

Ανασκόπηση

Η παρουσία των εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της εγκύου. Τι γνωρίζουμε σήμερα;

Α. Δανιηλίδης¹
Κ. Κουζή-Κολιάκου²

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρουσία των εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα εγκύων γυναικών αποδείχθηκε για πρώτη φορά, με τη χρήση χρώσης για την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, το 1957 από τον Kleihauer, καθώς και το 1959 από τον Douglas. Σε αντίθεση με τη μέχρι πρότινος αντίληψη πως ο πλακούντας είναι ένας αδιαπέραστος φραγμός μεταξύ μητέρας και εμβρύου, πολλές μελέτες έχουν δείξει πλέον ότι εμβρυϊκά κύτταρα και νουκλεϊκά οξέα κυκλοφορούν ελεύθερα στο αίμα της μητέρας. Τα εμβρυϊκά κύτταρα είναι πολύ σπάνια στην κυκλοφορία της μητέρας και είναι ιδιαίτερα σημαντικό να κατανοήσουμε τον ακριβή αριθμό τους. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν πως ο αριθμός των εμβρυϊκών κυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα της μητέρας μεταβάλλεται με την ηλικία της κύησης, αλλά και με κάθε διαφορετική εγκυμοσύνη.

Σήμερα έχουν απομονωθεί πέντε τύποι εμβρυϊκών κυττάρων στο αίμα της εγκύου: τα τροφοβλαστικά κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα, τα εμπύρηνα ερυθρά, τα προγεννητικά κύτταρα, καθώς και ελεύθερο εμβρυϊκό DNA. Αυτά τα κύτταρα θα μπορούσαν ίσως να χρησιμοποιηθούν για προγεννητικό έλεγχο. Υπάρχουν όμως ακόμη σημαντικές τεχνικές δυσκολίες ώστε να επιτευχθεί με ακρίβεια προγεννητική διάγνωση.

Όροι ευρετηρίου: προγεννητική διάγνωση, εμβρυϊκά κύτταρα, ελεύθερο DNA.

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΑΝΕΥΡΕΣΗΣ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

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 στη μητρική κυκλοφορία παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τον Douglas και συνεργάτες το 1959¹. Ο Kleihauer βρήκε εμβρυϊκά κύτταρα στην κυκλοφορία της μητέρας χρησιμοποιώντας χρώση για εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη². Το 1964 ο Clayton και συνεργάτες χρησιμοποιώντας χρώση για εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, ανακοίνωσαν την παρουσία ανώριμων ερυθρών αιμοσφαιρίων σε αυξανόμενο αριθμό ανάλογα με την πρόοδο της εγκυμοσύνης. Το 1969 ο Walknowska και συνεργάτες βρήκαν XY μεταφάσεις στο μητρικό αίμα εγκύων με άρρενα έμβρυα και θετικά για Y χρωματίνη κύτταρα στο μητρικό αίμα

¹Γ Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική, «Ιπποκράτειο» Νοσοκομείο, Θεσσαλονίκη

²Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας, Ιατρική Σχολή, ΑΠΘ

Αλληλογραφία:
Α. Δανιηλίδης
Νυμφαίου 81Α
54 224 Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 6932211395, 2310 559711
E-mail: angedan@hotmail.com
Κατατέθηκε: 04/07/06
Εγκρίθηκε: 25/09/06

Πίνακας 1¹⁷. Ευαισθησία και ποσοστό κυττάρων με πυρήνες με τρία σήματα σε φυσιολογικές κηύσεις και σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Δείκτης:	για το χρωμόσωμα 21		το χρωμόσωμα 18		το χρωμόσωμα 13	
	Τρισωμία 21	Φυσιολογικό	Τρισωμία 18	Φυσιολογικό	Τρισωμία 13	Φυσιολογικό
Όριο	N=36	N=142	N=24	N=1342	N=10	N=142
>=3%	35 (97%)	19 (13%)	23 (96%)	23 (16%)	10 (100%)	32 (22,5%)
>=4%	30 (83%)	4 (2,8%)	20 (83%)	9 (6%)	8 (80%)	7 (5%)
>=5%	22 (61%)	0	13 (54%)	0	5 (50%)	0

εγκύων με άρρενα έμβρυα^{3,4,5}. Το 1970 με την ανακάλυψη των τεχνικών διαχωρισμού κυττάρων, 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 συνεργάτες⁶. Το 1990 η Bianchi ήταν η πρώτη που πραγματοποίησε εμπλουτισμό ειδικά για εμβρυϊκά κύτταρα και ανάλυση με PCR⁷. Όλες οι έρευνες έως τώρα συμφωνούν πως τα εμβρυϊκά κύτταρα στο μητρικό αίμα είναι σπάνια, συγκεκριμένα υπάρχουν 1 με 6 κύτταρα ανά ml μητρικού αίματος⁸. 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. Σε γενικές γραμμές για να επιτευχθεί αυτός ο εμπλουτισμός των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα χρησιμοποιήθηκε φυγοκέντρηση, χωρίς όμως να επιτευχθεί καθαρό δείγμα λόγω της παρουσίας μητρικών κυττάρων. Έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ειδικοί δείκτες είτε με διαχωρισμό κυττάρων με φλουροσκεϊνή (FACS), είτε με μαγνητικό διαχωρισμό κυττάρων (MACS) για απομόνωση αυτών των κυττάρων και στη συνέχεια προσθήκη ειδικών δεικτών ώστε να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα αυτών των κυττάρων. Τελευταία άρχισε η χρησιμοποίηση της PCR, FISH και της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Ο ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΙ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΜΗΤΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

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 γενετικό υλικό κυκλοφορεί στο μητρικό αίμα. Μελετητές κατόρθωσαν να επιβεβαιώσουν την παρουσία του Y χρωμοσώματος στο μητρικό αίμα από την έκτη εβδομάδα κηύσης^{9,10}. Τα δεδομένα ήταν ακριβή όσον

αφορά στην ηλικία της κηύσης, αφού οι κηύσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνα ήταν κηύσεις που προέκυψαν με τεχνητή γονιμοποίηση.

