

УДК 576.3:[57.086.862+57.088.1]

UDC576.3:[57.086.862+57.088.1]

14.00.00 Медицинские науки

Medical sciences

**ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК ПЛОДА,  
ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ МАТЕРИ,  
ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ ПРЕНАТАЛЬНОЙ  
ДИАГНОСТИКИ**

**SELECTION OF FETAL CELLS CIRCULATING  
IN MATERNAL BLOOD FOR NONINVASIVE  
PRENATAL DIAGNOSIS**

Гудков Георгий Владимирович  
д.м.н., профессор

Gudkov Georgy Vladimirovich  
Dr.Sci.Med., professor

Филиппов Евгений Федорович  
д.м.н., профессор  
*Кубанский государственный медицинский  
университет, кафедра клинической иммунологии,  
аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и  
ППС, Краснодар, Россия*

Filippov Evgeny Fedorovich  
Dr.Sci.Med., professor  
*Kuban state medical University, Department of clinical  
immunology, Allergology and laboratory diagnostics,  
Krasnodar, Russia*

Крутенко Дмитрий Викторович  
к.б.н.  
*Лаборатория клеточных и репродуктивных  
технологий МБУЗ «Детская городская  
клиническая больница №1»*

Krutenko Dmitry Viktorovich  
Cand.Biol.Sci.  
*Laboratory of cellular reproductive technologies of  
"Children's city clinical hospital №1", Krasnodar,  
Russia*

Клетки трофобласта, циркулирующие в крови матери, могут служить потенциальными источниками генетической информации для реализации в акушерской практике скрининговых подходов к неинвазивной пренатальной диагностике. Материалом для исследования служила стабилизированная гепарином цельная кровь беременных в сроках гестации 8-12 недель в объеме 10 мл. Обогащение выполняли методом градиентного центрифугирования и магнитной сепарации (CD45<sup>-</sup>) с флуоресцентным окрашиванием негативной фракции мечеными антителами к антигенам трофобластов (HLA-G и Trop-2) для проведения проточной цитометрии и сортировки клеток на предметные стекла. Единичные клетки-кандидаты при помощи лазерной микродиссекции переносили в пробирки для последующей полногеномной амплификации, обеспечивающей достаточную репрезентативность их генома. Фетальное происхождение генетического материала подтверждали сопоставлением аллелей HLA генов родителей и клеток-кандидатов. Это позволило существенно повысить достоверность и универсальность неинвазивной пренатальной диагностики с использованием сравнительной геномной гибридизации на чипах (aCGH)

Trophoblast cells circulating in maternal blood may serve as potential sources of genetic information for screening in obstetric practice approaches to noninvasive prenatal diagnosis. The material for the study was whole blood of pregnant women of gestational ages of 8-12 weeks in a volume of 10 ml. stabilized with heparin. Enrichment was performed by the method of gradient centrifugation and magnetic separation (CD45<sup>-</sup>) with fluorescent staining negative fractions labeled with antibodies to antigens of trophoblasts (HLA-G, and Trop-2) to conduct flow cytometry and sorting of cells on glass slides. Single cell candidates using laser micro dissection were transferred into a vial for subsequent whole-genome amplification, providing sufficient representativeness of their genome. Fetal origin of the genetic material was confirmed by comparison of alleles of the HLA genes of the parents and cells candidates. It is possible to improve significantly the accuracy and versatility of non-invasive prenatal diagnosis using comparative genomic hybridization using chips (aCGH)

Ключевые слова: НЕИНВАЗИВНАЯ  
ПРЕНАТАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА,  
ТРОФОБЛАСТЫ, ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ,  
HLA-G, TROP-2, aCGH-АНАЛИЗ

Keywords: NON-INVASIVE PRENATAL  
DIAGNOSIS, TROPHOBLASTS, FLOW  
CYTOMETRY, HLA-G, TROP-2, ACGH  
ANALYSIS

Несмотря на значительный технический прогресс в области пренатальной диагностики (ПД), все инвазивные процедуры остаются связанными с определенным риском прерывания беременности (от 2% до 10%). По этой причине проведение инвазивных процедур не может быть рекомендовано для широкого скрининга и должно быть серьезно мотивировано [1].

«Неинвазивные» подходы к ПД связаны с исследованием фетальных клеток, а также ДНК или РНК плода, находящихся в периферической крови беременной вследствие их трансплацентарной трансфузии [2, 3]. Методы, в основу которых положены технологии анализа свободной внеклеточной ДНК (вкДНК) плода в материнской крови, сталкиваются с очевидной проблемой – как отличить генетическую информацию плода от генетической информации матери [4]. Несмотря на то, что в I-II триместрах на долю вкДНК плода приходится почти 5-10% от всей свободной ДНК плазмы, эффективно решить проблему разделения генетической информации матери и плода возможно только с применением массового параллельного секвенирования нового поколения (NGS) [5]. Секвенирование большого количества фрагментов ДНК с последующим применением сложных алгоритмов биоинформатики позволяет разделить обширный геномный материал матери и ребенка. Метод диагностики на основе секвенирования вкДНК показал впечатляющие результаты и даже включен в стандартные протоколы ряда стран (США, Китай, Дания, Швеция и др.). Тем не менее, высокая стоимость анализа и сложность технологии до сих пор остаются главными препятствиями для широкого внедрения в акушерскую практику, особенно в качестве скрининговых обследований [6, 7].

В отличие от предыдущего метода наиболее простой доступ к фетальной ДНК могут обеспечить технологии захвата клеток плода, циркулирующих в крови матери [8]. В этом случае практически нет

контаминации материнской ДНК, что выгодно отличает этот метод, так как отпадает необходимость обширного секвенирования для разделения геномов матери и плода. Однако, главной проблемой при реализации данного подхода является экстремально низкая концентрация клеток плода в крови матери (несколько клеток в 1 мл материнской крови), а также отсутствие специфических маркеров к их антигенам, необходимых для захвата и детекции [9].

