

# Γέννηση ύστερα από βιοψία πολικών σωματίων και προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο για ανευπλοειδία με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA

Οικονόμου Α. Κ.<sup>1</sup>, Χριστόπικου Δ.<sup>1</sup>, Τσορβά Ε.<sup>1</sup>, Handyside Η.Α.<sup>2</sup>, Καζλαρής Ε.Χ.<sup>1</sup>, Davies Σ.<sup>1</sup>, Μαστρομηνάς Μ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Μονάδα Ιατρικής Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής "ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΙΣ", Κηφισίας 49 & Ζηρίδη, 15123 Μαρούσι.

<sup>2</sup> The London Bridge Fertility, Gynaecology and Genetics Centre, London, United Kingdom

Αλληλογραφία: Κωνσταντίνος Α. Οικονόμου

Εμβρυογένεσις, Κηφισίας 49 & Ζηρίδη, 15123 Μαρούσι.

Τηλέφωνο 2106104682, Fax 2106104688, E-mail: keconomou@gmail.com

## Περίληψη

Ασθενής με ιστορικό επανειλημμένων αποτυχιών σε προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης υποβλήθηκε σε προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο της ανευπλοειδίας στα ωάρια με συγκριτικό γονιδιωματικό υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες DNA. Χρησιμοποιήθηκαν ωάρια, των οποίων η ευπλοειδία ελέγχθηκε για όλα τα χρωμοσώματα, με βιοψία του πρώτου και δεύτερου πολικού σωματίου, αποφεύγοντας έτσι τη χρήση ωαρίων δότριας. Από τη μεταφορά τριών εμβρύων επιτεύχθηκε δίδυμη κλινική κύηση. Δύο υγιή νεογνά (ένα άρρεν, ένα θήλυ) γεννήθηκαν πρόωρα κατά την 33η εβδομάδα κύησης, με καισαρική τομή, λόγω της ανάπτυξης συμπτωμάτων τοξαιμίας. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά γέννησης με την εφαρμογή της εν λόγω μεθόδου στην Ελλάδα.

Λέξεις κλειδιά: προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος (PGS), συγκριτικός γονιδιωματικός υβριδισμός σε μικροσυστοιχίες DNA (a-CGH), βιοψία πολικών σωματίων, εξωσωματική γονιμοποίηση

## Εισαγωγή

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (pre-implantation genetic diagnosis, PGD<sup>1,2</sup>) και ο προεμφυτευτικός γενετικός έλεγχος (pre-implantation genetic screening, PGS) είναι τεχνικές μέθοδοι ανίχνευσης γενετικών χαρακτηριστικών, οι οποίες εφαρμόζονται σε έμβρυα πριν τη μεταφορά τους στη μήτρα, ή ακόμη και σε ωάρια πριν τη γονιμοποίηση. Ο PGS εφαρμόζεται κυρίως για την ανίχνευση ανευπλοειδίας σε υλικό βιοψίας, είτε ωαρίου (πρώτο και δεύτερο πολικό σωματίο), είτε εμβρύου στο στάδιο της αυλάκωσης (3ης ημέρας / 8 κυττάρων, βιοψία βλαστομεριδίου), ή στο στάδιο της βλαστοκύστεως (5η ή 6η ημέρα, βιοψία τροφοεξωδέρματος).

Σε ειδικές κατηγορίες ασθενών, η επιλογή και μεταφορά στη μήτρα ευπλοειδών εμβρύων αναμένεται να αυξάνει τα ποσοστά επιτυχίας στην εξωσωματική γονιμοποίηση, αφού είναι γνωστό εδώ και δεκαετίες ότι η πλειονότητα των εμβρύων φέρει χρωμοσωματικές ανωμαλίες και αυξημένα ποσοστά μωσαϊκισμού. Για παράδειγμα, η εφαρμογή PGS αναμένεται να προσφέρει τη δυνατότητα σε γυναίκες ηλικίας άνω των 40 ετών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μειωμένη γονιμότητα, ή γυναίκες με πολλαπλές ανεξήγητες αποτυχίες στην εξωσωματική γονιμοποίηση, ή με καθ' εξιν αποβολές πρώτου τριμήνου, να τεκνοποιήσουν με αποδεκτή πιθανότητα επιτυχίας.

