

© В.В. Грабарь

УДК 618.3-06-076.5

**В.В. Грабарь**

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСЦЕРВИКАЛЬНЫХ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКИХ КЛЕТОК, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Центр репродукции человека «САНА-МЕД» (г. Харьков)

Данное исследование проводилось в рамках научной темы «Разработка методов диагностики, лечения и профилактики в перинатальной охране плода и нарушении репродуктивной функции», № гос.регистрации 0104U002231.

**Вступление.** Прогнозирование рождения здорового ребенка является одним из приоритетных направлений перинатальной медицины, и наиболее важной задачей является поиск неинвазивных методов диагностики в максимально ранние сроки беременности. Таким методом может быть исследование трансцервикальных трофобластических клеток, которые могут быть выявлены с помощью специфических моноклональных антител, распознающих экспрессируемые на клетках трофобласта маркеры [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11].

Нами проводилось исследование трансцервикальных трофобластических клеток иммуногистохимическим методом с последующим проведением fluorescence in situ hybridization на маркированных клетках для определения анеуплоидий и пола у плода [2, 3], но морфологические критерии трансцервикальных трофобластических клеток ранее не описывались.

**Целью настоящего исследования** явилось описание основных морфологических типов трансцервикальных трофобластических клеток при проведении иммуногистохимического исследования (ИГХ).

**Объект и методы исследования.** Исследование включало следующие этапы: забор трансцервикальных проб, приготовление мазков на стеклах, ИГХ-этап.

Забор цервикальной слизи произведен эндоскопической щеточкой у 116 пациенток в сроках беременности 6-12 нед. с одноплодной беременностью после получения их информированного согласия. Щеточка погружалась в 2-3 мл среды М-199 с добавлением антибиотика; далее для очищения от слизи образцы обрабатывались 3% 600 µl уксусной кислоты, после 10 мин. инкубации клетки отмывались 3 раза путем центрифугирования при 190 g и ресуспензировались в фосфатно-буферном растворе. Приготовленные на стекле мазки высушивались и до проведения ИГХ хранились в 95% этиловом спирте.

При проведении ИГХ стекла каждой пациентки обрабатывались смесью моноклональных антител (mAbs): MCA2043 (Serotec, США), распознающими HLA-G, экспрессирующиеся на клетках экстравиллезного трофобласта, в разведении 1:150

и SC-21733, моноклональные IgG, идентифицирующие фетальный ядерно-специфичный маркер матричную металлопептидазу MMP9 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA). Комплекс трофобластспецифический маркер-антитела определяли с использованием ABC Staining System (sc-2017, Santa Cruz, США). Для подсчета ядер применялась окраска гематоксилином. Препараты осматривались при увеличении 400 с использованием микроскопа Nikon Eclipse 80i (Япония), изображения фиксировались цифровой камерой (CCD-1300QB, VDS, Германия).

Критерием связывания клетки трофобласта с mAbs являлось коричневое окрашивание цитоплазмы и ядер, при этом форма клеток, ядерно-цитоплазматическое отношение, интенсивность окрашивания были различными. Материнские (цервикальные) клетки имели голубое окрашивание цитоплазмы и более темную окраску ядра.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Трофобластические клетки нами были выявлены в препаратах 98 пациенток (84,5 %), их общее количество составило 637, а среднее число клеток на 1 пациентку - 6,5.

Наиболее часто нам встречались отдельные экстравиллезные трофобластические клетки (171, 26,8 %) с четкими контурами, правильной овальной или круглой формы, темной цитоплазмой, на фоне которой контурировалось темное конденсированное ядро с различной степенью конденсации, гомогенной цитоплазмой, ядерно-цитоплазматическое отношение составило 1:2-1:3 (**рис. 1а, б, в**).

Материнские клетки имеют голубую окраску с темно-синими ядрами, с низким ядерно-цитоплазматическим отношением.

Экстравиллезные трофобластические клетки – темно-коричневые, с более темными ядрами, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

В 20,7 % (132) мы визуализировали округлые или овоидные, гомогенные, темно-коричневые ядра трофобластических клеток (**рис. 2**).

В 17,9 % (114) выявлялись экстравиллезные трофобластические клетки с четкими контрастными контурами, более светлой цитоплазмой, темно-коричневым округлым ядром, одинаковой формой и конденсацией ядра, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (1:1) (**рис. 3**).

Материнская клетка голубой окраски.

