

Μαγνητικός Διαχωρισμός και Κυτταρομετρία Ροής για την Ανίχνευση Εμβρυϊκών Εμπύρηνων Ερυθρών στο αίμα της εγκύου στο πρώτο τρίμηνο

Α. Δανηλίδης¹, Κ. Κουζή², Μ. Μαυρομαχάλη³, Γ. Κολιάκος⁴, Ν. Τσάγιας⁵, Ι. Τζαφέττας⁶

¹Μαιευτήρας Γυναικολόγος επιστημονικός συνεργάτης Β'Μαιευτικής & Γυναικολογικής κλινικής Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσ/κης,

²Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιστολογίας και Εμβρυολογίας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης,

³Παιδίατρος επιστημονική συνεργάτης Α' Νεογνολογικής κλινικής Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης,

⁴Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης,

⁵Βιολόγος και επιστημονικός συνεργάτης Βιοχημείας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης,

⁶Καθηγητής Β'Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης

Αλληλογραφία: Δανηλίδης Α.,

Σμύρνης 9, Θεσσαλονίκη

Τηλ.: 2310559711, E-mail: angedan@hotmail.com

Περίληψη

Περιγράφουμε δύο μεθόδους απομόνωσης εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών αιμοσφαιρίων από το περιφερικό αίμα εγκύων γυναικών, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για πρώιμο προγεννητικό έλεγχο. Στην πρώτη ομάδα χρησιμοποιήθηκε μαγνητικός διαχωρισμός. Έγινε λήψη περιφερικού αίματος από 20 έγκυες γυναίκες 8 έως 14 εβδομάδων κύησης. Ακολούθησε επεξεργασία, λήψη της υπόλευκης στοιβάδας των μονοκυττάρων, επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γλυκοφορίνης Α και μαγνητικός διαχωρισμός. Στη συνέχεια προστέθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γ-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης και ακολούθησε εξέταση και καταμέτρηση των θετικών εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών. Οι εγκυμοσύνες ήταν μεταξύ της 8ης έως της 14ης εβδομάδας (μέση εβδομάδα κύησης 10.8). Ο μέσος όρος ηλικίας των εγκύων ήταν 28.1 (από 21 έως 34 χρονών). Ο αριθμός των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο ήταν από 0 έως 18, με μέσο όρο 7.2, SD 5.2 και SEM 1.17. Το ποσοστό ανίχνευσης κυττάρων ήταν 90% (18/20). Για την πραγματοποίηση του πειράματος με κυτταρομετρία ροής έγινε λήψη 20 ml αίματος από 15 έγκυες γυναίκες, με ηλικία κύησης από 8 έως 14 εβδομάδες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και αφαίρεση της στοιβάδας των PBMCs. Στη συνέχεια έγινε επώαση ποσότητας του δείγματος με συγκεκριμένα αντιγόνα το CD 45 ECD, το CD 41 PE, τη GlycA PE και το IGγ-FITC. Ο πληθυσμός των κυττάρων που απομονώσαμε δηλαδή ήταν CD 45-, CD41-, GlycA + και anti γ+ και περιέχει τα εμπύρηνια εμβρυϊκά ερυθρά. Ο τελικός αριθμός του πληθυσμού των απομονωμένων κυττάρων είχε μέση τιμή 1138 (363-2560), SD 631.6 και SEM 163. Το ποσοστό των απομονωμένων κυττάρων σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό ήταν από 0.8% έως 4.2% (μέση τιμή 1.7%, SD 0.6). Η έρευνα μας αποσκοπούσε στην ακριβή αναγνώριση των εμβρυϊκών εμπύρηνων ερυθρών στην κυκλοφορία της μητέρας. Παρά τις δυσκολίες φαίνεται πως τα πρωτόκολλά μας συντέλεσαν στην απομόνωση με επιτυχία των λίγων εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών από το αίμα των εγκύων στα περισσότερα δείγματα.

