

УДК 575.224.23:618.32

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КАРИОТИПИРОВАНИЕ ПО ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК БЛАСТОЦЕЛЯ КАК ОСНОВА НЕИНВАЗИВНОГО ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА АНЕУПЛОИДИЙ

© 2015 г. Н. А. Скрябин^{1,2}, И. Н. Лебедев^{1,2}, В. Г. Артюхова³, Д. И. Жигалина²,
И. А. Степанов⁴, Г. В. Кривошекова⁴, А. В. Светлаков³

¹Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томск 634050

e-mail: nikolay.skryabin@medgenetics.ru

²Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск 634050

³Общество с ограниченной ответственностью

“Красноярский центр репродуктивной медицины”, Красноярск 660037

⁴Областное государственное автономное учреждение здравоохранения

“Областной перинатальный центр”, Томск 634063

Поступила в редакцию 21.01.2015 г.

Обнаружение фрагментов ДНК в полостной жидкости бластоцеля открывает перспективы в развитии новых методов неинвазивной преимплантационной генетической диагностики хромосомных болезней. Однако до настоящего времени отсутствуют данные, подтверждающие соответствие молекулярного кариотипа внеклеточной ДНК из жидкости бластоцеля и клеток бластоцисты. В настоящей работе сообщается о наличии такого соответствия по результатам молекулярно-цитогенетического анализа хромосомного набора, проведенного с помощью сравнительной геномной гибридизации.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, неинвазивная преимплантационная генетическая диагностика, анеуплоидия, полостная жидкость бластоцеля, бластоцентез.

DOI: 10.7868/S0016675815110156

Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) является современным и наиболее перспективным методом репродуктивной медицины, обеспечивающим эффективное решение проблем бесплодия и невынашивания беременности, обусловленных наследственной патологией. Концептуально проведение ПГД, выполняемой в одном из своих вариантов на одном–двух бластомерах развивающегося зародыша, базируется на представлении о единстве генотипа обследуемых и остающихся в составе бластоцисты клеток. Однако в случае диагностики анеуплоидий такое соответствие вполне может быть нарушено явлением хромосомного мозаицизма, частота которого заметно возрастает на первых делениях дробления.

Прогресс в области преимплантационного генетического скрининга анеуплоидий прошел путь от интерфазного FISH-анализа отдельных бластомеров с ДНК-зондами на хромосомы 13, 18, 21, X и Y, дисбаланс по числу копий которых приводит к рождению детей с хромосомными заболеваниями, до анализа всего кариотипа на

предмет числовых или несбалансированных структурных аномалий хромосом с помощью сравнительной геномной гибридизации (CGH) или, в последнее время, ДНК-микрочипов (аггау-СГН). Но так или иначе, ни один из этих методов при анализе одного–двух бластомеров или даже при биопсии участка трофэктодермы на более поздних этапах развития зародыша не гарантирует наличия нормального хромосомного набора во всех клетках бластоцисты, выбираемой для переноса и имплантации, вследствие возможного хромосомного мозаицизма.

В 2013 г. появилось первое сообщение о наличии фрагментов ДНК в полостной жидкости бластоцеля, обычно аспирируемой при процедурах витрификации [1]. Количество и качество такой ДНК оказались пригодными для молекулярно-генетических и молекулярно-цитогенетических исследований. В частности, был проведен анализ образцов внеклеточной ДНК из полости пяти бластоцист с помощью аггау-СГН, который оказался удачным в двух случаях. В первом случае была диагностирована трисомия по хромосоме 22

(47,XY,+22), тогда как во втором были выявлены множественные анеуплоидии: моносомии по хромосомам 1 и 10 и трисомии по хромосомам 11 и 16.

Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной возможности разработки метода неинвазивной ПГД с использованием нового источника биологического материала — жидкости из полости бластоцеля, традиционно удаляемой в ходе криоконсервации эмбрионов. Преимущество неинвазивной диагностики, т.е. процедуры, проводимой без биопсии собственно blastomeres, может быть особенно заметно в тех случаях, когда качество blastocyst оказывается невысоким для биопсии, что ведет к переносу эмбрионов без сопутствующего молекулярно-генетического или цитогенетического тестирования. Однако использование внеклеточной ДНК, на наш взгляд, открывает и принципиально новые перспективы в преимплантационной диагностике хромосомного мозаицизма. Действительно, наиболее вероятным источником ДНК в жидкости blastocyst может быть апоптоз клеток blastocyst. В таком случае при анализе внеклеточной ДНК появляется возможность получить интегральную оценку кариотипа всех тех клеток, которые вступили на путь апоптоза. Вместе с тем пока остается неясным, в какой степени апоптоз затрагивает клетки blastocyst, а также происходит или нет предпочтительная элиминация клеток с хромосомными нарушениями. Кроме того, пока отсутствует информация о том, имеются ли различия в уровне апоптоза в трофэктодерме и внутренней клеточной массе. Во всяком случае центральным становится вопрос, насколько полно молекулярный состав внеклеточной ДНК в полости blastocyst отражает кариотип клеток самой blastocyst. До настоящего времени в литературе, учитывая первое и единственное пока сообщение итальянских специалистов [1], а также появившиеся недавно данные об использовании внеклеточной ДНК для преимплантационной генетической диагностики пола с помощью ПЦР у эмбрионов лошадей [2, 3], нами не обнаружено сведений, подтверждающих соответствие молекулярного кариотипа внеклеточной ДНК и клеток самой blastocyst. В данной работе мы сообщаем о наличии такого соответствия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ были включены две blastocyst, а также их полостные жидкости. Blastocyst № 1 по морфологии относилась к категории 3AA (экспандированная blastocyst с нормальной внутренней клеточной массой и трофэктодермой), а blastocyst № 2 — к категории 3CC (экспандированная blastocyst со значительно отклоняющимися от нормы внутренней клеточной массой и трофэктодермой). Blastocyst были получены в

лечебных циклах ЭКО-ИКСИ. Эмбрионы культивировали до 5-го дня на средах фирмы “Vitrolife” (Швеция) в условиях 6%-ного CO₂, согласно стандартным протоколам лаборатории ЭКО. Забор клеток и внутриполостной жидкости был проведен на стадии blastocyst на пятый день эмбрионального развития. Для анализа была использована целая blastocyst без разделения на трофэктодерму и внутреннюю клеточную массу. От каждой супружеской пары получено письменное информированное согласие на использование оставшихся после переноса в полость матки эмбрионов для научно-исследовательских целей.

Полученные материалы (жидкость из полости blastocyst и сама blastocyst) были изолированы помещены в заранее приготовленные микропробирки с 1.5 мкл стерильного раствора PBS (Qiagen, США) и хранились до проведения исследования при –20°C. В качестве контрольного образца для сравнительной геномной гибридизации использовалось 10 нг референсной ДНК мужского пола (каталожный номер 5190-3796, Agilent Technologies, США).

Перед постановкой реакции полногеномной амплификации ДНК объем всех образцов был доведен до 4 мкл посредством добавления стерильного раствора PBS (Qiagen, США). Лизирование клеток blastocyst и полногеномную амплификацию опытных и контрольных образцов ДНК проводили с использованием коммерческого набора REPLI-g Mini Kit (каталожный номер 150023, Qiagen, США) с модификациями. Лизирование клеток и денатурацию ДНК перед полногеномной амплификацией проводили с помощью 3 мкл щелочного раствора (буфер D2, Qiagen, США) при 65°C в течение 10 мин. После денатурации добавляли 3 мкл нейтрализующего раствора (Stop Solution, Qiagen, США) и держали образцы на льду до следующего этапа. Далее готовили раствор для полногеномной амплификации ДНК, который содержал 9 мкл H₂O, 29 мкл реакционного буфера (REPLI-g Reaction Buffer, Qiagen) и 2 мкл ДНК-полимеразы (REPLI-g DNA Polymerase, Qiagen, США) (на один образец). К 10 мкл денатурированной ДНК добавляли 40 мкл приготовленного раствора и инкубировали при 30°C в течение 8 ч. По завершении инкубации инактивировали фермент при 65°C в течение 3 мин. Контроль полногеномной амплификации ДНК проводили с помощью биоанализатора Tape Station (Agilent Technologies, США) (рис. 1).

