

# Μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος από εμβρυϊκά κύτταρα και ελεύθερο εμβρυϊκό DNA στο αίμα της μητέρας

X. Χατζησεβαστού-Λουκίδου

Α΄ Παιδιατρική κλινική ΑΠΘ, Γ.Π.Ν.Θ., “Ιπποκράτειο”, Θεσσαλονίκη

**Περίληψη.** Η προγεννητική διάγνωση από εμβρυϊκά κύτταρα τα οποία κυκλοφορούν στο αίμα της μητέρας είναι μέθοδος ασφαλής, ακριβής και εφαρμόζεται πρώιμα (10η-11η εμβρυϊκή εβδομάδα). Τα κυκλοφορούντα εμβρυϊκά κύτταρα είναι λευκοκύτταρα, τροφοβλάστες και εμπύρνηνα ερυθροκύτταρα. Υπάρχουν τεχνικές δυσκολίες στην απομόνωσή τους, διότι είναι σπάνια (περίπου 1εμβρυϊκό κύτταρο ανά ml μητρικού αίματος) και είναι εύθραυστα. Κατάλληλα θεωρούνται τα εμπύρνηνα ερυθροκύτταρα, τα οποία έχουν ένα πλήρες φορτίο του γενετικού υλικού του εμβρύου στον πυρήνα τους. Μέχρι σήμερα έγινε προγεννητική διάγνωση εμβρύων με σύνδρομο Klinefelter (47,XXY), τρισωμίας 21, τρισ. 18, τρισ. 13, 69, XXX, α-, β-αιμοσφαιρινοπαθειών, κυστικής ίνωσης, νόσου Duchenne, προσδιορισμός του γενότυπου Rh(D) σε έγκυες Rh (D) αρνητικές. Καμιά απόφαση δεν έχει ληφθεί για διακοπή κύησης μόνο με το αποτέλεσμα διάγνωσης από εμβρυϊκά κύτταρα, διότι σε όλες τις περιπτώσεις παράλληλα εφαρμόστηκε και μια από τις τρέχουσες επεμβατικές μεθόδους (αμνιοκέντηση ή λήψη χοριακής λάχνης). Η προγεννητική διάγνωση από εμβρυϊκά κύτταρα στο αίμα της μητέρας δεν μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί ως κλινική εξέταση ρουτίνας.

**Λέξεις-κλειδιά:** εμβρυϊκοί εμπύρνηνοι ερυθροβλάστες, τεχνική FISH, PCR, προγεννητική διάγνωση.

**Hatzisevastou-Loukidou H. Non invasive prenatal diagnosis by fetal cells and free fetal DNA analysis in maternal blood.** Cytogenetic Lab, 1<sup>st</sup> Pediatric Clinic, Aristotle University of Thessaloniki, “Hippokration” Gen. Hospital, Thessaloniki - Grece. *Paediatr N Gr* 2002, 14: 372- 381.

*Prenatal diagnosis by fetal cells from maternal blood is a safe and accurate method, which, is applied early (10th-11th fetal week). The current fetal cells are leucocytes, trophoblasts and erythroblasts. There are technical difficulties in their isolation, due to the fact that they are rare (approximately 1 fetal cell per ml of maternal blood) and they are fragile. The erythroblasts, which have a full charge of the genetic material of the fetus in their nucleus, are considered appropriate. Until today the prenatal diagnosis that has taken place is of Klinefelter syndrome (47,XXY), trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13, 69,XXX, α- and β- hemoglobinopathies, cystic fibrosis (CF), Duchenne muscular dystrophy, determination of Rh (D) genotype for pregnancies in which the mother has Rh (D) negative status. No decision was made for the termination of a pregnancy based on the result of fetal cells analysis, due to the fact that in all cases a current invasive method was applied (amniocenteses or CVS). Prenatal diagnosis from fetal cells in the maternal blood cannot be used yet as a routine clinical examination.*

**Key words:** FNRBCs, FISH, PCR, prenatal diagnosis

Η έρευνα στην προγεννητική διάγνωση τα τελευταία δέκα χρόνια έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη μιας ασφαλούς και ακριβούς μεθόδου διαφορετικής από τις εφαρμοζόμενες επεμβατικές και μη επεμβατικές, διότι οι μη επεμβατικές μέθοδοι ενέχουν ιατρογενείς κινδύνους απώλειας του εμβρύου (αμνιοκέντηση -κίνδυνος 1/200, λήψη χοριακών λαχνών- κίνδυνος 2%, ομφαλοκέντηση -κίνδυνος 3-4%), οι δε μη επεμβατικές μέθοδοι δηλ. το ορολογικό screening test και το υπερηχογράφημα του εμβρύου έχουν μια υψηλή ψευδώς θετική διαγνωστική τιμή, η οποία είναι περίπου 5%<sup>1</sup>. Ένας πρόσθετος υπό μελέτη παράγων είναι η δημογραφική αλλαγή η οποία συμβαίνει στον αναπτυγμένο κόσμο σχετικά με την ηλικία των εγκύων γυναικών. Γενικά οι γυναίκες, όταν αποφασίσουν να κάνουν παιδί είναι πιο προχωρημένης ηλικίας από όσο τα προηγούμενα χρόνια. Επόμενο είναι να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για εμβρυϊκή ανευπλοειδία μητρικής προέλευσης. Επειδή αυτά τα ζευγάρια γενικά έχουν μόνο ένα ή δύο παιδιά πολλά δεν είναι πρόθυμα να εκτεθούν στον ιατρογενή κίνδυνο απώλειας του εμβρύου που σχετίζεται με τις επεμβατικές προγεννητικές μεθόδους<sup>2</sup>. Ένα άλλο ζήτημα είναι ότι καμιά από τις τρέχουσες μη επεμβατικές μεθόδους δεν μπορεί να διαγνώσει μονογονιδιακά νοσήματα του εμβρύου. Αναμφίβολα η δυνατότητα προσέγγισης στο γενετικό υλικό του ανθρώπου θα ανατρέψει την ιατρική γενετική με συνέπεια όλο και μεγαλύτερη διεύρυνση του πεδίου της προγεννητικής διάγνωσης. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες βοήθησαν στην πυροδότηση της σύγχρονης έρευνας, με στόχο την τεκμηρίωση και την εφαρμογή άλλων μη επεμβατικών μεθόδων με πρακτική εφαρμογή, ικανών να διαγνώσουν ένα ευρύ φάσμα γενετικών καταστάσεων του εμβρύου. Αναδύθηκαν δυο νέες μέθοδοι ικανές να στοχεύσουν σ' αυτά τα θέματα:

1<sup>η</sup> η απομόνωση των εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της εγκύου γυναίκας και

2<sup>ο</sup> η πολύ πρόσφατη ανακάλυψη ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία<sup>3,4</sup>.

