

# Неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий с использованием трансцервикальных трофобластических клеток при вспомогательной репродукции

**В.В. Грабарь<sup>1</sup>, А.М. Феськов<sup>1,2</sup>, Е.С. Жилкова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Центр репродукции человека «САНА-МЕД»

<sup>2</sup>Харьковский национальный медицинский университет

Изучалась возможность неинвазивной пренатальной диагностики анеуплоидий с использованием трансцервикальных трофобластических клеток у беременных после вспомогательной репродукции. Показано, что трофобластические клетки могут быть идентифицированы среди материнских с использованием моноклональных антител, распознающих трофобластический маркер HLA-G, а последующее проведение fluorescence in situ hybridization (FISH) на этих клетках позволяет выявить анеуплоидии эмбриона. С использованием данной методики в 6 нед беременности нами выявлены анеуплоидии 47XYY и 45X0, подтвержденные цитогенетическим исследованием ворсин хориона и амниоцитов. Таким образом, после дальнейших исследований данный неинвазивный метод может использоваться для ранней пренатальной диагностики анеуплоидий.

**Ключевые слова:** неинвазивная пренатальная диагностика, анеуплоидии, трансцервикальные трофобластические клетки, вспомогательная репродукция.

Благодаря изменению социальной среды, сексуальной и контрацептивной революции, нежеланных детей рождается все меньше. Но при этом у супружеских пар появляются трудности с зачатием из-за распространения позднего материнства, накопления заболеваний репродуктивной системы.

В настоящее время вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) позволяют успешно преодолевать многие виды бесплодия [3, 15].

Частота применения ВРТ постоянно возрастает: если до 2000 г. в мире с помощью ВРТ родились 200 000 детей, то к настоящему моменту детей «из пробирки» более миллиона [8, 14].

По совокупным данным репродуктивных клиник, в США частота рождений с помощью ВРТ составляет более чем 1% от всех родов, в европейских странах – 2–3%, в Израиле – до 4% [7].

Основными задачами, стоящими перед ВРТ на сегодняшний день, является достижение более широкого внедрения в клиническую практику и расширение возможностей лечения на фоне снижения частоты осложнений для матери и риска рождения больного ребенка [2].

Вопрос о потенциальной связи вспомогательной репродукции с рождением детей с врожденной патологией широко дискутируется. За последние годы опубликованы сообщения об увеличении количества редких болезней генетического импринтинга у детей после ВРТ (синдром Прадера–Вилли, Ангельмана) [10, 11]. Установлено также, что при использовании интрацитоплазматической инъекции сперматозоида специфической врожденной проблемой является рождение детей с гипоспадией, что может быть связано с отцовской субфертильностью [16]. Существенным фактором, повышающим риск хромосомной патологии у

плодов при ВРТ, является поздний репродуктивный возраст многих супругов [1].

Несмотря на упомянутые риски, бесплодные пары в позднем репродуктивном возрасте и с нарушениями в репродуктивной сфере будут стремиться к биологическому родителству, поэтому при вспомогательной репродукции особую актуальность приобретает предгестационная и ранняя пренатальная диагностика [2].

Существующая система пренатальной диагностики врожденной патологии плода заключается в последовательном проведении биохимического и ультразвукового скрининга, на основании которых рассчитывается индивидуальный риск хромосомной патологии, и при высоком риске (более 1:300) рекомендуется проведение инвазивной пренатальной диагностики [13].

Изучение психологического фона у беременных в программах ВРТ выявило у них повышенную тревожность за исход беременности, в связи с чем такие пациентки зачастую отказываются от биопсии хориона или амниоцентеза, несмотря на низкий риск осложнений после данных процедур [4, 12].

**Цель** работы – изучить возможности неинвазивной пренатальной диагностики с использованием трофобластических клеток, выделенных из цервикальной слизи матери после вспомогательной репродукции.