В настоящее время уже достоверно установлено, что в крови беременных присутствуют как клетки трофобласта, так и все клетки крови плода красного (эритробласты) и белого ряда (лейкоциты). Все эти типы ядродержащих клеток могут быть потенциальными источниками фетальной ДНК и клетками-кандидатами для пренатального генетического скрининга [10].

В литературе уже сообщается об успешной неинвазивной пренатальной диагностике (НПД) хромосомных анеуплоидий при анализе клеток плода, захваченных разными способами из крови матери с последующим генетическим анализом методами гибридизации *in situ* – FISH, сравнительной геномной гибридизации на чипах (Array Comparative Genomic Hybridization – aCGH), полимеразной цепной реакции (ПЦР) и других [11, 12].

Обобщая этот опыт можно заключить, что главные трудности в получении надежных и воспроизводимых результатов генетического исследования лежат как в выборе наиболее подходящих типов фетальных клеток, так и оптимальных способов их обогащения, детекции, захвата, применения технологий микроманипуляций с клетками [13, 14]. До сих пор актуальными остаются вопросы, присутствуют ли различные типы фетальных клеток в материнской крови в значимых количествах и имеют ли они достаточно специфические клеточные маркеры, отличающие их от

материнских клеток, чтобы обеспечить надежный и клинически реализуемый способ НПД.

Для выделения фетальных клеток наиболее распространены два метода клеточной сортировки: флуоресцентно-активированная (ФАКС) и магнитно-активированная (МАКС) [15]. В настоящее время реализация ФАКС с применением современных проточных цитометров-сортеров позволяет эффективно решать проблему высокопроизводительной сортировки редких клеток, что делает этот метод наиболее привлекательным [16].

В качестве клеток-кандидатов для НПД нами были выбраны трофобласты. Несмотря на то, что частота хромосомного мозаицизма в них может достигать 1%, что несколько снижает точность генетической диагностики, трофобласты имеют ряд преимуществ по сравнению с другими клетками фетального происхождения для реализации скрининговых подходов в НПД [17]. Поэтому актуальными задачами являются: поиск наиболее специфических маркеров к антигенам трофобластов, разработка эффективных методов их обогащения и сортировки, надежных способов верификации фетального происхождения клеток-кандидатов для повышения достоверности и универсальности НПД с использованием технологии aCGH [18, 19].

**Цель** настоящего исследования заключалась в оптимизации технологий выделения трофобластов, циркулирующих в крови матери, для неинвазивной перинатальной диагностики хромосомных аномалий методом сравнительной геномной гибридизации.

### **Материалы и методы**

Нами были проанализированы образцы периферической крови, полученные от 10 женщин с одноплодной физиологически протекающей беременностью в сроках гестации 8-12 недель. Средний возраст

обследованных беременных составил 26 лет (от 21 до 38 лет). У 8 женщин настоящая беременность была первой, остальные в анамнезе имели беременности с вынашиванием плода мужского пола.

Пол плода устанавливали в ходе ультразвукового исследования, а также ретроспективно после рождения. Гестационный срок рассчитывали по дню последней менструации и подтверждали результатами ультразвукового исследования. У девяти обследованных женщин беременность протекала без осложнений, у плодов и впоследствии у новорожденных отсутствовали какие-либо структурные или хромосомные аномалии. У одной женщины на 11 неделе гестации произошло прерывание беременности.

Периферическую гепаринизированную венозную кровь беременных в объеме 10 мл обрабатывали не позднее 6 часов после забора (хранение при комнатной температуре). Использовали только полипропиленовые и/или силиконизированные пробирки. Весь пластик, контактирующий с образцом, предварительно обрабатывали покрывающим буфером – 2% бычий сывороточный альбумин (БСА) в 0,01М фосфатно-солевом буфере (ФСБ) без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . Разбавленную в ФСБ 1:1 цельную гепаринизированную кровь наслаивали на градиент Histopaque-1119 (плотность 1.119 г/мл) в 50 мл пробирку (15 мл градиента на 30 мл разведенной крови). После центрифугирования при  $800\times g$  в течение 30 минут при комнатной температуре кольцо ядерных мононуклеарных клеток на границе раздела фаз (градиент-плазма) переносили в отдельную 15 мл пробирку и дважды отмывали в МАКС-буфере (0,5% БСА в ФСБ с 2 мМ ЭДТА), центрифугируя на каждом этапе при  $250\times g$  в течение 10 мин при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Для достижения необходимой концентрации ядерных клеток в конечном объеме МАКС-буфера (800 мкл) использовали цитометр Tali® Image Cytometer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Полученный образец мононуклеарных клеток ( $\sim 1 \times 10^8$  клеток в 800 мкл) подвергали иммуномагнитной сепарации на приборе MidiMACS™ Separator (#130-042-302, «Miltenyi Biotec», Германия). Процедуру выполняли с применением набора реагентов "CD45 MicroBeads, Human" (#130-045-801), специальных колонок с ферромагнитным матриксом ("LS-columns", #130-042-401) и сильного магнита, согласно инструкции производителя. Непосредственно к отмытой взвеси ядерных клеток добавляли 200 мкл суспензии парамагнитные частицы MicroBeads меченных против панлейкоцитарного антигена CD45 (конечный объем 1000 мкл). Клетки, не связавшие MicroBeads (негативные по CD45), удаляли промыванием колонки МАКС-буфером как негативную фракцию, которую подвергали дальнейшему исследованию.

