

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ và triển vọng ứng dụng tại Việt Nam

Nguyễn Đình Tảo

Trung tâm Công nghệ phôi, Học viện Quân y

Tại Việt Nam, tới thời điểm hiện nay, hầu hết các cơ sở y tế đều áp dụng kỹ thuật chẩn đoán trước sinh để tư vấn về các bệnh di truyền, khi đó phôi đã trên 3 tháng tuổi. Kỹ thuật này gây ảnh hưởng rất nhiều tới sức khỏe của người mẹ khi quyết định phải bỏ thai. Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ “Pre-implantation Genetic Diagnosis” (PGD) cho phép các cặp vợ chồng có nguy cơ truyền các bệnh lý di truyền cho con có thể có cơ hội sinh con khỏe mạnh.

Nguyên tắc về kỹ thuật của PGD dựa trên việc thực hiện thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) để tạo phôi, sau đó sinh thiết phôi và phân tích di truyền trước chuyển phôi. Sinh thiết phôi (embryo biopsy) có thể sinh thiết thể cực (polar body biopsy); sinh thiết phôi bào vào giai đoạn phân cắt của phôi (cleavage-embryo biopsy) hoặc sinh thiết phôi nang (blastocyst biopsy).

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ có thể được ứng dụng để chẩn đoán bất thường nhiễm sắc thể (NST): sử dụng kỹ thuật Fluorescent In situ Hybridization - FISH có thể chẩn đoán các bệnh liên quan đến NST như hội chứng Down, hội chứng Patau (Trisomy 13), hội chứng Edwards (Trisomy 18), hội chứng Klinefelter (XXY); sử dụng kỹ thuật QF-PCR (Quantitative PCR) hoặc kỹ thuật lai so sánh bộ gen (CGH= Comparative Genome Hybridization) có thể chẩn đoán được gần 200 bệnh đơn gen khác nhau, ví dụ bệnh Thalassemia, bệnh teo cơ tủy (Spinal muscular atrophy - SMA).

Tại Việt Nam, được sự hỗ trợ của Chương trình khoa học và công nghệ cấp nhà nước KC10/11-15, Học viện Quân y đã và đang triển khai đề tài “Nghiên cứu quy trình chẩn đoán một số bệnh di truyền trước chuyển phôi để sàng lọc phôi TTTON”, thực hiện trên bệnh nhân Thalassemia và SMA. Những kết quả của đề tài sẽ mang lại hạnh phúc cho những cặp vợ chồng với những đứa con khỏe mạnh.

Từ khóa: chẩn đoán di truyền tiền làm tổ, chẩn đoán trước sinh, NST, phôi.

Chỉ số phân loại 3.2

Giới thiệu chung

Tại Việt Nam, tới thời điểm hiện nay, hầu hết các cơ sở y tế đều áp dụng kỹ thuật chẩn đoán trước sinh để tư vấn về các bệnh di truyền, khi đó phôi đã trên 3 tháng tuổi. Kỹ thuật này gây ảnh hưởng rất nhiều tới sức khỏe của người mẹ khi quyết định phải bỏ thai. Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ “Pre-implantation Genetic Diagnosis” (PGD) cho phép các cặp vợ chồng có nguy cơ truyền các bệnh lý di truyền cho con có thể có cơ hội sinh con không mắc bệnh mà không phải chẩn đoán tiền sản sau khi mang thai và bỏ thai khi phát hiện bệnh lý ở thai. Kỹ thuật PGD dựa trên việc phát hiện các bất thường di truyền ở phôi và chỉ cấy trở lại vào lòng tử cung các phôi không có các bất thường về di truyền.

PGD được báo cáo lần đầu tiên trên thế giới vào

năm 1990. Trong bài báo đăng trên Tạp chí Nature, Handyside và cộng sự đã báo cáo các trường hợp có thai từ các phôi đã được sinh thiết và chẩn đoán di truyền bằng cách khuếch đại ADN đặc trưng cho NST Y. Tuy nhiên, từ khi kỹ thuật FISH bắt đầu được áp dụng trong PGD vào năm 1993-1994 để chẩn đoán các bất thường NST đã giúp cho PGD tiếp tục một bước phát triển mới khi người ta bắt đầu xác định được chuyển đoạn NST và ứng dụng vào PGD (năm 1996). Kỹ thuật chẩn đoán di truyền này giúp xác định các phôi không có các chuyển đoạn trước khi cấy vào tử cung.