В основе нашего исследования лежали данные о возможности идентификации клеток трофобласта в цервикальной слизи с помощью морфологических методов и специфических моноклональных антител, распознающих экспрессируемые на клетках трофобласта маркеры [4, 8, 11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами обследованы 15 пациенток, беременность у которых была получена в программах ВРТ, в сроках беременности 6–12 нед. В исследование включены женщины с одноплодной беременностью после получения их информированного согласия.

Возрастной диапазон пациенток составил 28–39 лет, их мужей – 30–45 лет. У 11 пар диагностировано женское бесплодие (из них у 7 – трубное, у 4 – эндокринное), у 4 пар – мужское.

Обследование включало забор трансцервикальных проб, приготовление мазков на стеклах, иммуногистохимический (ИГХ) этап и FISH. Забор трансцервикальной слизи проводился цервикальной щеточкой, которая затем погружалась в 2–3 мл среды М-199 с добавлением антибиотика; далее для очищения от слизи образцы обрабатывались 3% 600  $\mu$ л 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 (всего 6 на каждую пациентку) высушивались и до проведения ИГХ хранились в 95% этиловом спирите.

В ходе ИГХ стекла обрабатывались моноклональными антителами МСА2043 (Serotec, Великобритания), распознающими HLA-G, которые экспрессируются на клетках трофобласта. Комплексы HLA-G – антитела определялись с использованием ABC Staining System (sc-2017, Santa Cruz, США). Для подсчета ядер применялась окраска гематоксилином. Препараты осматривались при увеличении 400х с использованием микроскопа Nikon Eclipse 80i (Япония), изображения фиксировались цифровой камерой (CCD-1300QB, VDS, Германия).

HLA-G-позитивные клетки трофобласта после ИГХ имели коричневую окраску различной интенсивности, правильную овальную или полигональную форму, с различным ядерно-цитоплазматическим соотношением. После идентификации плодовых клеток отмечались их координаты, удалялись ИГХ-реактивы и проводилась FISH, при этом результаты FISH считывались с зарегистрированных на этапе ИГХ координат.

Для проведения FISH-диагностики на плодовых клетках использовались специальные методы отмывки препарата и фиксация клеток плода в растворах метанола и уксуса (в соотношении 3:1) и 100% метанола. Для визуализации анализа был использован флуоресцентный микроскоп Nikon Eclipse 80i, для документирования результата применялась цитогенетическая программа Lucia FISH (LIM, Чехия). Для проведения анализа методом FISH использованы ДНК-зонды Vysis (США).

Анализ анеуплоидий для плодовых клеток методом FISH проводился в 2 этапа. Для проведения анализа использовался стандартный протокол Vysis (США). На первом этапе проводился анализ анеуплоидий половых хромосом X и Y (СЕР X (DXZ1) Alpha Satellite DNA Spectrum Aqua; СЕР Y (DYZ3) Alpha Satellite DNA Spectrum Orange). На втором этапе была проведена диагностика плодовых клеток на наличие анеуплоидий хромосом 13, 18 и 21 (LSI 13 Spectrum Green, СЕР 18(D18Z1) Alpha Satellite DNA Spectrum Aqua, LSI 21 Spectrum Orange).

Пол ребенка устанавливался при УЗИ в 12–16 нед беременности. При подозрении на анеуплоидию проводился амниоцентез в сроке 16 нед. При неразвивающейся беременности проводилось цитогенетическое исследование хориона. Цитогенетические исследования клеток хориона и амниоцитов проведены по общепринятым методикам [5].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из проведенных обследований 15 беременных на ИГХ-этапе HLA-G-позитивные клетки выявлены в 13 случаях (86,7%).

Среднее количество HLA-G-позитивных клеток было 6,3 на трансцервикальные пробы одной пациентки, при этом учитывались данные всех шести стекол.

Среднее число клеток, в которых прошла реакция FISH, было 3,66. Данные FISH сравнивались с результатами, полученными при кариотипировании клеток хориона при неразвивающейся беременности или амниоцитов при прогрессирующей беременности.

