

Predimplantacijska genetska diagnostika

Preimplantation genetic diagnosis

Karin Writzl

Klinični inštitut za medicinsko genetiko, Ginekološka klinika, UKC Ljubljana, Štajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

doc. dr. Karin Writzl,
dr.med., spec. klinične
genetike, Klinični inštitut
za medicinsko genetiko,
Ginekološka klinika, UKC
Ljubljana, Štajmerjeva 3,
1000 Ljubljana
Tel: +386 1 5226031
Fax: +386 1 4320024
Elektronski naslov:
karinwritzl@gmail.com

Ključne besede:

predimplantacijska
genetska
diagnostika (PGD),
predimplantacijsko
genetsko presejanje
(PGS), kromosomske
mutacije, monogenske
bolezni

Key words:

preimplantation
genetic diagnosis
(PGD), preimplantation
genetic screening
(PGS), chromosomal
abnormality, single gene
disorder

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2013;
82: 106–12

Prispelo: 10. apr. 2012,
Sprejeto: 1. avg. 2012

Izvleček

Izhodišča: Za pare z veliko verjetnostjo za rojstvo otroka z znano genetsko boleznijo predstavlja predimplantacijska genetska diagnostika (PGD) možnost genetske preiskave celic zarodka pred njegovim vnosom v maternico. Za izvedbo PGD je potrebna oploditev z biomedicinsko pomočjo, biopsija ene ali dveh celic zarodka ter genetska preiskava na njih. V zadnjem času se poleg klasičnih genetskih metod fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) in verižne reakcije s polimerazo uveljavljajo tudi nove metode, kot sta metoda na mikromrežah osnovane primerjalne genomske hibridizacije (mikromreže CGH) in metoda mikromreže s polimorfizmi posameznih nukleotidov (mikromreže SNP). Njihova glavna prednost je možnost pregleda vseh 24 kromosomov ter možnost hkratne preiskave večjih (kromosomskih) in manjših (genskih) preureditev. Najpogostejše indikacije za PGD so kromosomske preureditve pri starših ali monogenska bolezen v družini. Predimplantacijsko genetsko presejanje (PGS), pri katerem ugotavljamo številčne nepravilnosti kromosomov na blastomerah z metodo FISH, so v klinično prakso uvedli z namenom izboljšati stopnje zanositve pri parih z zmanjšano plodnostjo. Izsledki randomiziranih kontroliranih raziskav pričakovanj niso potrdili. Glavni vzrok za neuspeh PGS je najverjetneje naravni pojav kromosomskega mozaicizma zarodka v času biopsije.

Zaključek: Metoda PGD se je v zadnjih dveh desetletjih uveljavila kot pomembna predrojstvena diagnostika pri parih z veliko verjetnostjo za rojstvo otroka z genetsko boleznijo zaradi kromosomske preureditve pri starših ali monogenske bolezni v družini. Prihodnost PGS bo odvisna od rezultatov trenutno potekajočih randomiziranih kontroliranih raziskav, pri katerih uporabljajo različne vire vzorca DNA (polarno telo, blastomera, trofoektoderm) in različne genetske meto-

de (mikromreže CGH in mikromreže SNP), da bi ugotovili, ali lahko s PGS izboljšajo stopnjo zanositve pri parih z zmanjšano plodnostjo.

Abstract

Background: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) is used to analyze embryos before their transfer into uterus. It is suitable for a group of patients who are at a substantial risk of conceiving a pregnancy affected by a known genetic defect. PGD requires medically assisted reproduction, embryo biopsy of one or two cells and genetic analysis using either fluorescent in situ hybridization (FISH) or polymerase chain reaction. New technologies for PGD are now emerging. Array-based technologies allow simultaneous testing of aneuploidy and specific genetic diseases in each embryo. The main indications for PGD have been single gene disorders and inherited chromosomal abnormalities. Preimplantation genetic screening (PGS) was introduced for aneuploidy screening, with the aim of replacing euploid embryos and increasing pregnancy rates in certain groups of patients undergoing in vitro fertilization procedures owing to infertility. Lately, several randomized control trials have failed to show that PGS on blastomeres using FISH method improved the delivery rate compared to the control group. The main reason is probably the natural occurrence of chromosomal mosaicism in the cleavage-stage embryo.

