

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИХ АНАЛИЗА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

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

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, e-mail: liza_mus@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Эндокринологический научный центр», Москва, e-mail: vitiazeva@yandex.ru

Изоляция и анализ клеток плодной природы, циркулирующих в крови беременных женщин, является заманчивой перспективой безопасного получения информации о генетическом статусе плода. Клетки трофобласта, присутствующие в материнском кровотоке во время беременности, являются потенциальным объектом неинвазивной пренатальной диагностики. В данной работе показана возможность выделения трофобластов из периферической крови и последующего метафазного CGH-анализа генетического материала единичных клеток. Материалом для исследования послужили искусственно созданные (артифициальные) смеси, имитирующие присутствие клеток трофобласта в периферической крови во время беременности. Выделение трофобластов из артифициальных смесей осуществлялось с помощью градиентного центрифугирования в растворах Перколл различной плотности. Клетки трофобласта детектировались с помощью иммуноцитохимического окрашивания с использованием моноклональных антител к цитоплазматическому белку цитокератину 7.

Ключевые слова: трофобласты, градиентное центрифугирование, цитокератин 7, CGH-анализ.

THE ESTIMATION OF POSSIBILITY OF ISOLATION AND ANALYSIS OF TROPHOBLAST CELLS IN THE MODEL EXPERIMENT

Musatova E.V.¹, Markova Z.G.¹, Vityazeva I.I.², Shilova N.V.¹

¹ Federal State Budgetary Institution "Research Centre for Medical Genetics", Moscow, e-mail: liza_mus@mail.ru

² Endocrinology Research Centre, Moscow, e-mail: vitiazeva@yandex.ru

The trophoblast cells in the blood of pregnant women are the potential source of information about genetic status of developing fetus. In model experiment the 29 artificial mixtures were created. The artificial mixtures were prepared by mixing samples of peripheral venous blood of adult with cells' samples of chorionic villus with known karyotype. Trophoblasts were isolated from artificial mixtures by gradient centrifugation on Percoll solutions with different densities. The isolated cell fraction was further depleted of lymphocytes using magnetic activated cell separation with anti-CD45 antibody. Detection of trophoblasts on the microscope slides was carried out by immunocytochemical staining with monoclonal antibodies to the cytoplasmic protein cytokeratin 7 (CK7). For the followed analysis three cells samples were selected. For their preparation was used chorionic cells with karyotypes 46,XX, 46,XY and 47,XX,+13. Isolation of single CK7-positive cells was performed by laser microdissection followed by a whole genome amplification step. Analysis of genetic material isolated CK7-positive cells was performed by comparative genomic hybridization. The profiles of hybridization of the genetic material isolated cells corresponded karyotype chorionic cells that were used for the preparation of respective artificial mixtures. Thus, we concluded that the isolated cells were fetal origin. These results may be used in the experiments with pregnant women' blood samples. But steps of isolation and detection of trophoblast cells should be made consider with very low levels of fetal cells in the maternal blood and possible change of their antigen characteristics.

Keywords: trophoblast cells, gradient centrifugation, cytokeratin 7, CGH-analysis.

Присутствие трофобластов в кровотоке беременных женщин было показано еще в 1893 году [8]. Удивительный феномен не привлекал внимания исследователей до второй половины прошлого века, когда в медицине сформировалась необходимость диагностики наследственных заболеваний еще до рождения ребенка. В любом случае для осуществления

пренатальной диагностики требуется наличие ткани плода, получаемой при проведении инвазивной процедуры (биопсия ворсин хориона, амниоцентез, кордоцентез), сопряженной с определенным риском прерывания беременности [9]. Альтернативным вариантом получения информации о генетическом статусе развивающегося плода является исследование циркулирующих в крови беременных женщин клеток плодной природы (лейкоциты, эритробласты, трофобласты), поскольку забор образца периферической венозной крови матери не несет угрозы прерывания беременности [3].