Λέξεις κλειδιά:μαγνητικός διαχωρισμός, κυτταρομετρία ροής, εμπύρηνια ερυθρά, προγεννητικός έλεγχος

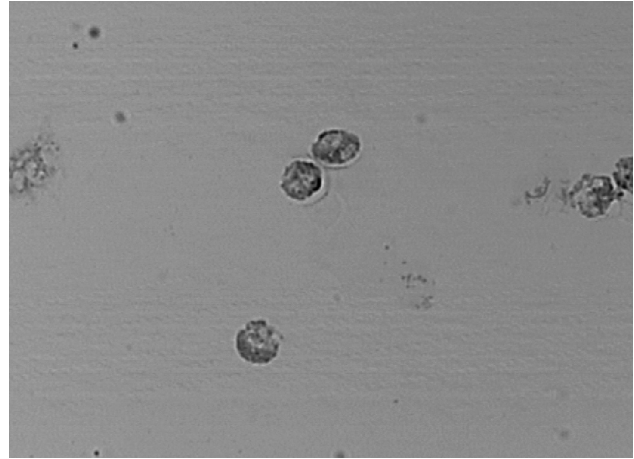
Εισαγωγή

Η ανάπτυξη μίας αξιόπιστης, εύκολα πραγματοποιήσιμης και προσιτής οικονομικά μη επεμβατικής μεθόδου απομόνωσης εμβρυϊκών κυττάρων από το αίμα της εγκύου θα καταστήσει δυνατή την προγεννητική διάγνωση σε όλο τον πληθυσμό. Παρά την εκτεταμένη έρευνα όμως, έως τώρα δεν έχει προκύψει μία ικανοποιητική και κλινικά αποδεκτή μέθοδος. Γι' αυτό το σκοπό έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διάφοροι τύποι κυττάρων όπως τα εμπύρηννα ερυθρά, τα λευκοκύτταρα, οι τροφοβλάστες, τα αιμοποιητικά προγεννητικά κύτταρα και το ελεύθερο DNA. Εξαιτίας της σπανιότητας των εμβρυϊκών κυττάρων στην κυκλοφορία της μητέρας, η ποσοτική ανάλυση της κατανομής τους στην μητρική κυκλοφορία αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στην ανάπτυξη μεθόδων για μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση. Είναι επίσης απαραίτητο να καθορισθεί η καταλληλότερη χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για τη λήψη του αίματος από την έγκυο ώστε να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα απομόνωσης των εμβρυϊκών κυττάρων. Θα πρέπει να απομονωθεί ικανός αριθμός ώστε να είναι εφικτή η διάγνωση. Η λήψη αίματος στο πρώτο τρίμηνο είναι σαφώς πιο επιθυμητή ώστε να γίνει η διάγνωση έγκαιρα, μειώνοντας την αγωνία του ζευγαριού αλλά και δίνοντας τη δυνατότητα διακοπής της εγκυμοσύνης στο πρώτο τρίμηνο εάν υπάρχει πρόβλημα.

Η έρευνα μας αποσκοπεί στην ακριβή αναγνώριση των εμβρυϊκών εμπύρηνων ερυθρών στην κυκλοφορία της μητέρας στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης με τη χρήση μαγνητικού διαχωρισμού και κυτταρομετρίας ροής. Προσδιορίζουμε όλα τα εμπόδια που δυσκόλεψαν τις προσπάθειες μας ώστε να ορίσουμε μία αξιόπιστη μέθοδο για μη επεμβατική απομόνωση εμβρυϊκών κυττάρων. Παρά τις δυσκολίες φαίνεται πως, τα πρωτόκολλα μας με το μαγνητικό διαχωρισμό και την κυτταρομετρία ροής και με τον πρωτότυπο συνδυασμό αντισωμάτων διαχωρισμού, συντελούν στην απομόνωση με επιτυχία των λίγων εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών από το αίμα των εγκύων στα περισσότερα δείγματα.

Υλικά και Μέθοδοι

Η απομόνωση των εμπύρηνων ερυθρών εμβρυϊκών αιμοσφαιρίων από το αίμα της εγκύου έγινε με δύο μεθόδους: με μαγνητικό διαχωρισμό και με κυτταρομετρία ροής. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων με τη μέθοδο του μαγνητικού διαχωρισμού έγινε λήψη 20 ml φλεβικού περιφερικού αί-



Εικόνα 1: Εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια μετά από απομόνωση από το μητρικό αίμα με χρώση με αντίσωμα για την αλυσίδα γ της αιμοσφαιρίνης X 1000.

