

## Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΙΣ ΤΗΝ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Ελένη Μακρινού<sup>1</sup>, Χρίστος Παπαλουκάς<sup>2</sup>, Βάσω Ζουρντζή<sup>3</sup>,  
Κωνσταντίνος Παπαθανασίου<sup>4</sup>, Χρυσόστομος Σοφούδης<sup>5</sup>, Ιωάννης Τζαφέττας<sup>6</sup>

### *Περίληψη*

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) έχει σαν στόχο την έγκαιρη ανίχνευση και κατ' επέκταση την πρόληψη παθήσεων με γενετικό υπόβαθρο και έτσι την αποφυγή ή μη τερατισμού της εγκυμοσύνης σε ζευγάρια με αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης κληρονομικής πάθησης. Η συγκεκριμένη τεχνική ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ως επικουρική μέθοδος, επιπλέον του συμβατικού προγεννητικού ελέγχου, από τις αρχές του 1990. Έκτοτε, η μέθοδος της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα. Ταυτόχρονα όμως, οι τεχνολογικές καινοτομίες, οι οποίες έχουν βελτιώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια διάγνωσης της μεθόδου, την έχουν καταστήσει και πιο πολύπλοκη. Το συγκεκριμένο άρθρο προσφέρει μία ανασκόπηση του θεσμού της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης καθώς και του φάσματος των τεχνικών που χρησιμοποιούνται, διαπραγματευόμενο επίσης τα νομικά και ηθικά ερωτήματα που προκύπτουν.

### *Εισαγωγή*

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) θεωρείται μια επιπρόσθετη δυνατότητα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που περιλαμβάνει τη διάγνωση γενετικών παθήσεων προτού ακόμα η εγκυμοσύνη ξεκινήσει (Handyside et al., 1990). Αναπτύχθηκε πριν από 15 χρόνια περίπου και προσφέρεται σε επίπεδο προγεννητικής διάγνωσης σε ζευγάρια με αυξημένο κίνδυνο μετάδοσης κληρονομικής πάθησης, σε άτομα με ιστορικό πολλαπλών αποβολών, σε άτομα με ιστορικό αποτυχημένων προσπαθειών εξωσωματικής γονιμοποίησης, καθώς και σε γυναίκες προχωρημένης αναπαραγωγικής ηλικίας (Kahraman et al., 2000).

Η διαδικασία περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός μικρού πληθυσμού εμβρύων από εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF) και μελέτη αυτών σε γενετικό επίπεδο. Από αυτά και ανάλογα με τη νομοθεσία που ισχύει σε κάθε κράτος σχετικά με την εμφύτευση εμβρύων, μόνο όσα ευρίσκονται γενετικά υγιή εμφυτεύονται στη μητέρα. Με τον τρόπο αυτό πρακτικά καταργείται και η ανάγκη των παραδοσιακών μεθόδων προγεννητικού ελέγχου με αμνιοπαρακέντηση (λήψη αμνιακών κυττάρων), ή δειγματοληψία της χοριακής λάχνης (λήψη εμβρυϊκής τροφοβλάστης), τα οποία εκτός από το γεγονός ότι λαμβάνουν χώρα σε προχωρημένη κύηση (6 με 10 εβδομάδες), προκαλούν δυσφορία στη μητέρα και το έμβryo με τον κίνδυνο πάντα της αποβολής (0.5% για αμνιοπαρακεντήσεις και 1-2% για δειγματοληψία χοριακής λάχνης) (Warner, 2005).

### *Βιοψία εμβρύου*

Τυπικά η βιοψία εμβρύου για γενετική ανάλυση λαμβάνει χώρα μετά από τεχνητή γονιμοποίηση κατά την τρίτη μέρα ανάπτυξης, όπου το έμβryo αποτελείται από 6 με 10 κύτταρα, τα οποία είναι σε θέση να διακριθούν με ευκολία (Εικόνα 1, Σχεδιάγραμμα 1).

Το πρώτο βήμα για μια βιοψία εμβρύου είναι να διανοιχτεί μια οπή στην διαφανή ζώνη του ωαρίου ή εμβρύου μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης και να αφαιρεθεί ένα κύτταρο για γενετικό έλεγχο. Σχετικά με τον τρόπο διάνοιξης της διαφανούς ζώνης αναφέρονται τρεις τρόποι: α) τοπική εφαρμογή οξειδωτικού διαλύματος «Tyrode» που αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο ευρείας χρήσης από την αρχή της προεμφυτευτικής διάγνωσης (Hardy et al., 1990), β) μερική απλή ή τριοδιάστατη μηχανική διάνοιξη της διαφανούς ζώνης (PZD) (Tucher et al., 1991; Cieslak et al., 1999) και γ) τρυπανισμός με laser, μια εύκολη και ακριβής μέθοδος και μάλλον η καλύτερη διαθέσιμη για τη διάνοιξη της διαφανούς ζώνης (Montag et al., 1998).

Ανάλογα με το στάδιο εξέλιξης του εμβρύου, η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση μπορεί να εφαρμοστεί σε τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων: σε πολικά σωματίδια που έχουν αφαιρεθεί από ωοκύτταρα κατά την διάρκεια



Εικόνα 1: Έμβρυο στο στάδιο των 3 ημερών, όπου έχει περάσει στο στάδιο της κυτταρικής διαίρεσης και αποτελείται από 6 με 10 βλαστομερίδια.

