

# Spinal Musküler Atrofi İçin Prenatal Tanı

PRENATAL DIAGNOSIS FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY

**Tufan ÇANKAYA**

*Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı*

### ÖZET

**Amaç:** Spinal msküler atrofi (SMA), spinal kord ön boynuz hücrelerinin dejenerasyonu, proksimal kaslarda ilerleyici güçsüzlük ve atrofi ile karakterize olup, en sık rastlanan kalıtsal alt motor nöron hastalığıdır. Hastalığın günümüz şartlarında tedavi edilemez olması, prenatal veya preimplantasyon genetik tanının önemine işaret etmekte olup bu amaçla yapılan çalışmalar hastalığın önlenmesinde önemlidir.

**Gereç ve yöntem:** Çalışmada, ailesinde SMA tanısı almış 12 çiftin amniyosentez veya koriyon villus örnekleri SMN1 geninde bulunan delesyonlar açısından Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (PCR-RFLP) yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir.

**Bulgular:** Olguların üçünde (%25) exon 7 ve 8 de delesyon saptanmıştır.

**Sonuç:** Elde edilen veriler literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırılmış ve SMA hastalığı için prenatal tanının önemi tartışılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Spinal msküler atrofi (SMA), prenatal tanı, survival motor neuron gen 1 (SMN1)

### SUMMARY

**Objective:** Spinal muscular atrophy (SMA) is the most common heritable lower motor neuron disease, characterised by degeneration of anterior horn cells of spinal cord and progressive weakness and atrophy in the proximal muscles. Because of Spinal Muscular Atrophy is known as incurable, prenatally and preimplantation genetic diagnosis are considered as the best approaches for this disease.

**Material and method:** In this study, amniocentesis or chorion villus samples obtained during the prenatal diagnosis from 12 subjects with a history of SMA, were analysed for deletion of exon 7 and 8 located in SMN1 gene by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP).

**Results:** Three of 12 subjects had exon 7 and 8 deletions (%25).

**Conclusion:** Results were compared with the literature and the importance of prenatally diagnosis for SMA was discussed.

**Key words:** Spinal muscular atrophy (SMA), prenatal- diagnosis, survival motor neuron gene 1 (SMN1).

**Tufan ÇANKAYA**

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik AD

35340, İnciraltı /İZMİR

Tel: (532) 2940746

e-posta: [tcankaya@gmail.com](mailto:tcankaya@gmail.com)

Spinal musküler atrofi (SMA) spinal kord ön boynuz hücrelerinin dejenerasyonu ile karakterize nörolojik bir hastalıktır. Hastalık, en sık rastlanan kalıtsal alt motor nöron hastalığı olup günümüz bilgileri ışığında tedavi edilemez olarak değerlendirilmektedir (1, 2).

Hastalık kliniğinde ana bulgu, proksimal kaslarda simetrik ilerleyici zayıflık ve atrofidir (3). SMA, başlangıç yaşı ve seyri temelinde üç ayrı klinik tabloda incelenmektedir. Tip I, akut seyirli olup en şiddetli bulgulara sahiptir ve iki yaşından önce ölümlerle sonuçlanır. Tip II ara ve Tip III hafif formdur. Bulgular altı ay ile on yedi yaş arasında başlarken görülme sıklığının 1/1000 canlı doğum oranında olduğu bildirilmiştir (3-7).

SMA otozomal resesif geçiş göstermektedir. İlk olarak 5q11.2-5q13.3 bölgesine haritalanmış ve ardından iki aday gen bu bölgeden klonlanmıştır. Telomerik survival motor nöron gen (SMN) ve nöronal apoptozis inhibitör protein (NAIP) gen, hastalığın ortaya çıkmasından sorumludur (8-14).