Экстравиллезная трофобластическая клетка – светло-коричневая, с темным ядром, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

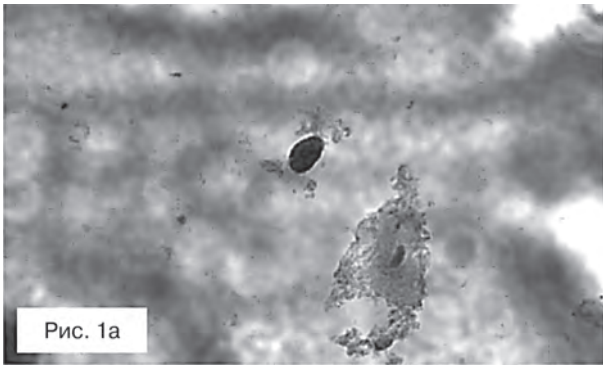


Рис. 1а

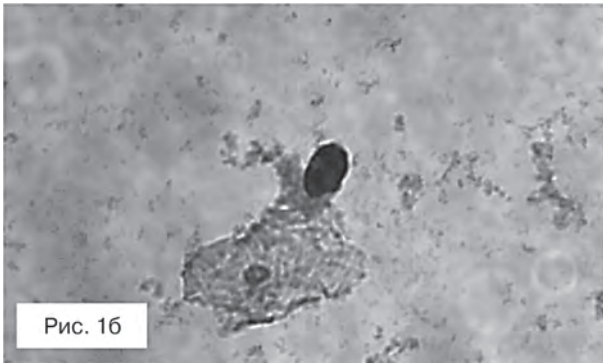


Рис. 1б

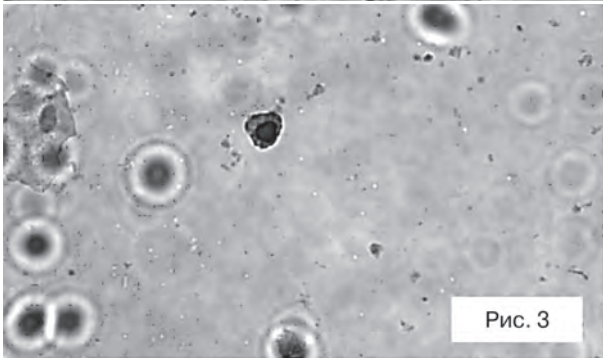


Рис. 3

Рис. 1а, б, в. Материнские и трофобластические клетки после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (ув. 400х).

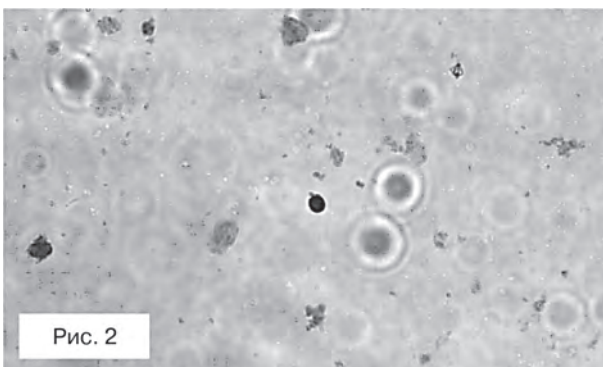


Рис. 2

Рис. 2. Свободное ядро трофобластической клетки, лишённое цитоплазмы, после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (ув. 400х).

В 13,0 % (83) мы выявили клетки синцитиотрофобласта с множественными ядрами в общей цитоплазме синцитиума. Ядра внутри одного участка синцитиума имели равные размеры, но различались в различных участках синцитиума (рис.4).

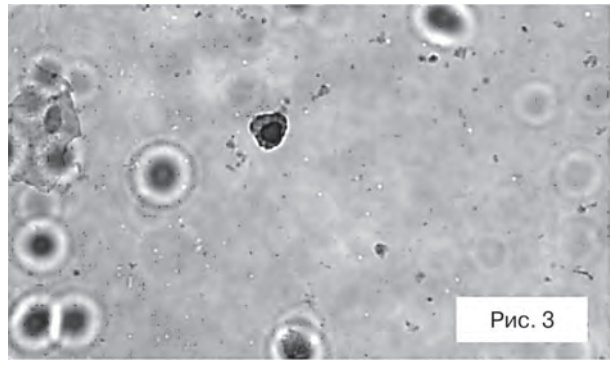


Рис. 3

Рис. 3. Материнская и трофобластическая клетки после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (ув. 400х).