У обследованных женщин при FISH нами не выявлено анеуплоидий по 21, 18, 13 хромосомам, по-видимому, из-за малого количества наблюдений. В 2 случаях были диагностированы анеуплоидии по половым хромосомам. Наши результаты согласуются с данными других исследователей о преобладании у эмбрионов количественных аномалий гоносом над аутосомными анеуплоидиями [1, 2].

Результаты FISH в трансцервикальных трофобластических клетках по половым хромосомам представлены в таблице.

Результаты FISH в трансцервикальных трофобластических клетках по хромосомам X, Y

Номер случая	Срок беременности, недели	Кол-во ИГХ-позитивных клеток	Кол-во FISH-позитивных клеток	Пол и/или хромосомная аберрация	Успех/ неудача трансцервикального теста
1	5	0	0	XX	-
2	10	5	2	XX	+
3	8	6	3	XY	+
4	6	8	2	XYY	+
5	7	2	0	XX	-
6	11	4	3	XY	+
7	9	15	10	XX	+
8	6	3	2	XY	ложный
9	12	6	5	XY	+
10	7	10	6	XX	+
11	10	8	4	XY	+
12	7	9	5	XO	+
13	11	3	3	XY	+
14	8	9	6	XX	+
15	10	7	4	XY	+

Примечания: «+» – верное определение пола с помощью FISH в трансцервикальных трофобластических клетках; «-» – нет результата в связи с отсутствием FISH-позитивных клеток; «ложный» – неверное определения пола с помощью FISH в трансцервикальных трофобластических клетках.

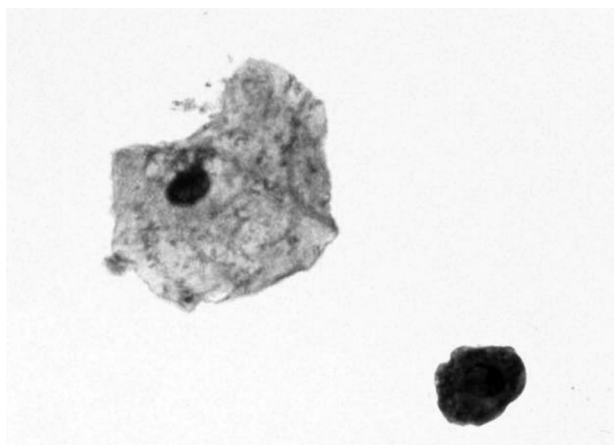
Для оценки эффективности данной методики в таблице представлены результаты исследований при однократном заборе материала у пациенток. Два случая негативного результата связаны с отсутствием HLA-G-клеток в образце или с малым их количеством. У 1 из этих женщин (случай 1) впоследствии диагностирована неразвивающаяся беременность с кариотипом хориона 46XX, у другой пациентки (случай 5) взяты повторные образцы, в которых выявлены трофобластические клетки, но эти результаты не включены в таблицу.

В 1 случае была ложная диагностика пола плода. В реакции FISH определены 2 сигнала XX, соответствующие женскому генотипу, тогда как при УЗИ в 12 нед беременности и при последующих осмотрах был установлен мужской пол плода, что подтвердилось при рождении ребенка. Вероятно, это вызвано неспецифическим связыванием анти-HLA-G-антител с материнскими клетками и последующей FISH-реакцией на них.

