

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КАРИОТИПИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ИЗ ВНУТРИПОЛОСТНОЙ ЖИДКОСТИ БЛАСТОЦИСТЫ ЧЕЛОВЕКА, КЛЕТОК ЭМБРИОБЛАСТА И ТРОФЭКТОДЕРМЫ

© Д. И. Жигалина,¹ * Н. А. Скрябин,^{1,2} В. Г. Артюхова,³
А. В. Светлаков,³ И. Н. Лебедев^{1, 2, 4}

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050,

²Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томск, 634050,

³Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск, 660037,

и ⁴Сибирский государственный медицинский университет

Министерства здравоохранения РФ, Томск, 634050;

* электронный адрес: darya.zhigalina@medgenetics.ru

Проведен анализ соответствия молекулярных кариотипов, реконструированных с помощью сравнительной геномной гибридизации образцов внеклеточной ДНК из полости бластоцисты, хромосомному набору клеток трофэктодермы и внутренней клеточной массы бластоцист человека на преимплантационных этапах развития. Продемонстрированы различные типы распределения клеток с хромосомными аномалиями между разными тканями бластоцисты и ее внутриполостной жидкостью. Впервые показано, что источником внеклеточной ДНК в полости бластоцисты могут являться не только клетки трофэктодермы, традиционно используемые при проведении преимплантационной генетической диагностики хромосомных заболеваний, но и внутренней клеточной массы. Полученный факт поддерживает перспективность бластоцентеза как новой технологии преимплантационной генетической диагностики, обеспечивающей возможность интегрального анализа нарушений кариотипа в различных клетках бластоцисты.

Ключевые слова: бластоцентез, внеклеточная ДНК, преимплантационная генетическая диагностика, хромосомный мозаицизм, экстракорпоральное оплодотворение.

Принятые сокращения: ВКМ — внутренняя клеточная масса (эмбриобласт), внДНК — внеклеточная ДНК, ПГА — полногеномная амплификация, ПГД — преимплантационная генетическая диагностика, ТЭ — трофэктодерма, ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение.

Эмбрион человека достигает стадии бластоцисты на 4—5-е сут после оплодотворения. В этом момент он представлен двумя линиями клеток — внутренней клеточной массой (ВКМ) и трофэктодермой (ТЭ). На данной стадии формируются ионные градиенты, и при участии аквапоринов внутрь бластоцисты начинает поступать жидкость (Wargcroft et al., 2003). За счет притока жидкости пространство внутри бластоцисты начинает расширяться и формируется заполненная жидкостью полость — бластоцель. Некоторое время внимание исследователей было направлено на изучение биохимического состава этой внутриполостной жидкости (D'Alessandro et al., 2012). Однако в 2013 г. появилось первое сообщение об обнаружении в ней внеклеточной ДНК (внДНК; Palini et al., 2013). Итальянским исследователям удалось не только выделить эту фракцию ДНК, но и провести для нее полногеномную амплификацию (ПГА), а также гибридизацию на микрочипах.

Сравнительная геномная гибридизация (Comparative Genomic Hybridization, CGH) оказалась наиболее удобным и информативным методом для изучения хромосомных аномалий при использовании образцов внДНК из

жидкости бластоцисты. С ее помощью появляется возможность одновременно зарегистрировать все анеуплоидии, которые присутствовали в подвергшихся апоптозу клетках бластоцисты. Изучение внДНК представляется интересным и с точки зрения понимания закономерностей возникновения хромосомных аномалий на ранних этапах эмбрионального развития человека. Сопоставление молекулярных кариотипов внеклеточной ДНК из жидкости бластоцисты клеткам ВКМ и ТЭ могло бы способствовать расшифровке цитогенетических механизмов формирования хромосомного мозаицизма на ранних стадиях эмбриогенеза и принципов распределения анеуплоидных клеточных клонов между эмбриональными и внезародышевыми тканями (Chow et al., 2014).