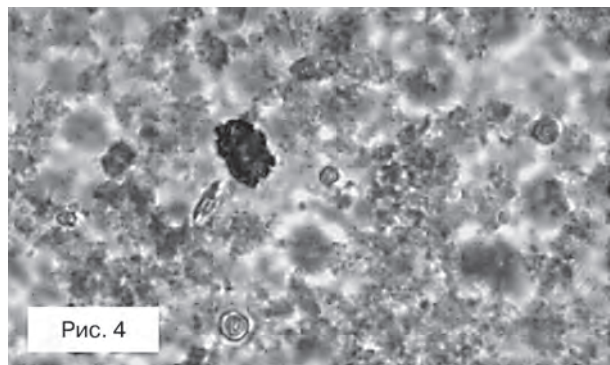


Рис. 4

Рис. 4. Клетка синцитиотрофобласта среди участков цитоплазмы материнских клеток после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (ув. 400х).

В 8,0 % (51) мы выявляли экстравиллезные трофобластические клетки с крупным конденсированным ядром, с гомогенной коричневой цитоплазмой, без четко очерченных границ, с ядерно-цитоплазматическим отношением – 1:1-1:3 (рис.5 а, б).

В 6,0 % (38) визуализировались экстравиллезные трофобластические клетки полигональной формы с крупным округлым ядром, с ядерно-цитоплазматическим отношением - 2:1-3:1 (рис. 6а, б).

В 3,9 % (25) выявлялись экстравиллезные трофобластические клетки, формирующие скопления либо с другими трофобластическими клетками либо с материнскими клетками. После ИГХ-обработки они выглядели как множественные ядра различных размеров, формы, плотности с аморфной коричневой цитоплазмой (рис. 7)

В 3,7 % (23) нам встречались «слепки» экстравиллезных трофобластических клеток, ядра которых располагались в один ряд, были практически одинаковых размеров и плотности, цитоплазма определялась в виде равномерного ободка цитоплазмы (рис. 8а, б).

Таким образом, трофобластические клетки, которые при связывании с mAbs и последующей окраске приобретают характерный коричневый цвет, имеют морфологические особенности, наиболее важными из которых является высокое ядерно-цитоплазматическое отношение, что лежит в основе свойств этих клеток – низкой дифференцировки и способности к быстрому делению [1].

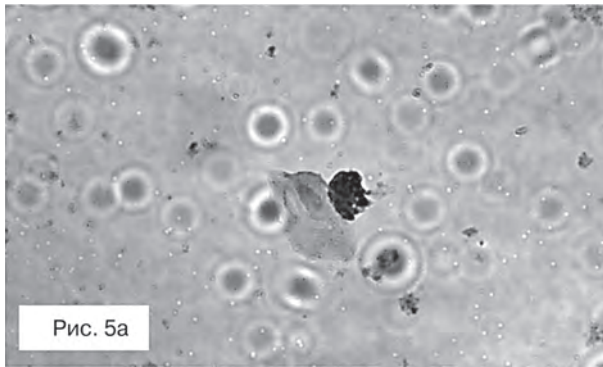


Рис. 5а

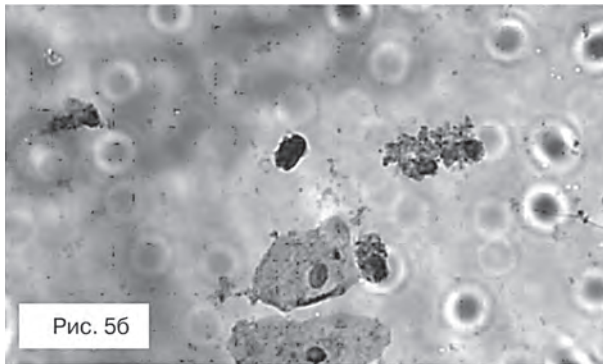


Рис. 5б

Рис. 5 а, б. Экстравиллезные трофобластические клетки – темно-коричневые, без четко очерченных границ; материнские клетки голубой окраски - после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (ув. 400х).

