

## Анализ экспрессии генов и цифровое кариотипирование бластоцист человека по результатам полнотранскриптомного секвенирования

Жигалина Д.И.<sup>1</sup>, Канбекова О.Р.<sup>2</sup>, Шитов В.А.<sup>1</sup>, Скрыбин Н.А.<sup>1</sup>

1 – ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Научно-исследовательский институт медицинской генетики 634050, г. Томск, Россия, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10

2 – ОГАУЗ Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко 634063, г. Томск, Россия, ул. И. Черных, 96/1

**Введение.** Изучение раннего эмбриогенеза человека сопряжено с анализом ограниченного количества биологического материала. Большинство методических подходов не дает возможности одновременно проанализировать несколько характеристик бластоцист на одном и том же материале. В данной работе представлены результаты пилотного исследования по секвенированию РНК клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЭ) бластоцист человека.

**Цель:** оценка возможности анализа экспрессии генов и реконструкции кариотипов бластоцист с использованием данных полнотранскриптомного секвенирования.

**Методы.** Материал – 16 бластоцист человека, которые были получены в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в ОГАУЗ «Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко». Бластоцисты были механически разделены на ВКМ (2 фрагмента) и ТЭ (3 фрагмента). Пробоподготовка библиотек для секвенирования РНК проводилась с помощью коммерческого набора QIAseq FX Single Cell RNA Library Kit (Qiagen, Germany). Секвенирование было произведено на приборе NextSeq 550 с использованием коммерческих наборов NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 sequencing kit и NextSeq 500/550 High Output Kit v2 kit (Illumina, США), а также на приборе NextSeq 2000 (Illumina, США) с использованием коммерческого набора NextSeq 2000 P3 reagents (300 cycles) (Illumina, США). Биоинформатическая обработка данных проводилась с использованием FastQC, multiQC, STAR, R, DESeq2, superFreq. Для реконструкции цифровых кариотипов исследуемых образцов в качестве референсных образцов с подтвержденным нормальным кариотипом были использованы эмбрионидные тельца (ЭТ), полученные из линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК).

**Результаты.** В бластоцистах 7 дня развития в сравнении с бластоцистами 5 дня (7vs5) была выделена группа генов, ответственных за рост бластоцист (*CTR9*, *GINS1* и *ZNF830*). При сравнении 7vs5 и при сравнении 6vs5 было выделено несколько групп генов, ответственных за локализацию белков и трансляцию. Всего выявлено 286 признаков хромосомной нестабильности (signatures of chromosomal instability, CIN). Амплификации, делеции, частичные амплификации и делеции аутосом встречались с частотой 48,3%, 34,3%, 11,2% и 6,3%, соответственно. Наиболее часто выявлялись нарушения числа копий 3, 5, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 19, 22 хромосом. Нами была обнаружена обратная статистически значимая корреляция между качеством ТЭ и числом CIN в ВКМ, а также тенденция к уменьшению CIN в ТЭ при изменении качества ТЭ от «С» к «А».

**Заключение.** Реконструкция кариотипов бластоцист на основе данных полнотранскриптомного анализа возможна и представляет интерес с точки зрения изучения взаимосвязи экспрессионных профилей клеток бластоцист и их хромосомной конституции.

**Ключевые слова:** анеуплоидия, преимплантационный генетический скрининг, ЭКО, цифровое кариотипирование, транскриптомный анализ.

**Для цитирования:** Жигалина Д.И., Канбекова О.Р., Шитов В.А., Скрыбин Н.А. Анализ экспрессии генов и цифровое кариотипирование бластоцист человека по результатам полнотранскриптомного секвенирования. *Медицинская генетика*. 2024; 23(10): 11-20.

**Автор для корреспонденции:** Жигалина Д.И.; e-mail: darya.zhigalina@medgenetics.ru

**Финансирование.** Исследование поддержано грантом РНФ №20-74-00064 (2020-2021 гг.) «Реконструкция мутационных процессов у эмбрионов человека на преимплантационном этапе развития на основе цифрового кариотипирования единичных клеток бластоцист».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 17.10.2024

## Gene expression analysis and e-karyotyping of human blastocysts using whole transcriptome sequencing

Zhigalina D.I.<sup>1</sup>, Kanbekova O.R.<sup>2</sup>, Shitov V.A.<sup>1</sup>, Skryabin N.A.<sup>1</sup>

1 – Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Genetics  
10, Naberejnaya Ushaiki, Tomsk, 634050, Russian Federation

2 – Regional Perinatal Center named after I.D. Yevtushenko  
96/1, I. Chernykh st., Tomsk, 634063, Russian Federation

**Introduction.** The study of early human embryogenesis involves the analysis of a limited amount of biological material. Most methodological approaches do not allow for the simultaneous analysis of several blastocyst characteristics on the same material. This paper presents the results of a pilot study on RNA sequencing of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells of human blastocysts.

**Aim:** evaluation of the feasibility of gene expression analysis and blastocyst karyotype reconstruction using whole transcriptome sequencing data.

