

ДЕТЕКЦИЯ ДНК В АСПИРАТЕ ПОЛОСТИ БЛАСТОЦИСТЫ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

© 2018 г. Н. И. Сесина^{а, *}, Е. Ю. Воскобоева^{б, с}, К. В. Краснопольская^д

^аМеждународная клиника “Семья”,
Россия, 129110, Москва Большая Переяславская улица, дом 7, строение 1

^бМедико-генетический научный центр РАМН,
Россия, 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1

^сКлинико-диагностическая лаборатория репродукции человека “Прогресс Лаб”
Россия, 107078, Москва, Каланчёвская улица, 31

^дГосударственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области
“Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии”,
Россия, 101000, г. Москва, ул. Покровка, д. 22а

*E-mail: sesina@mail.ru

Поступила в редакцию 12.09.2017 г.

Окончательный вариант получен 11.03.2018 г.

Предимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) – современный метод, позволяющий определять наличие хромосомных и генетических патологий у эмбриона человека до его переноса в полость матки. Генетический материал эмбриона получают методом биопсии. В этой работе была предпринята попытка оценить эффективность метода бластоцентеза – аспирации содержимого полости бластоцисты эмбрионов человека. В данном исследовании биопсию проводили у эмбрионов человека 6–7 сут развития низких морфологических характеристик (3–4 СС по классификации Гарднера). ДНК, полученную из аспирата, а также из бластоцисты, из которой он был изъят, анализировали методом КФ-ПЦР (количественной флуоресцентной полимеразной цепной реакции) после полногеномной амплификации. Всего было проанализировано 24 образца аспирата, а также бластоцист, из которых он был получен, в 7 (29%) образцах аспирата полости бластоцисты обнаружена пригодная для анализа ДНК, которая в 5 (71%) случаях была идентична ДНК бластоцисты. Таким образом, показано, что при бластоцентезе эмбриона человека возможно получение ДНК пригодной для анализа молекулярно-генетическими методами. Обсуждены особенности и преимущества применения метода мультиплексной КФ-ПЦР в сочетании с полногеномной амплификацией для исследования ДНК, полученной при аспирации жидкости бластоцеля. Рассмотрены перспективы получения ДНК методом бластоцентеза для предимплантационного генетического тестирования (ПГТ) в рутинной практике лечения бесплодия и профилактики хромосомных и генетических аномалий у новорожденных.

Ключевые слова: эмбрион человека, ПГТ, биопсия эмбриона, полость бластоцисты, бластоцентез

DOI: 10.1134/S0475145018050051

ВВЕДЕНИЕ

Вспомогательные репродуктивные технологии являются одним из наиболее динамично развивающихся методов современной медицины. В настоящее время большую роль в повышении вероятности рождения здорового ребенка у пациентов, проходящих программу ЭКО, играют предимплантационное генетическое тестирование (ПГТ-А), выполняемое с целью исключения переноса анеуплоидных эмбрионов, и предимплантационное генетическое тестирование (ПГТ-М), позволяющее диагностировать моногенные заболевания и присутствие наследственных несбалансированных транслока-

ций и других структурных перестроек в геноме доимплантационного эмбриона (ПГТ-СП) (Базанов и др., 2013; Mastenbroek et al., 2007). Термины, применявшиеся ранее: ПГД/ПГС – предимплантационная генетическая диагностика/скрининг, в настоящее время заменены на предимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) (Zegers-Hochschild et al., 2017). Для получения генетического материала используется биопсия одного или нескольких бластомеров эмбрионов 3-х сут развития, или нескольких клеток трофэктодермы эмбриона 5-х сут развития, что является инвазивной процедурой (Kuliev, Verlin-sky, 2005). В 2013 г. был предложен новый метод –

аспирация содержимого полости бластоцисты (Palini et al., 2013), получивший название – бластоцентез (Gianaroli et al., 2015) Показано, что при изъятии содержимого полости бластоцисты эмбриона человека 5-х сут развития, возможно получить ДНК пригодную для ПГТ. При бластоцентезе повреждение клеток эмбриона существенно меньше, чем при биопсии бластомеров или трофэктодермы, и, следовательно, риск повреждения эмбриона минимален. Так же было показано, что при анализе аспирата полости бластоцисты, лишь в 76.5% изучаемых образцов обнаружена пригодная для анализа ДНК (Gianaroli et al., 2014).