SMN geni, mRNA üretiminden sorumlu proteini kodlamaktadır. Gen, sentomerik kopyasında beş farklı nükleotid değişikliği ile farklılaşır ve bunlardan ikisi exon 7 ve 8 de bulunur. Her iki genin üretildiği olgularda, telomerik kopyanın fonksiyonel açıdan önemli olduğuna inanılmaktadır. Çünkü bu genin bazı exonları (exon 7 ve 8) hastalık bulgusu gösteren olgularda tespit edilemezken; sentromerik kopya da bazı normal bireylerde tespit edilemiştir (8-10). Telomerik NAIP geni fonksiyoneldir ve polimeraz zincir reaksiyonu yardımı ile sentromerik pseudo geninden ayırt edilerek exon.5'de delesyon olup olmadığı gösterilebilir (15).

SMA, otozomal resesif bir hastalıktır ve akraba evliliğinde karşımıza çıkma riski normalden daha fazladır. Türkiye'de yapılmış çalışmalarda akraba evliliği oranı %21,21 olarak bulunmuştur (16). Bu nedenle SMA hastalığını ülkemizde sık olarak görmekteyiz.

Literatürdeki bilgiler ışığında, SMA hastalığı için en uygun yaklaşım, prenatal veya mümkünse preimplantasyon genetik tanıdır (17). Prenatal tanı amaçlı çalışmalarda koriyon villus biyopsisi veya amniyosentez tercih edilmektedir. Aileler, genetik danışma sonrasında sonuç alma süresi, düşük riski ve tıbbi durumları doğrultusunda karar vermektedir.

Bu çalışma, prenatal tanının SMA hastalığı için önemini vurgulanması ve elde ettiğimiz sonuçların değerlendirilip literatüre katkı sağlaması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Genetik Tanı Merkezi'ne (DEGETAM) başvuran özgeçmişinde SMA tanısı olan 12 ailenin prenatal tanı örneklerinden, uygun kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Germany) kullanılarak genomik DNA eldesi yapılmış ve saflığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. On iki ailenin yapılan prenatal tanısı için bir ailede CVS ve on bir ailede amniyosentez materyali incelenmiştir. Ailelere prenatal tanı için CVS ve amniyosentez hakkında bilgi verilmiş ve bu yöntemlerden istedikleri, tıbbi durumları doğrultusunda uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyonlar final konsantrasyonlar 50µl olacak şekilde hesaplanmıştır; her bir dNTP'den 200 µl, ekzon 7 ve ekzon 8 için (F/R) primerlerden 0,4 µM, genomik DNA'dan 0.01 µg/ µl ve 2u Taq polimeraz kullanılmıştır. Primer dizileri F - 5' CTT TCC TTC TTT TTG ATT TTG TTT 3' ve R - 5' AGA CTA TCA ACT TAA TTT CTG ATC A 3' olarak kullanılmıştır.

Amplifikasyon ürünleri %6 PAGE kullanılarak kontrol edildikten sonra RFLP işlemi için enzim kesimi şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 10 µl amplifiye olmuş DNA örneği ekzon 7 için 200 u DraI, ekzon 8 için 30u DdeI enzimi ile 37 °C'de 90 dakika muamele edilerek kesim yapılmıştır.

Kesim ürünleri %6 PAGE kullanılarak, pozitif, negatif ve PCR kontrol örnekleri ile birlikte yüklenerek jelde yürütülmüş ve jel görüntüleme sisteminde değerlendirmeye alınmıştır. Jel kesim ürünlerinin değerlendirmesi ise; ekzon 7 için 192 bç'lik bandın, ekzon 8 için 189 bç'lik bandın varlığına göre yapılmıştır.

## BULGULAR

Toplam on iki hamilelik incelenmiş olup, üç olguda (%25) SMN geni exon 7 ve 8'de delesyon saptanmıştır. Toplam on bir olguda amniyosentez ve bir olguda koriyon villus biyopsisi örneği incelenmiştir. Olguların %33,3 ünde akrabalık olduğu görülmüştür. Ailelerden biri hariç önceki hamileliklerinde SMA'lı çocuk öyküsü bulunmamaktadır. Bu ailenin akrabasında SMA öyküsü nedeniyle prenatal tanı yapılmıştır. Bulgular Tablo'da özetlenmiştir.