Từ năm 1999, PGD lại được mở rộng chỉ định để chẩn đoán phôi có mang các gen liên quan đến các bệnh lý về sau này ở đứa trẻ. Chỉ định này cho phép bố mẹ có mang gen tiềm ẩn một bệnh lý được biết trước có thể sinh ra đời một trẻ hoàn toàn không mang

PRE-IMPLANTATION GENETIC DIAGNOSIS AND APPLICATION PROSPECT IN VIETNAM

Summary

At the moment, in Vietnam, almost health facilities are applying prenatal diagnosis while the embryos are 3 months old. This technique greatly affects the health of the mother to have an abortion decision. Pre-implantation genetic diagnosis (PGD) enables couples at risk of transmitting genetic disorders to have the opportunity of having healthy baby.

Principles of PGD technique is based on the implementation of in vitro fertilization (IVF) to create embryos, then make embryo biopsy and genetic analysis before embryo transfer.

Biopsy of embryos may be polar body biopsy, cleavage-embryo biopsy, or blastocyst biopsy.

PGD can be applied to diagnose abnormal chromosomes: using Fluorescent In Situ Hybridization technique (FISH) can diagnose diseases involving chromosome such as Down syndrome, Patau syndrome (Trisomy 13), Edwards syndrome (Trisomy 18), Klinefelter syndrome (XXY); in term of diagnosis of genetic abnormalities, using Quantitative PCR technique (QF-PCR) or Comparative Genome Hybridization (CGH) can diagnose nearly 200 different single-gene diseases such thalassemia, spinal muscular atrophy (SMA).

In Vietnam, under the support of KC10/11-15 program, Military Medical University has been implementing the project "Research on the procedure of diagnosis of some genetic diseases prior to embryo transfer to select IVF embryos" carried out on patients with Thalassemia and SMA. The results of the research are expected to bring infinite happiness for couples to have healthy babies.

Keywords: chromosome, embryos, pre-implantation Genetic Diagnosis, prenatal diagnosis.

Classification number 3.2

gen bệnh. Điều này mang đến khả năng ứng dụng rất lớn của PGD khi các nhà khoa học phát hiện ngày càng nhiều bệnh lý ở người có liên quan đến di truyền.

Kỹ thuật thực hiện

Nguyên tắc về kỹ thuật của PGD dựa trên việc thực hiện TTTON để tạo phôi, sau đó sinh thiết phôi và phân tích NST hoặc ADN bằng kỹ thuật FISH hoặc PCR (polymerase chain reaction). Nhìn chung kỹ thuật PGD gồm 3 bước:

Làm thủng màng trong suốt (zona drilling)

Kỹ thuật làm thủng màng trong suốt nhằm mục đích tạo một lỗ trên màng trong suốt. Thông qua lỗ thủng này, người ta sử dụng kim sinh thiết để hút các tế bào có trong phôi.

Làm thủng màng trong suốt có thể được thực hiện bằng nhiều cách khác nhau: sử dụng acid Tyrodes; xé màng zona bằng phương pháp cơ học; sử dụng tia laser không tiếp xúc.

Sinh thiết phôi (embryo biopsy)

Hiện nay, sinh thiết tế bào để làm chẩn đoán di truyền có thể thực hiện ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển của phôi: (i) Giai đoạn hợp tử: sinh thiết các thể cực; (ii) Giai đoạn phân chia vào ngày thứ 3, khoảng 6-8 tế bào: sinh thiết 1-2 phôi bào; (iii) Giai đoạn phôi nang: sinh thiết các tế bào thuộc lớp trophectoderm.

Sinh thiết thể cực (polar body biopsy): sinh thiết thể cực có ưu điểm là ít ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi, vì đây là các sản phẩm phụ bị loại bỏ trong quá trình phát triển của trứng và hợp tử. Ngoài ra, sinh thiết thể cực có thể được phối hợp với sinh thiết phôi bào để tăng độ chính xác của các chẩn đoán di truyền. Tuy nhiên, sinh thiết thể cực có nhược điểm lớn là chỉ có thể chẩn đoán các bất thường từ mẹ do thể cực chỉ chứa các NST xuất phát từ trứng. Ngoài ra, trong quá trình phát triển thể cực thứ nhất hay bị vỡ thành những mảnh nhỏ, điều này có thể dẫn đến việc thất thoát chất liệu di truyền, làm ảnh hưởng đến kết quả chẩn đoán.