В последнее время для получения ДНК эмбриона с целью дальнейшего исследования наиболее часто используется метод биопсии трофэктодермы. Трофэктодерма формируется на 4–5 сут развития эмбриона, также в это время дифференцируется внутриклеточная масса, которая потом развивается в органы и ткани собственно зародыша, в то время как трофэктодерма участвует в формировании внезародышевых структур. Именно эта дифференциация помогает минимизировать повреждения эмбриона при биопсии и снижение его потенциала к развитию. На пятые сутки развития эмбрион насчитывает 150–200 клеток. Биопсия 3–4 клеток трофобласта при правильном исполнении не ведет к серьезным повреждениям. Однако в ситуации исполнения биопсии эмбриона очень важна квалификация специалиста, исполняющего эту манипуляцию. Очень важно соблюдение равновесия: с одной стороны, при биопсии необходимо взять достаточное количество клеток для анализа, с другой – нанести эмбриону минимальные повреждения. В то же время любая биопсия является инвазивным методом, неизбежно ведущим к повреждению эмбриона в той или иной степени. В связи с этим в настоящее время идет активный поиск возможностей малоинвазивных методов изъятия генетического материала эмбриона. В данной работе была предпринята попытка оценить возможность использования аспирации содержимого полости бластоцисты человека для получения ДНК, которая в дальнейшем может быть использована для ПГТ. В настоящее время вспомогательные репродуктивные технологии являются одной из наиболее активно развивающихся областей медицины. На стыке медицины и биологии находятся методы, связанные с получением жизнеспособных эмбрионов человека *in vitro*. При переносе эмбрионов в полость матки человека для обеспечения эффективности лечения при помощи ВРТ необходима оценка потенциала эмбриона к развитию. Эмбрион оценивают по морфологическим параметрам (Gardner et al., 1998), однако даже эмбрионы, имеющие высокие морфологические характеристики, могут нести хромосомные аномалии, приводящие к остановке развития как на доимплантационных, так и на

постимплантационных стадиях развития, или приводящие к рождению детей с хромосомными синдромами (Debrock et al., 2010). Для оценки хромосомного статуса эмбриона используется биоптат эмбриона, полученный инвазивными методами. Эмбрионы человека отличаются своими физиологическим и физическим свойствами от эмбрионов лабораторных животных, таким образом, все методы работы с эмбрионами человека необходимо отрабатывать именно на эмбрионах человека. В данной работе были использованы эмбрионы человека с плохими морфологическими характеристиками и значительным отставанием в развитии, такие эмбрионы бесперспективны в отношении использования их для лечения бесплодия, так как не имеют потенциала развития. Все эмбрионы подлежали утилизации и были переданы для исследований пациентами, согласно их письменному заявлению. В связи с плохим качеством эмбрионы могут иметь ряд особенностей как физиологических, так связанных с содержанием ДНК, ее количеством и качеством, в жидкости полости бластоцисты (Palini et al., 2013; Gianaroli et al., 2014; Hammond et al., 2016; Скрыбин и др., 2015).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Установить, возможно ли получение ДНК, пригодной для анализа, методом бластоцентеза (учитывая научный аспект работы, использовали эмбрионы низкого качества).

Оценить перспективы данного метода для получения ДНК для рутинного проведения ПГТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аспирацию содержимого полости проводили на стадии бластоцисты на 6–7-е сут развития эмбриона, бластоцентезу подвергались эмбрионы класса 3–4 СС по классификации Гарднера (Gardner et al., 1998) признанные непригодными для криоконсервации и переноса в полость матки, ввиду низких морфологических характеристик, которые делали дальнейшее развитие эмбриона бесперспективным. Бластоцентез был проведен 24 бластоцистам. Аспирация содержимого полости бластоцисты проводилась при помощи микроманипуляторов NARISHIGE, при использовании инвертированного микроскопа NICKON. Манипуляции по изъятию содержимого полости бластоцисты проводили в пластиковых чашках Петри Nunc (кат. № 150318). Бластоцисту помещали в среду Gamete Buffer (COOK) закрепляли удерживающей стеклянной микропипеткой ORIGIO (MPH-MED-35), иглой для интрацитоплазматической инъекции сперматозоида фирмы ORIGIO (MIC-SI-35) отбирали содержимое полости бластоцисты до момента на-

Таблица 1. Результаты бластоцентеза (серия 1)

Образец	Концентрация ДНК после полной геномной амплификации, нг/мкл	Наличие ПЦР-продуктов после мультиплексной ПЦР различных STR-локусов
Бластоциста 1	32.5	Присутствуют
Бластоцеле 1	0.2	Отсутствуют
Бластоциста 2	21.17	Присутствуют
Бластоцеле 2	0.5	Отсутствуют
Бластоциста 3	19.8	Присутствуют
Бластоцеле 3	31.0	Присутствуют
Бластоциста 4	12.6	Присутствуют
Бластоцеле 4	21.4	Присутствуют
Бластоциста 5	44.8	Присутствуют
Бластоцеле 5	7.9	Отсутствуют

чала коллапсирования, аспирированную жидкость переносили в пробирку EPENDORF (кат. № 0030124332).