Для флуоресцентного мечения использовали по 500 нг тестовой и референсной ДНК. Мечение обеих геномных ДНК-библиотек (анализируемой и контрольной) проводили с использованием набора SureTag Complete DNA Labeling Kit, в соответствии с протоколом производителя (каталожный номер 5190-4240, Agilent Technologies, США).

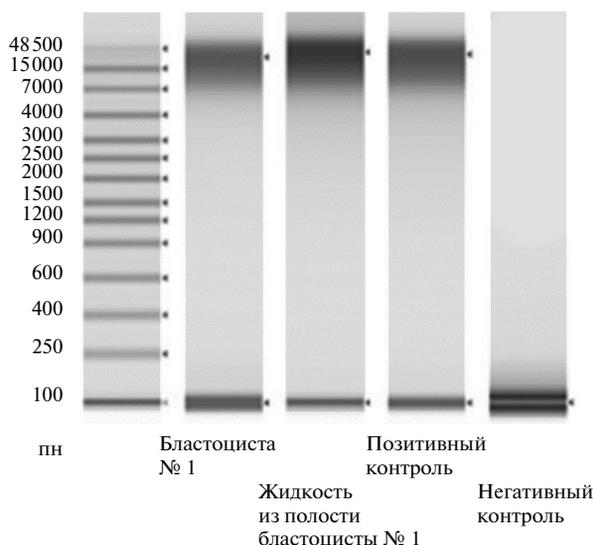


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК после полногеномной амплификации.

Анализируемые ДНК метили флуорохромом Су-5, а контрольные – флуорохромом Су-3. После мечения образцы очищали с помощью колонок Amicon 30kDa (Thermo Scientific, США). Проверку качества мечения осуществляли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, США), согласно протоколу SureTag Complete DNA Labeling Kit (табл. 1).

Гибридизацию ДНК-библиотек на метафазных препаратах, полученных из лимфоцитов периферической крови здорового индивида мужского пола, проводили с супрессией 50-кратным избытком C_0t -1 ДНК (каталожный номер 5190-3393, Agilent Technologies, США) в течение 72 ч при 37°C в гибридизационной камере ThermoBrite (Abbott Molecular, США). Препараты метафазных хромосом окрашивали раствором DAPI и проводили детекцию гибридизационных сигналов на люминесцентном микроскопе Axio Imager.Z2 (Carl Zeiss, Германия) с набором соответствующих свето-

фильтров. Для компьютерной обработки результатов CGH применялся программный продукт Isis – CGH Software (Metasystems, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении процедуры полногеномной амплификации были получены продукты амплификации ДНК обеих бластоцист и ДНК из жидкости только бластоцисты № 1. В образце жидкости из полости бластоцисты № 2 амплификация ДНК не прошла. Молекулярные кариотипы исследованных образцов, установленные с помощью CGH, приведены в табл. 2.

Кариотипы клеток бластоцисты № 1 и молекулярный состав фрагментов ДНК из ее полостной жидкости полностью совпали – в обоих случаях была обнаружена моносомия хромосомы 19 (рис. 2). Данный результат указывает на соответствие молекулярных кариотипов клеток бластоцисты и

Таблица 1. Концентрация ДНК и флуоресцентных красителей в опытных и контрольных образцах после полногеномной амплификации

| Образец | Концентрация красителя Су-3, пмоль/мкл | Концентрация красителя Су-5, пмоль/мкл | Концентрация ДНК, нг/мкл | Специфическая активность |
|-------------------------------------|--|--|--------------------------|--------------------------|
| Бластоциста № 1 | – | 19.1 | 359.58 | 53.2 |
| Жидкость из полости бластоцисты № 1 | – | 22.79 | 414.01 | 55.0 |
| Бластоциста № 2 | – | 16.22 | 348.68 | 46.6 |
| Контроль № 1 | 23.41 | – | 413.25 | 56.6 |
| Контроль № 2 | 25.35 | – | 430.96 | 58.9 |
| Контроль № 3 | 22.02 | – | 333.62 | 66.1 |

Таблица 2. Кариотипы, полученные с помощью CGH-анализа

| Образец | Кариотип |
|-------------------------------------|---|
| Бластоциста № 1 | ish cgh dim(19) |
| Жидкость из полости бластоцисты № 1 | ish cgh dim(19) |
| Бластоциста № 2 | ish cgh dim(16), dim(17), dim(19), dim(20) |