Было показано, что в 1 мл крови беременной женщины содержится 1–6 клеток плода, и большая часть этих клеток имеет трофобластную природу [4,5]. Крайне низкое содержание плодных клеток в материнском кровотоке является причиной нелегкого поиска оптимального способа выделения клеток плода из образца материнской крови. Одним из способов «обогащения» исследуемого образца клетками плодной природы является градиентное центрифугирование [2].

Цель исследования

Целью данного исследования явилась оценка возможности анализа генетического материала трофобластов, выделенных из периферической крови с помощью градиентного центрифугирования, в рамках проведения модельного эксперимента.

Материалы и методы исследования

Материалами для данного исследования послужили 29 образцов искусственно созданных (артифициальных) смесей. Артифициальные смеси получали путем добавления 0,5 мл клеточной суспензии ворсин хориона, полученных из абортного материала замерших беременностей, к 1 мл гепаринизированной периферической венозной крови взрослых индивидуумов с нормальным кариотипом. Таким образом, создавалась имитация состава крови беременной женщины, содержащей клетки трофобласта. Кариотипы каждого образца клеток хориона и периферической крови были известны и установлены при проведении стандартного цитогенетического исследования.

Выделение клеток трофобласта из артифициальной смеси осуществлялось с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте растворов Перколл (GEHealthcareBio-Science, Швеция) различной плотности (рисунок 1). Кроме того, в работе был использован второй вариант ступенчатого градиента, для приготовления которого применяли растворы Перколл с плотностями 1,077 и 1,066 г/мл в объеме 1 мл каждый. Для 22 образцов артифициальных смесей после градиентного центрифугирования использовали этап магнитно-активированной клеточной сортировки (МАКС) с моноклональными антителами (МКАТ) к панлейкоцитарному антигену CD45 (MiltenyiBiotec, Германия). Полученные фракции клеток наносились на покрытые полимерной PEN-мембраной предметные стекла (CarlZeiss,

Германия) в виде клеточного монослоя в ходе цитоцентрифугирования с последующей фиксацией клеток в смеси метанола и ацетона 1:1.

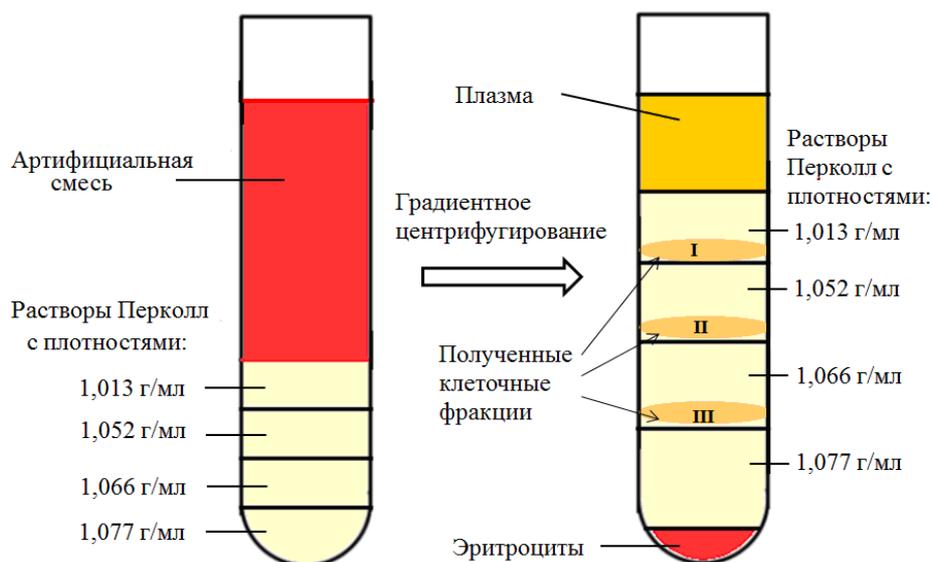


Рис.1. Схематическое изображение формирования градиента плотности растворов Перколл и клеточных фракций, полученных в результате центрифугирования