της μείωσης (Strom et al., 1997; Verlinsky et al., 1998), σε βλαστομερίδια που έχουν αφαιρεθεί από έμβρυο 3 ημερών (στάδιο 6-10 κυττάρων) (Handysider et al., 1989) ή σε τροφοκύτταρα καλλιέργειας βλαστοκύστης (Gardner et al., 1998). Οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν την ανάλυση του πρώτου πολικού σωματίου του ωοκυττάρου είναι ιδιαίτερα ελκυστικές καθώς προσφέρουν το πλεονέκτημα της διάγνωσης πριν από την σύλληψη και έτσι δεν εισερχόμαστε καν στην διαδικασία δημιουργίας εμβρύων. Από την άλλη πλευρά όμως, με τη μέθοδο αυτή δεν μπορούμε να έχουμε εικόνα του διαχωρισμού των χρωματοσωμάτων κατά την δεύτερη μειωτική διαίρεση και η ερμηνεία της ανάλυσης μεταλλάξεων μπορεί να είναι δύσκολη λόγω ομόλογου ανασυνδυασμού. Εξέταση τόσο του πρώτου όσο και του δεύτερου πολικού σωματίου που απομονώνεται μετά την γονιμοποίηση μπορεί να ξεπεράσει αυτά τα προβλήματα (Verlinsky et al., 1997). Παρόλα αυτά η τεχνική αυτή είναι επίπονη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για τη διάγνωση κληρονομούμενων μεταλλάξεων μητρικής προέλευσης καθώς δεν προσφέρει καμία πληροφορία σχετικά με την πατρική γενετική συμμετοχή.

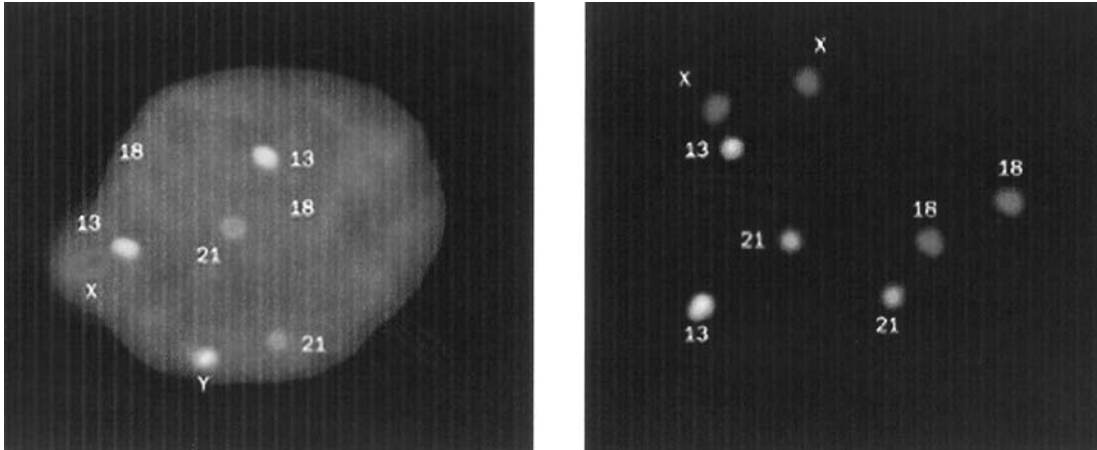
Επίσης έχουν γίνει προτάσεις για την ανάλυση τροφοκυττάρων από έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης (περίπου 5η μέρα μετά την γονιμοποίηση). Βιοψία σε αυτό το στάδιο επιτρέπει δειγματοληψία περισσότερων κυττάρων από ότι σε οποιοδήποτε άλλο προεμφυτευτικό στάδιο, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το εύρος των εξετάσεων που μπορούν να πραγματοποιηθούν, αλλά δυστυχώς η επιβίωση εμβρύων σε καλλιέργεια μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, αν και έχει βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια, παραμένει σχετικά χαμηλή (το πολύ 40%) (Jones et al., 1998).

Λόγω των προαναφερθεισών δυσκολιών τα περισσότερα κέντρα που προσφέρουν προεμφυτευτική διάγνωση έχουν επικεντρωθεί στην βιοψία 1-2 βλαστομεριδίων στην τρίτη μέρα μετά την γονιμοποίηση (στάδιο 6-10 κυττάρων) και συνήθως ολοκληρώνουν την διάγνωση και εμφύτευση εμβρύων μέσα σε 24-48 ώρες δηλ. την 5η μέρα ανάπτυξης, όπου τα έμβρυα βρίσκονται στο στάδιο του μορίδιου ή βλαστοκύστης (Harper Delhanty, 2000).

#### *Εκτίμηση του εμβρύου κατά το προεμφυτευτικό στάδιο*

Το πρώιμο εμφυτευτικό στάδιο αντιπροσωπεύει μια ιδιαίτερα δύσκολη και απαιτητική φάση της διαδικασίας ανάπτυξης και διαφοροποίησης του οργανισμού. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα, το έμβρυο πρέπει να δρομολογήσει διάφορες βασικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανόμενων χαρακτηριστικών προτύπων ενεργοποίησης και ρύθμισης γονιδίων, καθώς και την πρώτη κυτταρική διαφοροποίηση.

Οι μηχανισμοί που κρύβονται πίσω από αυτές τις διαδικασίες δεν είναι ακόμα επαρκώς ευκρινείς. Όμως αν τα συγκεκριμένα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης απορρυθμιστούν, τα έμβρυα εμφανίζουν μορφολογικές ανωμαλίες και είναι σχεδόν πάντα μη βιώσιμα. Υπάρχουν αρκετά γονίδια που έχουν σχετιστεί με την διαδικασία ανάπτυξης και διαφοροποίησης 1ης και 3ης μέρας μετά την γονιμοποίηση, όπως το BUB1, TP53, RB1, BRCA1, BKRC2, β-Actin και Hrakiri (Wells et al., 2005). Η απορρύθμισή τους μπορεί να προκαλέσει διάφορες μορφολογικές ανωμαλίες όπως κατακερματισμένα πολικά σωματίδια, κοκκιώδες κυτταρόπλασμα, συμπυκνωμένες κυτταρικές δομές στο κέντρο του πυρήνα, πολυπύρηνα βλαστομερίδια, μη φυσιολογικούς προπυρήνες και αποδιοργανωμένα ή τεμαχισμένα έμβρυα τα



Εικόνα 2: Αποτέλεσμα χρήσης επιτόπιας υβριδοποίησης φθορισμού πολλαπλών χρωστικών στον πυρήνα Α αρσενικού (X και Y χρωματοσώματα) και Β θηλυκού (δύο X χρωματοσώματα) βλαστομεριδίου.

οποία προκύπτουν από την γονιμοποίηση παραμορφωμένων ωοκυττάρων (Jurisicova et al., 1996; Zeibe et al., 1997; Rijnders Jansen, 1998; Alikani et al., 1999).

