

Κλινικοεργαστηριακή
μελέτηΑπομόνωση εμπύρηνων εμβρυικών
ερυθρών αιμοσφαιρίων από το περιφερικό
αίμα εγκύων, με τη χρήση μαγνητικού
διαχωρισμού

A. Δανηλίδης¹
 K. Κουζή-Κολιάκου²
 N. Κλεάρχου¹
 N. Τσάγιας²
 M. Μαυρομαχάλη³
 B. Καραγιάννης¹

Περίληψη

Σκοπός: Η απομόνωση εμπύρηνων εμβρυικών ερυθρών αιμοσφαιρίων από το περιφερικό αίμα εγκύων γυναικών, η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για πρώιμο προγεννητικό έλεγχο.

Υλικό και μέθοδος: Έγινε λήψη περιφερικού αίματος από 16 έγκυες γυναίκες 9 έως 14 εβδομάδων κύησης, χαμηλού κινδύνου για σύνδρομο Down, με βάση την ηλικία τους. Ακολούθησε επεξεργασία με βαθμίδωση πυκνότητας, λήψη της υπόλευκης στοιβάδας των μονοκυττάρων, επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γλυκοφορίνης A και μαγνητικός διαχωρισμός. Τα εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια, τόσο μητρικής, όσο και εμβρυικής προέλευσης συγκρατούνται από το μαγνήτη. Στη συνέχεια προστίθεται μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γ-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης και ακολουθεί εξέταση και καταμέτρηση των θετικών εμπύρηνων εμβρυικών ερυθρών.

Αποτελέσματα: Ο αριθμός των εμπύρηνων εμβρυικών ερυθρών αιμοσφαιρίων που ανιχνεύθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο ήταν από 0 έως 14, με μέσο όρο 6. Το ποσοστό ανίχνευσης κυττάρων ήταν 87.5% (14/16).

Συμπεράσματα: Αναφέρεται επιτυχημένη προγεννητική διάγνωση εμβρυικών ανευπλοειδιών και μονογονιδιακών κληρονομούμενων παθήσεων, όπως επίσης και του φύλου του εμβρύου βασιζόμενη στην ανάλυση των εμβρυικών NRBC είτε με FISH είτε με PCR. Ίσως η συσχέτιση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και του αυξημένου αριθμού εμβρυικών κυττάρων στο μητρικό αίμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μία ακόμη μέθοδος προγεννητικού ελέγχου (screening).

Όροι ευρητηρίων: Μαγνητικός διαχωρισμός, εμπύρηννα ερυθρά, σύνδρομο Down.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε αντίθεση με τη μέχρι πρότινος αντίληψη ότι ο πλακούντας είναι ένα αδιαπέραστο φράγμα που εμποδίζει κάθε είδους επικοινωνία μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού αίματος, διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει ότι εμβρυϊκά κύτταρα και εμβρυϊκό γεννητικό υλικό κυκλοφορεί στο μητρικό αίμα. Το 1893 ο Schmorl αναγνώρισε τροφοβλάστες στους πνεύμονες γυναικών που είχαν πεθάνει λόγω εκλαμψίας, αλλά όχι και σε γυναίκες που πέθαναν από άλλα αίτια. Αποδείξεις για την ύπαρξη εμβρυϊκών κυττάρων στην μητρική κυκλοφορία παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τον Douglas και συνεργάτες το 1959⁽¹⁾. Ο Kleihauer, χρησιμοποιώντας χρώση για εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη βρήκε εμβρυϊκά κύτταρα στην κυκλοφορία της μητέρας⁽²⁾. Το

¹ Γ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης

² Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
³ Παιδιατρική Κλινική Γ.Ν.Ν. Γεννηματάς Θεσσαλονίκης
 Αλληλογραφία:

Δανηλίδης Α.
 Νυμφαίου 81Α, 54224
 Θεσσαλονίκη
 Τηλ.: 6932211395, 2310 559711
 E-mail: angedan@hotmail.com
 Κατατέθηκε: 12/4/2006
 Εγκρίθηκε: 14/5/2006

