

ОБЗОРНЫЕ  
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 575.224.23:618.32

ПРЕИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА  
НА ОСНОВЕ БЛАСТОЦЕНТЕЗА: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2016 г. Д. И. Жигалина<sup>1</sup>, Н. А. Скрябин<sup>2,3</sup>, В. Г. Артюхова<sup>4</sup>, А. В. Светлаков<sup>4</sup>, И. Н. Лебедев<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
кафедра цитологии и генетики, Томск 634050

e-mail: darya.zhigalina@medgenetics.ru

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
лаборатория онтогенетики человека, Томск 634050

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томск 634050

e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

<sup>4</sup>Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск 660037

Поступила в редакцию 10.03.2015 г.

Обнаружение внеклеточной ДНК в полости ранней бластоцисты открывает новые перспективы в развитии преимплантационной генетической диагностики хромосомных и наследственных болезней человека. В настоящем обзоре проанализированы итоги первых исследований, позволивших оценить эффективность использования нового источника биологического материала, а также продемонстрировавших высокую степень совпадения результатов молекулярного кариотипирования с применением фракции внеклеточной ДНК и клеток самой бластоцисты. Полученные данные свидетельствуют о возможности разработки метода преимплантационной генетической диагностики на основе бластоцентаза, который может открыть новый виток прогресса в области вспомогательных репродуктивных технологий и в изучении генетики ранних этапов онтогенеза человека.

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

**DOI:** 10.7868/S001667581601015X

В 2013 г. во внутриполостной жидкости бластоцисты была обнаружена внеклеточная ДНК, при этом ее количество оказалось достаточным для осуществления полногеномной амплификации и ПЦР [1]. Данное открытие позволило предположить возможность использования такой фракции ДНК для проведения преимплантационной генетической диагностики. Стоит отметить, что подобный подход позволил бы решить сразу несколько проблем, с которыми регулярно сталкиваются специалисты при проведении циклов экстракорпорального оплодотворения. Так, например, встречаются случаи, когда ввиду неудовлетворительного качества бластоцисты использование клеток трофобластической оболочки для преимплантационной диагностики заболеваний становится невозможным, поскольку биопсия трофобластической оболочки возможна только для бластоцист очень хорошего качества [2]. Более того, забор клеток даже из бластоцист хорошего качества может быть сопряжен с риском повреждения эмбриона, в результате чего может быть нарушено его дальнейшее развитие и снижена способность к имплантации. Таким образом, использование ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты в кли-

нической практике представляется крайне заманчивым. Несмотря на это, остается целый ряд вопросов [3], без ответов на которые ее применение становится затруднительным:

действительно ли внеклеточная ДНК в полости бластоцисты отражает кариотип или генотип всех клеток эмбриона? И если это так, то в какой степени?

ДНК каких клеток, трофобластической оболочки или формирующейся внутренней клеточной массы, вносит определяющий вклад в состав внеклеточной ДНК и как это может отражаться на эффективности диагностики хромосомного мозаицизма, обусловленного тканеспецифичной компартиментализацией клеток с хромосомными мутациями;

являются ли источником внеклеточной ДНК аномальные клетки или клетки на стадии апоптоза? Подвергаются ли апоптозу преимущественно клетки с хромосомными нарушениями? В таком случае, можно ли будет судить по анализу внеклеточной ДНК о хромосомной конституции клеток, оставшихся в составе бластоцисты?

исключает ли процедура забора жидкости разрушение части клеток и контаминацию анализи-

руемого образца внеклеточной ДНК клеточным содержимым?

могут ли фрагменты ДНК поступать не только в жидкость внутри бластоцисты, но и в среду для культивирования? В таком случае культивирование эмбрионов в минимально допустимых объемах сред и анализ внеклеточной ДНК в этих средах явились бы вариантом неинвазивной диагностики.

Первые шаги к решению этих вопросов были предприняты недавно Gianaroli с коллегами. Целью их исследования стало выявление степени сходства кариотипов, установленных при анализе ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты, с хромосомными наборами, полученными при кариотипировании полярных телец, бластомеров, клеток трофэктодермы и целой бластоцисты [4]. Итоги работы продемонстрировали высокий уровень совпадения результатов молекулярно-цитогенетического анализа. Однако появился еще целый ряд вопросов. Выяснилось, что в некоторых случаях результаты анализов совпадают лишь частично, а иногда и полностью различаются. Подобные вопросы не могут оставаться без внимания и требуют дальнейшего пристального изучения специалистами в области цитогенетики и эмбриологии.

#### ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК ИЗ ПОЛОСТИ БЛАСТОЦИСТЫ КАК ИСТОЧНИК МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Образование бластоцисты связано с формированием эпителия трофэктодермы и начинается после возникновения ионных градиентов и осмотического накопления жидкости, поступающей через слой клеток [5]. Активное участие в этом процессе принимают мембранные ионные транспортеры и каналы, в частности Na/K-АТФазы [6]. Поступающая внутрь бластоцисты через аквапорины (AQP) жидкость накапливается и, таким образом, расширяет внутреннее пространство бластоцисты, способствуя образованию полости — бластоцеля [7]. Эти процессы происходят на 4–5-е сутки после оплодотворения. Далее истончается блестящая оболочка *Zona pellucida*, и бластоциста высвобождается из нее. В этот момент эмбрион готов к имплантации в матку.