Έως σήμερα έχουν περιγραφεί/απομονωθεί πέντε τύποι εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα: οι τροφοβλάστες, τα λεμφοκύτταρα, τα κοκκιοκύτταρα, τα εμπύρηνια ερυθρά και τα προγεννητικά κύτταρα¹¹. 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 το οποίο ίσως θα μπορούσε να δώσει λύσεις στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση.

Είναι πολύ σημαντικό να κατανοήσουμε τον ακριβή αριθμό των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα, καθώς είναι πολύ σπάνια. Όλες οι μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα πως ο αριθμός είναι πολύ μικρός ανά ml μητρικού αίματος¹². Η συχνότητα των εμβρυϊκών εμπύρηνων ερυθρών στο μητρικό αίμα υπολογίζεται να είναι 1 με 10 κύτταρα ανά ml μητρικού αίματος¹³. Άρα περίπου 20 εμπύρηνια ερυθρά κύτταρα υπολογίζεται να ανευρίσκονται σε 20 ml μητρικού αίματος. Αυτό το γεγονός καθιστά επιτακτική την ανάγκη να καθοριστεί με όσο το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια ο αριθμός των κυττάρων αυτών, αλλά και η ιδανικότερη στιγμή για αιμοληψία.

Σαφέστατα η λήψη αίματος στις αρχικές εβδομάδες κηύσης είναι πιο επιθυμητή ώστε να επιτευχθεί ταχύτερα η 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^{8,14}. Ένα ακόμη σημαντικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι ερευνητές είναι ο καθορισμός ειδικών δεικτών (markers) που θα επιτρέψουν τον διαχωρισμό και την απομόνωση των εμβρυϊκών κυττάρων με όσο το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια. Ένα τρίτο πρόβλημα είναι το γεγονός πως κάποια εμβρυϊκά κύτταρα μπορεί να παραμείνουν στη μητρική κυκλοφορία για αρκετά χρόνια μετά τον τοκετό, έως και 27 χρόνια, κάτι που

για πρώτη φορά περιγράφηκε από τη Bianchi και συνεργάτες¹⁵.

Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι ο αριθμός των κυττάρων και του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα δεν μεταβάλλεται μόνο με την εβδομάδα κύησης, αλλά είναι διαφορετικός σε διαφορετικές εγκυμοσύνες¹⁴. Είναι είδη γνωστό πως ο αριθμός τους αυξάνει σε:

- Εμβρυϊκές ανευπλοειδίες
- Προεκλαμψία
- Πρόωρο τοκετό
- Στιφρό πλακούντα
- Υπερέμεση κύησης
- Υδράμνιο

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 αίμα¹⁶.

Σε μία μελέτη ο Al-Mufti και συνεργάτες χρησιμοποίησαν αίμα από γυναίκες που πρόκειται να έχουν CVS. Πραγματοποίησε τριπλή φυγοκέντρηση και επιπολασμό με αντίσωμα CD71, MACS και FISH, ώστε να υπολογίσει τον ακριβή αριθμό των εμπύρηνων ερυθρών με πυρήνες που είχαν τρία σήματα. Συγκρίνοντας τα ευρήματά του βρήκε πως πυρήνες με τρία σινιάλα υπήρχαν στο 5% των εμπλουτισμένων κυττάρων του 60% των περιπτώσεων Down και σε καμία από τις φυσιολογικές εγκυμοσύνες. Τα ευρήματα αυτά ήταν ανάλογα με τα αποτελέσματα του προγεννητικού ορμονικού ελέγχου του δευτέρου τριμήνου. Τοποθετώντας σαν όριο το 3% των πυρήνων με τρία σήματα, η ευαισθησία για Down ήταν 97% και το ψευδώς θετικό ποσοστό ήταν 13%. Τα αρνητικά σήματα για την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη ήταν 3% (πίνακας 1).

Αυτή η συσχέτιση μεταξύ χρωμοσωμικών ανωμαλιών και αυξημένων αριθμών εμβρυϊκών κυττάρων και DNA στο μητρικό αίμα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν μία ακόμη μέθοδος προγεννητικού ελέγχου (screening). Φυσικά οι τεχνικές που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό είναι πολύπλοκότερες από αυτές που χρησιμοποιούμε σήμερα για τον ορμονικό προγεννητικό έλεγχο. Ο Νικολαΐδης προτείνει πως ίσως θα μπορούσε να γίνεται FISH στο μητρικό αίμα που έχει υποστεί επεξεργασία για ανεύρεση εμβρυϊκών κυττάρων στις γυναίκες υψηλού κινδύνου για τρισωμίες, αφού πρώτα οι γυναίκες αυτές επιλεγούν από το γενικό πληθυσμό με τη σημερινή μέθοδο προγεννητικού ελέγχου (συνδυασμός μητρικής ηλικίας, αυχενικής διαφάνειας, b-hCG και PAPP-A)¹⁷. Ακολουθώντας αυτή την τεχνική θα μπο-

ρούσε να μειωθεί στο 1% από το γενικό πληθυσμό το ποσοστό που έχει ένδειξη για CVS (γυναίκες με 3% θετικών σημείων για τρισωμία και γυναίκες χωρίς θετικά σινιάλα για εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη) έναντι του 5% που ισχύει με τα σημερινά τεστ.

ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΕΣ

Η ανάπτυξη του πλακούντα μπορεί να οδηγήσει σε δύο περιοχές στις οποίες δυνητικά μπορεί να υπάρξει εμβρυομητρική επαφή. Οι κυτταροτροφοβλάστες διεισδύοντας στον φθαρτό και το μυομήτριο έρχονται σε άμεση επαφή με μητρικούς ιστούς, σχηματίζοντας την ενδοαγγειακή κυτταροτροφοβλάστη. Κατά συνέπεια τα κύτταρα που αποκολλώνται από το στρώμα της κυτταροτροφοβλάστης μπορεί να περάσουν στη μητρική κυκλοφορία¹⁸. Οι τροφοβλάστες ήταν τα πρώτα κύτταρα που αναγνωρίστηκαν στη μητρική κυκλοφορία, λόγω του μεγέθους τους, της χαρακτηριστικής μορφολογίας τους και της επαφής τους με το μητρικό αίμα¹⁹. Παίζουν αποφασιστικό ρόλο στην ανάπτυξη του πλακούντα. Οι συγκυτιοτροφοβλάστες είναι πολυπυρηνικά κύτταρα που ανευρίσκονται στις πλακουντιακές λάχνες και βρίσκονται σε άμεση επαφή με μητρικό ιστό. Αυτά τα κύτταρα μπορεί να μεταφερθούν μέσω της κάτω κοίλης φλέβας στους πνεύμονες, όπου και παγιδεύονται μέσα στα πνευμονικά τριχοειδή και τελικά καταστρέφονται. Εντούτοις είναι δυνατό μερικά τροφοβλαστικά κύτταρα να διαφύγουν στην περιφερική κυκλοφορία, από όπου μπορεί να απομονωθούν και να καλλιιεργηθούν¹⁸. Οι κυτταροτροφοβλάστες είναι μονοπύρηννα κύτταρα που εισβάλλουν στη μήτρα και τις σπειροειδείς αρτηρίες και μπορεί να καταλήξουν στην κυκλοφορία της μητέρας. Αυτή η εμβρυομητρική κυκλοφορία μπορεί να είναι ένα γεγονός σε μία φυσιολογική εγκυμοσύνη, η οποία επηρεάζεται από παράγοντες που αυξάνουν αυτή την κυκλοφορία, όπως: προεκλαμψία, εκλαμψία, δακτυλική αποκόλληση πλακούντα, προχωρημένη εγκυμοσύνη και λοχεία¹⁸.

Μία από τις χαρακτηριστικές διαφορές των τροφοβλαστών είναι η έκφρασή τους με τις κυτταροκερατίνες, ενώ όλα τα αιμοποιητικά κύτταρα όπως και τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων είναι αρνητικά για κυτταροκερατίνη. Το 1984 απομονώθηκαν για πρώτη φορά τροφοβλάστες από το μητρικό αίμα σε διάφορα στάδια της κύησης. Ο διαχωρισμός έγινε με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι H315^{20,21}. Οι μελέτες κατέληξαν πως πέντε ήταν ειδικά για τον εμβρυϊκό ιστό. Μετά την έκθεση του μητρικού αίματος στα δύο από τα πέντε μονοκλωνικά αντισώματα, έγινε PCR στα απομονωμένα αντισώματα για την ανίχνευση Y σειρών. Το φύλο του εμβρύου αναγνωρίστηκε σωστά στα 7 από τα 7 άρρενα

και στα 6 από τα 7 θήλυ. Ο Bruch και συνεργάτες χρησιμοποίησαν μονοκλωνικά αντισώματα (GB17, GB21 και GB25) έναντι των συγκυτιοτροφοβλαστών, αλλά και έναντι μαζί των συγκυτιοτροφοβλαστών και των τροφοβλαστών (GB25). Μετά από κυτταρομετρία ροής τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε PCR για τις σειρές Y και βρήκαν το Y σήμα σε δύο από τα τρία δείγματα. Χρησιμοποιώντας κύτταρα που προέκυψαν μετά από ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και κυτταρομετρία ροής ο Caschux και συνεργάτες²² ανίχνευσαν 47XXY κύτταρα με FISH. Από τους 1.387 πυρήνες, οι 14 (1%) έδειξαν δύο ειδικά για Y σήματα και 45 (3,24%) πυρήνες είχαν ένα ειδικό για το Y σήμα. Εναλλακτικά, τα τροφοβλαστικά κύτταρα μπορεί να αναγνωρισθούν με υβριδισμό με ειδικούς δείκτες προς το HLA-G m-RNA, το οποίο είναι ένα μη πολυμορφικό αντιγόνο μέγιστης ιστοσυμβατότητας, ειδικό για τον πλακουντιακό ιστό. Πρόσφατα ο Vonα και συνεργάτες ανακοίνωσαν μία πρωτοποριακή μέθοδο στηριζόμενη στο διαχωρισμό των κυττάρων με βάση το μέγεθός τους (ISET) από μεικτούς πληθυσμούς κυττάρων. Αυτή η προσέγγιση φάνηκε να είναι ικανοποιητική για την απομόνωση τροφοβλαστών από το μητρικό αίμα. Μετά από ISET οι τροφοβλάστες απομονώνονται με διατομή με λέιζερ με βάση τα κυτταρομορφολογικά και ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά τους²³.

Εντούτοις υπάρχουν κάποια σημαντικά μειονεκτήματα τα οποία καθιστούν δυσχερή τη χρήση των τροφοβλαστών στην προγεννητική διάγνωση. Αρχικά, πολύ μικρός αριθμός κυττάρων υπάρχουν στο πρώτο τρίμηνο, όταν και θα ήταν ιδανική στιγμή για προγεννητική διάγνωση. Δεύτερον, τα περισσότερα τροφοβλαστικά κύτταρα που απελευθερώνονται στη μητρική κυκλοφορία παγιδεύονται άμεσα και καταστρέφονται στους πνεύμονες και μόνο μικρός αριθμός παραμένει στην περιφερική κυκλοφορία. Τρίτον, είναι γνωστό από την εμπειρία με τη CVS ότι στο 1% των συγκυτιοτροφοβλαστών υπάρχει το φαινόμενο του μωσαϊκισμού, με αποτέλεσμα ο καρυότυπος του πλακούντα να διαφέρει από του εμβρύου. Τέτατον, οι συγκυτιοτροφοβλάστες είναι πολυπύρηννα κύτταρα, κάτι που κάνει δύσκολη τη χρήση της FISH. Τέλος, για να πραγματοποιηθεί μαγνητικός διαχωρισμός ή κυτταρομετρία ροής με ενδοπυρηνικά αντισώματα θα πρέπει να επιτευχθεί δίοδος μέσω των κυτταρικών μεμβρανών με μονοκλωνικά αντισώματα. Η ανάπτυξη αυτών των αντισωμάτων για ειδικά αντισώματα της επιφάνειας της τροφοβλάστης δεν είναι ακόμη εφικτή. Σε κάποιες αρχικές ανακοινώσεις για απομόνωση τροφοβλαστών αποδείχθηκε τελικά πως μητρικά λεμφοκύτταρα ήταν αυτά που απορρόφησαν τους παράγοντες της τροφοβλάστης.