Conclusions: Over the last two decades, PGD has been shown to be a reliable and safe genetic test for couples who are at risk of a specific inherited disorder. For PGS, the results from several ongoing randomized controlled trials performed at different cell biopsy stage, using array-CGH and SNP array will provide the data needed to evaluate the clinical efficacy.

Uvod

Predimplantacijska genetska diagnostika (PGD) je genetska preiskava celic zarodka pred vnosom zarodka v maternico. Zanj se odločajo predvsem pari z veliko verjetnostjo za rojstvo otroka s poznano genetsko boleznijo. Populacijske študije so pokazale, da ima 1–2 % otrok monogeno bolezen, kromosomsko mutacijo pa 0,4–0,6 % otrok.¹ Verjetnost za prenos genetske nagnjenosti k bolezni z roditelja/roditeljev na potomce je odvisna od načina dedovanja bolezni in je lahko 50 % (pri avtosomno dominantnih boleznih), 25 % (pri avtosomno recesivnih boleznih in na kromosom X vezanih recesivnih boleznih) ter 10–15 % pri parih z uravnovešeno kromosomsko preureditvijo.² Do uvedbe PGD so imeli pari z ugotovljenim povečanim tveganjem za rojstvo otroka z genetsko boleznijo naslednje možnosti: a) sprejeti tveganje, b) odločiti se za predrojavno diagnostiko ter prekiniti nosečnost v primeru potrjene genetske bolezni pri plodu, c) odločiti se za darovane spolne celice, č) odločiti se za posvojitev ali d) sprejeti odločitev, da otrok ne bodo imeli. Z uvedbo PGD so dobili novo možnost. Številni pari, ki se odločajo za PGD, že imajo izkušnjo ponavljajočih se spontanah splavov ali medicinskih prekinitev nosečnosti zaradi ugotovljene mutacije pri plodu. Glavna prednost PGD je zato dejstvo, da je diagnostika izpeljana še pred vnosom zarodka v maternico. Tudi odločitev za PGD ni lahka. Pred izvedbo diagnostike preteče veliko časa za pripravo specifičnih preiskav za vsak par. Čeprav je večina parov plodnih, je potreben postopek oploditve z biomedicinsko pomočjo. Veliko razočaranje za pare so postopki, pri katerih se je mutacija ugotovila pri vseh zarodkih in zato prenos zarodka sploh ni mogoč.³

Prvi začetki PGD segajo v leto 1990.⁴ Narejena je bila selekcija spola v prid ženskih zarodkov pri dveh parih, ko sta bili ženski prenašalki na kromosom X vezane bolezni (adrenolevkodistrofija in na kromosom X vezana duševna manjrazvitost). Preiskava se je v zadnjih 20 letih hitro razširila po vsem svetu. V zadnjem poročilu ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) PGD konzorcija je opisanih

5887 postopkov oploditve z biomedicinsko pomočjo ter genetsko diagnostiko, ki so bili narejeni v letu 2007 in vodili v rojstvo 1206 otrok.³ V Sloveniji je bila preiskava prvič narejena leta 2004, prvi otrok pa je bil rojen leta 2006.⁵

Tehnike

Zarodke pridobimo s postopkom oploditve z biomedicinsko pomočjo. Mogoča je klasična zunajtelesna oploditev, pri kateri pripravljeno seme dodamo jajčnim celicam (IVF – in vitro fertilizacija) ali pa oploditev jajčne celice z neposrednim vnosom semenčice v jajčno celico (ICSI – intracytoplasmic sperm injection). Pri slednji je verjetnost paternalne kontaminacije manjša, zato jo vedno uporabljamo, kadar genetska preiskava blastomere poteka z molekularnogenetsko metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR – polymerase chain reaction). Najpogostejše se uporablja metoda, ko tretji dan, ko zarodek doseže 6 do 8 celični stadij, naredimo biopsijo ene ali dveh blastomer.⁶ Sledi genetska diagnostika na izoliranih blastomerah, ki traja največ dva dni. Peti dan en ali dva zarodka, pri katerih je bil rezultat genetske analize normalen, prenesemo v maternico. Preostale zarodke z normalnim razvojem in normalnim rezultatom genetske analize zamrznemo.⁷ Prenos odmrznjenih zarodkov v maternico je mogoč v naslednjih postopkih oploditve.