Οι τύποι των κυκλοφορούντων εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της μητέρας είναι: λευκοκύτταρα, τροφοβλαστικά, εμπύρηνια ερυθροκύτταρα<sup>5,6</sup>.

### Λευκοκύτταρα

Τα εμβρυϊκά λεμφοκύτταρα φαίνεται ότι κυκλοφορούν στη μητρική κυκλοφορία αρκετά νωρίς από τη 15η εβδομάδα της κύησης<sup>1,3</sup>. Ο διαχωρι-

σμός τους από το μητρικό αίμα με anti-HLA αντισώματα έχει δυο ενδογενείς δυσκολίες. Η πρώτη είναι ο τρομακτικός πολυμορφισμός των θέσεων HLA, ο οποίος καθιστά το διαχωρισμό μέσω των αντισωμάτων δύσκολο. Η δεύτερη είναι η μη πατρότητα, η οποία δημιουργεί πρόβλημα αν ο διαχωρισμός βασιστεί μόνο στις πατρικής προέλευσης HLA θέσεις. Οι στρατηγικές διαχωρισμού λεμφοκυττάρων είναι ακόμη πιο σύνθετες διότι οι επιφάνειες των εμβρυϊκών λεμφοκυττάρων εγγενώς δεν διαφέρουν από αυτές των μητρικών πανομοιότυπων λεμφοκυττάρων και ακόμη διότι υπάρχει το περιεργό φαινόμενο της παραμονής τους στο μητρικό αίμα για μεγάλο χρονικό διάστημα μέχρι 5 χρόνια μετά τον τοκετό. Έχει αναφερθεί η παρουσία τους ακόμη και 27 χρόνια μετά τον τοκετό<sup>7</sup>.

Η μακρά επιβίωση των κυττάρων αυτής της σειράς δημιουργεί δυσκολίες στο να καθοριστεί αν τα κύτταρα που απομονώθηκαν προέρχονται από την παρούσα εγκυμοσύνη. Γι' αυτό δεν προτιμούνται για διαχωρισμό και διάγνωση<sup>4,6</sup>.

### Τροφοβλαστικά κύτταρα

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα αποτελούν ελκυστικό υλικό για το διαχωρισμό εμβρυϊκών κυττάρων και αυτό προκύπτει από τη μοναδική τους μορφολογία και τη στενή τους σχέση με το μητρικό αίμα. Σχηματίζονται πολύ νωρίς στην εγκυμοσύνη. Παρόλα αυτά πολλοί ερευνητές είχαν δυσκολίες να τα διαχωρίσουν από την κυκλοφορία της εγκύου γυναίκας, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην αποτελεσματική κάθαρση του οργανισμού της από αυτά τα "ξένα σώματα", αφού αυτά εισέρχονται στην μητρική πνευμονική κυκλοφορία<sup>8</sup>. Από πολύ νωρίς το 1893 ο παθολόγος Schmorl βεβαίωσε την παρουσία τροφοβλαστών σε παθολογοανατομικά παρασκευάσματα πνευμόνων εγκύου γυναίκας που απεβίωσε από εκλαμψία<sup>9,10</sup>.

Η μεγαλύτερη δυσκολία για τον διαχωρισμό των τροφοβλαστών από το μητρικό αίμα είναι η έλλειψη κατάλληλων και ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων για την διευκόλυνση αυτού του διαχωρισμού.

Υπάρχουν δυο πιθανές δυσκολίες στη χρήση των τροφοβλαστικών κυττάρων για τη μη επεμβατική εμβρυϊκή κυτταρογενετική διάγνωση: α) η πολυπυρηνική φύση τους και β) το φαινόμενο του περιορισμένου μωσαϊκισμού του πλακούντα<sup>9,11</sup>. Είναι γνωστό ότι 1% των περιπτώσεων των καρπου-

πων από κύτταρα του πλακούντα διαφέρουν από αυτούς των εμβρύων, διότι παρουσιάζουν μωσαϊκισμό, ο οποίος δεν διαπιστώνεται στο αίμα του εμβρύου. Επιπλέον η πολυπυρηνική συγκυτιακή φύση της τροφοβλάστης μπορεί να περιπλέκει την ανάλυση με τεχνική FISH, διότι η δυσδιάγνωση του φθορίζοντος σήματος από τον πυρήνα του κυττάρου είναι βασικής σημασίας για τη διάγνωση<sup>12</sup>.

### Εμπύρηνα ερυθροκύτταρα

Η είσοδος των εμβρυϊκών κυττάρων στην μητρική κυκλοφορία διαπιστώθηκε το 1957 από τους Creger και Steele<sup>11</sup>. Τα εμπύρηνα ερυθροκύτταρα αντιπροσωπεύουν ένα καλό στόχο εμβρυϊκού κυτταρικού πληθυσμού για πειραματισμούς σε μεθόδους διαχωρισμού, επειδή είναι απίθανο να κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα ενός φυσιολογικού ενήλικου ατόμου. Είναι όμως παρόντα σε σημαντικό αριθμό στο αίμα των πολύ μικρής ηλικίας εμβρύων. Τα NRBCs (Nucleated Red Blood Cells τα αρχέγονα αιμοποιητικά προγονικά πολυδύναμα κύτταρα) εξ ορισμού περιέχουν ένα πυρήνα και έχουν ένα πλήρες φορτίο από τα γονίδια του. Επειδή τα NRBCs είναι σχεδόν πλήρως διαφοροποιημένα και έχουν διάρκεια ζωής περίπου 3 μηνών, είναι πιθανόν να προέρχονται από την παρούσα κύηση που ερευνάται.

Τα NRBCs στο μητρικό αίμα ταυτοποιούνται από τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά: α) χρώνονται με ειδικές τεχνικές χρώσης λόγω της παρουσίας της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Kleihauer-Betke τεχνικές)<sup>13</sup>, β)εμπεριέχουν ειδικές αλληλουχίες του Y-χρωμοσώματος σε έγκυες που κυοφορούν αρσενικό έμβρυο<sup>8,12,14</sup> γ) αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα του υποδοχέα της τρανσφερρίνης (CD71), ο οποίος εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα που περιέχουν σίδηρο. Αν και ο ενθουσιασμός για τη χρήση των NRBCs άξιζε τα τελευταία χρόνια και οι ερευνητές εστίασαν το ενδιαφέρον τους στο διαχωρισμό τους, έχουν συγκεντρωθεί παρατηρήσεις οι οποίες προηγουμένως δεν είχαν αξιολογηθεί<sup>14</sup> και οι οποίες υποδηλώνουν ότι κυκλοφορούν και μητρικά NRBCs στη μητρική κυκλοφορία. Επίσης παρατηρήθηκε ότι γυναίκες με προεκλαμψία είχαν σημαντικά αυξημένο αριθμό κυκλοφορούντων NRBCs και αυξημένο ελεύθερο εμβρυϊκό DNA πριν ακόμη εκδηλωθούν τα συμπτώματα της προεκλαμψίας<sup>15-17</sup>.

### Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA

Πολύ πρόσφατα ερευνήθηκε η παρουσία ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα της μητέρας<sup>1,15,18</sup>. Εφαρμογή της τεχνικής PCR για αλληλουχίες του Y-χρωμοσώματος σε δείγματα πλάσματος εγκύων γυναικών με μη επιπελεγμένη κύηση έδειξε, ότι σε όλες τις κύσεις με αρσενικό έμβρυο, όχι όμως σε αυτές με θήλυ, διαπιστώθηκαν χαμηλά επίπεδα DNA του Y χρωμοσώματος από την 7<sup>η</sup>-16<sup>η</sup> εβδομάδα, το οποίο άξιζε σταθερά μετά τις 24 εβδομάδες, έκανε μια αιχμή στον τοκετό και μειωνόταν γρήγορα μετά από αυτόν<sup>15,19</sup>.

Επίσης από άλλες έρευνες φάνηκε ότι το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA ήταν αυξημένο σε μητέρες με ανευλοειδικά έμβρυα και σε εκείνες που ανέπτυξαν προεκλαμψία<sup>15,17</sup>.

### Συχνότητα των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα

Στο παρελθόν υπολογίστηκε ότι η συχνότητα των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα ποίκιλε από 1/10<sup>5</sup> με 1/10<sup>9</sup>.<sup>20</sup> Έχουν χρησιμοποιηθεί δύο μέθοδοι για τον υπολογισμό των εμβρυϊκών κυττάρων: η τεχνική FISH και PCR<sup>21</sup>. Σε αίμα εγκύων με έμβρυα με 46,XY ο μέσος όρος κυττάρων που διαπιστώθηκε ήταν περίπου 1 εμβρυϊκό κύτταρο ανά ml μητρικού αίματος<sup>22</sup>. Άλλοι ερευνητές πολύ πρόσφατα βρήκαν 2-6 εμβρυϊκά κύτταρα ανά ml περιφερικού μητρικού αίματος<sup>18,22</sup>. Χαρακτηριστικό είναι ότι σε δείγματα αίματος εγκύων που κυοφορούσαν έμβρυα με 47,XY+21 ο αριθμός των εμβρυϊκών κυττάρων ήταν εξαπλάσιος ή ο μέσος όρος ήταν 116 εμβρυϊκά κύτταρα σε 16 ml μητρικού αίματος. Ήταν δηλ. σημαντικά αυξημένος ο αριθμός των εμβρυϊκών κυττάρων που διαπιστώθηκε, όταν το έμβρυο ήταν ανευλοειδικό. Αυτό δείχνει ότι ο διαχωρισμός των εμβρυϊκών κυττάρων από το μητρικό αίμα θα είναι ευκολότερος και πιο ακριβής για τα ανευλοειδικά έμβρυα<sup>23</sup>.

### Χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα

Καθώς μεγαλώνει η πλακουντιακή επιφάνεια επαφής του εμβρύου και της μητέρας, τόσο περισσότερα εμβρυϊκά κύτταρα έχουν την ευκαιρία να περάσουν τον πλακουντιακό φραγμό. Καθώς η εγκυμοσύνη εξελίσσεται μειώνονται οι σχετικές αναλογίες εμπυρήνων προς μη εμπύρηνα ερυθρο-

κύτταρα<sup>19</sup>. Ο χρόνος εμφάνισης των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα προσδιορίστηκε με λεπτομέρεια σε δείγματα περιφερικού αίματος εγκύων γυναικών στις οποίες υπήρχε ακρίβεια στην ηλικία της κύησης, γιατί η σύλληψη έγινε με εξωσωματική γονιμοποίηση. Διαπιστώθηκαν αλληλουχίες του Y-χρωμοσώματος από τις 4 εβδομάδες και 5 ημέρες της κύησης<sup>24</sup>. Άλλη ομάδα ερευνητών έδειξε ότι το εμβρυϊκό DNA είναι αναγνωρίσιμο στη μητέρα στο α' τρίμηνο της κύησης, διότι το είχαν διαπιστώσει σε όλες τις κύσεις που ελέγχθηκαν στις 7 εβδομάδες και είχε εξαφανισθεί στους 2 μήνες μετά τον τοκετό. Δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τον τύπο των εμβρυϊκών κυττάρων από τα οποία προερχόταν το DNA, όμως πιθανότατα στις 5-8 εβδομάδες προερχόταν από τροφοβλάστη. Για τη μελέτη της εξαφάνισης των εμπτυρικών εμβρυϊκών κυττάρων από το μητρικό αίμα μετά τον τοκετό επιχειρήθηκε να διαπιστωθεί η παρουσία του Y χρωμοσώματος με FISH και PCR. Σε 7 ημέρες και από άλλους σε ένα μήνα μετά τον τοκετό διαπιστώθηκε θετικό σήμα για το Y-χρωμόσωμα με την τεχνική FISH σε γυναίκες που γέννησαν αγόρια<sup>24</sup>. Σε τρεις μήνες μετά τον τοκετό δεν ανευρέθησαν εμβρυϊκά κύτταρα στο μητρικό αίμα με καμιά από τις παραπάνω μεθόδους ανάλυσης<sup>18</sup>.

### Παραμονή των εμβρυϊκών κυττάρων μετά τον τοκετό

Η πιθανότητα της παραμονής των εμβρυϊκών κυττάρων μετά τον τοκετό είναι ένα σοβαρό θέμα, επειδή υπάρχει η πιθανότητα διαγνωστικού λάθους από γενετική ανάλυση κυττάρων τα οποία προέρχονται από προηγούμενη εγκυμοσύνη. Έχει προσδιοριστεί η ύπαρξη αρσενικών λεμφοκυττάρων στο μητρικό αίμα 1-5 χρόνια μετά την γέννηση αρσενικού νεογνού. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την τεχνική PCR για αλληλουχίες του Y-χρωμοσώματος<sup>25,26</sup>. Επίσης διαπιστώθηκε παρουσία αρσενικών λεμφοκυττάρων σε έγκυες, οι οποίες είχαν γεννήσει ένα αγόρι μεταξύ 6 μηνών και 27 ετών προηγούμενα<sup>7</sup>. Ότι η εγκυμοσύνη μπορεί να επιφέρει μια κατάσταση φυσιολογικού μικροχαιρισμού ήταν μια μη αναμενόμενη παρατήρηση. Ευτυχώς το εμβρυϊκό NRBC είναι ένα κύτταρο διαφοροποιημένο σχετικά με τη διάρκεια ζωής η οποία είναι 90 ημέρες. Εστιάζοντας τις προσπάθειες διαχωρισμού στα εμβρυϊκά NRBCs φαίνεται, ότι οι γενετικές

πληροφορίες θα σχετίζονται με την υπό εξέλιξη κύηση<sup>27</sup>.