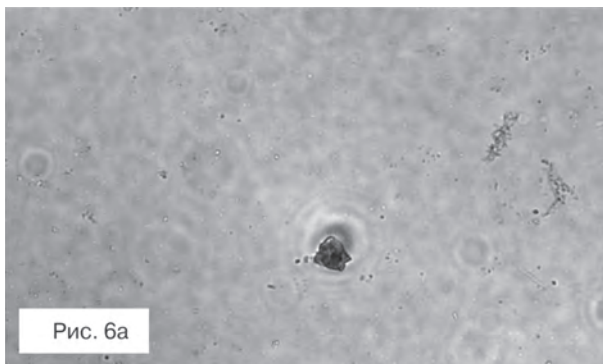


Рис. 6а

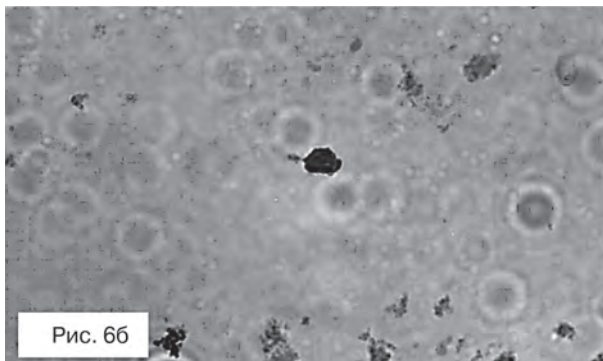


Рис. 6б

Рис. 6 а, б. Экстравиллезные трофобластические клетки коричневого цвета полигональной формы на фоне обломков материнских клеток голубого цвета - после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (ув. 400х).

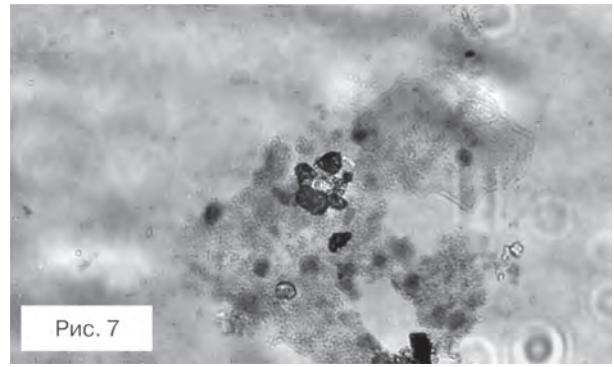


Рис. 7

Рис. 7. Скопления экстравиллезных трофобластических клеток коричневого цвета на фоне скопления голубых материнских клеток - после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (ув. 400х).

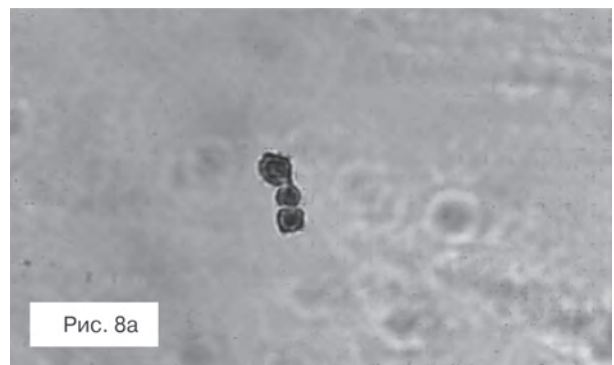


Рис. 8а

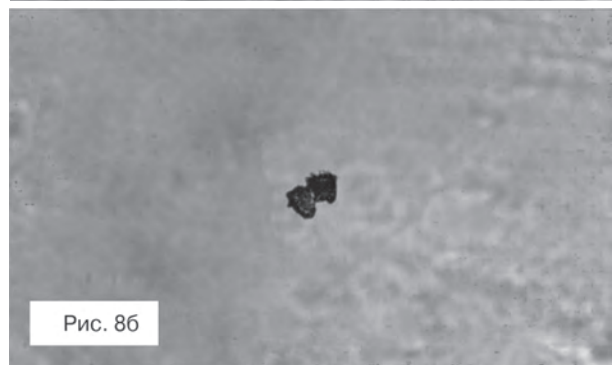


Рис. 8б

Рис. 8 а, б. «Слепки» экстравиллезных трофобластических клеток коричневого цвета, ядра которых располагаются в один ряд - после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (ув. 400х).

**Выводы.** Трофобластические клетки имеют признаки, отличающие их от материнских цервикальных клеток. Выявленные морфологические особенности трансцервикальных трофобластических клеток могут повысить диагностическую ценность данного метода.

**Перспективы дальнейших исследований.** Планируется внедрение данной методики для ранней диагностики хромосомных заболеваний, определению пола эмбриона, что является актуальным для прогнозирования сцепленных с полом заболеваний.