В современной клинической практике экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) применяется криоконсервация эмбрионов. Перед этой процедурой для повышения выживаемости эмбрионов на стадии бластоцисты выполняется удаление внутриполостной жидкости или “коллапсирование” бластоцисты. Показано, что процедура “коллапсирования” перед криоконсервацией

оказывает положительное влияние на жизнеспособность бластоцист, что позволяет повысить шансы наступления беременности после прохождения цикла ЭКО [8, 9]. Данная процедура может быть выполнена различными методами, включая лазерный импульс, микропипетирование, укол микроиглой, отсасывание жидкости. Полученная жидкость объемом 0.3–0.5 нл не используется. Однако в работе Palini с коллегами было впервые указано на наличие в ней внеклеточной ДНК [1].

Как именно попадает ДНК во внутриполостную жидкость? Наиболее вероятным источником внеклеточной ДНК становятся клетки эмбриона, подвергшиеся апоптозу. Программируемая клеточная гибель присутствует уже на доимплантационной стадии развития [10], а также в начале имплантации [11] и при образовании плаценты [12]. Однако до сих пор остается не до конца понятным, по каким причинам и какие именно клетки уходят в апоптоз. Возможно, что при апоптозе происходит ликвидация функционально неполноценных клеток, и, таким образом, он оказывается задействованным в клеточной дифференцировке в ходе ранних этапов онтогенеза [13]. Вопрос о роли апоптоза в эмбриональном развитии до сих пор остается дискуссионным. Однако независимо от причин, по которым клетки подвергаются апоптозу, ДНК действительно присутствует во внутриполостной жидкости [1]. Используя открытие Palini с соавторами, современные исследователи могут сделать внеклеточную ДНК на преимплантационных этапах развития объектом своего пристального внимания и изучения.

Основными методами, используемыми Palini с коллегами для генетического анализа внеклеточной ДНК, стали полногеномная амплификация (Whole Genome Amplification, WGA), ПЦР и сравнительная геномная гибридизация на ДНК-микрочипах (Comparative Genomic Hybridization, array-CGH). В пяти образцах была проведена полногеномная амплификация, что позволило увеличить количество ДНК, содержащейся в жидкости. Для подтверждения успешности WGA была выполнена ПЦР двух районов генов *MAP1LC3B* и *TBC1D3*, расположенных на 16-й и 17-й хромосомах соответственно. Проводилась также амплификация гена *TSPY1*, находящегося на Y-хромосоме. WGA оказалась успешной для четырех образцов, два из которых в ходе ПЦР показали амплификацию гена *TSPY*. В одном случае ДНК обнаружена не была. Это могло быть связано с тем, что ДНК изначально отсутствовала в жидкости бластоцисты. Кроме того, не исключены и некоторые методические проблемы полногеномной амплификации, связанные со столь малым стартовым количеством ДНК. Так, например, стоит отметить, что количественные параметры WGA во всех образцах были сопоставимыми,

включая тот образец, в котором отсутствовала ДНК, а также негативный контроль. Авторы объясняют это артефактом полногеномной амплификации, который связан со случайным образованием димеров праймеров. Для двух образцов удалось провести молекулярно-цитогенетический анализ с помощью агау-СГН. Было показано, что оба образца являются анеуплоидными и имеют следующие кариотипы: 47,XY,+22 и 46,XY,-1,-10,+11,+16. Впрочем, следует отметить, что представленная запись кариотипов не отражает хромосомный набор клеток, ДНК из которых попала в жидкость бластоцисты. В частности, невозможно сказать, присутствовали ли анеуплоидии по четырем хромосомам во втором образце одновременно в каждой клетке или кариотип был установлен при анализе внеклеточной ДНК, происходящей из различных клеток с числовыми нарушениями по разным хромосомам.

Использование ПЦР в данной работе также было направлено и на оценку числа копий однокопийного гена *GAPDH*, и мультикопийного гена *TBC1D3*. Для 16 образцов была исследована внутриполостная жидкость бластоцисты путем амплификации *GAPDH*. Лишь в девяти образцах был обнаружен амплифицированный продукт. Было выявлено два типа продуктов с различной температурой плавления. Обнаружено, что подобные результаты являются следствием неспецифической амплификации псевдогена *GAPDH* (*GAPDHPI*), что связано с особенностями используемого праймера. Тем не менее полученные результаты свидетельствуют о том, что в 9 из 16 образцах (56%) внутриполостной жидкости бластоцисты присутствовала ДНК, которую удалось успешно амплифицировать. Помимо этого, ДНК внутриполостной жидкости 31 бластоцисты была протестирована с помощью амплификации последовательности гена *TBC1D3*. Два образца были исключены из анализа по методическим причинам. В итоге частота обнаружения внеклеточной ДНК составила 89.7% (26/29).