Μερικοί ερευνητές εντούτοις κατόρθωσαν να ανακαλύψουν σειρές του Y χρωμοσώματος με PCR και FISH σε απομονωμένα τροφοβλαστικά κύτταρα του μητρικού αίματος^{24,25}.

ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΑ

Από τις αρχές του 1970 αρκετές μελέτες ανέφεραν την παρουσία ανδρικών μεταφάσεων σε καλλιέργειες περιφερικού αίματος γυναικών που ήταν έγκυες σε άρρενα έμβρυα. Ούτε η συγκυτιοτροφοβλάστη, ούτε η κυτταροτροφοβλάστη εκφράζουν πατρικής προέλευσης HLA-A,B ή DR αντιγόνα. Σε αντίθεση, τα εμβρυϊκά λεμφοκύτταρα εκφράζουν πολυμορφικά αντιγόνα HLA κλάσης I και II από τις 12 εβδομάδες κύησης. Κατά τη διάρκεια της κύησης οι πρωτοτόκες μπορεί να αναπτύξουν αντιανθρώπινα αντισώματα έναντι των λεμφοκυτταρικών αντιγόνων HLA, τα οποία δρουν έναντι των πατρικών HLA αντιγόνων που μεταφέρονται από το έμβρυο¹⁸.

Ο Herzenberg και οι συνεργάτες χρησιμοποίησαν τεχνικές κυτταρομετρίας ροής για να εμπλουτίσουν την παρουσία των πατρικά κληρονομούμενων ανθρώπινων λεμφοκυτταρικών αντιγόνων^{24,26}. Τα ζευγάρια που εξετάστηκαν ήταν αυτά στα οποία ο πατέρας αλλά όχι η μητέρα ήταν θετικά HLA-A2. Για να απομονωθούν τα λεμφοκύτταρα από το μητρικό αίμα αρχικά έγινε διαχωρισμός με Ficoll-Hypaque και μετά με φλουροσκεΐνη για τα θετικά για HLA-A2 κύτταρα. Τα θετικά στη φλουροσκεΐνη κύτταρα μετρήθηκαν οπτικά με βάση την παρουσία ή όχι της Y χρωματίνης. Από τις 12 κύσεις που οδήγησαν σε άρρενα νεογνά, οι πέντε έδειξαν κύτταρα θετικά για χρωματίνη Y (εύρος 0,3% έως 1,6% των απομονωμένων κυττάρων). Οι επτά μητέρες γέννησαν νεογνά των οποίων τα λεμφοκύτταρα δεν αντέδρασαν με τον αντιορό αντί-HLA-A2 και κανένα δεν έδειξε κύτταρα θετικά στη Y χρωματίνη. Αργότερα αποδείχθηκε πως τα λεμφοκύτταρα μπορούν να απομονωθούν με τεχνικές μοριακής βιολογίας¹⁶. Ο Yeoh και συνεργάτες χρησιμοποίησαν κυτταρομετρία στο μητρικό αίμα για να διαχωρίσουν τα κύτταρα που χαρακτηρίζονταν για πατρικά και κατά συνέπεια εμβρυϊκά HLA αντιγόνα. Η PCR έδειξε πατρικά και κατά συνέπεια εμβρυϊκά αλληλόμορφα HLA στο μητρικό αίμα²⁷.

Η αναγνώριση των κυττάρων που περιείχαν το Y χρωμόσωμα ήταν μία μέθοδος κατά την οποία ανδρικά κύτταρα, υποτίθεται εμβρυϊκά, διαχωρίζονταν από το μητρικό αίμα²⁸. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η συμβατική καρυοτυπική ανάλυση και η κινναζίνη για το Y χρωμόσωμα φλουροσκεΐνη για να αναγνωρισθούν εμβολικά εμβρυϊκά λευκοκύτταρα. Στη συμβατική καρυοτυπική ανάλυση τα λεμφοκύτταρα ενεργοποιούνται προς διαίρεση με ένα μιτογόνο

και κύκλος διαίρεσης σταματά στη μετάφαση με την προσθήκη κολχικίνης. Τα χρωμοσώματα χρωματίζονται με Giemsa και εξετάζονται με μεγέθυνση. Ανδρικές μιτώσεις βρέθηκαν στο μητρικό αίμα από την όγδοη εβδομάδα κύησης. Αυτές οι μιτώσεις προφανώς προέρχονται από εμβρυϊκά λεμφοκύτταρα, λόγω της μορφολογίας τους και της απάντησής τους στα μιτογόνα. Παρόλο που οι κυτταροτροφοβλάστες μπορεί να διαιρεθούν και να διαφοροποιηθούν, ούτε αυτοί ούτε οι συγκυτιοτροφοβλάστες απαντούν στα μιτογόνα¹⁸. Η κιννακρίνη συνδέει την πυρηνική χρωματίνη στη μεσόφαση και μετάφαση δίνοντας σήμα φλουροσκεΐνης στο Yq12 στο μακρύ σκέλος του Y χρωμοσώματος. Σε αντίθεση με τη συμβατική καρυοτυπική ανάλυση, μπορούν να εξετασθούν μεγάλοι αριθμοί κυττάρων. Εντούτοις, μόνο ένα ποσοστό (μεταξύ 30% με 50%) των ανδρικών λευκοκυττάρων σε μεσόφαση είναι θετικά στη φλουροσκεΐνη. Επίσης, η φλουροσκεΐνη των αυτοσωμάτων και η απουσία της φλουροσκεΐνης στα λεμφοκύτταρα από φυσιολογικούς άρρενες θεωρούνται πηγές λάθους¹⁸.

