

Метод фильтрации для выделения трофобластов из образцов периферической крови с целью детекции анеуплоидий в единичных клетках плодного происхождения

Мусатова Е.В.¹, Мартынов А.В.¹, Маркова Ж.Г.¹, Витязева И.И.², Шилова Н.В.¹

¹ – Федеральное государственное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1, liza_mus@mail.ru

² – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Эндокринологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117036, Москва, ул. Дм.Ульянова, д.11, vitiazeva@yandex.ru

Неинвазивная пренатальная диагностика хромосомных болезней представляется актуальным направлением современной пренатальной медицины. Определить хромосомный статус плода, не прибегая к инвазивным процедурам взятия плодного материала, можно путем анализа единичных клеток трофобласта, циркулирующих в периферической крови беременных женщин уже на ранних сроках беременности. В представленной статье изложены результаты модельного эксперимента по выделению клеток трофобласта из образцов периферической крови методом фильтрации через поликарбонатные фильтры с последующим анализом генетического материала единичных клеток методом сравнительной геномной гибридизации.

Ключевые слова: неинвазивная пренатальная диагностика; трофобласты; изоляция клеток, основанная на их размере; лазерная микродиссекция; сравнительная геномная гибридизация

Введение

Работа над созданием методов неинвазивной пренатальной диагностики наследственных заболеваний продиктована стремлением современного общества к минимизации пренатальных потерь, сочетающимся с необходимостью получения информации о генетическом статусе развивающегося плода. Анализ единичных трофобластов, циркулирующих в периферической крови беременных женщин, может стать перспективным направлением в неинвазивной диагностике наследственных заболеваний плода. Особенностью, отличающей клетки трофобласта от остальных клеток плодной природы, поступающих в периферический кровоток во время беременности, является их эпителиальная природа, определяющая крупный размер и характерную морфологию этих клеток. Эти клеточные характеристики позволяют применить для выделения трофобластов метод фильтрации (ISET – Isolation by Size of Epitelial Tumor cells), в ходе которого крупные клетки задерживаются на поверхности фильтра с определенным диаметром пор, тогда как большинство клеток периферической крови проходят через поры [9]. В отличие от методов, традиционно применяющихся для решения проблемы обогащения исследуемого образца материнской крови редкими клетками плодной природы, таких как градиентное центрифugирование и клеточная сортировка, выделение интересующих исследователей клеток из образцов по такому физическому параметру, как клеточный диаметр, представляется лишенным серьезного недостатка перечисленных методик – значительного уровня потерь и без того редких клеток плодной природы. Так, было

показано, что градиентное центрифугирование приводит к потере 60–80% плодных клеток, содержащихся в образце материнской крови [3].

Целью данного исследования была оценка возможности анализа генетического материала трофобластов методом сравнительной геномной гибридизации после их выделения из образцов венозной крови методом фильтрации.

Материалы и методы

Материалами для исследования послужили 12 образцов искусственно созданных, артифициальных смесей, полученных путем добавления суспензии клеток хориона с известным кариотипом в образцы периферической венозной крови взрослых индивидуумов. Артифициальные смеси явились имитацией качественного состава периферической венозной крови беременных женщин. Венозная кровь взрослых индивидуумов с нормальным кариотипом забиралась в вакуумные пробирки с гепарином. Источником клеток хориона с известным кариотипом был материал неразвивающихся беременностей. Ворсины хориона препарировали с помощью иглы и пинцета с использованием бинокулярной лупы с целью их очищения от фрагментов материнских тканей. Для приготовления клеточной суспензии из ворсин хориона использовали раствор трипсин-ЭДТА, в котором ворсины хориона оставляли на ночь при 4°C, а затем инкубировали 30 минут при 37°C.

