

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Grete-Katariine Kuum

PREIMPLANTATSIOONILINE GENEETILINE DIAGNOSTIKA

Bakalaureusetöö

Juhendaja prof. Ants Kurg, Ph.D.

Tartu

2015

Sisukord

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1 Preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika.....	5
2 Preimplantatsiooniline geneetiline sõeluuring	5
3 Näidustused	6
3.1 Monogeensed haigused.....	7
3.2 Kromosoommutatsioonid.....	8
3.3 Muud näidustused	9
4 Kehaväline viljastamine	10
5 Biopsia.....	12
5.1 Polaarkeha biopsia	13
5.2 Lõigustumisstaadiumi biopsia	13
5.2.1 Mosaiiksus	14
5.3 Trofektodermi (TE) biopsia	15
5.4 Embrüote säilitamine	17
6 Metoodika.....	17
6.1 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	17
6.2 <i>In situ</i> fluorestsentshübridisatsioon (FISH)	19
6.3 Kogu genoomi amplifikatsioon (WGA)	21
6.4 Mikrokiip tehnoloogia	22
6.5 Järgmise põlvkonna sekveneerimine (NGS).....	25
7 Embrüo siirdamine	26
8 Riskid	26
9 Eetika.....	28
ARUTELU	30
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY	33
TÄNUAVALDUSED.....	34
KASUTATUD KIRJANDUS	35
KASUTATUD VEEBILEHED.....	40
LIHTLITSENTS.....	41

KASUTATUD LÜHENDID

aCGH	võrdlev genoomhübridisatsioon mikrokiip tehnoloogiaga (<i>array comparative genomic hybridization</i>)
ADI	alleeli teke (<i>allele drop in</i>)
ADO	alleeli väljalangemine (<i>allele drop out</i>)
CGH	võrdlev genoomhübridisatsioon (<i>comparative genomic hybridization</i>)
DOP-PCR	degenereeruvate oligonukleotiid praimeritega PCR (<i>degenerate oligonucleotide PCR</i>)
FISH	fluorestsents in situ hübridisatsioon (<i>fluorescence in situ hybridisation</i>)
HLA	inimese leukotsüüdi antigeen (<i>human leukocyte antigen</i>)
ICM	sisemine rakumass (<i>inner cell mass</i>)
ICSI	seemneraku intratsütoplasmaatiline süstimine (<i>intracytoplasmic sperm injection</i>)
IVF	kehaväline viljastamine (<i>in vitro fertilization</i>)
LA-PCR	linker-adapter PCR (<i>linker-adaptor PCR</i>)
MDA	mitme nihke amplifikatsioon (<i>multiple displacement amplification</i>)
NGS	järgmise põlvkonna sekveneerimine (<i>next generation sequencing</i>)
PEP	(<i>primer extension preamplification</i>)
PGD	preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika (<i>preimplantation genetic diagnosis</i>)
PGS	preimplantatsiooniline geneetiline sõeluuring (<i>preimplantation genetic screening</i>)
SNP	üksiknukleotiidne polümorfism (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SPF	aeglane külmutamine (<i>slow programmable freezing</i>)
ZP	rebukest (<i>zona pellucida</i>)
TE	trofektoderm (<i>trophectoderm</i>)
WGA	kogu genoomi amplifikatsioon (<i>whole genome amplification</i>)

SISSEJUHATUS

Preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika (PGD) on reproduktiivtehnoloogia, mida kasutatakse kehavälise kunstliku viljastamise (IVF) teel saadud embrüote geneetilise seisundi määramiseks ning geneetiliste haiguste edasikandumise ärahoidmiseks enne embrüote siirdamist emakasse. PGD ja preimplantatsiooniline geneetiline sõeluuring (PGS) on 25 kasutusel olnud aasta jooksul saanud tavapäraseks ning sünnieelsele diagnostikale alternatiivseks kliiniliseks protseduuriks mitmetes IVF kliinikutes üle maailma ning on abiks paljudele päranduvate haiguste kandjatele või viljatusprobleemidega paaridele.

Biopsia meetodit kasutades eemaldatakse pärast kunstlikku viljastamist geneetiliseks testimiseks üks või kaks polaarkeha või embrüonaalrakku. Pärast rakkude eraldamist saab teostada embrüo seisundi määramiseks vajalikud analüüsid ning valida siirdamiseks sobivad embrüod. Kaks peamist geneetiliseks diagnoosimiseks kasutatavat tehnikat on polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) monogeensete haiguste molekulaarseks analüüsiks ja *in situ* fluorestsentshübridisatsioon (FISH) kromosoom-mutatsioonide tsütogeneetiliseks tuvastamiseks. Viimasel ajal on lisandunud ka kogu genoomi amplifikatsiooni etappi (WGA) vajavad uued meetodid, mis võimaldavad hinnata raku kõigi 24 kromosoomi seisundit. Selleks on kasutusele võetud võrdlev genoomhübridisatsioon DNA mikrokiipide (aCGH) või üksiknukleotiidsete polümorfismide mikrokiipide (SNP *array*) abil.

Kuna PGD suureks eeliseks on analüüside läbiviimine enne embrüo siirdamist, mis aitab vältida raseduse katkestamist, on meetod eetilise vaatepunktist vastuvõetavam. Kuigi IVFi ja PGD teostamisega kaasnevad ka teatud riskid nii emale kui embrüole, on just see meetod päranduvate haiguste kandjatele kõige sobivamaks võimaluseks tervete järglaste saamisel.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk on anda ülevaade kliinilises praktikas kasutusel olevast preimplantatsioonilisest geneetilisest diagnostikast ning selle meetoditest.

Märksõnad: kehaväliline viljastamine (IVF), embrüo, biopsia, preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika, preimplantatsiooniline geneetiline sõeluuring

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1 Preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika

Kõrge päranduvate haiguste edasikandumise riskiga paaridel on võimalik loote tervisliku seisundi määramiseks kasutada sünnieelset diagnostikat. Kui aga analüüside käigus selgub, et lootel esineb geneetiline häire, on ainsateks valikuteks sünnitada haige laps või rasedus katkestada. Preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika (PGD) on kasutusel geneetiliste haiguste tuvastamiseks embrüotes, et vältida nende edasikandumist vanematelt järglastele. PGD on kasutusel alternatiivina prenataalsele diagnostikale ning välistab haiguste esinemisel aborti vajaduse. Implanatsioonieelseid analüüse võib pidada prenataalse diagnostika varaseks vormiks ning meetod vajab abistava reproduktiivtehnoloogia osana kunstlikku viljastamist (IVF). PGD eesmärk on tuvastada geneetilisi haigusi tekitavate muutuste esinemine ootsüütides või embrüotes enne raseduse algust ning valida pärast mutatsioonianalüüsi siirdamiseks vaid terved embrüod. (Milachich, 2013; Van der Aa *et al.*, 2013) Implanatsioonieelse geneetilise testimise üldplaani on kujutatud joonisel 1 leheküljel 6.

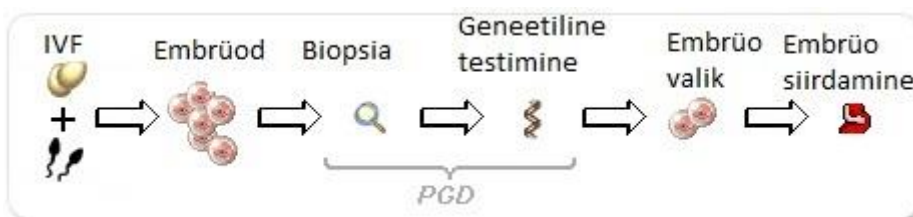
Esimest korda kasutati PGDd aastal 1989 paaril, kellel oli oht anda oma lapsele edasi suguliiteline haigus (Handyside *et al.*, 1990). Kui alguses kasutati PGDd monogeensete ja suguliiteliste haiguste tuvastamiseks, siis aja möödudes laienes meetod kromosomaalsete hälvete ning vanematel esinevate translokatsioonide kindlaks tegemiseks (Milachich *et al.*, 2013). Alates esimestest PGD rakendamistest on analüüsitava haiguste arv kasvanud, täiustunud nii embrüo biopsia tehnikad kui ka geneetilise testimise meetodid. Tänu tehnika arengule on võimalik teostada üha täpsemaid ning kiiremaid analüüse. (Van der Aa *et al.*, 2013)

2 Preimplantatsiooniline geneetiline sõeluuring

Üheks olulisimaks embrüo elujõulisuse mõjutajaks on kromosoomide aneuploidsus. Kromosoomide arvu muutused on inimeses embrüos esimese rakujagunemise jooksul tavalised ning on ühtlasi raseduse katkemise sagedaseks esilekutsujaks. Selle põhjal võiks järeldada, et aneuploidsus on üheks põhjuseks, miks on abistatud reproduktiivtehnoloogia kasutamisel edukate raseduste arv siiski suhteliselt madal. Selline teadmine viis preimplantatsioonilise sõeluuringu (PGS) tehnoloogia väljatöötamiseni, mille eesmärk on parandada edukate raseduste arvu pärast kunstlikku viljastamist jättes siirdamisest kõrvale aneuploidsed embrüod.

(Verlinsky *et al.*, 1995) Kuna PGSiga teostatakse sõeluuringut ning meetod on üldisem, erineb preimplantatsiooniline sõeluuring PGDst. Erinevus seisneb nii kasutatavates meetodites kui embrüol teostatavates analüüsid. Sõeluuringute teostamiseks ei pea perekonnas esinema kindlat geneetilist haigust, seega on analüüsi laialdasemalt kasutatavad. (Iwarsson *et al.*, 2011)

Preimplantatsiooniline geneetiline sõeluuring kontrollib päranduvate haiguste edasikandumise riski puudumisel embrüo geneetilist seisundit eesmärgiga valida siirdamiseks parim embrüo, mis oleks suuteline edukalt implanteeruma. Embrüoid testitakse kõige sagedamini esinevate geneetiliste vigade suhtes, üritatakse tuvastada *de novo* kromosomaalsete aneuploidsuste teket ning ei otsita kindlat haigust. (Harper *et al.*, 2012) Sõeluuringute eesmärgiks on aidata paare, kellel on normaalsed karüotüübid, kuid keda vaevavad viljastumisprobleemid (Van der Aa *et al.*, 2013). PGSiga on võimalik aidata parandada IVFi tulemuslikkust üle 35-aastastel naistel ning tõsta parima kvaliteediga embrüote valimisel implanteerumise efektiivsust. Ühtlasi on võimalik aidata vanemaid, kellel on esinenud spontaanseid raseduse katkemisi ning tõsise isapoolse viljatusteguriga paare. (ESHRE 2001; Ly *et al.*, 2011). Siiski on mitmed kontrollkatsed näidanud, et PGS vanuseriskiga naiste jaoks otseselt pesastumise ega raseduse määra ei paranda (Hardarson *et al.*, 2008; Staessen *et al.*, 2004).



Joonis 1. Preimplantatsiooniline geneetiline testimine. Pärast kehavälilist viljastamist eemaldatakse embrüotelt geneetilise materjali saamiseks rakud. Seejärel teostatakse analüüsid ning valitakse sobilikud embrüod emakasse siirdamiseks. (www.ingender.com)

3 Näidustused

PGD abiga saab diagnoosida kahte põhilist päranduvate vigade rühma: monogeensed haigused ja kromosoommutatsioonid. Monogeensed haigused võivad mõjutada nii sugukromosoomi kui ka autosoomi, mille puhul saab eristada autosoom-dominantset, -retsessiivset või X-liitelist pärandumismustrit. (Harper *et al.*, 2012) Lisaks on võimalik teostada mitte-meditsiinilist

soovalikut, tuvastada mutatsioone, mis võivad soodustada kindlate haiguste tekkimist (nagu rinnavähk), tuvastada hilise avaldumisega neurodegeneratiivseid haigusi ning viia läbi HLA (human leukocyte antigen) sobitamine (Asscher *et al.*, 2010; Bellavia *et al.*, 2010) Kõigest hoolimata kaasnevad viimastega eetilised mured ning neid võib pidada vastuolulisteks (Pennings *et al.*, 2003).

3.1 Monogeensed haigused

Kasutusel olnud aastate jooksul on PGDd rakendatud mitmete monogeensete haiguste tuvastamiseks ning PGD analüüside teostamise eeldus on, et otsitav geeni mutatsioon perekonnas esineks. Monogeensed haigused võivad mõjutada nii sugukromosoomi kui ka autosoomi autosoomdominantse, -retsessiivse või X-liitelise pärandumisega. (Harper *et al.*, 2012) Monogeensed haigused päranduvad erinevate mustrite alusel, andes seega perekonnas taasesinemiseks erineva tõenäosuse. Kui monogeenne haigus on autosomaal-retsessiivne, peavad lapse haigestumiseks olema mõlemad vanemad vähemalt vigase geeni kandjad. (Iwarsson *et al.*, 2011) Tüüpiliseks näiteks on tsüstiline fibroos, mille esinemise tõenäosus, kui mõlemad vanemad on kandjad, on 25 %. Autosomaal-dominantse haiguse korral on üks vanematest haige ning tõenäosus järglase haigestumiseks on 50 %. (Egozcue *et al.*, 2000) X-liiteliste retsessiivsete haiguste puhul on naissoost kandjal 25% võimalus sünnitada haige laps ning lisaks võivad 50 % tütardest olla haiguse kandjad. Suur osa patsiente saab enda või partneri genoomis esinevatest geneetilistest mutatsioonidest teadlikuks alles haige lapse sünni või pereliikmete geneetilise testimisega juhul, kui autosomaal-dominantne haigus ei ole ühes partneritest avaldunud või diagnoositud (Pensée *et al.*, 2014).

