เทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับอณูกับการแพทย์ทางสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา

พรพิมล เรืองวุฒิเลิศ พ.บ., Ph.D.*
ภาคภูมิ โพธิ์พงษ์ พ.บ., M.Sc.*

บทนำ

ปัจจุบันเทคนิคทางอณูชีววิทยามีความเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ทำให้ความรู้ทางเวชพันธุศาสตร์เจริญก้าวหน้าไปด้วย การแพทย์ทางสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยาก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับทางพันธุศาสตร์ค่อนข้างมาก เพราะความผิดปกติทางพันธุศาสตร์ในมนุษย์สามารถส่งผลกระทบได้ตั้งแต่ระยะปฏิสนธิ ระยะทารกในครรภ์ ระยะหลังคลอด วัยเด็ก จนถึงวัยเจริญพันธุ์ (ซึ่งอาจมีผลต่อชั่วคนถัดไป) และจนตลอดชีวิต ในการดูแลการตั้งครรภ์ให้ได้มารดาและทารกที่แข็งแรงปกติซึ่งเป็นจุดประสงค์สำคัญในทางสูติศาสตร์นั้น สิ่งที่จะต้องตระหนักประการหนึ่งคือความผิดปกติของพันธุกรรมซึ่งขณะนี้มีการให้บริการ การวินิจฉัยก่อนคลอดอย่างกว้างขวางนอกจากนี้ผู้ที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมบางรายอาจได้รับการวินิจฉัยหลังคลอด หรือในวัยเด็กวัยรุ่น หรือวัยเจริญพันธุ์ ผู้ป่วยอาจมีปัญหาทางนรีเวช เช่นการมีอวัยวะเพศกำกวม การมีความผิดปกติของระดูหรือไม่มีระดูเลย ปัญหาการมีบุตรยาก หรือแม้กระทั่งโรคมะเร็งทางนรีเวชบางชนิด ก็มีแนวโน้มจะเกิดกับผู้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมบางลักษณะ ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยา ร่วมกับความเจริญก้าวหน้าทางเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในปัจจุบันทำให้การวินิจฉัยความผิดปกติทางพันธุกรรมมีศักยภาพที่จะทำได้ตั้งแต่ระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน กล่าวคือก่อนปฏิสนธิหรือเพียงไม่กี่วันหลังจากปฏิสนธิ ดังนั้นนอกเหนือจากความรู้ทางพันธุศาสตร์ทางคลินิกแล้ว สูตินรีแพทย์ควรได้มีความรู้เกี่ยวกับหลักการของเทคนิคทางห้องปฏิบัติการระดับอณูด้วย เพราะเทคนิคเหล่านี้มีแนวโน้มที่จะได้รับการนำมาใช้ทางคลินิกมากขึ้นต่อไป เทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับอณูสามารถช่วยการวินิจฉัยความผิดปกติทางพันธุกรรมที่สำคัญ 2 กลุ่มใหญ่ คือ ความผิดปกติระดับโครโมโซม และความผิดปกติระดับยีน

1. ความผิดปกติระดับโครโมโซม สามารถเป็นได้ในแง่จำนวนของโครโมโซมหรือโครงสร้างของโครโมโซม หรือการมีส่วนประกอบของโครโมโซมต่างกันในคนคนเดียวกัน การตรวจโครโมโซมที่ทำกันทั่วไปในปัจจุบันจะอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์จากตัวอย่างให้ได้เซลล์ระยะเมตาเฟส (metaphase) กล่าวคือเซลล์ระยะที่โครโมโซมมีการเพิ่มจำนวนเตรียมจะแบ่งตัว และมีการขดตัวหนาขึ้นจนมองเห็นและตรวจนับได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เทคนิคระดับอณูในการตรวจโครโมโซม (molecular cytogenetics) ที่เริ่มใช้มากขึ้นในปัจจุบันคือ fluorescent in situ hybridization (FISH) จะทำให้สามารถตรวจโครโมโซมจากเซลล์ในระยะอินเตอร์เฟส (interphase) ได้ระดับหนึ่ง และจากเทคนิครวมทั้งหลักการของ FISH ก็มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ ๆ อีกหลายเทคนิค เช่น comparative genomic hybridization (CGH),[1] multiplex or multifluor FISH (M-FISH)[2] และ spectral karyotyping (SKY)[3] เป็นต้น

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร 10700.