Негативную фракцию клеток однократно отмывали в окрашивающем буфере ("Stain Buffer, FBS", #554656, BD Biosciences, США), ресуспендируя клеточный осадок в остатках буфера ( $\sim 100$  мкл). Для предотвращения неспецифического связывания с Fc-рецепторами к взвеси клеток перед окрашиванием добавляли 5 мкл Purified NA/LE Human BD Fc Block™ (#564765, "BD Biosciences", США) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Специфическое окрашивание антигенов трофобластов проводили моноклональными антителами против HLA-G, меченными аллофикоцианином ("APC anti-human HLA-G", BioLegend Inc., США) – 5 мкл и против трофобластического антигена, меченными тетраметилродамин-изотиоцианатом ("TRITC Anti-TBA detecting antibody", Abnova Corporation, КНР) – 5 мкл. Для контроля степени чистоты негативной иммуномагнитной сепарации добавляли антитела против CD45, меченные BV510 (#563204, "BD Biosciences", США) – 2 мкл. При гейтировании популяций мертвые клетки исключали окрашиванием витальным ядерным красителем 7-амино-актиномицином D

("7-AAD", #559925, BD Biosciences, США), а также использовали соответствующие изотипические контроли.

Анализ клеточных популяций и сортировку трофобластов выполняли на проточном цитометре-сортере «BD FACS AriaIII» (BD Biosciences, США) с использованием четырех лазеров (405, 488, 561 и 633 нм) при размере сопла 85 мкм. Трофобласты сортировали на предметные стекла для лазерной микродиссекции, покрытые специальной мембраной с низкой автофлуоресценцией ("MembraneSlide 1.0 PET", # 415190-9051-000, Carl Zeiss GmbH, Германия).

После сортировки клеток, подсушенное в темноте при комнатной температуре предметное стекло переносили на систему лазерной микродиссекции "PALM® MicroBeam" (Carl Zeiss GmbH, Германия), имеющей необходимые рефлекторные кубики (оранжевый и красный) для флуоресцентной микроскопии. При поиске клеток-кандидатов критериями отбора были: наличие флюоресценции клеточной поверхности в оранжевом (TRITC) и красном (APC) диапазонах при ее отсутствии в зеленом диапазоне (BV510). Фрагменты мембраны с отмеченными клетками-кандидатами вырезали ультрафиолетовым лазером в проходящем свете с использованием 5× или 20× объективов и катапультировали на крышку ПЦР-пробирки объемом 200 мкл с 0.1% поливинилового буферной средой (50 мкл). С одного слайда вырезали и катапультировали до 10 клеток, удовлетворяющих критериям отбора – каждый фрагмент мембраны с клеткой в отдельную ПЦР-пробирку. Нахождение вырезанного фрагмента мембраны с клеткой на дне ПЦР-пробирки подтверждали визуальным наблюдением в стереомикроскопе.

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.

Амплифицированную ДНК из фетальных клеток (трофобластов) использовали для последующей НПД хромосомных аномалий методом aCGH. Исследование проводили по протоколу "24sure Single Channel" (Illumina, США) с применением чипов "24sure V3 Pack". Анализ результатов выполняли при помощи сканера чипов "GenePix 4400A" (Molecular Devices, США) и программного обеспечения "BlueFuse Multi v4.2" (Illumina, США).

Для статистической обработки результатов исследования использовали пакет прикладных программ STATISTICA<sup>®</sup> for Windows Release 8.0 (Stat Soft<sup>®</sup> Inc., США). Средние значения сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Нулевую гипотезу отвергали при  $p > 0,05$ .

## **Результаты**

Центрифугирование в градиенте плотности 1,119 г/мл позволяло максимально отбирать все ядродержащие клетки – мононуклеары и гранулоциты, из 10 мл цельной крови беременных, максимально оставляя их жизнеспособными (доля мертвых клеток менее 0,5%). Несмотря на то, что эритроциты по плотности легче градиента, в его присутствии они агрегируют и в ходе центрифугирования осаждаются под градиент. Плазму



и слой ядродержащих клеток на границе раздела фаз собирали в отдельную пробирку и отмывали, центрифугируя при низких значениях ускорения (менее  $200\times g$ ), чтобы максимально уменьшить примесь тромбоцитов. В отличие от традиционного выделения с использованием градиента плотностью  $1,077$  г/мл, данный способ обеспечивал максимально возможный выход всех ядродержащих клеток крови и минимизировал потери редких популяций клеток на этапе пробоподготовки. Среднее число выделенных клеток в  $800$  мкл буфера составило  $1,05\pm 0,12\times 10^8$  клеток (среднее  $\pm SE$ ), что соответствовало средней концентрации  $\sim 1\times 10^8$  клеток/мл.

Обогащение клетками негативными относительно панлейкоцитарного антигена проводили в магнитном сепараторе путем истощения исходной популяции парамагнитными частицами, мечеными антителами против CD45. По результатам контрольной цитометрии с использованием моноклональных антител против CD45, меченных BV510 степень истощения во всех образцах превышала  $95\%$  ( $97,7\pm 1,34\%$ ), что соответствовало в негативной фракции  $2,71\pm 0,46$  млн. клеток (рис. 1).