Ένας σημαντικός αριθμός από τα ανθρώπινα προεμφυτευτικά έμβρυα που έχουν δημιουργηθεί με τεχνητή γονιμοποίηση (IVF) δεν καταφέρνουν να προοδεύσουν μέχρι την φάση εμφύτευσης αφού είτε εκφυλίζονται είτε μεταπίπτουν σε μη αντιστρεπτή κυτταρική κατάσταση. Σε μια προσπάθεια να βελτιωθεί το ποσοστό επιτυχίας της εξωσωματικής γονιμοποίησης, που προς το παρόν είναι σχετικά χαμηλό (περίπου 20-50%), γίνονται προσπάθειες για την ταυτοποίηση και επιλεκτική μεταφορά των πιο βιώσιμων εμβρύων από κάθε πληθυσμό. Για τους λόγους αυτούς η μελέτη της γενετικής έκφρασης κατά την προεμφυτευτική εξέλιξη, εκτός από την επιστημονική σημασία που έχει, μπορεί να οδηγήσει στον σχεδιασμό μιας νέας τάξης προεμφυτευτικών γενετικών ελέγχων για την επιλογή των εμβρύων με τις περισσότερες πιθανότητες για επιτυχή εγκυμοσύνη (Ebner et al., 2001; Gianaroli et al., 1997).

#### *Εφαρμογές προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης*

Είναι δεδομένο πλέον, ότι ένας μεγάλος αριθμός εργαστηρίων, κυρίως στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, εφαρμόζουν PGD. Μέχρι σήμερα, πάνω από 3.000 κύκλοι IVF έχουν συνοδευθεί από PGD, καταλήγοντας σε περίπου 700 γεννήσεις παγκοσμίως.

Οι γενετικές παθήσεις στις οποίες εφαρμόζεται η PGD ποικίλλουν. Περίπου το 40% των διαγνώσεων εφαρμόζεται σε φορείς αυτοσωματικών μονογονιδιακών ανωμαλιών, 35% ανταποκρίνεται σε χρωματοσωματικές ανισορροπίες όπως ανευπλοειδίες, αυξήσεις, ελλείψεις, ανταλλαγές και μεταθέσεις και 25% στοχεύουν στον καθορισμό του φύλου του εμβρύου για την αποφυγή φυλοσύνδετης (X linked) ασθένειας (Wells and Delhanty, 2001).

#### *Προεμφυτευτική διάγνωση μονογονιδιακών βλαβών*

Οι μονογονιδιακές παθήσεις δημιουργούνται από τις λεγόμενες σημειακές μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια, οι οποίες συχνά κληρονομούνται στα μέλη μιας οικογένειας. Η διαδικασία της προεμφυτευτικής διάγνωσης, περιλαμβάνει πρώτα χαρακτηρισμό της μετάλλαξης των γονέων και στη συνέχεια ανάλυση του εμβρυϊκού δείγματος. Η πρώτη αυτοσωματική μονογονιδιακή πάθηση που διαγνώστηκε στο προεμφυτευτικό στάδιο ήταν αυτή της κυστικής ίνωσης το 1992 (Handyside, et al. 1992). Από τότε, αν και η ανάλυση μονογονιδιακών παθήσεων παραμένει εξαρτημένη από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction / PCR), οι τεχνικές εφαρμογής PGD έχουν εξελιχθεί και αποκτήσει πολυπλοκότητα και έτσι ο αριθμός των παθήσεων για τις οποίες εφαρμόζεται παρουσιάζει σταθερή αύξηση.

Πολλές περιπτώσεις προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης έχουν δημοσιευθεί για διάφορες κληρονομούμενες παθήσεις, μερικές μόνο εκ των οποίων είναι η κυστική ίνωση, η οποία εμφανίζεται κυρίως σε πληθυσμούς της βόρειας Ευρώπης, η νόσος Tay Sachs, ένα ιδιαίτερα αυξημένο πρόβλημα ανάμεσα στους Ισραηλίτες Ashkenazi, οι μυϊκές δυστροφίες Duchenne και Becker, δερματικές παθήσεις, η δρεπανοκυτταρική αναιμία, το σύνδρομο Marfan,

νωτιαία/σπονδυλική μυϊκή ατροφία, το σύνδρομο εύθραυστου χρωμοσώματος X, ο τύπος IA Charcot Marie Tooth, η μεσογειακή αναιμία, η οποία εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε μεσογειακούς λαούς, μεταξύ των οποίων και οι Έλληνες, κληρονομικοί καρκίνοι, το σύνδρομο Lesch Nyhan, η συγγενής υπερπλασία επινεφριδίων και η χορεία του Huntington (McGrath et al., 1998; Verlinsky et al., 2001a; Verlinsky et al., 200h; Verlinsky et al., 2002).