V zadnjem času se vse bolj uveljavljata tudi metodi odvzema obeh polarnih teles ter biopsije blastociste. Delež postopkov, pri katerem sta bili odvzeti polarni telesi, je tako v zadnjem poročilu ESHRE PGD konzorcija dosegel 15,9 %, delež postopkov z biopsijo blastociste 0,2 %, še vedno pa so najpogostejši postopki, pri katerih se naredi biopsija blastomere (81,9 %).⁶ Glavni prednosti analize polarnih teles so: več časa, ki je na razpolago za analizo, ter odsotnost mozaicizma, ki je prisoten v zgodnjih fazah embrionalnega razvoja in lahko otežuje diagnostiko pri analizi blastomer.⁸ Glavna slabost je dejstvo, da lahko analiziramo le materin del dednega zapisa, ne pa očetovega, kar pomeni, da je metoda primerna, ko je mati nosilka kromosomske preureditve

ali mutacije za avtosomno dominantno ali na kromosom X vezano bolezen ter za izključevanje naključnih aneuploidij maternalnega izvora. Pomemben delež postopkov z biopsijo polarnih teles je bil v prejšnjih letih opravljen tudi zaradi zakonskih določil, saj je bila v Nemčiji do leta 2011 dovoljena samo analiza na polarnem telesu, ne pa na blastomerah zarodka.⁹

Genetska analiza lahko poteka z metodo fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) ali pa z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR).

Metoda fluorescentne in situ hibridizacije (FISH)

Metodo FISH uporabljamo za ugotavljanje kromosomskih nepravilnosti ali pa za določitev spola pri boleznih, vezanih na kromosom X, kadar specifična molekularno genetska preiskava ni mogoča. Izolirani blastomeri prenesemo na objektno stekelce in jih fiksiramo.¹⁰ Dodamo DNA sonde, ki so označene s fluorescentnim barvilom. Preparat nato segrejemo na temperaturo 70–75 °C, pri čemer poteče denaturacija DNA blastomer ter DNA sond, nato pa pri temperaturi 37 °C sledi hibridizacija DNA sond na komplementarne dele DNA blastomer. Z uporabo fluorescentnega mikroskopa analiziramo število signalov za posamezno DNA sondo. Vrsta uporabljenih sond je odvisna od indikacije.

Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Pri PGD monogenskih boleznih se uporablja metoda PCR. Omogoča namnožitev zadostne količine DNA, ki smo jo osamili iz blastomer zarodka. Velik izziv je majhna količina testnega vzorca, saj lahko za analizo uporabimo le eno do dve blastomeri, medtem ko imamo pri običajni analizi krvnega vzorca na voljo 20.000–100.000 celic. Blastomero najprej položimo v raztopino, ki povzroči lizo celice, pri čemer se sprosti DNA. Nato dodamo reagente za PCR. Občutljivost PCR se je povečala z uporabo fluorescentnega označevanja oligonukleotidnih začetnikov in z njo povezano fluorescentno zaznavo na avtomatskem sekvenatorju. Pa-

ziti je potrebno, da ne pride do kontaminacije vzorca z zunanjo DNA. Težave lahko povzroča tudi pomnoževanje samo enega od obeh starševskih alelov (allele-drop out), kar lahko vodi v napačno interpretacijo rezultata.¹¹ Pri avtosomno dominantni bolezni lahko pri odsotnosti pomnožitve bolezenskega alela dobimo izvid, ki je skladen s homozigotnim stanjem za normalen alel, kar pomeni, da zarodek z genetsko nagnjenostjo k razvoju bolezni opredelimo, da je zdrav. Verjetnost napačne diagnoze zaradi izgube alela se zmanjša ob hkratni izvedbi neposredne analize za ugotavljanje družinske mutacije/mutacij in posredne analize, pri kateri sledimo segregacijo polimorfnihih označevalcev. Pred PGD je zato potrebna natančna analiza vzorcev staršev ter bolnih in zdravihi družinskihi članovi za določitev primernih polimorfnihih označevalcev.

Nove metode

Novi metodi, ki se trenutno uveljavljata, sta metoda na mikromrežah osnovane primerjalne genomske hibridizacije (aCGH, angl. Array Comparative Genomic Hybridization) in metoda mikromreže s polimorfizmi posameznih nukleotidov (SNP array, angl. Single Nucleotide Polymorphism array).