Η ανακάλυψη της μακράς παραμονής των CD 34+, CD 38+ εμβρυϊκών προγονικών κυττάρων επισημαίνει την ανάγκη για καλύτερη κατανόηση των ανοσοβιολογικών μεταβολών, οι οποίες συμβαίνουν στις γυναίκες μετά μια κύηση<sup>28,29</sup>. Πολύ πρόσφατα υπήρξε μια άποψη, ότι το νόσημα σκληρόδεσμα αναπτύσσεται σαν μια νόσος μοσχεύματος (έμβρυο) κατά του ξενιστή (μητέρα). Αποκαλύπτονται αποδείξεις που δείχνουν την παρουσία ασυνήθως υψηλού αριθμού αρσενικών κυττάρων (προηγηθέντος εμβρύου) στο περιφερικό αίμα γυναικών προσβεβλημένων από βαρύ σκληρόδεσμα. Το γεγονός ότι τα εμβρυϊκά κύτταρα θα μπορούσαν να παραμείνουν για δεκαετίες και θα σχετίζονται με την αιτιολογία αυτοανοσοποιητικών νοσημάτων είναι μια νέα άποψη. Υπάρχουν έρευνες σε εξέλιξη για να ανιχνεύσουν και να επεκτείνουν αυτές τις προκαταρκτικές δημοσιεύσεις<sup>30-32</sup>.

### Τεχνικές διαχωρισμού

Όπως προαναφέρθηκε τα εμβρυϊκά κύτταρα είναι σπάνια στο αίμα της μητέρας. Στις ευπλοειδικές εγκυμοσύνες έχει διαπιστωθεί ένας μέσος όρος 1 εμβρυϊκού κυττάρου ανά ml πλήρους μητρικού αίματος. Όμως είναι αναγκαίες κάποιες μορφές εμπλουτισμού των εμβρυϊκών κυττάρων για να επιτευχθεί περαιτέρω γενετική ανάλυση. Είναι πιθανές δύο στρατηγικές: «θετική» συλλογή εμβρυϊκών κυττάρων ή κυττάρων τα οποία συγκεντρώνουν χαρακτηριστικά ανωριμότητας και «αρνητική» με αφαίρεση των μη αναγκαίων μητρικών κυττάρων. Μερικές ομάδες ερευνητών συνδυάζουν και τις δύο στρατηγικές<sup>33</sup>.

Σήμερα δεν υπάρχει εμφανώς υπερέχουσα εργαστηριακή μέθοδος διαχωρισμού των εμβρυϊκών κυττάρων<sup>34,35</sup>.

Πρωτοποριακή μέθοδος απόκτησης εμβρυϊκού DNA είναι η με μικροχειρισμούς σε μεμονωμένα NRBCs, τα οποία απεσπάστησαν από παρασκευάσματα αίματος από αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου και ακολούθως εφαρμόστηκε PCR σε ένα μόνο κύτταρο<sup>36</sup>. Οι ερευνητές αυτοί με φυσικό διαχωρισμό κάθε φορά ενός μόνο υποψήφιου εμβρυϊκού κυττάρου έκαναν διάγνωση ενός μόνο γονιδίου, επειδή απουσίαζαν από την αντίδραση οι χιλιάδες από τα πιθανά προσμειγμένα μητρικά κύτταρα.

## Αντισώματα και αναγνωριστές εμβρυϊκών κυττάρων

Επειδή η κύηση διεγείρει το αιμοποιητικό σύστημα της μητέρας, απελευθερώνονται στην κυκλοφορία της άωρα αιμοποιητικά μητρικά κύτταρα<sup>34,39</sup>. Η ιδεώδης κατάσταση θα ήταν να αναγνωρίζονται μόνο εμβρυϊκά κύτταρα και να μη συμβαίνει διασταυρούμενη αντίδραση με ένα υποσύνολο προγονικών μητρικών κυττάρων. Ατυχώς ασαφείς ενδείξεις δείχνουν ότι υπάρχει μια τέτοια αντίδραση. Οι φυσιολογικές διαφορές που υπάρχουν μεταξύ των εμβρυϊκών και των μητρικών ερυθροκυττάρων περιλαμβάνουν: α) διαφορετικούς τύπους αιμοσφαιρίνης β) διαφορετικά ισομερή της καρβονικής ανυδράσης, και γ) την παρουσία της γλυκοζο-6-φωσφατάσης. Τα πιο συχνά μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των εμβρυϊκών κυττάρων είναι: του υποδοχέα της τρανσφερρίνης (CD 71), του ανθρώπινου πλακουντιακού γαλακτογόνου (FD020N), κοινά αντιγόνα λευκοκυττάρων (CD 45), ώριμων T κυττάρων (CD 3), κοκκιοκυττάρων (CD 13, 32)<sup>39</sup>.

Παρατηρήθηκε μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της ηλικίας της κύησης και της έκφρασης εκείνων των αντιγόνων που προερχόταν από τα εμπύρινα εμβρυϊκά κύτταρα. Επιπλέον, έμβρυα με χρωμοσωμικές ανωμαλίες και/ή πολλαπλές ανωμαλίες της κατασκευής, πάντοτε ήταν ανώριμα σχετικά με την ηλικία της κύησης και εξέφραζαν υψηλότερα επίπεδα των υπό έρευνα αντιγόνων, συγκρινόμενα με φυσιολογικά έμβρυα<sup>16,17</sup>. Όμως, όταν το έμβρυο ήταν ανευπλοειδικό ή είχε πολλαπλές ανωμαλίες, τότε οι διαφορές μεταξύ των εμβρυϊκών κυττάρων και των αώρων μητρικών κυττάρων μεγάλωναν σημαντικά.

Σήμερα για τον προσδιορισμό του εμβρυϊκού κυττάρου γίνεται ταυτόχρονη χρήση της FISH και μονοκλωνικού αντισώματος για την γ-άλυσο της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης<sup>36,37</sup>. Ερευνητές διαπίστωσαν ένα μέσο όρο 3 εμβρυϊκών κυττάρων θετικών στην εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη σε 15 ml αίματος γυναικών που κυοφορούσαν φυσιολογικά έμβρυα. Αυτή η παρατήρηση δείχνει ότι η περιορισμένη απόκτηση εμβρυϊκών κυττάρων αιτιολογείται από την ευθραυστότητα των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα, από την αρχόμενη απόπτωση και το ποιοτικά πτωχό DNA.