В настоящий момент в литературе представлены единичные исследования, касающиеся цитогенетического анализа ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты, и полученные в них результаты весьма неоднозначны. Так, в одной из работ по результатам анализа ДНК из внутриполостной жидкости в 97,4 % случаев (38 из 39) удалось предсказать кариотип трофобласта (Gianaroli et al., 2014). В другом же исследовании было показано,

Результаты CGH-анализа внеклеточной ДНК из внутриполостной жидкости, клеток эмбриобласта и трофэктодермы 5 бластоцист

Эмбрион	внДНК	Эмбриобласт (ВКМ)	Трофэктодерма	Морфологическая характеристика
1	ish cgh dim(16,19)	ish cgh enh(1,16,19,20,22), dim(4)	ish cgh dim(19,22)	3AA
2	ish cgh enh(4), dim(16,17,19,22)	ish cgh enh(16,19,22)	ish cgh enh(14,16),dim(X)	3AA
3	ish cgh dim(16,17,19)	ish cgh enh(16,17,19,22)	ish cgh dim(16,19)	3BB
4	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh enh(17,19,22), dim(13)	ish cgh enh(17),dim(12)	3AA
5	ish cgh enh(4,X),dim (7,16)	ish cgh (1-22)×2,(XY)×1	ish cgh (1-22)×2,(XY)×1	3BB

Примечание. enh (enhanced) — амплификация хромосомного материала, dim (diminished) — делеция хромосомного материала, ish cgh (*in situ* hybridization comparative genomic hybridization) — сравнительная геномная гибридизация *in situ*.

что молекулярный кариотип внДНК из жидкости бластоцисты соответствовал кариотипу целой бластоцисты только для 48 % (29 из 60) проанализированных образцов (Tobler et al., 2015). Нами ранее было также проведено пилотное исследование по сопоставлению молекулярных кариотипов целой бластоцисты и внДНК из ее полости, которое продемонстрировало их соответствие (Скрябин и др., 2015). Однако во всех отмеченных работах сравнивали только молекулярные кариотипы ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты с отдельными клетками ТЭ или целой бластоцисты, тогда как кариотип клеток ВКМ проанализирован не был. В настоящей работе впервые приведены результаты такого анализа.

Материал и методика

Для исследования было использовано 5 бластоцист, по морфологии характеризующихся как бластоцисты хорошего качества (3AA-3BB) (табл. 1), полученных с информированного согласия супружеских пар в рамках циклов искусственного оплодотворения. Бластоцентез, забор и разделение тканей (ТЭ и ВКМ) был проведен на 5-е сут после оплодотворения. Жидкость из полости бластоцисты, ВКМ и ТЭ были изолированно перенесены в пробирки с 1.5 мкл стерильного раствора PBS. До проведения исследований все образцы находились при -20°C . Для контроля при постановке сравнительной геномной гибридизации было взято 10 нг ДНК индивида мужского пола.

Процедуры постановки полногеномной амплификации, мечения ДНК флуоресцентными красителями, гибридизации и детекции были подробно описаны в нашей предыдущей работе (Скрябин и др., 2015).

Результаты и обсуждение

В настоящей работе с помощью сравнительной геномной гибридизации были получены молекулярные кариотипы клеток ВКМ, ТЭ, а также внДНК из внутриполостной жидкости 5 бластоцист (табл. 1). Результаты свидетельствуют о значительной гетерогенности хромосомных аномалий в исследованных образцах. На это указывают результаты исследования первых трех бластоцист. В клетках бластоцисты № 4 также были выявлены множественные хромосомные аномалии, однако при ПГА образца внутриполостной жидкости данной бластоцисты не был получен продукт, что, возможно, объясняется отсут-

ствием в ней внДНК. Подобные случаи были описаны и в других работах (Palini et al., 2013; Gianaroli et al., 2014; Tobler et al., 2015). В пятой бластоцисте молекулярное кариотипирование показало наличие анеуплоидий в внДНК, в то время как ВКМ и ТЭ оказались эуплоидными. Возможно, что в процессе развития эмбриона клетки с хромосомными аберрациями элиминировались. Таким образом, после апоптоза ДНК из них попала во внутриполостную жидкость. В литературе встречаются сообщения о коррекции числа анеуплоидных клеток в процессе развития эмбриона с 3-х до 5-х дней (Barbash-Hazan et al., 2009; Gianaroli et al., 2014). Тоблер с соавторами (Tobler et al., 2015) высказывают предположение о наличии на этапе дробления механизмов селективной элиминации клеток с аномальным кариотипом.