**Methods.** Material – 16 human blastocysts, which were obtained as part of *in vitro* fertilization (IVF) cycles at the Regional Perinatal Center named after I.D. Yevtushenko. Blastocysts were mechanically divided into the ICM (2 fragments) and TE (3 fragments). Sample preparation of libraries for RNA sequencing was carried out using the commercial QIAseq FX Single Cell RNA Library Kit (Qiagen, Germany). Sequencing was performed using a NextSeq 550 instrument and commercial NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 sequencing kit and NextSeq 500/550 High Output Kit v2 kit (Illumina, USA), as well as a NextSeq 2000 instrument (Illumina, USA) and a commercial NextSeq 2000 P3 reagents (300 cycles) kit (Illumina, USA). Bioinformatics data processing was performed using FastQC, multiQC, STAR, RStudio. superFreq. Embryoid bodies (EBs) obtained from induced pluripotent stem cell (iPSC) lines were used as reference samples with confirmed normal karyotype to reconstruct molecular karyotypes of the studied samples.

**Results.** In blastocysts on day 7 of development, in comparison with blastocysts on day 5 (7vs5), a group of genes responsible for blastocyst growth (CTR9, GINS1 and ZNF830) was identified. When comparing 7vs5 and 6vs5, several groups of genes responsible for protein localization and translation were identified. A total of 286 signs of chromosomal instability (CIN) were identified. Amplifications, deletions, partial amplifications and deletions of autosomes occurred with a frequency of 48.3%, 34.3%, 11.2% and 6.3%, respectively. The most frequently detected copy number abnormalities were chromosomes 3, 5, 9, 10, 12, 15, 16, 17, 19, 22. We found an inverse statistically significant correlation between the quality of TE and the number of CIN in the ICM, as well as a tendency to decrease CIN in the trophectoderm with a change in the quality of TE from "C" to "A".

**Conclusions.** Reconstruction of blastocyst karyotypes based on whole-transcriptome analysis data is possible and is of interest from the point of view of studying the relationship between the expression profiles of blastocyst cells and their chromosomal constitution.

**Keywords:** aneuploidy, preimplantation genetic screening, IVF, e-karyotyping, transcriptome analysis.

**For citation:** Zhigalina D.I., Kanbekova O.R., Shitov V.A., Skryabin N.A. Gene expression analysis and e-karyotyping of human blastocysts using whole transcriptome sequencing. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]*. 2024; 23(10): 11-20. (In Russian)

**Corresponding author:** D.I. Zhigalina; **e-mail:** darya.zhigalina@medgenetics.ru

**Funding.** The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 20-74-00064 (2020-2021).

**Conflict of Interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 17.10.2024

### Введение

Раннее эмбриональное развитие у человека характеризуется низкой жизнеспособностью эмбрионов по сравнению с другими млекопитающими [1]. В литературе недостаточно информации о молекулярных механизмах, которые контролируют программу развития эмбрионов человека на преимплантационном этапе. Понимание этих механизмов крайне важно для оценки жизнеспособности и рисков для дальнейшего развития эмбрионов, получаемых в рамках циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Много вопросов остается в области, связанной с изучением процесса дифференцировки клеток во время бласто-

центеза, гастрюляции и органогенеза [2]. В то же время механизмы формирования хромосомных aberrаций на преимплантационном этапе развития эмбрионов также до конца не изучены. При этом более 50% blastocysts являются анеуплоидными, либо имеют хромосомный мозаицизм [3]. Для повышения имплантационного потенциала и снижения вероятности выкидышей были разработаны протоколы преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А). Однако диагностическая прогностическая ценность ПГТ-А при рассмотрении эмбрионального мозаицизма или сегментарного дисбаланса остается спорной.

В связи с ограниченным количеством биологического материала, который можно получить при исследовании эмбрионов человека из циклов ЭКО, одновременное изучение разных характеристик blastocyst часто затруднено. Развитие молекулярно-генетических и биоинформатических методов позволило разработать подходы к реконструкции кариотипов исследуемых образцов на основе данных полнотранскриптомного секвенирования. В данной работе представлены результаты пилотного исследования, включающего результаты секвенирования РНК клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) и трофэктодермы (ТЭ) blastocyst человека.

## Методы

Для выполнения работы была сформирована выборка, включающая 16 эмбрионов человека на стадии blastocyst. Все анализируемые эмбрионы были получены в рамках циклов ЭКО в ОГАУЗ «Областной перинатальный центр им. И.Д. Евтушенко». Криоконсервированные эмбрионы были переданы семейными парами для проведения научного исследования после подписания информированного согласия. Всего в исследовании участвовало 13 женщин, средний возраст которых составил  $34,7 \pm 2,3$  года. Качество blastocyst оценивалось в соответствии с классификацией Гарднера [4]. Две blastocyst были предварительно проанализированы с использованием aCGH в рамках процедуры ПГТ-А при прохождении пациентами циклов ЭКО.