Στην περίπτωση ελέγχου βλαστομεριδίων από έμβρυα στο στάδιο της αυλάκωσης ελέγχεται η ευπλοειδία του εμβρύου, αλλά όχι ο μωσαϊκισμός, ενώ η βιοψία τροφοεξωδέρματος στηρίζεται στην αμφισβητούμενη παραδοχή ότι τα λαμβανόμενα κύτταρα έχουν χρωμοσωματική σύσταση αντιπροσωπευτική του συνόλου του κυρίως εμβρύου (έσω κυτταρικής μάζας). Για τους παραπάνω λόγους, η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (ESHRE) προκρίνει, ως πιο πρόσφορη στρατηγική για PGS, τη βιοψία πολικών σωματίων (πρώτου και δεύτερου)<sup>3,4</sup>, κάτι που επιτρέπει την ανίχνευση της ανευπλοειδίας στο ωάριο. Η μέθοδος του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού (comparative genomic hybridisation, CGH) χρησιμοποιήθηκε αρχικώς για την ανάλυση ανευπλοειδίων σε κύτταρα συμπαγών όγκων<sup>5</sup>, αλλά η εφαρμογή γρήγορα επεκτάθηκε σε μοναδιαία κύτταρα αμνιακού υγρού και σε βλαστομερίδια<sup>6</sup>. Την τελευταία δεκαετία, διεθνώς, έχει ανακοινωθεί η γέννηση υγιούς τέκνου ύστερα από PGS σε βλαστομερίδια<sup>7</sup> και η πρώτη κλινική εφαρμογή PGD για την ανίχνευση ανευπλοειδίας σε πολικά σωματίδια για όλα τα χρωμοσώματα<sup>8</sup>. Παράλληλα αναπτύχθηκε και η τεχνολογία του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA, γνωστή πλέον ως “array-GCH” (a-CGH), αρχικώς για ομάδες καρκινωμάτων κύτταρων<sup>9</sup> και μετέπειτα για μεμονωμένα κύτταρα<sup>10</sup>, ανοίγοντας το δρόμο για την εφαρμογή σε υλικό βιοψίας από ανθρώπινα έμβρυα. Ειδικότερα, η ανάλυση με a-CGH ύστερα από βιοψία πολικών σωματίων για τον προεμφυτευτικό έλεγχο της ευπλοειδίας των ωαρίων επέτρεψε πολύ πρόσφατα τη γέννηση υγιούς τέκνου από μια γυναίκα 41 ετών, με ιστορικό 13 αποτυχημένων κύκλων εξωσωματικής γονιμοποίησης<sup>11</sup>.

Η μέθοδος a-CGH εφαρμόζεται στη Μονάδα μας για τον έλεγχο της ανευπλοειδίας σε βλαστομερίδια εδώ και ένα περίπου έτος<sup>12</sup>. Στην παρούσα μελέτη, ανακοινώνουμε την πρώτη γέννηση στην Ελλάδα ύστερα από έλεγχο της ευπλοειδίας ωαρίων σε βιοψίες πολικών σωματίων και γενετική ανάλυση με a-CGH.

## Ιστορικό

Η περίπτωση αφορά ασθενή, ηλικίας 36 ετών, με ιστορικό υποθυρεοειδισμού και πρωτοπαθούς υπογονιμότητας ανεξήγητης αιτιολογίας. Ο καρύοτυπος της ασθενούς και του συζύγου της είναι φυσιολογικός. Η ασθενής είχε υποβληθεί σε 4 ανεπιτυχείς προσπάθειες εξωσωματικής γονιμοποίησης σε

άλλη Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής εντός της προηγούμενης διατίας. Στις προσπάθειες αυτές, η διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας είχε επιτευχθεί με χρήση του μακρού πρωτοκόλλου (συναγωνιστής της GnRH και γοναδοτροπίνες), οπότε είχαν ληφθεί 4, 2, 6 και 1 ωάρια ανά προσπάθεια, εκ των οποίων είχαν γονιμοποιηθεί αντιστοίχως 2, 1, 3 και 1, τα οποία και είχαν μεταφερθεί, χωρίς επιτυχία κήσεως. Βάσει του ιστορικού αυτού, η ασθενής είχε καταταγεί ως πτωχή αποκρίτρια (“poor responder”) στην αγωγή με γοναδοτροπίνες και, δεδομένων των επανειλημμένων αποτυχιών, η επόμενη θεραπευτική πρόταση ήταν η δωρεά ωαρίου.