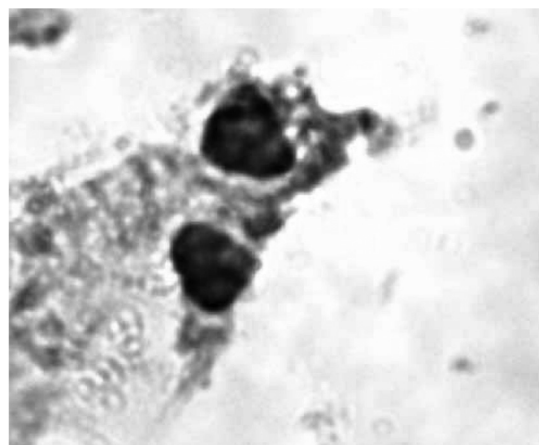
У остальных пациенток пол эмбриона установлен правильно, что было подтверждено у 11 при УЗИ, у 2 – кариотипированием хориона (при неразвивающейся беременности) и у 1 – цитогенетическим исследованием амниоцитов (при прогрессирующей беременности).

Представляем 2 случая выявленных анеуплоидий по гоносомам.

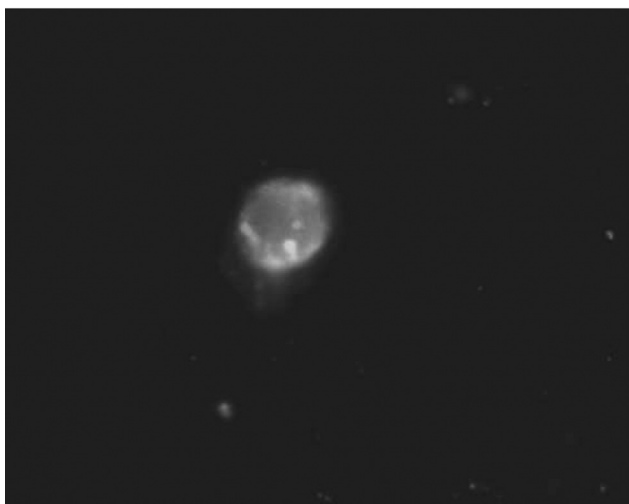
В случае 4 при FISH на ИГХ-маркированных клетках (рис. 1) нами зарегистрировано 2 красных и 1 голубой сигнал, соответствующие генотипу XYY (рис. 2). При этом при УЗИ в сроках 4–6 нед не было каких-либо отклонений от нормального течения ранней беременности. При биохимиче-



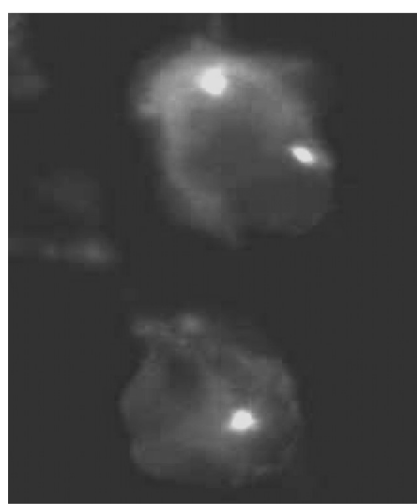
**Рис. 1. Материнская и трофобластическая клетка после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (увеличение 400)**  
Материнская клетка имеет голубую окраску с темно-синим ядром, трофобластическая клетка – темно-коричневую окраску с более темным ядром



**Рис. 4. Ядра материнской и трофобластической клеток после проведения ИГХ+окраска гематоксилином (увеличение 400 )**  
Ядро материнской клетки имеет темно-синюю окраску, ядро трофобластической клетки – темно-коричневую окраску

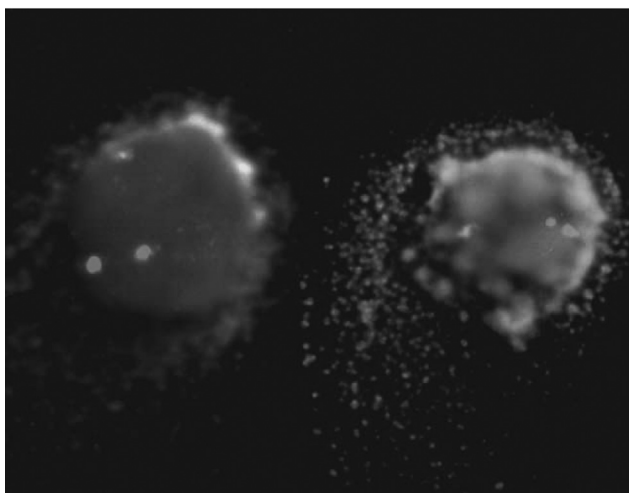


**Рис. 2. FISH трансцервикальной трофобластической клетки**  
В ядре визуализируются 2 красных сигнала, соответствующих Y-хромосоме, и 1 голубой, соответствующий X-хромосоме