Metoda na mikromrežah osnovane primerjalne genomske hibridizacije je most med citogenetiko in molekularno genetiko. Iz blastomere izolirano DNA ter DNA zdrave osebe (kontrolna DNA) ločeno namnožimo ter obarvamo z različnima fluorokromoma, najpogosteje z rdečim ter zelenim. Enaka deleža obeh vzorcev DNA nato zmešamo ter dodamo na mikromrežo, ki vsebuje majhne delčke kromosomov. Poteče kompetitivna hibridizacija obarvanihi vzorcev DNA na mikromrežo, z računalniškim programom pa lahko analiziramo delež zelenega in rdečega signala ter tako ugotovimo delecije in duplikacije posamezne regije. Glavni prednosti preiskave sta, da je preiskava izvedljiva v 24 urah, ter da omogoča analizo vseh 24 kromosomov. Metoda se uveljavlja pri ugotavljanju neuravnovešenih translokacij in pri predimplantacijskem genetskem presejanju.^{12–14} Z metodo aCGH ni mogoče ugo-

toviti poliploidij (npr. triploidije), delecij in duplikacij v predelu genoma, ki ni zastopan na mikromreži, sprememb v DNA zaporedju (točkaste mutacije, spremembe v trinukleotidnem zaporedju) in uravnovešenih sprememb (translokacije, inverzije).

Druga metoda je metoda mikromreže s polimorfizmi posameznih nukleotidov. Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP-single nucleotide polymorphism) so področja v genomu, za katera velja, da se sekvenca posameznega nukleotida v populaciji razlikuje. Iz blastomere izolirano DNA namnožimo in obarvamo določen SNP z zeleno barvo, drugo različico SNP pa z rdečo barvo. Ocenimo intenziteto posameznih signalov ter jo s pomočjo računalniškega programa primerjamo s kontrolno populacijo. Metoda omogoča hkratno ugotavljanje števila posameznih kromosomov ter s tem ugotavljanje aneuploidij in specifičnih monogenetskih genetskih bolezni.¹⁵

Indikacije za PGD

Monogeneske bolezni

Za večino bolezni, pri katerih je mogoča prenatalna diagnostika, je možna tudi PGD. V desetem poročilu Evropskega združenja za humano reprodukcijo in embriologijo (ESHRE), ki predstavi podatke 57 centrov PGD, je tako zapisanih kar 145 različnih bolezni.³

Najpogostejše so bili postopki PGD izvedeni pri teh indikacijah: 1. avtosomno recesivno dedne bolezni: beta talasemija/srpastocelična anemija, cistična fibroza, spinalna mišična atrofija, 2. avtosomno dominantno dedne bolezni: miotonična distrofija tip I, Huntingtonova bolezen, nevrofibrinomatosa, dedna motorična in senzorična nevropatija, 3. na kromosom X vezane bolezni: sindrom fragilnega kromosoma X, Duchennova/Beckerjeva mišična distrofija ter hemofilija A in B.³

Pri nekaterih na kromosom X vezanih boleznih, npr. Duchenne-ova mišična distrofija, obstaja poleg možnosti analize blastomer z metodo PCR tudi možnost analize z metodo FISH. Pri slednji gre za selekcijo spola. Po zaključeni analizi blastomer z me-

todo FISH se v maternico prenesejo le zarodki z dvema signaloma za kromosom X. Pri takšni selekciji se ne prenese polovica dečkov, ki mutacije nimajo, zato je etično bolj sprejemljiva metoda PCR, če je le mogoča.

Strukturne kromosomske nepravilnosti

V skupini strukturnih kromosomskih nepravilnosti so najpogostejša indikacija translokacije (recipročne in Robertsonove), ki se pojavljajo s pogostostjo približno 1/500 fenotipsko zdravih prenašalcev.¹⁶ Pogosto so recipročne translokacije specifične samo za določeno družino. Metoda PGD se lahko izvaja tudi pri inverzijah in insercijah.^{17,18}