#### *Χρωματοσωματική ανάλυση των προεμφυτευτικών εμβρύων*

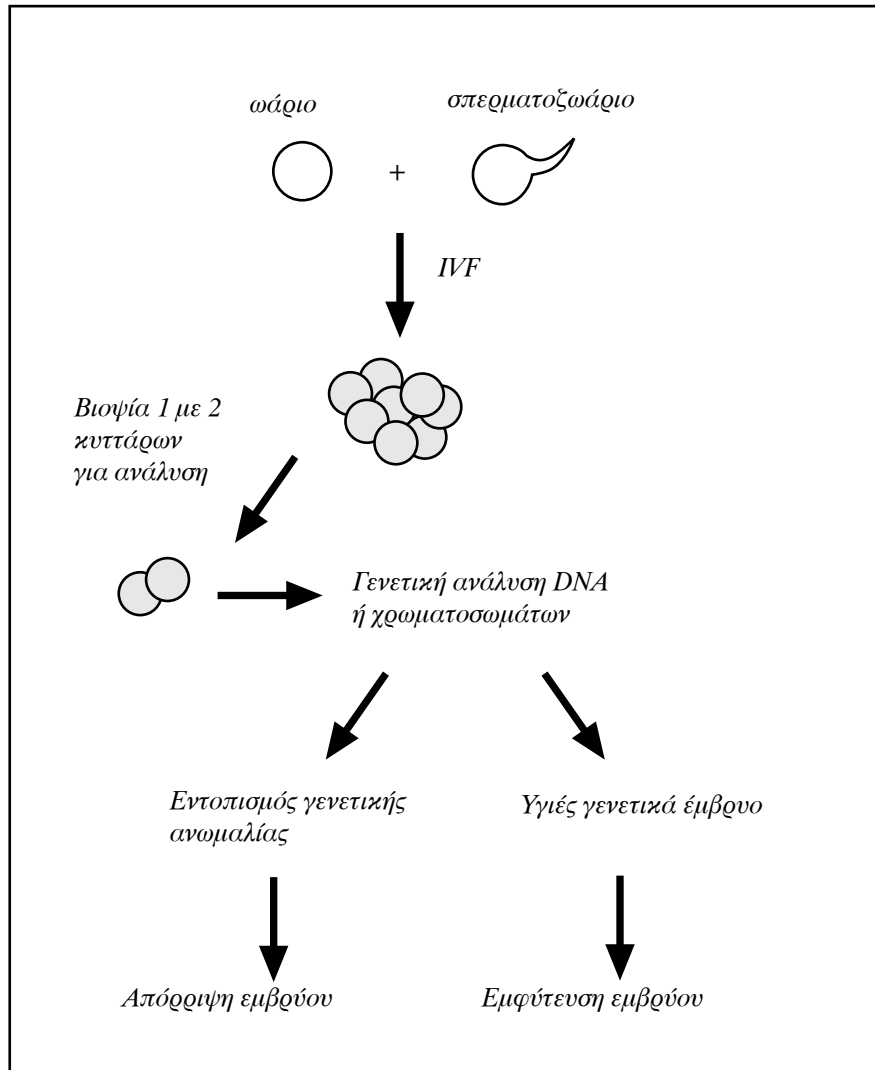
Πέρα από την γενετική ανάλυση σε επίπεδο γονιδίων η προεμφυτευτική διάγνωση είναι σε θέση να εξετάσει τυχόν ανωμαλίες του γενετικού υλικού σε συνολικό επίπεδο χρωματίνης ή χρωματοσωμάτων. Καθώς είναι δύσκολο να γίνει ανάλυση καρυότυπου στο στάδιο των 1 με 2 βλαστομεριδίων, (χρειάζονται χρωματοσώματα σε φάση μετάφασης), η ανίχνευση χρωματοσωματικών ανωμαλιών στις περισσότερες περιπτώσεις εξαρτάται από τη χρήση επιτόπιας υβριδοποίησης φθορισμού (Fluorescent In Situ Hybridization / FISH). Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι πιο εύχρηστη και εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία από τις πιο συμβατικές μεθόδους κυτταρογενετικής. Η τεχνική αφορά τον εντοπισμό συγκεκριμένων χρωματοσωματικών περιοχών χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή DNA που έχει σημειωθεί με φθορίζουσες χρωστικές. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την χαρτογράφηση περιοχών σε συγκεκριμένα χρωματοσώματα και τον εντοπισμό μικρών αλλά και μεγάλων σε έκταση χρωματοσωματικών αναδιατάξεων (Munne et al., 2000; Gianaroli et al., 1999).

Η τεχνική ανάλυσης FISH όμως υστερεί σημαντικά λόγω περιορισμού του αριθμού των ειδικών ανιχνευτών φθορισμού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα για να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα. Επιπλέον η διάγνωση μπορεί να γίνει ιδιαίτερα δύσκολη με την εμπλοκή περισσότερων από μίας ανακατατάξεων και σημείων θραύσης στα χρωματοσώματα και πολύ συχνά πρέπει να βρεθεί ο κατάλληλος συνδυασμός ανιχνευτών για κάθε οικογένεια που εξετάζεται. Αν και έχουν δημοσιευθεί σχετικές ανακοινώσεις που αφορούν πληθώρα χρωματοσωματικών ανακατατάξεων όπως οι μεταθέσεις του Robertson, αμοιβαίες μετατοπίσεις, αναστροφές, γενετικός μωσαϊκισμός και σύνδρομο Klinefelter's (Van Assche et al., 1999; Vandervorst et al., 1998), υπήρχε ανάγκη για μια συνολικά διαφορετική προσέγγιση. Σήμερα πλέον, οι πιο πολλά υποσχόμενες νέες τεχνικές είναι η συγκριτική υβριδοποίηση γονιδιώματος (Comparative Genomic Hybridisation / CGH), τα πλακίδια μικροκατάταξης γονιδίων (DNA microarrays) και με την μετατροπή χρωματίνης μεσόφασης σε μεταφασικά χρωματοσώματα (nuclear conversion) η εφαρμογή κι άλλων τεχνολογιών σχετικών με FISH όπως είναι η φασματογραφική απεικόνιση καρυότυπου (Spectral Karyotyping / SKY), και η πολλαπλή επιτόπια υβριδοποίηση φθορισμού (Multiplex Fluorescence in situ hybridisation / M-FISH).

Η τεχνική της συγκριτικής υβριδοποίησης γονιδιώματος (CGH) είναι μια σχετικά νέα τεχνική, η οποία δεν απαιτεί τη δημιουργία μεταφασικών χρωματοσωμάτων. Βασίζεται σε αρχές κυτταρογενετικής φθορισμού διαφορετικών χρωστικών και είναι σε θέση να εντοπίσει αυξήσεις, απώλειες και επεκτάσεις στο γενετικό υλικό ενός οργανισμού καθώς επίσης και να καθορίσει τον αριθμό αντιγράφων για κάθε χρωματόσωμα με μια μόνο υβριδοποίηση (Wells et al., 1999). Αν και η CGH είναι μια νέα και υποσχόμενη μέθοδος στον τομέα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, έχει σημαντικούς περιορισμούς κυρίως σε ότι αφορά το χρονικό πλαίσιο εφαρμογής στην προεμφυτευτική διάγνωση, το οποίο είναι πολύ μικρό σε σύγκριση με τον χρόνο που χρειάζεται η εφαρμογή του πρωτοκόλλου (συνήθως χρειάζεται μερικές μέρες για να ολοκληρωθεί). Το δεδομένο χρονικό πρόβλημα έχει πρόσφατα ξεπεραστεί με δύο τρόπους. Στη μία περίπτωση τα έμβρυα καταψύχονται μετά τη βιοψία δίνοντας έτσι τον χρόνο που απαιτείται για την ανάλυση. Εναλλακτικά μια ταχεία CGH τεχνική έχει εφαρμοσθεί σε πολικά σωματίνα τα οποία είναι διαθέσιμα για ανάλυση 3 μέρες νωρίτερα από ότι τα βλαστομερίδια. Και οι δύο αυτές λύσεις όμως παραμένουν χρονοβόρες και πολύπλοκες (Wilton, 2005).