Αν και συχνά χρησιμοποιήθηκε η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (ή η γ-άλυσος αυτής) για τη διαπί-

στώση των εμβρυϊκών κυττάρων, τώρα είναι υπό έρευνα άλλες πρωτεΐνες ή RNA αλληλουχίες. Σ' αυτές περιλαμβάνονται οι εμβρυονικές αιμοσφαιρίνες (και ε-και ζ-άλυσοι), HLA-G και HASH-2<sup>38</sup>.

## Μοριακή κυτταρογενετική

Φυσιολογικά κάθε κύτταρο θα πρέπει να περιέχει δυο αντίγραφα από κάθε αυτοσωμικό χρωμόσωμα. Αν υπάρχουν περισσότερα από δυο αντίγραφα ενός χρωμοσώματος, τότε το έμβρυο θα είναι κλινικά προσβεβλημένο. Η ανάπτυξη της τεχνικής FISH επέτρεψε τον σχεδιασμό εξειδικευμένων εξετάσεων για γρήγορη, εύκολη προγεννητική διάγνωση των μεγάλων χρωμοσωμικών ανευπλοειδιών.

Σήμερα υπάρχουν ειδικά χρωμοσωμικά DNA probes για όλα τα χρωμοσώματα του ανθρώπου<sup>37</sup>. Όταν χρησιμοποιούνται συνδεδεμένα με φθορίζουσα χρωστική, μπορεί με υβριδοποίησή τους να διαπιστωθούν χρωμοσώματα του ατόμου που μας ενδιαφέρει. Αυτή η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί σε μεταφασικά χρωμοσώματα αλλά και μεσοφασικό πυρήνα. Σχετικά με την ανάλυση των εμβρυϊκών κυττάρων που αποκτώνται από τη μητρική κυκλοφορία το πιο σημαντικό είναι ότι με τη χρήση αυτής της τεχνικής οι αριθμητικές ανωμαλίες είναι αναγνωρίσιμες και στον μεσοφασικό πυρήνα.

Μέχρι σήμερα διαγνώστηκαν με επιτυχία από το αίμα της μητέρας έμβρυα με Klinefelter σύνδρομο (47,XXY), με τρισωμία 18, τρισωμία 13, τρισωμία 21, 69,XXX με <72 ωρών διάρκεια της διαδικασίας<sup>36,39-41</sup>.

## Διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων

Η τεχνική PCR έχει το πλεονέκτημα ότι διευκολύνει την παραγωγή του DNA σε μια εκθετική αύξηση του ποσού του, δηλαδή σε εκείνη τη ποσότητα που είναι ο επιθυμητός στόχος όταν παράγεται με ενζυματική σύνθεση.

Μέχρι πρόσφατα το μοναδικό εμβρυϊκό γενετικό υλικό που διαπιστώθηκε στην μητρική κυκλοφορία ήταν του Y χρωμοσώματος προερχόμενο από αρσενικά έμβρυα<sup>5,26,27</sup>.

Σήμερα είναι δυνατή η διάγνωση εμβρυϊκών γονιδίων, αν η μητέρα έχασε τη μετάλλαξη ή τον πολυμορφισμό που φέρει ο πατέρας. Π.χ. έχει διαπιστωθεί σε μητρικό DNA που πολλαπλασιάστηκε με PCR, κληρονομήση στο έμβρυο μιας πατρικής μετάλλαξης της β-σφαιρίνης της αιμοσφαιρίνης

Lepore-Boston, άλλοι ερευνητές με αντιπροφλοβαστικά αντισώματα διέγνωσαν στο μητρικό αίμα πατρικές κληρονομικές μεταλλάξεις β-θαλασσαιμίας, άλλοι απέκτησαν εμβρυϊκό DNA με μικροχειρισμούς και απέκλεισαν την κληρονομικότητα της πατρικής μετάλλαξης της β-σφαιρίνης στο έμβρυο, επιβεβαιώνοντας μετά τον τοκετό ότι το έμβρυο δεν είχε β-θαλασσαιμία η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Ομοίως με χρήση PCR σε ένα κύτταρο άλλοι ερευνητές απέκλεισαν τη διάγνωση της μυϊκής δυστροφίας Duchenne σε μεμονωμένα εμβρυϊκά NRBCs συλλεχθέντα από επίχρισμα μητρικού αίματος<sup>42</sup>.

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν ότι ένα μόνο εμβρυϊκό κύτταρο μπορεί να δώσει DNA ολόκληρου του γενετικού υλικού. Στο μέλλον δυνητικά θα αναλύονται συγχρόνως πολλαπλά νοσήματα και /ή αλληλία<sup>43,44</sup>.

### Καλλιέργεια εμβρυϊκών αιμοποιητικών κυττάρων

Αν τα εμβρυϊκά κύτταρα μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν με καλλιέργειες, θα είχαν ξεπεραστεί οι τεχνικοί περιορισμοί της έρευνας με πολύ μικρούς αριθμούς εμβρυϊκών κυττάρων<sup>45</sup>. Θεωρητικά στο εργαστήριο θα μπορούσε να είναι πιθανός ένας σχεδιασμός εκλεκτικής προαγωγής της ανάπτυξης τους περισσότερο από τα μητρικά. Οι καλλιέργειες των εμβρυϊκών αρχέγονων αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων (fetal primitive haemopoietic progenitor cells) είναι πιο ευαίσθητες στην ερυθροποιητίνη από συγκρινόμενες καλλιέργειες οι οποίες περιέχουν κύτταρα ενηλίκων<sup>46,47</sup>. Επίσης η ανάπτυξη των εμβρυϊκών κυττάρων μπορεί να διεγερθεί με την προσθήκη ειδικών κυτταροκινών. Μερικές ομάδες ερευνητών έχουν δημοσιεύσει καταρχήν επιτυχίες σε καλλιέργειες

εμβρυϊκών κυττάρων. Αυτό αποτελεί ένα πεδίο για έρευνα.

### Εφαρμογές για προγεννητική διάγνωση

Η δυνατότητα διάγνωσης των ανευπλοειδιών βασισμένη στον μη επεμβατικό διαχωρισμό των εμβρυϊκών κυττάρων πρόκειται να αλλάξει τα μαιευτικά κριτήρια για τη διενέργεια των επεμβατικών διαδικασιών της προγεννητικής διάγνωσης. Προς το παρόν δεν είναι γνωστό αν η αποκάλυψη μιας εμβρυϊκής ανευπλοειδίας με ανάλυση των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μόνο σαν screening ή θα ήταν διαγνωστική. Η σχετική αξία των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα έναντι του screening στον μητρικό ορό φαίνεται στον πίνακα 1.