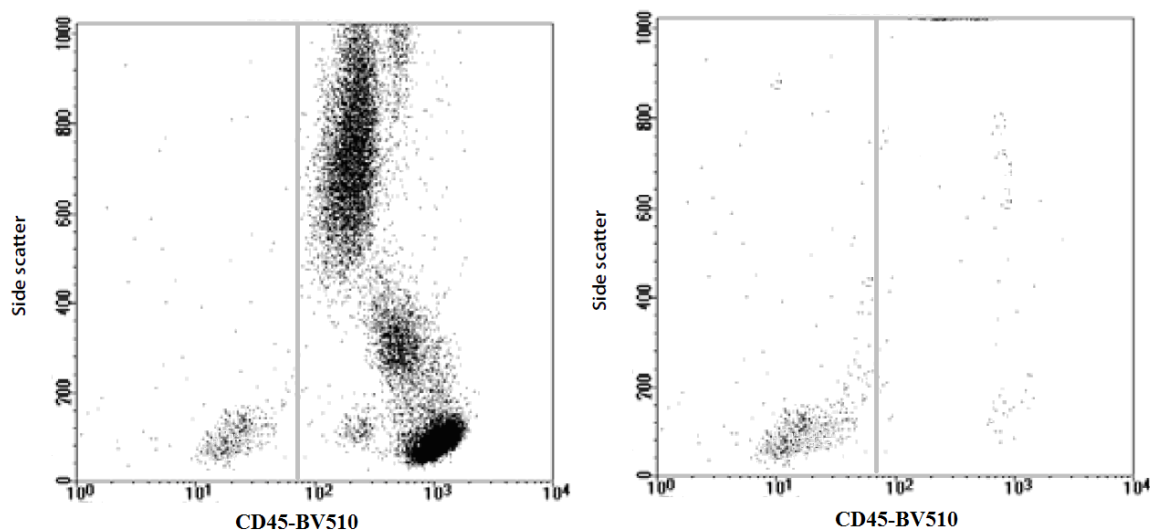


Рис. 1. На графиках бокового рассеяния (Side Scatter) против CD45-FITC показан пример результатов цитометрии исходной популяции клеток

(слева), выделенной с использованием градиента плотностью и негативной фракции клеток (справа), полученной после иммуномагнитной сепарации (на обоих графиках число событий в негативном по CD45 гейте – 5 тыс.).

Негативную фракцию, в составе которой потенциально содержалась целевая популяция клеток-кандидатов, подвергали специфическому иммуно-окрашиванию для выявления трофобластов с последующей их цитометрией и сортировкой на предметные стекла.

По скатерограммам прямого и бокового светорассеяния из анализа исключали фрагменты разрушенных клеток (дебрис), проводили дискриминацию дублетов и агрегатов клеток, а также исключали мертвые клетки по гистограмме красного канала (7-AAD). При составлении стратегии гейтирования в области негативной по панлейкоцитарному маркеру (CD45-BV510) выделяли двойную позитивную популяцию клеток-кандидатов (HLA-G<sup>+</sup>anti-TBA<sup>+</sup>), которая являлась объектом для сортировки (рис. 2).

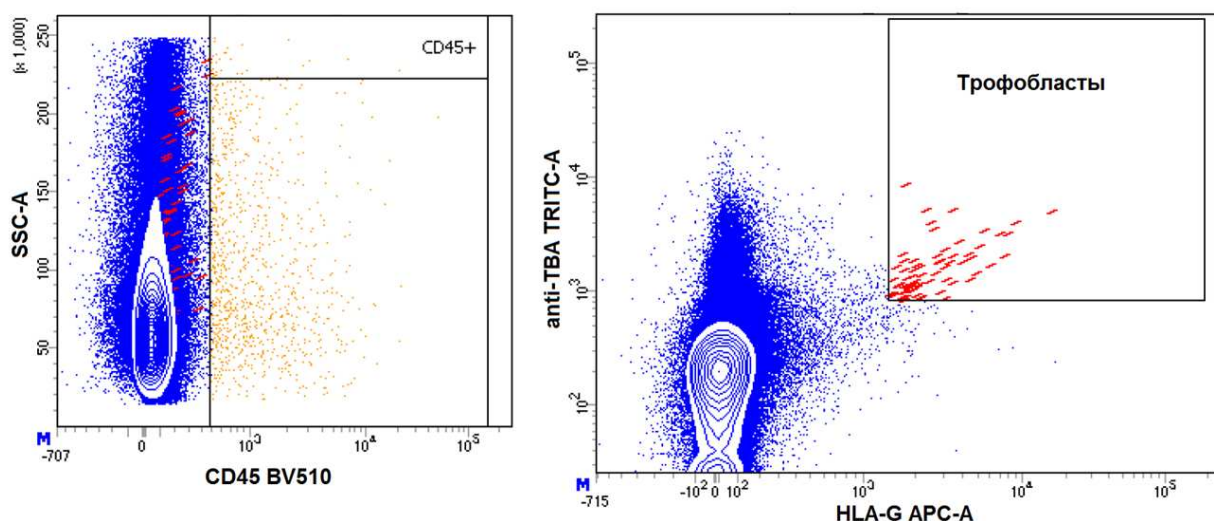


Рис. 2. Пример выделения зоны трофобластов (HLA-G<sup>+</sup>anti-TBA<sup>+</sup>) внутри области негативной по CD45 для проведения сортировки на предметные стекла

Сортировку проводили согласно рекомендациям производителя с заданными параметрами (диаметр сопла – 85 мкм, маска чистоты – "Single Cell Precision", в камере сбора клеток – устройство для сортировки на предметные стекла) до полного расходования пробы, что соответствовало индивидуальным колебаниям общего числа событий от 853 тыс. до 1,38 млн. Среднее число клеток-кандидатов, удовлетворяющих критериям CD45<sup>-</sup>HLA-G<sup>+</sup>anti-TBA<sup>+</sup>, отсортированных на предметные стекла с каждой пробы, составило 37,6±5,38 клеток.

Клетки-кандидаты, отсортированные на мембрану предметного стекла имели флуоресценцию в оранжевом (TRITC) и красном (APC) спектре, что позволяло проводить визуальный контроль клеток, отбираемых для лазерной микродиссекции. Согласно техники лазерной микродиссекции, вырезание фрагмента мембраны с индивидуальной клеткой выполняли бесконтактно при помощи сфокусированного УФ-лазерного луча (длина волны 350 нм). Катапультирование вырезанного фрагмента в пробирку достигалось при помощи расфокусированного лазерного импульса длительностью 3 наносекунды.

С одного слайда вырезали по 10 единичных клеток, каждую из которых катапультировали в отдельную ПЦР-пробирку, в которой проводили полногеномную амплификацию (всего 100 исследований). Электрофоретический контроль амплификации ДНК во всех пробах был положительным, а средняя концентрация ДНК из диссектированных единичных клеток после очистки составила 47,5±7,4 нг/мкл. Полногеномная амплификация была важным этапом, благодаря которому получали многократное увеличение количества ДНК в образце, достаточное для последующего анализа HLA-генотипа и проведения НПД методом aCGH.