## Список литературы

1. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты / В.С. Баранов. – СПб: Издательство Н-Л, 2007. – 640с.
2. Грабарь В.В. Возможности идентификации трансцервикальных трофобластических клеток с помощью иммуногистохимического метода и fluorescence in situ hybridization (FISH) / В.В. Грабарь, А.М. Феськов, Е.С. Жилкова // Вестник проблем биологии медицины. – 2011. – Вып. 2, Т.3 (86). – С.238–242.
3. Грабарь В.В. Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий с использованием трансцервикальных трофобластических клеток при вспомогательной репродукции / В.В. Грабарь, А.М. Феськов, Е.С. Жилкова // Здоровье женщины. – 2011. – №2 (58). – С. 185–188.
4. Федорова Н.И. Значение эмбриональных клеток, выделенных из цервикального канала, в ранней неинвазивной пренатальной диагностике / Н. И. Федорова, Н. К. Тетруашвили, Т. А. Демуря [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2010. – №1. – С.28–30.
5. Adinolfi M. Fetal cells in transcervical samples at an early stage of gestation / M. Adinolfi, J. Sherlock // Journal of Human Genetics. – 2001. – № 46. – P. 99–104.
6. Bischoff. F. Z. Endocervical fetal trophoblast for prenatal genetic diagnosis / F.Z. Bischoff, J.L. Simpson // Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. – 2006. – Vol. 18. – № 2. – P. 216–220.
7. Ergin T. Non-invasive early prenatal diagnosis using fluorescent in situ hybridization on transcervical cells: comparison of two different methods for retrieval / T. Ergin // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2001. – Vol. 5. – № 1. – P. 37–41.
8. Imudia A. N. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study / A.N. Imudia, Y. Suzuki, B. A. Kilburn [et al.] // Human Reproduction. – 2009. – Vol. 24 (9). – P. 2086–2092.
9. Imudia A.N. Transcervical retrieval of fetal cells in the practice of modern medicine: a review of the current literature and future direction / A. N. Imudia, S. Kumar, M. P. Diamond [et al.] // Fertility and sterility. – 2010. – Vol. 93 (6). – P. 1725–1730.
10. Mantzaris D. Preliminary report: correct diagnosis of sex in fetal cells isolated from cervical mucus during early pregnancy / D. Mantzaris // The Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology. – 2005. – Vol. 45 (6). – P. 56–60.
11. Miller D. Transcervical recovery of fetal cells from the lower uterine pole: reliability of recovery and histological/immunocytochemical analysis of recovered cell populations / D. Miller, J. Briggs, M. Rahman, M. Griffith-Jones // Human Reproduction. – 1999. – Vol. 14. – №2. – P.521–531.

УДК 618.3-06-076.5

### МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСЦЕРВИКАЛЬНЫХ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКИХ КЛЕТОК, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Грабарь В.В.

**Резюме.** Изучались морфологические особенности трансцервикальных трофобластических клеток, маркированных специфическими mAbs. Клеточные элементы трофобластического генеза имели специфическое коричневое окрашивание, в 66,3 % это были клетки экстравиллезного трофобласта, в 20,7 % - лишённые цитоплазмы «свободные» ядра, в 13,0 % - клетки синцитиотрофобласта. Характерной особенностью трансцервикальных трофобластических клеток было высокое ядерно-цитоплазматическое отношение.

**Ключевые слова:** неинвазивная пренатальная диагностика, трансцервикальные трофобластические клетки, ИГХ.

УДК 618.3-06-076.5

### МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАНСЦЕРВІКАЛЬНИХ ТРОФОБЛАСТИЧНИХ КЛІТИН, ІДЕНТИФІКОВАНИХ ІМУНОГІСТОХІМІЧНИМ МЕТОДОМ

Грабар В.В.

**Резюме.** Вивчалися морфологічні особливості трансцервікальних трофобластичних клітин, маркованих специфічними mAbs. Клітинні елементи трофобластичного генезу мали специфічне коричневе забарвлення, в 66,3% це були клітини екстравіллезного трофобласта, в 20,7% - позбавлені цитоплазми «вільні» ядра, в 13,0% - клітини синцитіотрофобласту. Характерною особливістю трансцервікальних трофобластичних клітин було високе ядерно-цитоплазматичне відношення.

**Ключові слова:** неінвазивна пренатальна діагностика, трансцервікальні трофобластичні клітини, ІГХ.

UDC 618.3-06-076.5

### Morphological Characteristic Of Transcervical Trophoblastic Cells Identified By Immunohistochemical Method

Grabar V.V.

**Summary.** We studied the morphological features of transcervical trophoblastic cells labeled with specific mAbs. Cellular elements of trophoblastic origin were peculiar brown staining, in 66.3% of these were extravillous trophoblast cells, in 20.7% - cell-free nucleus without cytoplasm, in 13.0% - syncytiotrophoblast cells. A characteristic feature of transcervical trophoblastic cells had high nuclear-cytoplasmic ratio.

**Key words:** noninvasive prenatal diagnosis, transcervical trophoblastic cells, IHC.

Стаття надійшла 24.02.2012 р.