PGD abiga on võimalik tuvastada tervet rida monogeenseid haigusi nagu näiteks tsüstiline fibroos, Tay-Sachs'i sündroom, sirprakuline aneemia ja Huntingtoni tõbi. Tsüstiline fibroos oligi esimene monogeenne haigus, mille tuvastamiseks PGDd kasutati. Selliste haiguste puhul tuvastatakse viga PCRi meetodil alleelspetsiifiliste praimeritega olles eelnevalt paljundanud üksikraku DNA. (Geraedts *et al.*, 2009) Siiski on mõnedel haigustel mitmeid teadaolevaid mutatsioone. Kõiki neist ei testita, seega ei saa ka pärast PGDd olla 100% kindel haiguse mitte-esinemises. Patsiendid, kellel haigus ei esine, võivad siiski olla kandjad ning harvade mutatsioonide testimata jätmise tõttu püsib oht anda haigust põhjustav geen edasi järglasele. Kuna iga haigus, mida tahetakse uurida, vajab erinevat protokollit, kasutatakse PGDd piiratud arvu geneetiliste haiguste diagnoosimiseks. (Egozcue *et al.*, 2000). Praegusel ajal on PGD

protokollid olemas 71 erineva monogeense, kahe hilise avaldumisega haiguse ja kuue vähi eelsoodumuse geeni analüüsimiseks (www.guide.hfea.gov.uk/pgd/).

Sagedamini esinevate X-liiteliste haiguste jaoks on samuti saadaval geenipõhised testid. Peamised testitavad haigused on fragiilse X sündroom, hemofiilia ja Duchenne'i lihasdüstroofia. Embrüo sugu tehakse kindlaks ning kõik meessoost embrüod jäetakse kõrvale. Meetodi puudus on see, et pooled kõrvale jäetud embrüod on tegelikult terved ning pooled naissoost embrüod, mis alles jäetakse on haiguse kandjad. Kuna pooled embrüod ei ole siirdamiseks sobilikud puhtalt soo pärast ning pooled neist kõrvale jäetud meessoost embrüotest on terved, tõstatab selline lähenemine eetilisi muresid. (Pensée *et al.*, 2014). Teadaolevatest suguliitelistest haigustest põhjustavad paljud tõsiseid füüsilisi ja vaimseid häireid. Need võivad olla kaasasündinud, nagu hemofiilia, või areneda elu jooksul, nagu juhtub lihasdüstroofiaga. Üldiselt on naised haiguse tunnusteta kandjad ning neil on 50 % tõenäosus kanda haigus edasi oma järglastele. Kõige levinumaks lahenduseks on määrata PGD käigus embrüo sugu FISH tehnoloogiaga, kasutades sugukromosoomi ning autosomaalset proovi ploidsuse kontrollimiseks. (Coonen *et al.*, 1998)

3.2 Kromosoommutatsioonid

Lisaks päranduvatele haigustele teostatakse PGD juhul, kui ühel või mõlemal partneritest on teada tasakaalustatud kromosomaalsed ümberkorraldused, mille tõttu võivad kanduda embrüole aberratsioonidega kromosoomid. Struktuursed kromosoomide ümberkorraldused on inimestes küllaltki levinud. (Iwarsson *et al.*, 2011) Kõige sagedasemad on retsiprooksed ja Robertsoni translokatsioonid, mille umbkaudne sagedus on vastavalt üks 625st ja üks 1000st. Retsiprooksed translokatsioonid väljenduvad kromosoomivahelistes DNA lõikude vahetumises ning Robertsoni translokatsioonide korral ühinevad mittehomoloogsed kromosoomid, moodustades uue üksikkromosoomi. Selliste muutuste tuvastamisel on võimalik ära hoida raseduse katkemist ning suurendada raseduse edukust, kui jätta sellise leiuga embrüod kõrvale (Hershberger *et al.*, 2011). Enamik translokatsioonide kandjaid on normaalse fenotüübiga, kuid kannatavad tihti korduva raseduse katkemise või viljatuse all. Lisaks sellele on oht tuua ilmale kaasasündinud vigade või vaimse alaarenguga järglane. Probleemid tekivad kromosoomide erinevast segregatsioonist meioosi käigus, mille tulemusena tekivad ebanormaalse struktuuriga kromosoomid. (Iwarsson *et al.*, 2011) Korduvate raseduse katkemiste ning viljatuse tõttu on PGD tihti translokatsioonidega patsientide jaoks ainus võimalus eduka raseduse saavutamiseks (Sermon *et al.*, 2004).

3.3 Muud näidustused

Lisaks päranduvate haiguste ning kromosoommutatsioonide tuvastamisele rakendatakse PGDd ka teistel, mõneti vastuolulistel, põhjustel. Kuna PGD abiga on võimalik tuvastada embrüo sugu, soovivad paljud paarid teostada analüüse soovalikuks. Soo määramine võib toimuda kas geneetilise analüüsi kõrvalt või puhtalt soovalikuks. Põhjused võivad olla nii sotsiaalsed, kultuurilised kui ka lihtsalt soov perekonna tasakaalustamiseks. Soovaliku kasutamine mitte-meditsiinilisel põhjusel, ehk kui tegemist ei ole päranduva haigusega, on vastuoluline ning tekitab eetilisi küsimusi põhjusel, et terved embrüod jäetakse kõrvale puhtalt ebasoovitava soo pärast. (Brezina *et al.*, 2015) Mitte-meditsiiniline soovalik, mida nimetatakse ka perekonna tasakaalustamiseks, (tihti soovivad vanemad olemasolevast lapsest erineva sooga järglast), võiks olla vastuvõetav, kui ebasoovitavad terved embrüod annetakse teistele viljatutele patsientidele. Kui meditsiiniline soovalik on lubatud suuremas osas riikidest, et vältida tõsiste suguliiteliste haiguste edasikandumist, siis perekonna tasakaalustamine on paljudes maades õigusevastane. (Leiter, 2014)

Uuemate PGD näidustuste hulka kuulub ka implantatsioonieelne inimese leukotsüüdi antigeeni (HLA) sobitamine (*HLA matching*) eesmärgiga sünnitada doonorlaps juba olemasolevale haigele õele või vennale, kes vajab hematopoeetiliste tüvirakkude siirdamist. Sellise meetodiga on võimalik tagada tüvirakkude doonor, keda kutsutakse ka päästja lapseks (ingl *saviour sibling*) haigele lapsele. Tüvirakkude siirdamisel on ravi suurema tõenäosusega edukas, kui kasutatakse HLA sobitatud doonorit. PGDd HLA sobitamiseks saab kasutada kahel juhul. Esiteks, kui lapsel on mitte-päranduv haigus, nagu leukeemia, ning vanemad soovivad kasutada PGDd ainult HLA sobitamiseks, ehk see on analüüside teostamise ainus põhjus. Teiseks, kui lapsel on päranduv geneetiline haigus ning vanemad vajavad analüüse, et vältida uue haige järglase sündi, sobitades samal ajal embrüo HLA tüüp lootuses päästa juba olemasolev laps. Sellisel juhul teostatakse analüüsid kahes etapis. Kõigepealt valitakse embrüo, kellel ei esine päranduvaid haigusi ning seejärel valitakse siirdamiseks välja need, kelle koetüüp sobib olemasoleva lapsega. (Liu, 2007) Antud rakenduse jaoks kasutab PGD mitmeid polümorfseid markereid HLA regioonis, et tuvastada terved embrüod, kellele on pärandunud vanematelt identsed kuuendas kromosoomid paiknevad HLA piirkonnad (Pensée *et al.*, 2014). Lisaks sellele, et HLA sobitamine koos geneetilise defekti analüüsiga on levinum, on see ka paljudes riikides ainuke lubatud variant. Siiski, ükskõik kumba meetodit kasutades, tuleb arvesse võtta eetilisi riske, eriti doonorlapse seisukohalt. HLA implantatsioonieelsete sobitamist on

läbiviidud näiteks sirprakulise aneemia, Fanconi aneemia ja beeta-talasseemia raviks (Iwarsson *et al.*, 2004).

Hiljuti on hakatud PGDd kasutama täiskasvanu eas avalduvate haiguste, nagu Huntingtoni ja Alzheimeri tõbi, ning vähi eelsoodumust tekitavate geenide, nagu BRCA1, tuvastamiseks. Viimasel juhul ei tekita mutatsioon kindlat haigust, vaid annab järglastele kõrgema riski mingi vähitüübi arenguks vanemas eas. Mõne hiliselt ilmneva haiguse, mille jaoks implantatsioonieelseid analüüse teostatakse, geeni esinemine ei ennusta täie kindlusega, et indiviidil tulevikus haigus avalduks. On sündroome, mida iseloomustab mittetäielik penetrantsus, mille tõttu ei pruugi kõigil mutatsiooni kandvatel indiviididel vastav haigus esineda. Hilises elueas avalduvad haigused on kompleksed ja omavad nii geneetilisi kui keskkondlikke põhjusi ning lisaks on võimalus edukaks paranemiseks. Seega on küsitav, kas vastava haigusnäitajaga embrüo elimineerimine on õigustatud. (Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2013)

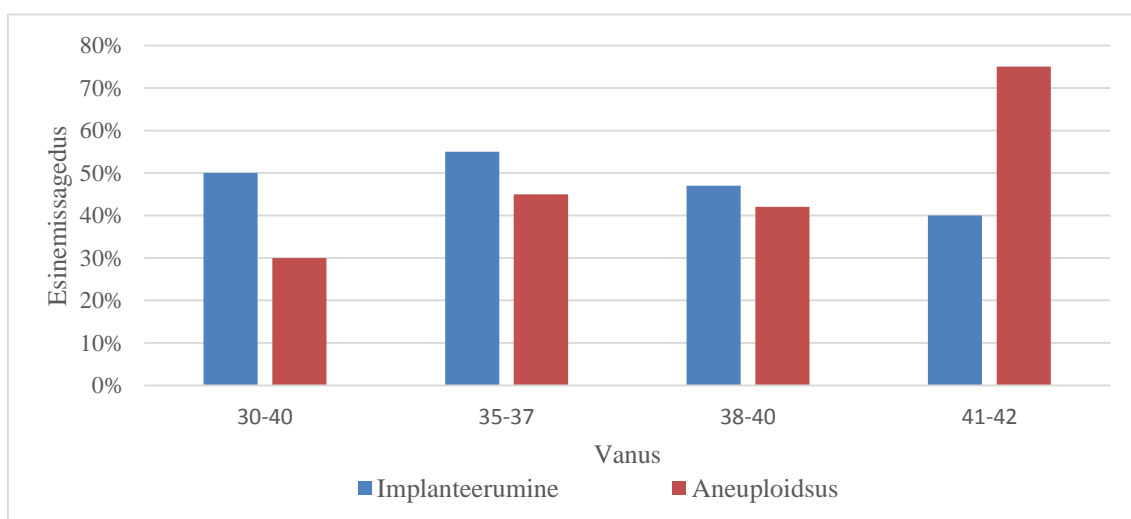
4 Kehaväline viljastamine

PGD ja PGSi pakutavate võimaluste kasutamiseks peavad vanemad läbima kehavälise viljastamise (IVF) tsükli. IVF on kõige sagedamini kasutatav abistava reproduktsiooni meetod viljatuse raviks, mille käigus toimub viljastamine *in vitro* ehk väljaspool naise organismi ning selle tulemusel saadud embrüo siiratakse emakasse (Tonsiver *et al.*, 2013). Kuigi kasutatakse ka teisi meetodeid, on just IVF viljatuse raviks kõige efektiivsem (Salumets *et al.*, 2003). Viljatuseks peetakse võimetust rasestuda normaalse suguelu korral 12 kuu jooksul kasutamata kontratseptsioonivahendeid ning see mõjutab ülemaailmselt hinnanguliselt 8-12% paare. Viljatuse põhjused võivad olla nii mehe- kui naisepoolsed. Need võivad olla tingitud nii elustiilist, geneetilisest põhjustest, halvast sperma kvaliteedist või sperma patoloogiatest, munajuhade kahjustustest, ovulatsioonihäiretest või vanusest. Võimalik on ka see, et viljatuse põhjused jäävad ebaselgeks. (Ombelet *et al.*, 2008, Tonsiver *et al.*, 2013, Wang, 2011) Kuigi IVF on väga levinud ning protseduuride arv on aasta-aastalt kasvanud, on selle tulemuslikkus suhteliselt madal, vaid ligikaudu 30% naistest rasestub (Ferraretti *et al.*, 2008). Üks peamine madala edukuse põhjus on ema vanusega suurenev embrüote aneuploidsus, mille tõttu embrüo ei pesastu või katkeb rasedus. Seega langeb IVF'i edukus suuresti pärast 30. eluaastat, kui langeb ka naise loomulik viljakus. (Ata *et al.*, 2012; Fragouli *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2012)

