

Информативность бластоцентеза в оценке хромосомного мозаицизма на стадии бластоцисты

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

¹ — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск

* e-mail: nikolay.skryabin@medgenetics.ru

² — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

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

⁴ — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

Актуальность. У эмбрионов человека на преимплантационном этапе развития часто регистрируется явление хромосомного мозаицизма. Это может быть обусловлено особенностями сегрегации хромосом на данном этапе онтогенеза. Использование внеклеточной ДНК из внутрисполостной жидкости может способствовать изучению частоты и механизмов возникновения хромосомного мозаицизма в бластоцисте путем анализа кариотипа клеток, подвергшихся апоптозу и недоступных для кариотипирования с применением традиционных технологий цитогенетического исследования. **Цель:** оценка частоты хромосомного мозаицизма у эмбрионов человека на стадии бластоцисты. **Материалы и методы.** CGH-анализ 14 эмбрионов человека на 5 день развития с разделением на внутреннюю клеточную массу, трофэктодерму и внутрисполостную жидкость. **Результаты.** Анализ клеток эмбриобласта и трофобласта 14 бластоцист показал, что мозаицизм в каждом эмбрионе наблюдается в среднем по 5 хромосомам. При этом дополнительное использование внеклеточной ДНК приводит к увеличению спектра мозаичных хромосомных аномалий до 7 на образец. Анализ молекулярных кариотипов с использованием внеклеточной ДНК доказывает преимущественную элиминацию клеток с аутомсомными моносомиями из эмбриобласта. **Выводы.** Использование внеклеточной ДНК из полости бластоцисты повышает частоту регистрации хромосомного мозаицизма в циклах экстракорпорального оплодотворения и преимплантационной генетической диагностики в основном за счет анеуплоидий, представленных во внутренней клеточной массе бластоцисты.

Ключевые слова: бластоцентез, внеклеточная ДНК, хромосомный мозаицизм, внутрисполостная жидкость бластоцисты, внутренняя клеточная масса, трофэктодерма

Informativity of blastocentesis in the evaluation of chromosomal mosaicism at the blastocyst stage

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

¹ — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

* e-mail: nikolay.skryabin@medgenetics.ru

² — National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ — Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine, Krasnoyarsk, Russia

⁴ — Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Actuality: Phenomenon of chromosomal mosaicism often recorded the in human embryos at the preimplantation stage of development. This may be due to features of chromosome segregation at this stage of ontogenesis. The use of extracellular DNA from the intracavitary fluid may contribute to the study of the frequency and mechanisms of occurrence of chromosomal mosaicism in the blastocyst. This is achieved by molecular karyotyping of cells undergoing apoptosis and inaccessible for karyotyping using traditional technologies of cytogenetic studies. **Objective:** Evaluation the frequency of chromosomal mosaicism in human embryos at the blastocyst stage. **Materials and Methods:** CGH-analysis of 14 human embryos on day 5 of a division of the inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. **Results:** Comparative analysis of karyotypes of embryoblast and trophoblast of 14 blastocysts revealed that mosaicism in each embryo is observed on average in five chromosomes. Additional use of cell-free DNA leads to increase of spectrum of mosaic chromosomal abnormalities to 7 per sample. Analysis of molecular karyotypes using extracellular DNA proves the predominant elimination of embryoblast cells with autosomal monosomy. **Conclusions:** The use of extracellular DNA from the cavity of the blastocyst increases the frequency of chromosomal mosaicism registration in the cycles of in vitro fertilization and preimplantation genetic diagnosis. This is accomplished primarily due to the identification of aneuploidies presented in the inner cell mass of the blastocyst.