внеклеточной ДНК из ее полости. Вместе с тем неожиданным само по себе является обнаружение моносомии по хромосоме 19 в нормально развивавшейся бластоцисте, принадлежавшей к категории ЗАА по морфологическим критериям. Хромосома 19 в кариотипе человека является хромосомой с максимальной плотностью генов и возможно поэтому дисбаланс по числу ее копий приводит к ранней остановке развития еще в преимплантационном периоде. Действительно, трисомии и тем более моносомии по хромосоме 19 — редкое событие при потерях беременности в первом триместре. В литературе имеются лишь еди-

ничные сообщения о таких анеуплоидиях у спонтанных абортусов [4].

Объяснить наличие моносомии 19 в клетках морфологически нормальной бластоцисты можно, на наш взгляд, с двух позиций. С одной стороны, эффекты не всех хромосомных мутаций начинают реализовываться на самых начальных этапах развития и, более того, не исключена вариабельность в сроках и формах фенотипического проявления даже одного и того же хромосомного дисбаланса. В таком случае эффекты геномной мутации могли бы проявиться в период имплантации или сразу после нее, приводя к невозможности наступления беременности. Необходимо отметить, что подобная ситуация не редкость при проведении ПГД. Действительно, ранее нами было показано, что 32.5% бластоцист с различными типами анеуплоидий имели нормальную морфологию [5]. С другой стороны, нельзя исключить присутствия хромосомного мозаицизма, а именно наличия в составе бластоцисты кроме клеток с моносомией по хромосоме 19 и клеток с нормальным кариотипом. Наличие последних могло бы поддерживать развитие эмбриона с хромосомной мутацией, формируя морфологически нормаль-