Дизайн настоящего исследования позволил провести анализ вариантов распределения клеток с анеуплоидией по отдельным хромосомам между ВКМ, ТЭ и внутриполостной жидкостью. Теоретически возможно семь таких вариантов распределения, шесть из которых представлены среди аномалий, выявленных в настоящем исследовании. Первые три варианта распределения включают в себя наличие анеуплоидии по одной хромосоме только в одном из исследованных образцов. Следующие три варианта подразумевают наличие анеуплоидии по одной хромосоме в двух образцах. И наконец, последний вариант распределения анеуплоидии включает в себя наличие аномалии одновременно во всех трех образцах. В данный анализ были включены хромосомные анеуплоидии по конкретной хромосоме, которые встретились в разных комбинациях межтканевых распределений в пределах каждой бластоцисты. Всего было идентифицировано 26 анеуплоидий. При этом за единицу принимались случаи, когда в разных образцах одной бластоцисты были выявлены моносомии и трисомии по одной и той же хромосоме, поскольку наиболее вероятным механизмом происхождения таких реципрокных аномалий является одно событие, а именно нерасхождение хромосом в ходе митоза (табл. 2).

В результате было показано, что чаще всего встречаются анеуплоидии, выявляемые только во внутриполостной жидкости бластоцисты и в ВКМ (6 и 7 наблюдений соответственно). Анеуплоидии, выявляемые только во внДНК, скорее всего, являются результатом коррекции хромосомных аномалий в клетках бластоцисты, которая в отдельных случаях может приводить к нормализации молекулярного кариотипа в клетках бластоцисты. Данный тип аномалий наблюдался в двух бластоцистах (№ 2 и 5).

Т а б л и ц а 2

Варианты распределения клеток с анеуплоидией по отдельным хромосомам между ВКМ, ТЭ и внутриполостной жидкостью

Вариант распределения	внДНК	Эмбриобласт (ВКМ)	Трофэктодерма	Номер бластоцисты
1	Аномалия	Норма	Норма	
	Трисомия 4	—	—	2
	Моносомия 17	—	—	5
	Трисомия 4	—	—	5
	Трисомия X	—	—	5
	Моносомия 7	—	—	5
	Моносомия 16	—	—	
2	Норма	Аномалия	Норма	
	—	Трисомия 1	—	1
	—	Трисомия 20	—	1
	—	Моносомия 4	—	1
	—	Трисомия 22	—	3
	—	Трисомия 19	—	4
	—	Трисомия 22	—	4
—	Моносомия 13	—	4	
3	Норма	Норма	Аномалия	
			Трисомия 14	2
			Делеция X	2
4	Аномалия	Аномалия	Норма	
	Моносомия 16	Трисомия 16	—	1
	Моносомия 19	Трисомия 19	—	2
	Моносомия 22	Трисомия 22	—	2
	Моносомия 17	Трисомия 17	—	3
5	Аномалия	Норма	Аномалия	
	—	—	—	
6	Норма	Аномалия	Аномалия	
	—	Трисомия 22	Моносомия 22	1
	—	Трисомия 17	Трисомия 17	4
7	Аномалия	Аномалия	Аномалия	
	Моносомия 19	Трисомия 19	Моносомия 19	1
	Моносомия 16	Трисомия 16	Трисомия 16	2
	То же	То же	Моносомия 16	3
	Моносомия 19	Трисомия 19	Моносомия 19	3

Анеуплоидии, выявляемые только в ВКМ, наблюдались в 3 бластоцистах (№ 1, 3 и 4). Возможно, именно этот тип распределения анеуплоидий лежит в основе того, что эффективность ЭКО после ПГД с помощью биопсии ТЭ составляет в среднем не более 60 % (Lee et al., 2015). К аналогичному результату может приводить четвертый вариант распределения — наличие анеуплоидий только в внДНК и ВКМ, который в нашем исследовании был отмечен в 4 случаях. Примечательно то, что все хромосомные aberrации в данной группе явились реципрокными (трисомии во ВКМ и моносомии в внДНК). Это указывает на постзиготическое происхождение мутаций с элиминацией моносомного клеточного клона. Для выявления хромосомных мутаций при таком типе распределения целесообразно использовать внДНК в диагностике если не как самостоятельного образца, то в качестве дополнения к традиционной биопсии ТЭ. К ложноположительным ре-

зультатам могут приводить распределения по третьему (наличие хромосомных aberrаций только в ТЭ (3 случая в настоящей работе)) и пятому (наличие анеуплоидий только во внДНК и ТЭ) вариантам. Однако ни одного случая распределения анеуплоидий по последнему типу в настоящем исследовании обнаружено не было.

