

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Шилова Н.В.¹, Миньженкова М.Е.¹, Маркова Ж.Г.¹, Кузина М.А.¹, Тарлычева А.А.¹, Капустина М.В.²

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕТЕКЦИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА В ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» Министерства науки и высшего образования РФ, 115522, Москва, Россия;

²ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», 101000, Москва, Россия

Пренатальная диагностика врожденных и наследственных заболеваний является относительно молодой и стремительно развивающейся областью медицины. Использование современного арсенала лабораторных, инструментальных и клинических методов оценки состояния здоровья плода позволяет выявить пороки и аномалии развития уже на ранних сроках беременности, обнаружить или с высокой долей вероятности исключить наследственный характер патологии. Идеальный метод пренатальной диагностики должен быть неинвазивным и комплексным, позволяющим одновременно диагностировать анеуплоидии, структурные хромосомные аномалии и генные мутации. Этим требованиям вполне отвечает неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ). Внедрение и использование технологий НИПТ привело к существенному снижению количества инвазивных процедур и потребовало разработки новых алгоритмов обследования беременных с учетом результатов и возможностей этого метода диагностики генетической патологии. НИПТ в целях обнаружения генетической патологии развивающегося плода является актуальным направлением пренатальной медицины. НИПТ на основе анализа коротких фрагментов внеклеточной ДНК, выделенной из плазмы беременной женщины, все более широко внедряется и используется в клинической практике в разных странах мира. Основным источником циркулирующей в материнской крови ДНК плода являются клетки трофобласта, подвергающиеся апоптозу. Альтернативным источником получения генетической информации рассматриваются интактные клетки плода, которые могут быть выделены из периферической крови и цервикального канала беременных женщин. Возможность их неинвазивного по отношению к плоду получения и дальнейшего анализа открывают перспективу исследования полного генома единичных клеток в целях пренатальной диагностики хромосомных аномалий и моногенной патологии. В настоящей работе представлен опыт выявления клеток экстраворсинчатого трофобласта в цервикальных образцах беременных женщин с помощью флуоресцентно меченых антител к поверхностному антигену HLA-G и проведена оценка эффективности такой детекции при сравнительном анализе частоты HLA-G позитивных клеток и клеток плода, выявленных в тех же цервикальных образцах с помощью FISH-анализа с соответствующими ДНК-зондами.

Ключевые слова: НИПТ; экстраворсинчатые трофобласты; иммунофлуоресцентное окрашивание; HLA-G, FISH.

Для цитирования: Шилова Н.В., Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Кузина М.А., Тарлычева А.А., Капустина М.В. Оценка эффективности детекции клеток трофобласта в цервикальных образцах беременных женщин. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (2): 102-110. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-2-102-110>

Для корреспонденции: Шилова Надежда Владимировна, д-р мед. наук, зав. лаб. цитогенетики; e-mail: nvsh05@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено в рамках темы НИР № 0400-2020-001 «Разработка методических подходов к анализу клеток трофобласта в целях неинвазивной детекции вариаций числа копий ДНК (CNVs)».

Поступила 10.11.2022

Принята к печати 24.12.2022

Опубликовано 00.02.2023

Shilova N.V.¹, Minzhenkova M.E.¹, Markova Zh.G.¹, Kuzina M.A.¹, Tarlycheva A.A.¹, Kapustina M.V.²

EVALUATION OF TROPHOBLAST CELLS DETECTION EFFICIENCY IN CERVICAL SAMPLES OF PREGNANT WOMEN

¹ Research Centre for Medical Genetics, 115522, Moscow, Russia;

² Moscow regional research institute of obstetrics and gynecology GBUZ MO MONIAG, 101000, Moscow, Russia

Prenatal diagnosis of congenital and hereditary diseases is a relatively young and rapidly developing field of medicine. Using the modern laboratory, instrumental and clinical methods for assessment the fetal health allows to identify malformations and developmental abnormalities already in the early stages of pregnancy, and also to detect or, with a high degree of probability, exclude the hereditary nature of the pathology. The ideal method of prenatal diagnosis should be non-invasive and comprehensive, allowing simultaneous diagnosis of aneuploidies, structural chromosomal abnormalities and gene mutations. These requirements are fully met by non-invasive prenatal testing (NIPT). The introduction and use of NIPT technologies has led to a significant reduction in the number of invasive procedures and required the development of new algorithms for examining pregnant women, taking into account the results and capabilities of this method for genetics diagnosis.

Non-invasive prenatal testing (NIPT) is an actual area of prenatal medicine in order to detect the genetic pathology of a developing fetus. NIPT based on the analysis of cell-free DNA isolated from maternal plasma is increasingly being introduced and used in clinical practice around the world. The main source of cell-free fetal DNA is trophoblast cells undergoing apoptosis. An alternative

source for obtaining fetal DNA is circulating fetal blood cells or cervical trophoblast cells. If those can be consistently recovered, they provide a pure source of fetal DNA and enable the potential to investigate the entire fetal genome for the prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities and monogenic disorders. This paper presents the experience of detecting extravillous trophoblasts from cervical samples using fluorescence labeled anti- HLA-G antibodies. The effectiveness of its detection was evaluated by a comparative analysis of the rate of anti-HLA-G antibody positive cells and fetal cells detected in the same cervical samples by FISH analysis with corresponding DNA probes.

Key words: NIPT; extravillous trophoblasts; immunofluorescence staining; HLA-G, FISH.

For citation: Shilova N.V., Minzhenkova M.E., Markova Zh.G., Kuzina M.A., Tarlycheva A.A., Kapustina M.V. Evaluation of trophoblast cells detection efficiency in cervical samples of pregnant women. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (2): 102-110 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-2-102-110>

For correspondence: Shilova N.V., Dr. Sci. Med., Head of the Laboratory of Cytogenetics; e-mail: nvsh05@mail.ru

Information about authors:

Shilova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0641-1084>;
Minzhenkova M.E., <https://orcid.org/0000-0001-5458-0408>;
Markova Zh.G., <https://orcid.org/0000-0003-2941-2861>;
Tarlycheva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9560-0273>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The reported study was funded by research work № 0400-2020-001 "Development of methodological approaches to the analysis of trophoblast cells for the purpose of non-invasive detection of copy number variations (CNVs)".