Recipročne translokacije zaznamuje izmenjava fragmentov DNA med dvema kromosomoma. Pri zdravih prenašalcih uravnovešene recipročne translokacije je pogostejša neplodnost (zlasti, kadar je prenašalec moški), povečano je tveganje za spontane splave ter za rojstvo otroka z razvojnimi nepravilnostmi in razvojnim zaostankom.¹⁹ Vzrok za to so neuravnovešene kromosomske kombinacije, ki nastanejo ob razporejanju kromosomov v spolnih celicah. Možnih je 32 različnih kombinacij,²⁰ le dve od njih (normalen kariotip ter kombinacija z uravnovešeno translokacijo) pa omogočata normalen razvoj. Pri PGD lahko na eni ali dveh izoliranih blastomerah z metodo FISH ob uporabi treh različnih sond ugotovimo, ali ima zarodek uravnovešeno ali neuravnovešeno kromosomsko kombinacijo. Sonde, ki predstavljajo specifične dele DNA, obarvane s fluorescentnim barvilom, praviloma izberemo tako, da hibridizirajo na oba subtelo-merna dela translociranih kromosomov ter v področje centromere enega od translociranih kromosomov.²⁰ Z metodo FISH ne moremo ločiti med blastomero z normalnim kariotipom in blastomero z uravnovešeno translokacijo.

Številčne kromosomske nepravilnosti

Predimplantacijsko genetsko presejanje (PGS-preimplantation genetic screening), pri katerem ugotavljamo številčne nepra-

vilnosti kromosomov na blastomerah, so uvedli v klinično prakso, da bi izboljšali stopnjo zanositve pri parih z zmanjšano plodnostjo. Uvedba metode je temeljila na predpostavki, da so kromosomske nepravilnosti zarodkov, ki jih pogosto najdemo v začetnih stadijih zarodkov, pogost vzrok za neuspele nosečnosti pri postopkih oploditve z biomedicinsko pomočjo.²¹ Najpogostejše indikacije so bile višja starost matere, ponavljajoče se neuspešne implantacije zarodkov, ponavljajoči se zgodnji spontani splavi in zelo slab spermogram pri moškem.³ Na eni ali dveh blastomerah je bila narejena analiza števila signalov za tiste kromosome, katerih aneuploidije vodijo v zgodnji spontani splav ali v rojstvo otroka z razvojnimi nepravilnostmi in razvojnim zaostankom (najpogostejše kromosomi X, Y, 13, 18, 21, 16, 22). Rezultati randomiziranih kontroliranih raziskav niso potrdili izboljšanja stopnje zanositve po PGS z metodo FISH pri parih, pri katerih je bila indikacija višja starost matere.^{22,23} Pri ostalih indikacijah pomen PGS še ni poznan.²³ Možni vzroki za neuspeh PGS so: 1. tehnične omejitve metode FISH, ki trenutno ne omogoča pregleda vseh kromosomov, 2. napaka pri izvedbi preiskave zaradi nezadostne hibridizacije, prekrivanja signalov, cepljenja signalov ter 3. mozaicizem. Slednji je prisoten pri večini zarodkov četrty dan embrionalnega razvoja.⁸ Normalen genetski izvid izolirane blastomere zato ne pomeni nujno tudi normalnega genetskega izvida preostalih blastomer zarodka in obratno. Z uvajanjem novih metod poskušajo premostiti omejitve sedanjih. Medtem, ko z metodo FISH lahko pregledamo le 5–12 kromosomov, omogočata novi metodi aCGH in mikromreže s SNP analizo vseh 24 kromosomov.²⁴ Težavi, ki jo predstavlja mozaicizem v zgodnjih fazah embrionalnega razvoja, se poskušajo izogniti tudi s tem, da bi določili optimalno stopnjo zarodka za biopsijo.^{25,26}

Napake pri diagnostiki, uspešnost PGD, zdravje otrok, rojenih po PGD

Pogostost napake pri PGD ni znana, saj se napaka v večini primerov prepozna le po rojstvu otroka z genetsko mutacijo, ne pa v

primerih, ko zaradi lažno pozitivnega izvida genetske diagnostike ni prišlo do prenosa zarodka, ko po prenosu zarodka ni prišlo do nosečnosti ali pa se je nosečnost zaključila z zgodnjim splavom. Po podatkih PGD konzorcija je bil delež prepoznanih in javljenih napak 0,16 % (24/15158) in sicer 0,1 % pri metodi FISH in 0,5 % pri metodi PCR.²⁷ Med možne vzroke za napake sodijo zamenjava zarodka zaradi nepravilne oznake izoliranih celic, prenos napačnega zarodka, kontaminacija izolirane celice z materino ali očetovo DNA, izguba alela, nepravilna uporaba sond ali oligonukleotidnih začetnikov in slaba hibridizacija ali pomnoževanje.²⁷ Napačna interpretacija pri diagnostiki z metodo FISH je lahko tudi posledica visokega deleža (50–90 %) mozaičnih zarodkov v zgodnjem embrionalnem razvoju.⁸