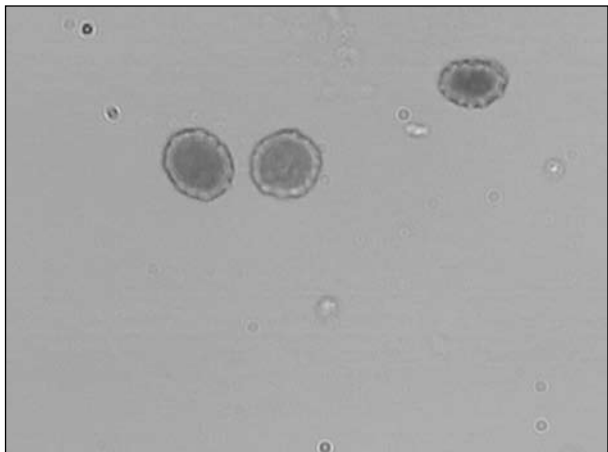
1964 ο Clayton και συνεργάτες, χρησιμοποιώντας χρώση για εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, ανακάλυψαν την παρουσία ανώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων σε αυξανόμενο αριθμό ανάλογα με την πρόοδο της εγκυμοσύνης. Το 1969 ο Walknowska και συνεργάτες βρήκαν ΙΧΥ1 μεταφάσεις στο μητρικό αίμα εγκύων με άρρενα έμβρυα και θετικά για Υ χρωματίνη κύτταρα στο μητρικό αίμα εγκύων με άρρενα έμβρυα^(3,4,5). Με την ανακάλυψη των τεχνικών διαχωρισμού κυττάρων το 1970, έγινε δυνατός ο διαχωρισμός και χαρακτηρισμός των εμβρυϊκών κυττάρων. Η πρώτη ερευνητική ομάδα που χρησιμοποίησε PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) και απέδειξε ότι τα εμβρυϊκά κύτταρα υπάρχουν πραγματικά στο μητρικό αίμα, ήταν ο Lo και συνεργάτες⁽⁶⁾. Το 1990, η Bianchi ήταν η πρώτη που πραγματοποίησε εμπλουτισμό ειδικά για εμβρυϊκά κύτταρα και ανάλυση με PCR⁽⁷⁾. Όλες οι έρευνες έως τώρα συμφωνούν πως τα εμβρυϊκά κύτταρα στο μητρικό αίμα είναι σπάνια, συγκεκριμένα υπάρχουν 1 με 6 κύτταρα ανά ml μητρικού αίματος⁽⁸⁾. Αυτό το γεγονός αποτελεί πραγματικά πρόκληση για την εύρεση αυτών των κυττάρων. Έχουν αναφερθεί αρκετά πρωτόκολλα έως τώρα για τον εμπλουτισμό και το διαχωρισμό αυτών των κυττάρων. Ειδικοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί είτε για διαχωρισμό κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (FACS), ή με μαγνητικό διαχωρισμό (MACS) για απομόνωση αυτών των κυττάρων. Τελευταία άρχισε η χρησιμοποίηση της PCR, FISH και της κυτταρογεννητικής ανάλυσης.

Είναι πολύ σημαντικό να προσδιορίσουμε τον ακριβή αριθμό των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα καθώς αυτά είναι πολύ σπάνια. Όλες οι μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα πως ο αριθμός είναι πολύ μικρός⁽⁹⁾. Αυτό το γεγονός καθιστά επιτακτική την ανάγκη να καθορισθεί με όσο το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια ο αριθμός των κυττάρων αυτών, αλλά και την ιδανικότερη στιγμή για αιμοληψία. Σαφέστατα η λήψη αίματος στις αρχικές εβδομάδες

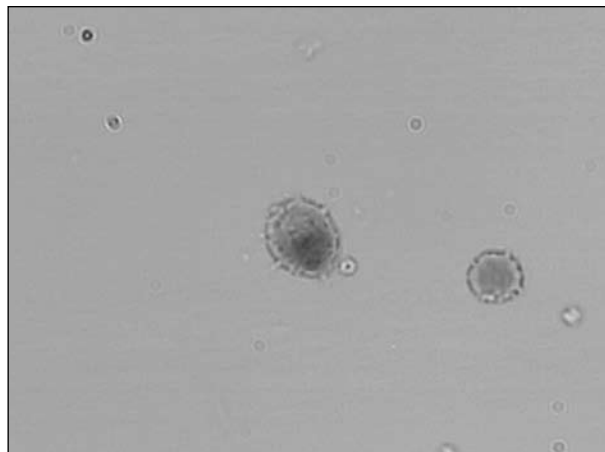
κύησης είναι πιο επιθυμητή ώστε να επιτευχθεί πρόωμη προγεννητική διάγνωση, αλλά είναι επίσης σημαντικό να ανευρεθεί ικανοποιητικός αριθμός κυττάρων. Δεδομένα από μελέτες συμφωνούν πως ο αριθμός των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα αυξάνει όσο προχωράει η εγκυμοσύνη^(7,9,11). Ένα ακόμη σημαντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι ερευνητές είναι ο καθορισμός ειδικών δεικτών (markers) που θα επιτρέψουν τον διαχωρισμό και απομόνωση των εμβρυϊκών κυττάρων με όσο το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια. Ένα τρίτο πρόβλημα είναι το γεγονός πως κάποια εμβρυϊκά κύτταρα μπορεί να παραμείνουν στην μητρική κυκλοφορία για αρκετά χρόνια μετά τον τοκετό, έως και 27 χρόνια, κάτι που για πρώτη φορά περιγράφηκε από την Bianchi και συνεργάτες⁽¹²⁾.