Среди 10 диссектированных 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.

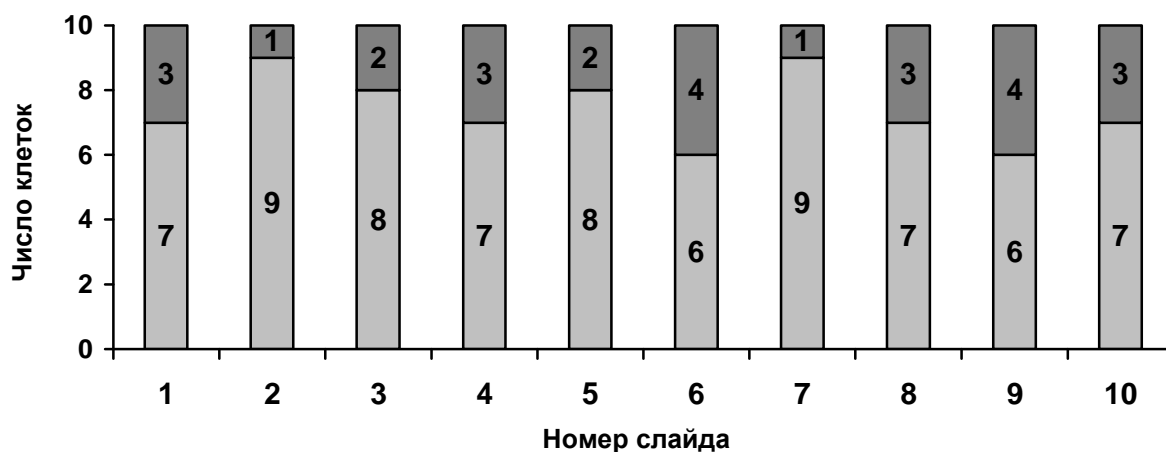


Рис. 3. Число диссектированных клеток-кандидатов (по 10 с каждого слайда), демонстрирующих либо комбинацию HLA-аллелей родителей (светлые), либо только HLA-генотип матери (темные)

Для дальнейшего исследования методом aCGH отбирали по одной пробе амплифицированной ДНК с каждого слайда, полученной из одной клетки фетального происхождения, верифицированной по HLA-генотипу. Основные этапы протокола aCGH включали дифференциальное флуоресцентное мечение геномной ДНК образца и референс-контроля с последующей гибридизацией их на чипе с пресинтезированными на нем фрагментами ДНК-матриц в количестве, достаточном для репрезентативного представления всего генома (3000 матриц-олигонуклеотидов на чип к репрезентативным последовательностям всех

хромосом). В дальнейшем микрочип сканировали и изображения обрабатывали специальным программным обеспечением. Высокое разрешение чипа позволило провести полногеномную идентификацию несбалансированных хромосомных aberrаций, включая анеуплоидии, делеции и дупликации.

Анализ результатов aCGH выявил в 6 пробах из 10 наличие Y-хромосомы, что указывало на мужской пол эмбрионов. Кроме того, в пробе одной из беременных выявили полное отсутствие 18-й хромосомы. Это могло стать основной причиной спонтанного прерывания этой беременности на 11 неделе гестации. Результаты кариотипирования биоматериала абортуса полностью подтвердили отсутствие у эмбриона 18-й хромосомы.

### **Обсуждение**

Настоящее исследование убедительно продемонстрировало, что выделение редких циркулирующих фетальных клеток (трофобластов) из крови матери для получения доступа к геному эмбриона является одной из перспективных стратегий НПД. Несмотря на крайне низкое число этих клеток в кровотоке матери (несколько клеток в 1 мл материнской крови), развитие технологий микроманипуляций с клетками существенно упрощает и удешевляет НПД.

Фетальные клетки могут быть представлены в материнском кровотоке различными типами, и все они в разной степени могут рассматриваться как потенциальный источник фетальной ДНК для перинатального генетического скрининга. Например, фетальные лейкоциты непосредственно принадлежат эмбриону, однако они могут сохраниться от предыдущих беременностей, поэтому у женщины, имевшей хоть одну беременность, остается химерное состояние на всю оставшуюся жизнь, что может привести к ложной диагностике. В ряде исследований

были обнаружены Y-специфические последовательности при ПЦР или FISH-анализах этих клеток в крови женщин, беременных плодом женского пола [21]. Другой их недостаток – отсутствие уникальных моноклональных антител к антигенам лейкоцитов плода, способных отличить их от лейкоцитов матери.

Эритробласты плода относятся к одной из первых клеточных линий, образующихся в процессе развития эмбриона, которые могут быть захвачены из крови матери уже в первом триместре. Переход их в кровотоки матери преобладает над другими клеточными линиями эмбриона, включая лейкоциты и трофобласты. Эритробласты имеют короткий период полужизни и ограниченную способность к пролиферации, что делает маловероятным сохранение их от предыдущих беременностей. Эти характеристики делают эритробласты особенно подходящими для неинвазивной ПД. Эритробласты плода из-за сходного удельного веса сепарируются вместе с мононуклеарными клетками крови матери. По данным разных авторов, конечная концентрация захваченных эритробластов из крови матери значительно варьирует: из 16 мл цельной материнской крови можно изолировать от 0 до 91 эритробласта плода [9, 10].

Однако, несмотря на всю привлекательность использования эритробластов в качестве клеток-кандидатов для ПД, они имеют ряд недостатков: это относительно хрупкие клетки; инициация в них процессов апоптоза может исказить результаты генетического анализа; необходима дифференциация от материнских эритробластов, число которых возрастает во время беременности. В отличие от лейкоцитов, эритробласты плода возможно более эффективно дифференцировать от материнских клеток по сочетанию маркеров клеточной поверхности (рецептор трансферрина и гликофорина) и цитоплазматическим антигенам – эмбриональные ( $\zeta$ - и  $\epsilon$ -) или фетальные ( $\gamma$ -) цепи гемоглобина [15].