Tablo. Bulgular

Olgu	İncelenen materyal	Akrabalık	Anomalili Çocuk Öyküsü	SMN Ekzon 7 del	SMN Ekzon .8 del
1	Amniyosentez	Var	(+)	(-)	(-)
2	Amniyosentez	Yok	(+)	(+)	(+)
3	Amniyosentez	Yok	(-)	(-)	(-)
4	Amniyosentez	Yok	(+)	(-)	(-)
5	Amniyosentez	Yok	(+)	(+)	(+)
6	Amniyosentez	Var	(+)	(+)	(+)
7	Amniyosentez	Var	(+)	(-)	(-)
8	Koriyon villus biyopsisi	Var	(+)	(-)	(-)
9	Amniyosentez	Yok	(+)	(-)	(-)
10	Amniyosentez	Yok	(+)	(-)	(-)
11	Amniyosentez	Yok	(+)	(-)	(-)
12	Amniyosentez	Yok	(+)	(-)	NA

NA: Enzim kesimi gerçekleşmemiştir.

## TARTIŞMA

Motor nöronları ilgilendiren kalıtsal nörolojik hastalıklar yaşamı ciddi biçimde etkilemekte ve bazı durumlarda ölümlü sonuçlanabilmektedir. SMA, ön motor nöronları bozunumu ile karakterize bir nörolojik kalıtsal hastalık olup, kendi içinde üç ayrı grup şeklinde sınıflandırılmaktadır. Ancak Tip 1, akut tiptir ve en şiddetli formudur. Bu grupta bulgular, altı aydan önce görülür ve iki yaşından önce genellikle ölümlü sonuçlanır (1-3, 6).

Telomerik SMN geninin homozigot delesyonu, olgularda hastalığın kesin tanısını koymak için yeterlidir. Prenatal test sırasında homozigot SMN gen delesyonu hasta fetüs olarak değerlendirilmektedir. Olguların %95'ten fazlasında delesyon tipi genetik bozukluk görülürken yaklaşık %5 civarında non-delesyon tipi bulunur. Non-delesyon tipi olanlarda ebeveynlerden biri mutlaka delesyonu taşıırken diğeri ancak enzim kesimi yapıldıktan sonra fragmanın ayrıntılı incelenmesi ile anlaşılabilir (8-13). Lin ve ark.'ları yaptıkları çalışmada 2/32 oranında non-delesyon formunu göstermişlerdir (17).

On iki ailenin yapılan prenatal tanısı için bir ailede CVS ve on bir ailede amniyosentez materyali incelenmiştir. Ailelere prenatal tanı için CVS ve amniyosentez hak-

kında bilgi verilmiş ve bu yöntemlerden istedikleri, tıbbi durumları doğrultusunda uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Olguların çoğu, CVS ile daha önce sonuç alınabilmesine rağmen, düşük riskinin daha az oranda görülmesi ve anneyle ait dokuların incelenen örneğe karışma riskinin daha az olması nedeniyle amniyosentezi tercih etmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, üç fetüste exon 7 ve 8 delesyonu bulunmuş ve bu fetüsler hasta olarak değerlendirilmiştir. Gebelikleri, ebeveynlerinin isteği doğrultusunda medikal olarak sonlandırılmıştır. Geriye kalan hamilelikler doğuma kadar devam etmiş ve bebekler sağlıklı olarak doğmuştur. Cobben ve ark. %36, Wirt ve ark. %33 ve Lin ve ark. %19,2 oranında inceledikleri fetüslerde hastalığı pozitif olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda hasta fetüs oranı %25 olarak bulunmuş olup şu ana kadarki literatür sonuçları ile uyumlu olarak değerlendirmiştir. İncelenen gruplardaki sağlıklı fetüs oranları birbirinden farklı olup tamamen şansa bağlı dağılım göstermektedir. Bu nedenle farklı grupların sonuçları arasında farklı sonuçlar olabilecektir (15, 17, 18).