Received 10.11.2022
Accepted 24.12.2022
Published 00.02.2023

Введение. Неинвазивное пренатальное тестирование (НИПТ) в целях обнаружения генетической патологии развивающегося плода является актуальным направлением пренатальной медицины [1]. Неинвазивное пренатальное тестирование на основе анализа клеток плода и клеток плацентарного происхождения (клеточное НИПТ) имеет несомненное преимущество в ряду других методов пренатальной диагностики и пренатального тестирования.

Цитогенетическое исследование клеток ворсин хориона, амниотической жидкости и пуповинной крови является золотым стандартом в пренатальной генетической диагностике. Наиболее распространенными методами получения клеток плодного происхождения при многоплодной, как и при одноплодной беременности, являются аспирация ворсин хориона/плаценты, амниоцентез и кордоцентез. Однако риск прерывания беременности вследствие подобных вмешательств оценивается как 0,1%-0,3%, а сами вмешательства требуют значительного навыка и аккуратности для обеспечения их эффективности и безопасности [2]. Хотя этот риск очень низок, тем не менее, наблюдаемая в обществе тенденция к снижению толерантности к любому рода потерям плода, обусловила развитие и быстрое клиническое внедрение НИПТ на основе анализа циркулирующей внеклеточной ДНК в материнской плазме. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в НИПТ, связанные с внедрением высокотехнологичных методов исследования, широкое применение этой технологии ограничивается на сегодняшний день высокой стоимостью анализа. Кроме того, при количественном подходе к анализу внеклеточной ДНК большое значение имеет содержание ДНК плодного происхождения в материнской плазме, так называемая плодная фракция. Циркулирующая внеклеточная ДНК в основном имеет материнское происхождение; в среднем, только около 10% приходится на долю плодной фракции, имеющей пла-

центарное происхождение [3]. При более низкой концентрации плодной фракции высока вероятность получения ложноотрицательных результатов, например, при проведении НИПТ в ранние сроки беременности (до 10 недель гестации), когда плодная фракция в материнской плазме составляет менее 4% [4–6]. Кроме того, на концентрацию внеклеточной ДНК плода в материнской плазме оказывают влияние вес беременной женщины: повышение массы тела ассоциировано с уменьшением концентрации плодной фракции вероятнее вследствие эффекта ее разбавления при увеличении объема циркулирующей крови, что также может приводить к ложноотрицательным результатам. Причиной ложноположительных результатов могут быть ограниченный плацентой мозаицизм, резорбция двойни, наличие соматического хромосомного мозаицизма по половым хромосомам или онкологического заболевания у самой беременной женщины [7]. Все эти факторы необходимо учитывать для корректной интерпретации результатов количественного анализа при проведении НИПТ на анеуплоидию.

Альтернативным способом получения информации о хромосомном статусе плода является выделение и анализ интактных клеток плода, являющихся источником нативной ДНК истинно плодного происхождения, и которые можно безопасно, без проведения инвазивной диагностической процедуры, получить из организма беременной женщины. Разработка НИПТ на основе анализа клеток плода традиционно базировалась на изучении разных типов клеток – лейкоцитов, эритробластов, трофобластов, циркулирующих в крови женщин во время беременности [8–11]. При этом на текущий день основные усилия сосредоточены на использовании клеток трофобласта как мишени для тестирования. Вследствие своей уникальной природы трофобласты могут иметь несколько источников неинвазивного получения во время беременности – периферическая кровь и цервикальный

канал [12–14]. В процессе изучения феномена присутствия клеток трофобласта в репродуктивном тракте беременной женщины предпринимались попытки применения различных подходов к получению этих клеток, в том числе эндоцервикальный и внутриматочный лаваж [15, 16]. При этом основополагающим этапом являлась возможность детекции клеток трофобласта в полученном цитологическом препарате и их изоляции для последующего анализа. Работы в этом направлении были сосредоточены на морфологической или иммунологической детекции редких клеток, а также на специфических способах изоляции таких клеток для последующего генетического исследования [17–19].

Исследование генома единичных интактных клеток плода является одним из основных преимуществ клеточного НИПТ. Перспективным подходом к такого рода исследованиям является лазерная микродиссекция детектированных в материнском образце единичных клеток плода с последующей полногеномной амплификацией их ДНК, что позволяет выявить аномалии целевых последовательностей генетического материала [20 - 22]. Лазерная микродиссекция предполагает использование специальных предметных стекол, покрытых полимерной мембраной (PEN-мембраной), что оптимизирует процесс диссекции и позволяет избежать повреждения вырезаемых объектов [23].

Феномен трансплацентарной миграции трофобластов представляет большой интерес. Цитотрофобласты ворсин хориона могут дифференцироваться в экстраворсинчатые трофобласты, приобретая способность проникать в материнские ткани. Экстраворсинчатые трофобласты мигрируют в кровеносные сосуды матки (эндоваскулярные трофобласты) и маточные железы (эндогандулярные трофобласты). Кроме того, клетки экстраворсинчатого трофобласта (ЭВТ) могут покидать плаценту и выходить в репродуктивный тракт матери, создавая условия для НИПТ при детекции и анализе этих клеток в цитологических образцах клеток цервикального канала. В качестве маркеров для детекции клеток ЭВТ в цервикальных образцах могут быть использованы различные антигены, экспрессирующиеся на этих клетках, в частности, HLA-G [24]. HLA-G является антигеном главного комплекса гистосовместимости, класса I, G. В отличие от циркулирующих материнских лимфоцитов, несущих на своей поверхности полиморфные антигены HLA первого и второго классов, инвазирующие клетки цитотрофобласта, в том числе ЭВТ, не содержат этих классических антигенов. Напротив, они экспрессируют неклассические, не полиморфные молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса, одним из которых является HLA-G. Основной функцией HLA-G антигена является обеспечение иммунологической толерантности организма матери по отношению к семи-аллогенному плоду, которая реализуется посредством блокировки естественных киллеров (NK-клеток) [25]. Детекция клеток трофобласта в цервикальных образцах беременных женщин с использованием этапа обогащения при магнитной