Enne viljastamist teostatakse munasarjade hormonaalne stimuleerimine, et indutseerida mitme munaraku üheaegne valmimine. Nii on võimalik saada ühe tsükli jooksul kuni 20 munarakku, mis võimaldab saavutada rasestumise vähemate tsüklitega. (Tonsiver *et al.*, 2013) Viljastamine toimub kas tavalise IVF või ICSI (*intracytoplasmatic sperm injection*) ehk spermisüstimise meetodil (Tonsiver *et al.*, 2013). Kui tavapärase meetodi puhul viiakse seemnerakud munarakuga toitelahuses kokku, siis ICSI puhul süstitakse üksik seemnerakk otse ootsüüdi tsütöplasmasse. Kuna viljastumiseks on vajalik vaid geneetiline materjal, immobiliseeritakse sperm saba eemaldades enne süstimist. (Coughlan *et al.*, 2009; Ferraretti *et al.*, 2012) ICSI töötati algselt välja paaridele, kellel esines mehepoolne viljatus, spermide patoloogiad, madal kvaliteet või seemneraku suutmatus iseseisvalt munarakku tungida. Samuti kasutatakse seda juhtudel, kui tavapärase IVF-meetodiga viljastamine ei õnnestu. (Zhao *et al.*, 2011) PGD kasutamine eeldab viljastamismeetodina ICSI kasutamist. Nii hoitakse ära spermidega saastumine, mis võib esineda ning mõjutada diagnoosi tulemusi tavapärase IVFi korral ning ühtlasi on võimalus valida viljastamiseks parima kvaliteediga sperm. (Milachich, 2013; Silber *et al.*, 1994)

Pärast viljastamist embrüoid kasvatatakse ning siiratakse seejärel sobilikud embrüod emakasse. Kui siirdamiseks kõlblikke viljastunud munarakke on rohkem, on võimalik need külmutada ning mõne hilisema tsükli jooksul transplanteerida, näiteks kui implanteerumine esimesel korral ei õnnestu. (Tonsiver *et al.*, 2013) Kuna keskmine IVFi tulemuslikkus on suhteliselt väike, võidakse siirdada rohkem kui embrüo (Salumets *et al.*, 2003). Kuna mitme embrüo siirdamisega sama tsükli jooksul suurendab mitmikse sünni tõenäosust ning sellega seoses on ka kõrgeenenud riskid nii lapse kui ema tervisele, on paljudes riikides seatud piirangud ühes tsüklis siirdatavate embrüote arvu osas, et vähendada viljatusraviga kaasas käivaid ohtusid. (Coughlan *et al.*, 2008)

Tabel 1. Aneuploidsuse tõus naise vanuse kasvades (Illumina, 2014)



5 Biopsia

Geneetiliste analüüside teostamiseks munarakul või embrüol on vaja neist eemaldada biopsia abiga materjal, mida testimiseks kasutada. Et saada kätte polaarkehad või embrüorakud, tehakse kas mehaaniliselt, keemiliselt või lasertehnoloogia abiga munakesta (*zona pellucida*, ZP) avaus, mille kaudu vajalikud rakud mikromanipulatsiooniga eemaldatakse. Teoreetiliselt saab kasutada kõiki kolme meetodit erinevate implantatsioonieelsete arengustaadiumite jaoks. (De Vos *et al.*, 2001) Kui polaarkehade ja blastomeeride eemaldamiseks kasutatakse peamiselt aspireerimist, siis trofektodermi (TE) rakud, mis läbi eelnevalt tehtud avause ümbritsevasse keskkonda väljuvad, lõigatakse nõelaga ülejäänud rakumassi küljest lahti (De Vos *et al.*, 2001). Mehaaniliselt saab kesta avada kahte moodi: otsene läbistamine pipetiga ning osaline kesta lahti lõikamine terava mikronõelaga (De Vos *et al.*, 2001). Selline meetod on suhteliselt lihtne ning risk munarakku või embrüot vigastada on väike (Cohen *et al.*, 1990).

Keemilise töötlemisega happelise *Tyrode*-lahusega (pH 2,3) saadakse mehhaaniliselt tekitatud avausest munakesta suurem auk, kuid esineda võivad nii happelisest lahusest tingitud edasist arengut häirivad kahjustused kui ka kohene rakusurm (Cohen *et al.*, 1992; De Vos *et al.*, 2001). Rakud, mida käsitletakse üksikult, pestakse koheselt pärast lahusest eemaldamist (Cohen *et al.*, 1992).

Lasertehnoloogia kasutamine ZP avamisel on lihtsam ning väikseima kahjustunud rakkude arvuga on suurem tõenäosus embrüo edasiseks häirimatuks arenguks (Joris *et al.*, 2003; De Vos *et al.*, 2001). Võrreldes keemilise meetodiga, kus *Tyrode*-lahusega lüüsitakse osaliselt munakest, on laseri kasutamine ohutum, kuna embrüo ei ole avatud potentsiaalselt ohtlikele happelistele tingimustele. Ühtlasi viibivad embrüod lühemat aega väljaspool inkubaatorit. Kuna eesmärk on suurem edukate viljastumiste ning pesastumiste arv, võib lasertehnoloogia abil teostatavat rakkude eemaldamist pidada kolmest meetodist parimaks (De Vos *et al.*, 2001). Embrüost saab eemaldada umbes veerandi tema rakkudest ilma, et see mõjutaks negatiivselt edasist *in vitro* arengut (De Vos *et al.*, 2001).

PGD ja PGS-i teostamiseks on võimalik kasutada embrüo arengu kolme erinevat staadiumit: polaarkeha staadium, lõigustumise staadium ning blastotsüsti staadium. (Milachich *et al.*, 2013) Preimplantatsiooniline embrüo koosneb piiratud arvust rakkudest, seega tuleb diagnostika läbi viia üksikute embrüonaalsete rakkudega. Põhiline meetod PGD rakendusel kasutab ühte või kahte blastomeeri kolmepäevasesst lõigustumisstaadiumis embrüost. (Van der Aa *et al.*, 2013). Töö embrüotega on näidanud, et materjali eemaldamine kahe- või neljarakulisest embrüost

vähendab suuresti looteks arenevat sisemist rakumassi ning on seega biopsia teostamiseks ebasobilik (Hardy *et* Handyside, 1993).

5.1 Polaarkeha biopsia

Polaarkeha biopsia, milleks kasutatakse munaraku arengu käigus meiotilise jagunemise tulemusena tekkinud naise DNAd sisaldavaid polaarkehasid, viiakse läbi varases arengustaadiumis (Milachich *et al.*, 2013). Biopsiaks kasutatakse nii esimest, viljastamata küpse munaraku kui ka teist, viljastunud munaraku polaarkeha ning viiakse läbi vastavalt päeval 0 või 1 (Van der Aa *et al.*, 2013). Kuna polaarkehade biopsia ei sisalda embrüo enda rakkude kasutamist, annab see meetodile nii eetilised kui ka embrüo tervist puudutavad eelised. Kuna polaarkehad ei ole edukaks viljastumiseks ega normaalseks embrüonaalseks arenguks vajalikud, ei kaasne nende eemaldamisega ka otsest kahju embrüole endale. Siiski kasutavad tänapäeval seda tehnikat vähesed riigid. (Milachich *et al.*, 2013) Põhjuseks on polaarkehades sisalduva geneetilise materjali vähesus, mistõttu on seda analüüside teostamiseks amplifitseerida (Capalbo *et al.*, 2013). Lisaks tömahukusele ja suurtele väljaminekutele, võimaldab meetod uurida vaid emapoolseid muutuseid genoomis ning säilib kõrge risk aneuploidsusteks, sest ei tuvastata ka näiteks mitootilisi vigu (Kuliev *et al.*, 2011).

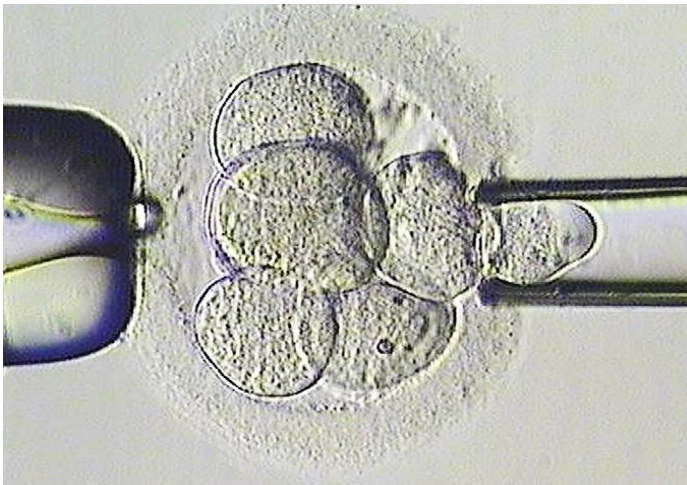
Polaarkeha biopsiat võib kasutada alternatiivina embrüo biopsiale, kui uuritakse ainult emapoolseid kromosoomiarvu muudatusi või mutatsioone (Montag *et al.*, 2009). Kui osad meditsiinasutused kasutavad polaarkehasid, et vältida embrüo rakkude eemaldamist, siis teised seevastu kasutavad neid vastavas riigis kehtivate embrüonaalsete rakkude kasutamist keelustavate regulatsioonide tõttu (Verlinsky *et al.*, 1990, 1997; Kupker *et al.*, 2001) Lisaks eeltoodud eelistele jätab polaarkeha biopsia kõige rohkem aega juba eemaldatud materjalil analüüside teostamiseks ning langeb ära ka võimalus preimplantatsioonilise arengu hilisematest staadiumites esinevast mosaiiksusest tingitud valediagnoosiks (Christopikou *et al.*, 2013).

5.2 Lõigustumisstaadiumi biopsia

Arengu kolmandaks päevaks koosneb viljastunud munarakk 6-8 rakust, kust saab isoleerida üks kuni kaks rakku. Lõigustumisstaadiumi biopsia teostatakse kolmanda arengupäeva hommikul. Blastomeeride eemaldamist kolmepäevasest embrüost on kujutatud joonisel 2. Peamine eelis teiste staadiumite ees on võimalus tuvastada isapoolsed ja mitootilised aneuploidsused.

Tänapäeval on lõigustusstaadiumi blastomeeride eraldamine kolmandal päeval pärast IVFi põhiline kasutatav biopsia meetod (Van der Aa *et al.*, 2013). Lõigustusstaadiumi biopsia on rahvusvaheliselt kõige enam kasutatud raku eemaldamis-staadium moodustades umbes 90% kõigist teostatud biopsiatest PGD käigus (Harper *et al.*, 2010). Kuigi teoreetiliselt on polaarkeha biopsia ja blastotsüstistaadiumi biopsia embrüole vähem kahjulikud kui lõigustusstaadiumi biopsia, on see siiski levinuim meetod.

Võrreldes polaarkehadega saab blastomeeride analüüsimisel paika panna kindlama diagnoosi ning erinevalt blastotsüsti rakkudega töötamisel jääb ka piisavalt aega analüüside täielikuks teostamiseks enne embrüo emakasse siirdamist. (De Vos *et al.*, 2009) Ühe või kahe blastomeeri eraldamise üle on vaieldud, sest kahe raku eraldamisel on võimalik saavutada täpsem diagnoos, kuid samas on see embrüole invasiivsem ning võib mõjutada implantatsiooni (Harper *et al.*, 2012). Blastomeeri biopsia piirangud väljenduvad ka mosaiiksuse esinemises kuni 60% embrüotel lõigustusstaadiumis. Kuigi mosaiiksust võib leida ka blastotsüstis, on see siiski tunduvalt vähemaarvuline kui 6-8 rakustaadiumis. (Milachich *et al.*, 2013)



Joonis 2. Lõigustusstaadiumi biopsia. Hoidmispipeti otsa paigutatud lõigustusstaadiumi embrüolt eemaldatakse läbi avause ZP's peene nõelaga üks kuni kaks blastomeeri. (Iwarsson *et al.*, 2011).

5.2.1 Mosaiiksus

Suur osa inimese lõigustusstaadiumi embrüotest omavad kromosomaalset mosaiiksust, koosnedes nii diploidsetest kui ka mitte-diploidsetest rakkudest (Bielanska *et al.*, 2001). Esimesed gameetide rakutsüklid pärast IVFi on vastuvõtlikud kromosomaalsele

ebastabiilsusele. Kromosomaalne muutlikus embrüotes ei ole tingimata nende arengule saatuslik, kuid võib viia mitmete erinevate muutusteni tervises (Voet *et al.*, 2011).

Paljud embrüo blastomeerid omandavad lõigustumisstaadiumis ülesehituse, mis ei iseloomusta originaalset sügootset genoomi. Esinevad nii valed kromosoomipaaride lahknemised kui ka struktuurilised ümberkorraldused. Pre- ja postnataalse DNA analüüs näitab, et kromosoomiarvu ja -struktuuri ebastabiilsust esineb nii *in vitro* kui ka *in vivo* viljastatud munarakkudel. Üle 50% blastomeerides embrüo kohta esinev kromosomaalsetes hälvetes või mitte-diploidses karüotüübis väljenduv mosaiiksus vähendab embrüo võimet areneda blastotsüstiks, mille tagajärjeks võib olla suurenenud oht ebaõnnestunud implantatsiooniks siirdamisel lõigustumise staadiumis (Bielanska *et al.*, 2001). Lisaks, osa aneuploidseks tunnistatud lõigutumisstaadiumi rakke teevad blastotsüsti staadiumiks läbi enese-paranduse, mille tõttu võib olla vale embrüole pandud diagnoos (Milachich, 2013).

Mosaiiksuse esinemise pärast embrüotel ei ole PGD teostamine kaheksa-raku staadiumis kunagi päris usaldusväärne. Ka kahe raku eemaldamisel ei saa me olla päris kindlad embrüosse jäänud rakkude kromosomaalse ülesehituses ning tuleb arvestada võimalike tsütogeneetiliste muutustega kuni blastotsüsti staadiumini. (Wells *et al.*, 2005) Kuni puudub täielik ülevaade mosaiiksete embrüote arengust, võib juhtuda, et kõrvale jäetakse terve embrüo, samas, kui siirdatakse vigane (Baart *et al.*, 2006).