Авторы считают, что ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты можно использовать для определения пола плода в случае наличия в семьях заболеваний, сцепленных с X-хромосомой [1]. Был предложен ПЦР-тест, в котором проводилась амплификация гена *TSPY1*, расположенного на Y-хромосоме, а также контрольная амплификация гена *TBC1D3* на хромосоме 17. Эффективность амплификации с помощью ПЦР составила 98 и 95% для генов *TSPY1* и *TBC1D3* соответственно. Среди 26 образцов, которые показали наличие продукта гена *TBC1D3*, 17 образцов продемонстрировали также и амплификацию *TSPY1*. Интересно, что ампликон *TSPY1* был выявлен в 17 из 26 образцов, что демонстрирует некоторый избыток эмбрионов мужского пола. Дисбаланс по полу мог возникнуть по ряду при-

чин. Во-первых, для анализа было взято небольшое количество образцов, что могло привести к смещению выборки. Во-вторых, подобное соотношение полов может быть связано с тем, что эмбрионы мужского пола имеют более высокую скорость дробления, чем женские [14], и, таким образом, отбираются как наиболее качественные.

В среднем количество геномной ДНК, содержащейся в жидкости, составило 9.9 пг на пробу. Необходимо отметить, что концентрация ДНК менее 5 пг не позволяла провести анализ. Несмотря на то, что ПЦР была успешной для большего числа образцов (89.7%), результативность данного подхода в целом оказалась ниже, чем для анализа, проводимого на одном или нескольких бластомерах (98–99%) [15]. Стоит также подчеркнуть, что подтверждающего кариотипирования бластомеров, соответствующих образцам внутриполостной жидкости бластоцисты, в исследовании Palini с коллегами выполнено не было.

Таким образом, впервые было показано, что из внутриполостной жидкости бластоцисты с высокой степенью вероятности можно выделить ДНК, затем провести ее полногеномную амплификацию и проанализировать с помощью ПЦР и агау-СГН. Если удастся с помощью модификации используемых методов повысить частоту успешных полногеномных амплификаций, то внедрение такого подхода в клиническую практику представляется вполне возможным. Однако здесь возникает центральный вопрос, насколько эта ДНК отражает кариотипы клеток самого эмбриона? В настоящий момент в мировой литературе представлено крайне мало публикаций, которые касаются изучения ДНК, содержащейся во внутриполостной жидкости бластоцисты. Отчасти это связано со сравнительно недавним обнаружением ДНК в жидкости, а также с необходимостью использования достаточно сложных и дорогостоящих методов для ее изучения. Кроме того, для проведения исследований в данной области обязательным условием является сотрудничество с эмбриологами и, соответственно, клиниками репродуктивной медицины. В связи с этим на настоящий момент можно отметить пока только первое и единственное исследование, продемонстрировавшее крайне интересные результаты по данному вопросу.

В конце 2014 г. была опубликована статья Giannaroli с коллегами, в которой сообщалось о проведении пилотных исследований ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты [4]. Целью работы было сопоставление результатов анализа внеклеточной ДНК с данными кариотипирования клеток трофобласта, полярных телец либо целой бластоцисты. В исследование было включено 17 пар, проходивших преимплантационную генетическую диагностику с использованием

сравнительной геномной гибридизации на микрочипах. Данный метод позволяет в пределах одной реакции выявить все несбалансированные числовые и структурные хромосомные аномалии в отличие от FISH-анализа, в котором диагностика анеуплоидии проводится только лишь для некоторых хромосом. Использование сравнительной геномной гибридизации для анализа внеклеточной ДНК из внутрисполостной жидкости бластоцисты теоретически может решить проблему диагностики хромосомного мозаицизма, потому что результаты будут одновременно отражать кариотипы всех погибших клеток бластоцисты; следовательно, данный анализ может дать информацию обо всех либо о большей части присутствующих в бластоцисте аномалиях. Однако не стоит забывать и про недостатки агау-СГН. Сравнительная геномная гибридизация не может обнаружить сбалансированные хромосомные перестройки (транслокации, инверсии), полиплоидию, а также изменения в последовательности ДНК, не связанные с нарушениями копийности. В сравнении с FISH, которую в настоящий момент наиболее часто используют в клинических циклах ЭКО и ПГД, процесс проведения СГН достаточно трудоемок и может занимать до 72 ч в варианте с использованием метафазных хромосом в качестве матрицы для гибридизации. Такие сроки не позволяют произвести перенос эмбриона в матку женщины в пределах пяти суток, что затрудняет проведение цикла ЭКО. Данная проблема решается с помощью криоконсервации бластоцист. Однако в случае внедрения метода, основанного на анализе ДНК из полости бластоцисты, данный недостаток, напротив, станет преимуществом, так как извлечение внутрисполостной жидкости из бластоцисты чаще всего непосредственно связано с криоконсервацией. Кроме того, современные протоколы сравнительной геномной гибридизации с использованием ДНК-микрочипов позволяют провести всю процедуру анализа в течение 24 ч, включая полногеномную амплификацию. По всей видимости, для проведенной группой Gianaroli работы агау-СГН был наиболее подходящим методом, поскольку основной акцент в работе был сделан именно на числовые аномалии хромосом.