Η απομόνωση των εμβρυϊκών λευκοκυττάρων δεν έγινε ευρέως διαδεδομένη, αρχικά επειδή η κυτταρική επιφάνεια των εμβρυϊκών λεμφοκυττάρων δεν διαφέρει από αυτή των μητρικών. Οι στρατηγικές διαχωρισμού που στηρίζονται στις διαφορές των HLA δεν μπορούν να λειτουργήσουν όταν συνυπάρχουν πατρικά και μητρικά αντιγόνα HLA. Δεύτερον, αυτή η προσέγγιση υστερεί στο γεγονός πως τα λεμφοκύτταρα που απομονώνονται δεν αντιδρούν στα μιτογόνα ώστε να παραχθούν οι κατάλληλες μεσοφάσεις για καρυοτυπική ανάλυση. Τρίτον, άλλο ένα πιθανό πρόβλημα είναι ότι σε μερικές περιπτώσεις τα εμβρυϊκά λεμφοκύτταρα μπορεί να παραμείνουν στη μητρική κυκλοφορία για χρόνια μετά την εγκυμοσύνη^{24,25}. Η Bianchi και συνεργάτες πραγματοποίησαν κυτταρομετρία ροής με βάση ειδικούς δείκτες (markers) στα αρχέγονα κύτταρα και βρήκαν σχετικές με το Y χρωμόσωμα σειρές σε έξι από τις οκτώ μη έγκυες γυναίκες που είχαν τεκνοποιήσει άρρενα νεογνά στο παρελθόν, από 6 μήνες έως 27 χρόνια²⁹. Το γεγονός αυτό επιβεβαίωσε τα ευρήματα του Schroder και συνεργατών, ο οποίος δύο δεκαετίες πριν παρουσίασαν την ύπαρξη ανδρικών λεμφοκυττάρων στο μητρικό αίμα τον πρώτο χρόνο μετά τη γέννηση άρρενος. Τα κύτταρα που παρέμειναν ήταν είτε λεμφοειδή, είτε μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα, τα οποία εκφράζουν το CD34 ή το CD34 και το CD38 μαζί. Σε μια γυναίκα βρέθηκαν ανδρικά CD+ κύτταρα. Οι γυναίκες που μελετήθηκαν ήταν υγιείς, χωρίς ιστορικό μεταγίσεων. Η μελέτη οδήγησε στην υπόθεση πως η φυσιολογική εγκυμοσύνη μπορεί να οδηγήσει σε κατάσταση μικροχαιμαισμού σε μία γυναίκα²⁹. Ο

Nelson το 1996 υπέθεσε πως ο μικροχαιμαισμός των εμβρυϊκών κυττάρων παίζει κάποιο ρόλο στην αυξημένη συχνότητα των αυτοάνοσων που συμβαίνει στις γυναίκες όταν περάσει η ηλικία γονιμότητας. Αυτή η υπόθεση αργότερα εξετάστηκε σε μία τυφλή μελέτη, η οποία έδειξε στατιστικά σημαντικά αυξημένη ποσότητα ανδρικού (πιθανώς εμβρυϊκού) DNA στο περιφερικό αίμα γυναικών που έπασχαν από σκληροδερμα, σε σύγκριση με τις φυσιολογικές αδελφές τους ή το δείγμα ελέγχου³⁰. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν πως ο εμβρυϊκός μικροχαιμαισμός που προκύπτει από την κύηση και τον τοκετό παίζει κάποιο ρόλο στην παθογένεση του σκληροδερματος. Προφανώς, κατά τη διάρκεια της εμβρυομητρικής μετάγγισης που συμβαίνει την ώρα του τοκετού μεταφέρονται και κάποια εμβρυϊκά κύτταρα με αναπαραγωγική δυνατότητα. Αυτά τα κύτταρα μπορεί να μεταναστεύσουν στα λεμφοποιητικά όργανα και να αναπαραχθούν όταν υπάρχει αντιγονική ομοιότητα μεταξύ εμβρύου και μητέρας. Η απάντηση του ξενιστή μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αυτοάνοσης νόσου. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η παραμονή εμβρυϊκών κυττάρων μετά τον τοκετό μπορεί να σχετίζεται αιτιολογικά με αυτοάνοσες διαταραχές, οι οποίες έχουν μεγαλύτερη συχνότητα σε γυναίκες που έχουν περάσει την αναπαραγωγική τους ηλικία.

ΚΟΚΚΙΟΚΥΤΤΑΡΑ

Από όλα τα κύτταρα που έχουν έως τώρα μελετηθεί, τα κοκκιοκύτταρα είναι αυτά τα οποία έχουν μελετηθεί λιγότερο. Το 1975 ο Zilliacus και συνεργάτες υπολόγισαν πως τα εμβρυϊκά κοκκιοκύτταρα αποτελούσαν το 0,02% έως το 0,04% των μονοπύρηνων κυττάρων στα δείγματα αίματος από 19 εγκύους που βρισκόνταν στο δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της κύησής τους³¹. Ο Wessman το 1992 χρησιμοποίησε τεχνικές in situ υβριδισμού έδειξε υβριδισμό σε ένα δείκτη για το Y χρωμόσωμα στο 0,26% των μητρικών μονοπύρηνων κυττάρων. Χρησιμοποίησε Ficoll-Paque για φυγοκέντρηση μεταβλητής πυκνότητας και στη συνέχεια FISH με ειδικό δείκτη για το Y χρωμόσωμα που αναγνωρίζει το ετεροχρωματικό Yq. Κύτταρα ειδικά για το Y χρωμόσωμα βρέθηκαν σε οκτώ γυναίκες, επτά από τις οποίες γέννησαν άρρενα νεογνά. Η Bianchi περιέγραψε μία μέθοδο η οποία επέτρεπε τον εμπλουτισμό των εμβρυϊκών κοκκιοκυττάρων, τα οποία είχαν απομονωθεί με συνδυασμό μονοκλωνικών αντισωμάτων αντί-CD71, αντιγλυαιμοφορίνης A και αντί-CD36 αντισωμάτων²³. Εντούτοις, το πρόβλημα της παραμονής των κυττάρων αυτών στο μητρικό αίμα μετά τον τοκετό και για μεγάλο χρονικό διάστημα αποτέλεσε τροχόπέδη για τη χρήση αυτών των μεθόδων²⁵.

**ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΑΡΧΕΓΩΝΑ ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ**

Πρόσφατα αποδείχθηκε η παρουσία στη μητρική κυκλοφορία των εμβρυϊκών αιμοποιητικών κυττάρων που εκφράζουν το επιφανειακό αντιγόνο CD34³². Κάτω από κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας ο πληθυσμός των κυττάρων μπορεί να πολλαπλασιασθεί, εξασφαλίζοντας υλικό για επιπλέον γεννητική ανάλυση³³. Αυτό που προκύπτει από τις διάφορες μελέτες είναι πως ο αριθμός των εμβρυϊκών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία αυξάνει όσο η εγκυμοσύνη προχωράει. Έχει παρατηρηθεί διπλασιασμός στο μέσο αριθμό των εμβρυϊκών CD34+ κυττάρων από το πρώτο έως το δεύτερο τρίμηνο της κύησης. Κατά συνέπεια η λήψη αίματος μετά τη δωδέκατη εβδομάδα της κύησης θα πρέπει να αυξάνει την πιθανότητα ανεύρεσης των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα. Μία άλλη προσέγγιση θα ήταν να γίνεται η λήψη αίματος από τη μητέρα σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, μία στο πρώτο τρίμηνο και μία στο δεύτερο, ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα ανεύρεσης των κυττάρων αυτών. Ο Greta και οι συνεργάτες του εξέτασαν την παρουσία των εμβρυϊκών CD34+ κυττάρων σε 30 δείγματα έγκυων γυναικών με άρρενα έμβρυα. Η εφαρμογή της τριπλής βαθμίδωσης φυγοκέντρωσης, μαγνητικού διαχωρισμού και αναγνώριση των κυττάρων αυτών με FISH και nested PCR έκαναν εφικτή τη μελέτη των CD34+ κυττάρων σε κάθε δείγμα αίματος χωριστά σε κάθε τρίμηνο³⁴. Ανδρικά εμβρυϊκά κύτταρα ανιχνεύθηκαν στα οκτώ από τα δέκα δείγματα αίματος του πρώτου τριμήνου, στα εννέα από τα εννέα του δεύτερου τριμήνου και στα δέκα από τα έντεκα του τρίτου τριμήνου. Ο αριθμός των εμβρυϊκών CD34+ κυττάρων σε 10ml μητρικού αίματος αυξήθηκε δύο φορές από το πρώτο στο δεύτερο τρίμηνο και μειώθηκε κατά τον ίδιο βαθμό στο τρίτο τρίμηνο (3/6/3 κύτταρα αντίστοιχα). Έχουν δημοσιευθεί διάφορες μελέτες όσον αφορά στην επιτυχία της *in vitro* καλλιέργειας για τον πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών προγεννητικών κυττάρων που απομονώνονται από τη μητρική κυκλοφορία. Κάτω από κατάλληλες προϋποθέσεις αυτά τα κύτταρα καλλιεργούνται και όχι μόνο είναι πιο πολλά στο εμβρυϊκό αίμα, αλλά και πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα από αυτά που έχουν προέλευση από ενήλικα³⁵. Η επάλειψη των θετικών κλασμάτων σε ημιστέρεο μέσο μεθυλσελουλόζης ή σε υγρή καλλιέργεια οδήγησε σε βελτίωση της διάγνωσης του φύλου και στην αύξηση των προσλαμβανόμενων κυττάρων για μελέτη. Στη μελέτη του Gietta παρατηρήθηκε με τη βοήθεια της FISH μετά από υγρή καλλιέργεια αύξηση 2,4 φορές των CD34+ κυττάρων³⁶.

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα στη χρήση αυτών

των προγεννητικών κυττάρων για ανάλυση είναι το ότι ένας μικρός αριθμός κυττάρων (1 με 2 κύτταρα ανά 20ml μητρικού αίματος) φαίνεται πως παραμένει από μία εγκυμοσύνη στην επόμενη³⁶. Ένα δεύτερο σοβαρό πρόβλημα είναι η έλλειψη των ειδικών δεικτών (markers) για τα CD34+ κύτταρα. Ο έλεγχος του φύλου με FISH ή PCR είναι δυνατός στην περίπτωση που το έμβryo είναι άρρεν. Εντούτοις, αυτή η προσέγγιση δεν δίνει ικανοποιητική λύση, διότι τα CD+ κύτταρα από θηλυκά έμβρυα δεν μπορούν να αναγνωρισθούν από μητρικά CD34+ κύτταρα.

ΕΛΕΥΘΕΡΟ DNA

Για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα υπήρχε άγνοια όσον αφορά στη δυνατότητα χρήσης του εμβρυϊκού DNA που κυκλοφορεί στο αίμα της μητέρας. Αυτό το γεγονός άλλαξε από τη στιγμή που ανακαλύφθηκαν μέσα στο πλάσμα καρκινοπαθών εξωκυτταρικά τμήματα DNA³⁷. Στηριζόμενος σε αυτή την ανακάλυψη ο Lo και συνεργάτες εξέτασαν την πιθανότητα ύπαρξης του φαινομένου αυτού στην εγκυμοσύνη. Απέδειξε την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων εμβρυϊκού DNA (3,4% έως 6,2%) στο ολικό DNA του μητρικού πλάσματος, με το μέσο όρο της συγκέντρωσης του εμβρυϊκού DNA να αυξάνει κατά 12 φορές στη διάρκεια της κύησης³⁸. Από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων τμημάτων DNA του Y χρωμοσώματος φάνηκε πως η συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA είναι πολύ μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση των εμβρυϊκών κυττάρων στο μητρικό αίμα. Σύμφωνα με τον Lo δεν βρέθηκε ανδρικό DNA στο πλάσμα της μητέρας όταν η τρέχουσα εγκυμοσύνη ήταν θηλέος και η προηγούμενη κύηση ήταν άρρενος. Αυτό σημαίνει πως μάλλον το εμβρυϊκό DNA δεν παραμένει για πολύ καιρό στο μητρικό αίμα.

Αναμφισβήτητα η ανακάλυψη του εμβρυϊκού γεννητικού υλικού στο μητρικό αίμα θα μπορούσε να δώσει νέες προοπτικές στην εξέλιξη των μη επεμβατικών μεθόδων προγεννητικού ελέγχου. Μία πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι πιθανώς η συνεχής διέλευση εμβρυϊκών κυττάρων διαμέσου του πλακούντα με συνακόλουθη καταστροφή τους από το ανοσολογικό σύστημα της μητέρας, με αποτέλεσμα την παραμονή μόνο DNA στο πλάσμα. Μια άλλη πιθανή εξήγηση είναι η συνεχής αναδιαμόρφωση της εμβρυομητρικής επιφάνειας του πλακούντα, με συνεχή κυτταρόλυση και απελευθέρωση του εμβρυϊκού DNA στη μητρική κυκλοφορία. Τέλος, μπορεί να συμβαίνει απόπτωση των εμβρυϊκών κυττάρων λόγω ανάπτυξης³⁹.