2. ความผิดปกติระดับยีน การตรวจความผิดปกติของโรคยีนเดี่ยว อาจใช้การตรวจหาผลผลิตของยีนนั้น เช่น โปรตีน เอนไซม์ หรือฮอร์โมน เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาทำให้สามารถเพิ่มปริมาณยีนที่ทราบตำแหน่งหรือรหัสพันธุกรรมหรือคุณสมบัติบางประการของยีนนั้น ให้ถึงระดับที่วิเคราะห์ได้สะดวกมากขึ้น จึงทำให้สามารถตรวจที่ระดับยีนโดยตรงได้ โดยไม่ต้องอาศัยผลผลิตของยีน

Fluorescent in situ hybridization (FISH)

ข้อมูลทางพันธุกรรมของแต่ละคนจะถูกบรรจุในสายดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid, DNA) สายคู่ซึ่งขดซ้อนกันหลายชั้นและขดร่วมกับโปรตีนพิเศษเป็นโครโมโซม โดยสายดีเอ็นเอนี้เป็นโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) สายดีเอ็นเอสายคู่นี้มีคุณสมบัติแยกออกจากกัน (denaturation) เมื่อถูกความร้อน และเมื่ออุณหภูมิลดลงก็จะกลับมาจับกันเป็นสายคู่ได้ใหม่ (hybridization หรือ annealing) โดยการจับกันจะมีลักษณะจำเพาะ คือจะจับกันได้ต่อเมื่อมีรหัสพันธุกรรม (base pair) ที่เข้าคู่กัน (complementary) เท่านั้น

เทคนิค FISH อาศัยคุณสมบัติข้อนี้ของดีเอ็นเอ โดยมีการออกแบบตัวตรวจจับที่เรียกว่า probe ซึ่งจะจับกับส่วนของโครโมโซมคู่ที่สนใจจะศึกษา โดยอาศัยความจำเพาะจากการที่รหัสพันธุกรรมต้องเข้าคู่กันในการจับกันเป็นสายคู่ดังกล่าว Probe นี้เป็นสายโพลีนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีลำดับรหัสพันธุกรรมที่เข้าคู่กับส่วนของโครโมโซมคู่ที่ต้องการตรวจ เมื่อให้ความร้อนกับสิ่งส่งตรวจ (ซึ่งตรึงอยู่บนสไลด์) และ probe สายดีเอ็นเอของสิ่งส่งตรวจและ probe จะแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว เมื่ออุณหภูมิลดลงจนพอเหมาะ สายดีเอ็นเอของ probe จะมีโอกาสจับกับรหัสพันธุกรรมที่เข้าคู่กันบนโครโมโซมของสิ่งส่งตรวจบนสไลด์ ตัว probe นี้จะถูกติดฉลาก (labelled) ด้วยสารฟลูออเรสเซนท์อยู่ก่อน ดังนั้นตำแหน่งที่ probe จับอยู่บนสไลด์จะถูกมองเห็นได้โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนท์และสามารถให้ข้อมูลของตำแหน่งและจำนวนของโครโมโซมที่ศึกษาได้ วิธีนี้จึงสามารถใช้ศึกษาได้ในเซลล์ระยะอินเตอร์เฟส

Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction[4] เป็นกระบวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการจะศึกษา โดยสามารถเพิ่มได้เป็นล้านเท่าของที่มีในตอนตั้งต้น ทำให้มีโอกาสทำการศึกษาส่วนที่สนใจได้มากขึ้นหรือง่ายขึ้น หรือวิเคราะห์ได้ชัดเจนขึ้น และเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ได้