Η τεχνολογία των microarray (πλακιδίων μικροκατάταξης) είναι ένας νεωτερισμός στον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο. Περιλαμβάνει την κατάταξη και ακινητοποίηση χιλιάδων ξεχωριστών αλληλουχιών DNA που αντιστοιχούν σε ολόκληρα χρωματοσώματα ή γονίδια πάνω σε πλακίδια με σκληρή επιφάνεια. Αυτές οι αλληλουχίες υβριδοποιούνται με το υπό εξέταση εμβρυϊκό DNA και ένα δείγμα αναφοράς, τα οποία σημαίνονται με διαφορετικές χρωστικές φθορισμού. Το χρώμα το οποίο αποκτούν τα προς παρακολούθηση σημεία δείχνει το σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου ή τον αριθμό αντιγράφων του χρωματοσώματος των εμβρύων προς εμφύτευση. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να ανιχνευτούν ταυτόχρονα πολλαπλές μεταλλάξεις, ή χρωματοσωματικές ανακατατάξεις (Salvado et al., 2004; Hu et al., 2004).

Οι περισσότερες κυτταρογενετικές τεχνικές απαιτούν κύτταρα σε μετάφαση, τη φάση δηλαδή του κυτταρικού κύκλου κατά την οποία η κυτταρική μεμβράνη έχει διασπαστεί και τα χρωματοσώματα έχουν συμπυκνωθεί. Δυστυχώς τα κύτταρα από βιοψίες ανθρώπινων εμβρύων συνήθως βρίσκονται σε μεσόφαση και τα χρωματοσώματα τους σε αυτό το στάδιο δεν είναι διακριτά μέσα στον πυρήνα. Η μέθοδος που είναι γνωστή σαν πυρηνική μετατροπή (nuclear conversion) υπάρχει σε διάφορες μορφές και προσφέρει την δυνατότητα μετατροπής της χρωματίνης από το πολικό σωματίο ή το βλαστομερίδιο σε μεταφασικό χρωματόσωμα (Fung et al., 1998; Willadser et al., 1999). Αυτό το πετυ-



χαίνει με την ένωση του πυρήνα του πολικού σωματίου, ή βλαστομεριδίου με ένα απύρηννο ωοκύτταρο το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιείται, καθιστώντας τα χρωματοσώματα προσβάσιμα σε ανάλυση με μεθόδους φθορισμού όπως FISH, φασματογραφική απεικόνιση καρυότυπου (spectral karyotyping / SKY) (Schrock et al., 1996) και πολλαπλή επιτόπια υβριδοποίηση φθορισμού (Multiplex Fluorescence in situ hybridisation / M-FISH) (Speicher et al., 1996).

Ένα πρόβλημα βέβαια που αντιμετωπίζουν οι περισσότερες νέες τεχνικές είναι η ποσότητα DNA που απαιτείται. Τα περισσότερα εργαστήρια χρειάζονται τουλάχιστον 200 ng DNA. Προκειμένου να συλλεχθεί αυτή η ποσότητα από ένα μόνο κύτταρο το γονιδίωμα αυτού του κυττάρου θα πρέπει να ενισχυθεί κατά τουλάχιστον 10.000 φορές. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας κάποιες τεχνικές ολικής γονιδιωματικής ενίσχυσης (Whole Genome Amplification / WGA) (Jiao et al., 2003; Handyside et al., 2004). Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται αρκετή ποσότητα DNA ή οποία επαρκεί για τεχνικές φθορισμού αλλά και για πολλαπλές χρήσεις PCR στο ίδιο κύτταρο (Well et al., 1999).

#### Προβλήματα σχετικά με την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση

Παρά το γεγονός ότι η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD) έχει εισέλθει πλέον στον χώρο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, δεν έφτασε στο σημείο να χρησιμοποιείται ευρέως όπως η προγεννητική διάγνωση. Εκτός του ότι είναι μια σχετικά ακριβή και επίπονη διαδικασία για να συμπεριληφθεί ως εξέταση ρουτίνας, επιβαρύνεται και με έναν αριθμό δυσκολιών που σχετίζονται κυρίως με την εφαρμογή της τεχνολογίας στο επίπεδο διάγνωσης

ενός μόνο κυττάρου, με αποτέλεσμα, την διάγνωση περιορισμένων σε αριθμό γενετικών ανωμαλιών, και σχετικά μεγάλο ποσοστό λάθος διαγνώσεων.

Ένα χαρακτηριστικό πρόβλημα εφαρμογής PGD είναι η ανακάλυψη υψηλών επιπέδων χρωματοσωματικού μωσαϊκισμού σε προεμφυτευτικά έμβρυα (Harper et al., 1995). Είναι πλέον γνωστό ότι ο πυρήνας ενός μόνο βλαστομεριδίου μπορεί να μη είναι αντιπροσωπευτικός του υπόλοιπου εμβρύου και για αυτό το λόγο, ιδανικά θα πρέπει να λαμβάνονται δύο κύτταρα για τη διάγνωση (Delhanty et al., 1997). Έμβρυα που περιέχουν μεγάλο ποσοστό πολυπλοειδικών, ή ανευπλοειδικών κυττάρων, τις περισσότερες φορές δεν είναι σε θέση να καταλήξουν σε βιώσιμες κηύσεις ενώ η υψηλή τους συχνότητα θα μπορούσε να εξηγήσει το σχετικά χαμηλό ποσοστό επιτυχίας φυσικής και υποβοηθούμενης σύλληψης στους ανθρώπους.