Детекция клеток цитотрофобласта на полученных цитологических препаратах проводилась посредством иммуноцитохимического окрашивания мечеными щелочной фосфатазой МКАТ к цитоплазматическому белку цитокератину 7 (СК7) с использованием набора EnVision+ System-HRP (Dako, Дания). Единичные СК7-положительные клетки изолировались с цитологических препаратов с помощью системы лазерной микродиссекции CarlZeissPALMMicroBeam (CarlZeiss, Германия). Диссектированный материал собирался в пробирки-коллекторы объемом 0,5 мл, непосредственно в которых далее проводился этап полногеномной амплификации генетического материала единичных клеток с использованием набора WGA4-50RXNGenomePlexSingleCellWholeGenomeAmplificationKit (SIGMA-ALDRICH, США). Анализ генетического материала полученных клеточных образцов проводили методом метафазной сравнительной геномной гибридизации (CGH) [1]. Анализ изображения производился с помощью программы «LUCIACGH», установленной в комплексе с эпифлюоресцентным микроскопом «eclipse 90i» (Nikon, Япония) и CCD камерой «ProgResMF» (JENOPTIK, Германия).

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе работы был произведен поиск оптимальных значений плотностей растворов Перколл для выделения трофобластов из 7 образцов искусственных смесей. Основываясь на данных, полученных Manoussaka с соавторами [6], для формирования

ступенчатого градиента было выбрано четыре значения плотности растворов Перколл- 1,013 г/мл, 1,052 г/мл, 1,066 г/мл и 1,077 г/мл, на границах которых могут сепарироваться клетки с различным удельным весом (рисунок 1).

Трофобласты являются клетками эпителиальной природы, в которых экспрессируются цитокератины – семейство цитоплазматических белков промежуточных филаментов эпителиальных клеток. В частности, цитокератин 7 (СК7) присутствует как в цитоплазме клеток нормального и неопластического железистого и переходного эпителия [7], так и в цитоплазме трофобластов [6]. Поэтому для детекции клеток трофобласта в полученных после градиентного центрифугирования фракциях использовали МКАТ к СК7.

При микроскопическом исследовании цитологических препаратов после иммуноцитохимического окрашивания было выявлено, что клеточные фракции, полученные на границах растворов Перколл с плотностями 1,013/1,052 г/мл (клеточная фракция I) и 1,052/1,066 г/мл (клеточная фракция II), содержали СК7–положительные клетки, тогда как в клеточной фракции ШСК7 – положительные клетки отсутствовали. Кроме того, было обнаружено, что в клеточной фракции II наблюдалось большее количество СК7-положительных клеток по сравнению с фракцией I. Но при этом во фракции II было отмечено и наличие большого числа лейкоцитов, что затрудняло визуализацию и дальнейший анализ клеток интереса. В связи с этим было принято решение об объединении выделяемых трофобластных клеток в одной клеточной фракции и последующей отрицательной сортировке лейкоцитов.

Для формирования ступенчатого градиента в 22 образцах искусственной смеси использовали растворы Перколл с плотностями 1,066 и 1,077 г/мл. Мы предположили, что СК7 – положительные клетки должны максимально сконцентрироваться в клеточной фракции на границе плазмы и раствора Перколл с плотностью 1,066 г/мл, тогда как клеточная фракция на границе растворов Перколл с плотностями 1,066 и 1,077 г/мл не должна содержать СК7-положительных клеток, как было показано ранее. После градиентного центрифугирования клеточная фракция, отобранная на границе плазмы и раствора Перколл плотностью 1,066 г/мл, подвергалась отрицательной МАКС с использованием МКАТ к панлейкоцитарному антигену CD45. В результате удалось значительно сократить число лейкоцитов и получить преимущественно отдельно лежащие трофобласты, что обеспечило удобство не только их микроскопии, но и последующей микродиссекции. После иммуноцитохимического окрашивания цитологических препаратов, полученных из каждой клеточной фракции, было подтверждено наличие СК7-положительных клеток в клеточной фракции, образованной на границе плазмы и раствора

Перколл с плотностью 1,066 г/мл. Клеточная фракция на границе растворов Перколл с плотностями 1,066 г/мл и 1,077 г/мл трофобластов не содержала (рисунок 2).