сортировке с моноклональными антителами к HLA-G антигену позволяет выявлять от 500 до 1500 клеток ЭВТ в отдельных образцах при минимальной контаминации материнскими клетками [26, 27]. Таким образом, используя стандартную и безопасную в акушерско-гинекологической практике процедуру взятия мазка по Папаниколау, можно получить большое количество интактных клеток плодного происхождения, что делает такой подход наиболее целесообразным при клеточном НИПТ и позволяет избежать проблем и ограничений НИПТ, которые существуют при исследовании внеклеточной ДНК.

Цель исследования - определение эффективности иммунофлуоресцентной детекции ЭВТ в цервикальном канале беременных женщин с использованием антител к специфическому маркеру клеток трофобласта – антигену HLA-G.

Материал и методы. Цервикальные образцы были получены от беременных женщин, которым проводили пренатальную молекулярно-цитогенетическую диагностику по результатам комбинированного скрининга I триместра (группа высокого риска наличия анеуплоидии у плода) ($n=14$). Сроки гестации варьировали от 12 до 16 недель. Критериями исключения являлись: многоплодная беременность, вагинальное кровотечение, гестационный срок 20 нед и более. Перед проведением инвазивной процедуры биопсии ворсин хориона, при наличии информированного добровольного согласия, осуществлялось взятие цервикального образца с помощью цитологической щеточки. Цервикальный образец помещали в физиологический раствор и транспортировали в лабораторию при температуре окружающей среды.

Приготовление препаратов из клеток цервикальных образцов проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [28]. Полученную клеточную фракцию раскапывали на предметные стекла с PEN (polyethylene naphthalat)-мембраной (1.0 mm PEN-membrane slide, Carl Zeiss).

Клеточный материал фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида, затем окрашивали флуоресцентно-мечеными (FITC) моноклональными антителами к мембранному маркеру HLA-G (Anti-HLA-G) при титре антител 1:1000 по протоколу фирмы-производителя (Abcam). В качестве контроля использовали препараты, полученные методом отпечатков ворсин нативного хориона ($n=7$).

Последующая гибридизация проводилась на тех же препаратах после иммунофлуоресцентного окрашивания (ИФО). Протоподготовка к проведению FISH-анализа включала в себя стадию обработки клеточного препарата раствором пепсина по стандартному протоколу. FISH-анализ выполняли с использованием локус-специфичных ДНК-зондов на хромосомы 21 (CCP21 Pericentromeric, CytoTest Inc, США), на прицентромерный район X хромосомы (DXZ1), Y хромосомы (DYZ1), а также хромосомы 18 (D18Z1) в качестве контроля гибридизации (XA AneuScore I, MetaSystems, Германия), меченных различными флуорохромами согласно инструкции фирмы-производителя. Контроль окрашивания клеточных ядер производи-

ли с помощью DAPI I (Abbott Molecular Inc., США) в растворе Vectashield (Vector Labs, США) в соотношении 1:20, а также раствора йодистого пропидия (Propidium Iodide) в фотозащитном растворе (2 мкг/мл).

FISH-анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе «AxioImagerM.1» (CarlZss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия).

Верификация хромосомного статуса плода проводилась по результатам молекулярно-цитогенетического анализа полупрямых хромосомных препаратов из клеток цитотрофобласта, полученных при биопсии ворсин хориона.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием компьютерной программы StatSoft STATISTICA (version 10). Оценку достоверности различий проводили по двухвыборочному *t*-критерию и *U*-критерию ранговых сумм (Манна-Уитни). Величина достигнутого уровня значимости ($p < 0,005$) считалась достоверной.

Результаты. Во всех исследованных контрольных препаратах клеток нативного хориона, полученных методом отпечатка ворсин на предметных стеклах, были обнаружены HLA-G-позитивные клетки характерной морфологии, имеющие хорошо визуализируемое ядро при контрокрашивании ядерным красителем DAPI (рис. 1).

Для оценки возможности иммунофлуоресцентной детекции клеток ЭВТ при приготовлении препаратов использовали предметные стекла, покрытые PEN-

мембраной. Однако при анализе клеток после ИФО мы столкнулись с проблемой аутофлуоресценции PEN-мембраны в ультрафиолетовом спектре, которая усугублялась при использовании раствора DAPI, традиционно используемого в качестве контрокрашивания ДНК клеточных ядер (рис. 2, а, б).

Это делало невозможным проведение анализа клеток, маркированных антителами к антигену HLA-G, окрашенных флуоресцентным красителем FITC. Проблема была решена при использовании флуоресцентного красителя PI в стандартной концентрации, который позволял оценивать морфологию клеточного ядра и не препятствовал визуализации окрашенных FITC моноклональных антител к поверхностному HLA-G антигену (рис. 2, в).

Таким образом, для анализа клеток на PEN-мембране при ИФО антителами, мечеными флуоресцентным красителем FITC, целесообразным является использование раствора йодистого пропидия (PI) в качестве контрокрашивающего ДНК агента.

По результатам пренатальной молекулярно-цитогенетической диагностики в 10 из 14 случаев анеуплоидия у плода не была выявлена, при этом у 7 плодов установлен мужской пол, у 3 плодов – женский пол. Трисомия по хромосоме 21 (синдром Дауна) детектирована в 4 случаях.