Keywords: cell-free DNA, chromosomal mosaicism, blastocysts intracavitary fluid, embryoblast, trophectoderm

Введение

Хромосомные аномалии являются основной причиной нарушения развития эмбрионов человека на преимплантационном этапе развития [1]. Показано, что у значительной части (около 70%) эмбрионов хромосомные aberrации представлены мозаичными формами [2, 3]. При этом высокая частота мозаицизма наблюдается как у эмбрионов на стадии дробления, так и в бластоцистах. Предполагается, что основной причиной мозаицизма являются постзиготические (митотические) аномалии сегрегации хромосом [4]. Одним из возможных подходов для более полного понимания механизмов возникновения мозаицизма является анализ внеклеточной ДНК (внДНК) во внутрисполостной жидкости бластоцисты [5], которая может дать ценную упускаемую информацию о кариотипе клеток, подвергшихся апоптозу. В настоящей работе мы сообщаем о результатах сравнительного молекулярного кариотипирования внДНК, внутренней клеточной массы (ВКМ) и ТЭ бластоцист.

Материал и методика

Проанализировано 14 бластоцист с нормальной морфологией (категория 3AA-3BB). 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 производился бластоцентез каждой бластоцисты, а также разделение и забор эмбриобласта и трофэктодермы. Полученные из бластоцист клетки эмбриобласта, трофэктодермы и внутрисполостная жидкость помещались

в стерильные микропробирки, содержащие 1,5 мкл раствора PBS (Qiagen, США) и замораживались при -20°C . Для проведения сравнительной геномной гибридизации в качестве контрольного образца использовали ДНК индивида мужского пола с нормальным кариотипом (#5190-4240, Agilent Technologies, США). Лизис клеток и полногеномную амплификацию (ПГА) исследуемых и контрольных образцов проводили с помощью коммерческого набора REPLI-g MiniKit (#150023, Qiagen, США) с модификациями. Для CGH образцы соответствующим образом метили флюоресцентными красителями (Fluorescein, TAMRA) в ходе реакции ник-трансляции. Качество мечения оценивали путем электрофореза в агарозном геле.

Препараты метафазных хромосом были получены из лимфоцитов периферической крови индивида мужского пола с нормальным кариотипом. Гибридизация полученных ДНК-библиотек на метафазные пластинки проводилась в гибридизационной камере «ThermoBrite» («Abbott Molecular», США) в течение 72 часов при 37°C с 50х избытком C_{0t-1} ДНК (# 5190-3393, Agilent Technologies, США). Препараты хромосом окрашивались DAPI. Детекцию гибридизационных сигналов проводили на люминесцентном микроскопе «AxioImager.Z2» («Carl Zeiss», Германия). Для компьютерной обработки и анализа результатов CGH использовали программный продукт «Isis — CGH Software» («Metasystems», Германия).

Результаты и обсуждение

В таблице представлены результаты анализа тканей и внДНК бластоцист. Анализ ВКМ и ТЭ 14 бластоцист

Таблица

Результаты CGH-анализа внеклеточной ДНК из внутрисполостной жидкости, клеток эмбриобласта и трофэктодермы бластоцист человека

Эмбрион	внДНК	ВКМ	ТЭ
1	ish cgh dim(16,19)	ish cgh enh(1,16,19,20,22), dim(4)	ish cgh dim(19,22)
2	ish cgh enh(4), dim(16,17,19,22)	ish cgh enh(16,19,22)	ish cgh enh(14,16),dim(X)
3	ish cgh dim(16,17,19)	ish cgh enh(16,17,19,22)	ish cgh dim(16, 19)
4	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh enh(17,19,22), dim(13)	ish cgh enh(17),dim(12)
5	ish cgh enh(4,X),dim(7,16)	ish cgh (1-22) x 2,(XY) x 1	ish cgh (1-22) x 2,(XY) x 1
6	ish cgh (1-22)x2,(XY) x 1	ish cgh enh(16), dim(22,X)	ish cgh enh(10, 18), dim(11,19)
7	ish cgh (1-22)x2,(XY) x 1	ish cgh enh(1,11,13), dim(4,5,Y)	ish cgh dim(Y)
8	ish cgh enh (17,19)	ish cgh enh(3,X), dim (17,19,21)	ish cgh enh(14,17,19,21), dim(1,13)
9	ish cgh (1-22) x 2,(XY) x 1	ish cgh enh(16,17,19,21),	ish cgh enh(20,X), dim(15)
10	ish cgh dim(16)	ish cgh enh(16), dim(17,19,21)	ish cgh enh(3,11,16), dim(17,19,21)
11	ish cgh enh(19,20,21), dim(4,6)	ish cgh dim(19)	ish cgh (1-22) x 2,(XX) x 1
12	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh dim(19,20,21)	ish cgh enh(1,4,19)
13	ish cgh enh(19,21)	ish cgh enh(4), dim(17,19,21)	ish cgh enh(16,18), dim(8)
14	ish cgh enh(19)	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh enh(3,13), dim(19)