ματος, από 20 έγκυες γυναίκες με ηλικία κύησης μεταξύ 8ης και 14ης εβδομάδας. Στη συνέχεια έγινε βαθμίδωση της πυκνότητας με hystopaque 1119 και παραλήφθηκε η υπόλευκη στιβάδα των μονοκυττάρων. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γλυκοφορίνης A, (DakoCytomation, IGg1,kappa) για 30 λεπτά. Μετά από συστηματική έκπλυση τα κύτταρα επώασθηκαν με anti-mouse αντίσωμα (Gerlinde Kisker), για 20 min το οποίο ήταν συνδεδεμένο με μαγνητικά σφαιρίδια (MACS) και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια μαγνήτη, ο οποίος τοποθετήθηκε στην περιφέρεια του σωλήνα. Η διαδικασία διαχωρισμού με τη βοήθεια του μαγνήτη επαναλήφθηκε ακόμη μια φορά. Μόνο τα εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια, τόσο μητρικής, όσο και εμβρυϊκής προέλευσης συγκρατήθηκαν από το μαγνήτη, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα απομακρύνθηκαν. Στη συνέχεια προστέθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γ-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης (Kortex). Τα κύτταρα επώασθηκαν για 20 min ακολούθησε πλύση με διάλυμα PBS.

Στη συνέχεια τα κύτταρα παραλήφθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες όπου εξετάστηκαν προσεκτικά κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για την ανεύρεση και καταμέτρηση των εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων (εικόνα 1).

Για την πραγματοποίηση του πειράματος με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήσαμε κυτταρομέτρο ροής της εταιρείας Beckman Coulter τύπου EPICS XL- MCL. Αρχικά έγινε λήψη 20 ml αίματος από 15 έγκυες γυναίκες, με ηλικία κύησης από 8 έως 14

Πίνακας 1: Αποτελέσματα μετρήσεων των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων στο δείγμα περιφερικού αίματος εγκύων γυναικών με μαγνητικό διαχωρισμό (+ Standard deviation, * Standard error of mean)

	Αριθμός εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών	Εβδομάδα κύησης	Ηλικία εγκύου (χρόνια)
Mean	7.2	10.8	28.1
SD+	5.2	1.7	3.69
Sem*	1.17	0.39	0.82

Πίνακας 2: Αποτελέσματα μετρήσεων των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων στο δείγμα περιφερικού αίματος εγκύων γυναικών με μαγνητικό διαχωρισμό.

Περιστατικό	Αριθμός εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών	Εβδομάδα κύησης	Ηλικία εγκύου (χρόνια)
1	8	12	30
2	4	13	32
3	5	14	28
4	3	14	21
5	6	10	25
6	4	9	26
7	2	10	25
8	1	12	29
9	0	10	33
10	12	9	30
11	9	13	28
12	11	10	34
13	6	9	31
14	14	11	27
15	4	10	29
16	0	12	22
17	18	9	24
18	12	11	34
19	14	10	26
20	12	8	28

εβδομάδες. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και αφαιρέθηκαν 15 ml από τη ζώνη των PBMCs (peripheral blood mononuclear cells). Ακολούθησε επώαση ποσότητας του δείγματος με συγκεκριμένα αντισώματα για 20 λεπτά στο σκοτάδι. Τα αντισώματα προήλθαν από την εταιρεία Beckman Coulter και είναι το CD 45 ECD (ετονιδρότη- δείκτης όλων των λευκών αιμοσφαιρίων), το CD 41 PE (φυκοερυθρίνη- δείκτης αιμοπεταλίων), η GlycA PE (γλυκοφορίνη A- δείκτης των ερυθρών αιμοσφαιρίων)

και το anti γ-FITC (δείκτης των ερυθρών αιμοσφαιρίων του εμβρύου). Με το πρώτο αντίσωμα έγινε αρνητικός διαχωρισμός και αποκλείστηκαν όλα τα λευκά αιμοσφαίρια που τυχόν βρισκόνταν στο δείγμα μας. Αρνητικός διαχωρισμός έγινε και με το δεύτερο αντίσωμα καθώς έτσι αποκλείστηκαν από το δείγμα και όλα τα αιμοπετάλια. Στη συνέχεια ακολούθησε θετικός διαχωρισμός των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών με τα δύο τελευταία αντισώματα. Ο πληθυσμός των κυττάρων που απο-

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μετρήσεων των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων στο δείγμα περιφερικού αίματος εγκύων γυναικών με κυτταρομετρία ροής

Δείγμα	Εβδομάδα κύησης	Ηλικία εγκύου (χρόνια)	Αριθμός κυττάρων CD45+/ μml	Αριθμός κυττάρων CD45+/ μml	Αριθμός κυττάρων GlycA+ Anti γ +/ μml	Συνολικός Χρόνος μεθόδου (λεπτά)	Ποσοστό απομονωμένων κυττάρων (%)
1	9	22	36978	356	486	115	1.3
2	11	31	29685	228	363	110	1.2
3	13	28	179703	797	2029	99	1.1
4	10	32	47805	122	477	111	0.9
5	14	23	134325	456	1049	102	0.8
6	8	25	125256	546	1025	125	0.8
7	12	24	148325	325	2560	132	1.7
8	10	19	57236	745	998	128	1.7
9	9	25	45903	236	689	102	1.5
10	8	24	25945	325	865	105	3.3
11	11	23	65825	645	985	139	1.5
12	12	22	78256	526	1123	103	1.4
13	13	29	36852	586	1562	125	4.2
14	11	31	85363	456	1985	92	2.3
15	12	32	78965	232	875	98	1.1

μονώσαμε ήταν δηλαδή CD 45-, CD41-, GlycA + και anti γ + και περιείχε τα εμπύρηνια εμβρυϊκά ερυθρά (εικόνα 2).