Μελέτες δείχνουν ότι ο αριθμός των κυττάρων και η παρουσία του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα δεν μεταβάλλεται μόνο με την εβδομάδα κύησης αλλά διαφέρει και ανά κύηση⁽¹¹⁾. Είναι είδη γνωστό πως ο αριθμός τους αυξάνει σε εμβρυϊκές ανευπλοειδίες, προεκλαμψία, πρόωρο τοκετό, σφιγρό πλακούντα, υπερέμεση κύησης και υδράμινο^(11,12,13). Πιθανά αίτια του αυξημένου αριθμού εμβρυϊκών κυττάρων σε αυτές τις καταστάσεις μπορεί να είναι βλάβες που πλακουντιακού φραγμού, λόγω αγγειακών διαταραχών ή λόγω ανάπτυξης οιδήματος στις χοριακές λάχνες. Ακόμη και η αμφίχειρη εξέταση, πριν από την αιμοληψία μπορεί να προκαλέσει είσοδο εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα⁽¹³⁾.

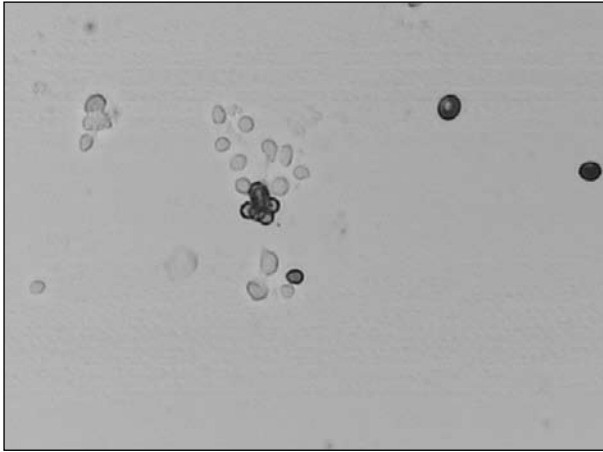
Έως σήμερα έχουν περιγραφεί / απομονωθεί πέντε τύποι εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα: οι τροφοβλάστες, τα λεμφοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα, τα εμπύρινα ερυθρά και τα προγεννητικά κύτταρα⁽¹³⁾. Αυτοί οι τύποι κυττάρων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν υπό κατάλληλες προϋποθέσεις για προγεννητικό έλεγχο. Πρόσφατα ανακοινώθηκε και η παρουσία ελεύθερου εμβρυϊκού DNA σε ανιχνεύσιμες ποσότητες κάτι



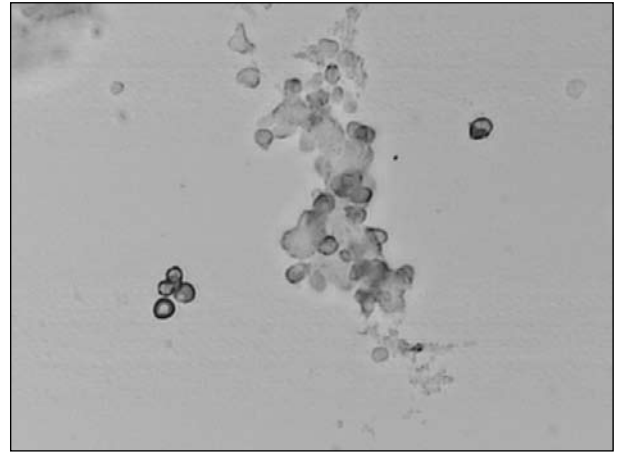
Εικόνα 1α. Τρεις προερυθροβλάστες απομονωμένοι από το μητρικό αίμα με χρώση MAY-GRUNWALD-GIMSA x 1000.



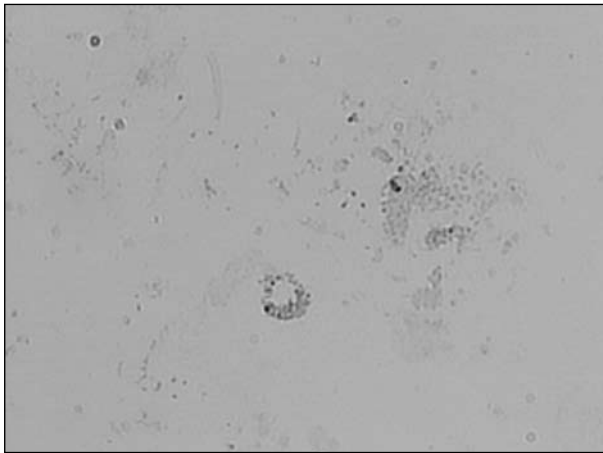
Εικόνα 1β. Ένας προερυθροβλάστης και ένας μικρότερος ώριμος νορμοβλάστης απομονωμένοι από το μητρικό αίμα με χρώση MAY-GRUNWALD-GIMSA x 1000.