Циркулирующие в крови матери трофобласты также могут служить источником генетического материала плода для НПД, несмотря на их плацентарное происхождение и проблему мозаицизма. Они появляются в крови матери на 6-й недели гестации и не сохраняются после родов, относятся к относительно крупным эпителиальным клеткам, экспрессируют специфичные антигены (включая цитокератины, молекулы адгезии ЕpСAM и другие), что облегчает их идентификацию и захват [11, 13]. Однако необходимо учитывать тот факт, что, проходя через легкие матери, крупноклеточная популяция трофобластов быстро элиминируются из кровотока, что снижает их эффективный выход. Эта особенность зачастую снижает ценность модельных экспериментов, при которых культуру крупноклеточных трофобластов добавляют в определенной концентрации в цельную кровь женщины, тем самым пытаясь воссоздать *in vitro* естественные условия их циркуляции в крови беременных. В ряде публикаций описывают результаты сепарации "экзогенных" трофобластов в модельных экспериментах, где рекомендуют использовать градиенты низкой плотности (1,066 г/мл) [14]. Согласно нашим наблюдениям, в естественных условиях такие крупные трофобласты не могут находиться в периферической крови беременных по указанной выше причине. Кроме того, использование "легкого" градиента приводит к большой потере относительно мелкоклеточной фракции "тяжелых" трофобластов (а именно такие клетки преимущественно циркулируют в крови матери) из-за "проваливания" их под градиент в ходе центрифугирования. По этой причине в настоящем исследовании был использован "тяжелый" градиент (1,119 г/мл), который задерживает на интерфазной поверхности все ядерные клетки, циркулирующие в крови. В дальнейшем, для обогащения негативной фракции, использовали иммуномагнитные частицы против панлейкоцитарного антигена (CD45), который экспрессирован на всех лейкоцитах за исключением эритроцитов и тромбоцитов.

Проточную цитометрию и сортировку негативной фракции, обедненной лейкоцитами, проводили с использованием меченных моноклональных антител к наиболее специфичным антигенам трофобластов. Прежде всего, антитела против HLA-G антигенов, которые относятся к неклассическим молекулам главного комплекса гистосовместимости (МНС) Ib класса, которые практически не экспрессируются на клетках матери [22]. При нормальных условиях антигены HLA-G кроме трофобластов экспрессируются на эпителиальных клетках тимуса [19]. Имеется семь изоформ этих молекул, включающих мембранные (HLA-G1, -G2, -G3 и -G4) и растворимые (HLA-G5, -G6 и -G7) формы. Используемое нами моноклональное антитело клона 87G реагирует с HLA-G1 и -G5 изоформами.

Для повышения специфичности определения редкой популяции трофобластов кроме антител против HLA-G использовали также меченное моноклональное антитело "anti-TBA" против антигена Trog-2 (GA733-1, Trophoblast cell surface antigen). Различают четыре разновидности Trog-антигена, Trog-1, -2, -3, -4, которые были обнаружены на клеточной поверхности нормальных и малигнизированных трофобластов (хорионкарциномы). Антигены Trog-1 и Trog-2 специфически экспрессируются на клетках синцитио- и цитотрофобласта, тогда как Trog-3 и Trog-4 обнаруживают также на поверхности различных линий опухолевых клеток, а также на нормальных лимфоцитах и моноцитах [20]. Анти-Trog-1 и анти-Trog-2 моноклональные антитела представляли большой интерес для детекции и выделения эмбриональных клеток трофобласта, циркулирующих в крови беременных. В частности, молекула Trog-2 – это поверхностный трансмембранный гликопротеин, который прежде всего экспрессируется на трофобластах, а также на линиях клеток хориокарциномы и других карцином. Функционально Trog-2 вовлечен в



процесс внутриклеточной передачи кальциевого сигнала, хотя точные физиологические механизмы этого процесса не выяснены [21].

В ходе проточной цитометрии и сортировки получали в среднем  $37,6 \pm 5,38$  клеток-кандидатов на один слайд, удовлетворяющих критериям гейта для трофобластов (CD45<sup>-</sup>HLA-G<sup>+</sup> anti-TBA<sup>+</sup>), при общем числе событий до 1 млн.

Помимо использования моноклональных антител к специфическим антигенам трофобластов для доказательства фетального происхождения клеток-кандидатов делали дополнительный акцент на различные кардинальные признаки их отличия от материнских клеток. Это целый ряд методов, целью которых является поиск у ребенка признаков, отсутствующих у 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 [11, 12]. Однако, по нашему мнению, эти способы не являются универсальными, а их точность недостаточна.

Для доказательства фетального происхождения отсортированных клеток мы использовали сочетание методов: лазерная микродиссекция единичных клеток, полногеномная амплификация их ДНК с последующим HLA-генотипированием, результаты которого однозначно свидетельствовали о происхождении клеток-кандидатов. Ключевым этапом была полногеномная амплификация ДНК, которая многократно увеличивает количество ДНК-матрицы (1000-кратно) из одной клетки и обеспечивает достаточную репрезентативность ее генома [24, 25]. Полученные результаты показали, что после очистки количество и качество амплифицированной ДНК во всех пробах (концентрация  $47,5 \pm 7,4$  нг/мкл) обеспечивает правильное определение HLA-генотипов методом SSO (Sequence Specific Oligonucleotides – гибридизации с олигонуклеотидными зондами на микросферах).