В исследовании от 17 пациенток была получена 71 бластоциста, что составило 69% от числа оплодотворенных яйцеклеток. Данный показатель практически не изменился и после биопсии полярного тельца и бластомера, что подтверждает результаты исследований, в которых говорится об отсутствии вреда биопсии для эмбрионов. Внутрисполостная жидкость была получена из 51 бластоцисты. Для 37 из них была предварительно проведена биопсия полярного тела, а для 14 — биопсия одного бластомера на стадии дробления 6–8-клеточной морулы. Жидкость из бластоци-

сты удалялась с помощью микропипетки, которая вводилась в бластоцисту в месте контакта между двумя клетками трофэктодермы для исключения попадания цитоплазмы. После проведения WGA ДНК была обнаружена в 39 образцах жидкости (76.5%). Средняя концентрация ДНК после полногеномной амплификации составила 900.38 нг/мл (диапазон 876.3–939.5 нг/мл).

С помощью агау-СГН было протестировано 30 образцов внутрисполостной жидкости, полученной из бластоцист с предварительной биопсией полярных тел, и 9 образцов из бластоцист, подвергшихся биопсии бластомера. Показано, что ДНК из полости бластоцисты отражает кариотип, прогнозируемый по анализу полярных тел в 93.3% случаев и анализу бластомера в 100% случаев. В среднем частота совпадения результатов кариотипирования составила 94.9%. Результаты анализа не совпали только в 2 случаях (5.1%). В одном случае были обнаружены множественные анеуплоидии (увеличение числа копий хромосом 5, 8, 11, 12, 15 и 19 и уменьшение копийности хромосом 3, 9 и 16) только при анализе ДНК из полости жидкости бластоцисты, в то время как первое и второе полярное тельце, а также клетки трофэктодермы имели нормальный кариотип. В другом случае по анализу первого и второго полярных тел была предсказана трисомия 6, но на основании анализа ДНК из полости жидкости и клеток трофэктодермы сама бластоциста оказалась эуплоидной.

При исследовании хромосомных нарушений в 30 образцах результаты анализа полярных тел и внутрисполостной жидкости полностью совпали в 21 случае (70%), частичное соответствие было выявлено в 7 образцах (23.3%) и, наконец, еще в 2 случаях результаты не совпали (6.7%). Один из них может представлять особый интерес для цитогенетики эмбрионального развития. Дело в том, что анализ первого полярного тельца показал увеличение копийности хромосом 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 19, 20, X и уменьшение числа копий хромосом 1, 2, 3, 8, 10, 13, 14, 16, 18, т.е. практически все хромосомы, за исключением 17-й, 21-й и 22-й, оказались вовлеченными в анеуплоидию. Удивительно, но при анализе второго полярного тельца были выявлены реципрокные анеуплоидии, а именно увеличение числа копий хромосом 1, 2, 3, 8, 10, 13, 14, 16, 18 и уменьшение числа копий хромосом 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 15, 19, 20, X. Вероятно, что в результате двух последовательных ошибок сегрегации хромосом в первом и втором делении мейоза в яйцеклетке произошла нормализация хромосомного набора, и кариотип, установленный при анализе ДНК из жидкости бластоцисты и клеток трофэктодермы, оказался эуплоидным. По мнению авторов, такие ошибки сегрегации хромосом могут быть объяснены преждевременной сегрегацией хроматид в пер-

вом делении мейоза. Однако цитологический механизм полной коррекции таких множественных анеуплоидий во втором мейозе пока остается неясным. Вместе с тем, такой пример наглядно демонстрирует необходимость кариотипирования обоих полярных тел для исключения выбраковки некоторой части эуплоидных эмбрионов. Впрочем, это положение также является дискуссионным, поскольку в более ранних исследованиях было показано, что только 18% бластоцист, сформировавшихся из оплодотворенных яйцеклеток, продемонстрировавших подобные последовательные нарушения сегрегации хромосом (по крайней мере, 13, 16, 18, 21 и 22) в первом и втором делении мейоза и “восстановивших” тем самым нормальный кариотип, способны сохранить нормальный хромосомный набор в ходе дробления [16]. Во всех остальных случаях продолжается возникновение новых хромосомных мутаций уже на постзиготических этапах дробления, отражая, возможно, разбалансировку механизмов контроля сегрегации хромосом.

