

Сравнительная цитогенетика эмбриобласта, трофэктодермы и внутриполостной жидкости бластоцисты человека

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

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050; *darya.zhigalina@medgenetics.ru

² Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050

³ ОГАУЗ «Томский областной перинатальный центр», Томск, 634040

⁴ ООО «Красноярский центр репродуктивной медицины», Красноярск, 660037

Сравнение молекулярных кариотипов внеклеточной ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты, клеток эмбриобласта и трофэктодермы открывает новые перспективы для изучения цитогенетических механизмов формирования числовых хромосомных нарушений в преимплантационном периоде развития человека. Кроме того, такой анализ позволяет оценить диагностическую ценность внеклеточной ДНК как дополнительного источника информации об эмбриональном кариотипе при преимплантационной генетической диагностике. Цель исследования — сравнительное молекулярно-цитогенетическое кариотипирование эмбриобласта, трофэктодермы и внеклеточной ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты. Методами метафазной и микроматричной сравнительной геномной гибридизации проанализировано 29 бластоцист человека 5 дня развития. Внеклеточная ДНК была успешно амплифицирована в 86,2% (25/29) образцов. По результатам анализа трофэктодермы, эмбриобласта и внеклеточной ДНК, бластоцисты были зуплоидными в 31%, 36% и 28% случаев соответственно. Лишь 3 бластоцисты из 29 (10,3%) имели нормальный кариотип по данным анализа всех трех образцов. Всего было выявлено 175 анеуплоидий, при этом трисомии, моносомии, частичные три- и моносомии встречались с частотой 47,4%, 46,9%, 5,1% и 0,5% соответственно. Отмечено преобладание трисомий в эмбриобласте, недоступном для преимплантационного генетического скрининга. Хромосомный мозаицизм выявлен в 14 обследованных бластоцистах (48,2%), а в 44,8% бластоцист описаны реципрокные анеуплоидии, представленные сочетанием трисомии и моносомии по одной паре гомологичных хромосом. Всего зафиксировано 25 реципрокных анеуплоидий, в формировании которых было вовлечено 50 из 175 анеуплоидий (28,5%). Таким образом, внеклеточная ДНК может быть успешно амплифицирована и проанализирована современными молекулярно-цитогенетическими методами. Результаты сравнительного молекулярного кариотипирования внеклеточной ДНК, клеток эмбриобласта и трофэктодермы в целом свидетельствуют о недооценке частоты анеуплоидных и мозаичных бластоцист. Установлено, что в 72,4% случаев молекулярные кариотипы эмбриобласта и трофэктодермы не являются идентичными, что говорит о невозможности прямой экстраполяции результатов преимплантационного генетического скрининга биопсированных клеток трофэктодермы на внутреннюю клеточную массу. Соответственно, внеклеточная ДНК в полости бластоцист человека может рассматриваться как важный дополнительный источник информации о кариотипе эмбриона при проведении преимплантационной генетической диагностики.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, внутриполостная жидкость бластоцисты, эмбриобласт, трофэктодерма, хромосомный мозаицизм, реципрокные анеуплоидии.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 15-04-08265.

Comparative cytogenetics of embryoblast, trophoctoderm and blastocoele fluid of human blastocyst

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

¹ National Research Tomsk State University, Tomsk, 634050; * darya.zhigalina@medgenetics.ru

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050

³ Tomsk Regional Perinatal Center, Tomsk, 634040

⁴ Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine, Krasnoyarsk, 660037

Relevance. A comparison of the molecular karyotypes of the cell-free DNA from the blastocoele fluid of the blastocyst, the embryoblast and trophoctoderm cells provides new possibilities for studying of the cytogenetic mechanisms of the formation of numerical chromosomal abnormalities at the preimplantation stage of human development. In addition, such analysis allows us to evaluate the diagnostic yield of cell-free DNA as an additional source of information about the embryo karyotype for preimplantation genetic diagnosis. **Aim.** Comparative molecular cytogenetic karyotyping of embryoblast, trophoctoderm and the cell-free DNA from the blastocoele fluid of the blastocyst. **Materials and methods.** Twenty-nine human blastocysts of the 5th day of development were analyzed by metaphase and array comparative genomic hybridization. **Results.** Cell-free DNA was successfully amplified in 86.2%