Сравнительный анализ HLA-генотипов единичных клеток-кандидатов с HLA-генотипами родителей показал достаточную степень чистоты популяции отсортированных клеток. Таким образом, сортировка на проточном цитометре с использованием выбранных антител к антигенам трофобластов позволила получить клетки фетального происхождения со 100%-й чувствительностью и 74%-й специфичностью. Причина присутствия на слайде отсортированных клеток с HLA-генотипом матери (36%), вероятно, обусловлена их неспецифическим захватом.

Для дальнейшего выполнения НПД методом aCGH использовали пробирки с амплифицированной ДНК из одной диссектированной клетки исключительно фетального происхождения по данным HLA-генотипирования [26]. Во всех наблюдениях, кроме одного, был получен сбалансированный профиль гибридизации, соответствующий виртуальному кариотипу стандартного цитогенетического исследования. В одном наблюдении профиль гибридизации демонстрировал полное отсутствие генетического материала соответствующего 18-й хромосоме, что могло стать основной причиной спонтанного прерывания этой беременности на 11 неделе гестации. Результаты стандартного кариотипирования биоматериала абортуса полностью подтвердили отсутствие у эмбриона 18-й хромосомы. При наличии данных хромосомных aberrаций эмбриогенез был невозможен или резко нарушен на ранних стадиях из-за аномалий, не совместимых с жизнью, которые стали наиболее вероятной причиной прерывания беременности. Это соотносится с данными литературы о том, что при исследовании абортусов большинство обнаруженных хромосомных нарушений – количественные [3].

Таким образом, предложенные подходы выбора антител к специфическим антигенам трофобластов для обеспечения эффективных

способов их обогащения, захвата и высокопроизводительной сортировки на основе проточной цитометрии, а также надежных методов верификации принадлежности плоду клеток-кандидатов позволили существенно повысить достоверность и универсальность неинвазивной пренатальной диагностики с использованием технологии aCGH.

### Список литературы

1. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques // *Fetal Diagn Ther.* – 2010. – Vol. 27 (1). – P. 1-7
2. Серов В.Н., Горин В.С., Жабин С.Г., Горин Р.В., Маркдорф А.Г., Шин А.П. Новые методические подходы в пренатальной диагностике хромосомных заболеваний (обзор литературы) // *Проблемы репродукции.* - 2000. - № 2. - С. 11-18.
3. Буяновская О.А., Глинкина Ж.И., Каретникова Н.А., Бахарев В.А. Молекулярно-генетические методы в пренатальной диагностике хромосомных аномалий // *Акушерство и гинекология.* – 2012. – № 8., Т.1 – С. 3–9.
4. Nicolaides K.H., Syngelaki A., Gil M., Atanasova V. and Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y // *Prenatal Diagnosis.* - 2013. - V.33, 6. - P. 575-579.
5. Пантюх К.С., Шубина Е.С. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий плода, основанная на секвенировании внеклеточной ДНК крови беременной женщины // *Акуш. и гин.* - 2015. - №8. - С. 5-11.
6. Сухих Г.Т., Каретникова Н.А., Баранова Е.С., Шубина Е.С., Коростин Д.О. и др. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) группе женщин высокого риска // *Акуш. и гин.* - 2015. - №4. - С. 5-11.
7. 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.
8. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, Chandrasekharan S. E Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *International journal of women's health*, 2015, 7:113-26.
9. Christensen B, Philip J, Kølvrå S, Lykke-Hansen L, Hom I. Fetal Cells in Maternal Blood: A Comparison of Methods for Cell Isolation and Identification. // *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2005; 20:106-112.
10. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 2006, 45(1):10-20.
11. Hatt L, Brinch M, Singh R, Møller K, Lauridsen RH, Uldbjerg N, Huppertz B, Christensen B, Kølvrå 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;35(3):218-27.
12. Calabrese G, Baldi M, Fantasia D, Sessa MT, Kalantar M, Holzhauer C, Alunni-Fabbroni M, Palka G, Sitar G: Detection of chromosomal aneuploidies in fetal cells isolated from maternal blood using single-chromosome dual-probe FISH analysis // *Clin Genet*, 2012, 82:131–139.

13. Mouawia H, Saker A, Jais JP, et al. Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy. *Reprod Biomed Online* 2012;25:508–20.
14. 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. doi: 10.17513/spno.128-21840.
15. Nemescu D., Constantinescu D., Martiniuc V., Onofriescu M., Carasevici E. Detection of Nucleated Red Blood Cells in Maternal Circulation by Magnetic Sorting and in situ Hybridization. // *GINECOeu* 2011, 7(1):15-18.
16. 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, 699:251–273.
17. 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.
18. 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.
19. van Wijk IJ, Griffioen S, Tjoa ML, et al. HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:991–7.
20. Lipinski M, Parks DR, Rouse RV, and Herzenberg LA. Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. // *Proc. Nati Acad. Sci. USA*, 1981, Vol. 78, No. 8, pp. 5147-5150.
21. Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S. Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. *Int J Cancer*. 1998; 76(5):671-676.
22. Schroder J. Passage of leukocytes from mother to fetus. // *Scand. J. Immunol*, 1974, 3:369-373.
23. Rizzo R, Vercammen M, van de Velde H, Horn PA, Rebmann V. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. *Cellular and molecular life sciences*, 2011, 68(3):341-52.
24. Лебедев И.Я., Черемных А.Д., Назаренко С.А., Светлаков А.В. Полногеномная амплификация ДНК: современные достижения и перспективы использования в преимплантационной генетической диагностике // *Проблемы репродукции*, 2005. - № 5. - С. 60-67.
25. Kim S.H., Godfrey T., Jensen R.H. Whole genome amplification and molecular genetic analysis of DNA from paraffin-embedded prostate adenocarcinoma tumor tissue. *J Urol* 1999; 162: 1512-1518.
26. Zhang L., Cui X., Schmitt K. et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *PNAS* 1992; 89: 5847-5851.
27. Rizzo R, Vercammen M, van de Velde H, Horn PA, Rebmann V. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. *Cellular and molecular life sciences*, 2011, 68(3):341-52.