При сравнительном анализе бластомера и внеклеточной ДНК из жидкости бластоцисты полное совпадение результатов было для девяти образцов (88.9%), а частичное только для одного (11.1%). В этом случае в бластомере были обнаружены трисомии 5, 10, 17, 21 и моносомии 1, 6, 14, 15 и 22, в то время как анализ внеклеточной ДНК показал наличие трисомий 8, 13 и 21 и моносомий 1, 5, 17, 18 и X. Таким образом, часть аномалий, выявленных при анализе бластомера, совпадали с таковыми, обнаруженными при молекулярном кариотипировании с использованием внеклеточной ДНК, тогда как числовые aberrации хромосом 6, 10, 13, 14, 15, 22 и X были выявлены только в одном из анализируемых образцов. Подобные примеры наглядно демонстрируют необходимость дальнейшего сравнительного изучения внеклеточной ДНК в полости бластоцисты и бластомеров, так как они указывают на вероятность получения ошибочных результатов при внедрении такого подхода в клиническую практику. Важно определить реально существующий процент соответствий и несоответствий, чувствительность и специфичность теста, анализируя выборки больших объемов.

Сравнение результатов кариотипирования с использованием внеклеточной ДНК и клеток трофобласта показало совпадение в 38 образцах из 39 (97.4%). Полное совпадение наблюдалось в 32 случаях (82%). Частичное несоответствие выявлено в 6 случаях (15.4%), тогда как абсолютное расхождение результатов было показано только в одном случае (2.6%). Полное несоответствие было обусловлено обнаружением при анализе внеклеточной ДНК трисомий по хромосомам 5, 8, 11, 12, 15, 19 и моносомий хромосом 3, 9, 16, в то время как клетки трофобласта оказались эупло-

идными. Подобные результаты можно объяснить тем, что клетки эмбриона, которые имели хромосомные аномалии, элиминировались путем апоптоза, и, таким образом, ДНК из них попала во внутриполостную жидкость. В таком случае встает вопрос, насколько часто встречаются бластоцисты, у которых результаты анализа будут аналогичны описанному случаю. Если процент таких бластоцист будет достаточно велик и превысит погрешность уже используемых в настоящее время в ПГД методов в отношении детекции хромосомного мозаицизма, то необходимость разработки метода преимплантационной генетической диагностики на основе бластоцентеза может оказаться под вопросом.

При пересчете на одну хромосому соответствие результатов кариотипирования с использованием внеклеточной ДНК и биопсией полярного тела составило 93.5%, с биопсией бластомера – 94% и с биопсией клеток трофобласта – 96.6%. Авторы работы полагают, что ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты может стать ценным материалом для клинического исследования и преимплантационной диагностики. Однако для этого необходимо, чтобы доля образцов с информативной ДНК, содержащейся в жидкости бластоцисты, повысилась до уровня информативности, наблюдаемого при биопсии бластомера.

Работа Gianaroli с соавторами крайне важна в свете разработки методов преимплантационной диагностики на основе бластоцентеза. В ней показан высокий процент совпадения результатов анализа ДНК внутриполостной жидкости бластоцисты и клеток самого эмбриона. Соответственно, дальнейшие исследования в данной области будут целесообразны и, возможно, приведут к созданию и внедрению в клиническую практику новой технологии диагностики. Проведенное исследование продемонстрировало большое преимущество использования внеклеточной ДНК, так как появилась реальная возможность зарегистрировать все хромосомные аномалии, присутствующие в эмбрионе. На фоне высокой частоты мозаичных кариотипов у эмбрионов это дает определенные надежды на решение проблемы диагностики хромосомного мозаицизма.

Помимо уже описанных исследований появились и новые работы, целью которых было изучение свойств внутриполостной жидкости бластоцисты, чтобы доказать в дальнейшем возможность ее применения на практике. Например, не так давно была продемонстрирована возможность использования ДНК из жидкости бластоцисты для проведения преимплантационной генетической диагностики у лошадей. Neggera с соавторами сообщили об успешном применении фракции внеклеточной ДНК для определения пола у 11 из 13 (84.6%) эмбрионов лошади. Также

была отмечена высокая выживаемость эмбрионов после забора жидкости. Авторы полагают, что данный подход не нарушает жизнеспособность эмбриона [17]. Однако два случая, в которых пол был определен неверно, заставляют задуматься о проведении дальнейших исследований с целью выявления частоты и причин ошибочных результатов.

### ПРОБЛЕМА ХРОМОСОМНОГО МОЗАИЦИЗМА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Мозаицизм на ранних стадиях эмбрионального развития представляет собой явление, при котором часть клеток эмбриона может быть эуплоидной, а другая часть может нести различные хромосомные аномалии. Исследования показывают, что от 15 до 50% моноспермальных эмбрионов на стадии дробления мозаичны [18]. Частота blastocист с хромосомным мозаицизмом варьирует, по оценкам разных авторов, от 17.6 до 95% [19–22]. Частота мозаицизма у эмбрионов в реальности может быть и выше, но используемые методы преимплантационной генетической диагностики далеко не всегда позволяют оценить наличие мозаичного кариотипа. Это главным образом связано с тем, что в большинстве случаев анализ проводится на минимальном объеме материала, например одном blastомере.