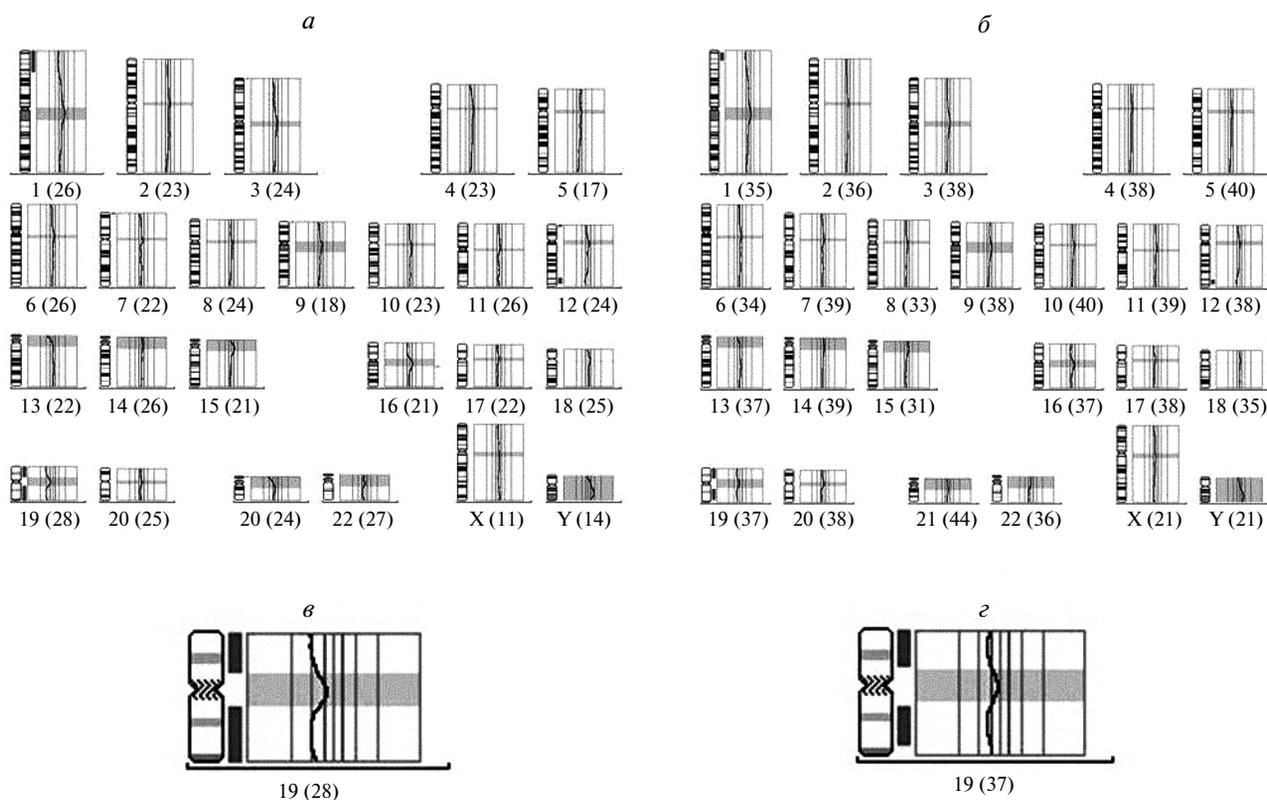


Рис. 2. Идиограммы хромосом и профили CGH-анализа: *a* — бластоцисты № 1; *б* — внутриполостной жидкости бластоцисты № 1; хромосомы 19 с моносомией в бластоцисте № 1 (*е*) и во внутриполостной жидкости бластоцисты № 2 (*з*). В скобках указано число проанализированных хромосом.

