanlara göre daha düşük bulunmuştur (23,24). İşlem sonrası embriyo survi'lerinin düşük olmasının önemli bir nedeni kullanılan dondurma prosedürüdür. Zonanın intakt olup olmaması ve zonanın kalınlığı ve membran üzerindeki glikoprotein örtü embriyo sağ kalımını belirleyen önemli bir faktördür (24).

### Sonuç

Son on yıllık süre içinde yardımcı üreme teknikleri ve preimplantasyon genetik tanı sadece tanı imkanlarımızı genişletmemiş aynı zamanda insan gelişiminin erken dönemine ait karanlıkta kalan bir takım noktaların aydınlatılmasını da sağlamıştır. Bununla birlikte preimplantasyon genetik tanı henüz deneysel bir nitelik taşıyan bir genetik tanı yöntemidir. Bu tanı yöntemi halen bazı ülkelerde illegal konumdadır.

Öte yandan preimplantasyon genetik tanıya ilişkin birtakım etik problemler önümüzde bulunmaktadır. Bunların en basiti cinsiyet, ırk, bir takım karakterlerin seçimi ve ayrımı gibi problemler şeklinde ortaya çıkabilir. Ancak bu özelliklerin çoğunun multifaktöryel geçiş göstermeleri ve tek hücre ile değerlendirmelerinin şu an için mümkün olmaması nedeni ile şimdilik problem olarak görünmemektedir. Şu an için preimplantasyon genetik tanının endikasyonları henüz tam oturmamıştır. Ancak endikasyonları belirlerken bu yöntemin amacının embriyo implantasyon oranlarını arttırmak, abortus oranını ve anomalili doğum sayısını azaltmak dolayısı ile yardımcı üreme tekniklerinin etkinliğini arttırmak olduğu unutulmamalıdır. Endikasyonları belirlemek kadar önemli bir konu da bu tanı yöntemlerinin kötüye kullanımını önleyecek yasal çerçeve ve üst kontrolün oluşturulmasıdır.

### KAYNAKLAR

- Küçük T, Bahçe M. Preimplantasyon genetik tanı. *Türk Fertilite Dergisi* 1999; 7: 121-31.
- Chen SU, Chao KH, Wu MY, Chen CD, Ho HN, Yang YS. The simplified two-pipette technique is more efficient than the conventional three-pipette method for blastomere biopsy in human embryos. *Fertil Steril* 1998; 69: 569-75.
- Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y. Three dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil and Steril* 1999; 71: 308-13.
- Boada M, Carrera M, De La Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga A. Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15 :302-7.
- Küçük T, Cohen J. 1,48 µm diyod lazer kullanılarak biyopsi yapılan embriyolarda preimplantasyon gelişim. *Türk Fertilite Dergisi* 1999; 7: 132-6.
- Dumoulin JC, Bras M, Coonen E, Dreesen J, Geraedts JP, Evers JL. Effect of Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> – free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Hum Reprod* 1998; 13:2880-83.
- Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RML, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *New Eng J Med* 1992; 327: 905-9.
- Xu K, Shi ZM, Veeck LL, Hughes MR, Rosenwaks Z. First unaffected pregnancy using preimplantation genetic diagnosis for sickle cell anemia. *JAMA* 1999; 281: 1701-06.
- Harper JC, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12: 67-72.
- Fallon L, Harton GL et al. Preimplantation genetic diagnosis for spinal muscular atrophy type I. *Neurol* 1999; 53:1087-90.
- Harton GL, Tsipouras P. Preimplantation genetic testing for Marfan syndrome. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:713-5.
- Ao A, Wells D, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis of inherited cancer: Familial adenomatous polyposis coli. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15:140-4.
- Iwarsson E, Ahrlund R L et al: Preimplantation genetic diagnosis of DiGeorge syndrome. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:871-5.
- Staessen C, Van Assche E, Joris H, Bonduelle M, Vandervorst M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:382-9.
- Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M et al. Prepregnancy genetic testing for age-related aneuploidies by polar body analysis. *Genet Test* 1997; 1:231-5.
- Handyside AH, Ogilvie CM. Screening oocytes and preimplantation embryos for aneuploidy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11:301-5.
- Munne S, Magli MC, Bahce M, Fung J, Legator M, Morrison L et al. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births. *Prenat Diag*, 1998; 18:1459-66.
- Gianaroli L, Magli MC, Munne S, Fortini D, Ferraretti AP. Advantages of day 4 embryo transfer in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *J Assist Reprod Genet* 1999; 170-5.
- ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. *Human Reprod* 1999; 14:3138-48.
- Munne S, Tang YX, Grifo J, Rosenwaks Z, Cohen J: Sex determination of human embryos using the polymerase chain reaction and confirmation by fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1994; 61: 111-7.
- Munne S, Scott R, Sable D, Cohen J. First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertil Steril* 1998; 69:675-81.
- Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* 2000; 73:1209-18.
- Lee M, Munne S. Pregnancy after polar body biopsy and freezing and thawing of human embryos. *Fertil Steril* 2000; 73 :647-647.
- Magli MC, Gianaroli L, Fortini D, Ferraretti AP, Munne S: Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum Reprod* 1999; 14: 770-3.

**Geliş Tarihi:** 28.09.2001

**Yazışma Adresi:** Dr. T. Umut K DİLEK

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD  
umutburcu1999@hotmail.com