(25/29) of the samples. Blastocysts were euploid in 31%, 36% and 28% of cases according to the results of analysis of trophectoderm, embryoblast and cell-free DNA, respectively. Only 3 out of 29 (10.3%) blastocysts had a normal karyotype according to the analysis of all three samples. A total of 175 aneuploidies were detected. Trisomies, monosomies, partial tri- and monosomies were observed at a frequency of 47.4%, 46.9%, 5.1%, and 0.5%, respectively. The prevalence of trisomy was noticed in the embryoblast, which is not available for preimplantation genetic screening. Chromosomal mosaicism was detected in 14 examined blastocysts (48.2%). The reciprocal aneuploidies presented by combination of trisomy and monosomy with one pair of homologous chromosomes were described in 44.8% of blastocysts. A total of 25 reciprocal aneuploidies were observed with involvement of 50 from 175 (28.5%) detected aneuploidies. **Conclusions.** The cell-free DNA can be successfully amplified and analyzed by current molecular cytogenetic techniques. The results of comparative molecular karyotyping of cell-free DNA, embryoblast and trophectoderm cells indicate an underestimation of the frequency of aneuploid and mosaic blastocysts. It was found that in 72.4% of cases the molecular karyotypes of the embryoblast and trophectoderm are not identical. This finding provides evidence for impossibility of a direct extrapolation of the results of preimplantation genetic screening of trophectoderm cells to the inner cell mass. Accordingly, the cell-free DNA from the blastocoele fluid can be considered as an important additional source of information about the embryo karyotype in preimplantation genetic diagnosis.

Keywords: cell-free DNA, blastocoele fluid, embryoblast, trophectoderm, chromosomal mosaicism, reciprocal aneuploidy.

The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, grant № 15-04-08265.

Введение

В последние два десятилетия в связи с активным развитием экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и методов преимплантационной генетической диагностики и скрининга (ПГД/ПГС) появилась уникальная возможность изучить процессы развития человека на самых ранних этапах [1]. Были получены новые генетические данные, которые позволили существенно повысить эффективность ПГД/ПГС. В настоящий момент известно, что молекулярно-цитогенетический анализ I и II полярных тел, позволяет оценить хромосомный статус ооцита [2]. С использованием данного подхода было показано, что около 95% хромосомных aberrаций, обнаруживаемых у эмбрионов на преимплантационном этапе развития, имеют материнское происхождение. В рамках ПГС анализ полярных тел дает возможность успешно отсеивать ооциты с анеуплоидиями [3]. Кроме того, использование микроматричного анализа I и II полярных тел позволило продемонстрировать механизм нормализации кариотипа ооцита в ходе мейотических делений [4]. Ограничением такого анализа является невозможность получить информацию о кариотипе клеток эмбриона и оценить наличие хромосомного мозаицизма.

До недавнего времени примерно 90% всех зарегистрированных циклов ПГД в мире составляла биопсия одного/двух бластомеров на стадии дробления [5]. Однако использование ряда молекулярно-цитогенетических методов показало, что кариотипы бластомеров одного эмбриона часто не идентичны. В связи с этим был поставлен вопрос о распространении на ранних этапах развития хромосомного мозаицизма [6]. Стало очевидно, что ошибки митоза в ходе дробления эмбриона вносят существенный вклад в формирование числовых хромосомных нарушений, а микросателлитный анализ позволил реконструировать хромосомный статус бластомеров на каждом митотическом делении и продемонстрировать механизмы формирования мозаичных кариотипов [7].