Η απάντηση στο ερώτημα εάν τα κύτταρα που αποπίπτουν αποτελούν την κύρια πηγή του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα την έδωσε ο Zhong και

συνεργάτες⁴⁰. Ο τελευταίος μελέτησε δείγματα αίματος από διάφορες έγκυες γυναίκες με φυσιολογικές και παθολογικές κνήσεις αρρένων εμβρύων. Στα ίδια δείγματα καταμέτρησε τα εμβρυϊκά κύτταρα στο αίμα της μητέρας με τη χρήση της FISH με ειδικά για X και Y σωματίδια, αλλά και με τη χρήση της PCR και στη συνέχεια μέτρησε τα επίπεδα του κυτταρικού DNA. Δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια ποσοτική σχέση μεταξύ εμβρυϊκών κυττάρων και εμβρυϊκού DNA στις φυσιολογικές εγκυμοσύνες, στις κνήσεις με προεκλαμψία ή στις κνήσεις που κατέληξαν σε πρόωρο τοκετό. Έτσι λοιπόν, λόγω του ότι τα εμβρυϊκά κύτταρα είναι πολύ σπάνια, θεωρείται απίθανο να ευθύνονται για τον όγκο του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα. Η Bianchi προσπάθησε να απαντήσει στο ερώτημα εάν τα κύτταρα που αποπίπτουν κατά την αιμοληψία μπορούν να λύνονται και να απελευθερώνουν το γεννητικό τους υλικό και επίσης εάν οι κυττοκίνες και τα μητρικά κύτταρα ανοσίας μπορεί να καταστρέφουν τα εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα και να απελευθερώνεται έτσι το εμβρυϊκό DNA⁴¹. Έτσι λοιπόν μέτρησε την ποσότητα του Y χρωμοσωμικού DNA σαν δείκτη ποσοτικό του εμβρυϊκού DNA και τη β αιμοσφαιρίνη σαν ποσοτικό δείκτη του ολικού (μητρικό και εμβρυϊκό) DNA στο αίμα της μητέρας. Στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πρώτο και τρίτο τρίμηνο και στις επαναληπτικές μετά από 24 ώρες από την πρώτη αιμοληψία δεν βρέθηκε κάποια αύξηση στην ποσότητα του εμβρυϊκού DNA.

Ο πλακούντας είναι ίσως λογικά η πηγή του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA, λόγω του μεγθους του και της άφθονης κυτταρικής δραστηριότητας. Πολλαπλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την ποσοτική σχέση μεταξύ του ελεύθερου DNA στο μητρικό αίμα και την πρόοδο της κύησης και πως ο πλακούντας είναι η κύρια πηγή του DNA^{42,43}. Μετρώντας το εμβρυϊκό DNA στο αίμα της μητέρας βρέθηκε πως σχεδόν όλη η ποσότητα του ελεύθερου DNA εξαφανίζεται από την κυκλοφορία λεχωίδος δύο ώρες μετά τον τοκετό⁴⁴. Ίσως η πιο τρανή απόδειξη έρχεται από το γεγονός πως πλακουντιακό mRNA ανευρίσκεται στο μητρικό αίμα⁴⁵. Παρόλο που η πηγή προέλευσης του ελεύθερου DNA και RNA στο αίμα της μητέρας δεν είναι βέβαιη, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα νουκλεϊκά οξέα προέρχονται από την αποδόμηση της τροφοβλάστης. Επιπλέον, η παρουσία της RNA τρανσκριπτάσης για την χοριογοναδοτροπίνη και το πλακουντιακό λακτογόνο αποδεικνύει πως τουλάχιστον εν μέρει υπάρχει πλακουντιακή συμμετοχή στην προέλευση του DNA⁴⁶. Είναι επίσης σημαντικό πως εμβρυϊκό DNA έχει βρεθεί και σε άλλα μητρικά υγρά, όπως το αμνιακό υγρό, το μητρικό εγκεφαλονωτιαίο υγρό αλλά και το μητρικό περιτοναϊκό υγρό⁴¹.

Η συγκέντρωση του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA στο αμνιακό υγρό είναι περίπου 200 φορές μεγαλύτερη από αυτή στο μητρικό αίμα. Αυτό το γεγονός οδήγησε στην υπόθεση της απευθείας μεταφοράς μοριδίων DNA διαμέσου του πλακούντα ή των μεμβρανών.

Μπορεί η απομόνωση του εμβρυϊκού DNA να είναι τεχνολογικά πιο εύκολη από την απομόνωση εμβρυϊκών κυττάρων. Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA αυξάνει κατά τη διάρκεια της κύησης και έχει υπολογισθεί πως αντιστοιχεί στο 3,4% έως στο 6,2% του ολικού DNA του μητρικού αίματος²³. Επιπλέον, το εμβρυϊκό DNA εξαφανίζεται από την κυκλοφορία σε δύο ώρες μετά τον τοκετό⁴⁶ και έχει μέσο όρο ζωής 16,3 λεπτά (από 4 έως 30 λεπτά)⁴⁴. Επιπλέον, εκτός από σειρές DNA έχουν βρεθεί και σειρές RNA στη μητρική κυκλοφορία, σε ποσότητες αρκετά σταθερές, που παραμένουν για τουλάχιστον 24 ώρες επειδή προστατεύονται από αποδόμηση λόγω σύνδεσής τους με ειδικά μορίδια⁴⁷. Η εμβρυομητρική αναλογία είναι 970 και 775 φορές υψηλότερη για το εξωκυτταρικό DNA σε σχέση με την αναλογία εμβρυϊκών και μητρικών κυττάρων σε κνήσεις πρώτου και τρίτου τριμήνου αντίστοιχα²³. Υπολογισμοί δείχνουν πως το εμβρυϊκό DNA απελευθερώνεται με μέσο ρυθμό 2,24 έως 100.000 σωματίδια ανά λεπτό και πως το εμβρυϊκό DNA στο μητρικό αίμα μπορεί να ανευρεθεί από την 32η ημέρα κύησης^{41,48}.

