

Распространение реципрокных анеуплоидий на преимплантационном этапе развития на основе данных молекулярного кариотипирования внеклеточной ДНК бластоцисты

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

¹ — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск; * darya.zhigalina@medgenetics.ru

² — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск

³ — Общество с ограниченной ответственностью «Красноярский центр репродуктивной медицины»

Актуальность: Сравнительный анализ молекулярных кариотипов внеклеточной ДНК из внутриполостной жидкости, внутренней клеточной массы и трофобластической бластоцисты позволяет зарегистрировать феномен реципрокных анеуплоидий. Это дает возможность определить источник происхождения числовых хромосомных нарушений, а также предположить механизмы их возникновения, связанные с постзиготическими ошибками сегрегации хромосом. **Цель:** Оценка частоты реципрокных анеуплоидий у эмбрионов человека на стадии бластоцисты. **Материалы и методы:** CGH-анализ 14 эмбрионов человека на 5 день развития с разделением на внутреннюю клеточную массу, трофобластическую и внутриполостную жидкость. **Результаты:** При сравнении молекулярных кариотипов ДНК из внутриполостной жидкости, внутренней клеточной массы и трофобластической бластоцисты обнаружено, что у 64% эмбрионов имелись от 1 до 3 реципрокных анеуплоидий (9/14). В формирование реципрокных аномалий были вовлечены хромосомы 19 (33%), 16 (27%), 17, 21, 22 (по 13%). Частота реципрокных анеуплоидий в расчете на пару гомологичных хромосом, полученная на основе сравнительного анализа молекулярных кариотипов внеклеточной ДНК, внутренней клеточной массы и трофобластической бластоцисты, составила 24% (16/67); при сравнении внеклеточной ДНК и внутренней клеточной массы — 21% (14/67), внеклеточной ДНК и трофобластической бластоцисты — 3% (2/67), а при сравнении внутренней клеточной массы и трофобластической бластоцисты — 10% (7/67). **Выводы:** Использование внеклеточной ДНК из полости бластоцисты в качестве источника дополнительной информации о хромосомной конституции эмбриона позволяет на 56% повысить вероятность выявления реципрокных анеуплоидий, отражающих интенсивность постзиготических митотических ошибок сегрегации хромосом.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, хромосомный мозаицизм, внутриполостная жидкость бластоцисты, внутренняя клеточная масса, трофобластическая бластоциста, реципрокные анеуплоидии

The study of the spread of reciprocal aneuploidies on preimplantation development using molecular karyotyping of extracellular blastocyst DNA

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

¹ — National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia; * darya.zhigalina@medgenetics.ru

² — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMC, Tomsk, Russia

³ — Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine, Krasnoyarsk

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

Actuality: A comparative analysis of the molecular karyotypes of extracellular DNA in intracavitary fluid, inner cell mass and trophectoderm allows registering the phenomenon of reciprocal aneuploidies. This makes it possible to determine the origin of numerical chromosome abnormalities and suggest mechanisms of their occurrence related to post-zygotic chromosome segregation errors. **Objective:** Evaluation of the frequency of reciprocal aneuploidy in human embryos at the blastocyst stage. **Materials and Methods:** CGH-analysis of 14 human embryos (day 5) with separation to inner cell mass, trophectoderm and intracavitary fluid. **Results:** By comparing the molecular karyotypes of DNA from blastocoel fluid, inner cell mass and trophectoderm was found that 64% of embryos had from 1 to 3 reciprocal aneuploidies (9/14). Reciprocal anomalies were formed involving chromosomes 19 (33%), 16 (27%), 17, 21 and 22 (13%). The frequency of reciprocal aneuploidies based on a pair of homologous chromosomes, obtained on the basis of comparative analysis of the molecular karyotype of extracellular DNA, the inner cell mass and trophectoderm was 24% (16/67). The frequency of reciprocal aneuploidies in a comparative analysis of extracellular DNA and the inner cell mass was 21% (14/67), extracellular DNA and trophectoderm — 3% (2/67), inner cell mass and trophectoderm — 10% (7/67). **Conclusions:** Using of extracellular DNA from the cavity of the blastocyst as a source of additional information about the chromosomal constitution of embryo can increase the probability of detecting of reciprocal aneuploidy by 56%. These anomalies reflect an intensity of mitotic chromosome segregation errors.

Keywords: extracellular DNA, chromosomal mosaicism, intracavitary fluid, inner cell mass, trophectoderm, reciprocal aneuploidy

Введение

В 2013 году было показано наличие внеклеточной ДНК (внДНК) во внутриполостной жидкости бластоцисты [1]. Поскольку она формируется из ДНК клеток эмбриона, подвергшихся апоптозу в процессе развития, анализ внутриполостной жидкости дает уникальную возможность оценить частоту и разнообразие анеуплоидий в погибших клетках. Сопоставление результатов молекулярного кариотипирования из внутриполостной жидкости и тканей бластоцисты позволяет проследить источник происхождения аномалии, предположить механизмы ее возникновения за счет регистрации феномена реципрокных анеуплоидий (сочетания трисомии и моносомии по одной и той же паре гомологичных хромосом), маркирующих постзиготическое событие нерасхождения хромосом в клетках с нормальным кариотипом. Целью настоящего исследования стала характеристика феномена реципрокных аномалий у эмбрионов на стадии бластоцисты.