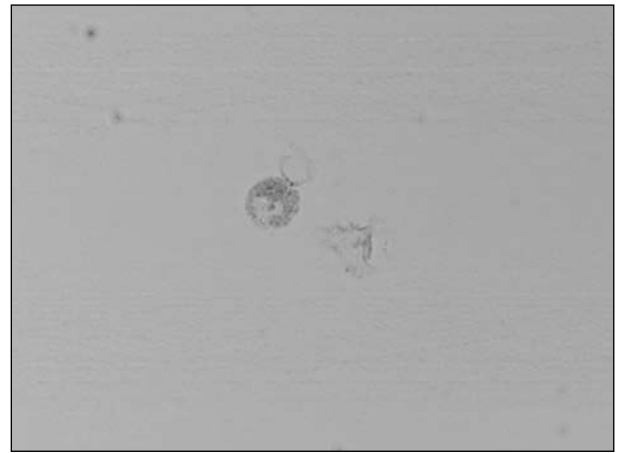
Εικόνα 2α. Ερυθρά αιμοσφαίρια μετά από χρώση με το αντίσωμα για τη Glycophorin A μετά από (MACS) x 1000.



Εικόνα 2β. Ερυθρά αιμοσφαίρια μετά από χρώση με το αντίσωμα για τη Glycophorin A μετά από (MACS) x 1000.



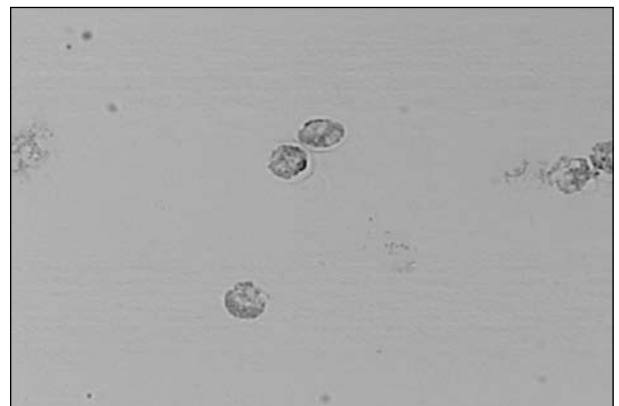
Εικόνα 3α. Εμπύρηνα ερυθρά αιμοσφαίρια μετά από απομόνωση από το μητρικό αίμα με χρώση με αντίσωμα για την αλυσίδα γ της αιμοσφαιρίνης x 1000.



Εικόνα 3β. Εμπύρηνα ερυθρά αιμοσφαίρια μετά από απομόνωση από το μητρικό αίμα με χρώση με αντίσωμα για την αλυσίδα γ της αιμοσφαιρίνης x 1000.

το οποίο ίσως θα μπορούσε να δώσει λύσεις στην μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση.

Εμείς, στη μελέτη μας, προσανατολισθήκαμε στην ανεύρεση εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων εμβρυϊκής προέλευσης. Αυτό διότι, από τα διάφορα είδη των προαναφερθέντων κυττάρων έχει πλέον αποδειχθεί πως τα καταλληλότερα για μελέτη είναι τα εμπύρηνα ερυθρά αιμοσφαίρια αφού: α) είναι μονοπύρηνα, β) κυκλοφορούν σε ανιχνεύσιμες ποσότητες από το πρώτο τρίμηνο, γ) είναι καλά διαφοροποιημένα(19). Βέβαια υπάρχουν πολλά προβλήματα διαχωρισμού και αναγνώρισής τους που πρέπει να αντιμετωπισθούν όπως ότι: 1) έχουν μικρό χρόνο ζωής, 2) ο αριθμός τους στο αίμα είναι περιορισμένος, 3) σύγχρονη παρουσία στο αίμα της μητέρας και εμπύρηνων ερυθρών μητρικών αιμοσφαιρίων.



Εικόνα 3γ. Εμπύρηνα ερυθρά αιμοσφαίρια μετά από απομόνωση από το μητρικό αίμα με χρώση με αντίσωμα για την αλυσίδα γ της αιμοσφαιρίνης x 1000.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα μετρήσεων των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων στο δείγμα περιφερικού αίματος εγκύων γυναικών.

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

Στόχος της μελέτης μας ήταν η απομόνωση και η ταυτοποίηση των σπάνιων αυτών εμβρυϊκών κυττάρων και συγκεκριμένα των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών αιμοσφαιρίων με σκοπό αυτά μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν για προγεννητικό έλεγχο.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Για την πραγματοποίηση του πειράματος γίνεται λήψη 20ml φλεβικού περιφερικού αίματος από 16 έγκυες γυναίκες μεταξύ 9ης και 14ης εβδομάδας της κύησης χαμηλού κινδύνου για σύνδρομο DOWN, σύμφωνα με την ηλικία τους, καθώς και από 6 γυναίκες που δεν ήταν έγκυες και δεν είχαν ιστορικό κύησης στο παρελθόν. Αρχικά το αίμα τοποθετείται σε σωλήνα με EDTA. Στη συνέχεια προστίθεται RPMI και γίνεται βαθμίδωση της πυκνότητας με Histopaque 1119 και παραλαμβάνεται η υπόλευκη σπιάδα των μονοκυττάρων η οποία περιέχει κύτταρα της λευκής σειράς (μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα) και εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα κύτταρα κάθε φορά ξεπλένονται με διάλυμα PBS.

Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γλυκοφορίνης A, (DakoCytomation, IGg1,kappa) για 30 min. η οποία αποτελεί δείκτη της ερυθράς σειράς. Μετά από συστηματική έκπλυση τα κύτταρα επωάζονται με anti-mouse αντίσωμα (Gerlinde Kisker), για 20 min το οποίο είναι συνδεδεμένο με μαγνητικά σφαιρίδια (MACS) και στη συνέχεια διαχωρίζονται με τη βοήθεια μαγνήτη, ο οποίος τοποθετείται στην περιφέρεια του σωλήνα. Η διαδικασία διαχωρισμού με τη βοήθεια του μαγνήτη επαναλαμβάνεται ακόμη μια φορά. Μόνο τα εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια, τόσο μητρικής, όσο και

εμβρυϊκής προέλευσης συγκρατούνται από το μαγνήτη, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα απομακρύνονται. Ακολουθεί προσθήκη παραφορμαλδεΐδης 2% για την μονιμοποίηση των κυττάρων και προσθήκη 3% H₂O₂ για την καταστροφή της ενδογενούς υπεροξειδάσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στη συνέχεια προστίθεται μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γ-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης (Kortex). Τα κύτταρα επωάζονται για 20 min ακολουθεί πλύση με διάλυμα PBS.

Στη συνέχεια παραλαμβάνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες όπου διαδοχικά προστίθεται βιοτίνη, αβιδίνη-υπεροξειδάση, DAB και ακολουθεί αφυδάτωση σε ανιούσες συγκεντρώσεις διαλύματα αλκοόλης-ξυλόλης. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εξετάζονται προσεκτικά κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο για την ανεύρεση θετικών ως προς τη χρήση του αντισώματος εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων και με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη μας συμμετείχαν 16 έγκυες γυναίκες χαμηλού κινδύνου για σύνδρομο DOWN με βάση την ηλικία τους. Οι εγκυμοσύνες ήταν μεταξύ της 9ης έως της 14ης εβδομάδας. Ο μέσος όρος ηλικίας των εγκύων ήταν 28, ενώ ο μέσος όρος εβδομάδας της κύησης ήταν 11. Ο αριθμός των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών κυττάρων που ανιχνεύθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο ήταν από 0 έως 14, με μέσο όρο 6. Το ποσοστό ανίχνευσης κυττάρων ήταν 87.5% (14/16). Στην ομάδα ελέγχου των έξι γυναικών που δεν ήταν έγκυες αλλά και δεν είχαν ιστορικό εγκυμοσύνης στο παρελθόν δεν βρέθηκαν θετικά εμπύρηννα ερυθρά κύτταρα. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 1.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στόχος της μελέτης μας ήταν να μπορέσουμε να απομονώσουμε και να καταδείξουμε την παρουσία των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών αιμοσφαιρίων στην κυκλοφορία της μητέρας.

Λαμβάνοντας υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα, επινοήσαμε τη δική μας μέθοδο διαχωρισμού. Έγιναν αιμοληψίες από εγκύους 9-14 εβδομάδων και χρησιμοποιήσαμε 20ml περιφερικού αίματος από κάθε γυναίκα. Στο πρώτο βήμα πραγματοποιήθηκε βαθμίδωση πυκνότητας με Histopaque- 1119. Συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει πως χρησιμοποιώντας μόνο του το Histopaque-1119 και όχι συνδυασμούς Histopaque 1077 και 1119 ή 1110, αφενός παρέχεται η δυνατότητα λήψης μόνο 20, και όχι 40ml, περιφερικού αίματος και αφετέρου απομονώνονται 2,1 φορές περισσότερα εμπύρηνια ερυθρά. Τα παραπάνω αποδείχθηκαν σε πρόσφατη μελέτη από τον Osama Samura και συνεργάτες⁽²⁰⁾.

Μετά το διαχωρισμό των εμπύρηνων κυττάρων προχωρήσαμε σε επώαση των κυττάρων για 30 λεπτά με το μονοκλωνικό αντίσωμα (mouse anti human) έναντι της γλυκοφορίνης A σε θερμοκρασία 37°C. Σύμφωνα με τη νεότερη βιβλιογραφία το αντίσωμα αυτό υπερέχει φανερά έναντι άλλων αντισωμάτων όπως το anti- CD45, anti CD-36, anti- CD 45, anti- CD71, HAE 9 και anti-I όσον αφορά την καθαρότητα του λαμβανόμενου πληθυσμού⁽²¹⁾.