Το National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) από το 1994 μέχρι το 1998 διενήργησε έρευνα για να εκτιμηθεί κλινικά η ακρίβεια της διάγνωσης μιας ανευπλοειδίας στο έμβρυο, συγκρίνοντας όλες τις υπάρχουσες μεθόδους προγεννητικής διάγνωσης δηλ. την διαπίστωση ανευπλοειδίας από εμβρυϊκά κύτταρα που κυκλοφορούν στο μητρικό αίμα συγκριτικά από χοριακή λάχνη και αμνιοκέντηση. Το ακρωνύμιο για τη μελέτη ήταν NIFTY (National Institutes of Health Fetal Cell Study)<sup>48</sup>. Η αρχική πληθυσμιακή μελέτη αποτελείτο από γυναίκες που χαρακτηρίστηκαν ότι είναι “υψηλού κινδύνου” για εμβρυϊκή ανευπλοειδία. Όλες οι οποίες συμμετείχαν συμφώνησαν να υποστούν μια κλινικά ενδεδειγμένη επεμβατική διαγνωστική εξέταση, δηλ. αμνιοκέντηση ή λήψη χοριακής λάχνης. Κλινικές αποφάσεις για διακοπή της κύησης δεν θα παιρνονταν στηριγμένες μόνο στα αποτελέσματα του αίματος. Ο σκοπός του προγράμματος ήταν να χρησιμο-

**Πίνακας 1.** Σχετικά πλεονεκτήματα μη επεμβατικών screening εμβρυϊκής ανευπλοειδίας

Ανάλυση ορού	Εμβρυϊκά κύτταρα
Αποκάλυψη 60% των περιπτώσεων της τρισ. 21	Αποκάλυψη άγνωστη προς το παρόν
Ψευδώς θετική τιμή 5%	Ψευδώς θετική τιμή <1%
Ψευδώς θετικές περιπτώσεις επιβάλλουν περαιτέρω έλεγχο (ECHO,αμνιοκέντηση)	Χαμηλότερο κόστος υπηρεσιών υγείας, οδηγεί σε χαμηλότερη ψευδώς θετική τιμή
Σχετίζεται με την ηλικία της κύησης	Ανεξάρτητα της ηλικίας της κύησης
Δεν διαγιγνώσκεται η τρισ. 13	Αποκαλύπτεται η τρισ. 13, και η τρισ.18
Αποκάλυψη >60% της τρισ. 18	Αποκαλύπτει χρωμοσωμικές ανωμαλίες του φύλου
Αποκαλύπτει ± 50% των άλλων ανωμαλιών	Αποκαλύπτει τριπλοειδίες
	Περιορισμένη διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών άλλων από αυτές των ανευπλοειδιών

ποιηθεί ένα κοινό πειραματικό πρωτόκολλο το οποίο μη επεμβατικά θα καθόριζε το φύλο του εμβρύου, ανευπλοειδίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων και τρισωμία 13,18 και 21.

Μέχρι τον Ιούνιο του 1998 ενεγράφησαν στο πρόγραμμα 2512 έγκυες. Από αυτές 1921 πληρούσαν τους όρους του (64% του τελικού στόχου που ήταν 3000). Ένα σημαντικό στοιχείο της μελέτης ήταν η συμφωνημένη χρήση ενός ερωτηματολογίου που σχεδιάστηκε για να εκτιμήσει την άποψη των γυναικών σχετικά με τη χρησιμότητα της εξέτασης από τα εμβρυϊκά κύτταρα. Δεδομένα μετα-ανάλυσης έδειξαν ότι γενικά 41% των περιπτώσεων των ανευπλοειδιών ήταν δυνατόν να διαγνωστούν. Σημειωτέον ότι η ψευδώς θετική τιμή για τη διάγνωση της ανευπλοειδίας ήταν σημαντικά χαμηλότερη του 5% που υπάρχει στο screening test του μητρικού ορού.

Οι Nicolaidis και συν. έλεγξαν δείγματα αίματος 230 εγκύων υψηλού κινδύνου για χρωμοσωμικό πρόβλημα του εμβρύου στις 10-14 εβδομάδες της κύησης, πριν υποβληθούν σε επεμβατική μέθοδο προγεννητικής διάγνωσης. Με ειδικό probe για το 21 χρωμόσωμα διέγνωσαν το 61% των τρισωμιών 21 με ψευδώς θετική τιμή διάγνωσης 13%. Προτείνουν ότι αν αυτή η τεχνική χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την μητρική ηλικία και την αυχενική διαφάνεια του εμβρύου σαν μέθοδος επιλογής των υψηλού κινδύνου κυήσεων, θα είναι δυνατόν να διαγνωστεί το 80% της τρισωμίας 21 οδηγώντας σε επεμβατική μέθοδο λιγότερο του 1% του πληθυσμού των εγκύων γυναικών<sup>49</sup>.

Σήμερα εκτιμάται ότι τα εμβρυϊκά κύτταρα στο μητρικό αίμα αρχικά θα χρησιμοποιηθούν για την αποκάλυψη των ανευπλοειδιών του εμβρύου. Όμως μια άλλη δυνατή εφαρμογή είναι να χρησιμοποιηθούν τα εμβρυϊκά κύτταρα για τον καθορισμό του γονότυπου Rh(D) σε όλες τις εγκυμοσύνες που προέρχονται από έγκυες Rh(D) αρνητικές. Με την μη επεμβατική αποκάλυψη Rh(D) θετικών εμβρύων, θα είναι δυνατόν οι επόμενοι μαιευτικοί χειρισμοί να στοχεύουν στο να ελαχιστοποιήσουν κάθε επιπλέον κίνδυνο του εμβρύου πέρα από την ευαισθητοποίηση από τον Rh(D). Τελικά τα εμβρυϊκά κύτταρα στο αίμα της μητέρας μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο μονογονιδιακών νοσημάτων συχνών σε εθνικές ομάδες, όπως είναι η κυστική ίνωση και α-, β-αιμοσφαιρινοπάθειες<sup>3,42,50,51</sup>.