Sinh thiết phôi bào vào giai đoạn phân cắt của phôi (cleavage-embryo biopsy): sinh thiết phôi được thực hiện vào ngày thứ 3 sau thụ tinh. Ở giai đoạn này, phôi có từ 6-8 phôi bào. Một đến hai phôi bào sẽ được sinh thiết để làm chẩn đoán về di truyền. Việc lấy đi 1-2 phôi bào trong giai đoạn này không gây ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi còn lại. Đây là kỹ thuật sinh thiết phôi phổ biến nhất hiện nay.

Trong trường hợp này, phôi bào sinh thiết cần được chẩn đoán di truyền sớm để dựa vào kết quả chẩn đoán này, người ta sẽ chọn phôi và cấy vào buồng tử

cung vào 1-2 ngày sau. Hiện tượng liên kết giữa các phôi bào có thể đã bắt đầu vào thời điểm này, để chuẩn bị sang giai đoạn phôi dâu vào ngày tiếp theo. Do đó, có thể gặp khó khăn khi sinh thiết phôi bào ở giai đoạn phân chia. Việc chẩn đoán di truyền được thực hiện chỉ trên 1 hoặc 2 tế bào có được cũng là một thách thức của kỹ thuật. Ngoài ra, hiện tượng khảm (mosaicism) vẫn có thể xảy ra ở giai đoạn này. Điều này dẫn đến kết quả chẩn đoán di truyền trên phôi bào sinh thiết được có thể không thể hiện chính xác cấu trúc di truyền của phôi.

Sinh thiết phôi nang (blastocyst biopsy): đây là một kỹ thuật mới, chỉ được ứng dụng lâm sàng gần đây. Phôi sẽ được nuôi cấy đến ngày thứ 5 hoặc 6 sau khi thụ tinh. Sau khi làm thủng màng trong suốt, trophectoderm bắt đầu thoát ra khỏi màng trong suốt qua lỗ thủng. Một số tế bào (5-10 tế bào) thuộc lớp trophectoderm sẽ được sinh thiết để làm chẩn đoán di truyền.

Kỹ thuật này có một số ưu điểm nhất định. Chúng ta sẽ có nhiều tế bào hơn để thực hiện chẩn đoán di truyền. Phôi được sinh thiết ở giai đoạn này thường có sức sống cao hơn so với phôi giai đoạn phân cắt. Tuy nhiên, sinh thiết ở giai đoạn phôi nang cũng gặp một số bất lợi như trong quá trình nuôi cấy in vitro, nhiều phôi có thể không phát triển được đến giai đoạn phôi nang. Ngoài ra, kết quả di truyền chẩn đoán được có thể không thể hiện chính xác di truyền của phôi do hiện tượng khảm.

Phôi nang ở người có một lớp tế bào lá nuôi ở phía ngoài (Trophectoderm) sau này sẽ phát triển thành các phần phụ của thai và một khối tế bào cục phôi hay nụ phôi ở bên trong (inner cell mass) sẽ phát triển thành cơ thể thai. Những nghiên cứu gần đây đã tiến hành đánh giá số lượng của các tế bào ở giai đoạn phôi nang cho thấy số lượng đó xấp xỉ tương ứng lần lượt là: 60 tế bào, 80 tế bào và 125 tế bào của phôi nuôi cấy ngày 5, ngày 6 và ngày 7. Những phôi nang có bất thường về mặt hình thái chỉ có số tế bào rất ít, khoảng một nửa so với những con số nêu trên ở những giai đoạn nuôi cấy tương đương về mặt thời gian. Đến giai đoạn phôi nang nuôi cấy ngày thứ 7, số lượng tế bào lá nuôi tăng mạnh so với số lượng tế bào nụ phôi, chiếm khoảng 2/3 tổng số tế bào của phôi nang.

Kỹ thuật FISH (Fluorescent In situ Hybridization)

Các probes sử dụng tập trung vào các NST có ý nghĩa về mặt lâm sàng như: X, Y, 13, 18, 21 và có thể mở rộng với các NST 15, 16, 22. Khi bị lệch bội về các NST trên, phôi vẫn có thể tiếp tục làm tổ và phát

triển trong buồng tử cung. Trong đó, một số có thể tiếp tục phát triển thành thai nhi và sinh sống. Mỗi mẫu dò (probe) đặc trưng cho 1 NST và được đánh dấu huỳnh quang khác nhau để phân biệt. Với kỹ thuật hiện nay, chẩn đoán lệch bội với FISH có thể cho kết quả trong vòng 6-8 giờ. Các phôi bình thường, không phát hiện lệch bội với các NST trên, sẽ được cấy vào buồng tử cung. Ngoài ra, kỹ thuật FISH còn được dùng để chẩn đoán chuyển đoạn NST hoặc chẩn đoán giới tính để loại trừ các bệnh lý di truyền theo giới tính.