В качестве контроля была использована ДНК, полученная из бластоцисты. Для этого после процедуры бластоцентеза эмбрион целиком переносили в пробирку EPENDORF в 2 мкл среды. Полную геномную амплификацию проводили с применением низкотермальной полимеразы Phi29 (Kumar et al., 2008). КФ-ПЦР проводили со специфическими к исследуемым хромосомным локусам праймерами и стандартными условиями ПЦР. Анализ результатов проводили при помощи капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems), согласно инструкции производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего было проведено четыре серии эксперимента, в ходе которого было проанализировано в общей сложности 24 бластоцисты. Количество эмбрионов в каждой серии определялось наличием бластоцист низкого качества однородительского происхождения. Это обусловлено тем, что результаты, полученные от бластоцист-сиблингов легче интерпретировать. Все полученные образцы ДНК были проанализированы в лаборатории молекулярно-генетической группы ГБОУЗ МО МОНИИАГ. Результаты исследования первой группы образцов приведены в табл. 1. Всего было проанализировано 5 бластоцист. Для увеличения количества анализируемой ДНК был использован метод полногеномной амплификации (Zheng et al., 2011; Lin Liu et al., 2012), таким образом, концентрации ДНК в образцах, полученных из бластоцеля и соответствующих бластоцист были сравнимы. В двух случаях была выявлена ДНК в жидкости бластоцеля, причем, при анализе

ПЦР-продуктов после мультиплексной ПЦР различных STR-локусов, было показано, что ДНК аспирированной бластоцисты совпадает с ДНК соответствующей бластоцисты. Установить наличие или отсутствие анеуплоидий в представленных образцах ДНК не представлялось возможным, поскольку для полноценного исследования необходимы образцы ДНК пациентов, которые, к сожалению, не дали согласия на исследование их ДНК.

Были проанализированы продукты амплификации следующих специфических STR-локусов хромосом: D13S796 (хромосома 13); D18S976 (хромосома 18); D21S2055 (хромосома 21); D22S1169 и D22S689 (хромосома 22); DXS472, DXS8377 и DXS6809 (хромосома X).

В следующей серии эксперимента был получен ПЦР-продукт от всех бластоцист, однако ни в одном образце бластоцеля не было обнаружено ДНК. Возможно, это является следствием сильной фрагментации ДНК содержимого полости бластоцист плохого качества (Gianaroli et al., 2014). Так же отсутствие ДНК может быть связано с техническими причинами, как то потеря ДНК при переносе в пробирку для ПЦР, или при переносе аспирированной в каплю с лизирующим буфером. Кроме того, все бластоцисты данной серии имели однородительское происхождение и были крайне низкого качества, что может свидетельствовать об индивидуальной склонности эмбрионов данной семейной пары к фрагментации и дегенерации структур эмбриона, сопровождающихся массивной дегенерацией ДНК, вызывающей затруднения при ее анализе.

В третьей серии нами было отмечено присутствие в ряде образцов аспирированной бластоцисты неспецифической ДНК. Т.е анализ продуктов амплификации STR-последовательностей показал, что ДНК в них не может принадлежать бласто-

Таблица 2. Результаты бластоцентеза (серия 2)

Образец	Концентрация ДНК после полной геномной амплификации, нг/мкл	Наличие ПЦР-продуктов после мультиплексной ПЦР различных STR-локусов
Бластоциста 6	33.4	Присутствуют
Бластоцеле 6	1.82	Отсутствуют
Бластоциста 7	38.5	Присутствуют
Бластоцеле 7	1.64	Отсутствуют
Бластоциста 8	54.7	Присутствуют
Бластоцеле 8	5.25	Отсутствуют
Бластоциста 9	36.9	Присутствуют
Бластоцеле 9	2.48	Отсутствуют
Бластоциста 10	57.7	Присутствуют
Бластоцеле 10	1.68	Отсутствуют