ในกระบวนการของ PCR สิ่งที่จะต้องทราบคือดีเอ็นเอส่วนสั้น ๆ ที่ขนาบอยู่ข้างดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการศึกษา เพื่อที่จะสร้าง "primers" ซึ่งเป็นสายดีเอ็นเอสั้น ๆ ที่มีรหัสพันธุกรรมเข้าคู่กับส่วนดีเอ็นเอที่ขนาบข้างอยู่นั้น สำหรับดีเอ็นเอที่ต้องการจะศึกษาแต่ละชิ้นจะมี primers ที่เรียกว่า forward และ reverse เป็นตัวเริ่มต้นการสร้างสายโพลีนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ดีเอ็นเอในสิ่งส่งตรวจเป็นแม่พิมพ์ โดยเมื่อสิ่งส่งตรวจ, primers และนิวคลีโอไทด์ รวมทั้งเกลือแร่ และ Taq polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการต่อเชื่อมของนิวคลีโอไทด์ให้เป็นสายโพลีนิวคลีโอไทด์ ในส่วนผสมของปฏิกิริยาได้รับความร้อน สายดีเอ็นเอในสิ่งส่งตรวจจะแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว เมื่อลดอุณหภูมิลง primers จะมาจับ (anneal) กับสายดีเอ็นเอในสิ่งส่งตรวจ และนิวคลีโอไทด์จะมาจับเรียงต่อตามรหัสของสิ่งส่งตรวจซึ่งเป็นแม่พิมพ์ โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ในอุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิรอบใหม่ สายดีเอ็นเอเดิมที่จับกับสายดีเอ็นเอที่เพิ่งสร้างใหม่จะแยกออกจากกันอีก เมื่อลดอุณหภูมิลง primers ในส่วนผสมของปฏิกิริยาก็จะจับกับสายดีเอ็นเอทั้งของเดิมและ

สายใหม่อีก และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มอีกเล็กน้อยให้เหมาะกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็จะมีการสร้างสายดีเอ็นเอต่อไปโดยใช้นิวค์ลีโอไทด์ในส่วนผสมที่มีอีก ปฏิกิริยาเช่นนี้จะทำซ้ำเป็นรอบ ๆ โดยทั่วไปจะทำ 20 – 30 รอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการศึกษาเพิ่มขึ้นนับล้านเท่า ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีต่าง ๆ ทางห้องปฏิบัติการต่อไป

การใช้การวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ระดับอณูในสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา

ในสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา วิทยาการของการวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ระดับอณูอาจนำมาใช้ได้ในกรณีต่อไปนี้

1. **การวินิจฉัยหรือการวิจัยโดยอาศัยเซลล์จากตัวอ่อนระยะก่อนการฝังตัว** ซึ่งระยะที่ใช้มากที่สุดคือระยะ cleavage (ระยะ 6-10 เซลล์) ในแง่การวินิจฉัยนั้นจะได้เซลล์ (blastomere) ประมาณ 1-2 เซลล์มาตรวจวิเคราะห์ในช่วงเวลาจำกัด เพราะจะต้องนำตัวอ่อนใส่เข้าไปในโพรงมดลูกในช่วงเวลาที่ไม่นานเกินไป Blastomere(s) ที่ได้จากการทำ biopsy มักจะอยู่ในระยะอินเตอร์เฟส ซึ่งในแง่การศึกษาโครโมโซมที่ใช้กันทั่วไป (karyotyping) จะต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ระยะเมตาเฟส ซึ่งต้องใช้เวลา และการเพาะเลี้ยงจาก 1-2 เซลล์ มีโอกาสล้มเหลวสูงมาก FISH จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ โดยสามารถใช้ศึกษาโครโมโซมผิดปกติที่พบบ่อยในเซลล์ระยะอินเตอร์เฟสได้[5-8] รวมทั้งมีการวินิจฉัยโครโมโซมผิดปกติชนิด translocation ในคู่สามีภรรยาที่ฝ่ายใดฝ่ายหนึ่งเป็น balanced carrier ด้วย[9] ส่วนในแง่การศึกษาความผิดปกติระดับยีนก็จะต้องอาศัยการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการจะศึกษาโดยอาศัย PCR ปัจจุบันเริ่มมีความพยายามจะเพิ่มจำนวนจีโนม (สารพันธุกรรมทั้งหมดในนิวเคลียส) ของ 1-2 เซลล์นั้น (whole genome amplification, WGA) ซึ่ง WGA นั้นนอกจากจะใช้ศึกษาได้หลายยีนหรือหลายปฏิกิริยาเพื่อยืนยันผลแล้ว ยังสามารถติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนท์ และนำไปผสมกับดีเอ็นเอปกติซึ่งติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสเซนท์อีกสีหนึ่ง (control DNA) แล้วย้อมบนโครโมโซมจากเซลล์ปกติระยะเมตาเฟส เพื่อศึกษาการขาดหรือเกินของโครโมโซมทั้ง 23 คู่ของ blastomere(s) นั้นได้ด้วย[10-12]