**Рис. 5. FISH материнской и трансцервикальной трофобластической клетки**

В верхнем ядре (материнском) визуализируются 2 голубых сигнала, соответствующих X-хромосоме, в нижнем (трофобластическом) ядре визуализируется 1 голубой сигнал, соответствующий X-хромосоме



**Рис. 3. FISH амниоцитов**  
В ядрах визуализируются 2 красных сигнала, соответствующих Y-хромосоме, и 1 голубой, соответствующий X-хромосоме

ском скрининге I триместра в 10–11 нед закономерно не найдено каких-либо изменений (РАРР-А – 1,2 МоМ, free β-ХГЧ – 0,8 МоМ), при УЗ-скрининге маркеров хромосомной и другой патологии плода не выявлено, диагностирован мужской пол плода.

В 16 нед данной пациентке был проведен амниоцентез, при FISH амниоцитов подтвержден генотип XYU (рис. 3), а результаты цитогенетического исследования амниоцитов установили кариотип 47XYU.

В связи с отсутствием влияния данной анеуплоидии на соматическое здоровье ребенка семья приняла решение донашивать беременность. Цитогенетическое исследование на препаратах метафазных хромосом лимфоцитов периферической крови показало нормальный кариотип родителей, но в связи с астенозооспермией у мужа проводился FISH спермы, выявивший более 2% анеуплоидий по половым хромосомам в ядрах сперматозоидов.

Беременность у данной пациентки протекает без осложнений, в настоящее время срок гестации 30 нед.

Во втором случае (№ 12) в 7 нед беременности в ИГХ-маркированных клетках (рис. 4) при FISH была выявлена моносомия X0 (рис. 5), подтвержденная цитогенетическим исследованием хориона в 9 нед (45X0); забор хориона для кариотипирования произведен при выскабливании матки в связи с неразвивающейся беременностью.

### ВЫВОДЫ

Данный метод неинвазивной пренатальной диагностики с использованием трансцервикальных трофобластических клеток может использоваться для ранней диагностики хромосомной патологии эмбриона после дальнейшей оценки его эффективности.

### Неінвазивна пренатальна діагностика анеуплоїдій з використанням трансцервікальних трофобластичних клітин після допоміжної репродукції

**V.V. Grabar, O.M. Fes'kov, E.S. Zhilkova**

Вивчалася можливість неінвазивної пренатальної діагностики анеуплоїдій з використанням трансцервікальних трофобластичних клітин у вагітних після допоміжної репродукції. Показано, що трофобластичні клітини можуть бути ідентифіковані серед материнських з використанням моноклональних антитіл, що розпізнають трофобластичний маркер HLA-G, а подальше проведення FISH на цих клітинах дозволяє виявити анеуплоїдії ембріона. З використанням даної методики в 6 тиж вагітності нами виявлені анеуплоїдії 47XYY та 45X0, підтверджені цитогенетичним дослідженням ворсин хоріона та амніоцитів. Отже, після подальших досліджень даний неінвазивний метод може використовуватися для ранньої пренатальної діагностики анеуплоїдій.

**Ключові слова:** неінвазивна пренатальна діагностика, анеуплоїдії, трансцервікальні трофобластичні клітини, допоміжна репродукція.

### Noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidy using transcervical trophoblastic cells in assisted reproduction

**V.V. Grabar, A.M. Feskov, E.S. Zhilkova**

The possibility of noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidy using transcervical trophoblastic cells in pregnant women in assisted reproduction was investigated. It is shown that trophoblastic cells could be identified among the maternal cells using monoclonal antibodies recognizing trophoblastic marker HLA-G, and the subsequent applying of FISH on these cells reveals aneuploidy of embryo. By using this technique in 6 weeks' gestation we found aneuploidy 47XYY and 45X0, confirmed by cytogenetic study of chorionic villi and amniocytes. This non-invasive procedure could provide a useful platform for prenatal diagnosis of early pregnancy after further investigation to establish its efficacy.

**Key words:** noninvasive prenatal diagnosis, aneuploidy, transcervical trophoblast cells, assisted reproduction.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития человека: Научно-практические аспекты / Баранов В.С., Кузнецова Т.В. – СПб.: Издательство Н-Л, 2007. – 640 с.
2. Глинкина Ж.И. Диагностика и профилактика врожденных и наследственных заболеваний при вспомогательных репродуктивных технологиях: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Рос. ун-т дружбы народов, 2008. – 42 с.
3. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия. Теоретические и практические подходы: Руководство / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова. – 2-е изд., доп. – М.: МИА, 2004. – 781 с.
4. Abu-Musa A.A., Nassar A.H., Usta I.M. Attitude of women with IVF and spontaneous pregnancies towards prenatal screening // Human Reproduction. – 2008. – Vol. 23, № 11. – P. 2438–2443.
5. Bahado-Singh R.O., Kliman H., Feng T.Y. et al. First-trimester endocervical irrigation – feasibility of obtaining trophoblast cells for prenatal-diagnosis // Obstetrics & Gynecology. – 1995. – Vol. 85. – P. 461–464.
6. Czepulkowski B. Analyzing chromosomes. The basics / London, BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. – 205 p.
7. El-Chaar D., Yang Q., Gao J., Bottomley J, Leader A. Risk of birth defects increased in pregnancies conceived by assisted human reproduction // Fertility and sterility. – 2008. – Vol. 92, № 5. – P. 1557–1561.
8. Hansen M., Bower C., Milne E., de Klerk N., Kurinczuk J. Assisted reproductive technologies and risk of birth defect – a systematic review // Human Reproduction. – 2005. – Vol. 20, № 8. – P. 328–338.
9. Imudia A.N., Kumar S., Diamond M.P., DeCherney A.H., Armant D.R. Transcervical retrieval of fetal cells in the practice of modern medicine: a review of the current literature and future direction // Fertility and sterility. – 2010. – Vol. 93, 6. – P. 1725–1730.
10. Lucifero D., Chaillet J.R., Trasler J.M. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology // Human reproduction update. – 2004. – Vol. 10, № 1. – P. 3–18.
11. Manipalviratn S., DeCherney A., Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology // Fertility and sterility. – 2009. – Vol. 19, № 2. – P. 305–315.
12. Miller D., Briggs J., Rahman M, Griffith-Jones M. Transcervical recovery of fetal cells from the lower uterine pole: reliability of recovery and histological/immunocytochemical analysis of recovered cell populations // Human Reproduction. – 1999. – Vol. 14, № 2. – P. 521–531.
13. Nicolaides K.H. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks // Prenatal Diagnosis. – 2011. – Vol. 31, № 1. – P. 7–15.
14. Reefhuis J., Honein M.A., Schieve L.A., Correa A., Hobbs C.A., Rasmussen S.A. Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States // Human reproduction. – 2009. – Vol. 24, № 2. – P. 360–366.
15. Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives / Edited by Gardner D.K., Weissman A., Howles C.M., Shoham Z. Second edition. – London and New York., Taylor&Francis Group, 2004. – 984 p.
16. Wennerholm U.B., Bergh C., Hamberger L., Lundin K., Nilsson L., Wikland M. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI // Human Reproduction. – 2000. – Vol. 15, № 4. – P. 944–948.