Материал и методика

Проанализировано 14 бластоцист, имеющих хорошие морфологические характеристики (3АА-3ВВ). Все бластоцисты для научного исследования были получены с добровольного информированного согласия пациентов после проведения циклов ЭКО и по желанию пациентов не подлежали дальнейшей криоконсервации. На 5-й день развития производили бластоцетез каждой бластоцисты, а также разделение и забор внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЭ). Полученные образцы помещали в стерильные микропробирки с 1,5 мл раствора PBS (Qiagen, США) и замораживали при -20°C . Для сравнительной геномной гибридизации (CGH) в качестве контрольного образца использовали ДНК индивида мужского пола с нормальным кариотипом (#5190-4240, Agilent Technologies, США). Лизис клеток и полногеномную амплификацию ДНК (ПГА) исследуемых и контрольных образцов проводили с помощью набора REPLI-g Mini-Kit (#150023, Qiagen, США) с модификациями. Образцы ДНК метили флюоресцентными красителями (Fluorescein, TAMRA) в ходе ник-трансляции. Препараты метафазных хромосом были получены из лимфоцитов периферической крови индивида мужского пола с нормальным кариотипом. Гибридизацию ДНК-библиотек на метафазные пластинки проводили в гибридизационной камере «ThermoBrite» (Abbott Molecular, США) в течение 72 часов при 37°C с 50х избытком $\text{C}_{\text{gt-1}}$ ДНК (#5190-3393, Agilent Technologies, США). Препараты метафазных хромосом окрашивали DAPI. Детекцию гибридизационных сигналов проводили на люминесцентном микроскопе «AxioImager.Z2» (Carl Zeiss, Германия). Для анализа результатов CGH использовали программный продукт «Isis — CGH Software» (Metasystems, Германия).

Результаты

О наличии у эмбриона на преимплантационном этапе развития реципрокных анеуплоидий можно говорить в случае, когда присутствуют клеточные клоны с трисомией и с моносомией по одной и той же паре гомологичных хромосом [2]. При сравнении молекулярных кариотипов внутриполостной жидкости, ВКМ и ТЭ было обнаружено, что у 64% (9/14) эмбрионов имеется от 1 до 3 реципрокных аберраций. В формирование реципрокных аномалий были вовлечены хромосомы 19 (33%), 16 (27%), 17, 21 и 22 (по 13%). Известно, что анеуплоидии хромосом 16 и 21 у спонтанных абортусов в первом триместре беременности встречаются чаще (25,3% и 11,6% соответственно), чем на стадии бластоцисты (9,76% и 7,28% соответственно). В свою очередь, частота числовых аномалий хромосом 17, 19 и 22, напротив, у абортусов (0,2%, 0%, 7,3% соответственно), по сравнению со стадией бластоцисты, существенно снижается (3,23%, 3,77%, 11,57% соответственно) [3, 4]. Вероятно, это обусловлено тем, что данные анеуплоидии приводят к серьезным нарушениям раннего эмбриогенеза, например, к ошибкам имплантации.

Поскольку расхождение пары хромосом в процессе митоза происходит независимо от других хромосом, в данной работе был проведен анализ типов распределения клеток с анеуплоидией по отдельным хромосомам между ВКМ, ТЭ и внутриполостной жидкостью бластоцист (таблица). Из дальнейшего анализа были исключены те случаи, в которых не было получено продукта ПГА. Было выявлено 4 из 6 теоретически возможных комбинаций распределения реципрокных анеуплоидий между двумя эмбриональными тканями (ВКМ и ТЭ) и внутриполостной жидкостью. Частота реципрокных аномалий, определенная на основе анализа всех трех образцов, составила 24% (16/67). При сравнительном анализе только внДНК и ВКМ данный показатель составил 21% (14/67), при анализе внДНК и ТЭ — 3% (2/67), а при сравнении ВКМ и ТЭ — 10% (7/67). Таким образом, использование внДНК в качестве источника дополнительной информации о хромосомной конституции эмбриона позволило на 56% (9/16) повысить вероятность выявления реципрокных анеуплоидий.

Было отмечено, что частота выявления реципрокных анеуплоидий при сравнении молекулярных кариотипов ВКМ и внДНК (21%) оказалась значительно выше, чем при сопоставлении ТЭ и внДНК (3%). Это может указывать на то, что наиболее часто апоптозу подвергаются, по всей видимости, моносомные клеточные клоны из ВКМ. Более того, в 64% (9/14) образцов внДНК встречались именно моносомии.