Τη φάση των εμπύρηνων κυττάρων στη συνέχεια την περάσαμε μέσα από στήλη η οποία περιέχει το δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με μαγνητικά σφαιρίδια. Στην περιφέρεια της στήλης υπήρχε ένας ισχυρός μαγνήτης ο οποίος κατακράτησε τα συνδεδεμένα με τη γλυκοφορίνη κύτταρα. Τα τελευταία αποτελούν τα εμπύρηνια ερυθρά αιμοσφαίρια, δεδομένου ότι η γλυκοφορίνη αποτελεί δείκτη της ερυθράς σειράς. Και η μέθοδος FACS όπως και η MACS έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως με επιτυχία διεθνώς. Η μέθοδος FACS απαιτεί εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό, ενώ η MACS είναι σαφώς ευκολότερη σαν μέθοδος, απαιτεί πιο φθηνότερο εξοπλισμό και συγκριτικά παρουσιάζει μικρότερη επιμόλυνση των πληθυσμών των εμβρυϊκών κυττάρων από άλλα κύτταρα⁽²²⁾.

Το γεγονός ότι ανάμεσα στα εμβρυϊκά εμπύρηνια ερυθρά ανευρίσκονται και μητρικά εμπύρηνια ερυθρά⁽²³⁾ μας οδήγησε στο να προχωρήσουμε και σε δεύτερο διαχωρισμό ώστε να απομονώσουμε τα εμβρυϊκά κύτταρα. Αυτό επιτεύχθηκε με την επίστροψη των εμπύρηνων ερυθρών σε αντικειμενοφόρο πλάκα και την επώασή τους με το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της γ αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης. Τα θετικά αντιδρώντα στο αντίσωμα έναντι της γ αλυσίδας κύτταρα αποτελούν πλέον με βεβαιότητα εμπύρηνια ερυθρά του εμβρύου. Η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη είναι η κυρίαρχη κυτταροπλα-

σματική πρωτεΐνη, η οποία ανευρίσκεται στα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα μετά τις 7 εβδομάδες κύησης. Παρόλο που η εγκυμοσύνη ενεργοποιεί την σύνθεση μικρής ποσότητας εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στη μητέρα, η ποσότητα της αλυσίδας γ που παράγεται ανά κύτταρο είναι πολύ μεγαλύτερη στο έμβryo.

Συγκριτικές μελέτες για την παραγωγή ε και ζ αλυσίδων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης έδειξαν ότι υπάρχει απότομη πτώση της ανίχνευσης αυτών των αλυσίδων μετά τις 13 και 14 εβδομάδες κύησης ακόμη και σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Αντίθετα, υπάρχει σημαντική αύξηση της ποσοτικής ανίχνευσης για την αλυσίδα γ στο πρώτο τρίμηνο και μικρή σταδιακή πτώση στο δεύτερο σε φυσιολογικά έμβρυα, ενώ υπάρχει συνεχής αύξηση σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Φαίνεται λοιπόν ότι η χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος της αλυσίδας γ αναγνωρίζει μεγαλύτερο αριθμό εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων, δίνοντας τη δυνατότητα να αναγνωρίζονται ευκολότερα⁽²⁴⁾. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες εξετάζονται προσεκτικά κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο για την ανεύρεση εμπύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων. Εξετάσαμε τα κύτταρα με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών: το στρογγυλό πυρήνα, το μεγάλο μέγεθος του κυττάρου, το χαρακτηριστικά χρωματισμένο κυτταροπλάσμα και περιφερική φωτεινότητα του κυτταροπλάσματος^(19,25,26). Ακολούθησε καταμέτρηση των κυττάρων για κάθε περίπτωση. Βιβλιογραφικά αναφέρεται πως η συχνότητα των εμβρυϊκών εμπύρηνων ερυθρών στο μητρικό αίμα υπολογίζεται να είναι 1 με 10 κύτταρα ανά ml μητρικού αίματος⁽¹⁰⁾ και πως η συχνότητα είναι ένα εμπύρηνιο εμβρυϊκό ερυθρό ανά 106 με 107 μητρικά κύτταρα στο περιφερικό αίμα της μητέρας^(22,27). Άρα περίπου 10-20 εμπύρηνια ερυθρά κύτταρα υπολογίζεται να ανευρίσκονται σε 20ml μητρικού αίματος. Ο μέσος αριθμός 6, των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων που βρέθηκαν στη μελέτη μας, έρχεται σε συμφωνία με τους περισσότερους μελετητές είτε χρησιμοποιήσαν μαγνητικό διαχωρισμό είτε κυτταρομετρία ροής^(8,28-31). Υπάρχουν ανακοινώσεις επιτυχημένης προγεννητικής διάγνωσης εμβρυϊκών ανευπλοειδιών και μονογονιδιακών κληρονομούμενων παθήσεων, όπως επίσης και του φύλου του εμβρύου βασιζόμενης στην ανάλυση των εμβρυϊκών NRBC είτε με FISH είτε με PCR⁽³²⁻³⁷⁾. Οι μέθοδοι που έχουν ανακοινωθεί είναι αρκετά πολύπλοκες και απαιτούν μεγάλη προσπάθεια, τα ποσοστά επιτυχημένης προγεννητικής διάγνωσης κυμαίνονται μεταξύ του 68% και του 92 % ενώ, υπάρχουν επίσης και ψευδώς θετικά αποτελέσματα στο 3 έως 15% των περιστατικών^(9,33,38-42). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν μεαμνιοπαρακέντηση και CVS.