Tuy nhiên, dùng kỹ thuật FISH để chẩn đoán bất thường NST cũng có một số vấn đề về mặt kỹ thuật: mất NST trong lúc sinh thiết và cố định tế bào; lai thất bại; các NST chồng lên nhau, khó phân biệt; chỉ chẩn đoán được một số NST nhất định.

FISH là một kỹ thuật trung gian giữa di truyền tế bào và di truyền phân tử trên cơ sở sử dụng các trình tự dò NST có đánh dấu huỳnh quang. Sau khi cho lai trực tiếp trên NST của tế bào tại kỳ nghỉ, nhuộm màu huỳnh quang cho phép ta có thể phân tích xác định số lượng NST hoặc phát hiện chuyển đoạn NST được khảo sát thông qua các tín hiệu khi quan sát trên kính hiển vi huỳnh quang. Ưu điểm là có thể phát hiện bất thường một số NST thường gặp (với bộ kit chuyên dụng), tiến hành với 1 tế bào. Tuy nhiên, phương pháp này bị hạn chế bởi chi phí và thời gian cần thiết để làm kỹ thuật lớn. FISH là kỹ thuật khó khi cố định phôi bào (blastomeres). Một số nhược điểm có thể gặp phải bao gồm cả thất bại khi lai, chồng chéo tín hiệu có thể ảnh hưởng đến tính chính xác khi phân tích. Kỹ thuật FISH phân tích có thể có giá trị chẩn đoán đúng khoảng 83%. Kết quả sai có thể loại bỏ các phôi thai bình thường hoặc dẫn đến chuyển phôi bất thường. Khi làm FISH để phát hiện bất thường NST thì không còn vật liệu để khảo sát gen.

PGD với kỹ thuật PCR

Trước khi thực hiện PGD, cần xác định là việc chẩn đoán gen bệnh là khả thi. Điều này được thực hiện bằng cách lấy máu bố mẹ, xác định trình tự gen bệnh ở bố mẹ và thiết kế mồi. Điều này cần được thực hiện trước khi tiến hành TTON để tạo phôi. Sau đó, thực hiện TTON và nuôi cấy phôi. Sinh thiết phôi và cho các tế bào sinh thiết từ mỗi phôi cho vào tube chạy PCR và phân tích các gen bệnh. Chọn các phôi âm tính với gen bệnh để cấy vào buồng tử cung.

Các vấn đề về kỹ thuật của PGD với kỹ thuật PCR bao gồm: số lượng ADN giới hạn; khuếch đại thất bại; "Allelic drop out": chỉ 1 alen được khuếch đại; tạp nhiễm ADN ngoại lai.

Trong tương lai, kỹ thuật microarray với “ADN chip” hy vọng có thể được ứng dụng trong PGD. Kỹ thuật này giúp có thể chẩn đoán đồng thời lệch bội của tất cả NST, nhiều gen trên các NST khác nhau và chuyển đoạn NST cùng một lúc mà chỉ cần sinh thiết 1 tế bào.

Kỹ thuật QF-PCR (Quantitative PCR)

Là nhóm các kỹ thuật PCR định lượng với việc sử dụng nhân gen các trình tự ngắn đánh dấu huỳnh quang, qua đó đánh giá các biến đổi NST thông qua biến đổi liều lượng gen (Gene dosis): trisomy, monosomy.

Kỹ thuật PCR huỳnh quang và PCR định lượng (QF-PCR) dựa trên việc gắn huỳnh quang vào mỗi đầu của các trình tự ngắn đánh dấu huỳnh quang để nhân đoạn gen cần phân tích hoặc mỗi đầu của các trình tự lặp lại ngắn - STR. Sản phẩm PCR được giải trình tự và phân tích. Qua đó, xác định được tính chất sản phẩm PCR dựa vào màu sắc, kích thước và có thể phân tích liều lượng gen phát hiện các trường hợp lệch bội NST: trisomy hoặc monosomy.