С помощью лазерного микроманипулятора OSTA Laser Shot (MTG, Германия) blastocyst были механически разделены на ВКМ и ТЭ. Дизайн эксперимента предполагал дополнительное разделение тканей blastocyst на фрагменты. Образцы ВКМ были разделены на 2 части, а образцы ТЭ – на три части. Несмотря на то, что для данного исследования отбирались blastocyst хорошего качества – не ниже 3BB, в некоторых случаях такое разделение не представлялось возможным, т.к. сложно определить четкую границу между тканями. В связи с этим некоторые образцы были условно помечены, как «ВКМ/ТЭ». Полученные клетки помещались в микроцентрифужную пробирку, содержащую 3 мкл  $1 \times \text{PBS}$ , и хранились до начала пробоподготовки при температуре  $-80^\circ\text{C}$  для обеспечения сохранности РНК. Обратная транскрипция, полнотранскриптомная амплификация и подготовка библиотек для секвенирования РНК проводились с использованием коммерческого набора QIAseq FX Single

Cell RNA Library Kit (Qiagen, Germany) по протоколу «Amplification of Poly A+ mRNA». Концентрация кДНК измерялась с помощью флуориметра Qubit 3.0 (Invitrogen Corporation, США) и коммерческого набора Qubit DNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Качество отдельных библиотек, а также качество пула проверялось с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, США) и набора реактивов D1000 и High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США), а также системы 4150 TapeStation (Agilent Technologies, США) и коммерческого набора D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, США). При проведении пробоподготовки был взят протокол получения фрагментов ДНК размером 300 п.н. Секвенирование было произведено с помощью прибора NextSeq 550 (Illumina, США) и коммерческих наборов NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (75 Cycles) sequencing kit и NextSeq 500/550 High Output Kit v2 kit (150 cycles) (Illumina, США), а также с помощью прибора NextSeq 2000 (Illumina, США) и коммерческого набора NextSeq 2000 P3 reagents (300 cycles) (Illumina, США).

Контроль качества прочтений производился с использованием FastQC [5] и multiQC [6]. Прочтения выравнивались на транскриптом человека версии GRCh38 (hg38) при помощи STAR [7]. Количество копий РНК в образцах рассчитывалось программой featureCounts [8]. Митохондриальные гены удалялись перед анализом дифференциальной экспрессии генов. Для данных экспрессии выполнялась TPM-нормализация и удалялись гены с  $\text{TPM} < 1$  во всех образцах аналогично работе Groff с соавт. [9]. Анализ дифференциальной экспрессии генов производился при помощи DESeq2 [10] и инструмента apeglm [11]. Для иерархической кластеризации и применения метода главных компонент использовалось преобразование, стабилизирующее дисперсию (variance stabilizing transformation). Обработка данных производилась в среде разработки RStudio при помощи языка программирования R версии 4.0.5 (R Core Team, 2021). Кариотипы образцов были получены при помощи инструмента superFreq [12] на основе интеграции данных об однонуклеотидных полиморфизмах и анализа копийности генов по данным экспрессии РНК. В части образцов с низким качеством прочтений установить хромосомный состав не удалось. На разных этапах пробоподготовки некоторые образцы исключались из анализа по причине низкой концентрации после полнотранскриптомной амплификации, низкого качества полученных библиотек, небольшого числа прочтений по итогам секвенирования.

Для реконструкции цифровых кариотипов исследуемых образцов в качестве референсных образцов с подтвержденным нормальным кариотипом были использованы эмбрионидные тельца (ЭТ), полученные из линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а именно ICGi020-A, ICGi030-A, ICGi022-A [13-15]. Линия ICGi022-A была получена от здорового индивида без выявленных генетических нарушений, а линии ICGi020-A и ICGi030-A были получены от пациентов с болезнью Вильсона-Коновалова. Наличие нормального кариотипа линий ИПСК подтверждалось перед началом формирования ЭТ. Для получения ЭТ колонии ИПСК снимались с подложки 0,15% коллагеназой IV типа (Thermo Fisher Scientific, США) и перемещались в стерильные чашки Петри диаметром 35 мм, покрытые слоем 1% агарозы. Клетки культивировались в течение 18 дней в среде без фактора роста bFGF: базовая среда DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 20% заменителя сыворотки KnockOut (Thermo Fisher Scientific, США), 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США), 1% раствора антибиотика Pen-Strep (Gibco, США), 0,1 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США). Для полнотранскриптомного анализа единичное ЭТ помещалось в 7 мкл 1×PBS, и хранилось до начала пробоподготовки при температуре –80°C для обеспечения сохранности РНК. Пробоподготовка, полнотранскриптомный и биоинформатический анализ для ЭТ проводились аналогично протоколу, описанному выше для образцов бластоцист.

## Результаты и обсуждение

### Зависимость экспрессии от дня развития бластоцист

По результатам анализа методом главных компонент было показано, что в отличие от образцов, полученных из бластоцист 6 и 7 дней, экспрессия в образцах бластоцист 5 дня развития в значительной степени гетерогенна. Вероятно, это связано с активным ростом и формированием бластоцисты, а также дифференцировкой клеток на ВКМ и ТЭ. Нами было проведено сравнение экспрессии в образцах бластоцист 5, 6 и 7 дней развития путём анализа обогащения на основе 100 генов с наибольшей дифференциальной экспрессией (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit). При анализе обогащения по биологическим функциям гипохиперэкспрессирующихся генов в бластоцистах 7 дня развития

в сравнении с бластоцистами 5 дня (7vs5) была обнаружена группа генов, ответственных за рост бластоцист. Данная группа включала в себя три гена: *CTR9*, *GINS1* и *ZNF830*. Вероятно, экспрессия этой группы генов наиболее важна в процессе формирования и роста эмбриона на стадии бластоциты. Однако к 7 дню развития экспрессия данной группы генов снижается.