SMA olgularında, SMN ve/veya NAIP geni delesyonlarını göstermek rutin moleküler teknikler ile mümkün olmasına rağmen, ebeveynlerde taşıyıcılığın gösterilmesi

için çok zahmetli ve pahalı yöntemlerin kullanılması gerekmektedir (15,19). Yapılan popülasyon çalışmaları taşıyıcılık oranının 1/40 ile 1/100 arasında olduğunu bildirmektedir. Bu durum toplum taraması yaparak taşıyıcıların tespitinin ne kadar zor olacağını düşündürmektedir (6, 7, 20). Bu nedenle prenatal tanı SMA aileleri için kolay, hızlı ve ucuz bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

Burada sunduğumuz on iki aileden on birinin özgeçmişinde SMA'lı çocuk öyküsü bulunmaktadır. Bu SMA'lı olgular için yapabildiklerimiz destekleyici tedavi olmakla birlikte, ailelerin bize başvuru sebepleri doğrultusunda sağlıklı bir bebeğe sahip olmaları sağlanmıştır.

Tüm bu sonuçlar, prenatal tanının şu anki bilgilerimiz ve tedavi yöntemleri doğrultusunda SMA hastalığı için en uygun yaklaşım olduğunu düşündürmektedir.

#### KAYNAKLAR

- Dubowitz V. Muscle Disorders of Childhood. Philadelphia: Saunders. Fischer V, Liu Q, Drefuss G. 1997. The SMN-SIPI complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 1978; 90: 1023-1029.
- Pearn JH. Infantile motor neuron disease. In: Rowland LP (ed.) *Advances in Neurology*. New York: Raven Press; 1982:121-130.
- Dubowitz V. Infantile muscular atrophy: a prospective study with particular reference to a slowly progressive variety. *Brain* 1964; 87: 707-718.
- Wohlfart G, Fex J, Eliasson WS. Hereditary proximal spinal muscular atrophy: a clinical entity simulating progressive muscular dystrophy. *Acta Psychiatr Neurol Scand* 1955; 30: 395-406.
- Kugelberg E, Welander L. Heredo-familial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 1956; 75: 500-509.
- Pearn JH. The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type I): a total population survey in north-east England. *J Med Genet* 1973;10: 260-265.
- Pearn JH. Incidence, prevalence, and frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1978; 15: 409-413.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; 80: 55-165.
- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q 11.2-11.3. *Nature* 1990; 344 540-541.
- Gilliam TC, Brzustowicz LM, Castilla LH, et al. Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy. *Nature* 1990;345: 823-825.
- Melki J, Abdelhak S, Sheth P, et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990; 344: 767-768.
- Melki J, Burlet P, Clermont O, et al. Refined linkage map of chromosome 5 in the region of the spinal muscular atrophy gene. *Genomics* 1993; 15: 521-524.
- Melki J, Lefebvre S, Burglen L, et al. De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 1994; 264: 1474-1477.
- Kleyn PW, Wang CH, Lien LL, et al. Construction of a yeast artificial chromosome contig spanning the spinal muscular atrophy disease gene region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6081-6085.
- Wirth B, Pick E, Leutner A, et al. Large linkage analysis in 100 families with autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) and 11 CEPH families using 15 polymorphic loci in the region 5q11.2-13.3. *Genomics* 1994; 20: 84-93.
- Başaran N, Hassa H, Başaran A, et al. The effect of consanguinity on the reproductive wastage in the Turkish population. *Clin Genet*. 1989; 36:168-173.
- Lin SP, Chang JG, Jong YJ, et al. Prenatal prediction of spinal muscular atrophy in Chinese. *Prenat Diagn*. 1999;19: 657-661.
- Cobben JM, Scheffer H, De Visser M, et al. Prenatal prediction of spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 231-236.
- Daniel RJ, Suthers GK, Morrison KE et al. Prenatal prediction of spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1992; 29: 165-170.
- Roberts DF, Chavez J, Court SDM. The genetic component in child mortality. *Arch Dis Child* 1970; 45: 33-38.