Αποτελέσματα

Στη πρώτη ομάδα της μελέτη μας με μαγνητικό διαχωρισμό συμμετείχαν 20 έγκυες γυναίκες, χαμηλού κινδύνου για σύνδρομο DOWN με βάση την ηλικία τους. Επίσης συμμετείχαν και έξι μη έγκυες γυναίκες χωρίς ιστορικό κύησης στο παρελθόν σαν ομάδα ελέγχου. Οι εγκυμοσύνες ήταν μεταξύ της 8ης έως τη 14η εβδομάδας (μέση εβδομάδα κύησης 10.8). Ο μέσος όρος ηλικίας των εγκύων ήταν 28.1 (από 21 έως 34 χρονών). Ο αριθμός των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο ήταν από 0 έως 18, με μέσο όρο 7.2, SD 5.2 και SEM 1.17 (εικόνα 1). Το ποσοστό ανίχνευσης κυττάρων ήταν 90% (18/20). Στην ομάδα ελέγχου των έξι γυναικών που δεν ήταν έγκυες αλλά και δεν είχαν ιστορικό εγκυμοσύνης στο παρελθόν δεν βρέθηκαν θετικά εμπύρηνια ερυθρά κύτταρα. Τα αποτελέσματα φαίνονται

αναλυτικά στους πίνακες 1 και 2.

Στη δεύτερη ομάδα μελέτης μας με κυτταρομετρία ροής συμμετείχαν 15 έγκυες γυναίκες, χαμηλού κινδύνου για σύνδρομο DOWN με βάση την ηλικία τους. Οι εγκυμοσύνες ήταν μεταξύ της 8ης έως τη 14η εβδομάδα (μέση ηλικία κύησης 10 εβδομάδες). Ο μέσος όρος ηλικίας των εγκύων ήταν 26 (19-32). Ο μέσος χρόνος διάρκειας της κυτταρομετρίας ροής ήταν 118.3 λεπτά (98-139). Όσον αφορά τον τελικό αριθμό του πληθυσμού των απομονωμένων κυττάρων αυτός είχε μέση τιμή 1138 (363-2560), SD 631.6 και SEM 163. Το ποσοστό των απομονωμένων κυττάρων σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό είναι από 0.8% έως 4.2% (μέση τιμή 1.7%, SD 0.6) Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες 3 και 4.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα graph pad instat και χρησιμοποιήθηκε το Pearson correlation. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων και της εβδομάδας κύησης σε καμία από τις δύο ομάδες γυναικών (στην ομάδα της κυτταρομετρίας ροής $p=0.1$ και στην ομάδα του μα-

Πίνακας 4: Αποτελέσματα μετρήσεων των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων στο δείγμα περιφερικού αίματος εγκύων γυναικών με κυτταρομετρία ροής (+ Standard deviation, * Standard error of mean)

	Εβδομάδα κύησης	Ηλικία εγκύνου (χρόνια)	Αριθμός κυττάρων CD45+/ μ ml	Αριθμός κυττάρων CD45+/ μ ml	Αριθμός κυττάρων GlycA+ Anti γ +/ μ ml	Ποσοστό απομονωμένων κυττάρων (%)	Συνολικός Χρόνος μεθόδου (λεπτά)
Mean	10	26	78472	438.5	1138	1.7	118.3
SD+	1.8	4.17	47579	201.5	631.6	0.6	18.2
Sem*	0.47	1.078	12285	52	163.08	0.34	4.7

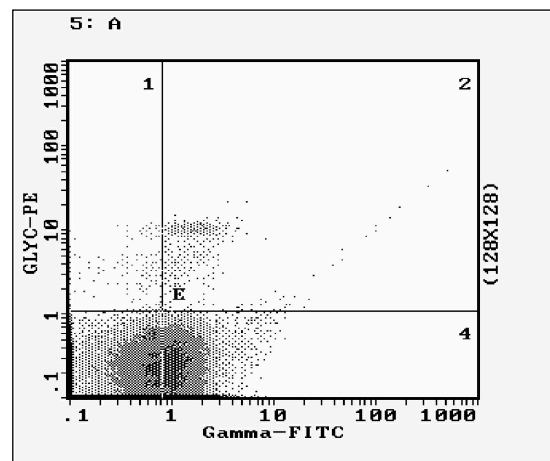
γνητικού διαχωρισμού $p=0.07$).