Существует вероятность, что отбор против мозаичных эмбрионов начинается еще на преимплантационной стадии. Эта ранняя гибель эмбрионов может способствовать большому количеству потерь на этапе имплантации на 2–3-е сут после переноса эмбрионов в матку женщины [18]. Los с коллегами изучили динамику частоты мозаичных кариотипов у эмбрионов и предложили модель, согласно которой частота мозаицизма на стадии 8 клеток составила 59.8% и постепенно снижалась в процессе развития эмбриона [23]. Авторы полагают, что снижение частоты встречаемости мозаичных эмбрионов после стадии морулы поддерживает реализацию концепции летальности и жизнеспособности клеток под контролем клеточного цикла. Таким образом, начиная со стадии морулы частота мозаицизма у эмбрионов постепенно уменьшается.

Стоит отметить, что небольшое количество анеуплоидных клеток на ранних стадиях эмбрионального развития не может быть фатальным для последовательных делений дробления. Если хромосомные нарушения совместимы с имплантацией, то эмбрион будет иметь возможность для дальнейшего развития, особенно на фоне присутствия клеток с нормальным кариотипом, что приведет к формированию тканеспецифичного хромосомного мозаицизма [24, 25]. Кроме того, было

отмечено, что значительная часть аномалий, обнаруживаемых в мозаичной форме на ранних стадиях развития, представляет собой полиплоидию, что вполне может быть частью нормальной дифференцировки трофобласта [18].

Возвращаясь к итогам работы Gianaroli с соавт. [4], продемонстрировавших высокий процент совпадения результатов кариотипирования с использованием внеклеточной ДНК и отдельных blastомеров (88.9%) или клеток трофэктодермы (97.4%), принципиально важно отметить, что сдвиг времени проведения преимплантационной диагностики на более поздние сроки, по всей видимости, благоприятно сказывается на снижении частоты ложно-отрицательных результатов вследствие естественной элиминации мозаичных эмбрионов. В этом отношении перспективы забора жидкости из полости blastоцисты перед криоконсервацией на более поздних этапах преимплантационного развития выглядят привлекательными для повышения достоверности преимплантационной генетической диагностики и уменьшения вероятности диагностических ошибок из-за присутствия хромосомного мозаицизма.

Таким образом, несмотря на то, что в настоящее время активно ведутся исследования цитогенетических механизмов формирования хромосомного мозаицизма на начальных этапах развития эмбриона, все еще остается много вопросов. Для преимплантационной генетической диагностики крайне важно найти способ выявления мозаичных эмбрионов и получать информацию о кариотипах всех анеуплоидных клеток. В наибольшей степени проблемы диагностики связаны с методами получения биологического материала для цитогенетического анализа, которые в большинстве своем не позволяют достоверно оценить наличие хромосомного мозаицизма у эмбриона.

### СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

К уже используемым в настоящее время методам получения материала относят биопсию полярных тел, биопсию blastомера на стадии дробления, а также биопсию клеток трофэктодермы на стадии blastоцисты. У каждого из подходов есть очевидные преимущества, однако есть и ряд существенных недостатков, особенно в свете диагностики хромосомного мозаицизма.

Использование полярных тел является наименее инвазивным и достаточно эффективным методом в случае необходимости выбрать яйцеклетки, не несущие анеуплоидии материнского происхождения. При этом важно отметить, что подавляющее большинство (более 90%) анеупло-

идий человека имеют материнское происхождение [26]. Несмотря на это, такой анализ не дает информации о кариотипе клеток бластоцисты и исключает возможность оценки мозаицизма у эмбриона.

Биопсия бластомера на третьи сутки развития производится примерно в 94% случаев преимплантационной генетической диагностики [27]. Стоит сказать, что анализ одного бластомера также не достаточно информативен в связи с возможным мозаицизмом у эмбриона [28]. Существует еще ряд методических проблем, к которым можно отнести отсутствие или потерю ядра при фиксации бластомеров, уменьшение в результате микроманипуляций количества клеток для дальнейшего формирования бластоцисты и др. Однако показано, что биопсия одного бластомера не влияет на жизнеспособность и вероятность имплантации эмбриона [29].

Биопсия трофэктодермы на пятые сутки развития эмбриона является более приемлемым способом получения материала для диагностики, так как появляется возможность использования большего количества клеток. Это снижает вероятность получения ложно-отрицательного результата в связи с наличием хромосомного мозаицизма. McArthur с коллегами показали высокую жизнеспособность бластоцист после биопсии трофэктодермы, при этом вероятность наступления беременности составила более 40% [30]. Однако биопсия более 25% бластомеров может быть опасна и способна снизить вероятность имплантации и жизнеспособность эмбриона [31]. Несмотря на то, что большинство исследований указывает на незначительное снижение вероятности имплантации после различных типов биопсии, данные подходы все же являются инвазивными. При их использовании сохраняется вероятность повреждения эмбриона.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идея использования ДНК из внутрисполостной жидкости бластоцисты в качестве материала для проведения преимплантационной генетической диагностики является оригинальной и весьма перспективной. Первые проведенные исследования с ее использованием позволяют сделать некоторые обобщения.

Во-первых, подтверждено наличие такой фракции внеклеточной ДНК. Она обнаруживается в 76,5–90% бластоцист, при этом содержание ДНК на образец колеблется от 8,7 до 9,9 пг. Анализ ДНК становится невозможным, если ее концентрация оказывается ниже 5 пг на один образец.