К образцу венозной крови объемом 1 мл добавляли 0,5 мл полученной суспензии клеток хориона. Получен-

Таблица

Цитогенетическая характеристика образцов артифициальных смесей

№ п/п	Кариотип лимфоцитов периферической крови	Кариотип материала неразвивающейся беременности
1	46,XX	46,XY
2	46,XX	47,XY,+16
3	46,XY	46,XX
4	46,XX	46,XY
5	46,XY	47,XX,+13
6	46,XY	46,XX
7	46,XY	46,XX
8	46,XY	46,XX
9	46,XX	47,XY,+21
10	46,XY	46,XX
11	46,XX	46,XY
12	46,XX	46,XY

ную артифициальную смесь разводили фильтрационным буфером (0,2% формальдегида, 0,1% альбумина, 0,1% тритон X100, 0,0372% ЭДТА) в соотношении 1:10 и оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Выделение клеток трофобласта из образцов артифициальных смесей осуществлялось с помощью вакуумной фильтрации через круглые поликарбонатные фильтры с диаметром пор 8 мкм, помещенные в устройство для фильтрации. Устройство для фильтрации представляет собой колбу Бунзена с фильтродержателем и емкостью для образца. После фильтрации образца фильтр промывался солевым фосфатным буфером для удаления дебриза эритроцитов. Затем фильтры помещались на предметное стекло и высушивались на воздухе.

Для детекции клеток трофобласта на фильтре использовалось иммуноцитохимическое окрашивание с monoclonalными антителами к цитоплазматическому белку цитокератину 7 (CK7) с использованием набора EnVision+ System-H RP (Dako, Дания). Клетки трофобласта детектировались на фильтре по характерному окрашиванию цитоплазмы при микроскопическом исследовании полученных цитологических препаратов при увеличении 200x и 400x. Единичные CK7-положительные клетки изолировались с цитологических препаратов с помощью системы лазерной микродиссекции Carl Zeiss PALM MicroBeam (Carl Zeiss, Германия). Диссектированный материал собирался в пробирки-коллекторы объемом 0,2 мл, в которых далее проводился этап полногеномной амплификации генетического материала единичных клеток с использованием набора WGA4-50RXN GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification Kit (SIGMA-ALDRICH, США). Для проведения полногеномной амплификации с каждого цитологического препарата было изолировано по 2 единичные клетки. Анализ генетического материала полученных клеточных образцов проводили методом метафазной сравнительной геномной гибридизации (CGH) [1].

Анализ изображения производился с помощью программы «LUCIA CGH», установленной в комплексе с эпифлюоресцентным микроскопом «Eclipse 90i» (Nikon, Япония) и CCD камерой «ProgResMF» (JENOPTIK, Германия).

Результаты и обсуждение

Ранее нами были опубликованы результаты модельного эксперимента по выделению клеток трофобласта из образцов периферической крови методом градиентного центрифugирования [3]. Однако сопряженные с данной методикой клеточные потери, связанные в первую очередь с многочисленными отмывками клеток, а также многоэтапность и трудоемкость протокола, продиктовали использование альтернативного метода выделения редких клеток, основанного на их размере. На первом этапе работы была получена коллекция цитологических препаратов клеток трофобласта на поверхности фильтров, выделенных из 12 образцов артифициальных смесей. Полученная коллекция содержала образцы клеток трофобласта как с нормальным хромосомным набором, так и с аномалиями кариотипа (таблица).

На этапе фильтрации ключевым является выбор оптимального диаметра пор фильтра, который должен не только задерживать на поверхности фильтра крупные клетки, но и пропускать подавляющее большинство клеток периферической крови, не представляющих интереса для исследования. Средний диаметр клеток крови составляет 8–11 мкм, клетки цитотрофобласта имеют диаметр 14–30 мкм [9]. При тестировании фильтров с различными диаметрами пор (от 8 до 14 мкм), было установлено, что диаметр 8 мкм является оптимальным, так как задерживает на поверхности фильтра менее 0,1% клеток крови [6].

После проведения иммуноцитохимического окрашивания с антителами к цитокератину 7 визуализация

трофобластов на фильтрах осуществлялась при микроскопическом исследовании образцов. Клетки трофобlasta идентифицировались на поверхности фильтра по характерному окрашиванию их цитоплазмы (рис. 1).