Συζήτηση

Στην πρώτη ομάδα γυναικών ερευνήσαμε τη χρήση του αρνητικού μαγνητικού διαχωρισμού ώστε να διαχωρισθούν τα εμβρυϊκά εμπύρηνια ερυθρά από τα ερυθρά της εγκύνου. Μετά το διαχωρισμό των εμπύρηνων κυττάρων προχωρήσαμε σε επώαση των κυττάρων με το μονοκλωνικό αντίσωμα (mouse anti human) έναντι της γλυκοφορίνης A, το οποίο υπερέχει φανερά έναντι άλλων αντισωμάτων όπως το anti- CD45, anti CD-36, anti- CD 71, HAE 9 και anti-I όσον αφορά την καθαρότητα του λαμβανόμενου πληθυσμού^{1,2}.

Επειδή ανάμεσα στα εμβρυϊκά εμπύρηνια ερυθρά ανευρίσκονται και μητρικά εμπύρηνια ερυθρά^{3,4} προχωρήσαμε και σε δεύτερο διαχωρισμό ώστε να απομονώσουμε τα εμβρυϊκά κύτταρα. Αυτό επιτεύχθηκε με την επίστροψη των εμπύρηνων ερυθρών σε αντικειμενοφόρο πλάκα και την επώασή τους με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γ αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης. Η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη είναι η κυρίαρχη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η οποία ανευρίσκεται στα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα μετά τις 7 εβδομάδες κύησης. Παρόλο που η εγκυμοσύνη ενεργοποιεί την σύνθεση μικρής ποσότητας εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στη μητέρα, η ποσότητα της αλυσίδας γ που παράγεται ανά κύτταρο είναι πολύ μεγαλύτερη στο έμβryo. Συγκριτικές μελέτες για την παραγωγή ϵ και ζ αλυσίδων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης έδειξαν ότι υπάρχει απότομη πτώση της ανίχνευσης αυτών των αλυσίδων μετά τις 13 και 14 εβδομάδες κύησης ακόμη και σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες^{5,6,7}. Αντίθετα, υπάρχει σημαντική αύξηση της ποσοτικής ανίχνευσης για την αλυσίδα γ στο πρώτο τρίμηνο και μικρή σταδιακή πτώση στο δεύ-

τερο σε φυσιολογικά έμβρυα, ενώ υπάρχει συνεχής αύξηση σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Φαίνεται λοιπόν ότι η χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος της αλυσίδας γ αναγνωρίζει μεγαλύτερο αριθμό εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων, δίνοντας τη δυνατότητα να αναγνωρίζονται ευκολότερα^{5,6,7}. Εξετάσαμε τα κύτταρα στο οπτικό μικροσκόπιο με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών, δηλαδή το στρογγυλό πυρήνα, το μεγάλο μέγεθος του κυττάρου, το χαρακτηριστικά χρωματισμένο κυτταροπλάσμα και περιφερική φωτεινότητα του κυτταροπλάσματος^{1,8,9}. Είναι γνωστό πως η συχνότητα των εμβρυϊκών εμπύρηνων ερυθρών στο μητρικό αίμα υπολογίζεται να είναι 1 με 10 κύτταρα ανά ml μητρικού αίματος¹⁰ και πως η συχνότητα είναι ένα εμπύρηνιο εμβρυϊκό ερυθρό ανά 10^6 με 10^7 μητρικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα της μητέρας^{11,12}. Ο μέσος



Εικόνα 2: Τα απομονωμένα εμπύρηνια εμβρυϊκά κύτταρα μετά την τελική ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής (CD 45-, CD41-, GlycA + και anti γ).

αριθμός 7, των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων που βρέθηκαν κατά την καταμέτρηση, έρχεται σε συμφωνία με τους περισσότερους μελετητές είτε χρησιμοποίησαν μαγνητικό διαχωρισμό είτε κυτταρομετρία ροής^{13,14,15,16,17}.