Ген *CTR9* (*CTR9* Homolog, Paf1/RNA Polymerase II Complex Component) кодирует белок, который участвует в росте бластоцисты, а также в дифференцировке клеток ВКМ (GeneCards database). В работе Zhang с соавт. было показано, что *CTR9*, присутствующий на этапе морулы и бластоцисты, необходим для нормального преимплантационного развития [16]. Эмбрионы с дефицитом *CTR9* не формируют ворсины трофобласта.

Ген *GINS1* (*GINS* Complex Subunit 1) участвует в раскручивании ДНК, репликации ДНК и элонгации (GeneCards database). Ген *GINS1* был отнесен к генам, принадлежащим к онтологиям, специфически связанным с развитием эмбриона (*GINS1*, *TAF8*, *ESRRB*, *NCAPG2*, *SP1*, *XAB2*, *CDC2L1*, *MSX1* и *AQP3*). Таким образом, экспрессия гена *GINS1* крайне важна на раннем этапе преимплантационного развития, так как эффективная и точная репликация ДНК особенно необходима в стволовых клетках и клетках-предшественниках для успешной пролиферации и выживания.

Предполагается, что ген *ZNF830* (*zinc finger protein 830*) индуцирует активность связывания нуклеиновых кислот и ионов цинка, участвует в нескольких процессах, включая репликацию ДНК, передачу сигналов контрольной точки целостности митотической ДНК, задействован в преантральном росте фолликулов яичников. Вероятно, участвует в нескольких процессах, включая рост бластоцисты, организацию хромосом, поддержание структуры кишечного эпителия (NCBI).

При аналогичном сравнении бластоцист 6 и 5 дней развития по результатам анализа обогащения по биологическим функциям гипохиперэкспрессирующихся генов *bvs5*, не было выявлено дифференциальной экспрессии группы генов, ответственных за развитие бластоцист. При анализе обогащения по биологическим функциям гиперэкспрессирующихся генов как при сравнении 7vs5, так и при сравнении *bvs5*, выделено несколько групп генов, ответственных за локализацию белков и трансляцию. Анализ этих групп генов показал, что с большей части генов экспрессируются рибосомальные белки, что, по всей видимости, связано с активацией трансляции. В их числе белки, связывающиеся с мембраной, с эндоплазматическим ретикуломом, а также с инициацией трансляции и самой трансляции.

ей. Усиление экспрессии рибосомальных белков может быть связано с возможной ролью рибосом в дифференцировке клеток [17].

#### Полнотранскриптомный анализ ЭТ из линий ИПСК

При сравнении экспрессионных профилей образцов ТЭ и ЭТ линии ICGi022-A для 100 наиболее дифференциально экспрессирующихся генов был проведен анализ обогащения с помощью электронного ресурса WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit. FDR  $\leq 0,05$  был обнаружен для групп генов, отвечающих за оогенез млекопитающих, рост антральных фолликулов яичников, развитие женских половых желез, развитие первичных женских половых признаков. Обогащение данных групп обусловлено дифференциальной экспрессией трех генов: *PTX3*, *GPR149*, *CCDC182*. Ген *PTX3* участвует во множестве процессов, в том числе в дифференцировке фибробластов, в регуляции воспаления и активации системы комплемента. Кроме того, ген связан с созреванием ооцитов и качеством эмбрионов. В экспериментах на мышинных эмбрионах была показана экспрессия исключительно в клетках ТЭ и критическая роль продукта данного гена в имплантации [18]. Для генов *GPR149* и *CCDC182* на настоящий момент показано участие в развитии яйцеклеток. Значительная дифференциальная экспрессия в клетках ТЭ по сравнению с ЭТ может указывать на участие в развитии трофобласта и в процессах имплантации эмбриона.

При анализе обогащения 100 наиболее дифференциально экспрессирующихся генов между ВКМ и ЭТ значимо различающихся групп генов выявлено не было. С одной стороны, ранее было показано, что ИПСК или эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) наиболее близки по уровню экспрессии к эмбрионам на стадии бластоцисты [19]. С другой стороны, в отличие от ВКМ, ЭТ содержат в себе клетки на разных этапах дифференцировки. Таким образом, полученные результаты могут быть связаны с особенностями секвенирования пула клеток, а не единичных клеток бластоцист.

#### Цифровое карiotипирование бластоцист

На первом этапе цифрового карiotипирования была проанализирована ploидность образцов. Значительная часть исследуемых образцов имела ploидность, близкую к двум (рис. 1А). Шесть образцов были исключены из анализа на данном этапе, т.к. значение ploидности у них было близко к нулю (рис. 1Б). У одного образца показатель ploидности был равен 1, из чего был сделан вывод о том, что данный образец,

вероятно, гаплоидный (рис. 1В). Образцы, ploидность которых была близка к 4, относили к «вероятно полиploидным» (рис. 1Г). Значения ploидности от 2 до 4, по всей видимости, могут свидетельствовать о наличии мозаичной полиploидии в пределах образца, однако в настоящий момент вопрос относительно интерпретации такого рода результатов остается открытым.