## Εξωσωματική γονιμοποίηση

Στην Μονάδα μας, αφού ενημερώθηκε και χορήγησε την προβλεπόμενη συναίνεση, η ασθενής υπεβλήθη αρχικώς σε ένα κύκλο διέγερσης της ωοθηκικής λειτουργίας με διαφορετικό πρωτόκολλο (ανταγωνιστής της GnRH και γοναδοτροπίνες), το οποίο απέδωσε συνολικά 5 ωάρια. Δύο εξ αυτών ήταν άωρα, στα υπόλοιπα 3 πραγματοποιήθηκε γονιμοποίηση με ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI)<sup>13</sup> και γονιμοποιήθηκαν 2, τα οποία και μεταφέρθηκαν. Η προσπάθεια κατέληξε σε βιοχημική κήση. Μετά την παρέλευση 4 μηνών, η ασθενής υπεβλήθη σε νέο κύκλο αγωγής με το ίδιο πρωτόκολλο, κατά τον οποίο ελήφθησαν 4 ωάρια, πλην όμως όλα από τη δεξιά ωοθήκη. Ένα μόνο ήταν άωρο, τα υπόλοιπα 3 γονιμοποιήθηκαν με ICSI και μεταφέρθηκαν 3 έμβρυα, χωρίς επιτυχία.

Στη συνέχεια, η ασθενής εντάχθηκε στο πρόγραμμα προεμφυτευτικού γενετικού ελέγχου, πρώτον, για να διαγνωσθεί το γενικό ποσοστό ανευπλοειδίων στα ωάρια της και δεύτερον, για να χρησιμοποιηθούν για εμβρυομεταφορά μόνον έμβρυα προερχόμενα από ευπλοειδή ωάρια, ώστε να αποφευχθεί η προσφυγή στη λύση της δωρεάς ωαρίου. Η ασθενής υπεβλήθη σε μία ακόμη διέγερση της ωοθηκικής λειτουργίας με το πρωτόκολλο του ανταγωνιστή της GnRH, η οποία απέδωσε 4 ωάρια: μετά την απομάκρυνση των κοκκοειδών κυττάρων, διαπιστώθηκε ότι τα ωάρια αυτά βρισκόνταν σε μετάφαση της 2ης μειωτικής διαίρεσης. Διενεργήθηκε αρχικώς βιοψία του πρώτου πολικού σωματίου (βλ. περιγραφή της τεχνικής στην επόμενη παράγραφο) και ύστερα μικρογονιμοποίηση με ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (ICSI). Όλα τα ωάρια γονιμοποιήθηκαν επιτυχώς, εκβάλλοντας το δεύτερο πολικό σωματίο εντός 18 ωρών. Μετά τη

βιοψία των δεύτερων πολικών σωματίων, τα έμβρυα τοποθετήθηκαν εκ νέου σε καλλιέργεια. Η γενετική ανάλυση των πολικών σωματίων με την τεχνική του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού σε μικροσυστοιχίες DNA (a-CGH) δεν κατέδειξε ανευπλοειδία. Την 3η ημέρα, 2 έμβρυα (ένα 8 κυττάρων βαθμίδας 1 και ένα 6 κυττάρων βαθμίδας 2) μεταφέρθηκαν στη μητρική κοιλότητα, τα άλλα δύο (10 κυττάρων, βαθμίδας 2, χωρίς θρυμματισμό) καταψύχθηκαν με υαλοποίηση<sup>14</sup>. Από την εμβρυομεταφορά αυτή δεν επιτεύχθηκε κύηση.