Методом ИФО с Anti-HLA-G –FITC были исследованы цитологические препараты из цервикальных образцов, полученных от женщин, беременных плодом мужского пола ($n=7$) или плодом с трисомией по хромосоме 21 (синдром Дауна) ($n=4$).

При определении частоты клеток ЭВТ в цервикальных материнских образцах учитывали такие морфологические характеристики как округлое ядро и компактная область флуоресценции FITC, что позволяло дифференцировать такие клетки (HLA-G-позитивные) от эпителиальных материнских клеток с вытянутым ядром и диффузной цитоплазмой (рис. 3).

Результаты ИФО с антителами к HLA-G антигену (Anti-HLA-G –FITC) представлены в табл. 1.

В 11 цитологических препаратах клеток цервикального канала беременных женщин в общей сложности было проанализировано 32 845 клеток. Как видно из представленных данных, HLA-G+ клетки были выявлены во всех проанализированных образцах и

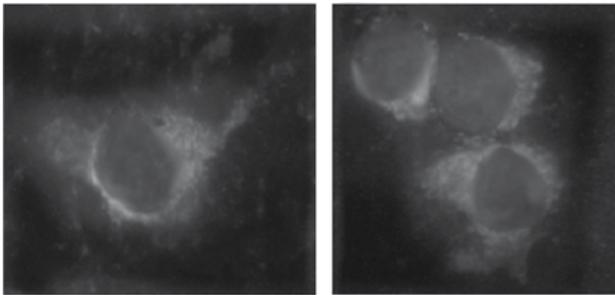


Рис. 1. Результат иммунофлуоресцентного окрашивания клеток нативного хориона с HLA-G-антителами.

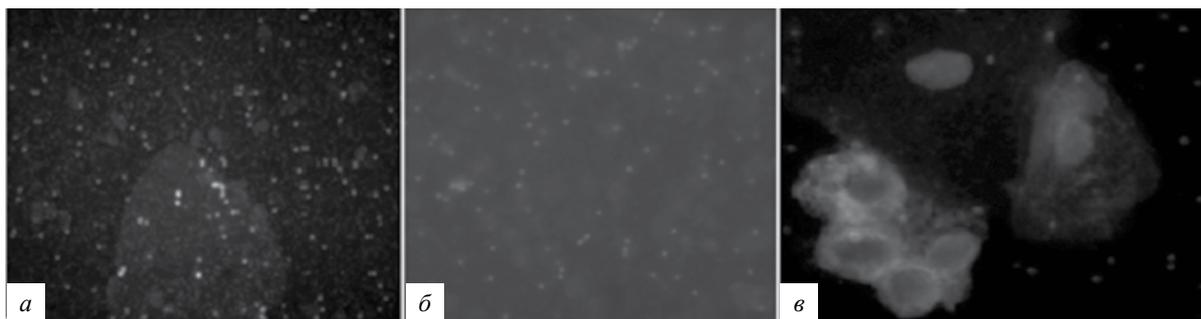


Рис. 2. Флуоресцентное окрашивание ДНК клеточных ядер на PEN-мембране.

а – аутофлуоресценция PEN-мембраны; б – фоновая флуоресценция PEN-мембраны при использовании ядерного красителя DAPI; в – окрашивание ДНК клеточных ядер на PEN-мембране при использовании ядерного красителя йодистого пропидия.

их количество варьировало от 9 до 194. Средняя частота HLA-G-позитивных клеток (предположительно клеток трофобласта) при беременности плодом с нормальным кариотипом и плодом с анеуплоидией статистически значимо не различалась и составила 1,9% и 1,96% среди материнских клеток соответственно ($p=0,5$, $U=10$). В среднем, в образце материнских цервикальных клеток частота HLA-G+ клеток составила $1,9\% \pm 0,63\%$.

С целью оценки специфичности метода иммунофлуоресцентной детекции клеток трофобласта в цервикальных образцах беременных женщин была проведена FISH с соответствующими ДНК-зондами на тех же препаратах и определена частота клеток плода. Кроме того, FISH с такими же ДНК-зондами

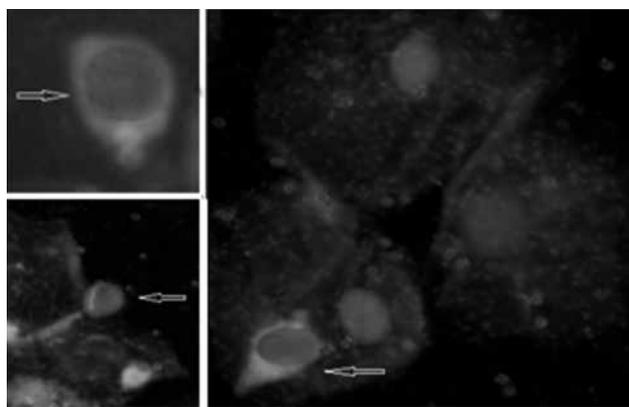


Рис. 3. Результат иммунофлуоресцентного окрашивания клеток с Anti-HLA-G –FITC в цервикальных образцах беременных женщин. Клетки характерной для трофобласта морфологии, окрашенные Anti-HLA-FITC (указаны стрелкой) среди материнских эпителиальных клеток.

была проведена на 3 препаратах, полученных из цервикальных образцов женщин, беременных плодом женского пола, в качестве контрольных.

Перед проведением FISH цитологические препараты подвергались протеолитической обработке для удаления клеточной оболочки с ассоциированными антителами и цитоплазмы. При интерпретации результатов FISH учитывали специфичность паттерна гибридизационных сигналов. Так, в препаратах из образцов женщин, беременных плодом мужского пола ($n=7$), выявление интерфазных ядер (клеток) с гибридизационными сигналами зеленого (DXZ1, FITC) и красного цвета (DYZ3, TexRed), т.е. содержащих X и Y хромосомы, определяло их плодное происхождение. В то же время, материнские клетки содержали по два зеленых гибридизационных сигнала (XX-клетки) (рис. 4).