## Ηθική και μη επεμβατικός προγεννητικός έλεγχος

Η γενετική καθοδήγηση που παρέχεται πριν τις επεμβατικές διαδικασίες της προγεννητικής διάγνωσης γενικά εστιάζεται στον κίνδυνο της απώλειας του εμβρύου, ο οποίος οφείλεται στη διαδικασία, έναντι του προβλεπόμενου οφέλους, το οποίο προκύπτει από την γνώση του εμβρυϊκού γονότυπου. Πολλές γυναίκες αποφασίζουν ακόμη την επεμβατική προγεννητική διάγνωση, επειδή τους ενδιαφέρει ο κίνδυνος αποβολής, δηλαδή για να χαθεί το παιδί. Μερικά ζευγάρια, δεν θέλουν να γνωρίζουν προγεννητικά αν το έμβρυό τους έχει σύνδρομο Down, επειδή δεν θέλουν να αντιμετωπίσουν την απόφαση, αν θα συνεχίσουν την κύησή τους. Οι γυναίκες θα αισθάνονται εξαναγκασμένες να κάνουν αυτό το test αν ο διαχωρισμός των εμβρυϊκών κυττάρων γίνει μέρος των μαιευτικών χειρισμών ρουτίνας. Ανασκοπώντας αυτή την τεχνική ένα επιπλέον θέμα που προκύπτει είναι η πιθανή κατάχρησή της για επιλογή του φύλου. Ευτυχώς δύο βιολογικοί παράγοντες μπορεί να περιορίσουν τη διάγνωση του φύλου: 1) η παραμονή των αρσενικών εμβρυϊκών κυττάρων από την προηγούμενη κύηση και 2) η παρουσία μικρότερου αριθμού εμβρυϊκών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία, όταν το έμβρυο έχει φυσιολογικό καρυότυπο. Όμως τα αποτελέσματα μελετών υβριδοποίησης με X και Y probes θα μπορούν να αξιοποιούνται μόνο σε οικογένειες που είναι σε υψηλό κίνδυνο για φυλοσύνδετο νόσημα στο έμβρυό τους<sup>52</sup>.

## Συμπεράσματα

Η παρουσία των εμβρυϊκών κυττάρων στην μητρική κυκλοφορία είναι γνωστή από το 1893, όταν ο γερμανός παθολογοανατόμος Schmorl παρατήρησε κύτταρα τροφοβλάστης σε πνεύμονες γυναίκας, η οποία απεβίωσε από προεκλαμψία. Πολλές ομάδες ερευνητών στον κόσμο συνεχίζουν να τελειοποιούν μεθόδους για να εξασφαλίσουν τον διαχωρισμό τους, την αναγνώρισή τους και την γενετική τους ανάλυση. Ο αριθμός των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα είναι χαμηλός, όταν το έμβρυο έχει ένα φυσιολογικό καρυότυπο και υψηλότερος, όταν το έμβρυο έχει ανευπλοειδία (και /ή πιθανώς άλλες υψηλού κινδύνου καταστάσεις). Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι διαχωρισμού εμβρυϊκών κυττάρων από το μητρικό αίμα. Οι μέθοδοι διαφέρουν στο κόστος-όφελος και απαιτούν εμπειρία. Οι περισσότεροι ερευνητές έχουν εστίασει

την έρευνά τους στην απομόνωση εμβρυϊκών NRBCs, τροφοβλαστικών κυττάρων ή και των δυο. Παραμονή στην κυκλοφορία προγονικών λεμφοκυττάρων και μυελοκυττάρων από προηγηθείσες κήσεις επιβάλλουν την ανάγκη της απομάκρυνσής τους από το μητρικό αίμα πριν τη διάγνωση. Η σχέση μεταξύ αυτών των κυττάρων και της ανάπτυξης αυτοανοσοποιητικής νόσου στη μητέρα είναι υπό έρευνα. Μακροχρόνια παραμονή εμβρυϊκών NRBCs και τροφοβλαστικών κυττάρων δεν έχει βεβαιωθεί.

Σημαντικά πλεονεκτήματα της μονογονιδιακής και της μονοκυτταρικής ανάλυσης προσφέρονται για μη επεμβατικό εμβρυϊκό test. Η μελλοντική έρευνα είναι πιθανόν να εστιαστεί αφενός στη δυνατότητα της καλλιέργειας των εμβρυϊκών αιμοποιητικών κυττάρων, αφετέρου στην αποκάλυψη ειδικών markers επιφανείας των εμβρυϊκών κυττάρων, του κυττοπλάσματος, του πυρήνα και επιπλέον στην εξερεύνηση του ρόλου των εμβρυϊκών κυττάρων στην αιτιοπαθογένεια αυτοανοσοποιητικής νόσου της μητέρας.

## Βιβλιογραφία

- Holzgeve W, Hahn S. Prenatal diagnosis using fetal cells and free fetal DNA in maternal blood. *Clinics in Perinatology* 2001, 28 (2): 353-65.
- Wald NJ, Kennard A, Hackshaw A, McGuire A. Antenatal screening for Down' syndrome. *Journal of medical screening* 1997, 4 (4): 181-246.
- Lamvu G, Kuller JA. Prenatal diagnosis using fetal cells from the maternal circulation. *Obstetr gynecolog survey* 1997, 52, (7): 433-7.
- Toricelli F, Pescucci C. Isolation of total cells from the maternal circulation: prospects for the noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chemistry and Lab Med* 2001, 39: 494-500.
- Yeoh SC, Sargent IL, Redman CWG, Thein SL. Detecting fetal cells in maternal circulation. *Lancet* 1989: 869-70.
- Bianchi DW. Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J of perinatal Med* 1998, 26: 175-85.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996, 93: 705-8.
- Kang A, Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells in maternal blood-their significance in non-invasive prenatal diagnosis and in etiologically determined diseases. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*. 1999, 129(46): 1740-3.
- Covone AE, Johnson PM, Mutton D, Adinolf M. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet* 1984,2 :841-43.
- Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969, 7: 1119-22.
- Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediat* 1995, 127: 847-56.
- Mueller UW, Hawes CS, Wright AE, Petropoulos A, Deboni E, Firgaira FA, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant woman. *Lancet* 1990, 336: 197-200.
- Martel-Petit V, Petit C, Marchand M, Fleurenti A, Fontaine B, Miron A, et al. Use of the Kleihauer test to detect fetal erythroblasts in the maternal circulation. *Pren Diagn* 2001, 21: 106-111.
- Voullaire L, Ioannou P, Nouri S, Williamson R. Fetal nucleated red blood cells from CVS washings: an aid to development of first trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2001, 21: 827-34.
- Holzgreve W, Zhong XY, Burk MR, Hahn S. Enrichment of fetal cells and free fetal DNA from maternal blood: An insight into the Basel experience. *Early pregnancy* 2001, 5: 1537-1583.
- Al-Mufti R, Lees C, Albaiges G, Hambley H, Nicolaidis KH. Fetal cells in maternal blood of pregnancies with severe fetal growth restriction. *Human Reproduction* 2000, 15: 218-21.
- Al-Mufti R, Hambley H, Albaiges G, Lees C, Nicolaidis KH. Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia. *Human Reproduction* 2000, 15: 1624-8.
- Krabchi K, Gross-Louis F, Yan J, Bronsard M, Masse J, Forest J-C, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 2001, 60: 145-150.
- Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, et al. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 2001, 41: 1524-30.
- Little MT, Langlois S, Wilson D, Lansdorp PM. Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* 1997, 89: 2347-58.
- Hall JM, Lingenfelter P, Adams SL, Lasser D, Hansen JA, Bean MA. Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1995, 86: 2829-32.
- Jansen MW, von Linden M, Beug H, Brandenburg H, Wildschut HI, Wladimiroff JW. The use of in vitro expanded erythroid cells in a model system for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenatal Diagnosis*