Во-вторых, показано, что в среднем в 97,4% случаев по внеклеточной ДНК можно верно определить хромосомный набор эмбриона на

преимплантационных этапах онтогенеза, при этом точность диагностики возрастает с ходом развития.

В-третьих, высокая частота совпадения результатов кариотипирования, полученных с использованием внеклеточной ДНК и клеток самого эмбриона, поддерживает идею применения нового источника биологического материала для решения проблемы диагностики хромосомного мозаицизма.

Как можно было заметить, частота обнаружения ДНК во внутрисполостной жидкости бластоцисты достаточно велика, как и в целом высокая степень соответствия кариотипов, устанавливаемых при исследовании внеклеточной ДНК и клеток эмбрионального происхождения. Тем не менее очевидно, что еще требуется методическая доработка процесса выделения и полногеномной амплификации ДНК, чтобы увеличить количество бластоцист, для которых возможно будет провести такого рода анализ. Актуальным представляется и сравнительный анализ кариотипа клеток трофэктодермы, внутренней клеточной массы и состава внеклеточной ДНК в полости бластоцисты для более детального понимания происхождения этой фракции ДНК и для повышения эффективности диагностики хромосомного мозаицизма.

Существует в этой области и ряд других неопределенных моментов. Так, остается открытым вопрос о том, какова вероятность повреждения эмбриона во время забора внутрисполостной жидкости. Позволяет ли проникновение микропипетки для забора жидкости между соседними клетками трофэктодермы полностью исключить вероятность попадания ДНК из клеток самого эмбриона в анализируемый образец? Интересно было бы узнать, какие именно клетки подвергаются апоптозу. Может ли сложиться ситуация, когда во внутрисполостную жидкость бластоцисты попадает ДНК только из клеток с определенным кариотипом (нормальным или аномальным) или специфической локализацией в бластоцисте (в трофэктодерме или во внутренней клеточной массе)?

Проведенные первые исследования внеклеточной ДНК из внутрисполостной жидкости бластоцисты могут стать отправной точкой отсчета начала новой эпохи в преимплантационной генетической диагностике. Однако не стоит забывать, что разработка новых подходов для внедрения в клиническую практику это крайне ответственный процесс, который требует долгой и кропотливой работы разных исследовательских групп по всему миру.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 15-04-08265 и в рамках Программы “На-