Άλλα προβλήματα αφορούν μία από τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές προεμφυτευτικής διάγνωσης, την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RCR). Ως τεχνική, η PCR είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και για αυτό τον λόγο εξάλλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση απειροελάχιστων ποσών DNA όπως στην περίπτωση απομόνωσης ενός μόνο κυττάρου. Μπορεί να επιτρέψει τον εντοπισμό δομικών αλλαγών μεγάλης έκτασης, όπως μεταθέσεις και ελλείψεις, αλλά κυρίως χρησιμοποιείται για την ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων. Ως τεχνική όμως εφαρμοζόμενη στις ανάγκες της προεμφυτευτικής διάγνωσης, εμφανίζει κάποιους περιορισμούς. Οι πιο σημαντικοί περιορισμοί PCR ενός μόνο κυττάρου είναι η αποτυχία ενίσχυσης, γεγονός που εκτιμάται ότι συμβαίνει στο 5-10% των μονοκυτταρικών PCR, η απόρριψη αλληλόμορφων (allele dropout, ADO) και η επιμόλυνση της αντίδρασης από ξένο γενετικό υλικό. Η επιλεκτική ενίσχυση ενός από τα δύο αλληλόμορφα (allele dropout), αποτελεί ένα φαινόμενο που περιορίζεται στις μονοκυτταρικές διαγνώσεις και έχει αποτελέσει την αιτία αρκετών λανθασμένων διαγνώσεων με προεμφυτευτική γενετική διάγνωση. Συμβαίνει όταν το ένα αλληλόμορφο ενισχύεται επιλεκτικά έναντι του άλλου κατά την διαδικασία του PCR. Με τον τρόπο αυτό, ένα ετερόζυγο για κάποιο γενετικό γνώρισμα κύτταρο έχει την τάση να εμφανίζεται ως ομόζυγο (Grifo et al., 1994; Harper et al., 1994; Verlinsky, 1996). Η επιμόλυνση της αντίδρασης από ξένο γενετικό υλικό είναι προφανώς ένα μεγαλύτερο πρόβλημα στην προεμφυτευτική γενετική διάγνωση, λόγω της ελάχιστης ποσότητας δείγματος προς ανάλυση. Η μόλυνση με γονικό DNA μπορεί να αποτελέσει συνέπεια της ακούσιας δειγματοληψίας σπέρματος ή κυτταρικών σωρών κατά την βιοψία εμβρύου. Για το λόγο αυτό είναι προτιμότερο αντί της κλασικής εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF), να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI, μικρογονιμοποίηση), που περιλαμβάνει την έγχυση ενός μόνο σπερματοζωαρίου μέσα στο ωάριο και επίσης να απομακρυνθούν όσα περισσότερα κύτταρα σωρών είναι δυνατόν πριν από την βιοψία του εμβρύου (Wells, 2004).

Προκειμένου να αποφευχθούν λάθη κατά την διάρκεια του PCR λόγω της αποτυχίας ενίσχυσης, μόλυνσης και απόρριψης αλληλίων, πολλές δοκιμασίες προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης χρησιμοποιούν πλέον πολλαπλό (multiplex) PCR (Wells and Sherlock, 1998). Η αναφερόμενη τεχνική περιλαμβάνει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών τεμαχίων DNA σε μία μόνο αντίδραση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πολλαπλών διαγνωστικών δεικτών (Piyamongkol et al., 2001). Ιδανικά, κάθε έμβρυο κληρονομεί ένα αλληλίο από κάθε γονέα. Εάν ανιχνευθούν επιπλέον αλληλία που δεν ήταν παρόντα σε κανέναν από τους δύο γονείς, τότε είναι πιθανή η «επιμόλυνση» από εξωτερική πηγή. Εναλλακτικά, εάν το δείγμα εμφανίζει περισσότερα από τα 2 αναμενόμενα γονικά αλληλία τότε είναι πιθανό η επιμόλυνση να προέρχεται από τον γονέα (Findlay et al., 1997). Ελπίζουμε όμως ότι, με την βελτίωση σε διαγνωστικές τεχνικές και την εφαρμογή νέων τεχνολογιών, αυτά τα προβλήματα να επιλυθούν στο μέλλον.

#### *Νομικά και ηθικά ζητήματα*

Η εισαγωγή της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης στην ιατρική πράξη, όπως και άλλες προόδους στην τεχνολογία της αναπαραγωγής, εκτός από τεχνικές δυσκολίες θέτει και σημαντικές ηθικές, νομικές αλλά και κοινωνικές προκλήσεις. Οι απόψεις σχετικά με την έρευνα στα έμβρυα ποικίλουν από κράτος σε κράτος, όπως φυσικά και η νομοθεσία που την ελέγχει (Viville et al., 1998). Στην πιο απόλυτη μορφή τους οι νόμοι που σχεδιάστηκαν για να ρυθμίσουν την έρευνα σε έμβρυα, πρακτικά απαγορεύουν την προεμφυτευτική γενετική διάγνωση και αυτό ήταν άλλωστε που εμπόδισε την ανάπτυξη της στη Γερμανία και μέχρι πρόσφατα και στην Γαλλία (Krones and Richter, 2004). Είναι όμως ενδιαφέρον ότι οι ίδιες αυτές χώρες προσφέρουν προγεννητική διάγνωση αλλά και τερατισμό με παθολογικής κήσης ακόμα και πολύ αργά στην εγκυμοσύνη.

Οι περισσότερες χώρες που διαθέτουν σχετική νομοθεσία υιοθετούν ρυθμίσεις ανάλογες με αυτές που προτάθηκαν από την επιτροπή ανθρώπινης γονιμοποίησης του Ηνωμένου Βασιλείου (UK Human Fertilization Committee). Σύμφωνα με αυτές επιτρέπεται η έρευνα σε έμβρυα μέχρι 14 μέρες μετά την γονιμοποίηση μόνο για την βελτίωση θεραπείας υπογονιμότητας, την κατανόηση συγγενών παθήσεων, τη βελτίωση αντισυλληπτικών μεθόδων και την κατανόηση των αιτιών αποβολών. Το πιο σημαντικό για την προεμφυτευτική διάγνωση όμως είναι ότι επιτρέπεται η ανάπτυξη μεθόδων για την ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών κατά το προεμφυτευτικό στάδιο (Bahadur, 2005).