Ưu điểm của kỹ thuật QF-PCR là có độ nhạy cao hơn, cho kết quả nhanh hơn và hiệu suất cao hơn khi phân tích nhiều mẫu, có thể phân tích cả bất thường NST hoặc bất thường gen trên cùng vật liệu ADN tách được. Người ta cũng sử dụng các trình tự STR hoặc Microsatellite để kiểm soát sự nhiễm chéo hoặc sự mất alen trong phản ứng PCR.

Nhược điểm của kỹ thuật này là không phân tích được các trường hợp thể khảm, chuyển đoạn, chiếm khoảng 5% tổng số các trường hợp bất thường NST thường gặp và có thể bị hiện tượng mất alen. Vì vậy, nếu phát triển được kỹ thuật QF-PCR trong PGD sẽ có cơ hội phân tích cả bất thường NST, trong khi vẫn phân tích được cả đột biến gen.

Kỹ thuật lai so sánh bộ gen (CGH= Comparative Genome Hybridization)

Bao gồm hai loại Array-CGH và Metaphase-CGH. Kỹ thuật này có thể đánh giá bất thường với cả 24 NST, trong khi kỹ thuật FISH chỉ đánh giá được một số NST. CGH sử dụng toàn bộ hệ gen như là một đầu dò đánh dấu và một kiểu nhân ở kỳ giữa được gắn trên một slide hiển vi với tư cách là đích. ADN hệ gen từ các tế bào bình thường được đánh dấu màu huỳnh quang và ADN hệ gen từ các tế bào khối u được đánh dấu một màu huỳnh quang khác, sau đó cả hai được trộn lẫn và lai ghép với nhau để đích các NST. Các vùng của NST đích sẽ hiện lên với những khác biệt về huỳnh quang giữa 2 màu và cho thấy sự khác biệt về số bản sao giữa hệ gen khối u và hệ gen bình thường, đồng thời cũng

cho thấy cả những đứt đoạn và khuếch đại. CGH đã trở thành một phương pháp chuẩn mực cho việc phân tích di truyền tế bào từ đầu những năm 90 của thế kỷ trước.

Các ứng dụng của chẩn đoán di truyền tiền làm tổ

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ có thể được chia làm 2 loại chính:

- Chẩn đoán bất thường NST: sử dụng kỹ thuật FISH, có thể chẩn đoán các bệnh liên quan đến NST như: hội chứng Down, hội chứng Patau (Trisomy 13), hội chứng Edwards (Trisomy 18), hội chứng Klinefelter (XXY).

- Chẩn đoán bất thường về gen: sử dụng kỹ thuật PCR có thể chẩn đoán được gần 200 bệnh đơn gen khác nhau, ví dụ bệnh Thalassemia, bệnh teo cơ tủy (Spinal muscular atrophy - SMA).

PGD có nhiều ưu điểm so với chẩn đoán tiền sản thông thường. *Thứ nhất*, có thể tránh được việc phải chấm dứt thai kỳ, bỏ thai. Việc chấm dứt thai kỳ khi phát hiện bệnh lý chẩn đoán tiền sản gặp phải các vấn đề về đạo đức sinh học, cũng như về sức khỏe, di chứng thể chất và tinh thần của người mẹ. *Thứ hai*, đây là một kỹ thuật thích hợp với các cặp vợ chồng bị chuyển đoạn NST, giúp loại trừ khả năng chuyển đoạn không cân xứng (unbalanced translocations) xuất hiện ở thai nhi, thường dẫn đến sảy thai liên tiếp. *Thứ ba*, thích hợp cho các cặp vợ chồng có nguy cơ sinh ra trẻ bị các bệnh lý thường gặp có nguyên nhân di truyền là gen lặn hay trội. *Thứ tư*, các cặp vợ chồng không chỉ có nhu cầu sinh con không bị bệnh mà còn có hệ HLA phù hợp để có thể sử dụng máu cuống rốn điều trị cho anh hoặc chị lớn đã có bệnh lý di truyền.

Tại Việt Nam, được sự hỗ trợ của Chương trình khoa học công nghệ cấp nhà nước KC10/11-15, Học viện Quân y đã và đang triển khai đề tài Nghiên cứu quy trình chẩn đoán một số bệnh di truyền trước chuyển phôi để sàng lọc phôi TTTON (mã số KC10.35/11-15), do GS.TS Nguyễn Đình Tảo làm chủ nhiệm. Đề tài được thực hiện trên bệnh nhân Thalassemia và SMA (teo cơ tủy) với những kết quả đáng ghi nhận.