В настоящее время в центрах репродуктивной медицины набирает популярность биопсия клеток трофэкто-

дермы (ТЭ) на стадии бластоцисты, которая позволяет снизить вероятность получения ложноположительного результата вследствие хромосомного мозаицизма [8]. В свою очередь, анализ эмбриобласта (ЭБ) и ТЭ позволил бы оценить распределение между тканями анеуплоидных клеток. В некоторых исследованиях указывается на то, что результаты, полученные на основании биопсии клеток ТЭ можно, как правило, экстраполировать на клетки ЭБ [9, 10], хотя до сих пор однозначно не установлена связь мозаицизма в ЭБ и ТЭ [11]. Использование мышинных эмбрионов в качестве модельного объекта позволило выявить различия в частоте элиминации аномальных клеток из ЭБ и ТЭ. Более того, путём создания химер было продемонстрировано рождение жизнеспособных особей из мозаичных эмбрионов [12]. Аналогичные результаты были получены и для человека после переноса эмбрионов с мозаичным кариотипом [13]. Вопрос относительно коррекции эмбрионального кариотипа также широко обсуждается в настоящее время [14].

В 2013 году было продемонстрировано присутствие внеклеточной ДНК (внДНК) во внутрисполостной жидкости бластоцисты [15], после чего несколькими исследовательскими группами были инициированы работы, в которых проводилось сравнение молекулярных кариотипов внДНК с полярными телами, бластомерами, клетками ТЭ, либо с целой бластоцистой [4, 16]. Однако полученные результаты оказались противоречивыми. В связи с этим возможность использования внутрисполостной жидкости в качестве материала для проведения ПГС до сих пор остается дискуссионной. Достоверно неизвестно, является ли молекулярный кариотип внДНК из полости бластоцисты интегральным кариотипом погибших клеток, либо отражает в большей степени кариотипы клеток только одной из тканей — ТЭ или ЭБ [17]. Поскольку ранее не было получено таких данных, целью настоящей работы стало проведение сравнительного молекулярно-цитогенетического кариотипирования ЭБ, ТЭ и ДНК из внутрисполостной жидкости бластоцисты.

Материалы и методы

В настоящей работе проанализировано 29 бластоцист человека пятого дня развития, которые были получены после подписания информированного согласия от пациентов Томского областного перинатального центра и Красноярского центра репродуктивной медицины. Бластоцисты культивировались на средах G-1 PLUS, G-2 PLUS (Vitrolife). Из каждой бластоцисты проводилась аспирация внутриполостной жидкости по методике, описанной в литературе [4]. Забранная жидкость переносилась в стерильную микропробирку, содержащую 2,5 мкл раствора PBS (Qiagen, США), и замораживалась при 20С. Затем проводилось разделение ЭБ и ТЭ. В 15 бластоцистах оно осуществлялось с использованием лазерной микрохирургической системы OCTAX Laser Shot (MTG, Германия), в остальных 14 эмбрионов — микроманипулятором Narishige (Япония). После разделения клетки помещались в стерильные пробирки с раствором PBS и замораживались. Были проведены лизис клеток всех образцов и полногеномная амплификация. ДНК из клеток ЭБ, ТЭ и из полости 15 бластоцист была амплифицирована набором Rubicon PicoPlex (Rubicon Genomics, США), 14 бластоцист — набором REPLI-g MiniKit (#150023, Qiagen, США). В качестве контрольного образца использовали ДНК индивида мужского пола с нормальным кариотипом (#5190-4240, Agilent Technologies, США) для проведения сравнительной геномной гибридизации (Comparative Genomic Hybridization, CGH).

14 бластоцист были проанализированы методом CGH на метафазных пластинках. ДНК после полногеномной амплификации в ходе реакции ник-трансляции метили флуоресцентными красителями (Fluorescein, TAMRA). Препараты метафазных хромосом получали из лимфоцитов периферической крови индивида мужского пола с нормальным кариотипом. Гибридизация ДНК-библиотек на метафазные пластинки проводилась в гибридизационной камере «ThermoBrite» (Abbott Molecular, США) в течение 72 часов при 37°С с 50х избытком C₀t-1 ДНК (#5190-3393, Agilent Technologies, США). Препараты метафазных хромосом окрашивали DAPI. Детекция гибридизационных сигналов проводилась на люминесцентном микроскопе «AxioImager.Z2» (Carl Zeiss, Германия). Для анализа результатов CGH использовали программный продукт «Isis-CGH Software» (Metasystems, Германия).

