

УДК 616-073

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К МЕТОДУ ДЕТЕКЦИИ И ВЕРИФИКАЦИИ ПЛОДНЫХ КЛЕТОК В КРОВОТОКЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

¹Пивень А.В., ¹Золотавина М.Л., ²Гудков Г.В.

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, e-mail: rector@kubsu.ru;

²МБУЗ «ДГКБ № 1», Краснодар, e-mail: detgb1@kmivc.ru

Выделение клеток фетального происхождения из крови беременной представляет большую актуальность для получения информации о геноме плода и реализации в широкой клинической практике скрининговых методов неинвазивной пренатальной диагностики. Но в настоящее время существует проблема подбора специфичных маркеров, методов сепарации и верификации материала. Материалом для исследования служила стабилизированная гепаринизированная цельная кровь беременных в сроках гестации 8-12 недель в объеме 10 мл. Обогащение выполняли методом градиентного центрифугирования и магнитной сепарации (CD45-) с флуоресцентным окрашиванием негативной фракции меченными антителами к антигенам трофобластов (HLA-G) для проведения проточной цитометрии и сортировки клеток на предметные стекла. Фетальное происхождение генетического материала подтверждали сопоставлением аллелей HLA генов родителей и клеток-кандидатов. Предложенные подходы к выбору антител к специфическим антигенам трофобластов для обеспечения эффективных способов их обогащения, захвата и высокопроизводительной сортировки на основе проточной цитометрии, а также надежные методы верификации принадлежности плоду клеток-кандидатов позволяют существенно повысить достоверность и универсальность неинвазивной пренатальной диагностики.

Ключевые слова: неинвазивная пренатальная диагностика, трофобласты, HLA, проточная цитометрия

CHARACTERISTICS OF THE PERIOD DOSE TITRATION WARFARIN IN PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION. RELATIONSHIP WITH CLINICAL FACTORS

¹Piven A.V., ¹Zolotavina M.L., ²Gudkov G.V.

¹Kuban State University, Krasnodar, e-mail: rector@kubsu.ru;

²Children's City Clinical Hospital № 1, Krasnodar, e-mail: detgb1@kmivc.ru

Isolation of fetal origin cells from the pregnant woman's blood is more relevant for the information on the genome of the fetus and implementation in clinical practice, non-invasive screening methods for prenatal diagnosis. But now there is a problem of specific markers, separation methods and verification fetal origin cells. The material for the study served as a stabilized heparin whole blood in pregnant gestation of 8-12 weeks in a volume of 10 ml. The enrichment was carried out by gradient centrifugation and magnetic separation (CD45-) negative staining with a fluorescent-labeled antibody fractions trophoblast antigens (HLA-G) for flow cytometry and cell sorting on glass slides. Fetal origins of genetic material was confirmed by comparing the HLA alleles of genes of parents and the candidate cells. The proposed approach to the selection of antibodies to specific antigens trophoblasts to ensure effective methods of enrichment, capture and high-performance sorting by flow cytometry, as well as reliable methods of verifying the fetus candidate cell supplies will significantly increase the reliability and universality of noninvasive prenatal diagnosis.

Keywords: non-invasive prenatal diagnosis, trophoblasts, HLA, flow cytometry

Во всех развитых странах активно ведутся исследования по разработке и внедрению методов неинвазивной пренатальной диагностики, с использованием редких плодных клеток из кровотока беременной, находящихся там вследствие их трансплацентарной трансфузии или свободной внеклеточной ДНК (вкДНК) плода [2].

При анализе свободной вкДНК плода в материнской крови, возникает проблема верификации генетической информации плода [10]. Эта проблема решается применением метода массового параллельного секвенирования нового поколения (NGS) с применением сложных алгоритмов биоинформатики, что обуславливает высокую

стоимость данного метода и тормозит его внедрение в акушерскую практику [1].

Другая технология – захват клеток плода, циркулирующих в крови матери, несущих фетальную ДНК, значительно проще в применении [8]. Однако, при данном подходе также стоит задача верификации выделенных из кровотока плодных клеток от материнских, что становится особенно актуальным при недостатке специфических маркеров к антигенам плодового происхождения экспрессированных на захваченных клетках; ДНК из единственной захваченной клетки подвергается полногеномной амплификации, в связи, с чем крайне важным является однозначно верифицировать иссле-

дуюмую клетки-кандидаты на ее плодовое происхождение [7].