Самым редким среди выявленных распределений является шестой вариант, представленный наличием аномалий в ВКМ и ТЭ, но нормальным кариотипом, реконструируемым по анализу внДНК. Последний, седьмой, вариант распределения анеуплоидий характеризуется наличием хромосомных aberrаций во всех трех образцах. В настоящей работе было выявлено 4 случая такого распределения в бластоцистах № 1—3. Все они характеризовались наличием реципрокных анеуплоидий. При этом в бластоцистах № 1 и 3 в ВКМ наблюдались трисомии хромосом 16 и 19, в то время как в ТЭ и в внДНК регистри-

ровались моносомии по этим хромосомам, что указывает не только на постзиготическое событие в происхождении этих реципрокных аномалий, но и на наличие межклеточного мозаицизма в их распределении. В бластоцисте № 2 выявлены трисомии в ВКМ и ТЭ и моносомия в вДНК.

Нами было оценено соотношение трисомий и моносомий в ВКМ, ТЭ и вДНК. Для ВКМ оно составило 7.5 : 1, для трофобласта — 1 : 2, а для внутриполостной жидкости — 1 : 3.7. Значительное преобладание трисомий в ВКМ и обратная ситуация в ТЭ указывают на преимущественную элиминацию клеток с моносомиями в производных внутренней клеточной массы. Данный феномен подтверждается другими работами, в которых сообщается о преобладании трисомий в ВКМ и моносомий в ТЭ (Evsikov, Verlinsky, 1998; Chung et al., 2013; Yang et al., 2013). Возможно, это связано с тем, что моносомные клетки имеют дифференциальную жизнеспособность в зародышевых и внезародышевых листках. Клетки с моносомиями как продукты нерасхождения или отставания хромосом могут исключаться из ВКМ, которая дает начало всем эмбриональным структурам, но при этом сохраняются в трофобласте, отвечающем за имплантацию бластоцисты.

Для внутриполостной жидкости бластоцисты было показано близкое к трофобласту соотношение хромосомных аномалий. Можно предположить, что клетки ТЭ подвергаются апоптозу чаще, чем клетки ВКМ, и ДНК из них попадает в полость бластоцисты. Различия по уровню апоптоза подтверждаются результатами экспериментальных исследований (Hardy et al., 1989).

В заключение можно отметить, что использованный в настоящем исследовании анализ клеток ВКМ наряду с изучением ТЭ и вДНК позволил выявить значительное разнообразие хромосомных аномалий и их распределений между производными зародышевых и внезародышевых листков, даже несмотря на то что работа была проведена на ограниченном объеме бластоцист высокого, по морфологическим характеристикам, качества. Данный факт с новых позиций подтверждает высокий уровень хромосомной изменчивости на преимплантационных этапах развития человека и в отсутствие информации о кариотипе клеток внутренней клеточной массы при проведении преимплантационной генетической диагностики хромосомных заболеваний акцентирует внимание на потенциальной диагностической ценности бластоцентеза, позволяющего получить интегральную оценку кариотипа развивающейся бластоцисты.

Исследование было выполнено в рамках программы «Научный фонд им. Д. И. Менделеева Томского государственного университета» в 2015 г. и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-08265).