Τον μεθεπόμενο μήνα, και επειδή ο αριθμός των κρουσυντηρημένων εμβρύων κρίθηκε ανεπαρκής, η ασθενής υπεβλήθη σε εξωσωματική γονιμοποίηση σε φυσικό κύκλο, κατά τον οποίο ελήφθησαν 2 ωάρια: σε αυτά διενεργήθηκε βιοψία του πρώτου πολικού σωματίου και ICSI, γονιμοποιήθηκε δε το ένα, στο οποίο διενεργήθηκε βιοψία του δεύτερου πολικού σωματίου. Με την τεχνική a-CGH διαπιστώθηκε ότι τα δύο πολικά σωματία ήταν ευπλοειδή. Την 3η ημέρα καλλιέργειας, το εν λόγω έμβρυο βρισκόταν στο στάδιο των 7 κυττάρων, βαθμίδας 2, χωρίς θρυμματισμό. Αποψύχθηκαν και τα δύο κρουσυντηρημένα έμβρυα της προηγούμενης προσπάθειας και διενεργήθηκε εμβρυομεταφορά των τριών αυτών εμβρύων.

### Βιοψία πολικών σωματίων

Στην προεμφυτευτική γενετική διαγνωστική, γενικώς, η προετοιμασία των ωαρίων έχει ιδιαίτερη σημασία: πρέπει να αφαιρεθούν επιμελώς όλα τα κοκκοειδή κύτταρα, προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση των βιοψιών με μητρικό DNA, η δε γονιμοποίηση να γίνει με ICSI, ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση με πατρικό DNA από σπερματοζώαρια, προσδεδεμένα στη διαφανή ζώνη. Η βιοψία του πολικού σωματίου πραγματοποιείται μέσω μιας σχισμής, η οποία διανοίγεται στη διαφανή ζώνη του ωαρίου μηχανικά<sup>15</sup>. Τα υλικά (τρυβλία, έλαιο υπερκάλυψης καλλιεργειών, μικροεργαλεία κ.λπ.) έχουν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να καταστραφεί το εξωγενές DNA, ο δε χειριστής οφείλει να φορά προστατευτικά μέσα (μάσκα, γάντια κ.λπ.), προκειμένου να αποφευχθεί επιμόλυνση των δειγμάτων με δικό του DNA.

Για τη βιοψία χρησιμοποιείται το σύστημα μικροχειρισμού με αέρα SAS-SE (Research Instruments, Ην. Βασίλειο), στο οποίο προσαρμόζονται, στο ένα χειριστήριο, ένα υάλινο μικροσιφώνιο συγκράτησης και στο άλλο χειριστήριο (Narishige HD-21 06017), μία υάλινη μικροβελόνη μερικής ανατομής

της διαφανούς ζώνης (partial zona dissection, PZD) και ένα μικροσιφώνιο αναρρόφησης, εσωτερικής διαμέτρου 15-16 μm.

Τα ωάρια τοποθετούνται ανά ένα σε τρυβλία (Falcon, BD Biosciences) που περιέχουν σταγόνες 15 μl καλλιεργητικού μέσου HTF-10% SPS (SAGE, Η.Π.Α.), οι οποίες υπερκαλύπτονται με έλαιο παραφίνης. Το ώριμο ωάριο (που βρίσκεται σε μετάφραση της 2ης μειωτικής διαίρεσης και έχει εκβάλει το πρώτο πολικό σωματίο) τοποθετείται σε μία σταγόνα καλλιεργητικού μέσου. Αφού το ωάριο ακινητοποιηθεί με μικρή αναρρόφηση μέσω του μικροσιφωνίου συγκράτησης, με το πολικό σωματίο προσανατολισμένο στη 12η ώρα και ελαφρώς εκτός εστίασης, η μικροβελόνη PZD εισάγεται στη διαφανή ζώνη από την 1-2η ώρα προς την 10-11η ώρα, διαπερνώντας το περιεπιθητικό διάστημα παράλληλα με το τοίχωμα του μικροσιφωνίου συγκράτησης. Τότε, ο χειριστής απελευθερώνει το ωάριο από το μικροσιφώνιο συγκράτησης, ενώ αυτό παραμένει καθηλωμένο στη μικροβελόνη, και το μετακινεί προς την 6η ώρα του πεδίου, ώστε η διαφανής ζώνη να έρθει σε επαφή με το εξωτερικό τοίχωμα του μικροσιφωνίου συγκράτησης. Με μικρή πίεση της μικροβελόνης στο μικροσιφώνιο συγκράτησης, μια σχισμή πλάτους περίπου 1 μm διανοίγεται στη διαφανή ζώνη και το ωάριο απελευθερώνεται. Στη συνέχεια, το ωάριο ακινητοποιείται εκ νέου, εστιάζοντας στο πολικό σωματίο και προσανατολιζοντάς το κατά τη 2η ώρα, το μικροσιφώνιο αναρρόφησης εισάγεται διά μέσου της σχισμής στο περιεπιθητικό διάστημα και η βιοψία πραγματοποιείται με μικρή αναρρόφηση.