Βέβαια υπάρχει ανησυχία σχετικά με την πιθανότητα εφαρμογής ευγονικής μέσω προεμφυτευτικής διάγνωσης, όσον αφορά χαρακτηριστικά εμβρύων που δεν σχετίζονται άμεσα με θέματα υγείας (Kalfoglou et al, 2005). Μέχρι σήμερα πάντως, με εξαίρεση την εφαρμογή προεμφυτευτικής διάγνωσης για την επιλογή του φύλου για ιατρικούς λόγους ή για επιλογή εμβρύου σαν δότη για κάποιο μέλος της οικογένειας, δεν έχει προκύψει ζήτημα προεμφυτευτικής διάγνωσης στο πλαίσιο ευγονικής (Robertson, 2002). Παράδειγμα επιλογής εμβρύου ως δότη έχουμε σε μία πρόσφατη περίπτωση παιδιού που έπαυχε από ανααιμία Fanconi, μια θανατηφόρο γενετική πάθηση. Το συγκεκριμένο άτομο θεράπευτηκε μετά από μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων που προήλθαν από το αίμα του ομφάλιου λώρου ενός υγιούς νεογνού το οποίο επιλέχτηκε με προεμφυτευτικό έλεγχο από έναν αριθμό διαθέσιμων εμβρύων μετά από τεχνητή γονιμοποίηση (Bielorai et al., 2004). Αυτή η περίπτωση προσέλκυσε το ενδιαφέρον των μέσων ενημέρωσης και δημιούργησε έντονη αμφισβήτηση σχετικά με τα κατά παραγγελία μωρά και την ηθική του να παράγεις ένα παιδί, ή και περισσότερο, προς όφελος ενός άλλου. Λαμβάνοντας όμως υπόψη τον σχετικά μικρό αριθμό εμβρύων που προκύπτουν ανά κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης, το υψηλό κόστος της εν λόγω διαδικασίας, αλλά και τα χαμηλά ποσοστά επιτυχίας, η χρήση PGD για μη παθολογικά γενετικά χαρακτηριστικά αποθαρρύνεται.

Παρόλα αυτά, η γενετική διάγνωση εμβρύων σε προεμφυτευτικό στάδιο δεν παύει να είναι μια ιδιαίτερα ελκυστική και ελπιδοφόρα μέθοδος, που μπορεί μεν η άσκοπη χρήση της να οδηγήσει σε ηθικές και νομικές περιπλοκές, η σωστή και ελεγχόμενη όμως εφαρμογή της μπορεί να εξαλείψει σημαντικά προβλήματα που αφορούν όχι μόνο γενετικές ανωμαλίες που εμφανίζονται στην αρχή της ζωής ενός ανθρώπου, αλλά και πολύ αργότερα, όπως στην περίπτωση παθήσεων στις οποίες εμπλέκονται πολυγονιδιακοί παράγοντες, καθώς και το ίδιο το περιβάλλον.

#### Summary

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is regarded as an assisted reproduction procedure that involves the diagnosis of genetic disease before a pregnancy has been established. It was introduced at the beginning of the 1990s as an alternative to prenatal diagnosis, to prevent termination of pregnancy in couples with a high risk for offspring affected by a sex-linked genetic disease. From those days, strategies for preimplantation genetic diagnosis (PGD) have become increasingly complex. This paper discusses technical innovations that have improved the scope and accuracy of PGD, as well as problems and ethical issues related to the subject. A brief review of new technologies is also included.

#### Βιβλιογραφία

1. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999;71:836-42.
2. Bahadur G. Parliamentary proposals for liberal approaches to assisted conception. *Reprod Biomed Online*. 2005 Aug;11(2): 177-82.
3. Bielorai B, Hughes MR, Auerbach AD, Nagler A, Loewenthal R, Rechavi G, Toren A. Successful umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia using preimplantation genetic diagnosis for HLA-matched donor. *Am J Hematol*. 2004 Dec;77(4):397-9.
4. Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril* 1999; 71:308-313.
5. Delhanty IDA, Harper JC, Ao A, Handy side 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.
6. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Polz W, Tews G. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2001;76:281-5.
7. Findlay I, Taylor A, Quirke P, Frazier R, Urquhart A. DNA fingerprinting from single cells. *Nature*. 1997 Oct 9;389(6651):555-6.
8. Fung J, Hyun W, Dandekar P, Pedersen RA, Weier HU. Spectral imaging in preconception/preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: multicolor, multichromosome screening of single cells. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15:323-330.
9. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69:84-88.
10. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munne' S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999;72:837-44.
11. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Florentine A, Garrisi J, Munne' S. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 1997;68:1128-31.
12. Grijo JA, Tang YX, Munne S, Alikani M, Cohen J, Rosenwaks Z. Healthy deliveries from biopsied human embryos. *Hum Reprod* 1994;9:912-6.
13. Handyside, A.H. et al. (1992) Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *New Engl. J. Med.* 327,905-909.
14. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344:768-70.
15. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989; 1:347-349.
16. Handyside AH, Robinson MD, Simpson RJ, Omar MB, Shaw MA, Grudzinskas JG, Rutherford A. Isothermal whole genome amplification from single and small numbers of cells: a new era for preimplantation genetic diagnosis of inherited disease. *Mol Hum Reprod*. 2004 Oct;10(10):767-72.
17. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RML, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by

- biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; 5:708-714.
18. Harper JC, Handyside AH. The current status of preimplantation genetic diagnosis. *Curr Obstet Gynecol* 1994;4:143-9.
  19. Harper JC, Wells D. Recent advances and future developments in PGD. *Prenat Diagn* 1999;19:1193-1199.
  20. Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RML, Hopman AHN, Delhanty JDA. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* 1995; 15:41-49.
  21. Harper JC, Delhanty JD. Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2000 Apr;12(2):67-72.
  22. Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod*. 2004 Apr;10(4):283-9.
  23. Jiao Z, Zhou C, Li J, Shu Y, Liang X, Zhang M, Zhuang G. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of beta-thalassemia by whole-genome amplification. *Prenat Diagn*. 2003 Aug;23(8):646-51.
  24. Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 70:1022-1029
  25. Kalfoglou AL, Doksum T, Bernhardt B, Geller G, LeRoy L, Mathews DJ, Evans JH, Doukas DJ, Reame N, Scott J, Hudson K. Opinions about new reproductive genetic technologies: hopes and fears for our genetic future. *Fertil Steril*. 2005 Jun;83(6):1612-21.
  26. Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzalioglu N, Yakisn K, Cengiz G, et al. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2000; 15:2003-7.
  27. Krones T, Richter G. Preimplantation genetic diagnosis (PGD): European perspectives and the German situation. *J Med Philos*. 2004 Oct;29(5):623-40.
  28. McGrath JA, Handyside AH. Preimplantation genetic diagnosis of severe inherited skin diseases. *Exp Dermatol* 1998; 7:65-72
  29. Montag M, van der Ven K, Delacretaz G, Rink K, van der Ven H. Laserassisted microdissection of the zona pellucida facilitates polar body biopsy. *Fertil Steril* 1998; 69:539-542.
  30. 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.
  31. Piyamongkol W, Harper JC, Sherlock JK, Doshi A, Serhal PF, Delhanty JD, Wells D. A successful strategy for preimplantation genetic diagnosis of myotonic dystrophy using multiplex fluorescent PCR. *Prenat Diagn*. 2001 Mar;21(3):223-32.
  32. Rijnders PM, Jansen CA. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1998 Oct;13(10):2869-73
  33. Robertson, J.A. (2002) Sex selection for gender variety by preimplantation genetic diagnosis. *Fertil. Steril.*, 78,463.
  34. Salvado CS, Trounson AO, Cram DS. Towards preimplantation diagnosis of cystic fibrosis using microarrays. *Reprod Biomed Online*. 2004 Jan;8(1):107-14.
  35. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*. 1996 Jul 26;273(5274):494-7
  36. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*. 1996 Apr;12(4):368-75
  37. Strom C, Rechiutsky S, Cieslak J, et al. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:469.
  38. Tucker MJ, Bishop FM, Cohen J, Wiker SR, Wright G. Routine application of partial zona dissection for male factor infertility. *Hum Reprod*. 1991 May;6(5):676-81.
  39. Vandervorst M, Liebaers I, Sermon K, Staessen C, De Vos A, Van de Velde H, Van Assche E, Joris H, Van Steirteghem A, Devroey P. Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus oocyte complexes. *Hum Reprod*. 1998Nov;13(11):3169-76.
  40. Van Assche E, Staessen C, Vegetti W, Bonduelle M, Vandervorst M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis and sperm analysis by fluorescence in-situ hybridization for the most common reciprocal translocation t(1;22). *Mol Hum Reprod* 1999; 5:682-690.
  41. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, et al. Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second polar body FISH analysis. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15:285-289.
  42. Verlinsky Y, Rechiutsky S, Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Walle J, White M, Ginsberg N, Strom C, Kuliev A. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. *Biochem Mol Med*. 1997 Dec;62(2): 182-7.
  43. Verlinsky Y. Preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1996;13:87-9.
  44. Verlinsky, Y., Rechiutsky, S., Verlinsky, O., Xu, K., Schattman, G., Masciangelo, C., Ginberg, N., Strom, C., Rosenwaks, Z. and Kuliev, A. (2001a). Preimplantation diagnosis of P53 tumor suppressor gene mutations. *Reprod. Biomed. Online*, 2,102-105i
  45. Verlinsky, Y., Rechiutsky, S., Schoolcraft, W., Strom, C. and Kuliev, A. (2001). Preimplantation diagnosis for Franconi anemia combined with HLA matching. *JAMA*, 285, 3130-2133
  46. Verlinsky, Y., Rechiutsky, S., Verlinsky, O., Masciangelo, C., Lederer, K. and Kuliev, A. (2002) Preimplantation diagnosis for early-onset Alzheimer's disease caused by V717L mutation. *JAMA*, 283,1018-1021.
  47. Viville S, Pergament D. Results of a survey of the legal status and attitudes towards preimplantation genetic diagnosis conducted in 13 different countries. *Prenat Diagn* 1998; 18:1374-1380
  48. Wapner RJ. Invasive prenatal diagnostic techniques. *Semin Perinatol*. 2005 Dec;29(6):401-4
  49. Wells D. Advances in preimplantation genetic diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004 Jul 1;115 Suppl 1:897-101.
  50. Wells D. and Delhanty J. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med*. 2001 Jan;7(1):23-30.
  51. Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munne S. First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril*. 2002 Sep;78(3):543-9
  52. Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res*. 1999 Feb 15;27(4):1214-8.



53. Wells D, Sherlock JK. Strategies for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders by DNA amplification. *Prenat Diagn.* 1998 Dec; 18(13): 13 89-401.
54. Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, Malter H, Delhanty JDA, Cohen J. Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod* 2005;20:1339-48.
55. Willadsen S, Levron J, Munne S, Schimmel T, Marquez C, Scott R, Cohen J. Rapid visualization of metaphase chromosomes in single human blastomeres after fusion with in-vitro matured bovine eggs. *Hum Reprod* 1999; 14:470-475.
56. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genomic hybridization. *Hum Reprod Update.* 2005 Jan-Feb;11(1):33-41.
57. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997 Jul;12(7): 1545-9

---

<sup>1</sup>Ελένη Μακρυνού, Μοριακή Βιολόγος, Επιστημονική συνεργάτρια Β' Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

<sup>2</sup>Χρήστος Παπαλουκάς, Ιατρός, Επιστημονικός συνεργάτης Β' Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Α.Π.Θ.

<sup>3</sup>Βάσω Ζουρνατζή, Αναπλ. Καθηγήτρια Β' Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Α.Π.Θ.

<sup>4</sup>Κωνσταντίνος Παπαθανασίου, Αναπλ. Καθηγητής Β' Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Α.Π.Θ.

<sup>5</sup>Χρυσόστομος Σοφούδης, Ιατρός, Επιστημονικός συνεργάτης Β' Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Α.Π.Θ.

<sup>6</sup>Ιωάννης Μ. Τσαφέττας, Καθηγητής, Διευθυντής Β' Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.