Στο δεύτερο πρωτόκολλο της μελέτης μας χρησιμοποιήσαμε κυτταρομετρία ροής (flow cytometry) με συγκεκριμένο συνδυασμό αντισωμάτων τα οποία με αρνητικό και θετικό διαχωρισμό, επιτρέπουν την απομόνωση πληθυσμού κυττάρων, με αρκετά υψηλή καθαρότητα, όσον αφορά την περιεκτικότητα σε εμπύρηννα εμβρυϊκά κύτταρα^{18,19,20,21,22}. Ο αρνητικός διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τα μονοκλωνικά αντισώματα για τα αντιγόνα CD45 και CD41. Το πρώτο αποτελεί το αντιγόνο για τα λευκοκύτταρα^{18,22} ενώ το δεύτερο αντιγόνο απομακρύνει τα αιμοπετάλια^{19,22}. Με την απομάκρυνση των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων βελτιώνεται η συχνότητα των σπάνιων εμβρυϊκών εμπύρηνων κυττάρων, και μειώνεται ο χρόνος που απαιτείται για την κυτταρομετρία καθώς μικρότερος αριθμός κυττάρων πρέπει να περάσει από το κυτταρόμετρο. Στη συνέχεια για να επιτευχθεί καθαρότητα στο δείγμα μας χρησιμοποιήσαμε συνδυασμό θετικού διαχωρισμού με αντισώματα για τα αντιγόνα GPA και την αιμοσφαιρίνη γ. Το αντιγόνο GPA υπάρχει μόνο στη σειρά των ερυθροκυττάρων^{3,21}. Μελέτες έχουν δείξει πως το αντίσωμα έναντι της γλυκοφορίνης Α έχει μεγαλύτερη ειδικότητα έναντι του αντισώματος για το αντιγόνο CD71²⁰. Το γεγονός ότι ανάμεσα στα εμβρυϊκά εμπύρηννα ερυθρά ανευρίσκονται και μητρικά εμπύρηννα ερυθρά 3,7 μας οδήγησε στο να προχωρήσουμε και σε δεύτερο διαχωρισμό με τη χρησιμοποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της γ αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης^{21,22}. Τα θετικά αντιδρώντα στο αντίσωμα έναντι της γ αλυσίδας κύτταρα αποτελούν πλέον με βεβαιότητα εμπύρηννα ερυθρά του εμβρύου. Τελικά λαμβάνεται πληθυσμός κυττάρων με όσο το δυνατό μικρότερη επιμόλυνση από μητρικά κύτταρα. Ο πληθυσμός των κυττάρων που απομονώνουμε είναι δηλαδή CD 45-, CD41-, GlycA + και anti γ +. Το μοναδικό ίσως μειονέκτημα που μπορεί να παρουσιασθεί με το anti-γ αντίσωμα είναι πως σε γυναίκες με στίγμα μεσογειακής αναιμίας αυξάνει η σύνθεση των γ αλυσίδων και ίσως και ο αριθμός των αιμοσφαιρίων μητρικής προέλευσης τα οποία είναι IΓγ +^{21,23}. Έτσι ίσως εξηγείται ο αυξημένος τελικός αριθμός κυττάρων στα δείγματα 3 και 7, όπου οι έγκυες είχαν στίγμα μεσογειακής αναιμίας²⁴. Όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων που απομονώσαμε στο τελικό δείγμα

ο μέσος όρος τους ήταν 1138 και σίγουρα εξακολουθεί να υπάρχει επιμόλυνση από ερυθροβλάστες μητρικής προέλευσης. Υπάρχουν διάφορες μελέτες με κυτταρομετρία ροής στις οποίες χρησιμοποιούνται διάφοροι συνδυασμοί αντισωμάτων και οι οποίες παρουσιάζουν στατιστικά παρόμοια με εμάς αποτελέσματα^{21,23,25,26}.

Οι μέθοδοι μαγνητικού διαχωρισμού και κυτταρομετρία ροής που επιλέξαμε είναι ταχείες, φθηνές και μπορούν να πραγματοποιηθούν με 20 ml περιφερικού αίματος. Χρησιμοποίησαμε ικανό αριθμό αντισωμάτων τα οποία δίνουν τη δυνατότητα αξιοπιστίας απομόνωσης καθαρών εμβρυϊκών ερυθροβλαστών. Η καθαρότητα του δείγματος κυττάρων η οποία εξασφαλίζεται με τον συνδυασμό αντισωμάτων διαχωρισμού που χρησιμοποιήσαμε καθιστούν τη μέθοδο μας αρκετά ελκυστική, εάν συνδυαστεί με PCR στο τελικό δείγμα κυττάρων για προγεννητική διάγνωση.