Στη συνέχεια, το πολικό σωματίο μεταφέρεται σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρου που περιέχει 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), μέσω ειδικού στείρου μικροσιφωνίου (Ινστιτούτο RGI, Σικάγο, Η.Π.Α.), μέσα σε ελάχιστο όγκο (περίπου 0,5 μl) καλλιεργητικού μέσου. Ένα δεύτερο μικροσιφώνιο χρησιμοποιείται για τη μεταφορά παρόμοιου όγκου μέσου σε άλλο σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (αρνητικός μάρτυρας). Τα δύο δείγματα παραδίδονται στο εργαστήριο μοριακής γενετικής για ανάλυση με την τεχνική a-CGH, όπως αυτή περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο.

Για τη βιοψία του δεύτερου πολικού σωματίου των διπλοειδών ζυγωτών ακολουθείται παρόμοια τεχνική, χρησιμοποιείται δε η υπάρχουσα σχισμή στη διαφανή ζώνη.

## Γενετική ανάλυση με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών DNA (a-CGH)

Για την ανάλυση των 23 ζευγών χρωμοσωμάτων χρησιμοποιείται η πλατφόρμα μικροσυστοιχιών BAC (24Sure+, BlueGnome Ltd, Cambridge, Ην. Βασίλειο). Στόχος είναι ο έλεγχος για διπλασιασμούς και ελλείψεις ολόκληρων χρωματοσωμάτων, ή τμημάτων τους. Η γενετική ανάλυση διενεργείται σε μικροσυστοιχίες υψηλής ανάλυσης CytoChip 3.0 (BlueGnome). Η εν λόγω μικροσυστοιχία καλύπτει το ανθρώπινο γονιδίωμα ανά 2-5 Mbp, συμπεριλαμβανομένων των υποτελομεριδιακών και περικεντρομεριδιακών περιοχών.

Αρχικώς, είναι απαραίτητο να πολλαπλασιασθεί το ολικό γονιδίωμα, προκειμένου να δημιουργηθεί, από ένα κύτταρο, ικανή ποσότητα DNA για υβριδισμό σε μικροσυστοιχίες. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται σε τυχαίο κατακερματισμό του γονιδιωματικού DNA και επακόλουθη ενίσχυση του DNA δείγματος και μάρτυρα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), με τη βοήθεια κιτ πολλαπλασιασμού του ολικού γονιδιώματος (SurePlex, BlueGnome). Από το προϊόν της PCR, περίπου 3 μg DNA δείγματος και μάρτυρα σημαίνονται επί 2 ώρες με τις φθορίζουσες χρωστικές Cy3 και Cy5 αντιστοίχως, χρησιμοποιώντας το σύστημα σήμανσης φθορισμού (BlueGnome) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα σημασμένα DNA δείγματος και μάρτυρα εφαρμόζονται στη μικροσυστοιχία και συνυβριδοποιούνται επί μία νύκτα. Στη συνέχεια, οι μικροσυστοιχίες πλένονται επί 10 λεπτά σε 2×SSC (ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου-κιτρικού νατρίου) που περιέχει 0,05% Tween-20 και επί 10 λεπτά σε 1×SSC, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν δύο περαιτέρω πλύσεις σε 0,1×SSC, μία επί 5 λεπτά στους 60°C και μία επί 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, οι μικροσυστοιχίες ξηραίνονται σε φυγόκεντρο κενού (3 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου, υψηλή ταχύτητα) και τοποθετούνται στον σαρωτή (Innoscan710, Innopsys, Γαλλία). Οι εικόνες αναλύονται με το λογισμικό BlueFuse (BlueGnome). Η ακρίβεια της μεθόδου a-CGH για το DNA πολικών σωματίων είναι 98%. Αναφέρεται χρωμοσωματική ανωμαλία όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία<sup>16</sup> εάν 15 ή περισσότεροι ανιχνευτές εμφανίσουν απόκλιση από τα φυσιολογικά όρια της πλατφόρμας CytoChip 3.0.