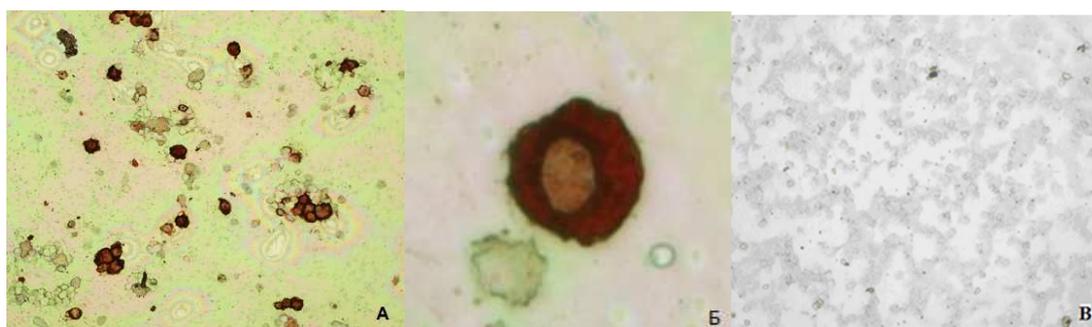


Рис.2. Фотографии цитологических препаратов, полученных после градиентного центрифугирования и окрашенных с помощью антител к цитокератину 7. А: клеточная фракция, отобранная на границе плазмы и раствора Перколл с плотностью 1,066г/мл, 100х увеличение. Б: цитотрофобласт, 400х увеличение. В: клеточная фракция, отобранная на границе растворов Перколл с плотностями 1,066 г/мл и 1,077 г/мл, отсутствие в ней цитокератин 7-положительных клеток, 100х увеличение

Таким образом, было показано, что обогащение искусственной смеси трофобластами возможно путем центрифугирования с использованием ступенчатого градиента плотности растворов Перколл. Применение растворов Перколл с плотностями 1,066 и 1,077 г/мл позволило получить одну клеточную фракцию, содержащую трофобласты, и при этом избавиться от более тяжелых клеток стромы ворсин хориона. Большое число лейкоцитов, содержащихся в клеточной фракции интереса, было успешно удалено из образца при помощи отрицательной МАКС.

Для проведения лазерной микродиссекции и последующего анализа генетического материала единичных клеток были выбраны цитологические препараты, содержащие трофобласты плода с нормальным мужским кариотипом (46,XY), плода с нормальным женским кариотипом (46,XX) и плода женского пола с трисомией по 13 хромосоме (47,XX,+13). В результате проведенной полногеномной амплификации диссектированных единичных СК7-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 в образцах амплифицированной геномной ДНК, полученной из одной диссектированной клетки. Анализ полученных профилей гибридизации показал, что виртуальный кариотип клеток во всех трех случаях соответствовал результатам стандартного цитогенетического исследования (рисунок 3). На основании приведенных выше данных можно утверждать, что выделенные из искусственной смеси СК7-положительные клетки являются плодными по происхождению.