Na uspešnost PGD postopkov vpliva več dejavnikov. Mednje gotovo sodi indikacija, saj je pri avtosomno dominantnih monogenetskih boleznih že izhodiščna verjetnost za mutacijo pri zarodku večja kot na primer pri avtosomno recesivnih boleznih. Pri višji starosti matere je pogosto pridobljenih manj jajčnih celic, večja je verjetnost aneuploidij, zato je tudi uspešnost PGD postopkov manjša.²⁸ Na uspešnost gotovo vplivajo tudi izkušnje centra, ki diagnostiko izvaja. Po podatkih ESHRE PGD konzorcija je bil v 55 PGD centrih povprečen delež kliničnih nosečnosti na cikel 21,73 %.³

Delež otrok z razvojnimi nepravilnostmi po postopku PGD je primerljiv z deležem po postopku ICSI.²⁹ Razvojne nepravilnosti so bile opisane pri 3,8 % (154/4021) otrok, od tega je 2 % otrok imelo hude razvojne nepravilnosti, 1,8 % pa manjše.³ Visok pa je delež večplodnih nosečnosti (23 %).³

Etična vprašanja oz. pomisleki ob PGD

PGD sproža tudi številna etična vprašanja. Najpogostejše so povezana z indikacijami za postopek.

Večina se strinja, da so strukturne kromosomske preureditve pri starših ter možnost monogenske bolezni, ki se pojavi v otroškem obdobju, upravičene indikacije za postopek PGD. Do razprave o upravičenosti

postopka prihaja pri monogenjskih boleznih, ki se pojavljajo v odraslem obdobju, ter pri testiranju, pri katerem gre za ugotavljanje predispozicije za določeno bolezen (npr. rak dojke).^{30,31} Pomisleki se pojavljajo tudi pri genetskem testiranju zarodka za tkivno sorodnost, katerih namen je rojstvo otroka, ki bo lahko darovalec določenega tkiva bolnemu sorojencu.³² Etično sporna je tudi uporaba metode PGD za selekcijo spola brez medicinske indikacije.^{33,34}

Zaključek

Preiskava PGD se je v zadnjih letih uveljavila kot pomembna možnost pri načrtovanju družine pri parih z veliko verjetnostjo za rojstvo otroka s hudo genetsko boleznijo. Število postopkov PGD iz leta v leto narašča v svetu, pa tudi v Sloveniji.^{3,5} S hitrim tehnološkim napredkom bo mogoče testirati celice zarodka za kromosomske nepravilnosti, monogenske bolezni ter ugotavljati predispozicijo za posamezne bolezni (npr. rak, sladkorno bolezen, avtizem, bolezni srca). In kaj sledi oziroma kje so sploh meje?

Literatura

1. Baird PA, Anderson TW, Newcombe HB, Lowry RB. Genetic disorders in children and young adults: a population study. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 677–93.
2. Midro AT, Stengel-Rutkowski S, Stene J. Experiences with risk estimates for carriers of chromosomal reciprocal translocations. *Clin Genet* 1992; 41: 113–22.
3. Harper JC, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T, et al. V. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod* 2010; 25: 2685–707.
4. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768–70.
5. Writzl K, Veble A, Kmecl J, Peterlin B. Predimplantacijska genetska diagnostika–4-letne izkušnje na Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. *Zdrav Vestn* 2009; 78 Suppl 1: 181–5.
6. Harton G, Traeger-Syndinos J, Goossens V. Data from the ESHRE PGD Consortium. *Hum Reprod* 2011; Suppl 1: 17–8.
7. El-Toukhy T, Kamal A, Wharf E, Grace J, Bolton V, Khalaf Y, et al. Reduction of the multiple pregnancy rate in a preimplantation genetic diagnosis programme after introduction of single blastocyst transfer and cryopreservation of blastocysts biopsied on day 3. *Hum Reprod* 2009; 24: 2642–8.
8. Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, Van Opstal D, Schuring-Blom GH, Krijtenburg PJ, et al. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of Day 4, 5 and 8 human embryos. *Hum Reprod* 2010; 25: 1916–26.
9. Griesinger G, Bündgen N, Salmen D, Schwinger E, Gillissen-Kaesbach G, Diedrich K. Polar body biopsy in the diagnosis of monogenic diseases: the birth of three healthy children. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106: 533–8.
10. Scriven PN, O'Mahony F, Bickerstaff H, Yeong CT, Braude P, Mackie Ogilvie C. Clinical pregnancy following blastomere biopsy and PGD for a reciprocal translocation carrier: analysis of meiotic outcomes and embryo quality in two IVF cycles. *Prenat Diagn* 2000; 20: 587–92.
11. Spits C, Sermon K. PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology. *Prenat Diagn* 2009; 29: 50–6.
12. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod* 2011; 26: 1560–74.
13. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod* 2011; 26: 1925–35.
14. Traversa MV, Marshall J, McArthur S, Leigh D. The genetic screening of preimplantation embryos by comparative genomic hybridisation. *Reprod Biol* 2011; 11 Suppl 3: 51–60.