Ίσως η συσχέτιση μεταξύ χρωμοσωμικών ανωμαλι-

ών και αυξημένων αριθμών εμβρυϊκών κυττάρων και DNA στο μητρικό αίμα⁽¹⁷⁾ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν μία ακόμη μέθοδος προγεννητικού ελέγχου (screening). Εφαρμογή μεθόδου FISH στο μητρικό αίμα που έχει υποστεί επεξεργασία για ανεύρεση εμβρυϊκών κυττάρων, στις γυναίκες που έχουν επιλεγεί από τον γενικό πληθυσμό με τη σημερινή μέθοδο προγεννητικού ελέγχου (συνδυασμός μητρικής ηλικίας, αυχενικής διαφάνειας, b-hCG και PAPP-A)⁽¹⁴⁾ θα μπορούσε να μειώσει το ποσοστό των γυναικών που έχει ένδειξη για CVS (γυναίκες με θετικά σήματα για τρισωμία) έναντι του 5% που ισχύει με τα σημερινά τεστ.

Συμπερασματικά δεν έχει ακόμη καθορισθεί με ακρίβεια εάν ο έλεγχος των εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της μητέρας θα αποτελέσει στο μέλλον ασφαλή μέθοδο για προγεννητικό έλεγχο ή screening τεστ μεγάλης ευαισθησίας και ειδικότητας. Η τεχνολογική πρόοδος μας επιτρέπει να βλέπουμε το μέλλον του μη επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου με αισιοδοξία.

Summary

Daniilidis A, Kouzi-Koliakou K, Klearxou N, Tsiagias N, Mavromichali M, Karagiannis V

Isolation of nucleated fetal red cells from maternal blood, with magnetic activated cell sorting

Hellen Obstet Gynecol 18(3):238-245, 2006

Aim: The isolation of nucleated fetal erythrocytes from maternal blood.

Material and method: We have used 20 mls of maternal blood from 16 pregnant women with gestational age 9 to 14 weeks. The pregnant women had a low risk for Down syndrome according to their age. After gradient centrifugation with histopaque 1119 and removal of the mononuclear cell layer we have performed magnetic cell sorting twice by using the glycophorin A antibody and secondary antibody conjugated with magnetic beads. The positive cells have been held on the magnet and were maternal and fetal red cells. We have then added on the positive cells the monoclonal antibody for γ -chain and the fetal nucleated erythrocytes have been measured under light microscope.

Results: The number of fetal erythrocytes we have counted was between 0 and 14, with mean number of 6. We have managed to find these cells on the 14 out of 16 cases (87.5%).

Conclusions: There are a lot of publications of successful prenatal diagnosis with FISH or PCR with fetal erythrocytes. Maybe the fact that their number is increased in cases of aneuploidy means that their absolute number could be used as another screening test.

Key words: *Magnetic activated cell sorting, nucleated erythrocytes, Down syndrome.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. Trophoblasts in the circulating blood during pregnancy. *AM J Obstet Gynecol* 1959; 58:960-973.
2. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hamaglobin in den Erythrocyten eines Blutaustriehes. *Klinische Wochenschrift*. 1957; 35:637-638.
3. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969; 1:1119-1122.
4. Schroder J, de la Chapelle A. Fetal erythrocytes in maternal blood. *J Hematol* 1972; 39:153-162.
5. Siebers JW, Knauf I, Hillemans HG. Antenatal sex determination in blood from pregnant women. *Hum Genet* 1975; 28:273-280.
6. Lo Y-MD, Pate P, Sampietro M, Gillmer MDG, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1990; 335:1463-1464.
7. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JHM, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1990; 87:3279-3283.
8. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP:PCR quantification of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *AM J Hum Genet* 1997;61(4):822-829.
9. Bianchi DW. AP, Shuber M. De Maria, AC Fougner, KW Klinger. Fetal cells in maternal blood. Determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *AM J Obstet Gynecol* 1994; 171:922.
10. Hamada H. T Arimani, T Kubo. H Hamaguchi. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 1993; 91:427.
11. Kuo PL. Frequencies of fetal nucleated red cells in maternal blood during different stages of gestation. *Fetal Diagn Ther* 1998; 13:375-379.
12. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, S Sylvester and MA De Maria. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:705-708.
13. Liou JD, et.al. Fetal cells in the maternal circulation during the first trimester in pregnancies. *Hum Genet* 1993; 91:427.
14. Nikolaidis KH, Neil J Sebire, Rosaline JM Snijeders. Nuchal translucency and chromosomal defects. *THE 11-14 WEEK SCAN*. Parthenon publishing 1999; 1:3-65.
15. Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *The Journal of Pediatrics* 1995; 127(6):847-856.