На следующем этапе проводилась биоинформатическая реконструкция карiotипов образцов. В качестве референсных образцов с подтвержденным нормальным карiotипом были использованы ЭТ, полученные из линий ИПСК. На рис. 2 представлены результаты цифрового карiotипирования ЭТ линии ИПСК ICGi030-A мужского пола [15]. Данный образец ЭТ был взят в качестве контрольного с карiotипом 46, XY при цифровой реконструкции карiotипов образцов, содержащих единичные клетки бластоцист. Сверху вниз графики: нормализованное отношение экспрессии с участка хромосомы к экспрессии с того же участка хромосомы в контроле; средняя частота однонуклеотидных полиморфизмов по хромосоме; график «клональности». По результатам интерпретации полученных графиков нами были сделаны выводы о наличии/отсутствии признаков хромосомной нестабильности в исследуемых образцах (signatures of chromosomal instability, CIN). На графике «клональности» отклонения от 1 по ауто索мам нет. Таким образом, по результатам секвенирования РНК данный образец мужского пола имеет нормальный молекулярный карiotип, что свидетельствует об адекватности полученных нами результатов биоинформатического анализа.

Поскольку цифровое карiotипирование позволяет лишь опосредованно сделать выводы относительно числа копий участков, либо целых хромосом в образцах, в настоящем исследовании термины «трисомия»/«тетрасомия», «нуллисомия»/«моносомия», «частичная трисомия», «частичная моносомия» были заменены на термины «амплификация», «делеция», «частичная амплификация» и «частичная делеция», соответственно. На рис. 3 представлены примеры графиков, полученных для образца бластоцисты, на основании которого было сделано следующее заключение: seq[GRCh38] dup(2,3,4,7q) del(22).

#### Спектр хромосомных аномалий в образцах ВКМ и ТЭ

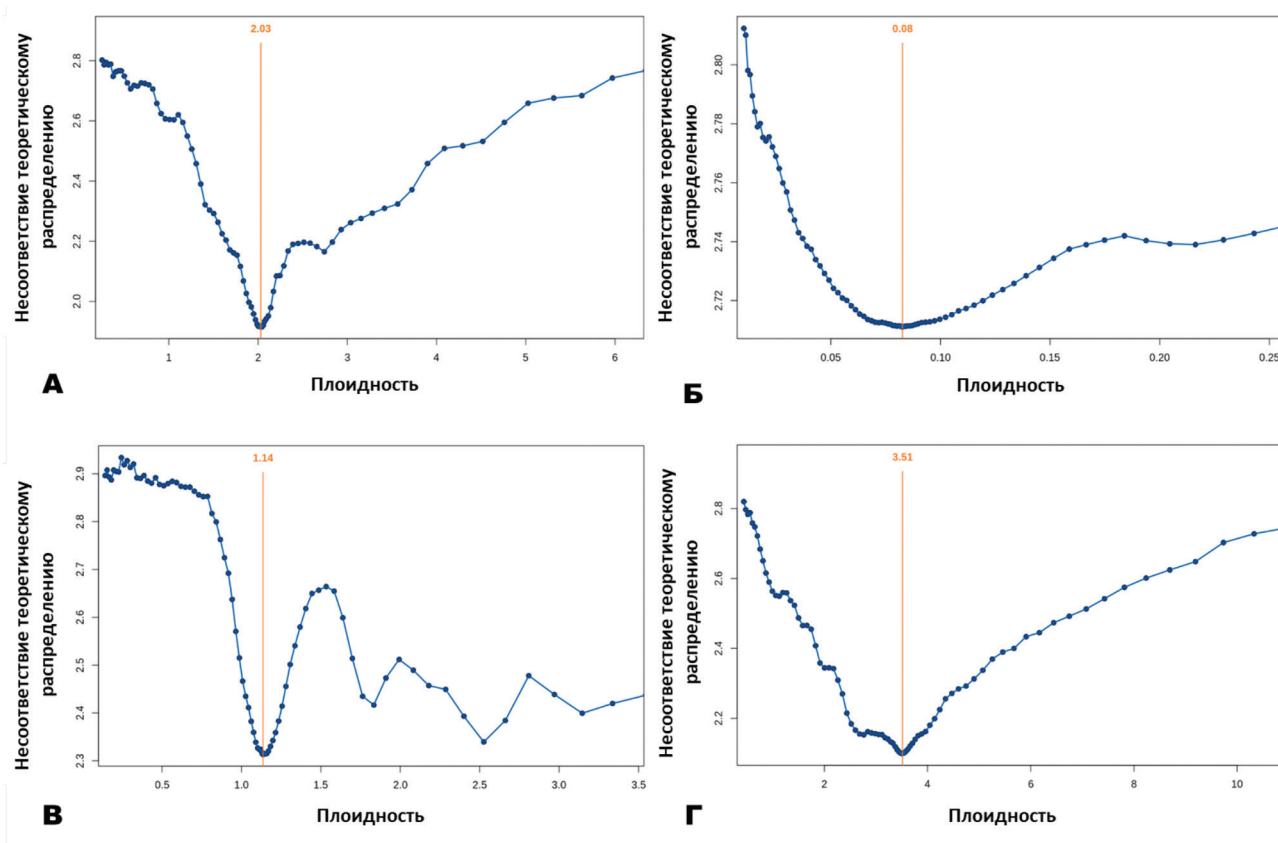
Всего при анализе бластоцист было выявлено 286 CIN. Амплификации, делеции, частичные амплификации и делеции аутосом встречались с частотой 48,3% (138/286), 34,3% (98/286), 11,2% (32/286) и 6,3% (18/286), соответственно (табл. 1). Числовые аномалии