15. Handyside AH. PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes by genome-wide SNP analysis: seeing the wood and the trees. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 686–91.
16. Hook EB, Hamerton JL. The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies—differences between studies—results by sex and by severity of phenotypic involvement. In: Hook EB, Porter IH, eds: *Population Cytogenetics*. New York, Academic Press Inc; 1977. p. 63–79.
17. Escudero T, Lee M, Stevens J, Sandalinas M: Munné S. Preimplantation genetic diagnosis of pericentric inversions. *Prenat Diagn* 2001; 21: 760–6.
18. Xanthopoulos L, Mantzouratou A, Mania A, Ca-wood S, Doshi A, Ranieri DM, et al. Male and female meiotic behaviour of an intrachromosomal insertion determined by preimplantation genetic diagnosis. *Mol Cytogenet* 2010; 3: 2.
19. Gardner RJM, Sutherland GR. *Chromosomal abnormalities and Genetic Counseling*. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2004. p. 59–97.
20. Scriven PN, Handyside AH, Ogilvie CM. Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 1998; 18: 1437–49.
21. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod* 2009; 24: 1221–8.
22. Harper J, Coonen E, De Rycke M, Fiorentino F, Geraedts J, Goossens V, et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum Reprod* 2010; 25: 821–3.
23. ACOG Committee Opinion No. 430. Preimplantation genetic screening for aneuploidy. *Obstet Gynecol* 2009; 113: 766–7.
24. Bisignano A, Wells D, Harton G, Munné S. PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes: advantages and disadvantages of competing platforms. *Reprod Biomed Online* 2011; 23: 677–85.
25. Geraedts J, Collins J, Gianaroli L, Goossens V, Handyside A, Harper J, et al. What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! *Hum Reprod* 2010; 25: 575–7.
26. Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, Gordon A, Wells D. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod* 2011; 26: 480–90.
27. Wilton L, Thornhill A, Traeger-Synodinos J, Sermon KD, Harper JC. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod* 2009; 24: 1221–8.
28. Xanthopoulos L, Mantzouratou A, Mania A, Ghevaria H, Ghebo C, Serhal P, Delhanty JD. When is old too old for preimplantation genetic diagnosis for reciprocal translocations? *Prenat Diagn* 2011; 31: 1002–6.
29. Desmyttere S, De Rycke M, Staessen C, Liebaers I, De Schrijver F, Verpoest W, et al. Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD. *Hum Reprod* 2012; 27: 288–93.
30. Julian-Reynier C, Chabal F, Frebourg T, Lemery D, Noguès C, Puech F, et al. Professionals assess the acceptability of preimplantation genetic diagnosis and prenatal diagnosis for managing inherited predisposition to cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4475–80.
31. Menon U, Harper J, Sharma A, Fraser L, Burnell M, ElMasry K, et al. Views of BRCA gene mutation carriers on preimplantation genetic diagnosis as a reproductive option for hereditary breast and ovarian cancer. *Hum Reprod* 2007; 22: 1573–7.
32. Pennings G, Schots R, Liebaers I. Ethical considerations on preimplantation genetic diagnosis for HLA typing to match a future child as a donor of haematopoietic stem cells to a sibling. *Hum Reprod* 2002; 17: 534–8.
33. Strange H; Cesagen (ESRC centre for economic and social aspects of genomics). Non-medical sex selection: ethical issues. *Br Med Bull* 2010; 94: 7–20.
34. Shenfield F, Pennings G, Devroey P, Sureau C, Tarlatzis B, Cohen J; ESHRE Ethics Task Force. Taskforce 5: preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2003; 18: 649–51.