Список литературы

- Скрябин Н. А., Лебедев И. Н., Артюхова В. Г., Жигалина Д. И., Степанов И. А., Кривошекова Г. В., Светлаков А. В. 2015. Молекулярное кариотипирование внеклеточной ДНК из жидкости бластоцисты как основа неинвазивного преимплантационного генетического скрининга анеуплоидий. *Генетика*. 51 (11) : 1301—1307. (Skryabin N. A., Lebedev I. N., Artukhova V. G., Zhigalina D. I., Stepanov I. A., Krivoschekova G. V., Svetlakov A. V. 2015. Molecular karyotyping of free cell DNA from blastocoele fluid as a basis for noninvasive preimplantation genetic screening of aneuploidy. *Genetics*. 51 (11) : 1123—1128.)
- Barbash-Hazan S., Frumkin T., Malcov M., Yaron Y., Cohen T., Azem F., Amit A., Ben-Yosef D. 2009. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil. Steril.* 92 : 890—896.
- Barcroft L. C., Offenbergh H., Thomsen P., Watson A. J. 2003. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Develop. Biol.* 256 : 342—354.
- Chow J. F., Yeung W. S., Lau E. Y., Lee V. C., Ng E. H., Ho P. C. 2014. Array comparative genomic hybridization analyses of all blastomeres of a cohort of embryos from young IVF patients revealed significant contribution of mitotic errors to embryo mosaicism at the cleavage stage. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12 : 105.
- Chung M. K., Jeong H. J., Lee J. H., Park S. J., Chung H. D., Kang H. Y. 2013. Comprehensive chromosome analysis of blastocysts before implantation using array CGH. *Mol. Cytogenet.* 6 : 1—4.
- D'Alessandro A., Federica G., Palini S., Bulletti C., Zolla L. 2012. A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in fertility research. *Mol. BioSyst.* 8 : 953—958.
- Evsikov S., Verlinsky Y. 1998. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum. Reprod.* 13 : 3151—3155.
- Gianaroli L., Magli M. C., Pomante A., Crivello A. M., Cafueri G., Valerio M., Ferraretti A. P. 2014. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil. Steril.* 102 : 1692—1699.
- Hardy K., Handyside A. H., Winston R. M. 1989. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. *Development.* 107 : 597—604.
- Lee E., Illingworth P., Wilton L., Chambers G. M. 2015. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A) : systematic review. *Hum. Reprod.* 30 : 473—483.
- Palini S., Galluzzi L., De Stefani S., Bianchi M., Wells D., Magnani M., Bulletti C. 2013. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod. Biomed. Online.* 26 : 603—610.
- Tobler K. J., Zhao Y., Ross R., Benner A. T., Xu X., Du L., Broman B. S., Thrift K., Brezina P. R., Kearns W. G. 2015. Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil. Steril.* 104 : 418—425.
- Yang Z., Salem S. A., Liu X., Kuang Y., Salem R. D., Liu J. 2013. Selection of euploid blastocysts for cryopreservation with array comparative genomic hybridization (aCGH) results in increased implantation rates in subsequent frozen and thawed embryo transfer cycles. *Mol. Cytogenet.* 6 : 32.

MOLECULAR KARYOTYPING BY USING CELL-FREE DNA FROM HUMAN
BLASTOCOELE FLUID, EMBRYOBLAST AND TROPHOBLAST CELLS

D. I. Zhigalina,^{1,*} N. A. Skryabin,^{1,2} V. G. Artyukhova,³ A. V. Svetlakov,³ I. N. Lebedev^{1, 2, 4}

¹ National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050,

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050,

³ Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine, Krasnoyarsk, 660037,

and ⁴ Siberian State Medical University, Tomsk, 634050;

* e-mail: darya.zhigalina@medgenetics.ru

In the present study, we have carried out a comparative analysis of molecular karyotypes of cell free DNA from blastocoele fluid, trophoctoderm and inner cell mass of human blastocysts at the preimplantation stages of development, using the comparative genomic hybridization. Different types of chromosomal abnormalities distribution between trophoctoderm, inner cell mass and blastocoele fluid were identified. It was first shown that the source of cell free DNA in the blastocoele fluid may arise from the cells of inner cell mass in addition to the trophoctoderm cells, which are traditionally used in preimplantation genetic diagnosis of chromosomal aberrations. These results support the promising of blastocentesis as a new technology of preimplantation genetic diagnosis, which provides the possibility of integral analysis of chromosome abnormalities in different cells of the blastocyst.

Key words: blastocentesis, cell free DNA, preimplantation genetic diagnosis, chromosomal mosaicism, *in vitro* fertilization.