В случаях беременности плодом с трисомией по хромосоме 21, выявленной при молекулярно-цитогенетическом исследовании ($n=4$), при гибридизации с ДНК-зондом на прицентромерный гетерохроматин хромосомы 21, меченным FITC, наличие трех дискретных гибридизационных сигналов в ядре позволяло считать такую клетку плодной по происхождению (рис. 5).

Следует отметить, что в цервикальных образцах при беременности здоровым плодом женского пола не были обнаружены клетки с Y хромосомой или тремя копиями хромосомы 21.

Результаты FISH-анализа 11 образцов представлены в табл. 2.

Как видно из представленных данных, в двух случаях (№ 4 и № 11) FISH-анализ провести не удалось из-за крайне низкой эффективности гибридизации. В остальных случаях частота клеток с XY-

Таблица 1

Результат ИФО с Anti-HLA-G–FITC клеток цервикальных образцов беременных женщин

Возраст, годы	Срок беременности (нед)	Хромосомный статус плода*	ИФО		
			Количество HLA-G + клеток	Количество проанализированных клеток	% HLA-G + клеток
24	12-13	XY	194	7212	2,7
28	13-14	XY	87	6320	1,34
34	13-14	XY	61	3984	1,5
37	14	XY	36	2365	1,52
36	16	XY	58	4109	1,41
40	13-14	XY	36	1347	2,67
32	15-16	XY	21	975	2,15
		Всего	493	26312	1,9
Нет данных	Нет данных	XY,+21	15	602	2,5
41	14-15	XY,+21	47	2016	2,33
33	14	XY,+21	57	3387	1,68
39	14	XX,+21	9	528	1,7
		Всего	128	6533	1,96

Примечание.* – Пол плода и наличие/отсутствие трисомии по хромосоме 21 были установлены при проведении пренатальной молекулярно-цитогенетической диагностики.

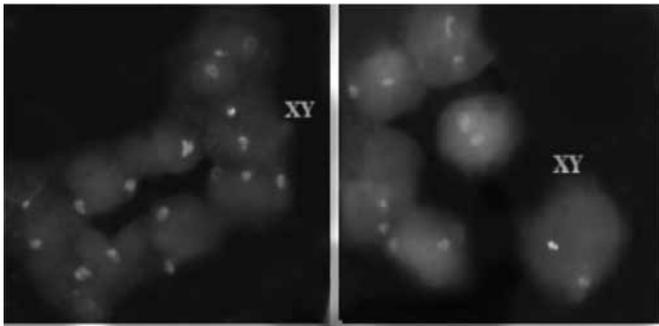


Рис. 4. Результат гибридизации с ДНК-зондами на X и Y хромосомы при беременности плодом мужского пола. Клетки плода мужского пола (XY) среди материнских (XX) клеток.

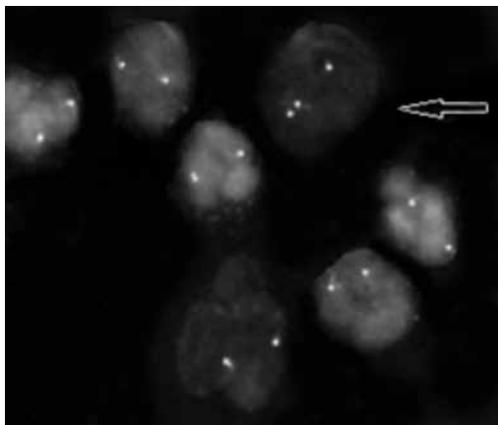


Рис. 5. Результат гибридизации с ДНК-зондом на перicen- тромерный район хромосомы 21 при беременности плодом с синдромом Дауна. Клетка плода с тремя гибридизационными сигналами (трисомия 21) указана стрелкой.

гибридизационными сигналами составила в среднем 0,3%, т.е. в среднем 1 клетка плодного происхождения была обнаружена среди 308 материнских клеток с XX-гибридизационными сигналами.

Средняя частота интерфазных ядер с аномальным количеством гибридизационных сигналов, соответствующих наличию трех копий хромосомы 21 составила 0,73 %, т.е. в среднем одна клетка плодного происхождения была обнаружена среди 132 материнских клеток с двумя гибридизационными сигналами, что соответствует нормальному, дисомному количеству копий хромосомы 21.

Таким образом, частота интерфазных ядер с аномальным количеством сигналов в цервикальных образцах при наличии анеуплоидии у плода в 2,4 раза превышала таковую при беременности плодом с нормальным кариотипом.

С целью оценки эффективности детекции клеток ЭВТ в материнских цервикальных образцах методом ИФО с Anti-HLA-G-FITC был проведен сравнительный анализ выявляемости HLA-G-позитивных клеток (предположительно плодные) и клеток плода, идентифицированных при FISH-анализе с соответствующими ДНК-зондами.

Данные по сравнительной оценке частоты HLA-G-позитивных клеток, клеток плодов мужского пола с нормальным кариотипом и с трисомией по хромосоме 21 представлены в табл. 3.

Так, если при проведении ИФО в препаратах из материнских цервикальных образцов средняя доля клеток предположительно трофобластного происхождения составила 1,93%, то при FISH-анализе тех же цитологических образцов частота клеток плода составила в среднем 0,52%. Таким образом, средняя частота клеток плода плацентарного происхождения оказались достоверно значимо ниже ($p < 0,005$), чем

Таблица 2

Результат молекулярно-цитогенетического исследования цервикальных образцов беременных женщин

№ п/п	Возраст, годы	Срок беременности (нед)	Хромосомный статус плода	FISH		
				Количество клеток с XY/аномальным кол-вом сигналов	Количество проанализированных клеток	% клеток с XY/аномальным количеством сигналов
1	24	12-13	XY	7	1691	0,4
2	28	13-14	XY	8	2000	0,4
3	34	13-14	XY	8	2241	0,35
4	37	14	XY	-	-	-
5	36	16	XY	4	2000	0,2
6	40	13-14	XY	5	2000	0,25
7	32	15-16	XY	4	1140	0,35
			Всего	36	11072	0,3
8	Нет данных	Нет данных	XY+21	2	196	1
9	41	14-15	XY+21	2	486	0,4
10	33	14	XY+21	8	896	0,8
11	39	14	XX+21	-	-	-
			Всего	12	1578	0,73

Эффективность выявления клеток трофобласта в цервикальных образцах при использовании различных методов их детекции

ИФО	FISH	p	U
Средняя частота HLA-G + клеток (%)	Средняя частота клеток с XY/аномальным кол-вом сигналов (%)		
1,93	0,52	0,002	0

Примечание. p – уровень значимости статистических данных, U- критерий Манна-Уитни.