Наиболее перспективными для неинвазивной пренатальной диагностики являются клетки трофобласта [5]. Для их выделения из кровотока матери широко используют метод флуоресцентно-активированной сортировки (ФАКС) на проточном цитометре [10]. Несмотря на использование в ходе сортировки моноклональных антител к специфическим антигенам трофобластов необходима дополнительная верификация генетического материала захваченных клеток. Для этого применяют ряд методов, целью которых является поиск у клеток плода признаков отсутствующих у клеток матери. Например, наиболее доступными маркерами в случае вынашивания плода мужского пола является Y-хромосома (выявляют при помощи FISH), наличие у плода Rh-фактора при его отсутствии у матери и другие [4, 6]. Однако, по нашему мнению, эти способы не являются универсальными, а их точность не достаточна, по сравнению с более точным HLA-генотипированием, результаты которого однозначно свидетельствовали о происхождении выделенных клеток-кандидатов.

Поэтому актуальной проблемой являются поиск наиболее надежных способов верификации фетального происхождения клеток-кандидатов для повышения достоверности и универсальности неинвазивной пренатальной диагностики [3].

Цель настоящего исследования заключалась в модификации и улучшении эффективности методов сепарации, сортировки, HLA-генотипирования трофобластов циркулирующих в кровотоке матери для неинвазивной пренатальной диагностики.

Материалы и методы исследования

В ходе исследования были проанализированы образцы периферической крови, полученные у 10 женщин с одноплодной физиологически протекающей беременностью в сроках гестации 8-12 недель. У 8 женщин настоящая беременность была первой, остальные в анамнезе имели беременности с вынашиванием плода мужского пола.

Кровь наслаивали на градиент Histopaque-1077 (плотность 1,077 г/мл) и разделяли образец центрифугированием. Полученный образец мононуклеарных клеток ($\sim 1 \times 10^8$ клеток в 800 мкл) подвергали негативной по CD45 иммуномагнитной сепарации. Обогащенную целевыми клетками (трофобластами) негативную фракцию окрашивали моноклональными антителами anti-HLA-G, меченными аллофикоцианином (APC) и anti-Trop-2 меченными тетраметилродамин-изотиоцианатом (TRITC). Далее на проточном цитометре-сортере «BD FACS AriaIII» (BD Biosciences, США) с использованием сопла диаметром 85 мкм проводили сортировку трофобластов на предметные стекла порывы мембраной с низкой

автофлуоресценцией («MembraneSlide 1.0 PET», Carl Zeiss GmbH, Германия). После сортировки клеток предметное стекло переносили на систему лазерной микродиссекции «PALM® MicroBeam» (Carl Zeiss GmbH, Германия). С одного слайда вырезали и катапультировали в отдельную ПЦР-пробирку до 10 клеток, удовлетворяющих критериям отбора.

Следующий этап включал проведение полногеномной амплификации ДНК из единичных клеток в каждой пробирке при помощи набора реагентов «SurePlex DNA Amplification System» (Illumina, США) и амплификатора T-100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). В ходе полногеномной амплификации получали высокую концентрацию мультикопий нативной ДНК единственной клетки, обеспечивающей достаточную репрезентативность ее генома.

Полученную ДНК клетки после очистки использовали для проведения HLA-генотипирования по локусам (A, B, C, DQB1, DRB1, DPB) на приборе «Luminex 200» (Hologic, Inc., США) с использованием наборов реагентов «LifeCodes HLA Typing Kits». На основании сравнения HLA-генотипов амплифицированной ДНК из клеток-кандидатов с HLA-генотипами ДНК, выделенной из крови родителей, проводили достоверную верификацию фетального происхождения диссектированных клеток-кандидатов.

Средние значения сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Нулевую гипотезу отвергали при $p > 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Используя данный метод были проанализированы 10 образцов периферической крови, полученные у женщин с одноплодной физиологически протекающей беременностью в сроках гестации 8-12 недель.