ในสถาบันที่สามารถเลี้ยงตัวอ่อนได้ถึงระยะ blastocyst (ประมาณวันที่ 5-7 หลังการปฏิสนธิ) FISH ก็ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยเรื่องรูปแบบของโครโมโซมของตัวอ่อนระยะนี้แล้วเช่นกัน[13-16]

2. **การวินิจฉัยหรือการวิจัยเรื่องเซลล์เพศ (gametes)** มีหลักการคล้ายกับการศึกษาเซลล์จากตัวอ่อนก่อนการฝังตัวในข้อที่ว่า การจะได้เซลล์ระยะเมตาเฟสที่มีคุณภาพดีจากไข่หรือตัวอสุจิเป็นไปได้ยาก FISH หรือ PCR จึงถูกนำมาใช้กับ polar body ซึ่งจะช่วยให้ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมของไข่[17,18] และถูกนำมาใช้กับอสุจิในการศึกษาเกี่ยวกับโครโมโซม[19]

3. **การวินิจฉัยก่อนคลอด** FISH ช่วยให้ทราบผลได้เร็ว เพราะไม่ต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ แม้ว่าจะยังไม่สามารถให้ผลการวินิจฉัยที่ดีในโครโมโซมทั้ง 23 คู่ในการวิเคราะห์ครั้งเดียว แต่ก็สามารถวินิจฉัยความผิดปกติที่พบบ่อยและสำคัญ คือความผิดปกติในแง่จำนวนของโครโมโซมคู่ที่ 13, 18, 21 และโครโมโซมเพศ[20-22] การทราบผลได้เร็วจะทำให้สามารถวางแผนการดูแลรักษาได้เร็วขึ้น ตัวอย่างเช่นในกรณีที่ต้องยุติการตั้งครรภ์ (therapeutic abortion) ซึ่งจะเลี่ยงผลแทรกซ้อนจากการต้องทำแท้งในอายุครรภ์มากได้ หรือถ้าผลการตรวจไม่พบว่ามีความผิดปกติของโครโมโซมที่พบบ่อยก็จะช่วยให้บิดามารดาลดความวิตกกังวลไปได้มากและเร็วขึ้น เทคนิคนี้ยังสามารถเป็นตัวช่วยการวินิจฉัยอย่างน้อยสำหรับโครโมโซมคู่ดังกล่าว ในกรณีที่ไม่สามารถทราบผลจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น การเพาะ

เลี้ยงเซลล์ล้มเหลว ซึ่งแม้พบไม่บ่อย แต่ก็อาจเกิดขึ้นได้ Ning et al[23] รายงานการใช้เทคนิค SKY ในการวินิจฉัยภาวะ mosaicism ของความผิดปกติของโครโมโซมในแง่โครงสร้างได้ด้วย สำหรับ PCR มักใช้วินิจฉัยความผิดปกติของยีนเดี่ยว แต่ก็มีการศึกษาการใช้ PCR สำหรับการวินิจฉัยโครโมโซมผิดปกติ โดยการใช้ polymorphic markers ในการวินิจฉัยก่อนคลอดเช่นกัน[24-27] และยังสามารถใช้ PCR ในการวินิจฉัยการติดเชื้อของทารกในครรภ์ด้วย[28,29]

4. **การวินิจฉัยก่อนคลอดชนิด non-invasive** ซึ่งอาศัยเซลล์ทารกในเลือดมารดา[30-32] หรือมูกที่ปากมดลูก[33-35] ซึ่งยังอยู่ในระหว่างการวิจัย จำนวนเซลล์ของทารกจะมีจำนวนไม่มากนัก และการเพาะเลี้ยงเซลล์ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร วิธีการทางพันธุกรรมระดับอณูซึ่งมีความไวกว่าวิธี conventional จะช่วยให้การวินิจฉัยก่อนคลอดจากสิ่งส่งตรวจนี้มีความเป็นไปได้