цисте. Таким образом, встал вопрос о контаминации образцов чужеродной ДНК. Хочется подчеркнуть, что метод ПЦР-диагностики является крайне чувствительным и для избежания внесения чужеродной ДНК применяется ряд строгих мер, а именно: работа в стерильных условиях, стерильные среды, стерильный одноразовый пластик, однако возможность контаминации никогда нельзя исключить. Учитывая, что свободная ДНК содержится в окружающей среде, даже небольшое ее количество, при попадании в условия полногеномной амплификации, многократно возрастает в концентрации. Факт выявления неспецифических сигналов является весьма обнадеживающим и является несомненным достоинством методом мультиплексной КФ-ПЦР. Благодаря различиям STR-последовательностей возможно выявление ДНК неродительского происхождения в образце (Markoulatos et al., 2002; Handyside, 2013), что может быть расценено как внутренний контроль качества, учитывая, что особенности изъятия содержимого полости бластоцисты не позволяют сделать адекватный отрицательный контроль всего используемого оборудования и реактивов. Так же этот факт может пояснять различия между полученными нами данными и данными других авторов, которые использовали для анализа содержимого полости бластоцеля другие молекулярно-генетические методы (Скрябин и др., 2015; Palini et al., 2013; Gianaroli et al., 2014). Ни CGH, ни NGS не позволил бы выявить принадлежность сигнала чужеродной ДНК, данные методы не позволяют различить сигналы, полученные от разных образцов ДНК, что делает их применение менее предпочтительным в ситуации анализа крайне малых количеств ДНК. Кроме того, в ряде работ была предпринята попытка диагностики моногенного заболевания: синдрома Мартина–Бела (ломкой

X-хромосомы) (Gianaroli et al., 2014), в ДНК, аспирированной из полости бластоцисты. В рутинной практике для косвенной ДНК-диагностики моногенных заболеваний так же используется метод КФ-ПЦР, таким образом, представляется целесообразным адаптировать методику получения ДНК из полости бластоцисты именно под этот метод исследования ДНК.

Так же в 3-й серии эксперимента, единожды за все наше исследование не был получен сигнал ДНК от самой бластоцисты. Это можно связать как с низким качеством самой бластоцисты, дегенеративные процессы в которой сопровождалась массивной деградацией ДНК, так и с технической ошибкой, при которой сама бластоциста или ее материал были потеряны в ходе работы. В четвертой серии эксперимента было проанализировано 6 эмбрионов. В одном случае отмечено наличие ДНК в полости бластоцисты, и эта ДНК совпала с ДНК бластоцисты. Так же в бластоцели бластоцисты № 23 были отмечены единичные сигналы, свидетельствующие, скорее всего, о высокой фрагментации ДНК содержимого бластоцеля, или же частичной деградации ДНК в процессе манипуляций с аспирированной, что также согласуется с данными зарубежных авторов (Gianaroli et al., 2014; Hammond et al., 2016).

Таким образом, в общей сложности было проанализировано 24 бластоцисты, из которых в 7 образцах жидкости полости бластоцисты была получена ДНК, причем только у 5 молекулярный генотип совпадал с кариотипом бластоцисты. В двух случаях ДНК различалась. Дискуссии о совпадении молекулярного генотипа бластоцисты и аспирированной бластоцели идут с момента обнаружения ДНК в аспирированном при бластоцентезе (Скрябин и др., 2015; Gianaroli et al., 2014; Hammond et al., 2016). В работе Gianaroli с коллегами (Gianaroli et al., 2014) также показано, что при

Таблица 3. Результаты бластоцентеза (серия 3)

Образец	Концентрация ДНК после полной геномной амплификации, нг/мкл	Наличие ПЦР-продуктов после мультиплексной ПЦР различных STR-локусов
Бластоциста 11	1.43	Отсутствуют
Бластоцеле 11	0.37	Отсутствуют
Бластоциста 12	29.7	Присутствуют
Бластоцеле 12	0.9	Отсутствуют
Бластоциста 13	24.2	Присутствуют
Бластоцеле 13	23.8	Присутствуют НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ
Бластоциста 14	23.0	Присутствуют
Бластоцеле 14	51.2	Присутствуют НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ
Бластоциста 15	33.4	Присутствуют
Бластоцеле 15	0.68	Отсутствуют
Бластоциста 16	39.5	Присутствуют
Бластоцеле 16	0.9	Отсутствуют
Бластоциста 17	28.3	Присутствуют
Бластоцеле 17	1.01	Отсутствуют
Бластоциста 18	29.1	Присутствуют
Бластоцеле 18	26.8	Присутствуют