## Έκβαση

Ο προσδιορισμός της β-χοριακής γοναδοτροπίνης

την 14η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά έδειξε την παρουσία κνήματος (400 mIU/ml). Η κύηση επιβεβαιώθηκε με διακολπικό υπερηχογράφημα στις 8 εβδομάδες (οπότε διαπιστώθηκε η παρουσία δύο σάκων κνήσεως σε ενδομήτρια θέση, με εμβρυϊκά στοιχεία και καρδιακή λειτουργία σε αμφότερα τα έμβρυα) και εξελίχθηκε ομαλά μέχρι την 33η εβδομάδα, οπότε η ασθενής εμφάνισε συμπτώματα τοξαιμίας. Ως εκ τούτου, κρίθηκε επιβεβλημένος ο πρόωρος τοκετός, με καισαρική τομή, κατά τον οποίο γεννήθηκαν δύο υγιή νεογνά: ένα άρρεν (1870 g) και ένα θήλυ (1950 g), αμφότερα με βαθμολογία 10 κατά Apgar.

## Συζήτηση

Η τεχνική a-CGH θεωρείται διεθνώς ως η τελευταία λέξη της τεχνολογίας στον τομέα της προεμφυτευτικής γενετικής διαγνωστικής. Οι εφαρμογές της, τόσο σε υλικό βιοψίας πολικών σωματίων, όσο και βλαστομεριδίων, προσφέρουν στον κλινικό εμβρυολόγο και στον ιατρό ισχυρά εργαλεία για την πρόωμη ανίχνευση δομικών βλαβών και αριθμητικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων. Στην παρούσα μελέτη ανακοινώνεται η πρώτη γέννηση στην Ελλάδα ύστερα από βιοψία πολικών σωματίων και προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο με a-CGH.

Σε επίπεδο μεθοδολογίας, έχει σημασία να τονίσουμε ότι η διάνοιξη της διαφανούς ζώνης με μηχανικό τρόπο αντί της χρήσης laser<sup>17</sup> επιτρέπει την ασφαλή βιοψία και των δύο πολικών σωματίων από την ίδια σχισμή. Παρά το γεγονός ότι για τον ολοκληρωμένο έλεγχο του εμβρύου απαιτείται διπλή βιοψία, η τεχνική αυτή παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου του γονιδιώματος αποφεύγοντας την αφαίρεση ενός ολόκληρου βλαστομεριδίου σε μεταγενέστερο στάδιο ανάπτυξης. Η προσέγγιση αυτή ευθυγραμμίζεται με τη διεθνώς αποδεκτή πρακτική<sup>3</sup>.