16. Steele CD, Wapner RJ, Smith JB, Haynes MK, Jackson LG. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal blood: a review. *Clinical Obstetrics and Gynaecology* 1996; 39(4):801-813.
17. Guetta E, Gordon D, Simchen MJ. Hematopoietic progenitor cells as targets for non invasive prenatal diagnosis: detection of fetal cells CD+34 and assessment of post delivery persistence in maternal circulation. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2003; 30:13-21.
18. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:864-870.
19. Dong HC, Farina A, Bianchi DW. ROC analysis of an erythroblast morphologic scoring system to improve identification of fetal cells in maternal blood. *Prenatal Diagnosis* 2004; 24:117-120.
20. Samura O, Sekizawa A, Zhen DK, Falco VM, Bianchi DW. Comparison of fetal cell recovery from maternal blood using a high density gradient for the initial separation step: 1.090 versus 1.119 g/ml. *Prenatal Diagnosis* 2000; 20:281-286.
21. Troeger C, Holzgreve W, Hahn S. A comparison of different density gradients and antibodies for enrichment of fetal erythrocytes by MACS. *Prenatal Diagnosis* 1999; 19:521-526.
22. Fukushima A, Utsugisawa Y, Wada Y, Mizusawa N, Horiuchi S, Kagabu T. The application of MACS to detect fetal cells in maternal peripheral blood. *J Obstetrics Gynaecology* 2001; 27(3):155-162.
23. Slunga-Tallberg A, el-Rifai W, Keinanen M, Ylinen K, Kurki T, Klinger K. Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *Human Genetics* 1995; 96:53-57.
24. Zheng YL, Zhen DK, Farina A, Berry S, Wapner J, Williams JM, Bianchi DW. Fetal cell identifiers: results of microscope slide-based immunocytochemical studies as a function of gestational age and abnormality. *Am J Obstet Gynaecol* 1999; 180:1234-1239.
25. Ikawa K, Yamafuji K, Ukita T, Kuwabara S, Igarashi T, Takabayashi H. Fetal DNA diagnosis from maternal blood: PEP-Taqman PCR analysis of a single nucleated erythrocyte (NRBC). *2001 Ann N Y Acad Sci* 2001; 945:153-155.
26. Samura O, Sohda S, Johnson KL, et al. Diagnosis of trisomy 21 in fetal nucleated erythrocytes from maternal blood by use of short tandem repeat sequences. *Clin Chem* 2001; 47:1622-1626.
27. Bianchi DW. Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J Perinat Med* 1998; 26:175-185.
28. Zheng YL, Carter NP, Price CM, Colman SM, Milton PJ, Hackett GA, Greaves MF, Ferguson-Smith MA. Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J Med Genet* 1993; 30:1051-1056.
29. Mavrou A, Colialexi A, Tsangaris G TH, Antsaklis A, Panagiotipoulou P, Tsenghi C, Metaxotoy C. In *Vivo* 1998; 12:195-200.
30. De Maria MA, Zheng Y-L, Zhen D, Weinschenk NM, Vadnais TJ, Bianchi DW. Improved fetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular antifetal hemoglobin and Hoechst 33342. *Cytometry* 1996; 25:37-45.
31. Sohda S, Arimani T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. *Prenat Diag* 1997; 17:743-752.
32. Jennifer A Bubb, Anne L Matthews. What's new in prenatal screening and diagnosis? *Primary Care; Clinics in Office Practice* 2004; 31(3).
33. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenatal Diagnosis* 2001; 21:293-301.
34. Joe Leigh Simpson, Sherman Elias. Isolating fetal cells from maternal blood. *JAMA* November 1993; 270; 19:2357-2361.
35. Bianchi DW, Mahr A, Zickwolf GK, et al. Detection of fetal cells with 47, XY, +21 karyotype in maternal peripheral blood. *Hum Gen* 1992; 90:368-370.
36. Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, et al. High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios. *Prenat Diagn* 2000; 20:838-841.
37. Bianchi DW AP, Shuber M De Maria, AC Fougner, KW Klinger. Fetal cells in maternal blood. Determination of purity and yield by quantitative polymerase chain reaction. *AM J Obstet Gynecol* 1994; 171:922.
38. Klinger K, Landes G, Shook D, et al. Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *American J Hum Genet* 1992; 51:55-65.
39. Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenatal Diagnosis* 2001; 21:293-301.
40. Kathy Mann, Celia Donaghue, Susan P Fox, Zoe

- Docherty and Caroline Mackie Ogilvie. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. *European Journal Of Human Genetics* 2004; 12:907-915.
41. Mansfield ES. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet* 1993; 2:43-50.
42. Pertl B, Yau SC, Sherlock J, Davies AF, Mathew CG, Adinolfi M: Rapid molecular method for prenatal detection of Down's syndrome. *Lancet* 1994; 343:1197-1198.