Примечание. ВКМ — внутренняя клеточная масса, ТЭ — трофэктодерма

показал, что мозаицизм в каждом эмбрионе наблюдается в среднем по 5 хромосомам (от 1 до 11 хромосом на эмбрион). При этом дополнительное использование вДНК приводит к увеличению спектра мозаичных хромосомных аномалий до 7 на образец (от 4 до 11 хромосом на эмбрион). В значительной степени увеличение спектра обусловлено регистрацией реципрокных анеуплоидий (трисомий и моносомий по одной и той же гомологичной хромосоме) во вДНК бластоцисты по отношению к анеуплоидиям в клетках эмбриона. Вероятно, что выявленные реципрокные аномалии являются результатом одного события митотического нерасхождения хромосом в клетке с изначально нормальным кариотипом. Следовательно, использование вДНК из полости бластоцисты позволяет более детально изучить механизмы возникновения хромосомного мозаицизма.

Всего в работе выявлено 110 анеуплоидий, во вДНК зарегистрировано 25 aberrаций (23%), в ВКМ — 47 (43%), а в ТЭ — 38 (34%). Во вДНК оказалось больше моносомий, чем трисомий (14:11), а в ВКМ и ТЭ, напротив, преобладали трисомии (27:20 и 21:17 соответственно). При этом вДНК и ВКМ характеризовались более высокой частотой совпадения по спектру хромосом, вовлеченных в анеуплоидию, по сравнению с вДНК и ТЭ (21% и 3% соответственно). Вероятно, менее жизнеспособные моносомные клетки ВКМ подвергаются апоптозу, и ДНК из них попадает в полость бластоцисты. В пользу этого свидетельствуют результаты Bolton с соавторами, продемонстрировавшие, что в мышечных мозаичных эмбрионах апоптозу подвергаются в основном анеуплоидные клетки в ВКМ, в то время как в ТЭ практически отсутствует апоптоз [6]. Кроме того, авторы показали, что мозаичные эмбрионы (до 50% анеуплоидных клеток) имеют практически такой же потенциал для нормального развития, как и полностью эуплоидные эмбрионы.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что использование вДНК из внутриволостной жидкости бластоцисты потенциально может повысить частоту регистрации анеуплоидий, представленных в ВКМ, недоступной для проведения преимплантационной генетической диагностики. Дальнейшее изучение молекулярного кариотипа вДНК и сопоставление полученных данных с результатами кариотипирования клеток ТЭ может прояснить представления не только о частоте хромосомного мозаицизма, но и о механизмах его возникновения.

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. 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. Медицинская генетика. 2009; 8(2): 19-24.
2. van Echten-Arends J., Mastenbroek S., Sikkema-Raddatz B. et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. Hum Reprod Update. 2011; 17(5): 620-627.
3. Liu J., Wang W., Sun X. et al. DNA Microarray Reveals That High Proportions of Human Blastocysts from Women of Advanced Maternal Age Are Aneuploid and Mosaic. Biology of Reproduction. 2012; 87(6): 148, 1-9
4. Rius M., Daina G., Obradors A. et al. Comprehensive embryo analysis of advanced maternal age-related aneuploidies and mosaicism by short comparative genomic hybridization. Fertil. Steril. 2011; 95(1): 413-416.
5. Palini S., Galluzzi L., De Stefani S. et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. Reprod. Biomed. Online. 2013;26(6): 603-610.
6. Bolton H., Graham S.L., Van der Aa N. et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. Nat Commun. 2016; 7: 11165.