- 1999, 19 (40) : 323-9.
23. *Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klingler KW, Shuber AP.* PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997, 61: 822-9.
  24. *Lo YMD, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA.* Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989, 2: 1363-1365.
  25. *Scott RAP, Chuter TAM.* Clinical endovascular placement of bifurcated graft in abdominal aortic aneurysm without laparotomy. *Lancet* 1994, 343: 413-4.
  26. *Lo YMD, Patel P, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA, Wainscoat JS.* Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1990, 335: 1463-4.
  27. *Yeoh SC, Sargent IL, Redman CW, Wordsworth BP, Thein SL.* Detection of fetal cells in maternal blood. *Prenatal diagnosis* 1991, 11: 117-23.
  28. *Bischoff FZ, Lewis DE, Nguyen DD, Murrell S, Schober W, Scott J et al.* Prenatal diagnosis with use of fetal isolated from maternal blood: five- color fluorescent in situ hybridization analysis on flow- sorted cells for chromosomes X,Y, 13,18, and 21. *American J Obstet Gynec* 1998, 179 ( 1): 203-9.
  29. *Jansen MWIC, Korver- Hakkeennes K, Van Leenen D, Brandenburg H, Wildschut HJJ, Wladimiroff HJJ et al.* How useful is the in vitro expansion of fetal CD34+ progenitor cells from maternal blood samples for diagnostic purposes? *Pren Diagn* 2000, 20: 725-731.
  30. *Tanaka A, Lindor K, Ansari A and Gershwin ME.* Fetal microchimerisms in the mother: immunologic implications. *Liver Transplantation* 2000, 6 (2): 138-143.
  31. *Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA.* Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998, 338: 1186-191.
  32. *Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley, Evans PC, Smith A et al.* Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998, 351: 559-562.
  33. *Peter M, Tercanli S, Holzgreve W.* Developments in laboratory techniques for prenatal diagnosis. *Current opinion in Obstet and Gynec* 2002, 14: 161-8.
  34. *Slunga-Tallberg A, el-Rifai W, Keinamen M, Ylinen K, Kurki T, Klingler K, et al.* Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *Hum Genet* 1995, 96(1): 53-7.
  35. *Mavrou A, Kolialexi A, Tsangaris GT, Antsaklis A, Panagiotopoulou P, Tsenghi C, et al.* Fetal cells in maternal blood: isolation by magnetic cell sorting and confirmation by immunophenotyping and FISH. *In vivo (Greece)* 1998, 12 (2) : 195-200.
  36. *De Graaf IM, van Bezouw SM, Jacobs ME, Leschot NJ, Zondervan HA, Bilardo CM.* First-trimester non-invasive prenatal diagnosis of triploidy. *Pren Diagn* 1999, 19(2): 175-7.
  37. *Zhen DK, Wang JY, Falco VW, Weber W, Delli- Bovi L, Bianchi DW.* Poly-FISH: a technique of repeated hybridization that improve cytogenetic analysis of fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 1998, 18: 1181-5.
  38. *Mavrou A, Kolialexi A, Zheng YL, Metaxotou C, Bianchi DW.* Improved specificity of NRBC detection in chorionic villus sample supernatant fluids using anti-zeta and anti-epsilon monoclonal antibodies. *Fetal diagn and therapy* 1999, 14(5): 291-5.
  39. *Valerio D, Altieri V, Antonucci FR, Aiello R.* Characterization of fetal haematopoietic progenitors circulating in maternal blood in seven aneuploid pregnancies. *Prenatal diagnosis* 1997, 17( 12): 1159-69.
  40. *Parano E, Falcidia E, Grillo A, Pavone P, Cutuli N, Takabayashi H, et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by isolation and analysis of fetal cells from maternal blood. *American J of Med Genet.* 2001, 101 (3): 262-7.
  41. *Miller WA, Haddow JE.* Prenatal diagnosis by use of cells isolated from maternal blood. *Amer J Obstet Gynec* 1995, 173 :1-2.
  42. *Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW.* Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nature genetics* 1996, 14(3): 264-8
  43. *Evans MI, Wapner RJ.* Future directions. Metabolic and genetic screening, in: *Clinics in Perinatology* 2001, 28: 477-80.
  44. *Sekizawa A, Kimura T, Sasaki M, Nakamura S, Kobayashi R Sato T.* Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single nucleated erythrocyte in maternal blood. *Neurology* 1996, 46: 1351-5.
  45. *Valerio D, Aiello R, Altieri V.* Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Molecular human reproduction* 1997, 3(5) : 451-5.
  46. *Valerio, Aiello R, Altieri V, Malato AP, Fortunato A, Cannazio A.* Prenatal diagnosis using fetal cells from the maternal circulation. *Prenatal diagnosis* 1996, 16(12) : 1073-82.
  47. *Saknan M, Sherman E, Dorothy LE, Leigh SJ, Fariden BZ.* Evaluation of a culture system for enrichment of CD 34+ hematopoietic progenitor cells present in maternal blood. *Fetal diagn and therapy* 2002, 17(2): 90-6.
  48. *Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Evans MI, Sherman, Elias S, Holzgreve W, et al.* Fetal Cells in Maternal Blood: NIFTY Clinical Trial Interim Analysis. *Prenat Diagn* 1999,19: 993-7.
  49. *Al Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, Nicolaidis KH.* Investigation of maternal blood enriched for fetal cells: role in screening and diagnosis of fetal trisomies. *Am*

- J Med Genet 1999, 85: 66-75.
50. *Griffin DK, Ferguson-Smith MA.* Diagnosis of sex and cystic fibrosis status in fetal erythroblasts isolated from cord blood. *Prenat Diagnosis* 1999,19(2): 172-4.
51. *Kramer K, Cohen HJ.* Intrauterine fetal diagnosis for hematologic and other congenital disorders. *Clinics in Laboratory medicine* 1999, 19 (1): 239-53.
52. *Bianchi DW.* Prenatal Diagnosis through the analysis of fetal cells in the maternal circulation. In: Milunski A, Genetics disorders and the fetus. Diagnosis, prevention, and treatment, 4th ed. Baltimore and London: Johns Hopkins, 1998: 931-51.

*Αλληλογραφία:*

Χ. Χατζησεβαστού –Λουκίδου  
Κωνσταντινουπόλεως 49,  
546 42 Θεσσαλονίκη  
Τηλ. 2310892455 /2310992975  
e-mail: chari @med. auth. gr

*Corresponding author:*

H. Hatzisevastou-Loukidou  
49, Konstantinoupoleos Str.  
546 42 Thessaloniki  
Greece