Έχουν διατυπωθεί ορισμένες αντιρρήσεις για την κλινική αξία του PGS, στηριζόμενες κυρίως σε ασάφειες της μεθοδολογίας<sup>18</sup> και στη διαφαινόμενη μείωση των ποσοστών εμφύτευσης ύστερα από PGD, όπως προκύπτει από μετα-ανάλυση των δημοσιευμένων μελετών<sup>19</sup>. Ωστόσο, η ορθότητα της διάγνωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ορθή τεχνική βιοψίας καθώς και από την εργαστηριακή ποιότητα της ίδιας της γενετικής ανάλυσης<sup>20</sup>, κάτι που εξηγεί την έλλειψη μεγάλου αριθμού τυχαιοποιημένων προοπτικών μελετών με διασφαλισμένη την απαραίτητη τεχνική επάρκεια, προκειμένου να καταδειχθεί το κλινικό όφελος της μεθόδου. Τα ευρήματα πρόσφατης εργασίας σε μεγαλύτερο

αριθμό περιστατικών<sup>21</sup> ενισχύουν τη χρησιμότητα του προεμφυτευτικού ελέγχου με χρήση πολικού σωματίου. Στην κλινική αυτή μελέτη, βρέθηκε ότι η χρήση του πρώτου και μόνο πολικού σωματίου σε πρόγραμμα PGS και η μεταφορά ενός και μόνο εμβρύου προερχόμενου από ευπλοειδές ωάριο, αυξάνει τα ποσοστά εμφύτευσης σε ασθενείς με πτωχή πρόγνωση λόγω επανειλημμένων ανεπιτυχών προσπαθειών με εξωσωματική γονιμοποίηση ή επανειλημμένων αποβολών.

Η αξία όμως της τεχνικής που ανακοινώνουμε στην παρούσα εργασία, δηλαδή η βιοψία και των δύο πολικών σωματίων, ενισχύεται με βάση τα ευρήματα πρόσφατης κλινικής περίπτωσης<sup>22</sup>. Στο κλινικό περιστατικό που περιγράφεται<sup>22</sup> υπογραμμίζεται ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που μπορεί να προκύψουν από την ανάλυση του πρώτου πολικού σωματίου, είναι δυνατόν να εξισορροπούνται από την ανάλυση του δεύτερου πολικού σωματίου και έτσι τελικά το ωάριο να προκύπτει χρωμοσωμικώς υγιές. Πιο συγκεκριμένα, οι μελετητές που περιέγραψαν το κλινικό περιστατικό (Scott et al., 2012) παρουσιάζουν τη γέννηση χρωμοσωμικώς υγιούς τέκνου μετά από βιοψία και των δυο πολικών σωματίων ωαρίου, από τα οποία στο πρώτο προέκυψε η έλλειψη μιας χρωματίδας του χρωμοσώματος<sup>21</sup>, ενώ το δεύτερο πολικό σωματίο παρουσίαζε μια επιπλέον χρωματίδα για το ίδιο χρωμόσωμα. Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το ωάριο που αναλύθηκε και τελικά συντέλεσε στην εγκυμοσύνη και τη γέννηση του υγιούς παιδιού, ήταν χρωμοσωμικώς υγιές, μιας και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αλληλοσυμπληρώνονταν (compensation) στα δυο πολικά του σωματία. Γίνεται φανερό ότι αν είχε πραγματοποιηθεί η βιοψία ενός και μόνο πολικού σωματίου, το ωάριο θα είχε διαγνωσθεί εσφαλμένα ως χρωμοσωμικώς ανώμαλο. Επιβεβλημένη φαίνεται να είναι λοιπόν η βιοψία και των δυο πολικών σωματίων, όπως περιγράφουμε στο δικό μας κλινικό περιστατικό.

Τέλος, αναμένεται ότι η διεθνής πολυκεντρική μελέτη της ESHRE, καθώς και οι οδηγίες βέλτιστης πρακτικής που εκδόθηκαν πρόσφατα<sup>23</sup> θα εδραιώσουν προοδευτικά την εμπιστοσύνη στη μέθοδο PGS, κάτι που μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την απόδοση των προγραμματιών ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ενώ η βιοψία και των δυο πολικών σωματίων για τη χρωμοσωμική ανάλυση των ωαρίων αναμένεται να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο για τον προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο.