Анализ внДНК, ЭБ и ТЭ 15 эмбрионов был проведен методом aCGH (arrayCGH). Для этой цели были использованы микрочипы SurePrint G3 Human CGH Microarrays (8x60K, Agilent Technologies, США). Амплифицированная ДНК была помечена флуоресцентными красителями Cy3 и Cy5. Гибридизация проводилась в течение 14 часов при 67°С, после чего чипы были отмывы от гибридизационной смеси и отсканированы на приборе SureScan Microarray Scanner (Agilent Technologies, США). Графический анализ результатов проводился с использованием программного обеспечения Agilent CytoGenomics Software (v3).

Результаты

В настоящем исследовании было проведено сопоставление молекулярных кариотипов внДНК из полости бластоцисты, клеток ЭБ и ТЭ 29 бластоцист (табл. 1). ДНК из внутриполостной жидкости была успешно амплифицирована в 86,2% (25/29) образцов. Случаи отсутствия или недостаточного для анализа количества ДНК после полногеномной амплификации были описаны ранее в других работах [4, 15, 16]. В этих исследованиях внДНК была успешно амплифицирована в 89,7% (26/29), 76,5% (39/51) и 63% (60/96) случаев соответственно. Таким образом, эффективность полногеномной амплификации внДНК из полости бластоцист человека в целом сопоставима с опубликованными данными.

По результатам анализа ТЭ в 31% (9/29) случаев бластоцисты оказались эуплоидными. Молекулярное кариотипирование ЭБ и внДНК не выявило анеуплоидий у 36% (10/28) и 28% (7/25) бластоцист соответственно. В 7 бластоцистах в ЭБ и ТЭ отсутствовали хромосомные aberrации и лишь 3 бластоцисты из 29 (10,3%) имели нормальный кариотип по результатам сравнительного анализа всех трех образцов. Полное совпадение кариотипов было зафиксировано только для эуплоидных бластоцист. При наличии во внутриполостной жидкости и тканях бластоцисты хромосомных aberrаций нами было отмечено лишь частичное совпадение кариотипов, либо их полное несоответствие. Таким образом, за исключением эуплоидных образцов и образцов, для которых не было получено продукта ПГА, при сравнении кариотипов внДНК и ЭБ частичное совпадение было выявлено в 3 случаях (3/21), для пары «внДНК — ТЭ» — в 6 случаях (6/22), а для пары «ЭБ — ТЭ» — в 8 случаях (8/22). Наибольшее совпадение хромосом, вовлеченных в анеуплоидию, было выявлено при сравнении молекулярных кариотипов ЭБ и ТЭ (21 совпадение). Сравнение кариотипов в парах «внДНК — ЭБ» и «внДНК — ТЭ» продемонстрировало совпадение по 19 и 16 хромосомам соответственно.

Всего было выявлено 175 анеуплоидий. Трисомии, моносомии, частичные три- и моносомии встречались с частотой 47,4%, 46,9%, 5,1% и 0,5% соответственно. Во внДНК зарегистрировано 67 (34,2%) анеуплоидий, в ЭБ — 68 (34,7%) и в ТЭ — 61 (31,1%). Отмечено преобладание трисомий в ЭБ (40:28), в то время как во внутриполостной жидкости и ТЭ соотношение трисомий и моносомий было близко к единице (32:35 и 31:30 соответственно). Хромосомный мозаицизм был выявлен в 14 бластоцистах (48,2%). Наличие одной и той же анеуплоидии в ЭБ и ТЭ может указывать на ее мейотическое происхождение. Всего в 6 бластоцистах было выявлено 9 таких случаев.