5. **การศึกษาเกี่ยวกับพยาธิวิทยาของทารกในครรภ์ (fetal pathology)** เนื่องจากการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ทำได้ยาก เพราะการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของทารกจะต้องปราศจากเชื้อ การแท้งผ่านช่องคลอดมักจะมีการปนเปื้อน normal flora หรือ pathological organisms และอาจทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์ล้มเหลว อีกประการหนึ่ง ถ้าเป็น macerated fetus ก็ยิ่งทำให้การเพาะเลี้ยงเซลล์มีโอกาสล้มเหลวได้มากขึ้น FISH จะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ได้ และยังช่วยให้การศึกษาเรื่อง mosaicism (การมีส่วนประกอบของโครโมโซมมากกว่า 1 รูปแบบ ในคนคนเดียวกันที่เกิดจากตัวอ่อนเดียว) ทำได้ง่ายขึ้น เพราะสามารถนับเซลล์ได้ครั้งละมาก ๆ[36]

6. **การวินิจฉัยความผิดปกติของโครโมโซมเพศ** ในผู้ที่มีอวัยวะเพศกำกวม มีความผิดปกติของระบบต่อมไร้ท่อ[37] การมีบุตรยาก ฯลฯ โดยเฉพาะในรายที่เป็น mosaic โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับอณูเพื่อตรวจจับส่วนของโครโมโซม Y

7. **การวิจัยเรื่องของมะเร็งทางนรีเวชบางชนิด** ที่มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของยีนบางยีนในผู้ป่วยส่วนหนึ่ง ซึ่งอาจนำไปสู่การวินิจฉัยหรือการตรวจค้นผู้ที่มีแนวโน้มเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งได้ โดยใช้เทคนิค PCR เข้าช่วย[38-40]

สรุป

จะเห็นว่าวิทยาการทางพันธุศาสตร์ระดับอณูมีแนวโน้มที่จะถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยความผิดปกติทางพันธุกรรมและการติดเชื้อบางอย่างได้ จึงมิใช่สิ่งไกลตัวสูตินรีแพทย์อีกต่อไป ความก้าวหน้าทางด้านนี้จึงเป็นสิ่งที่สูตินรีแพทย์ควรให้ความสนใจติดตามศึกษาและค้นคว้าวิจัยหาความรู้ใหม่ ๆ เพื่อเพิ่มศักยภาพและพัฒนาการดูแลรักษาผู้ป่วยทางสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยาในอนาคต

REFERENCES

1. Piper J, Rutovitz D, Sudar D, et al. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. Cytometry 1995; **19:** 10-26.
2. Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nat Genet 1996; **12:** 368-375.
3. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science 1996; **273:** 494-497.
4. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; **230:** 1350-1354.
5. Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, et al. Detection of aneuploidy and chromosomal masaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). Hum Mol Genet 1993; **2:** 1183-1185.