5.3 Trofektodermi (TE) biopsia

Trofektodermi biopsia viiakse läbi blastotsüsti staadiumis pärast embrüo jagunemist sisemiseks rakumassiks, millest areneb embrüo, ning seda ümbritsevaks trofektodermiks. Jagunemine toimub umbes 5. päeval. Protseduuri käigus eemaldatakse üksikute blastomeerirakkude asemel suuremal arvul TE rakke. (Brezina *et al.*, 2012) Viiendal päeval pärast viljastamist eemaldatakse trofektodermist klaasnõela või laseri abiga umbes viis rakku. Selle tulemusena ei kaota embrüo sisemist rakumassi ning jääb ilma suuremate vigastusteta (McArthur *et al.*, 2005). Kui lõigustumisstaadiumi diagnostikal võivad olla negatiivsed tagajärjed embrüo kahjustamise tõttu, siis viiendal päeval testimine lubab kasutada biopsiaks rakke, mis ei ole otseselt seotud embrüo, vaid pigem embrüoplasti moodustumisega (Milachich *et al.*, 2013). Kuigi mosaiiksuse esinemine on blastotsüstirakkudes harvemini esinev kui varasemas arengustaadiumis, võivad ka TE biopsia korral kromosomaalsed erinevused sisemise- ja välimise rakumassi vahel vähendada diagnoosi täpsust (Illumina, 2014). Siiski on selles staadiumis suurem osa

mosaiiksusest, mis lõigustumisstaadiumis esines, kadunud (Mertzanidou *et al.*, 2013). Hilise arengujärgu kasutamisel biopsiaks tuleb arvestada ainult umbes poolte implantatsioonieelsete embrüote jõudmisega blastotsüsti staadiumisse, mis piirab oluliselt analüüsideks kasutatavate blastotsüstide arvu (McArthur *et al.*, 2005). Lisaks vajab TE rakkude biopsia blastotsüsti staadiumis embrüo külmutamist ning hiljem sulatamist, sest biopsia lükkamine arengu hilisesse staadiumisse limiteerib oluliselt diagnoosi teostamiseks kasutatavat aega ning puudub võimalus sooritada uus PCR või rehübridiseerida FISH-i proove enne, kui embrüo siirdamist vajab (Van der Aa *et al.*, 2013).

Tabel 2. Erinevate biopsia meetodite eelised ja puudused. (Illumina, 2014)

	Eelised	Puudused
Polaarkeha	<ul style="list-style-type: none"> • Pikem aeg analüüsideks enne embrüosiirdamist • Ei eemaldata materjali embrüost • Osades riikides ainus lubatud variant 	<ul style="list-style-type: none"> • Ei tuvasta mitootilisi vigu • Ei tuvasta isapoolset aneuploidsust • Vajamineva materjali hulk suur
Lõigustumisstaadium	<ul style="list-style-type: none"> • Kõige levinum • Tuvastab nii ema- kui isapoolsed vead • Piisavalt aega analüüside teostamiseks 	<ul style="list-style-type: none"> • Võib mõjutada embrüo eluvõimet • Suur mosaiiksuse esinemissagedus
Blastotsüst	<ul style="list-style-type: none"> • Vähem mosaiiksust, kui lõigustumisstaadiumis • Eemaldatavad rakud ei osale otseselt embrüo enda arengus • Analüüsitakse rohkem, kui ühte rakku 	<ul style="list-style-type: none"> • Vähe aega analüüsideks, embrüod vajavad külmutamist • Võib olla ebasobiv, kui patsiendil ei moodustu palju blastotüste

5.4 Embrüote säilitamine

Kuna analüüside läbiviimiseks on pärast biopsiat aega piiratult, kasutatakse pärast rakkude eemaldamist embrüote külmutamist. Külmutamine seiskab arengu ajaks, mida on vaja uuringute läbiviimiseks. Kuna siirdamist lükatakse edasi, teostatakse see naise järgmise menstruaaltsükli ajal, kui emakas on vastuvõtlik ning viljastatud munarakk saab pesastuda. (Chang *et al.*, 2013) Sobilik järgnev tsükkel võib olla loomulik või ka hormoonidega esile kutsutud (Van der Aa *et al.*, 2013).

Krüosäilitamine viitab elusrakkude säilitamisele madalal, tavaliselt $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatuuril vedelas lämmastikus (Zhao *et al.*, 2011). Rakkude külmutamiseks kasutatavad meetodid peaksid kindlustama nende kõrge elujõulisuse pärast sulatamist, kuid võib juhtuda, et embrüod saavad kahjustada rakusiseste jääkristallide moodustumise pärast (Granne *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2011). Kaks peamiselt kasutatavat külmutamise meetodit on vitrifikatsioon ning aeglane külmutamine (SPF) (Edgar *et al.*, 2012). Vitrifikatsioon saavutatakse kasutades väga kiiret külmutamist ($15,000\text{--}30,000\text{ }^{\circ}\text{C}$ minutis), mille tulemusena saavutab vesi klaasilaadse seisundi ning välditakse jääkristallide tekkimist. Tänu külmumisvastaste kaitseainete (nt. glütserool) lisamisele moodustub jää asemel geelitaoline materjal, tänu millele ei saa rakud vedelas lämmastikus hoidmisel vigastada. (Loutradi *et al.*, 2008). Ellujäämise ning pesastumise kohapealt eelistatakse vitrifikatsiooni, sest võrreldes SPF'iga on tulemuseks vähenenud risk DNA kahjustusteks (Kopeika *et al.*, 2014). Kui meetodit rakendatakse õigesti, on vitrifikatsiooni teel külmatud ning seejärel sulatatud embrüotel silmapaistvalt kõrge ellujäämise võimalus, isegi kuni 95 % (Cobo *et al.*, 2012).

6 Metoodika

6.1 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Kui geneetiline materjal on biopsiaga munarakust või embrüost eemaldatud, saab alustada geneetilise analüüsiga. Esimeste preimplantatsiooniliste analüüside teostamisel kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni embrüo soo määramiseks, amplifitseerides Y-kromosoomi spetsiifilised regioonid (Handyside *et al.*, 1990). Siiski sai peagi selgeks, et soomääramine on

lihtsam ning usaldusväärsem kasutades FISH meetodit ning praegusel ajal kasutatakse PCRi monogeensete haiguste tuvastamiseks, amplifitseerides sihtmärklõukuse mutatsiooni-spetsiifiliste praimeritega. (Iwarsson *et al.*, 2000)

Eraldatud rakud lüüsitakse DNA kättesaamiseks lahuses ning segatakse seejärel PCRi reaktsiooniseguga, mis sisaldab reaktsiooni toimumiseks vajalikke primereid, nukleotiide ning polümeraasi (Sermon *et al.*, 2004). Üldiselt teostatakse mutatsioonanalüüs paralleelselt vähemalt kahe polümorfse markeriga, et kontrollida mutantse alleeli korrektset amplifitseerumist. Kuna PCR on küllaltki kiire ning mugav viis DNA testimiseks, kasutatakse seda paljude implantatsioonieelsete analüüside läbiviimiseks. Siiski, vajab meetod piisavat kogust puhast ja kvaliteetset DNAd, mille kättesaadavus polaarkehast või üksikust embrüorakust võib olla raskendatud. (Van der Aa *et al.*, 2013) Üksikraku DNA amplifikatsiooni efektiivsus on kindlasti madalam, kui tavaliste PCR analüüside teostamisel, kus algmaterjali võib olla palju suuremates kogustest. Vähenenud amplifikatsiooni efektiivsus võib olla põhjustatud nii ebaõnnestunud proovi kogumisest kui ka PCRi protseduurist endast. Võttes arvesse, et inimese üksik diploidne rakk sisaldab vaid umbes 7 pg DNAd, võib enne analüüside teostamist läbi viia raku kogu genoomi amplifikatsiooni. (Van der Aa, *et al.*, 2013)

Üksiku raku geneetilise diagnoosimisega kaasnevad teatud ohud, näiteks amplifikatsiooni ebaõnnestumine, saastumine välise DNAGA või alleeli väljalangemine (*allele drop-out* ADO). Polaarkeha või blastomeeri rakud sisaldavad analüüside läbiviimiseks piiratud materjali ning on seega probleemidele rohkem altid kui trofektodermi koe rakud blastotsüsti staadiumis, millest on võimalik eraldada rohkem rakke ja DNA-d. Tõstes analüüsitava rakkude arvu on võimalik vähendada ka vigade esinemise tõenäosust. (Milachich *et al.*, 2013)

Üheks suurimaks PCR meetodi puuduseks on ADO, mille tõttu üks kahest uuritavast alleelist heterosügootses proovis ei amplifitseeru (Van der Aa *et al.*, 2013). Selle põhjuseks võib olla nii DNA madal kontsentratsioon, mille tõttu üks alleelidest ei pruugi eduka amplifitseerumise jaoks vajalikus koguses olemas olla, või DNA madal kvaliteet, mis võib takistada praimerite ja polümeraasi seondumist (Thornhill *et* Snow, 2002) ADO ohustab PGD usaldusväärsust, sest embrüo võidakse ekslikult tunnistada kas terveks või mitte, olenevalt millise alleeli amplifitseerumine ebaõnnestub. Eriti murettekitav on ADO autosomaal-dominantsete haiguste korral, kus mutantse alleeli väljalangemine võib viia mutatsiooni kandva embrüo siirdamiseni. Multipleks PCRiga saab üheaegselt uurida mitmeid lookuseid, kui praimerid on märgistatud erinevate fluorestsentsmärgistega. Aheldusanalüüsi läbiviimiseks tuleb koguda proovid nii vanematelt kui ka vähemalt ühelt mutatsiooniga perekonna liikmelt, et identifitseerida informatiivsed markerid. (Thornhill *et* Snow, 2002) Kasutades multipleks PCRi koos

polümorfsete markeritega, on võimalik vähendada ADO ja väardiagnoosi võimalikku esinemist (Harper *et al.*, 2011).

Lisaks ühe alleeli ebaõnnestunud amplifitseerumisele ehk ADOle, võib uuritavas materjalis esineda lisa alleel, mis tegelikult analüüsitavas DNAs ei esine. Sellist väikese DNA koguse paljundamisel tekkivat nähtust kutsutakse alleeli tekkeks (ingl *allele drop-in* ADI). Lisandunud alleelid on DNA polümeraasi poolt amplifikatsioonil tehtud vigade või kontaminatsiooni tagajärg ning ei amplifitseeru kordusreaktsioonis. Nagu ka puuduv alleel, segavad ADI poolt tekitatud kõrvalkalded andemete analüüsi ning korrektse tulemuse saamist. (Gill *et al.*, 2000)

Suur PCRi tsüklite arv ning DNA limiteeritud kogus, teevad üksikraku analüüsid tundlikuks kontaminatsioonidele. Geneetilise materjali saastumine isa-, emapoolse või välise DNAGA võib viia embrüo väardiagnoosini. Kuna DNA munarakule kinnitunud spermidest või *cumulus*'e rakkudest on potentsiaalne saasteallikas, tuleb viljastamiseks kasutada ICSI meetodit ning puhastada korralikult eemaldatud rakud. Välise saaste proovidesse sattumise ohu välistamiseks peab keskkond laboris, kus analüüse teostatakse, olema rangelt kontrollitud. Lisaks võib teostada analüüse polümorfsete markerite juuresolekul, et kinnitada testitava DNA embrüonaalne päritolu. (Hershberger *et al.*, 2011; Sermon *et al.*, 2004)

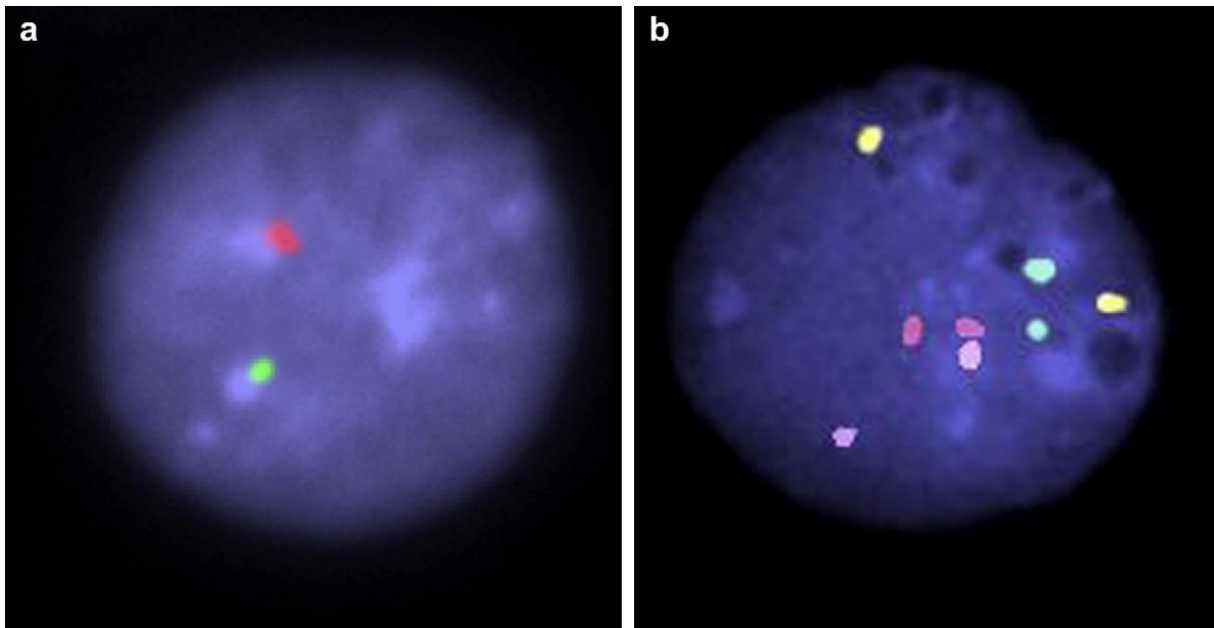
Analüüse teostades tuleb arvesse võtta meetodi puuduseid nagu amplifikatsiooni efektiivsus, oht kontaminatsiooniks ning ADO ja ADI. Tuleb arvestada, et amplifikatsiooni ebaõnnestumine ei tähenda, et embrüo oleks mutatsioonist vaba. PCRi käigus tekkivad vead võivad viia valediagnoosini ning defektse embrüo siirdamiseni või terve embrüo kõlbmatuks tunnistamiseni. (Harper *et al.*, 2011)