Magnetic cell sorting and flow cytometry for the detection fetal nucleated red cells in maternal circulation during the first trimester of pregnancy

A. Daniilidis¹, K.Kouzi², M.Mavromichali³, G.Koliakos⁴, N.Tsagias⁵, J.Tzafettas⁶

¹Obstetrician Gynecologist and Scientific Associate in the 2nd Department of Obstetrics and Gynecology Hippokratio University Hospital of Thessaloniki

²Associated Professor of Histology and Embryology Aristotle University of Thessaloniki

³Pediatrician Scientific Associate 1st Department of Neonatology Hippokratio University Hospital of Thessaloniki

⁴Associated Professor in Biochemistry Aristotle University of Thessaloniki

⁵Biologist and Scientific Associate in Biochemistry Aristotle University of Thessaloniki

⁶Professor in 2nd Department of Obstetrics and Gynecology Hippokratio University Hospital of Thessaloniki

Correspondence: Dainilidis A.,
9 Smirnis str., Thessaloniki
Tel.: +30 2310559711,
E-mail: angedan@hotmail.com

Summary

We describe two methods for isolation of nucleated fetal red blood cells from peripheral maternal blood. These cells could be used for early prenatal diagnosis. For the first group of the study we used MACS. The twenty pregnant women who participated in the first group were between 8 and 14 weeks of gestation (mean 10.8), and had low risk for Down syndrome according to their age (between 21 to 34 years old and mean 28.1). We have used 20 mls from maternal peripheral blood. After gradient centrifugation and removal of the mononuclear cell layer we have performed magnetic cell sorting twice by using the glycophorin A antibody and secondary antibody conjugated with magnetic beads. The positive cells have been held on the magnet and were maternal and fetal red cells. We have then added on the positive cells the monoclonal antibody for γ -chain and the fetal nucleated erythrocytes have been measured under light microscope. The number of fetal erythrocytes we have counted was between 0 and 18, with mean number of 7.2, SD 5.2 and SEM 1.17. We have managed to find these cells in 18 out of 20 cases (90%).

The second group of women who participated in our study consisted of 15 pregnant women between 8 and 14 weeks of gestation. In this group we used 20 mls of peripheral maternal blood and performed flow cytometry. After gradient centrifugation and removal of the mononuclear cell layer we added the antibodies CD 45 ECD, CD 41 PE, GlycA PE and anti γ -FITC and performed flow cytometry. The isolated population of cells was CD45-, CD41-, GlycA+, I γ + and contains the nucleated red blood fetal cells. The mean number of the isolated cells were 1138 (363-2560), SD 631.6 and SEM 163. The percentage of the isolated cells to the total cell population was 0.8% to 4.2% (mean 1.7%, SD 0.6)

The aim of our study was to identify the nucleated red fetal blood cells in maternal blood. We have identified all the obstacles encountered in our experiments and we have finally managed to develop a reliable method for non invasive isolation of fetal cells from maternal peripheral blood. Despite the difficulties our current protocols seem to enable the isolation of the few nucleated fetal red blood cells from the maternal circulation in most samples.

Key words: magnetic cell sorting, flow cytometry, nucleated fetal erythrocytes, prenatal diagnosis

Βιβλιογραφία

- Samura O, Sekizawa A, Zhen DK, Falco VM, Bianchi DW. Comparison of fetal cell recovery from maternal blood using a high density gradient for the initial separation step: 1.090 versus 1.119 g/ml. *PRENATAL DIAGNOSIS* 2000; 20: 281-286.
- Fukushima A, Utsugisawa Y, Wada Y, Mizusawa N, Horiuchi S, Kagabu T. The application of MACS to detect fetal cells in maternal peripheral blood. *J OBSTETRICS GYNAECOLOGY* 2001; 27;3:155-162.
- Slunga-Tallberg A, el-Rifai W, Keinanen M, Ylinen K, Kurki T, Klinger K. Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *HUMAN GENETICS* 1995; 96:53-57.
- Wang JY, Zhen DK, Vincent MF, Farina A, Zheng YL, Delli-Bovi LC, Bianchi DW. Fetal Nucleated Erythrocyte recovery: Fluorescence activated cell sorting- based positive selection using anti-gamm globin versus magnetic activated cell sorting using anti CD 45 depletion and anti-gamma globin positive selection. *CYTOMETRY* 2000; 39: 224-230.
- Choolani M et al. Simultaneous fetal cell identification and diagnosis by ϵ globin chain immunophenotyping and chromosomal fluorescence in situ hybridization. *BLOOD* 2001; 98:554-557.
- Zheng YL, Zhen DK, Farina A, Berry S, Wapner J, Williams JM, Bianchi DW. Fetal cell identifiers: results of microscope slide-based immunocytochemical studies as a function of gestational age and abnormality. *AM J OBSTET GYNAECOL* 1999; 180:1234-1239.
- Kathy Mann, Celia Donaghue, Susan P Fox, Zoe Docherty and Caroline Mackie Ogilvie. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS* 2004; 12:907-915
- Dong HC, Farina A, Bianchi DW, Johnson KL. ROC analysis of an erythroblast morphologic scoring system to improve identification of fetal cells in maternal blood. *PRENAT DIAGN* 2004; 24:117-120.
- Ikawa K, Yamafuji K, Ukita T, Kuwabara S, Igarashi T, Takabayashi H. Fetal DNA diagnosis from maternal blood: PEP-Taqman PCR analysis of a single nucleated erythrocyte (NRBC). 2001 *ANN N Y ACAD SCI* 945:153-155.
- Hamada H. T Arimani. T Kubo. H Hamaguchi. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *HUM GENET* 1993; 91:427.
- Thilaganathan B, Sairam S, Michailidis G, Wathen NC. First trimester nuchal translucency: effective routine screening for Down's syndrome. *BR J RADIOL* 1999;