Нами было обнаружено присутствие у эмбрионов на стадии бластоцисты клеточных клонов с трисомией и с моносомией по одной и той же паре гомологичных хромосом — так называемых реципрокных анеуплоидий

(РА). Они были выявлены в 13 из 29 бластоцист (44,8%). Всего было зафиксировано 25 реципрокных числовых хромосомных аномалий. Таким образом, 50 анеуплоидий из 175 (28,5%) были вовлечены в формирование РА. Нами было проанализировано распределение РА между внутрисомной жидкостью и тканями бластоцист, и было выявлено 9 из 12 теоретически возможных комбинаций распределения РА (табл. 2). Сравнительный анализ только ЭБ и ТЭ позволил выявить 36% (9/25) РА. При сравнении вДНК и ЭБ данный показатель соста-

вил 60% (15/25), а при анализе вДНК и ТЭ — 32% (8/25). Таким образом, использование вДНК в качестве источника дополнительной информации о хромосомной конституции эмбриона позволило на 64% повысить вероятность выявления РА по сравнению с анализом только ЭБ и ТЭ. Нами также была оценена частота встречаемости хромосом, которые были вовлечены в формирование РА. Хромосомы 9, 16, 19 наиболее часто были представлены РА — в 12%, 24% и 32% случаев соответственно.

Таблица 1

Молекулярные кариотипы вДНК из внутрисомной жидкости, клеток ЭБ и ТЭ 29 бластоцист

№ бластоцисты	Возраст матери, лет	Стадия развития	Внутрисомная жидкость	Эмбриобласт	Трофобласт
1	30	BI3AA	ish cgh dim(16,19)	ish cgh enh(1,16,19,20,22),dim(4)	ish cgh dim(19,22)
2	30	BI3AA	ish cgh enh(4),dim(16,17,19,22)	ish cgh enh(16,19,22)	ish cgh enh(14,16),dim(X)
3	29	BI3BB	ish cgh dim(16,17,19)	ish cgh enh(16,17,19,22)	ish cgh dim(16,19)
4	31	BI3AA	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh enh(17,19,22),dim(13)	ish cgh enh(17),dim(12)
5	31	BI3BB	ish cgh enh(4,X),dim(7,16)	ish cgh (1-22)x2,(X,Y)x1	ish cgh (1-22)x2,(X,Y)x1
6	30	BI3BB	ish cgh (1-22)x2,(X,Y) x1	ish cgh enh(16),dim(22,X)	ish cgh enh(10,18),dim(11,19)
7	25	BI3BB	ish cgh (1-22)x2,(X,Y) x1	ish cgh enh(1,11,13),dim(4,5,Y)	ish cgh dim(Y)
8	27	BI3BB	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	31	BI3BB	ish cgh (1-22)x2,(X,Y)x1	ish cgh enh(16,17,19,21)	ish cgh enh(20,X),dim(15)
10	31	BI4AA	ish cgh dim(16)	ish cgh enh(16),dim(17,19,21)	ish cgh enh(3,11,16),dim(17,19,21)
11	33	BI3AB	ish cgh enh(19,20,21),dim(4,6)	ish cgh dim(19)	ish cgh (1-22)x2,(X)x1
12	37	BI4AA	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh dim(19,20,21)	ish cgh enh(1,4,19)
13	25	BI3BB	ish cgh enh(19,21)	ish cgh enh(4),dim(17,19,21)	ish cgh enh(16,18),dim(8)
14	25	BI3BB	ish cgh enh(19)	Отсутствие продукта ПГА	ish cgh enh(3,13),dim(19)
15	23	—	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2
16	23	—	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2
17	32	BI4BB	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2
18	—	BI3BB	arr(19)x3	arr(1-22,X)x2	arr(1-22,X)x2
19	33	BI3-4AB	arr(3,6,8,17)x3,(2,7,10)x1	arr(1-22)x2,(X,Y)x1	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
20	37	BI4-5AA	arr(2,3q,11,19)x3	arr(1-22,X)x2	arr(X)x1
21	37	BI4-5BB	arr(16,17,19,20)x3, (3,10,12,13,15,22)x1,(9)x0	arr(1-22,X)x2	arr(9)x3,(20)x1
22	33	BI4BB	arr(8,11,19,20,21)x3,(7)x1	arr(7)x1	arr(7)x1
23	32	—	arr(X)x2	arr(1-22)x2,(X,Y)x1	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
24	39	BI3BB	arr(19p)x3,(9)x1	arr(9)x3	arr(9)x3
25	39	BI3-4BB	arr(1)x3,(13)x1	arr(10q)x3,(13)x1	arr(13)x1
26	39	BI2	arr(2,5)x1,(4,16,X)x0	arr(10q,6)x3,(13,20,21)x1,(4)x0	arr(16)x4,(1,2,6)x3, (3,9,17,19,20)x1,(10)x0
27	31	BI3BB	arr(1-22)x2,(XY)x1	arr(5,15,16q,17q,20p)x3,(X)x0	arr(1-22)x2,(X,Y)x1
28	31	BI2AB	Отсутствие продукта ПГА	arr(9q,13,18,19)x3	arr(1p)x3,(9q)x1,(Xq)x0
29	34	3BI3BB	Отсутствие продукта ПГА	arr(1-22)x2,(X,Y)x1	arr(X)x2,(Y)x0