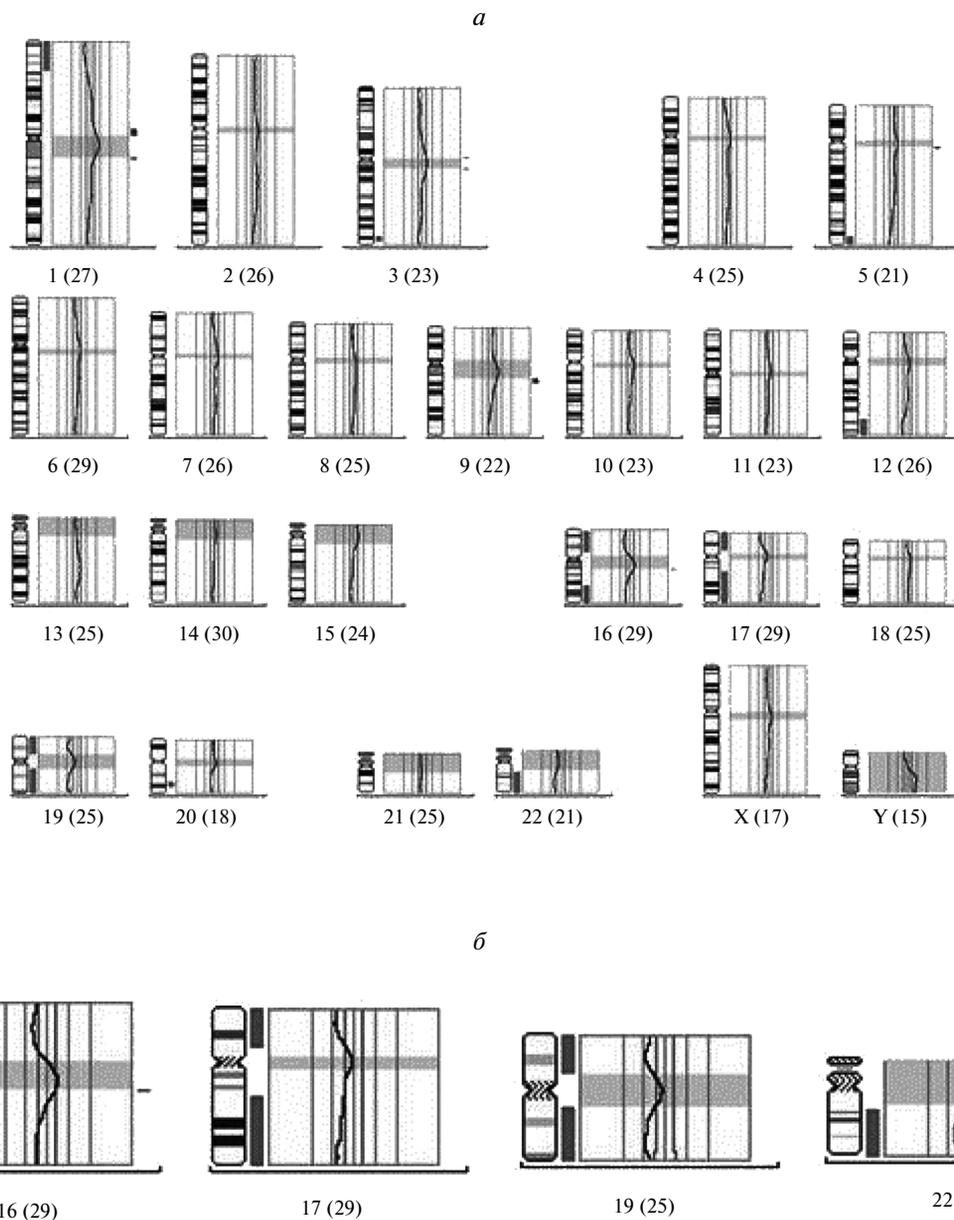


Рис. 3. Идиограммы хромосом и профили CGH-анализа: *a* – бластоцисты № 2; *б* – хромосом 16, 17, 19 и 22 с моносомией в бластоцисте № 2. В скобках указано число проанализированных хромосом.

ную бластоцисту на пятый день развития. Используемый нами метод сравнительной геномной гибридизации не позволяет детектировать хромосомный мозаицизм, однако может зафиксировать присутствие клона клеток с хромосомными аномалиями (с частотой 30–40%, по разным оценкам) на фоне основной массы клеток с нормальным кариотипом.

Отрицательные результаты полногеномной амплификации ДНК из полостной жидкости бластоцисты № 2, скорее всего, можно объяснить отсутствием в ней ДНК. В работе Palini с соавт. [1] также отмечались случаи отсутствия амплифика-

та в образцах жидкости бластоцисты – из 81 анализированного образца результаты получены только для 54 (66.6%). Поскольку внеклеточная ДНК в полости бластоцисты является, как предполагают, результатом выхода фрагментированной ДНК после апоптоза клеток, в бластоцистах с отсутствием внеклеточной ДНК возможно нарушены процессы апоптоза. Не исключено также, что в таких случаях клетки не вступают активно в апоптоз вследствие их нормального кариотипа. В настоящем исследовании амплификация ДНК не прошла именно в образце из жидкости бластоцисты с множественными моносомиями (рис. 3).

Возможно, что в данном случае имело место нарушение механизма апоптоза как следствие хромосомных анеуплоидий. Косвенным подтверждением этого предположения является морфологическая оценка качества бластоцисты – 3СС (экспандированная бластоциста со значительно отклоняющимся от нормы внутренней клеточной массой и трофэктодермой). Наличие в бластоцисте неэлиминированных клеток с различными (или множественными) хромосомными анеуплоидиями, вероятно, и привело к формированию морфологических нарушений. Здесь, однако, следует отметить, что результаты CGH не позволяют сделать однозначного заключения о том, присутствовали ли моносомии по хромосомам 16, 17, 19 и 20 в каждом бластомере или в составе бластоцисты были клетки с различными комбинациями данных анеуплоидий. Такое же ограничение относится и к результатам агау-СГН анализа, опубликованным группой Palini [1]. Действительно, представленная ими запись кариотипа 46,XY,-1,-10,+11,+16 является только лишь интерпретацией полученного результата микрочипового исследования внеклеточной ДНК, но не позволяет судить о наличии такого хромосомного дисбаланса в каждой клетке бластоцисты, ДНК из которой попала в полость бластоцеля.