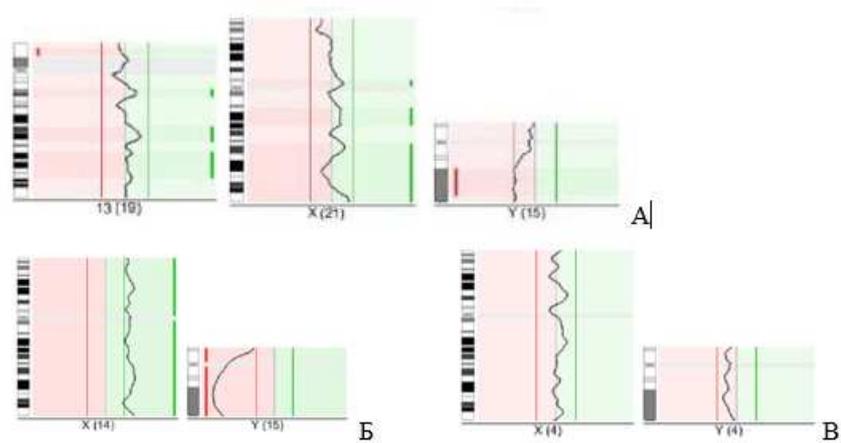


Рис.3. Результаты сравнительной геномной гибридизации генетического материала одной клетки, изолированной из искусственной смеси, содержащей трофобласты плода: А – женского пола с трисомией по 13 хромосоме; Б – с нормальным женским кариотипом; В – с нормальным мужским кариотипом (представлены профили гибридизации половых хромосом (А, Б,В) и хромосомы 13 (А))

Заключение

С помощью метода градиентного центрифугирования удалось «обогатить» исследуемый образец плодными клетками. Последующее применение МАКС с панлейкоцитарными МКАТ к CD45 позволило удалить из исследуемой клеточной фракции лейкоциты, затруднявшие изоляцию единичных клеток для их последующего анализа. Таким образом, в условиях модельного эксперимента удалось исследовать молекулярный кариотип выделенных из искусственных смесей СК7-положительных клеток и сделать вывод об их плодном происхождении. Успешное выполнение всех этапов модельного эксперимента является основой для продолжения работы по выделению и анализу трофобластов из образцов нативной крови беременных женщин. Однако этапы выделения, детекции и анализа единичных трофобластов в рамках экспериментов с кровью беременных женщин должны выполняться с учетом крайне низкого содержания плодных клеток в образце и возможного изменения их антигенных характеристик.

Список литературы

1. Миньженкова М.Е., Шилова Н.В., Маркова Ж.Г., Антоненко В.Г., Лебедев И.Н., Козлова Ю.О., Землякова В.В., Золотухина Т.В. Получение и применение динамических стандартных референсных интервалов для анализа результатов сравнительной геномной гибридизации // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 10. – С.1229-1235.
2. Шилова Н.В. Исследование клеток плода в крови матери: новый неинвазивный подход в пренатальной диагностике: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М.,1999. – 26 с.

3. Fiddler M. Fetal Cell Based Prenatal Diagnosis: Perspectives on the Present and Future // J Clin Med. – 2014. – Vol.3(3). – P. 972-85.
4. Kølvrå 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.
5. Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, Bronsard M, Masse J, Forest JC, Drouin R. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques // Clin. Genet. – 2001. – Vol. 60(2). – P. 145-150.
6. Manoussaka MS, Jackson DJ, Lock RJ, Sooranna SR, Kumpel BM. Flow cytometric characterisation of cells of differing densities isolated from human term placentae and enrichment of villous trophoblast cells // Placenta. – 2005. – Vol.26 (4). – P. 308-318.
7. Ramaekers F, van Niekerk C, Poels L, Schaafsma E, Huijsmans A, Robben H, Schaart G, Vooijs P. Use of monoclonal antibodies to keratin 7 in the differential diagnosis of adenocarcinomas // Am J Pathol. – 1990. – Vol. 136 (3). – P. 641-55.
8. Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Puerperal-Eklampsie // Vogel. – 1893.
9. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques // Fetal Diagn Ther. – 2010. – Vol. 27 (1). – P. 1-7

Рецензенты:

Зинченко Р.А., д.м.н., профессор, заведующая лабораторией генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ», г. Москва;

Костюк С.В., д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной биологии ФГБНУ «МГНЦ», г. Москва.