таковая, полученная при анализе клеток цитологических препаратов, окрашенных с использованием флуоресцентно меченых моноклональных антител к HLA-G антигену.

Обсуждение. Использование предметных стекол с PEN-мембраной позволяет получать цитологические препараты из цервикальных материнских образцов, детектировать в них клетки трофобласта и осуществлять лазерную микродиссекцию единичных клеток трофобласта с последующей возможностью проведения любого рода генетического анализа независимо от пола плода. Поэтому, для оценки возможности иммунофлуоресцентной детекции клеток ЭВТ и последующей их лазерной микродиссекции при приготовлении препаратов, мы использовали специальные, биохимически инертные, предметные стекла, покрытые такой мембраной.

При исследовании цитологических препаратов методом флуоресцентной микроскопии, конечным этапом обработки является окрашивание ядер клеток с целью облегчения их визуализации и предотвращения «выгорания» флуоресцентных молекул. Первоначально в качестве контрокрашивающего агента клеток цервикальных образцов нами был выбран флуоресцентный интеркалирующий краситель 4',6-диамидиамидо-2-фенилиндола (DAPI), который повсеместно применяется в иммуногистохимии и флуоресцентной гибридизации *in situ*. Однако было отмечено, что применение этого красителя усиливает аутофлуоресценцию PEN-мембраны, особенно в области ее пор, что значительно затрудняет анализ цитологических препаратов. Поэтому в качестве альтернативного ядерного красителя был выбран раствор PI, также используемый для окрашивания ДНК и содержащих ее структур клеток, но отличающийся по спектральным характеристикам от красителя DAPI, что является оптимальным для флуоресцентной микроскопии в комбинации с флуоресцентно-мечеными антителами [29].

По результатам FISH-анализа цитологических препаратов из цервикальных образцов как HLA-G+ клетки, так и клетки плодного происхождения, были выявлены во всех проанализированных образцах. При этом средняя частота клеток предположительно трофобластного происхождения (HLA-G+ клетки) почти в 4 раза превышала частоту клеток плода, установленную при FISH-анализе тех же цитологических образцов (1,93% и 0,52% соответственно). Одним из объяснений такой низкой специфичности детекции клеток трофобласта методом ИФО может быть тот факт, что мембранно-связанный поверхностный HLA-G антиген

помимо клеток трофобласта может экспрессироваться также клетками материнской иммунной системы (дендритные клетки, лимфоциты, макрофаги, моноциты, натуральные киллеры) [30]. По-видимому, такие клетки крови могут присутствовать в образце в результате нарушения целостности кровеносных сосудов слизистой оболочки цервикального канала при проведении процедуры забора биологического материала.

В результате исследования установлено, что средняя частота клеток ЭВТ при беременности плодом с трисомией по хромосоме 21 достоверно значимо превышает таковую при беременности плодом с нормальным кариотипом. Действительно, известно, что содержание плодных клеток в периферической крови беременной женщины выше при наличии анеуплоидии плода и это может быть связано с аномальным функционированием плаценты [31]. Вероятно, аналогичная закономерность существует и в отношении цервикальных трофобластов.

Заключение. Таким образом, исходя из полученных данных, можно заключить, что метод ИФО с антителами к поверхностному маркеру ЭВТ - HLA-G антигену не может быть использован в качестве самостоятельного для детекции клеток экстраворсинчатого трофобласта в цервикальных образцах беременных женщин и возможной последующей лазерной микродиссекции этих клеток для генетического анализа. Метод FISH с ДНК-зондами на хромосому 21, а также X и Y хромосомы является более эффективным методом детекции клеток плодного происхождения в цервикальных образцах беременных женщин. Однако, существенным ограничением такого подхода является невозможность проведения клеточной НИПТ при беременности плодом женского пола. Необходим дальнейший поиск универсального маркера(ов), позволяющего дифференцировать клетки плода от материнских клеток цервикального канала с целью их надежной детекции, последующей изоляции, полногеномной амплификации и проведения генетической диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liehr T. False-positives and false-negatives in on-invasive prenatal testing (NIPT): what can we learn from a meta-analysis on >750,000 tests? *Molecular Cytogenetics*. 2022; 15(1):36.
2. Salomon L.J., Sotiriadis A., Wulff C.B., Odibo A., Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2019; 54(4):442-51.
3. Ashoor G., Syngelaki A., Poon L.C., Rezende J.C., Nicolaides K.H. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks'

- gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2013; 41(1):26-32.
4. Palomaki G.E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet. Med.* 2011; 13(11):913-20.
 5. Norton M.E., Brar H., Weiss J., Karimi A., Laurent L.C., Caughey A.B. et al. Non-invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012; 207(2):137.e1-8.
 6. Hui L. Noninvasive prenatal testing for aneuploidy using cell-free DNA - New implications for maternal health. *Obstet. Med.* 2016;9(4):148-52.
 7. Vossaert L., Chakchouk I., Zemet R., Van den Veyver I.B. Overview and recent developments in cell-based noninvasive prenatal testing. *Prenat. Diagn.* 2021; 41(10):1202-14.
 8. Herzenberg L.A., Bianchi D.W., Schröder J., Cann H.M., Iverson G.M. Fetal cells in the blood of pregnant women: Detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76(3):1453-5.
 9. Gänshirt-Ahlert D.M., Burschky M., Garritsen H.S., Helmer L., Miny P., Horst J. et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1992; 166(5):1350-5.
 10. Zolotukhina T.V., Shilova N.V. Fetal cells in maternal blood: recovering by fluorescence-activated cell sorting. Early prenatal diagnosis, fetal cells and DNA in the mother, present state and perspectives. In: Macek M. Sr., Bianchi D., Cuckle H. eds. Prague: Charles University in Prague: The Karolinum Press; 2002; 121-31.
 11. Kølvræ 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; 53(3):331-6.
 12. Vona G., Beroud C., Benachi A., Quenette A., Bonnefont J.P., Romana S. et al. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells in maternal blood. *Am. J. Pathol.* 2002; 160(1):51-8.
 13. Mouawia H., Saker A., Jais J.P., Benachi A., Bussièrès L., Lacour B. 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(5):508-20.
 14. Sibiak R., Wender-Ozegowska E. Methods of detection and isolation of trophoblast cells from trans-cervical specimens – a historical overview. *Medical Journal of Cell Biology.* 2021; 9(4):170-6.
 15. Cioni R., Bussani C., Scarselli B., Barciulli F., Bucciantini S., Simi P. Detection of fetal cells in intrauterine lavage samples collected in the first trimester of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 2002; 22(1):52-5.
 16. Cioni R., Bussani C., Scarselli B., Bucciantini S., Barciulli F., Scarselli G. et al. Fetal cells in cervical mucus in the first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn.* 2003; 23(2):168-171.
 17. Fang C.N., Kan Y.Y., Hsiao C.C. Detection of fetal cells from trans-cervical mucus plug before first-trimester termination of pregnancy by cytokeratin-7 immunohistochemistry. *J. Obstet Gynaecol Res.* 2005; 31(6):500-7.
 18. Imudia A.N., Suzuki Y., Kilburn B.A., Yelian F.D., Diamond M.P., Romero R. et al. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study. *Hum Reprod.* 2009; 24(9):2086-92.
 19. Wu L., Li R., Ye O., Huang S. Application of Trophoblast in Noninvasive Prenatal Testing. *Biomed. J. Sci & TechRes.* 2020; 28(2):21381-7.
 20. Bulmer J.N., Cioni R., Bussani C., Cirigliano V., Sole F., Costa C. et al. HLA-G positive trophoblastic cells in transcervical samples and their isolation and analysis by laser microdissection and QF-PCR. *Prenat. Diagn.* 2003; 23(1):34-9.
 21. Burgemeister R. New aspects of laser microdissection in research and routine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2005; 53(3):409-12.
 22. Mantzaris D., Cram D.S. Potential of syncytiotrophoblasts isolated from the cervical mucus for early non-invasive prenatal diagnosis: Evidence of a vanishing twin. *Clinica Chimica Acta.* 2015; 438:309-15.
 23. Мусатова Е.В., Гвеленева А.А., Мартынов А.В., Маркова Ж.Г., Шилова Н.В. Сравнение методов амплификации единичных клеток трофобласта с целью их последующего анализа с помощью метафазной сравнительной геномной гибридизации. *Генетика.* 2018; 54(9):1092-9.
 24. Moser G., Drewlo S., Huppertz B., Armant D.R. Trophoblast retrieval and isolation from the cervix: origins of cervical trophoblasts and their potential value for risk assessment of ongoing pregnancies. *Hum. Reprod. Update.* 2018; 24(4):484-96.
 25. Ferreira L.M., Meissner T., Tiburgs T., Strominger J.L. HLA-G: at the interface of maternal-fetal tolerance. *Trends in Immunology.* 2017; 38(4):272-86.
 26. Bolnick J.M., Kilburn B.A., Bajpayee S., Reddy N., Jeelani R., Crone B. et al. Trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC) for noninvasive prenatal screening at 5 to 20 weeks of gestation. *Fertil. Steril.* 2014; 102(1):135-142.e6.96.
 27. Jain C.V., Kadam L., van Dijk M., Kohan-Ghadr H.R., Kilburn B.A., Hartman C., et al. Fetal genome profiling at 5 weeks of gestation after noninvasive isolation of trophoblast cells from the endocervical canal. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8(363):363re4.
 28. Мусатова Е.В., Капустина М.В., Миньженкова М.Е., Маркова Ж.Г., Тарлычева А.А., Шилова Н.В. Использование трофобластов цервикального канала для неинвазивной пренатальной детекции частых анеуплоидий. Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2020;19(4):75-80.
 29. Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T., Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1997; 45 (1):49-53.
 30. Tantengco O.A.G, Richardson L., Lee A., Kammala A.K, Kim S., Medina P.M.B. et al. Histocompatibility antigen, class I, G (HLA-G)'s role during pregnancy and parturition: a systematic review of the literature. *Life.* 2021; 11:1061.
 31. Bianchi D.W., Williams J.M, Sullivan L.M., Hanson F.W., Klinger K.W., Shuber A.P. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61:822-9.

REFERENCES

1. Liehr T. False-positives and false-negatives in on-invasive prenatal testing (NIPT): what can we learn from a meta-analyses on >750,000 tests? *Molecular. Cytogenetics.* 2022; 15(1):36.
2. Salomon L.J., Sotiriadis A., Wulff C.B., Odibo A., Akolekar R. Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2019; 54(4):442-51.
3. Ashoor G., Syngelaki A., Poon L.C., Rezende J.C., Nicolaides K.H. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2013; 41(1):26-32.
4. Palomaki G.E., Kloza E.M., Lambert-Messerlian G.M. DNA sequencing of maternal plasma to detect Down syndrome: an international clinical validation study. *Genet. Med.* 2011; 13(11):913-20.
5. Norton M.E., Brar H., Weiss J., Karimi A., Laurent L.C., Caughey A.B. et al. Non-invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2012; 207(2):137.e1-8.
6. Hui L. Noninvasive prenatal testing for aneuploidy using cell-free DNA - New implications for maternal health. *Obstet. Med.* 2016;9(4):148-52.
7. Vossaert L., Chakchouk I., Zemet R., Van den Veyver I.B. Overview and recent developments in cell-based noninvasive prenatal testing. *Prenat. Diagn.* 2021; 41(10):1202-14.
8. Herzenberg L.A., Bianchi D.W., Schröder J., Cann H.M., Iverson G.M. Fetal cells in the blood of pregnant women: Detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76(3):1453-5.