Очевидно, что для оценки перспектив неинвазивной преимплантационной генетической диагностики, по крайней мере хромосомных болезней, необходимы дальнейшие исследования, направленные, прежде всего, на поиск ответа на ключевой вопрос – в какой степени внеклеточная ДНК в полости бластоцеля отражает кариотип клеток развивающегося зародыша. Предстоит выяснить, имеются ли различия в представленности фрагментов ДНК из клеток трофэктодермы и внутренней клеточной массы в составе внеклеточной ДНК в полости бластоцеля. Подвергаются или нет апоптозу преимущественно клетки с хромосомными нарушениями? Если подвергаются, то не будет ли выявление хромосомных анеуплоидий при анализе внеклеточной ДНК указывать на то, что кариотип большинства клеток, оставшихся в составе бластоцисты, является нормальным? И, наоборот, в какой степени “нормальный хромосомный набор” внеклеточной ДНК отражает нормальный кариотип клеток бластоцисты, особенно в случае мозаицизма низкого уровня? Какое влияние может оказывать само хромосомное нарушение (вовлеченная хромосома, тип анеуплоидии – трисомия, моносомия, нуллисомия или тетрасомия) на характер распределения мутантных клеток в трофэктодерме и внутренней клеточной массе, а также на представленность

фрагментов ДНК в полости бластоцеля? В связи с открытием внеклеточной ДНК в полости бластоцеля данные вопросы, безусловно, стали фундаментальными для изучения цитогенетических механизмов регуляции раннего индивидуального развития человека, но и с практической точки зрения их решение является ключевым для очередного витка прогресса в репродуктивной медицине и в преимплантационной генетической диагностике.

P.S. В процессе подготовки настоящей статьи была опубликована аналогичная работа, выполненная группой итальянских авторов под руководством Gianaroli [6]. При успешном анализе 39 (из 51) образцов ДНК из полости бластоцеля в 38 случаях (97.4%) было также подтверждено соответствие молекулярных кариотипов, установленных при микрочиповом исследовании внеклеточной ДНК и клеток трофэктодермы (изолированный анализ внутренней клеточной массы при этом не проводился). Представленные данные поддерживают перспективность новой неинвазивной технологии, получившей название бластоцентез, в преимплантационной генетической диагностике хромосомных болезней.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 15-04-08265.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palini S., Galluzzi L., De Stefani S. et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid // *Reprod. Biomed. Online*. 2013. V. 26(6). P. 603–610.
2. Herrera C., Morikawa M.I., Baca Castex C. et al. 317 sex determination of equine embryos by PCR using blastocoele fluid // *Reprod. Fertil. Dev.* 2014. V. 27(1). P. 247–248.
3. Herrera C., Morikawa M.I., Castex C.B. et al. Blastocoele fluid from *in vitro*- and *in vivo*-produced equine embryos contains nuclear DNA // *Theriogenology*. 2015. V. 83(3). P. 415–420.
4. Daniely M., Aviram-Goldring A., Barkai G., Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization // *Hum. Reprod.* 1998. V. 13. P. 805–809.
5. Артюхова В.Г., Лебедев И.Н., Маркова Е.В., Светлаков А.В. Структура числовых хромосомных нарушений и особенности их фенотипических эффектов на преимплантационных этапах развития человека // *Мед. генетика*. 2009. Т. 8. № 2. С. 19–24.
6. Gianaroli L., Magli M.C., Pomante A. et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study // *Fertil. Steril.* 2014. V. 102(6). P. 1692–1699.

Molecular Karyotyping of Cell-Free DNA from Blastocoele Fluid as a Basis for Noninvasive Preimplantation Genetic Screening of Aneuploidy

**N. A. Skryabin^{a, b}, I. N. Lebedev^{a, b}, V. G. Artukhova^c, D. I. Zhigalina^b,
I. A. Stepanov^d, G. V. Krivoschekova^d, and A. V. Svetlakov^c**

^a *Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050 Russia*
e-mail: nikolay.skryabin@medgenetics.ru

^b *National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

^c *ООО "Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine," Krasnoyarsk, 660037 Russia*

^d *Regional Perinatal Center, Tomsk, 634063 Russia*

The discovery of DNA fragments in the blastocoele fluid is promising for the development of new noninvasive methods for the preimplantation genetic diagnosis of chromosomal diseases. However, to date there are no data confirming the concordance between the molecular karyotype of cell-free DNA from blastocoele fluid and the blastocyst cells per se. This paper reports on this concordance according to the results of molecular-cytogenetic analysis of the chromosomal set with the use of comparative genomic hybridization.

Keywords: cell-free DNA, noninvasive preimplantation genetic diagnosis, aneuploidy, blastocoele fluid, blastocentesis.

English translation of the paper is published in "Russian J. Genetics" (2015, vol. 51, no. 11), www.maik.ru.