Таблица 4. Результаты бластоцентеза (серия 4)

Образец	Концентрация ДНК после полной геномной амплификации, нг/мкл	Наличие ПЦР-продуктов после мультиплексной ПЦР различных STR-локусов
Бластоциста 19	39.4	Присутствуют
Бластоцеле 19	0.87	Отсутствуют
Бластоциста 20	35.2	Присутствуют
Бластоцеле 20	0.65	Отсутствуют
Бластоциста 21	32.9	Присутствуют
Бластоцеле 21	31.8	Присутствуют
Бластоциста 22	40.0	Присутствуют
Бластоцеле 22	0.2	Отсутствуют
Бластоциста 23	28.6	Присутствуют
Бластоцеле 23	16.7	Присутствуют ЕДИНИЧНЫЕ СИГНАЛЫ
Бластоциста 24	35.1	Присутствуют
Бластоцеле 24	0.1	Отсутствуют

биопсии 51 бластоцисты ДНК была выявлена в 39 случаях и в 38 случаях она совпадала с таковой у бластоцисты (97.4%). В нашей работе мы так же показали, что в большинстве случаев (71%) есть совпадение генотипов, в то же время исследования ДНК с применением ПЦР уникальных STR-маркеров позволяет четко показать, что все случаи различия ДНК бластоцисты и ДНК, полученной из полости бластоцисты, связаны именно с контаминацией образца чужеродной ДНК, а не с эмбриональным мозаицизмом.

Некоторые различия в количестве образцов, в которых была получена ДНК, может быть объяснено качеством бластоцист, использованных в нашей работе. В работе Gianoroli (Gianaroli et al., 2014) были проанализированы бластоцисты 5-х сут разного качества, причем было показано, что есть тенденция к ухудшению качества ДНК, которое может снижать вероятность ее выявления при анализе, с ухудшением морфологических характеристик эмбриона. В нашей работе мы использовали эмбрионы 7-х сут развития самого низшего каче-

Таблица 5. Сравнение собственных данных и данных Gianoroli 2014 (Gianaroli et al., 2014)

	Gianoroli (2014)	Собственное исследование
Проанализированно бластоцист	51	24
Обнаружена ДНК в полости бластоцеля	39 (76.5%)	7 (29%)
Есть совпадения ДНК бластоцисты и бластоцеля	38 (97.4%)	5 (71%)

Таблица 6. Сравнение методов инвазивной и неинвазивной биопсии

Биопсия	Инвазивная	Неинвазивная
Травматичность	Механическое изъятие 3–4 клеток трофэктодермы	Отсутствие повреждения клеток бластоцисты
Информативность	Высокая	Низкая
Техническая сложность выполнения биопсии	Высокая	Низкая
Техническая сложность переноса материала в пробирки для ПЦР	Низкая	Высокая
Требования к оборудованию	Необходима лазерная установка	Достаточно обычной установки для ИКСИ

ства, что безусловно не могло не сказаться на качестве ДНК в полости бластоцисты. Однако даже эмбрионы столь плохого качества могут быть пригодны к неинвазивной биопсии бластоцисты с последующим получением ДНК, пригодной для анализа. Метод биопсии полости бластоцисты, несомненно, нуждается в дальнейшем усовершенствовании, однако уже сейчас можно выявить ряд преимуществ перед более инвазивными методами (см. табл. 5). В первую очередь, это собственно малая инвазивность. При правильном выполнении бластоцентеза единственное изменение, которое претерпевает бластоциста — это коллапсирование, которое является естественным процессом, вторым существенным достоинством данного метода является его низкая стоимость и общедоступность. Т.к. для проведения аспирации жидкости полости бластоцисты требуется лишь обычная установка для ИКСИ (интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит), в то время как для биопсии трофэктодермы необходима лазерная пушка. В настоящее время метод бластоцентеза не может быть применен только из-за его низкой информативности, однако, безусловно, при дальнейшем развитии технологии он может прочно войти в рутинную практику.

ВЫВОДЫ

При бластоцентезе эмбриона человека возможно получение ДНК, пригодной для анализа молекулярно-генетическими методами.

Для исследования ДНК, полученной при аспирации жидкости полости бластоцисты, целесообразно

применение метода мультиплексной КФ-ПЦР в сочетании с полногеномной амплификацией.

Использование ДНК, полученной при бластоцентезе, может быть возможным как для диагностики моногенных заболеваний, так и для преемплантационного генетического скрининга.