Примечание. ПГА — полногеномная амплификация.

Обсуждение

Молекулярно-цитогенетический анализ вДНК из внутриполостной жидкости, а также сравнение реконструированного молекулярного кариотипа с кариотипами

клеток ЭБ и ТЭ позволяют получить уникальную информацию о природе вДНК и возможности ее использования в ПГД. В настоящей работе было продемонстрировано, что вДНК может быть успешно амплифици-

Таблица 2

Варианты распределения клеток с реципрокными анеуплоидиями между внутриполостной жидкостью, ЭБ и ТЭ

Вариант распределения	Внутриполостная жидкость	Внутренняя клеточная масса	Трофэктодерма
1	Трисомия	Моносомия	Трисомия
	17	17	17
	19	19	19
2	Моносомия	Трисомия	Моносомия
	16	16	16
	19	19	19
3	Трисомия	Моносомия	Моносомия
4	Моносомия	Трисомия	Трисомия
	9	9	9
	16	16	16
5	Трисомия	Трисомия	Моносомия
6	Моносомия	Моносомия	Трисомия
7	Моносомия	Трисомия	N
	16	16	
	17	17	
	19	19	
8	Трисомия	Моносомия	N
	19	19	
	21	21	
9	Трисомия	N	Моносомия
	19		19
	20		20
10	Моносомия	N	Трисомия
	2		2
	9		9
	16		16
11	N	Трисомия	Моносомия
		9q	9q
		22	22
12	N	Моносомия	Трисомия
		19	19
		21	21

Примечание. N — сбалансированный хромосомный набор по результатам CGH/aCGH. В таблице обозначены хромосомы, вовлеченные в реципрокные анеуплоидии.

рована наборами для ПГА как на основе ПЦР, так и MDA (Multiple Displacement Amplification). Амплифицированная ДНК пригодна для дальнейшего анализа методами метафазной CGH и aCGH. Несмотря на то, что для исследования были взяты бластоцисты, по качеству пригодные для переноса в ходе циклов ЭКО, 76% эмбрионов оказались мозаичными или анеуплоидными. Анализ внутриполостной жидкости показал наличие дополнительных хромосомных аномалий относительно ЭБ и ТЭ, что позволяет предположить более высокий уровень мозаицизма у эмбрионов на 3–4-й день после оплодотворения. Более того, обнаружение дополнительных анеуплоидий во вндНК может указывать на наличие небольшого процента (менее 30%) аномальных клеток, не выявленных в ходе анализа тканей в связи с ограничениями методов CGH и aCGH. Сообщается, что частота хромосомного мозаицизма на стадии бластоцисты превышает 90%, что может приводить к ошибкам в ходе ПГС [11, 18]. Наличие анеуплоидий во внутриполостной жидкости бластоцисты, ТЭ которой оказалась эуплоидной по результатам диагностики, вероятно, свидетельствует о присутствии в эмбриональных тканях анеуплоидного клеточного клона. При этом сравнительно недавно было продемонстрировано, что эффективность детекции хромосомного мозаицизма возрастает с увеличением числа взятых для анализа клеток [19]. В таком случае, вндНК может быть использована в качестве дополнительного источника информации о кариотипе эмбриона.