Важным этапом эксперимента явился этап изоляции единичных CK7-положительных клеток с поликарбонатного фильтра. Метод лазерной микродиссекции предполагает использование специальных предметных стекол, покрытых полимерной мембраной, что оптимизирует процесс диссекции и позволяет избежать повреждения вырезаемых объектов. Поликарбонатный фильтр является крайне непростым материалом для лазерной микродиссекции в силу собственности его химического состава и толщины. В процессе подбора рабочих условий микродиссекции удалось добиться полного прорезания материала фильтра без повреждения расположенной на данном участке клетки и последующего катапультирования вырезанного участка вместе с единичной клеткой в пробирку-коллектор (рис. 2).

Для проведения лазерной микродиссекции и последующего анализа генетического материала единичных клеток были выбраны цитологические препараты, содержащие трофобласти с аномальными кариотипами, а именно: плода женского пола с трисомией по хромосоме 13 (47,XX,+13), и плода мужского пола с трисомией по хромосоме 16 (47,XY,+16). В результате проведенной полногеномной амплификации диссектированных единичных CK7-положительных клеток среднее значение концентрации ДНК в образцах составило 1105 нг/мкл. Таким образом, полногеномная амплификация явилась важным этапом, благодаря которому удалось получить многократное увеличение количества ДНК в образце, достаточное для последующего анализа.

Сравнительная геномная гибридизация была проведена с образцами амплифицированной геномной ДНК, полученной из двух диссектированных с каждого образца клеток. Анализ полученных профилей гибридизации

показал, что виртуальный кариотип клеток в обоих случаях соответствовал результатам стандартного цитогенетического исследования (рис. 3). Обращает на себя внимание прерывистость профиля гибридизации соответствующих хромосом, что может быть связано с избирательной амплификацией генетического материала единичных клеток и/или малым стартовым количеством ДНК. Подбор оптимального протокола полногеномной амплификации является важной задачей будущих экспериментов. На основании приведенных выше данных можно утверждать, что выделенные из артификальной смеси CK7-положительные клетки являются плодными по своему происхождению. Анализ молекулярного кариотипа методом метафазной CGH представляется актуальным в силу высокой информативности при выявлении анеуплоидий, а также низкой стоимости по сравнению с микроматричным CGH-анализом.

Трудности использования плодных клеток в качестве объекта неинвазивной пренатальной диагностики в настоящее время ассоциируются с их крайне низким содержанием в крови беременной женщины. В среднем в 1 мл крови беременной женщины содержится 2–6 клеток плодного происхождения, причем большая часть этих клеток имеет трофобластную природу [4, 5]. Клетки трофобласта появляются в крови женщины уже на 5-й неделе беременности и не сохраняются в материнском организме после родов [7]. Вследствие крайне низкой представленности клеток трофобласта в периферической материнской крови крайне актуальной является разработка подходов к эффективной изоляции плодных клеток из исследуемого образца.

Изоляция клеток, основанная на их крупном размере — современный подход, позволяющий осуществить цитологическую, иммуноморфологическую и молекулярно-генетическую характеристику циркулирующих в периферической крови крупных эпителиальных клеток. Выделенные единичные клетки могут быть изоли-



Рис. 1. CK7-положительные клетки на поверхности поликарбонатного фильтра. Иммуноцитохимическое окрашивание с использованием моноклональных антител к цитокератину 7, 400x увеличение:
1 – CK7-положительные клетки; 2 – поры фильтра.

рованы с фильтра лазерной микродиссекцией, а их ДНК амплифицирована, что позволяет выявить аномалии таргетных последовательностей генетического материала. Использование в данной методике поликарбонатных фильтров с выделенными клетками в качестве цитологического препарата позволяет осуществить комбинированное морфологическое и иммуноцитохимическое исследование этих клеток.