6.2 *In situ* fluorestsentshübridisatsioon (FISH)

Tsütogeneetilised analüüsid implantatsioonieelsete embrüotega viiakse läbi kasutades FISHi ehk *in situ* fluorestsentshübridisatsiooni. (Egozcue *et al.*, 2000). FISHi kasutatakse aneuploidsuste tuvastamiseks implantatsioonieelse sõeluuringu käigus, kromosomaalsete aberratsioonide kindlaks tegemiseks ning X-liiteliste haiguste korral soo määramiseks (Sermon *et al.*, 2004). Pärast biopsiat kantakse eraldatud rakud klaasist alusele ning laotatakse lahuse abiga üle klaasi. Rakud lüüsitakse nii, et DNAd sisaldav tuum oleks hübridiseerimiseks ja analüüsiks kättesaadav. Erinevate fluorestsentsvärvidega märgistatud geeniproovid kantakse rakkudest eraldatud geneetilisele materjalile, kus need peaksid komplementaarsuse alusel spetsiifilistele kromosoomidele kinnituma. Seejärel visualiseeritakse proov

fluorestsentsmikroskoobis, et lugeda rakus esinevad märgistatud kromosoomid, mille järgi saab otsustada, kas rakk, millest proov võeti, on normaalne või kõrvalekalletega. (Iwarsson *et al.*, 2011). Fluorestsentsproovide tüüp ja number sõltub näidustusest, mille jaoks analüüse teostatakse. Näiteks soo määramiseks läheb vaja vaid kahte, X- ja Y-kromosoomi, proovi, ning autosomaalset proovi ploidsuse kontrollimiseks. Aneuploidsuste sõeluuringul on analüüsitavate kromosoomide arv piiratud kasutusel olevate fluorokroomide arvuga. (Sermon *et al.*, 2004) FISH meetodiga analüüsitavad kromosoomid on 1, 13, 16, 18, 21 ning sugukromosoomid X ja Y. Üldiselt analüüsitakse kromosoomi, millel on kõige suurem oht trisoomia esinemiseks (Iwarsson *et al.*, 2011). Analüüsides edukus sõltub geneetilise materjali kvaliteedist, kasutatavate fluorestsentsproovide omadustest ning analüüsitavate kromosoomide arvust. Üldjuhul saadakse informatiivsed tulemused umbes 90% juhtudel. (Egozcue *et al.*, 2000) Erinevate fluorestsentsproovidega märgitud ning mikroskoobis visualiseeritud FISH proovid on näha joonisel 3 leheküljel 21.

Vaatamata FISHi laiale kasutusele implantatsioonieelses diagnostikas, on selle kasutamisel üksiku raku analüüsiks mõned piirangud, mida tuleb meetodi efektiivsuse ja väärdiagnoosi minimeerimise koha pealt silmas pidada. Hoolimata suurest kasutusel olevate FISH proovide hübriidiseerumise efektiivsusest, esineb siiski risk hübriidiseerumise ebaõnnestumiseks, mille tõttu võib tõlgendada valesti monosoomiate esinemise. Mitme proovi kasutamine analüüsides teostamisel peaks probleemi detekteerimisel abiks olema. FISHi valed tulemused võivad olla hübriidisatsiooni ebaõnnestumise, nõrga signaali, proovi seondumine vale kromosoomiga või uuritava kromosoomi peritsentrilise piirkonna deletsioon. (Pehlivan *et al.*, 2003) Limiteeritud arvu DNA proovide märgistamiseks olemasolevate fluorokroomide tõttu, saab FISH meetodiga hinnata küllaltki piiratud arvu kromosoomi. Üheks probleemist ülesaamise võimaluseks on teostada analüüse mitu korda, pestes fluorestsentsproovid tsüklite vahepeal maha ning kasutades neid siis erinevate kromosoomide jaoks uuesti. Tuleb aga arvesse võtta, et FISH analüüsides täpsus väheneb iga lisanduva hübriidisatsiooni ringiga ning selletõttu ei ole soovitatav teostada rohkem kui kaks või kolm järjestikust analüüsi. Kuna kasutusel olevad FISH meetodid lubavad hinnata vaid piiratud arvu kromosoomi, ei ole välistatud, et osad defektsed embrüod jäävad märkamatuks ning just sellel põhjusel asendatakse meetodit vähesel määral mikrokiip-põhise võrdleva genoomhübriidatsiooni (Van der Aa *et al.*, 2013; Wells *et al.*, 2008)



Joonis 3. FISH analüüsid. (a) Üksikraku soo määramine X- (punane) ja Y-kromosoomi (roheline) spetsiifiliste tuumale hübridiseeritud proovidega. (b) FISH retsiprooksete translokatsioonide analüüsiks tsentromeeri.spetsiifiliste (kollane ja roosa) ja telomeeri-eelsete (punane ja roheline) proovidega translokatsioonis osalevatel kromosoomidel. Iga proovi kaks signaali näitab muutusteta embrüot. (Iwarsson *et al.*, 2011)

6.3 Kogu genoomi amplifikatsioon (WGA)

Võttes arvesse, et üks inimese diploidne rakk sisaldab vaid umbes 7 pg DNAd, on enne ülegenoomset analüüsi vajadus kogu genoomi amplifikatsiooniks (WGA). Vastavalt kasutatavale WGA meetodile, saab DNAd paljundada tuhandeid kordi ning ületada seega vähese algmaterjaliga kaasnevad probleemid. (Van der Aa *et al.*, 2013) Kvaliteetse WGA teostamiseks on välja töötatud erinevaid tehnikaid, mille hulka kuuluvad mitme nihke amplifikatsioon (*multiple displacement amplification* MDA) ja PCR-põhised meetodid.

MDA meetodi puhul seonduvad denatureeritud üksikraku DNAGA juhuslikud heksameersed praimerid, mille järgi toimub konstantsel temperatuuril *proofreading* aktiivusega faagi ϕ 29 DNA polümeraasi juuresolekul DNA süntees. Kui sünteesitava fragmendi 3' ots jõuab teise fragmendi 5' otsani, nihutatakse sünteesitud ahel nii, et seonduda saaks uus praimer ja süntees uuesti alata. Võrreldes PCR-põhiste amplifikatsiooni meetoditega, toodab MDA suuremaid, vähemate vigadega produkte ning sobib oma kõrge täpsusega kasutuseks SNP genotüüpiseerimisel. (Van der Aa *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2011)

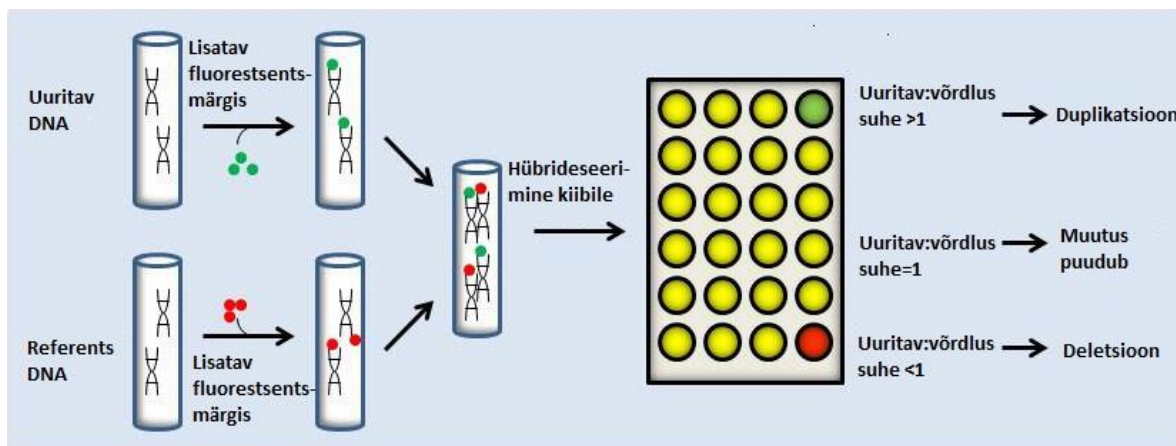
PCR põhiseid WGA meetodeid on kolm: PEP (*primer extension preamplification*), DOP-PCR (*degenerante oligonucleotide PCR*) ja linker-adapter PCR (*linker-adaptorPCR*, LA-PCR) Kui PEP vajab amplifikatsioonieelset etappi praimeride lisamiseks DNA fragmentidele, siis LA-PCR kasutab seundumissaitide loomiseks DNA fragmentidele ligeeritud adaptereid. Erinevalt tavapärasest PCR reaktsioonist, pannakse PEPi puhul 15 aluselised juhusliku järjestusega praimerid denaturatsiooni järgselt DNAGA ühinemiseks madalale temperatuurile (37°C), mille tõttu seonduvad need mittespetsiifiliselt. (Thornhill *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2011) DOP-PCRi erinevuseks on osaliselt degeneraerunud oligonukleotiidide kasutamine, mis seonduvad madala temperatuuriga tsükli jooksul mitmetesse kohtadesse üle genoomi. *Taq* polümeraasi kasutamine nii PEP kui DOP-PCRi reaktsioonides, piirab DNA fragmentide pikkuse 3 kb'ni samas, kui MDA produkt võib olla kuni 10 kb. Lisaks, puudub *Taq* DNA polümeraasil *proofreading* aktiivsus, mille tõttu ei eemaldata võimalike sünteesil tekkinud vigu. Nagu ka tavapärase PCRi reaktsioonide puhul, ohustavad WGA meetodil saadud andmete õiget analüüsimist ADO ja ADI. (Zheng *et al.*, 2011)

6.4 Mikrokiip tehnoloogia

Peaaegu 20 aastat tagasi tutvustati molekulaarset tsütogeneetiliste meetodit, mille abil on võimalik raku kõigi kromosoomide üheaegne hindamine. Meetod, mis arendati algselt välja kasvajakudede kromosoomide uurimiseks, põhineb võrdleval genoomhübridatsioonis (CGH). (Kallioniemi *et al.*, 1992) Meetod rakendab erinevalt märgistatud DNA proovide hübridisatsiooni normaalsetele metafasi kromosoomidele. Erinevate fluorokroomidega märgistatud DNA fragmendid seonduvad kromosoomide komplementaarsete järjestustega ning värvide fluorestsentsi suhte järgi on võimalik detekteerida ja võrrelda kromosoomi koopiate arvu uuritavas ja võrdlusena kasutatavas DNAs (Kallioniemi *et al.*, 1992). Kui uuritav ja võrdlus DNA on märgistatud vastavalt rohelist ja punast fluorestsentssignaali andva värviga, siis üleliigne roheline fluorestsents kromosoomil osutab geneetilise materjali kordistumisele (trisoomia) ning liigne punane fluorestsents geneetilise materjali kaotusele. Kuna CGH vajab umbes üks mikrogrammi DNAd, tuleb enne analüüside teostamist läbi viia kogu genoomi amplifikatsioon. (Wells *et al.*, 2008) Kuigi aneuploidsuse kohta on võimalik saada palju infot ka FISH meetodiga, analüüsimata kõiki kromosoomide, saab maksimaalse täpsuse siiski vaid terve kromosoomikomplekti hindamisel. Seetõttu on CGH oluline meetod ootsüütide ja embrüote sõeluuringul. Siiski jääb limitatsiooniks hübridisatsiooniks kuluv aeg (kuni 72 tundi),

mille tõttu tuleks analüüsivad embrüod külmutada ning nende elujõulisus võib väheneda. (Wells *et al.*, 2008)