Вероятно, в некоторых случаях перенос мозаичных бластоцист может приводить к рождению детей с нормальным кариотипом [13], в связи с чем возникает вопрос относительно коррекции кариотипа в ходе развития эмбриона [14]. Селективный отбор анеуплоидных клеток присутствует уже на преимплантационной стадии, что заметно на фоне уменьшения числа клеток с числовыми хромосомными aberrациями со стадии дробления до стадии бластоцисты [20]. Благодаря анализу вндНК можно привести два аргумента в пользу коррекции эмбрионального кариотипа. Во-первых, обнаружение анеуплоидий в жидкости бластоцисты и их отсутствие в ЭБ и ТЭ говорит об элиминации аномальных клеток из тканей, в результате чего ДНК из этих клеток попадает во внутриполостную жидкость. Во-вторых, проведенное в нашем исследовании разделение ЭБ и ТЭ позволило сравнить частоты трисомий и моносомий не только между клетками бластоцисты и ее жидкостью, но и между отдельными тканями. Преобладание трисомий в ЭБ (40:28) может косвенно свидетельствовать о том, что клетки ЭБ подвергаются апоптозу чаще, чем клетки ТЭ. При этом во внутриполостной жидкости соотношение трисомий и моносомий было близко к единице. Возможно, такой механизм позволяет исключать из ЭБ моносомные клетки, тем самым способствуя нормальному развитию ткани, дающей в дальнейшем начало всем эмбриональным структурам. В пользу этой гипотезы сви-

детельствует и то, что наиболее часто подвергаются апоптозу анеуплоидные клетки ЭБ по сравнению с клетками ТЭ. Было продемонстрировано, что аномальный клеточный клон в ЭБ элиминируется чаще (41,1%), чем нормальный (19,5%) [12]. В ряде исследований говорится об отсутствии признаков неслучайного и преимущественного распределения анеуплоидных клеток в ТЭ и указывается на то, что результаты, полученные на основании биопсии клеток ТЭ можно, как правило, экстраполировать на клетки ЭБ [9, 10]. Однако в настоящей работе было продемонстрировано лишь частичное совпадение молекулярных кариотипов ЭБ и ТЭ, причем в значительной степени «общие» анеуплоидии, вероятно, имеют мейотическое происхождение. Тем не менее, по спектру хромосом наибольшее совпадение было выявлено при сравнении молекулярных кариотипов ЭБ и ТЭ, что подтверждает эффективность используемой в настоящее время биопсии ТЭ в ПГС.

Сравнительное молекулярное кариотипирование вндНК из внутриполостной жидкости бластоцисты и клеток ЭБ и ТЭ показало отсутствие полного соответствия кариотипов. Эти результаты расходятся с данными других исследовательских групп. В одной из работ результаты сравнительного кариотипирования вндНК и клеток ТЭ показали полное, частичное совпадение, либо его отсутствие в 82%, 15,4% и 2,6% случаев соответственно [4]. В другом исследовании сравнение молекулярных кариотипов вндНК и ДНК из клеток не разделявшихся ЭБ и ТЭ показало полное соответствие лишь в 48% случаев [16]. В некоторой степени наблюдаемые различия можно объяснить тем, что в нашем исследовании впервые было применено разделение тканей, благодаря чему появилась возможность молекулярно-цитогенетически проанализировать 3 различных типа образцов от одной бластоцисты. В результате использования такого подхода при сравнении кариотипов нами были выявлены РА, которые представляют собой трисомии и моносомии по одной и той же паре гомологичных хромосом и являются результатом постзиготического хромосомного нерасхождения. В том случае, если в бластоцисте или биоптате ТЭ присутствуют два равно представленных клеточных клона с РА, они могут стать причиной снижения частоты выявления анеуплоидий методом CGH и возникновения диагностических ошибок. Таким образом, разделение тканей и молекулярное кариотипирование вндНК дало нам возможность на 64% увеличить вероятность обнаружения РА, позволив с высокой степенью вероятности определить анеуплоидии, сформировавшиеся в результате постзиготических митотических ошибок (50/175 мутаций, 29%). С точки зрения ПГС в ходе циклов ЭКО, обнаружение анеуплоидии во внутриполостной жидкости, либо ТЭ может указывать на наличие реципрокной аномалии в ЭБ. Таким образом, использование вндНК в ПГС как единственного и самостоятельного источника информации о кариотипе эмбриона вряд ли представляется возможным, пото-