## References

1. Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques // *Fetal Diagn Ther.* – 2010. – Vol. 27 (1). – P. 1-7
2. Serov V.N., Gorin V.S., Zhabin S.G., Gorin R.V., Markdorf A.G., Shin A.P. Novye metodicheskie podhody v prenatal'noj diagnostike hromosomnyh zabojevanij (obzor literatury) // *Problemy reprodukcii.* - 2000. - № 2. - S. 11-18.
3. Bujanovskaja O.A., Glinkina Zh.I., Karetnikova N.A., Baharev V.A. Molekuljarno-geneticheskie metody v prenatal'noj diagnostike hromosomnyh anomalij // *Akusherstvo i ginekologija.* – 2012. – № 8., T.1 – S. 3–9.
4. Nicolaides K.H., Syngelaki A., Gil M., Atanasova V. and Markova D. Validation of targeted sequencing of single-nucleotide polymorphisms for non-invasive prenatal detection of aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y // *Prenatal Diagnosis.* - 2013. - V.33, 6. - R. 575-579.
5. Pantjuh K.S., Shubina E.S. Neinvazivnaja prenatal'naja diagnostika aneuploidij ploda, osnovannaja na sekvenirovanii vneketochnoj DNK krovi beremennoj zhenshhiny // *Akush. i gin.* - 2015. - №8. - S. 5-11.
6. Suhij G.T., Karetnikova N.A., Baranova E.S., Shubina E.S., Korostin D.O. i dr. Neinvazivnaja prenatal'naja diagnostika aneuploidij metodom vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovanija (NGS) gruppe zhenshhin vysokogo riska // *Akush. i gin.* - 2015. - №4. - S. 5-11.
7. Ekimova E.V., Ekimov A.N., Alekseeva M.L. Rol' molekuljarnyh metodov diagnostiki v preimplantacionnom skrininge jembrionov (obzor literatury) // *Problemy reprodukcii.* - 2012. - №6. - S. 56-59.
8. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, Chandrasekharan S. E Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *International journal of women's health*, 2015, 7:113-26.
9. Christensen B, Philip J, Kølvrå S, Lykke-Hansen L, Hom I. Fetal Cells in Maternal Blood: A Comparison of Methods for Cell Isolation and Identification. // *Fetal Diagnosis and Therapy*, 2005; 20:106-112.
10. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 2006, 45(1):10-20.
11. Hatt L, Brinch M, Singh R, Møller K, Lauridsen RH, Uldbjerg N, Huppertz B, Christensen B, Kølvrå 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;35(3):218-27.
12. Calabrese G, Baldi M, Fantasia D, Sessa MT, Kalantar M, Holzhauser C, Alunni-Fabbroni M, Palka G, Sitar G: Detection of chromosomal aneuploidies in fetal cells isolated from maternal blood using single-chromosome dual-probe FISH analysis // *Clin Genet*, 2012, 82:131–139.
13. Mouawia H, Saker A, Jais JP, et al. Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy. *Reprod Biomed Online* 2012;25:508–20.
14. Musatova E.V., Markova Zh.G., Vitjazeva I.I., Shilova N.V. Ocenka vozmozhnosti vydelenija kletok trofoblata iz perifericheskoj krovi i ih analiza v uslovijah model'nogo jeksperimenta // *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija.* - 2015. - №5. doi: 10.17513/spno.128-21840.

15. Nemescu D., Constantinescu D., Martiniuc V., Onofriescu M., Carasevici E. Detection of Nucleated Red Blood Cells in Maternal Circulation by Magnetic Sorting and in situ Hybridization. // GINECOeu 2011, 7(1):15-18.

16. 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, 699:251–273.

17. 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.

18. Min'zhenkova M.E., Shilova N.V., Markova Zh.G., Antonenko V.G., Lebedev I.N., Kozlova Ju.O., Zemljakova V.V., Zolotuhina T.V. Poluchenie i primeneniye dinamicheskikh standartnykh referentsnykh intervalov dlja analiza rezul'tatov sravnitel'noj genomnoj gibridizacii // Genetika. – 2013. – T. 49, № 10. – S.1229-1235.

19. van Wijk IJ, Griffioen S, Tjoa ML, et al. HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2001;184:991–7.

20. Lipinski M, Parks DR, Rouse RV, and Herzenberg LA. Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies. // Proc. Nati Acad. Sci. USA, 1981, Vol. 78, No. 8, pp. 5147-5150.

21. Ripani E, Sacchetti A, Corda D, Alberti S. Human Trop-2 is a tumor-associated calcium signal transducer. Int J Cancer. 1998; 76(5):671-676.

22. Schroder J. Passage of leukocytes from mother to fetus. // Scand. J. Immunol, 1974, 3:369-373.

23. Rizzo R, Vercammen M, van de Velde H, Horn PA, Rebmann V. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. Cellular and molecular life sciences, 2011, 68(3):341-52.

24. Lebedev I.Ja., Cheremnyh A.D., Nazarenko S.A., Svetlakov A.V. Polnogenomnaja amplifikacija DNK: sovremennye dostizhenija i perspektivy ispol'zovanija v preimplantacionnoj geneticheskoj diagnostike // Problemy reprodukcii, 2005. - № 5. - S. 60-67.

25. Kim S.H., Godfrey T., Jensen R.H. Whole genome amplification and molecular genetic analysis of DNA from paraffin-embedded prostate adenocarcinoma tumor tissue. J Urol 1999; 162: 1512-1518.

26. Zhang L., Cui X., Schmitt K. at al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. PNAS 1992; 89: 5847-5851.

27. Rizzo R, Vercammen M, van de Velde H, Horn PA, Rebmann V. The importance of HLA-G expression in embryos, trophoblast cells, and embryonic stem cells. Cellular and molecular life sciences, 2011, 68(3):341-52.