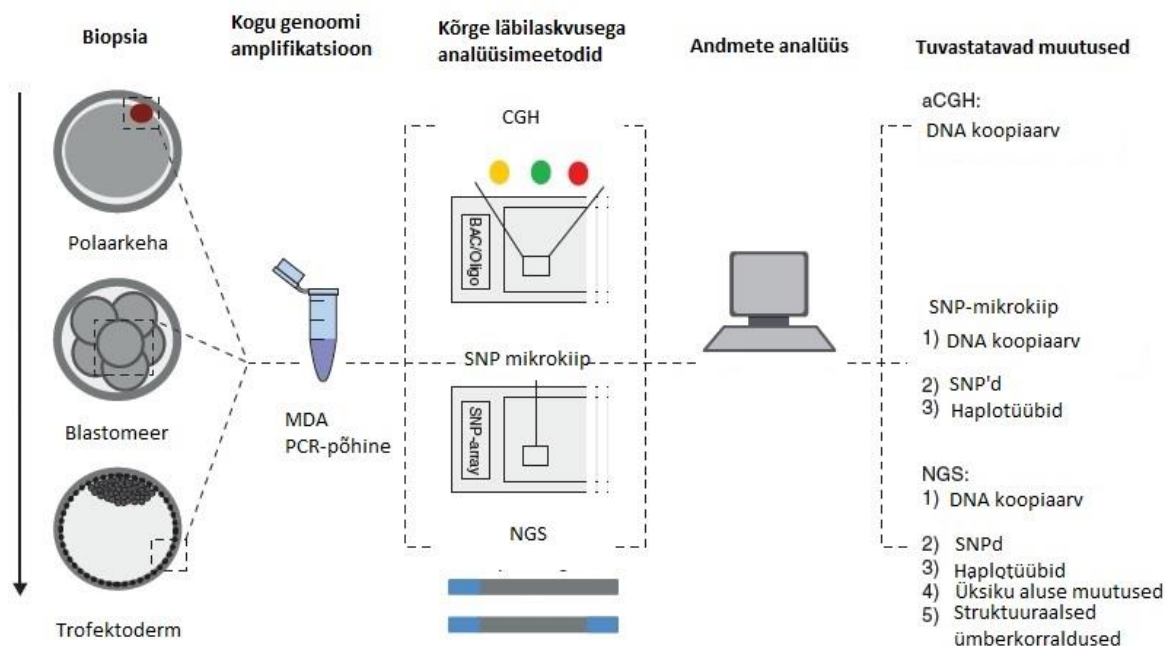
Uuem tehnoloogia, mikrokiibi põhine CGH (aCGH), töötati välja analüüside täpsuse ja efektiivsuse tõstmiseks. aCGH lubab translokatsioonide ja teiste aneuploidsuste sõeluuringut kõigil 24 kromosoomil. Ühtlasi on automatiseeritud andmete lugemine, mis välistab fluorestsentssignaalide palja silmaga jälgimise. (Wu *et al.*, 2013) Nagu ka tavalise CGH meetodiga, kasutavad mikrokiibid erisuguselt märgistatud uuritava ja teadaoleva karüotüübiga võrdlus DNA võrdlevat hübridiseerimist. Iga DNA proov on spetsiifiline erineva kromosoomi piirkonna suhtes ning hõivab alusel kindla koha. Taaskord on kromosoomide lisa või kaotus väljendatud erinevate positsioonide fluorestsentsi intensiivsusega. Joonisel 4 on kujutatud erinevate märgistega DNA hübridiseerimine mikrokiibile ning tulemuste analüüs fluorestsentssignaalide suhte põhjal. Võrreldes tavalise CGH meetodiga, on mikrokiipidel põhinev hübridisatsioon vähem aeganõudev, mis teeb meetodi sobilikuks implantatsioonieelsete analüüside teostamiseks ilma embrüote külmutamise vajaduseta. (Wells *et al.*, 2008) Kuigi üksikraku aCGHl on FISHi ees eeliseid, tuleb arvesse võtta, et WGA produktis esinev ADO ja ADI võivad mõjutada fluorestsentssignaale ühe või teise alleeli kasuks ning lookus-spetsiifilise amplifikatsiooni tulemus võib sõltuda omadustest nagu lookuse guaniini- ja tsütosiinirikkus (Van der Aa *et al.*, 2013).



Joonis 4. Mikrokiibi analüüsi käigus erinevalt märgitud uuritava ja referents DNA proovide hübridiseerimine oligonukleotiid proovidega, millele järgneb fluorestsentssignaalide intensiivsuse analüüs ja koopiaarvu muutuste tuvastamine (Larsen *et al.*, 2013)

Veel üheks aneuploidsusi detekteerivaks mikrokiibiks on üksiknukleotiidsete polümorfismide (SNP) analüüsil põhinev meetod ehk SNP mikrokiip (Wells *et al.*, 2008). Nagu ka aCGH, pakub

SNP mikrokiiptehnoloogia ülegenoomset meetodit DNA koopiaarvu muutuste analüüsiks (Van der Aa *et al.*, 2013). Üldiselt lubab SNP mikrokiip tehnoloogia tuvastada tsütogeneetiliste rakenduste jaoks 10 000 kuni 500 000 üksiknukleotiidset polümorfismi erinevates positsioonides üle kõigi kromosoomide. SNP mikrokiibi põhimõte on sama, mis tavalisel DNA mikrokiibil, mille puhul toimub DNA hübridisatsioon ja fluorestsentssignaalide analüüsimine, kuid SNP kiibi puhul ei hübridiseerita patsiendi DNAd koos kontroll DNAGA, vaid iga proovi fluorestsentssignaali intensiivsust võrreldakse olemasoleva andmebaasiga. Selle asemel, et kombineerida amplifitseeritud uuritav geneetiline materjal võrdlus DNAGA, hübridiseeritakse see eraldi, hinnates võrdlusproove paralleelselt. Seega on võimalik uuritava materjali märkimine sama värviga. DNA koopiaarv arvutatakse kahel viisil. Esiteks võrreldakse igas SNP lookuses detekteeritud allelele vanemate omadega, mis näitab, millised vanemate alleelid on embrüole pärandunud. Seejärel võrreldakse uuritava DNA ja võrdluspaneeli fluorestsentssignaalide intensiivsust. Kui mingis kromosoomis annavad vaadeldud SNP markerid uuritava DNA kohta intensiivsema signaali, kui võrdluses, võib oletada kromosomaalse materjali lisa ning vastupidi nõrgem fluorestsents osutab materjali kaotusele. (Wells *et al.*, 2008) SNP põhise meetodiga on võimalik tuvastada ka heterosügootsuse kadu. (Van der Aa *et al.*, 2013) SNP mikrokiibi oluline eelis on lisaks kromosoomi koopiaarvu tuvastamisele ka genotüübi kohta saadav info. Tuhandete üle genoomi paiknevate polümorfismide üheaegne analüüs annab igale uuritavale embrüole ainulaadse DNA sõrmejälje, mille abil saab tuvastada vanemliku päritolu. (Wells *et al.*, 2008) SNP-mikrokiip ning ka teised uuemad üksikraku geneetilise analüüsi meetodid ning nendega tuvastatavad muutused DNAs on näha joonisel 5 leheküljel 25.



Joonis 5. Üksikraku geneetiline analüüs PGDs. Pärast biopsiat teostatakse WGA ning analüüsitakse geneetilist materjali CGH mikrokiibi, SNP mikrokiibi või järgmise põlvkonna sekveneerimisega. Iga analüüsiplatvorm lubab erinevate geneetiliste muutuste detekteerimist. (Van der Aa *et al.*, 2013)

6.5 Järgmise põlvkonna sekveneerimine (NGS)

Uue põlvkonna sekveneerimistehnoloogiate (NGS) kasutuselevõtuga sai võimalikuks terve genoomi kõigi geneetiliste varieeruvuste uurimine ühe katse käigus. PGD jaoks võib see tähendada nii uut meetodit kõigi võimalike näidustuste uurimiseks, kui ka embrüote analüüsimist *de novo* mutatsioonide suhtes. NGS ehk teise põlvkonna sekveneerimine võimaldab järjestada paralleelselt suure hulga DNA molekule ning ületada probleemid nagu vähene informatsioon ja kõrge hind. Sekveneerimiseks koostatakse DNA raamatukogu, mida kasutatakse paralleelse sekveneerimisel alusena. Tulemuseks saadud kuni 100 aluspaari pikkused, kas ühest või mõlemast otsast sekveneeritud järjestused kaardistatakse referents genoomile geneetiliste varieeruvuste tuvastamiseks. (Handyside, 2013; Van der Aa *et al.*, 2013)

NGSil on võrreldes DNA mikrokiipidega mitmeid analüüside täpsust ja usaldusväärsust parandavaid eeliseid. Kui mikrokiibiga kontrollitakse üksikraku kindlaid, proovide poolt määratud lookusi, siis NGS on hüpoteesivaba, võimaldades analüüsida peaaegu igat amplifitseeritud nukleotiidi. Sekveneerimine lubab erinevalt SNP mikrokiibist üle genoomi

paiknevate *de novo* DNA mutatsioonide avastamist ning andmete analüüs ei sõltu proovispetsiifilisest fluorestsentsi intensiivsusest. (Van der Aa *et al.*, 2013)

7 Embrüo siirdamine

Kui analüüsid on teostatud ning tulemused saadud, siiratakse PGD tsükli neljandal või viiendal päeval, enne embrüo loomulikku pesastumisaega, üks või kaks sobilikuks tunnistatud embrüot steriilsetes tingimustes patsiendi emakasse (Van der Aa *et al.*, 2013). Välja valitud embrüod süstitakse peene kateetri abil emakaõõnde. Kuna siirdamisest üle jäänud embrüod säilitatakse külmutamise teel, saab neid siirdamise ebaõnnestumisel järgmiste tsüklite jooksul kasutada. Külmutatud embrüo siirdamine ei erine värske embrüoga teostatavast protseduurist. Pärast transplanteerumist alustatakse patisendil toetavat ravi progesterooniga, mis võib kesta kuni raseduse 12. nädalani. (Tonsiver *et al.*, 2013). Võib ka juhtuda, et siirdamist ei saa teostada, kuna ükski analüüsitud embrüo ei ole ülesehituselt sobilik või ei ole analüüsi tulemused piisavad, et otsustada täpselt embrüo seisundi üle (Hershberger *et al.*, 2011).

8 Riskid

PGD, mis on suureks abiks geneetiliste häiretega paaridele, on siiski küllaltki agressiivne meetod, sest embrüolt eemaldatakse üks või mitu rakku. Protseduurid, mis on vajalikud analüüside läbiviimiseks, võivad häirida arenevat embrüot ning mõjutada lõpptulemust. Lõigustumisstaadiumis, kus embrüo ei ole veel arenenud sisemiseks ja välimiseks rakumassiks ning kõik rakud panustavad võrdselt embrüo edasisse arengusse, on biopsia jooksul tekitavateks häiringuteks suurem oht, kui hilisemas staadiumis. Piiratud materjali tõttu on probleemidele vastuvõtlikumad polaarkehjad ja blastomeeri rakud, samas kui TE rakkude kasutamine, millest saab eraldada rohkem geneetilist ainet, vähendavad riske. Võttes arvesse rakkude suhet, millest embrüo koosneb ning mitu rakku eraldatakse, peaks blastotsüsti staadiumi olema arengu seisukohast vähem häirivam. (Milachich, 2013)

Kuna biopsia nõuab embrüo lühiajalist inkubaatorist eemaldamist, embrüokesta augu tegemist ning rakkude eemaldamist, võiks arvata, et embrüo võib sellisest käsitlemisest kahjustuda. Kui

lõigustusstaadiumi biopsia teostatakse kahe kuni nelja raku staadiumis, ehk eemaldatakse veerand rakumassist, mõjutab see arengut rohkem, vähendades sisemise- ja välimise rakumassi suhet. Seevastu kaheksa rakulise embrüoga töötades on embrüo areng vähem mõjutatud. (Hardy and Handyside, 1993)

Lisaks biopsia häirivale mõjule on PGD küllaltki suur oht valediagnoosimine. Valediagnoosi põhjuseid on mitmeid, nii kasutatava meetodi põhiseid kui ka üldisemaid bioloogilisi või tehnoloogilisi puuduseid. (Brezina *et al.*, 2012) Üksikraku geneetilise testimisega kaasnevad teatud ohud piiratud materjali tõttu nagu amplifikatsiooni ebaõnnestumine, alleeli väljalangemine ning saastumine välise DNAGA. Põhjused võivad olla eriomased PCRile, FISHile või rakenduda mõlemale meetodile võrdselt. Isegi ülitäpset PCR tehnoloogiat kasutades teevad piirangud nagu mosaiiksus ja enese-parandus mehhanism täpse diagnoosi paneku raskeks, seega on võimalik tõlgendada valesti vea esinemine. (Milachich, 2013) Tehniliste limitatsioonide tõttu, nagu kasutada olevate fluorokroomid ja analüüside jaoks vajaminev aeg PGSi teostamisel, saab FISHiga testiga vaid kindla arvu kromosoomi, seega ei tuvastata aneuploidseid embrüoid, mille viga asub mitte-uuritavas kromosoomis (Mastenbroek *et al.*, 2011).

Väärdiagnoosi tagajärjed ei pruugi olla patsiendi jaoks alati negatiivse efektiga, kuid ebasoodsate juhtude korral võib tulemusena sündida haige laps või katkeda terveks tunnistatud embrüoga rasedus. Samas võib resultaatina sündida ka terve, kuid mutatsiooni kandev järglane juhul, kui embrüo tunnistati ekslikult terveks. (Wilton *et al.*, 2009) Väärdiagnoosi põhjusteks võivad olla veel valesti tõlgendatud tulemused, vale embrüo siirdamine, kontaminatsioon ja ebasobilike praimerite või proovide kasutamine, millest suuremat osa on võimalik ära hoida töötajate korrektse väljaõppega (Wilton *et al.*, 2009.) Kindlasti tuleb protseduuri läbivate patsientidega arutada PGD limitatsioone ning teavitada neid valediagnoosi ohust (Hershberger *et al.*, 2011).