му что это может привести к появлению ложноположительных результатов. Действительно, в настоящей работе были обнаружены бластоцисты, у которых анеуплоидии выявлялись только при анализе вДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты, тогда как ТЭ и ЭБ имели нормальный кариотип (№ 18, 23 в табл. 1). В таком случае часть эуплоидных эмбрионов может быть ошибочно исключена для переноса по результатам диагностики, основанной только на использовании вДНК.

Выводы

Анализ вДНК из внутрисполостной жидкости бластоцисты человека дает заметный вклад в понимание цитогенетических механизмов формирования постзиготических митотических анеуплоидий, являющихся одной из причин образования хромосомного мозаицизма на начальных этапах эмбрионального развития. ВДНК может быть успешно амплифицирована и проанализирована современными молекулярно-цитогенетическими методами. Результаты сравнительного анализа внеклеточной ДНК, клеток ЭБ и ТЭ в целом свидетельствуют о недооценке частоты анеуплоидных и мозаичных бластоцист. Кариотипы ЭБ и ТЭ часто оказываются не идентичными, что говорит о невозможности прямой экстраполяции результатов ПГС клеток ТЭ на ЭБ. Таким образом, вДНК в полости бластоцисты можно рассматривать как ценный дополнительный, но не самостоятельный источник информации о кариотипе эмбриона.

Список литературы

1. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344:768-770.
2. Montag M, Koster M, Strowitzki T, Toth B. Polar body biopsy. Review article. *Fertil Steril*. 2013;100(3): 603-607.
3. Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I et al. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(1): 2-8.
4. 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. e6.
5. Harper JC, Coonen E, De Rycke M et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: Cycles from January to December 2007

with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod. Hum. Reprod.* 2010;25(11):2685-2707.

6. Harton GL, Magli MC, Lundin K et al. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group-best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod*. 2011;26(1):41-46.

7. 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. DOI: 10.1186/1477-7827-12-105.

8. Mertzaniidou A, Spits C, Nguyen HT et al. Evolution of aneuploidy up to Day 4 of human preimplantation development. *Hum Reprod*. 2013;28(6):1716-1724.

9. Evsikov S, Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod*. 1998;13:3151-3155.

10. Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod*. 2010;16:944-949.

11. Esfandiari N, Bunnell ME, Casper RF. Human embryo mosaicism: did we drop the ball on chromosomal testing? *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(11):1439-1444.

12. Bolton H, Graham SJ, Van der Aa N. et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nature communications*. 2016;7:11165. DOI:10.1038/ncomms11165.

13. Lledo B, Morales R, Ortiz JA et al. Implantation potential of mosaic embryos. *Syst Biol Reprod Med*. 2017;63(3):206-208. DOI: 10.1080/19396368.2017.1296045.

14. Bazrgar M, Gourabi H, Valojerdi MR et al. Self-correction of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2013;22(17):2449-2456.

15. Palini S, Galluzzi L, DeStefani S et al. Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(6):603-610.

16. Tobler KJ, Zhao Y, Ross R et al. Blastocoele 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.

17. Mantikou E, Wong KM, Repping S, Mastenbroek S. Molecular origin of mitotic aneuploidies in preimplantation embryos. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822:1921-1930.

18. Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL et al. The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum Reprod Update*. 2014;20: 571-581

19. Gleicher N, Vidali A, Braverman J et al. Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14(1):54.

20. Van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B et al. Chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update*. 2011;17:620-627.