Обсуждение

Учитывая, что при коррекции трисомной зиготы отставание хромосом приводит к формированию двух клеточных клонов — трисомного и с нормальной хро-

мосомной конституцией, а нерасхождение — к формированию диплоидного и тетрасомного клонов [5], становится более вероятным, что реципрокные аберрации могут сформироваться в ходе одного события нерасхождения хромосом в клетке с изначально нормальным кариотипом на стадии дробления. Таким образом, оценка уровня реципрокных анеуплоидий отражает интенсивность постзиготических ошибок сегрегации хромосом, лежащих, в том числе, в основе возникновения хромосомного мозаицизма. В связи с этим, 33% (36/110) хромосомных анеуплоидий, обнаруженных в бластоцистах в настоящей работе, скорее всего, имеют постзиготическое митотическое происхождение.

На основании полученных данных можно отметить, что именно сравнительный анализ ВКМ и вДНК по-

зволяет с наибольшей вероятностью выявлять реципрокные аберрации. Вероятно, именно поэтому в другом исследовании, где проводился сравнительный анализ только вДНК и ТЭ, реципрокных анеуплоидий выявлено не было [6].

В нашем исследовании такая пара сравнений также продемонстрировала минимальную частоту регистрации реципрокных числовых нарушений хромосом. Еще в одной работе реципрокные аномалии составили всего 10% (8/77) от всех выявленных анеуплоидий [7]. Сравнительно низкий процент можно объяснить тем, что в работе Tobler K.J. с соавторами не проводилось разделение тканей бластоцист на ВКМ и ТЭ для дальнейшего aCGH-анализа. Поэтому часть анеуплоидий могла быть не выявлена по методическим причинам.

Таблица

Варианты распределения клеток с нормальным кариотипом и анеуплоидией по отдельным хромосомам между внутренней клеточной массой, трофобластомой и внутриполостной жидкостью бластоцист

	вДНК	ВКМ	ТЭ	Число случаев
Варианты распределения не реципрокных анеуплоидий				
Вариант 1	N	N	N	0
Вариант 2	трисомия	N	N	5
	моносомия	N	N	5
Вариант 3	N	трисомия	N	14
	N	моносомия	N	6
Вариант 4	N	N	трисомия	10
	N	N	моносомия	7
Вариант 5	N	моносомия	моносомия	4
	N	трисомия	трисомия	0
Вариант 6	трисомия	трисомия	трисомия	0
	моносомия	моносомия	моносомия	0
Варианты распределения реципрокных анеуплоидий				
Вариант 7	трисомия	моносомия	трисомия	2
	моносомия	трисомия	моносомия	3
Вариант 8	трисомия	моносомия	моносомия	2
	моносомия	трисомия	трисомия	0
Вариант 9	трисомия	трисомия	моносомия	0
	моносомия	моносомия	трисомия	0
Вариант 10	моносомия	трисомия	N	4
	трисомия	моносомия	N	3
Вариант 11	трисомия	N	моносомия	0
	моносомия	N	трисомия	0
Вариант 12	N	трисомия	моносомия	1
	N	моносомия	трисомия	1
Всего				67

Примечание. Под одним "Вариантом" понимается наличие или трисомии, или моносомии, как реципрокных форм анеуплоидии по одной и той же хромосоме; N — сбалансированный хромосомный набор по результатам CGH.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее вероятным источником вДНК являются клетки ВКМ. Использование вДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты заметно повышает вероятность выявления реципрокных анеуплоидий. В свою очередь, регистрация подобного феномена позволяет оценить вклад митотических *de novo* ошибок сегрегации хромосом в генерацию хромосомного мозаицизма на преимплантационных этапах развития.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 15-04-08265 и в рамках Программы «Научный фонд им. Д.И. Менделеева Томского государственного университета» в 2015 г.

Список литературы

1. Palini S, Galluzzi L, De Stefani S et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod. Biomed. Online*. 2013; 26(6): 603-610.
2. Chow JF, Yeung WS, Lau EY et al. 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.* 2014; 12(1): 105.
3. Lebedev I Mosaic aneuploidy in early fetal losses. *Cytogenetic and genome research*. 2011; 133(2-4): 169-183.
4. Fragouli E, Alfarawati S, Spath K et al. The origin and impact of embryonic aneuploidy. *Human genetics*. 2013; 132(9): 1001-1013.
5. Kalousek DK Confined placental mosaicism and uniparental disomy. *Funct. Dev. Morph.* 1994; 4(2): 93-98.
6. Gianaroli L, Magli MC, Pomante A et al. Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study. *Fertil. Steril.* 2014; 102(6): 1692-1699.
7. Tobler KJ, Zhao Y, Ross R et al. Blastocoel fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil. Steril.* 2015; 104(2): 418-425.