## Live birth after polar body biopsy and preimplantation genetic screening of aneuploidy by DNA-microarray comparative genomic hybridisation

Economou K.<sup>1</sup>, Christopikou D.<sup>1</sup>, Tsorva E.<sup>1</sup>, Handyside A.<sup>2</sup>, Cazlaris H.<sup>1</sup>, Davies S.<sup>1</sup>, Mastrominas M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>“EMBRYOGENESIS” Assisted Conception Unit, 49 Kifissias & Ziridi st., 15123 Marousi, Athens, Greece

<sup>2</sup>The London Bridge Fertility, Gynaecology and Genetics Centre, London, United Kingdom

Correspondence: Konstantinos A. Economou  
Embryogenesis, 49 Kifissias & Ziridi st.,  
15123 Marousi, Athens, Greece  
Tel.: +30 2106104682, Fax: +30 2106104688,  
E-mail: keconomou@gmail.com

### Summary

A patient with a history of several failed IVF attempts was subjected to preimplantation genetic screening of aneuploidies by DNA microarray comparative genomic hybridisation (a-CGH). Oocytes that had been screened and found chromosomally euploid after biopsy of the first and second polar bodies were used, thereby avoiding the use of donated oocytes. A twin clinical pregnancy was achieved after transferring three embryos, and two healthy children (one male, one female) were delivered prematurely by caesarian section at 33 weeks' gestation, due to development of pre-eclampsia symptoms. This is the first report of birth after application of polar bodies screening by a-CGH in Greece.

*Key words:* preimplantation genetic screening (PGS), DNA microarray comparative genomic hybridisation (a-CGH), polar body biopsy, in vitro fertilisation

### Βιβλιογραφία

1. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, et al. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989;333(8634):347-349.
2. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344(6268):768-770.
3. Geraedts J, Collins J, Gianaroli L, et al. What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! *Hum Reprod* 2010;25(3):575-577.
4. Harton GL, Magli MC, Lundin K, et al. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod* 2011;26(1):41-46.

5. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258(5083):818-821.
6. 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;27(4):1214-1218.
7. Wilton L, Williamson R, McBain J, et al. Birth of a healthy infant after preimplantation confirmation of euploidy by comparative genomic hybridisation. *New Engl J Med* 2001;345(21):1537-1541.
8. Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JDA, Munné S. First clinical application of comparative genomic hybridisation and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* 2002;78(3):543-549.
9. Pinkel D, Segraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridisation to microarrays. *Nat Genet* 1998;20(2):207-211.
10. Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridisation. *Mol Hum Reprod* 2004;10(4):283-289.
11. Fishel S, Gordon A, Lynch C, et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil Steril* 2010;93(3):1006.e7-10.
12. Χριστόπικου Δ, Τσορβά Ε, Οικονόμου ΚΑ, Καζλαρή ΧΕ, Handyside A, Davies S, Μαστρομηγάς Μ. Κύηση ύστερα από προεμφυτευτική διάγνωση αναστροφής χρωμοσώματος X με μικροσυστοιχίες DNA. *Ιατρική* 2011;99(5-6):286-291.
13. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340(8810):17-18.
14. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005;11(5):608-614.
15. Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, et al. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril* 1999;71(2):308-313.
16. 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(6):1560-1574.
17. Macas E, Xie M, Schaufelberger S, et al. Vitrification of human single pronuclear oocytes following two approaches to polar body biopsy. *Reprod Biomed Online.* 2011;22(4):376-381.
18. Twisk M, Mastenbroek S, van Wely M, et al. Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;25(1):CD005291.
19. Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update* 2011;17(4):454-466.
20. Munné S, Wells D, Cohen J. Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. *Fertil Steril* 2010;94(2):408-430.
21. Fishel S, Craig A, Lynch C, et al. Assessment of 19,803 paired chromosomes and clinical outcome from first 150 cycles using array CGH of the first polar body for embryo selection and transfer. *J Fertiliz In Vitro* 2011;1(1): doi: 10.4172/jfiv.1000101.
22. Scott RT Jr, Treff NR, Stevens J, et al. Delivery of a chromosomally normal child from an oocyte with reciprocal aneuploid polar bodies. *J Assist Reprod Genet* 2012; doi: 10.1007/s10815-012-9746-6.
23. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod* 2011;26(1):33-40.