6. Griffin DK. Fluorescent in situ hybridization for the diagnosis of genetic disease at postnatal, prenatal and preimplantation stages. Int Rev Cytol 1994; **153:** 1-40.
7. Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, et al. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. Hum Reprod 1994; **9:** 721-724.
8. Munné S, Weier HU, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. Biol Reprod 1994; **51:** 373-379.
9. Conn CM, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. Infertile couples with Robertsonian translocations: Preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. Hum Genet 1998; **102:** 117-123.
10. Wells D, Delhanty JDA. Chromosomal and molecular genetic analysis following whole genome amplification of single cells from human preimplantation embryos. Human Genome Meeting HGM'99. Programme and Abstract book p.8, abstract no.032 (Abstract).
11. 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:** 1214-18.
12. Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. Hum Genet 2000; **106:** 210-217.
13. Benkhalifa M, Janny L, Vye P, Malet P, Boucher D, Ménézo Y. Assessment of polyploidy in human morulae and blastocysts using co-culture and fluorescent in situ hybridisation. Hum Reprod 1993; **8:** 895-902.
14. Evsikov S, Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. Hum Reprod 1998; **13:** 3151-3155.
15. Veiga A, Gil Y, Boada M, et al. Confirmation of diagnosis in preimplantation genetic diagnosis (PGD) through blastocyst culture: preliminary experience. Prenat Diagn 1999; **19:** 1242-1247.
16. Ruangvutilert P, Delhanty JD, Serhal P, Simopoulou M, Rodeck CH, Harper JC. FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. Prenat Diagn 2000; **20:** 159-162.
17. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, et al. Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. J Assist Reprod Genet 1996; **13:** 157-162.
18. Verlinsky Y, Rechitsky S, Cieslak J, et al. Preimplantation diagnosis of single gene disorders by two-step oocyte genetic analysis using first and second polar body. Biochem Mol Med 1997; **62:** 182-187.
19. Sloter ED, Lowe X, Moore II DH, Nath J, Wyrobek AJ. Multicolor FISH analysis of chromosomal breaks, duplications, deletions, and numerical abnormalities in the sperm of healthy men. Am J Hum Genet 2000; **67:** 862-872.
20. Romana SP, Tachdjian G, Druart L, Cohen D, Berger R, Chérif D. A simple method for prenatal diagnosis of trisomy 21 on uncultured amniocytes. Eur J Hum Genet 1993; **1:** 245-251.
21. Evans MI, Henry GP, Miller WA, et al. International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. Hum Reprod 1999; **14:** 1213-1216.
22. Pergament E, Chen PX, Thangavelu M, Fiddler M. The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. Prenat Diagn 2000; **20:** 215-220.
23. Ning Y, Laundon CH, Schröck E, Buchanan P, Ried T. Prenatal diagnosis of a mosaic extra structurally abnormal chromosome by spectral karyotyping. Prenat Diagn 1999; **19:** 480-482.
24. Findlay I, Tóth T, Matthews P, Marton T, Quirke P, Papp Z. Rapid trisomy diagnosis (21, 18, and 13) using fluorescent PCR and short tandem repeats: applications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis. J Assist Reprod Genet 1998; **15:** 266-275.
25. Pertl B, Kopp S, Kroisel PM, Tului L, Brambati B, Adinolfi M. Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescent PCR: first application on 247 chorionic villus samples. J Med Genet 1999; **36:** 300-303.
26. Pertl B, Pieber D, Lercher-Hartlieb A, et al. Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy by quantitative fluorescent PCR on fetal samples from mothers at high risk for chromosome disorders. Mol Hum Reprod 1999; **12:** 1176-1179.
27. Levett LJ, Liddle S, Meredith R. A large scale evaluation of amnio-PCR for the rapid prenatal diagnosis of fetal trisomy. Ultrasound Obstet Gynecol 2001; **17:** 115-118.
28. Guerra B, Lazzarotto T, Quarta S, et al. Prenatal diagnosis of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. Am J Obstet Gynecol 2000; **183:** 476-482.
29. Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. Obstet Gynecol 2001; **97:** 296-300.
30. Bianchi DW. Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. J Perinat Med 1998; **26:** 175-185.
31. Bianchi DW. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell

microchimerism. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000; **92:** 103-108.
32. Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2001; **184:** 414-419.
33. Adinolfi M, Sherlock J. First trimester prenatal diagnosis using transcervical cells: an evaluation. Hum Reprod Update 1997; **3:** 383-392.
34. Ruangvutilert P, Halder A, Jauniaux E, Arienzo M, Cirigliano V, Sherlock J. A minimally invasive prenatal diagnosis technique for the collection of transcervical cells. Prenat Neonat Med 1998; **3:** 294-296.
35. Daryani YP, Barker GH, Penna LK, Patton MA. Transcervical sampling as a means of detection of fetal cells during the first trimester of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000; **183:** 752-754.
36. Moore GE, Ruangvutilert P, Chatzimeletiou K, et al. Examination of trisomy 13, 18 and 21 foetal tissues at different gestational ages using FISH. Eur J Hum Genet 2000; **8:** 223-8.
37. Techatraisak K, Dangrat C, Vateekul S, Ko-Anantakul S. Premature ovarian failure (POF): cytogenetic and SRY analyses. Siriraj Hosp Gaz 2000; **52:** 810-815.
38. Zweemer RP, van Diest PJ, Verheijen RH, et al. Molecular evidence linking primary cancer of the fallopian tube to BRCA1 germline mutations. Gynecol Oncol 2000; **76:** 45-50.
39. Levine DA, Lin O, Barakat RR, et al. Risk of endometrial carcinoma associated with BRCA mutation. Gynecol Oncol 2001; **80:** 395-398.
40. Welcsh PL, King MC. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. Hum Molec Genet 2001; **10:** 705-713.