учный 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. V. 26. № 6. P. 603–610.
2. *Johnson D.S., Cinnioglu C., Ross R. et al.* Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass // *Mol. Hum. Reprod*. 2010. V. 16. № 12. P. 944–949.
3. *Cohen J., Grudzinskas G., Johnson M.H.* Embryonic DNA sampling without biopsy: the beginnings of non-invasive PGD? // *Reprod. Biomed. Online*. 2013. V. 26. № 6. P. 520–521.
4. *Gianaroli L., Magli M.C., Pomante A. et al.* Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing. Results from a pilot study // *Fertil. Steril*. 2014. V. 102. № 6. P. 1692–1699. e6.
5. *Watson A.J., Barcroft L.C.* Regulation of blastocyst formation // *Front Biosci*. 2001. V. 6. D708–D730.
6. *Barcroft L.C., Moseley A.E., Lingrel J.B., Watson A.J.* Deletion of the Na/K-ATPase  $\alpha 1$ -subunit gene (*Atp1a1*) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo // *Mech. Dev*. 2004. V. 121. № 5. P. 417–426.
7. *Barcroft L.C., Offenberger H., Thomsen P., Watson A.J.* Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation // *Dev. Biol*. 2003. V. 256. № 2. P. 342–354.
8. *Chang E.M., Han J.E., Kim Y.S. et al.* Use of the natural cycle and vitrification thawed blastocyst transfer results in better *in vitro* fertilization outcomes: cycle regimens of vitrification thawed blastocyst transfer // *J. Assist. Reprod. Genet*. 2011. V. 28. № 4. P. 369–374.
9. *Zhu D., Zhang J., Cao S. et al.* Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles—time for a new embryo transfer strategy? // *Fertil. Steril*. 2011. V. 95. № 5. P. 1691–1695.
10. *Juriscova A., Varmuza S., Casper R.F.* Involvement of programmed cell death in preimplantation embryo demise // *Hum. Reprod. Update*. 1995. V. 1. № 6. P. 558–566.
11. *Parr E.L., Tung H.N., Parr M.B.* Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats // *Biol. Reprod*. 1987. V. 36. № 1. P. 211–225.
12. *Welsh A.O., Enders A.C.* Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death // *Biol. Reprod*. 1993. V. 49. № 1. P. 38–57.
13. *Hardy K.* Apoptosis in the human embryo // *Rev. Reprod*. 1999. V. 4. № 3. P. 125–134.
14. *Alfarawati S., Fragouli E., Colls P. et al.* The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender // *Fertil. Steril*. 2011. V. 95. № 2. P. 520–524.
15. *Harton G., Braude P., Lashwood A. et al.* ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening // *Hum. Reprod*. 2011. V. 26. № 1. P. 14–24.
16. *Kuliev A., Verlinsky Y.* Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis // *Hum. Reprod. Update*. 2004. V. 10. № 5. P. 401–407.
17. *Herrera C., Morikawa M.I., Castex C.B. et al.* Blastocoele fluid from *in vitro*- and *in vivo*-produced equine embryos contains nuclear DNA // *Theriogenology*. 2015. V. 83. № 3. P. 415–420.
18. *Bielanska M., Tan S.L., Ao A.* Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*, incidence, type, and relevance to embryo outcome // *Hum. Reprod*. 2002. V. 17. № 2. P. 413–419.
19. *Ruangvutitert P., Delhanty J.D.A., Rodeck C., Harper J.C.* Relative efficiency of FISH on metaphase and interphase nuclei from nonmosaic trisomic or triploid fibroblast cultures // *Prenat. Diagn*. 2000. V. 20. № 2. P. 159–162.
20. *Coonen E., Derhaag J.G., Dumoulin J.C. et al.* Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos // *Hum. Reprod*. 2004. V. 19. № 2. P. 316–324.
21. *Bielanska M., Jin S., Bernier M. et al.* Diploid-aneuploid mosaicism in human embryos cultured to the blastocyst stage // *Fertil. Steril*. 2005. V. 84. № 2. P. 336–342.
22. *Daphnis D.D., Delhanty J.D.A., Jerkovic S. et al.* Detailed FISH analysis of day 5 human embryos reveals the mechanisms leading to mosaic aneuploidy // *Hum. Reprod*. 2005. V. 20. № 1. P. 129–137.
23. *Los F.J., Van Opstal D., van den Berg C.* The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model // *Hum. Reprod. Update*. 2004. V. 10. № 1. P. 79–94.
24. *Лебедев И.Н., Назаренко С.А.* Тканеспецифичный плацентарный мозаицизм по аутомосомным трисомиям у спонтанных абортусов человека: механизмы формирования и фенотипические эффекты // *Генетика*. 2001. Т. 37. № 11. С. 1459–1474.
25. *Lebedev I.* Mosaic aneuploidy in early fetal losses // *Cytogenet. Genome Res*. 2011. V. 133. № 2–4. P. 169–183.
26. *Chang L.J., Chen S.U., Tsai Y.Y. et al.* An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening // *Clin. Exp. Reprod. Med*. 2011. V. 38. № 3. P. 126–134.
27. *Романова Н.В., Смольникова В.Ю., Глинкина Ж.И., Кузьмичев Л.Н.* Применение преимплантационной диагностики в комплексной оценке эмбриона для селективного переноса // *Проблемы репродукции*. 2010. Т. 6. С. 75–78.
28. *Fragouli E., Katz-Jaffe M., Alfarawati S. et al.* Comprehensive chromosome screening of polar bodies and blastocysts from couples experiencing repeated implantation failure // *Fertil. Steril*. 2010. V. 94. P. 875–887.
29. *Sandalinas M., Sadowy S., Alikani M. et al.* Development ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage // *Hum. Reprod*. 2001. V. 16. № 9. P. 1954–1958.
30. *McArthur S.J., Leigh D., Marshall J.T. et al.* Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts // *Fertil. Steril*. 2005. V. 84. № 6. P. 1628–1636.
31. *Cohen J., Wells D., Munné S.* Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates // *Fertil. Steril*. 2007. V. 87. № 3. P. 496–503.



## Preimplantation Genetic Diagnosis by Blastocentesis: Problems and Perspectives

D. I. Zhigalina<sup>a</sup>, N. A. Skryabin<sup>b, c</sup>, V. G. Artyukhova<sup>d</sup>,  
A. V. Svetlakov<sup>d</sup>, and I. N. Lebedev<sup>b, c</sup>

<sup>a</sup>*National Research Tomsk State University, Department of Cytology and Genetics, Tomsk, 634050 Russia  
e-mail: darya.zhigalina@medgenetics.ru*

<sup>b</sup>*National Research Tomsk State University, Laboratory of Human Ontogenetics, Tomsk, 634050 Russia*

<sup>c</sup>*Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, 634050 Russia  
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru*

<sup>d</sup>*Krasnoyarsk Center for Reproductive Medicine, Krasnoyarsk, 660037 Russia*

The discovery of cell-free DNA in blastocoele fluid opens new perspectives for the development of preimplantation genetic diagnosis of human chromosomal and genetic diseases. In this review we analyzed the results of the first studies, which made it possible to evaluate the effectiveness of the application of a new source of biological material and showed a high degree of agreement between the results of molecular karyotyping with cell-free DNA and blastocyst cells. The results suggest the possibility of developing a noninvasive method of preimplantation genetic diagnosis, which may open a new round of progress in the field of assisted reproductive technologies and the genetics of early stages of human ontogenesis.

*Keywords:* blastocentesis, cell-free DNA, preimplantation genetic diagnosis, chromosomal mosaicism, *in vitro* fertilization,