половых хромосом не были проанализированы в данном исследовании в связи с ограничениями алгоритмов биоинформатической обработки данных. В целом в бластоцистах наиболее часто выявлялись нарушения числа копий хромосом 3 (11,0 %), 5 (10,5 %), 9 (10,4 %), 10 (10,0 %), 12 (10,2 %), 15 (11,2 %), 16 (15,1 %), 17 (10,2 %), 19 (12,9 %), 22 (13,5 %) (рис. 4). В работе Franasiak с соавт. наиболее часто встречающимися были числовые aberrации хромосом 13, 15, 16, 18, 19, 21 и 22 [20]. Таким образом, полученные результаты для бластоцист согласуются с представленными в литературе данными.

У 11 бластоцист, в которых отсутствовали образцы «ВКМ/ТЭ», уровень соответствия цифровых кариотипов ВКМ и ТЭ в пересчете на одну хромосому составил 29% (40/144). Полностью идентичных цифровых кариотипов выявлено не было. Можно выделить ряд

факторов, ставших причиной снижения уровня конкордантности цифровых кариотипов между тканями бластоцист. В настоящем исследовании было проведено дополнительно разделение тканей на образцы, в результате чего могли быть выявлены CIN, которые не были бы обнаружены при анализе всех клеток одной ткани в связи с методическими ограничениями. Кроме того, авторы не исключают наличия ложноположительных CIN.

С помощью критерия Краскела-Уоллиса был проведен ранговый тест ANOVA для оценки связи между качеством ТЭ и числом CIN в бластоцистах. При анализе учитывались показатели качества развития тканей, описанные в классификации Гарднера, которые варьируют по шкале от «А» до «С» [4]. Нами была обнаружена обратная статистически значимая корреляция между качеством ТЭ и числом CIN в ВКМ (Kruskal-Wallis test:



**Рис. 1.** Графическое представление результатов анализа ploidy образцов бластоцист: А – диплоидный образец; Б – образец, исключенный из дальнейшего анализа; В – гаплоидный образец; Г – полиплоидный образец.

**Fig. 1.** Graphical representation of ploidy analysis of blastocyst samples: А – diploid sample; Б – sample excluded from further analysis; В – haploid sample; Г – polyloid sample.



$H(2, N = 16) = 6,642764; p = 0,0361$  (рис. 5). Кроме того, была показана тенденция к уменьшению CIN в ТЭ при возрастании ее качества от «С» к «А» (Kruskal-Wallis test:  $H(2, N = 16) = 4,038868; p = 0,1327$ ) (рис. 6). Таким образом, лучше развивается ТЭ бластоцист с меньшим числом CIN как в ВКМ, так и непосредственно в ТЭ.

#### Определение происхождения анеуплоидий

Сравнительный анализ цифровых кариотипов нескольких образцов от каждой бластоцисты позволил обнаружить феномен реципрокных анеуплоидий (РА), т.е. такие числовые хромосомные нарушения, возникновение которых является взаимозависимым событием и происходит в результате одной митотической ошибки сегрегации хромосом. Оценка частоты РА отражает интенсивность постзиготических *de novo* ошибок сегрегации хромосом, лежащих, в том числе, в основе возникновения хромосомного мозаицизма, в результате чего появляется возможность дифференцировать митотические постзиготические числовые хромосомные aberrации от анеуплоидий, образовавшихся в ходе мейоза II.

В 37,5% (6/16) бластоцист нами были обнаружены реципрокные полнохромосомные CIN (reciprocal signatures of chromosomal instability, RCIN), всего было выявлено 9 RCIN по хромосомам 2, 5, 10, 12, 15, 17, 19 и 21. В формирование 9 пар RCIN было вовлечено 19 CIN (6,6%, 19/286). Таким образом, по предварительным оценкам как минимум 6,6% нарушений числа хромосом сформировались в результате нарушения митоза. Тем не менее, с учетом предыдущих работ, описывающих результаты анализа внутриполостной жидкости бластоцисты, в настоящем исследовании полученная частота RCIN может быть занижена в связи с отсутствием образцов, содержащих внеклеточную ДНК.