Среднее число выделенных клеток в 800 мкл образца составило $1,05 \pm 0,12 \times 10^8$ клеток (среднее $\pm$ SE), что соответствовало средней концентрации $\sim 1 \times 10^8$ клеток/мл. После обогащения клетками негативными относительно панлейкоцитарного антигена (CD45) при помощи магнитной сепарации степень истощения во всех образцах превышала 95% ($97,7 \pm 1,34\%$), что соответствовало в негативной фракции $2,71 \pm 0,46$ млн. клеток. В ходе сортировки на предметные стекла среднее число клеток-кандидатов, удовлетворяющих критериям CD45⁻HLA-G⁺anti-TBA⁺ составило $37,6 \pm 5,38$ клеток.

С каждого слайда вырезали по 10 единичных клеток, которые катапультировали в отдельные ПЦР-пробирки для проведения полногеномной амплификации (всего 100 исследований). Полногеномная амплификация позволяла получить количество ДНК в образце, достаточное для последующего анализа HLA-генотипа. Электрофоретический контроль амплификации ДНК во всех пробах был положительным, а средняя концентрация ДНК из диссектированных единичных клеток после очистки составила $47,5 \pm 7,4$ нг/мкл.

Среди 10 клеток-кандидатов, отбираемых с каждого слайда, HLA генотипы из комбинаций родительских аллелей выявляли в $7,4 \pm 1,35$ клетках (74%), что достоверно подтверждало их фетальное происхождение. Остальные клетки ($2,6 \pm 0,76$) имели HLA генотип матери, что свидетельствовало о неспецифическом их захвате в ходе сортировки. Оценка полученных результатов по показателям чувствительности и специфичности составила 100% и 74%, соответственно.

Выводы

Таким образом, среди существующих способов верификации плодных клеток для неинвазивной пренатальной диагностики использованный нами метод является относительно простым, и позволяет однозначно определить плодное происхождение клеток-кандидатов, а также использовать результаты исследования в других целях.

Использование надежных методов верификации принадлежности плоду клеток-кандидатов таких как HLA типирование по 6 локусам (A, B, C, DQB1, DRB1, DPB) 1 и 2 класса гистосовместимости может существенно повысить достоверность и универсальность неинвазивной пренатальной диагностики.

Список литературы

1. Екимова Е.В., Екимов А.Н., Алексеева М.Л. Роль молекулярных методов диагностики в преимплантационном

скрининге эмбрионов (обзор литературы) // Проблемы репродукции. – 2012. – № 6. – С. 56-59.

2. Молекулярно-генетические методы в пренатальной диагностике хромосомных аномалий / Буяновская О.А. и др. // Акушерство и гинекология. – 2012. – № 8, Т. 1 – С. 3–9.

3. Получение и применение динамических стандартных референсных интервалов для анализа результатов сравнительной геномной гибридизации / Миньженкова М.Е. и др // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 10. – С. 1229-1235.

4. 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? / Hatt L and et // Fetal Diagn Ther. – 2014; – 35(3), – P. 218-227.

5. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood / Purwosunu Y. and et // Taiwanese journal of obstetrics & gynecology, – 2006, – 45(1):10-20.

6. Detection of chromosomal aneuploidies in fetal cells isolated from maternal blood using single-chromosome dual-probe FISH analysis / Calabrese G and et // Clin Genet, – 2012, – 82: – P. 131–139.

7. Fetal Cells in Maternal Blood: A Comparison of Methods for Cell Isolation and Identification. / Christensen B and et// Fetal Diagnosis and Therapy, – 2005; – 20, – P 106-112.

8. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges / Allyse M and et // International journal of women's health, – 2015, – 7, – P. 113-126.

9. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y / Nicolaidis K.H. and et // Prenatal Diagnosis. – 2013. –V.33, 6. – P. 575-579.

10. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Donnenberg AD. Rare event detection and analysis in flow cytometry: bone marrow mesenchymal stem cells, breast cancer stem/progenitor cells in malignant effusions, and pericytes in disaggregated adipose tissue. // Methods Mol Biol 2011, – P. 251–273.