Tabel 3. Valediagnoosi põhjused ja ärahoidmise võimalused (Wilton *et al.*, 2009)

Põhjus	Ärahoidmine
<ul style="list-style-type: none"> • Ema- või isapoolne kontaminatsioon • Mosaiiksus • ADO • Proovi või praimerite ebaõnnestumine • Valesti märgitud proovid, valesti tõlgendatud tulemus, vale embrüo siirdamine • Analüüside teostaja poolne kontaminatsioon 	<ul style="list-style-type: none"> • ICSI viljastamiseks, enne biopsiat eemaldada kõik <i>cumulus</i> 'e rakud. • Teise raku ja polaarkehade analüüsimine • Rohkem kui ühe raku eemaldamine • WGA kordusanalüüsiks • Piisav väljaõpe • Korralik kaitseriietus ja reguleeritud keskkond

9 Eetika

Implantatsioonieelse diagnostika kasutusvõimalused on laienemas ning lisaks geneetiliste haiguste tuvastamisele ning aneuploiduste sõeluuringule kinnitavad kanda ka uued kasutuspõhjused. Nende hulka kuuluvad hilise avaldumisega haiguste ja vähi eelsoodumuse kindlaks tegemine ning ka mitte-meditsiiniline soovalik ja HLA sobitamine. Sellised rakendused tõstatavad aga küsimusi eetilise vastuvõetavuse kohta. (Robertson, 2003)

Üheks kõige vastuolulisemaks PGD rakenduseks on mitte-meditsiiniline soovalik, mida patsiendid võivad soovida perekonna tasakaalustamiseks või lihtsalt soo eelistamiseks, kui vanemad soovivad vaid ühte last. Peamine mitte-meditsiiniliste põhjustega soovaliku kasutamise mure on võimalik negatiivne efekt populatsioonide soolisele tasakaalule (Brezina *et al.*, 2012). Osades Hiina piirkondades näiteks on viimasel aastakümnel toimunud populatsioonis muutus nii, et iga saja naise kohta on 150 meest. Sellise nähtuse peamiseks põhjuseks on ebasoovitava sooga raseduste katkestamine, imikute hukkamine ning tüdruklaste madalam hoolitsuse tase. Sellises ühiskonnas võib implantatsioonieelne soovalik viia tõsiste

sooliste tasakaalutusteni. Seega, kuigi soovalik ei ole kahjulik potentsiaalsele lapsele, võivad negatiivsed tagajärjed väljenduda ühiskonnas. (Klipstein, 2005) See ning põhjus, et terved embrüod jäetakse kõrvale vaid ebasobiva soo pärast, on peamised põhjused, miks mitte-meditsiiniline soovalik paljudes riikides seadusevastane on (Brezina *et al.*, 2012).

Kui praegu omame tehnoloogiat, et valida embrüoid soo alusel, siis pole võimatu, et tulevikus võime identifitseerida DNA järjestusi ja geene, mis määravad tunnuseid nagu pikkus, tugevus ja intelligentsus. Eetilisest seisukohast on selline tehnoloogia kasutus, ehk soovitavate tunnuste valimine embrüos, aga küsitav. (Brezina *et al.*, 2012) Inimese isiksuse ning nii vaimsete kui füüsiliste tunnuste geneetilise tausta mõistmine on geneetilise testimise seisukohalt libe tee, mille potentsiaalset kalduvust eugeenikale ei saa ignoreerida. Tekivad küsimused, et kui vanematel oleks selleks võimalus, kas nad valiksid oma tulevase järglase tunnuseid eesmärgil tagada neile parem elu ning kas selline väljavaade viiks ühiskonnani, kus oleks võimalik indiviidide ehk niinimetatud „disainlaste“ sünnieelne kujundamine. (Robertson, 1996)

Juhul, kui PGDd kasutatakse HLA-identse embrüo valimiseks, tekivad doonorlapse heaolu ja väärtustamisega seotud küsimused (Liu, 2007). Kuna siirdatakse vaid embrüod, mille koetüüp sobib olemasoleva haige lapsega, ning teised (ka terved) embrüod jäetakse kõrvale, võib oletada, et doonorlapsed luuakse ainsa põhjusega päästa õde või vend. Selline käsitlemine tekitab kahtlusi, et laps sünnib vaid kindla eesmärgiga, mitte tema enda isiksuse väärtuse pärast. Kuigi ei tohiks olla kahtlust, et igat last armastatakse ning väärtustatakse perekonnas ühte viisi, ei saa välistada lapse vahendina kasutamise seotud muresid, mis sellise meetodi kasutusel tekivad. (Klipstein, 2005).

ARUTELU

Kui sünnieelne diagnostika 1980ndate aastate keskpaigas kanda kinnitas, sai selgeks, et vanematel, kellel on potentsiaalne oht kanda järglastele edasi geneetiline haigus või muudatustega kromosoomid, puudub selge väljavaade oma tulevase lapse tervisest. Abistatud reproduktiivtehnoloogia kasutamise saai võimalikuks *in vitro* viljastamise teel saadud embrüote diagnoosimine enne emakasse siirdamist ning seega saai võimalikuks preimplantatsioonilise geneetilise diagnostika areng. Esimesed edukad rasedused saavutati 1990. aastal ning alates sellest ajast on riskialtis vanematel võimalus PGD kasutamiseks, kui riik seda seadusega lubab.

Kuigi PGDd kasutati algselt X-liiteliste ja autosomaal-retsessiivsete haiguste kindlaks tegemiseks, on protseduuri tegevusulatus 25 kasutusaasta jooksul tugevalt laienenud. Käesoleval ajal on saanud võimalikuks üha suurema arvu geneetiliste häirete ning aneuploiduste, nagu 21. kromosoomi trisoomia, detekteerimine. Sellest ajast peale on geneetilise analüüsi tehnikad üksikraku tasemel arenenud, kasutusele on FISH kromosoomide, PCR geenide analüüsiks ning tutvustatud ka uuemaid kõiki 24 kromosoomi analüüsivaid mikrokiibi põhiseid meetodeid. Siiski, ka pärast 25 aastat kasutust, on väljakutseks vähene DNA kogus ning analüüside teostamiseks sobilik lühike ajaaken.

Kuigi viljatuse ravi tulemuslikkus on aastate jooksul paranenud, õnnestub siiski vaid umbes 30% IVF-protseduuridest. Üks peamine implantatsiooni edukuse määra langetaja ja põhjus, miks abistatud reproduktiivtehnoloogia tulemuslikkus suhteliselt madal püsib, on kromosomaalsete defektide esinemine embrüotes. PGS, mille eesmärk on detekteerida aneuploidustega embrüod ning seeläbi vältida nende siirdamist, peaks olema suureks abiks patsientidele, kes on üle 35 aasta vanad, kellel esinevad korduvad raseduse katkemised kromosoomiarvu muutuste tõttu või religioossed ja moraalsed vastuväited abordile. Tuvastades muutused embrüo kromosomaalses ülesehituses enne implanteerumist, saab vältida embrüote siirdamist, mille väljavaated edukaks raseduseks ei ole head.

PGD on alates kasutuselevõtust olnud vastuoluline ning tõstatanud mitmeid eetikat puudutavaid küsimusi. Erinevates riikides on implantatsioonieelseid analüüse puudutavad seisukohad erinevad ning see väljendub ka seadusandluses. Peale maade, kus meetod täielikult keelatud on, leidub ka neid riike, kus lubatud on näiteks vaid polaarkehade käsitlemine, jättes nii puutumata embrüo enda. Kuigi valdav seisukoht on, et PGD on päranduvate haiguste tuvastamiseks prenataalsest diagnostikast sammu võrra ees, on mure, et pikkamööda hakatakse teguviisi kasutama mittehädavajalikel põhjustel. Soovitavate omaduste valimine järglastes ja

„disainlaste“ loomine on libe tee, millel on omad kalduvused eugeenikale. On arusaadav, et ühiskond on ettevaatlik tehnoloogia osas, mis võib potentsiaalselt ennustada indiviidi võimeid baseerudes geneetilisel analüüsil. Selletõttu on oluline, et PGD kasutataks vaid seisundite jaoks, mis mõjutavad tulevase lapse tervist. Samas on võimalik vaielda ka haiguse tõsiduse ja avaldumisaja üle. Näiteks, kuidas tegutseda, kui tegemist on hilise avaldumisega haiguse, näiteks Huntingtoni tõve või vähi eelsoodumuse geenidega, mis iseenesest ei anna 100% kindlust, et haigus indiviidis ka kunagi esile tuleks. Kuigi enamus riike on üksmeelel, et PGD „disaini“ eesmärgil on vastuvõetamatu, teostatakse siiski mitte-meditsiinilist soovalikut, mis on iseenesest ohutu, paneb see eetilise poole üle järgi mõtlema.

Pole kahtlust, et implantatsioonieelne diagnostika ja sõeluuringud on tervete järglaste saamise seisukohalt hindamatu väärtusega. Siiski tekitab biopsia potentsiaalne agressiivsus embrüo suhtes probleeme, mille elimineerimiseks on tulevikuplaani võetud mitte-invasiivsed meetodid embrüote geneetilise seisundi määramiseks. Blastotsöoli vedeliku ja DNA eraldamine ilma biopsiata ning toitelahuse valgusisalduse uurimine on väljavaated, mille abil häirivat mõju elimineerida. Kuigi need meetodid on paljulubavad, ei ole veel piisavalt tõestusmaterjali, mille põhjal praegu kasutusel olevad meetodid uutega asendada saaks. (Milachic, 2014)

Lisaks häiringutele, mis biopsia teostamisega kaasneda võivad, on PGD küllaltki suur oht valediagnoosimine. Valediagnoosi põhjuseid on mitmeid, need puudutavad nii kasutatavaid analüüsi meetodeid kui ka erinevaid bioloogilisi põhjuseid. Blastomeeridel esinev mosaiiksus ning iseeneslik korrektuur on isegi väga täpsete tehnoloogiate korral arvestatav takistus. Embrüotelt analüüsiks eraldatav geneetiline materjal on piiratud ning vajab paljundamist, millega võivad kaasneda amplifikatsiooni ebaõnnestumine või alleeli väljalangemine, mille puhul on risk tõlgendada valesti vea esinemine ning anda seega embrüole valediagnoos. Ka materjali saastumine välise DNAGA on analüüsides läbiviimisel suureks ohuks. PGDd saab teostada kindlate haiguste leidmiseks, seega võivad jääda tuvastamata uued tekkinud muudatused ning terveks määratud embrüod võivad siiski kanda endas defekte.

Vaatamata muredele, mis tulenevad biopsia agressiivsusest ning võimalikust häirivast mõjust embrüole, on preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika olulise väärtusega paaridele, kellel esinevad viljakusprobleemid või geneetilised haigused. Analüüsides ajamahukus ning kõrged hinnad, mis lubaksid täpsematel meetoditel laiemalt levida, on pikemas perspektiivis ületatavad probleemid ning uute tehnoloogiate järkjärguline kasutuselevõtt klassikaliste asemel saab suure tõenäosusega võimalikuks.

KOKKUVÕTE

Alates PGD kasutuselevõtust 1990. aastate alguses, on meetod arenenud võimsaks vahendiks geneetiliste haiguste poolt mõjutatud laste sünni vältimiseks. Paarid, kes kannavad päranduvaid haigusi või kromosomaalseid ümberkorraldusi, saavad olla kindlad, et nende järglane on terve, vältides seejuures emotsionaalselt raske abordi sooritamist. PGD tehniline külg on olnud pidevas arengus ning seejuures on laienenud ka näidustuste ring, andes võimaluse analüüse teostada ning neist kasu saada üha rohkematele indiviididel. Järgmise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiate kasutuselevõtuga on saanud võimalikuks üksikraku terve genoomi iseloomustamine kõikide võimalike geneetiliste muudatuste suhtes. Erinevalt mikrokiibi analüüsides, kus on võimalik tuvastada vaid proovide poolt määratud mutatsioone, lubab NGS detekteerida igas embrüos nii päranduvad kui ka kõikvõimalikud *de novo* koopiaarvu muutused. Üksikraku genoomi sekveneerimine võib kulude alanedes ning analüüsikestvuse vähenedes saada implantatsioonieelses diagnostikas tavapäraseks kliinilises praktikas kasutatavaks meetodiks.

Kõigi 24 kromosoomi üheaegseks analüüsiks arendatud meetodid, nagu DNA mikrokiibid ja uue põlvkonna sekveneerimine, võimaldavad saada suuri andmekoguseid kiiresti ning vähendatud kuludega. Usaldusväärsete embrüo säilitusmeetodite kasutuselevõtuga on eemaldatud uute analüüsimeetodite rakendamise ajalised takistused ning võimalikuks saanud nende laialdasem kasutuselevõtt. Piirangud, nagu vähene geneetilise materjali kogus ja sellest tingitud analüüsikestvus, on ületatavad kogu genoomi amplifikatsiooni rakendamisel. WGA, eriti MDA põhise meetodi tutvustamine, teeb võimalikuks mitmete suurt DNA kogust vajavate analüüsikestvuse teostamise ning tulemuste täpsema tõlgendamise.

Patsiendid, kes otsustavad PGD kasuks, peavad läbima mitmeastmelise protsessi, mis sisaldab kunstliku viljastamist, biopsiat, geneetilist testimist ning embrüo siirdamist. Kuna protseduurid, mis läbi viiakse võivad olla häirivad nii embrüole kui emale, tuleks enne alustamist korralikult kaaluda kõiki meetodiga kaasnevaid eeliseid ja puudusi ning arvestada võimaliku väärdiagnoosi ohuga.

Nagu teadus ning meie arusaamine geneetika ja haiguste seostest edeneb, kasvab suure tõenäosusega ka implantatsioonieelse diagnostika kasutus. Tehnoloogia areng võimaldab rakendada geneetilisteks analüüsikestvuseks üha uusi meetodeid, parandab testide nagu PGD ja PGS täpsust ning efektiivsust, lubades neid rakendada veelgi laiemal otstarbel kui praegu.

SUMMARY

Preimplantation genetic diagnosis

Grete-Katariine Kuum

More than two decades after the first application, preimplantation genetic diagnosis (PGD), that aims to help couples with heritable genetic disorders to avoid the birth of affected offspring, is an established medical procedure and an accepted alternative to conventional prenatal diagnosis. The great advantage of PGD is that the diagnostic procedure is made at the embryo stage, before transfer to the mother, and the need for pregnancy termination is avoided.

The main indications for PGD are heritable disorders, X-linked diseases and chromosomal copy-number aberrations that may lead to recurrent miscarriages. Preimplantation genetic screening (PGS), has been introduced to help couples who have normal karyotypes, but have fertility problems that can occur because of recurrent implantation failure, miscarriage, advanced maternal age or male factor infertility.