9. Gänshirt-Ahlert D.M., Burschik M., Garritsen H.S., Helmer L., Miny P., Horst J. et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1992; 166(5):1350-5.
10. Zolotukhina T.V., Shilova N.V. Fetal cells in maternal blood: recovering by fluorescence-activated cell sorting. Early prenatal diagnosis, fetal cells and DNA in the mother, present state and perspectives. In: Macek M. Sr., Bianchi D., Cuckle H. eds. Prague: Charles University in Prague: The Karolinum Press; 2002; 121-31.
11. 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; 53(3):331-6.
12. Vona G., Beroud C., Benachi A., Quenette A., Bonnefont J.P., Romana S. et al. Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells in maternal blood. *Am. J. Pathol.* 2002; 160(1):51-8.
13. Mouawia H., Saker A., Jais J.P., Benachi A., Bussièrès L., Lacour B. 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(5):508-20.
14. Sibiak R., Wender-Ozegowska E. Methods of detection and isolation of trophoblast cells from trans-cervical specimens – a historical overview. *Medical Journal of Cell Biology.* 2021; 9(4):170-6.
15. Cioni R., Bussani C., Scarselli B., Barciulli F., Bucciantini S., Simi P. Detection of fetal cells in intrauterine lavage samples collected in the first trimester of pregnancy. *Prenat. Diagn.* 2002; 22(1):52-5.
16. Cioni R., Bussani C., Scarselli B., Bucciantini S., Barciulli F., Scarselli G. et al. Fetal cells in cervical mucus in the first trimester of pregnancy. *Prenat Diagn.* 2003; 23(2):168-171.
17. Fang C.N., Kan Y.Y., Hsiao C.C. Detection of fetal cells from trans-cervical mucus plug before first-trimester termination of pregnancy by cytokeratin-7 immunohistochemistry. *J. Obstet Gynaecol Res.* 2005; 31(6):500-7.
18. Imudia A.N., Suzuki Y., Kilburn B.A., Yelian F.D., Diamond M.P., Romero R. et al. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study. *Hum Reprod.* 2009; 24(9):2086-92.
19. Wu L., Li R., Ye O., Huang S. Application of Trophoblast in Noninvasive Prenatal Testing. *Biomed. J. Sci & TechRes.* 2020; 28(2):21381-7.
20. Bulmer J.N., Cioni R., Bussani C., Cirigliano V., Sole F., Costa C. et al. HLA-G positive trophoblastic cells in transcervical samples and their isolation and analysis by laser microdissection and QF-PCR. *Prenat. Diagn.* 2003; 23(1):34-9.
21. Burgemeister R. New aspects of laser microdissection in research and routine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2005; 53(3):409-12.
22. Mantzaris D., Cram D.S. Potential of syncytiotrophoblasts isolated from the cervical mucus for early non-invasive prenatal diagnosis: Evidence of a vanishing twin. *Clinica Chimica Acta.* 2015; 438:309-15.
23. Musatova E.V., Tveleneva A.A., Martynov A.V., Markova Z.G., Shilova N.V. Comparison of Amplification Methods of Single Trophoblast Cells for Their Subsequent Analysis Using Metaphase Comparative Genomic Hybridization. *Genetika.* 2018; 54(9):1111-6. (in Russian)
24. Moser G., Drewlo S., Huppertz B., Armant D.R. Trophoblast retrieval and isolation from the cervix: origins of cervical trophoblasts and their potential value for risk assessment of ongoing pregnancies. *Hum. Reprod. Update.* 2018; 24(4):484-96.
25. Ferreira L.M., Meissner T., Tiburgs T., Strominger J.L. HLA-G: at the interface of maternal-fetal tolerance. *Trends in Immunology.* 2017; 38(4):272-86.
26. Bolnick J.M., Kilburn B.A., Bajpayee S., Reddy N., Jeelani R., Crone B. et al. Trophoblast retrieval and isolation from the cervix (TRIC) for noninvasive prenatal screening at 5 to 20 weeks of gestation. *Fertil. Steril.* 2014; 102(1):135-142.e6.96.
27. Jain C.V., Kadam L., van Dijk M., Kohan-Ghadr H.R., Kilburn B.A., Hartman C., et al. Fetal genome profiling at 5 weeks of gestation after noninvasive isolation of trophoblast cells from the endocervical canal. *Sci. Transl. Med.* 2016; 8(363):363re4.
28. Musatova E.V., Kapustina M.V., Minzhenkova M.E., Markova Zh.G., Tarlycheva A.A., Shilova N.V. Use of cervical trophoblasts for non-invasive prenatal detection of frequent aneuploidies. *Voprosy ginekologii, akusherstva I perinatologii.* 2020; 19(4):75-80. (in Russian)
29. Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T., Takata K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1997; 45 (1):49-53.
30. Tantengco O.A.G., Richardson L., Lee A., Kammala A.K., Kim S., Medina P.M.B. et al. Histocompatibility antigen, class I, G (HLA-G)'s role during pregnancy and parturition: a systematic review of the literature. *Life.* 2021; 11:1061.
31. Bianchi D.W., Williams J.M., Sullivan L.M., Hanson F.W., Klinger K.W., Shuber A.P. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61:822-9.