В свою очередь нами были определены CIN целых хромосом, которые, наиболее вероятно, являются мейотическими. К хромосомным aberrациям предположительно мейотического происхождения относились CIN, которые выявлялись одновременно в двух тканях бластоцисты. Из анализа были исключены образцы «ВКМ/ТЭ», т.к. в них могут быть представле-

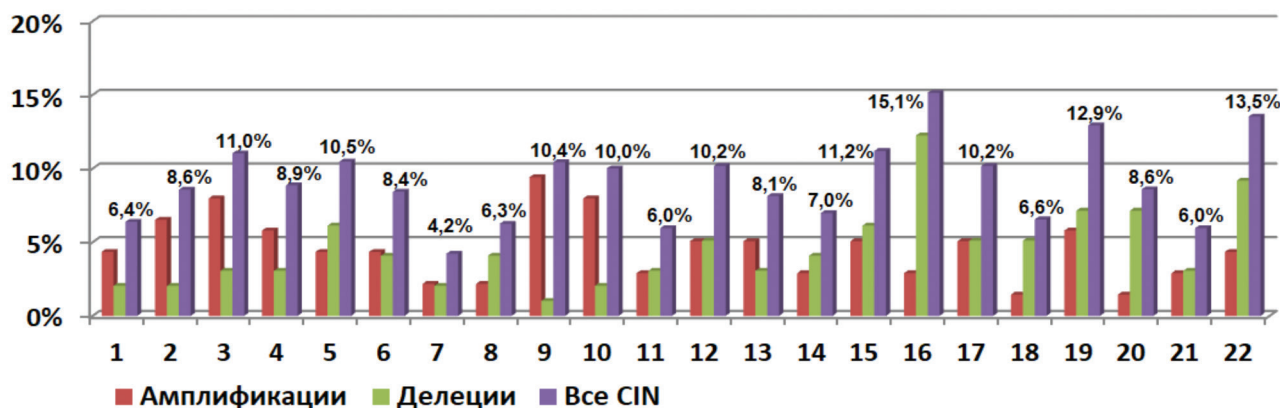


Рис. 4. Частота полнохромосомных CIN в бластоцистах

Fig. 4. Frequency of whole-chromosomal CIN in blastocysts

Таблица 1. Число CIN в образцах бластоцист

Table 1. Number of CIN in blastocyst samples

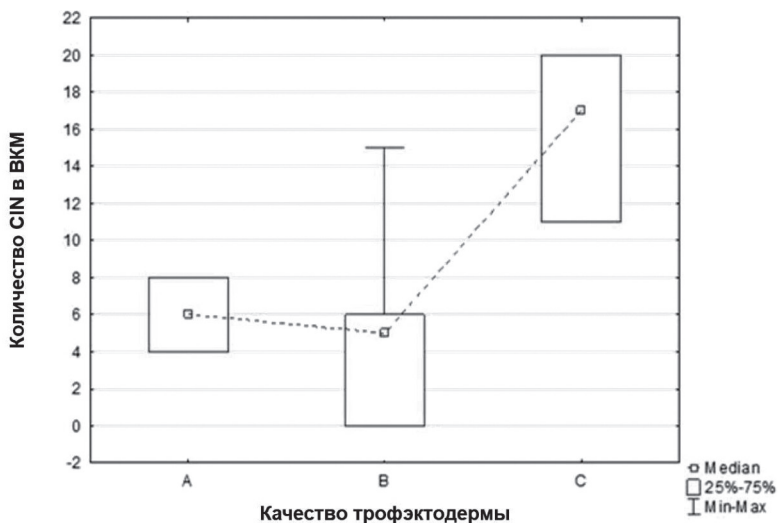
Тип CIN	ТЭ	ТЭ/ВКМ	ВКМ	Всего
Амплификации	65 (45,5%)	21 (39,6%)	52 (57,8%)	138 (48,3%)
Делеции	55 (38,5%)	21 (39,6%)	22 (24,4%)	98 (34,3%)
Частичные амплификации	18 (12,6%)	4 (7,5%)	10 (11,1%)	32 (11,2%)
Частичные делеции	5 (3,5%)	7 (13,2%)	6 (6,7%)	18 (6,3%)
Всего	143 (100%)	53 (100%)	90 (100%)	286 (100%)

ны клетки двух тканей. Всего нами была выявлена 31 CIN, вероятно, мейотического происхождения. С учетом того, что в разных образцах встречалась одна и та же хромосомная аномалия, частота мейотических CIN составила 31,5 % (90/286).

**Заключение**

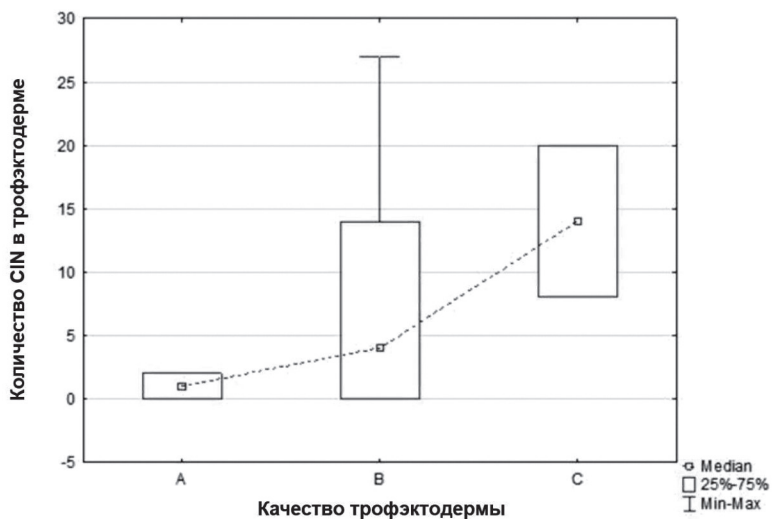
Реконструкция кариотипов бластоцист на основе данных полнотранскриптомного анализа возможна и представляет интерес с точки зрения изучения взаимосвязи экспрессионных профилей клеток бластоцист и их хромосомной конституции. Однако несмотря на то, что результаты настоящего исследования адекват-