Метод ISET был впервые применен для выделения и исследования опухолевых клеток из образцов периферической крови пациентов, страдающих онкологическими заболеваниями [8]. В последующих исследовани-

ях по выделению опухолевых клеток из образцов периферической крови была показана высокая эффективность метода изоляции крупных опухолевых клеток по размеру в сравнении с магнитно-активированной клеточной сортировкой [6]. Метод изоляции эпителиальных клеток, основанный на их размере, лишен недостатков, характерных для методик, в основе которых лежит детекция экспрессии клетками тех или иных молекулярных маркеров. Вследствие возможной недостаточности экспрессии или потери клеткой молекулярных маркеров можно столкнуться с проблемой низкой чувствительности подобных методов.



Рис. 2. Последовательность этапов изоляции единичных клеток цитотрофобласта с использованием системы лазерной микродиссекции Carl Zeiss PALM MicroBeam (Carl Zeiss, Германия).
 А – полное прорезание материала фильтра по заданной траектории вокруг клетки, 200x увеличение;
 Б – вид фильтра после катапультирования диссектированного участка, 200x увеличение;
 В – диссектированный участок фильтра в капле воды на крышке пробирки-коллектора, 50x увеличение.

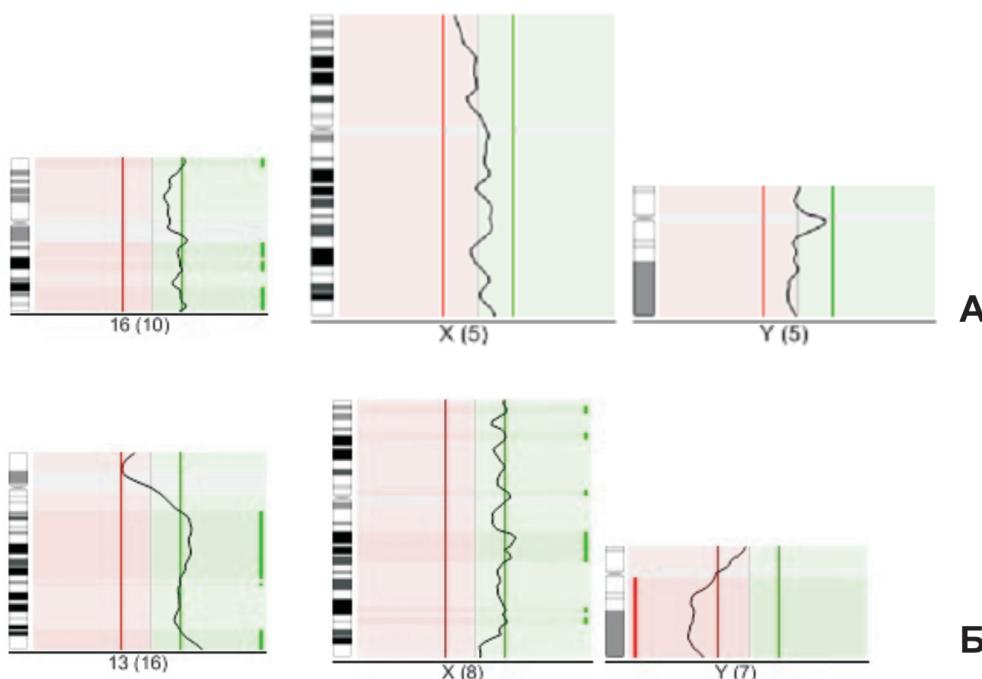


Рис. 3. Результаты сравнительной геномной гибридизации генетического материала двух единичных СК7-положительных клеток, изолированных с каждого из анализируемых цитологических препаратов на фильтрах. Образцы артификальных смесей, анализируемых методом CGH, содержали трофобласти плода:
 А – мужского пола с трисомией по хромосоме 16; Б – женского пола с трисомией по хромосоме 13.