Kết luận

PGD đã và đang trở thành một kỹ thuật phổ biến trong lĩnh vực di truyền và hỗ trợ sinh sản trên thế giới. Mục đích của PGD là tạo ra những thai kỳ mà thai nhi không bị các bất thường về gen và NST được tầm soát. Kỹ thuật thực hiện PGD ngày càng đơn giản, chính xác. Điều này giúp mở rộng các chỉ định của PGD nhằm loại trừ việc cấy các phôi có bất thường về gen hoặc NST vào tử cung.

Kỹ thuật PGD gắn liền với các kỹ thuật hỗ trợ sinh sản. Gần đây, ngành hỗ trợ sinh sản ở Việt Nam đã có những bước tiến lớn và theo kịp trình độ các nước trong khu vực trong hầu hết các kỹ thuật. Sự kết hợp giữa hỗ trợ sinh sản và chẩn đoán di truyền để triển khai kỹ thuật PGD ở Việt Nam có thể sẽ là một bước phát triển tiếp theo của ngành y để theo kịp sự phát triển của y học thế giới.

Chẩn đoán di truyền tiền làm tổ PGD là kỹ thuật sàng lọc di truyền, chỉ chọn những phôi khỏe mạnh trước khi cấy phôi vào buồng tử cung, không ảnh hưởng tới sức khỏe bà mẹ. Vì vậy, PGD là một trong những yêu cầu quan trọng, cấp thiết và thực tiễn, có tính nhân văn. Nguyên tắc kỹ thuật của PGD dựa trên việc thực hiện TTTON để tạo phôi, sau đó sinh thiết phôi và sàng lọc gen.

Tại Việt Nam, triển vọng trong 5 năm tới, PGD sẽ được áp dụng rộng rãi ở nhiều trung tâm thụ tinh ống nghiệm như Bệnh viện Phụ sản Trung ương, Bệnh viện Phụ sản Từ Dũ, Trung tâm Di truyền - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP Hồ Chí Minh và có thể sàng lọc nhiều bệnh di truyền khác nhau, hy vọng sẽ mang lại hạnh phúc vô bờ bến cho những cặp vợ chồng khi có cơ hội có những đứa con khỏe mạnh.

Tài liệu tham khảo

1. Trương Đình Kiệt, Hồ Mạnh Tường (2011), *Thiết lập quy trình kỹ thuật trong chẩn đoán di truyền tiền làm tổ các phôi TTTON*.
2. Nguyễn Việt Tiến (2012), *Nghiên cứu quy trình chẩn đoán một số bệnh di truyền trước chuyển phôi để sàng lọc phôi TTTON*.

3. Devolder K (2005), "Preimplantation HLA typing: having children to save our loved ones", *Journal of Medical Ethics*, **31**, 582-586.
4. Desono P, Staessen C, Fauser B and Devroey P (2007), "Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF", *Human Reproduction Update*, **13**, 15-25.
5. Grace J, Toukhy T and Braude P (2004), "Preimplantation genetic testing", *British Journal of Obstetrics and Gynecology*, **111**, 1165-1173.
6. Handyside A.H, Kontogiani E.H, Hardy K, Winston R.M.L (1990), "Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification", *Nature*, **344**, 768-70.
7. Katz M Fitzgerald, Bankier A et al (2002), "Issues and concern of couples presenting for PGD", *Prenatal Diagnosis*, **22**, 1117-1122.
8. Kuliev A, Verlinsky Y (2002), Current features of preimplantation genetic diagnosis", *Reprod Biomed Online*, **5**, 296-301.
9. Kuliev A and Verlinsky Y (2007), "Preimplantation genetic diagnosis: technological advances to improve accuracy and range of applications", *RBM online*, **16(4)**, 532-538.
10. Lalioti M (2008), "Can preimplantation genetic diagnosis overcome recurrent pregnancy failure?", *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, **20**, 199-204.
11. Munne S, Ary J, Zouves C et al (2006), "Wide range chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors", *Reprod Bio online*, **12**, 340-6.
12. Practice Committee of SART and Practice Committee of ASRM (2007), "Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion", *Fertility Sterility*, **88**, 1497-1504.
13. Rechitsky S, Verlinsky O, Chistokina A, Sharapova T, Ozen S, Masciangelo C et al (2002), "Preimplantation genetic diagnosis for cancer predisposition", *Reprod Biomed online*, **5**, 148-55.