- 72:946-948.
12. Nyberg DA, Souter VL, EL-Bastawissi A, Young S, Luthhardt F, Luthy D. Isolated sonographic markers for detection of fetal Down syndrome in the second trimester of pregnancy. *J ULTRASOUND MED* 2001; 20:1053-1063.
 13. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP: PCR quantification of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *AM J HUM GENET* 1997; 61; 4:822-829.
 14. Zheng YL, Carter NP, Price CM, Colman SM, Milton PJ, Hackett GA, Greaves MF, Ferguson-Smith MA. Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J MED GENET* 1993; 30:1051-1056
 15. Mavrou A, Colialexi A, Tsangaris G TH, Antsaklis A, Panagiotipoulou P, Tsenghi C, Metaxotoy C. Fetal cells in maternal blood: Isolation by magnetic cell sorting and confirmation by immunophenotyping and FISH. *IN VIVO* 1998; 12: 195-200.
 16. De Maria MA, Zheng Y-L, Zhen D, Weinschenk NM, Vadnais TJ, Bianchi DW. Improved fetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular antifetal hemoglobin and Hoechst 33342. *CYTOMETRY* 1996; 25: 37-45.
 17. Sohda S, Arimani T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *PRENAT DIAG* 1997; 17: 743-752
 18. Yeoh SC, Sargent IL, Redman CWG, Wordsworth BP, Thein S L. Detection of fetal cells in maternal blood. *PREN DIAGN* 1991; 11:117-12.
 19. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation; feasibility for prenatal diagnosis. *BRIT J OF HAEMATOL* 1999; 105: 574-583.
 20. Choolani M, O'Donoghue K, Talbert D, Kumar S, Roberts I, Letsky E, Bennet P, Fisk N. Characterization of first trimester fetal erythroblasts for non-invasive prenatal diagnosis. *MOL HUM REPROD* 2003; 9: 227-235.
 21. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *PRENAT DIAGN* 1997; 18: 743-752.
 22. Holtzman G, Makhlof O, Kaufman F, Gonchoroff L, Holtzman E. The clinical utility of fetal cell sorting to determine prenatally fetal E/e or e/e Rh genotype from peripheral maternal blood. *AM J OBSTET GYNECOL* 2000; 183: 462- 466.
 23. Guetta E, Simchen MJ, Mammon-Daviko K, Gordon D, Aviram-Goldring A, Rauchbach N, Barkai G. Analysis of fetal blood cells in the maternal circulation: challenges, ongoing efforts, and potential solutions. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* 2004; 13:93-99
 24. Bianchi DW. Fetomaternal cell trafficking: a story that begins with prenatal diagnosis and may end with stem cell therapy. *JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY* 2007; 42: 12-18.
 25. Christensen B, Philip J, Lykke-Hansen L, Kolvraa S. Sensitivity and specificity of the identification of fetal cells in maternal blood by combined staining with antibodies against beta-, gamma- and epsilon -globin chains. *FETAL DIAGN THER* 2003; 18: 479-484.
 26. Bianchi DW, Wataganara T, Lapaire O, Tjoa ML, Maron JL, Larrabee PB, Johnson KL. Fetal Nucleic Acids in Maternal Body Fluids. An Update. *ANN.N.Y.ACAD.SCI.* 2006; 1075: 63-73.