но сопоставляются с литературными данными и с результатами наших предыдущих работ, стоит учитывать некоторые методические ограничения и особенности применяемого подхода. Во-первых, механическое разделение тканей бластоцисты не позволяет исключить вероятность контаминации образцов одной ткани клетками другой ткани. Во-вторых, размер выборки эмбрионов является ограничением, поскольку не обладает достаточной мощностью для оценки частоты хромосомных aberrаций. В-третьих, наличие нескольких клеток в одном образце создает дополнительный «шум» при статистической и биоинформатической обработке результатов. Так, например, при анализе регионов потери гетерозиготности (LOH) необходимо учитывать,



**Рис. 5.** Связь между числом CIN во ВКМ и группами бластоцист по качеству ТЭ

**Fig. 5.** Relationship between the number of CIN in the ICM and blastocyst groups by TE quality



**Рис. 6.** Связь между числом CIN в ТЭ и группами бластоцист по качеству ТЭ

**Fig. 6.** Relationship between the number of CIN in TE and blastocyst groups by TE quality

что наличие в пределах одного образца хотя бы одной гетерозиготной клетки при использовании строгих статистических критериев приведет к ложноотрицательному результату и не позволит детектировать делецию. Перед проведением крупномасштабных исследований следует провести валидацию протоколов биоинформатической обработки с целью исключения ложноположительных результатов при интерпретации полученных результатов.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность д.б.н., профессору РАН, заведующему лабораторией эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН С.М. Закияну, а также к.б.н. А.А. Малаховой и к.б.н. Е.В. Григорьевой за предоставленную для данного исследования линию ИПСК.

### Литература/References

- Shaw L., Sneddon S.F., Zeef L., et al. Global gene expression profiling of individual human oocytes and embryos demonstrates heterogeneity in early development. *Plos One*. 2013;8(5):e64192.
- Rossant J., Tam P.P. Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. *Dev Cell*. 2022;57(2):152-165.
- Alfarawati S., Fragouli E., Colls P., et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril*. 2011;95(2):520-524.
- Schoolcraft W.B., Gardner D.K., Lane M., et al. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*. 1999;72(4):604-609.
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. [Electronic resource] Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Accessed: 20.10.2024.
- Ewels P., Magnusson M., Lundin S., et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047-3048.
- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.
- Liao Y., Smyth G.K., Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-930.
- Groff A.F., Resetkova N., DiDomenico F., et al. RNA-seq as a tool for evaluating human embryo competence. *Genome Res*. 2019;29(10):1705-1718.
- Love M., Anders S., Huber W. Differential analysis of count data—the DESeq2 package. *Genome Biol*. 2014;15(550):10-1186.
- Zhu A. Statistical methods for sequencing count data and integrative functional genomics. 2019. [Electronic resource] Available at: <https://doi.org/10.17615/y2et-dh46>. Accessed: 20.10.2024.
- Flensburg C., Sargeant T., Oshlack A., et al. SuperFreq: Integrated mutation detection and clonal tracking in cancer. *PLoS Comput Biol*. 2020;16(2):e1007603.
- Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V., et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res*. 2020a;48:101952.
- Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Vasilyeva O.Y., et al. Generation of two induced pluripotent stem cell lines from peripheral blood mononuclear cells of a patient with Wilson's disease. *Stem Cell Res*. 2020b;47:101922.
- Zhigalina D.I., Malakhova A.A., Vasilyeva O.Y., et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line ICGi030-A from a Wilson's disease patient carrying a frameshift mutation p. Lys1013fs and missense mutation p. H1069Q in the ATP7B gene. *Stem Cell Res*. 2021;57:102556.
- Zhang K., Haversat J.M., Mager J. CTR9/PAF1c regulates molecular lineage identity, histone H3K36 trimethylation and genomic imprinting during preimplantation development. *Dev Biol*. 2013;383(1):15-27.
- Genuth N.R., Shi Z., Kunimoto K., et al. A stem cell roadmap of ribosome heterogeneity reveals a function for RPL10A in mesoderm production. *Nat Commun*. 2022;13(1):5491.
- Tranguch S., Chakrabarty A., Guo Y., et al. Maternal pentraxin 3 deficiency compromises implantation in mice. *Biol Reprod*. 2007;77(3):425-432.
- Huang K., Maruyama T., Fan G. The naive state of human pluripotent stem cells: a synthesis of stem cell and preimplantation embryo transcriptome analyses. *Cell Stem Cell*. 2014;15(4):410-415.
- Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H., et al. Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in trophectoderm biopsies: changes with patient age and chromosome structure. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31:1501-1509.