Полученные данные могут являться основой для экспериментов по дальнейшему определению оптимальных условий выделения плодных клеток, а также подобру наилучших условий амплификации крайне малого количества генетического материала не только в рамках модельного эксперимента, но и при использовании нативных образцов периферической крови беременных женщин.

Список литературы

1. Миньженкова М.Е., Шилова Н.В. , Маркова Ж.Г., Козлова Ю.О., Золотухина Т.В. Эффективность различных методов диагностики хромосомных аномалий при репродуктивных потерях // Медицинская генетика. — 2014. — Т. 13, № 2. — С. 25–30.
2. Мусатова Е.В., Маркова Ж.Г., Витязева И.И., Шилова Н.В. Оценка возможности выделения клеток трофобласта из периферической крови и их анализа в условиях модельного эксперимента // Современные проблемы науки и образования. — 2015. — № 5; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21840> (дата обращения: 11.01.2016).
3. Emad A., Drouin R. Evaluation of the impact of density gradient centrifugation on fetal cell loss during enrichment from maternal peripheral blood // Prenat Diagn. — 2014. — Vol. 34, № 9. — P. 878—885.
4. Hatt L., Brinch M., Singh R., Moller K., Lauridsen R.H., Uldbjerg N., Huppertz B., Christensen B., Kolvraa S. Characterization of fetal cells from the maternal circulation by microarray gene expression analysis — could the extravillous trophoblasts be a target for future cell-based non-invasive prenatal diagnosis? // Fetal. Diagn. Ther. — 2014. — Vol. 35, № 3. — P. 218—227.
5. Kolvraa S., Christensen B., Lykke-Hansen L., Philip J. The fetal erythroblast is not the optimal target for non-invasive prenatal diagnosis: preliminary results // J. Histochem. Cytochem. — 2005. — Vol. 53(3). — P. 331—336.
6. Ma Y.C., Wang L., Yu F.L. Recent advances and prospects in the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) methodology // Technol. Cancer Res. Treat. — 2013. — Vol. 12, № 4. — P. 295—309.
7. Mouawia H. Genotyping analysis of circulating fetal cells reveals high frequency of vanishing twin following transfer of multiple embryos // Avicenna J. Med. Biotechnol. — 2013. — Vol. 5, № 2. — P. 125—132.
8. Vona G., Sabile A., Louha M., Sitruk V., Romana S., Schutze K., Capron F., Franco D., Pazzaglia M., Vekemans M., Lacour B., Brechot C., Paterlini-Brechot P. Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells // Am. J. Pathol. — 2000. — Vol. 156, № 1. — P. 57—63.
9. Vona G., Beroud C., Benachi A., Quenette A., Bonnefont JP., Romana S., Munnich A., Vekemans M., Dumez Y., Lacour B., Paterlini-Brechot P. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells in maternal blood // Am. J. Pathol. — 2002. — Vol. 160, № 1. — P. 51—58.

Filtration as a method for isolation of trophoblasts from maternal blood and analysis of single fetal cells**Musatova E.V.¹, Martynov A.V.¹, Markova Zh.G.¹, Vityazeva I.I.², Shilova N.V.¹**¹ — Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», 115409, Moscow, Moskvorechie 1, e-mail: liza_mus@mail.ru² — Endocrinology Research Centre, 117036, Moscow, Dm.Ul'yanova Str., 11, e-mail: vitiazeva@yandex.ru

Non-invasive prenatal diagnosis of chromosomal disorders is a topical area of modern prenatal medicine. Identification of chromosomal status of the fetus avoiding invasive procedures perhaps by analyzing of trophoblasts circulating in peripheral maternal blood. In this article, we present the results of a model experiment for isolation of trophoblast cells from peripheral blood samples by filtration through polycarbonate filters. Isolation of single cells was performed by laser microdissection followed by a whole genome amplification step. Analysis of genetic material isolated cells was performed by comparative genomic hybridization.

Keywords: non-invasive prenatal diagnosis; trophoblasts; ISET; cytokeratin 7; comparative genomic hybridization