PGD can only be performed after in-vitro fertilisation followed by embryo biopsy and genetic analysis of single cells. The biopsy is performed on three different stages of development: polar body biopsy from oocytes, blastomere biopsy and trophectoderm (TE) biopsy. After removing the cells from the embryo, genetic evaluation using different methods takes place.

Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) has been introduced for the analysis of chromosomes and PCR for the analysis of genes in cases of monogenic diseases. In addition to these two main techniques, new methods using whole genome amplification (WGA) and microarrays for genomic hybridization have been developed to assess all 24 chromosomes of the cell and increase accuracy and efficiency of the tests.

Since the start of PGD, it has been a controversial method that not all individuals or countries accept. There has been a concern, that as PGD evolves, the seriousness of the conditions used for will lessen and provide the society a tool to „design“ their successors. For that reason there is a consensus, that PGD should only be used, when the health of the potential child is affected.

PGD is a complex procedure for both the couple as well as the embryo. However, for couples at high risk of having an affected child, PGD may be the most attractive alternative to conceive unaffected children

TÄNUAVALDUSED

Sooviksin tänada oma juhendajat professor Ants Kurge mõistva ja abistava suhtumise ning vajalike näpunäidete eest antud lõputöö valmimisel. Suure tänuavalduse soovin teha ka oma korterikaaslastele ning vanematele, kelle toetavate sõnadega viimased kuud möödusid.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Asscher E. and Koops B.J. (2010). The right not to know and preimplantation genetic diagnosis for Huntington's disease. *J Med Ethics*. 36: 30-33.
2. Ata B., Kaplan B., Danzer H., Glassner M., Opsahl M., Tan S.L. and Munné S. (2012). Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related to the number of embryos generated. *Reprod. Biomed. Online* 24(6): 614–620.
3. Baart E. B., Martini E., van den Berg I., Macklon N. S., Galjaard R-J. H., Fauser B. C. J. M., and Van Opstal D. (2006). Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 21 (1): 223-233.
4. Bellavia M., Von Der Weid N., Peddes C., Jacquemont S., Liebaers I., Hohlfelt P., Wunder-Galié D. and De Ziegler D. (2010). Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for HLA typing: Bases for setting up an open international collaboration when PGD is not available. *Fertil Steril.* 94(3): 1129-31.
5. Bielanska M., Lin Tan S. and Ao A. (2001). Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum. Reprod.* 17 (2): 413-419.
6. Brezina P. R. (2012). Preimplantation Genetic Testing in the 21st Century: Uncharted Territory. *Reprod. Health* 2013:7 17–21.
7. Brezina P. R. and Kutteh W. H. (2015). Clinical applications of preimplantation genetic testing. *BMJ* 2015; 350 :g7611.
8. Christopikou D., Tsorva E., Economou K., Shelley P., Davies S., Mastrominas M., Handyside A. H. (2013). Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum. Reprod.* 28(5) : 1426-1434.
9. Cobo A., de los Santos M. J., Castello D., Gamiz P., Campos P. and Remohi J. (2012). Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil. Steril.* 98:1138–1146. e1131.
10. Cohen J., Elsner C., Kort H., Malter H., Massey J., Mayer M. P. and Wiemer K., (1990). Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum. Reprod.* 5: 7–13.
11. Coonen E., Hopman A. H. N., Geraedts J .P. M. and Rademaekers F. C. S. (1998). Application of in-situ hybridization techniques to study human preimplantation embryos: a review. *Hum. Reprod. Update* 4, 135–152.

12. Coughlan C. and Ledger W.L. (2008). In-vitro fertilisation. *Obstetrics, Gyn. & Reprod. Med.* 18 (11), 300-306.
13. De Vos A. and Van Steirteghem A. (2001). Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* 21:767–80.
14. De Vos A., Staessen C., De Rycke M., Verpoest W., Haentjens P., Devroey P., Liebaers I. and Van de V. (2009). Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum. Reprod.* 24: 2988–2996.
15. Edgar D. H. and Gook, D. A. (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum. Reprod.* 18 (5): 536.
16. Egozcue J., Santalo J., Gimenez C., Perez N. and Vidal F. (2000). Preimplantation genetic diagnosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 15;166 (1):21-5.
17. ESHRE. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum. Reprod* 2002;17:233–46.
18. Ethics Committee of American Society for Reproductive Medicine. (2013). Use of preimplantation genetic diagnosis for serious adult onset conditions: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 100(1):54-7.
19. Ferraretti A.P., Goossens V., de Mouzon J., Bhattacharya S., Castilla J.A., Korsak V., Kupka M., Nygren K.G., Nyboe Andersen A.; European IVF-monitoring (EIM); Consortium for European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). (2012). Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum. Reprod.* 27 (9):2571–84.
20. Fragouli E. and Wells D. (2011). Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenet. Genome Res.* 133(2–4): 149–159.
21. Geraedts J. P. M. and De Wert G. M. W. R. (2009). Preimplantation genetic diagnosis. *Clin.Genet.* Vol 76: 4, 315–325.
22. Gill P., Whitaker J., Flaxman C., Brown N. and Buckleton J. (2000). An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100pg of DNA. *Forensic Sci. Int.* 112, 17–40.
23. Granne I., Child T. and Hartshorne G. (2008). Embryo cryopreservation: evidence for practice. *Hum Fertil (Camb)* 11(3): 159-172.
24. Handyside A. H. (2013). 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available Technologies. *Fertil Steril.* 100(3):595-602).

25. Handyside A. H., Kontogianni E. H., Hardy K., Winston R. M. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344 (6268): 768-770.
26. Hardarson T., Hanson C., Lundin K., Hillensjö T., Nilsson L., Stevic J., Reisner E., Borg K., Wikland M. and Bergh C. (2008). Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: A randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 23 (12): 2806-2812.
27. Hardy K. and Handyside A. H. (1993). Cell allocation in twin half mouse embryos bisected at the 8-cell stage: implications for preimplantation diagnosis. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 16–22.
28. Harper J. C., Coonen E., De Rycke M., Harton G., Moutou C., Pehlivan T., Traeger-Synodinos J., Van Rij M. and Goossens V. (2010). ESHRE PGD Consortium data collection X: Cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum. Reprod.* 25 (11): 2685-707.
29. Harper J.C. and Sengupta S.B. (2012). Preimplantation genetic diagnosis: State of the art 2011. *Hum. Gen.* 131:175-186.
30. Hershberger P.E., Schoenfeld C. and Kasper I. T. (2011). Unraveling Preimplantation Genetic Diagnosis for High-Risk Couples Implications for Nurses at the Front Line of Care. *Nurs Womens Health.* 15(1): 36–45.
31. Illumina (2014). Preimplantation Genetics Publications. Pub 1570-2014-43.
32. Iwarsson E., Malmgren H. and Blennowa E. (2011). Preimplantation genetic diagnosis: twenty years of practice. *Semin Fetal Neonatal Med.* 16(2):74-80.
33. Joris H., De Vos A., Janssens R., Devroey P., Liebaers I. and Van Steirteghem A. (2003). Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode medium or a laser. *Hum. Reprod.* 18 (9): 1896-1902.
34. Klipstein S. (2005). Preimplantation genetic diagnosis: technological promise and ethical perils. *Fertil Steril.* 83(5):1347-53.
35. Kopeika J., Thornhill A. and Khalaf Y. (2014). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum.Reprod. Update* 21 (2): 209–227.
36. Kupker W., Hubert G., Ludwig M. and Diedrich K. (2001). Preimplantation genetic diagnosis in Germany—ethical responsibility and law. *Reprod Biomed Online* 2:84–87.

37. Larsen E. C., Swanwick C. C. and Banerjee-Basu S. (2013). Genetic Evaluation of Individuals with Autism Spectrum Disorders. *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I*.
38. Leiter G. (2014). What Israeli policy can teach us about elective sex selection. *Isr. J. Health. Policy Res.* 18;3(1):42.
39. Liu C. K. (2006). ‘Saviour Siblings’? The Distinction between PGD with HLA Tissue Typing and Preimplantation HLA Tissue Typing. *Bioethical Inquiry* 4:65–70.
40. Loutradi K. E., Kolibianakis E. M., Venetis C. A., Papanikolaou E. G., Pados G., Bontis I. and Tarlatzis B. C. (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 90 (1): 186-193.
41. Ly K. D., Agarwal A. and Nagy Z.P. (2011). Preimplantation genetic screening: Does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28: 833-849.
42. Mastenbroek S., Twisk M., Van der Veen F. and Repping, S. (2011). Preimplantation genetic screening: A systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum. Reprod. Update*, 17: 454-466.
43. McArthur S. J., Leigh D., Marshall J. T., de Boer K. A. and Jansen R. P. (2005). Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil. Steril.* 84 (6): 1628–36.
44. Mertzaniidou A., Spits C., Nguyen H. T., Van de Velde H. and Sermon K. (2013). Evolution of aneuploidy up to day 4 of human preimplantation development. *Hum. Reprod.* 28 (6): 1716–1724.
45. Montag M., van der Ven K., Rösing B. and van der Ven H. (2009). Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening. *Reprod Biomed Online*. 18 Suppl 1:6-11.
46. Ombelet W., Cooke I., Dyer S., Serour G. and Devroey P. (2008). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum. Reprod. Update* 14(6): 605-621.
47. Pehlivan T., Rubio C., Rodrigo L., Remohí J., Pellicer A. and Simón C. (2003). Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization: clinical possibilities and pitfalls. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10(6):315-22.
48. Pennings G. and De Wert G. (2003). Evolving ethics in medically assisted reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 9 (4): 397-404.
49. Pensée W., Whiteford M. L. and Cameron A. D. (2014). Preimplantation genetic Diagnosis. *Obstetrics, Gynaecology & Reprod. Med.* 24: 3, 67–73.

50. Robertson J.A. (1996). Genetic selection of offspring characteristic. *Boston Univ. Law. Rev.* 421,76–92.
51. Robertson J. A. (2003). Extending preimplantation genetic diagnosis: the ethical debate. *Ethical issues in new uses of preimplantation genetic diagnosis. Hum. Reprod.* 18:3, 465-471.
52. Salumets A., Karits P., Tiido T. ja Saarma I. (2003). Embrüoselektiooni uued võimalused – embrüodiagnostika. *Eesti Arst* 2003; 82 (3):188 – 191.
53. Scott R. T. Jr., Ferry K., Su J., Tao X., Scott K. and Treff N. R. (2012). Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertil. Steril.* 97(4): 870-875.
54. Sermon K., Van Steirteghem A. and Liebaers I. (2004). Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet.* 363: 1633–41.
55. Silber S.J., Nagy Z.P., Liu J., Godoy H., Devroey P. and Van Steirteghem A.C. (1994). Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum. Reprod.* 9(9):1705-9.
56. Staessen C., Platteau P., Van Assche E., Michiels A., Tournaye H., Camus M., Devroey P., Liebaers I. and Van Steirteghem A. (2004). Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: A prospective randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 19: 2849-2858.
57. Zhao Y., Brezina P., Hsu C. C., Garcia J., Brinsden P. R. and Wallach E. (2011). In vitro fertilization: four decades of reflections and promises. *Biochim. Biophys. Acta.* 1810(9): 843-852.
58. Zheng Y.-M., Wang N. and Jin F. (2011). Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis. *J. Zhejiang. Univ. Sci. B.* 12(1): 1–11.
59. Thornhill A. R. and Snow K. (2002). Molecular Diagnostics in Preimplantation Genetic Diagnosis. *J. Mol. Diagn.* 4(1): 11–29.
60. Tonsiver T., Ehrenberg A., Ringmets I., Saare K., Lepik K. ja Kiivet R A. (2013). Kehavälise viljastamise efektiivsus ja kulud Eestis. Tartu: Tartu Ülikooli tervishoiu instituut.
61. Van der Aa N., Esteki M. Z., Vermeesch J. R., Voet T. (2013). Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med* 5(8): 71.
62. Verlinsky Y., Ginsberg N., Lifchez A., Valle J., Moise J. and Strom C. M. (1990). Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* 5 (7): 826–829.

63. Verlinsky Y., Cieslak J., Freidline M., *et al.* (1995). Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum. Reprod.* 10(7):1923-7.
64. Voet T., Vanneste E. and Vermeesch J. R. (2011). The human cleavage stage embryo is a cradle of chromosomal rearrangements. *Cytogenet. Genome Res.* 133 (2-4): 160-8.
65. Wilton L., Thornhill A., Traeger-Synodinos J., Sermon K.D. and Harper J. C. (2009). The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD. *Hum Reprod.* 24(5):1221-8.
66. Wang S. X. (2011). The past, present, and future of embryo selection in in vitro fertilization: *Frontiers in Reproduction Conference.* *Yale J. Biol. Med.* 84(4): 487-490.
67. Wells D., Bermudez M. G., Steuerwald N., Thornhill A. R., Walker D. L., Malter H., Delhanty J. D. and Cohen J. (2005). Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum. Reprod.* 20 (5): 1339-1348.
68. Wells D., Alfarawati S. and Fragouli E. (2008). Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol. Hum. Reprod.* 14:12., 703–710.
69. Wu M.-Y., Chao K.-H., Chen C.-D., Chang L.-J., Chen, S.-U. and Yang Y.-S. (2014). Current Status of Comprehensive Chromosome Screening for Elective Single-Embryo Transfer. *Obstet. Gynecol. Int.* 2014: 581783.

KASUTATUD VEEBILEHED

1. www.guide.hfea.gov.uk/pgd/
2. <http://www.ingender.com/Gender-Selection/PGD/>

LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Grete-Katariine Kuum

(sünnikuupäev: 27.01.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Preimplantatsiooniline geneetiline diagnostika,

mille juhendaja on Ants Kurg,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2015.