Метод бластоцентеза имеет большие перспективы для внедрения в широкую практику, однако для повышения достоверности и эффективности метода требуются дополнительные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Базанов П.А., Митюшина Н.Г., Юткин Е.В. и др.* Оптимизация ведения пациентов при выполнении преимплантационной генетической диагностики // Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2013. № 5. С. 97–102.
- Скрябин Н.А., Лебедев И.Н., Артюхова В.Г. и др.* Молекулярное кариотипирование по внеклеточной ДНК бластоцеля как основа неинвазивного преимплантационного генетического скрининга анеуплоидий // Генетика. 2015. Т. 51. № 11. С. 1301–1307.
- Gardner D., Schoolcraft W., Wagley L. et al.* A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in IVF // Hum. Reprod. 1998. V. 13. P. 3434–3440.
- 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.
- Debrock S., Melotte C., Spiessens C. et al.* Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial // Fertil. Steril. 2010. V. 93. P. 364–373.

- Hammond E.R., Shelling A.N., Cree L.M.* Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use // *Hum. Reprod.* 2016. Aug. 31 (8): 1653–1661.
- Handyside A.H.* 24-Chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies // *Fertil. Steril.* 2013. V. 100. P. 595–602.
- Kuliev A., Verlinsky Y.* Place of preimplantation diagnosis in genetic practice // *The American J. of Medical Genetics.* 2005. V. 134. № 1. P. 105–110.
- Kumar G., Garnova E., Reagin M. et al.* A Improved multiple displacement amplification with phi 29 DNA polymerase for genotyping of single human cells // *Biotechniques.* 2008. Jun; 44 (7) P. 879–890.
- Lin Liu, Yinhu Li, Siliang Li et al.* Comparison of next-generation sequencing systems // *J. of Biomedicine and Biotechnology.* V. 2012. P. 11. doi: 10.1155/2012/251364
- Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M.* Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach // *J. of clinical laboratory analysis.* 2002. V. 16 (1). P. 47–51.
- Mastenbroek S., Twisk M., van Echten-Arends J. et al.* In vitro fertilization with preimplantation genetic screening // *N. Engl. J. Med.* 2007. V. 357. P. 9–17.
- 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.
- Zheng Y.M., Wang N., Li L. et al.* Whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis // *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2011. V. 12 (1). P. 1–11.
- Zegers-Hochschild F., Adamson G.D. et al.* The International Glossary on Infertility and Fertility Care // *Fertil. Steril.* 2017. V. 108 (3). P. 393–406.

Detection of DNA in Human Blastocyst Cavity Aspirate by Multiplex PCR

N. I. Sesina^{1, *}, E. Y. Voskoboeva^{2, 3}, and K. V. Krasnopolskaya⁴

¹*International Clinic “Family”, Moscow, 129110 Russia*

²*Medical-Genetic Research Center of RAMS, Moscow, 115478 Russia*

³*Clinical Diagnostic Laboratory of Human Reproduction “Progress Lab”, Moscow, 107078 Russia*

⁴*GBUZ MH MO “Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology”, Moscow, 101000 Russia*

*e-mail: sesina@mail.ru

Received September 12, 2017; in final form, March 3, 2018

Preimplantation genetic diagnosis is a modern method of detection of chromosomal and genetic abnormalities in human embryo before its transfer to the uterus. The genetic material is obtained by the embryo biopsy. In this study, an attempt was made to evaluate the effectiveness of the method of noninvasive biopsy – aspiration of the contents of blastocoele (blastocentesis) of the human embryos. In this research, a biopsy was done in human embryos of 6–7 days of development of low morphological characteristics. DNA obtained from aspirate, as well as from blastocyst, were analyzed by RT-PCR after the whole genome amplification. In total, 24 blastocysts and samples of aspirate obtained from them were analyzed, 6 in 7 (29%) samples, an assayable DNA was obtained, which in 5 (71%) cases was identical to blastocyst DNA. Thus, with a non-invasive biopsy of the human embryo in the blastocyst stage, it is possible to obtain DNA suitable for analysis by molecular genetic methods. The features and advantages of using the multiplex QF-PCR method in combination with full-genomic amplification for DNA research of the blastocoele fluid obtained during aspiration are discussed here. The prospects of the noninvasive biopsy method for use as a diagnostic procedure in the routine practice of infertility treatment and prevention of chromosomal and genetic abnormalities in newborns are considered in this work.

Keywords: human embryo, PGD, embryo biopsy, blastocoele, blastocentesis, blastocoele fluid