Κάποιοι συγγραφείς όπως ο Invernizzi⁴⁹ και ο Lambert⁵⁰ απέδειξαν την παρουσία ανδρικού γενετικού υλικού στο πλάσμα 22% και 36% αντίστοιχα γυναικών που γέννησαν άρρενα νεογνά χρόνια πριν. Αναφέρουν πως τα εμβρυϊκά κύτταρα που παραμένουν στο μητρικό αίμα μετά τον τοκετό μπορεί να «μολύνουν» το αίμα, με αποτέλεσμα την παραμονή και εμβρυϊκού DNA. Η πιο πιθανή ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων είναι πως οι συγκεκριμένοι μελετητές προχώρησαν σε μία μόνο φυγοκέντρηση του μητρικού αίματος και όχι σε δύο, με αποτέλεσμα τον ανεπαρκή διαχωρισμό των κυττάρων από το πλάσμα και την τελική ανίχνευση DNA που προέρχεται από εμβρυϊκά προγεννητικά κύτταρα και λευκοκύτταρα⁵¹.

Η ικανότητα μέτρησης του εμβρυϊκού ελεύθερου DNA στο μητρικό αίμα οδήγησε σε κάποιες κλινικές εφαρμογές. Έχουν αναφερθεί μελέτες προσδιορισμού του φύλου²⁴ και της ομάδας RhD του εμβρύου⁵² για φυλοσύνδετα νοσήματα, αχονδροπλασία²⁴, μυοτονική δυστροφία²⁴ και πατρικά κληρονομούμενη χρωμοσωμική ανευπλοειδία^{24,52}. Έχουν αναφερθεί νέες προοπτικές για την ανάπτυξη μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης για αυτοσωματικά υπολειπόμενα νοσήματα, όπως συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων, β θαλασσαιμία και κυστική ίνωση^{53,54}.

Ο προσδιορισμός του εμβρυϊκού RhD στηριζόμενος στην ανάλυση του DNA έχει αποκτήσει τέτοια ακρίβεια που είδη χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη⁵⁵. Ο Honda και συνεργάτες⁴² χρησιμοποιώντας συμβατική PCR, απέδειξαν ανίχνευση 40 αρρένων εμβρύων στις 7 εβδομάδες κύησης με ευαισθησία 100%. Επίσης χρησιμοποιώντας real time PCR πέτυχαν ευαισθησία 100% στις 5 εβδομάδες κύησης. Η Bianchi υποστηρίζει ότι σε εγκύους με έμβρυο με τρισωμία 21 η συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA είναι διπλάσια απ' ό τι σε φυσιολογικές κύσεις⁴¹. Επίσης χρησιμοποίησε τις μετρήσεις του εμβρυϊκού DNA στο τετραπλό τεστ του δευτέρου τριμήνου και έδειξε πως με ένα ψευδώς θετικό ποσοστό 5%, το ποσοστό ανίχνευσης του συνδρόμου DOWN, αυξήθηκε από 81% σε 86%. Πιθανώς ο ποσοτικός προσδιορισμός εμβρυϊκού DNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν μέσο προγεννητικού τεστ. Άλλη χρήση θα μπορούσε να είναι η πρόληψη της προεκλαμψίας. Πολλές μελέτες έδειξαν αύξηση έως και 5 φορές στην ποσότητα του εμβρυϊκού DNA σε δείγματα αίματος από γυναίκες με συμπτώματα προεκλαμψίας^{56,57}. Τα αυξημένα επίπεδα του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτη και για την πρόληψη του πρόωρου τοκετού. Σύμφωνα με τον Leung και συνεργάτες⁵⁸ η αύξηση του εμβρυϊκού DNA στο μητρικό αίμα, που συμβαίνει σε φυσιολογικές κύσεις⁵⁹ και που αυξάνει απότομα μετά τις 32 εβδομάδες κύησης, μπορεί να υποδηλώνει αλλαγές που προμηνύουν πρόωρο τοκετό. Βρήκε πως υπάρχουν σημαντικά αυξημένες ποσότητες εμβρυϊκού DNA σε γυναίκες που είχαν πρόωρο τοκετό πριν από τις 34 εβδομάδες κύησης. Τα επίπεδα του εμβρυϊκού DNA αυξάνονται επίσης σε προδρομικό πλακούντα⁶⁰, υπερέμεση⁶¹, αλλά όχι και σε κύσεις με υπολειπόμενη ανάπτυξη του εμβρύου⁶².

Παρά τις διαφαινόμενες πολλαπλές δυνατότητες χρήσης της ανίχνευσης του εμβρυϊκού DNA, η παρουσία του ανάμεσα στο μητρικό DNA περιορίζει τη χρήση του μόνο σε περιπτώσεις που το έμβρυο είναι άρρεν. Αποτελεί μεγάλο μειονέκτημα το γεγονός πως μητέρα και έμβρυο έχουν περίπου το 50% του γεννητικού τους υλικού ίδιο. Κατά συνέπεια είναι δυνατό να ανιχνευτούν μόνο τμήματα του DNA που κληρονομούνται από τον πατέρα. Η παρουσία εμβρυϊκού RNA στο μητρικό αίμα έχει είδη αποδειχθεί^{63,64}. Παραδόξως το mRNA εμβρυϊκής προέλευσης φαίνεται πως είναι αρκετά σταθερό. Ίσως η αξιόπιστη ανίχνευσή του να βοηθήσει μελλοντικά στον εμβρυϊκό γονιδιακό έλεγχο.

ΕΜΠΥΡΗΝΑ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΥΣΚΟΛΙΕΣ

Ίσως το καλύτερα περιγραφόμενο εμβρυϊκό κύτ-

ταρο στο μητρικό αίμα είναι ο ερυθροβλάστης, ένα εμπύρηνο ερυθρό αιμοσφαίριο που ταξιδεύει από την εμβρυϊκή στη μητρική κυκλοφορία. Στην τεχνική Kleihauer-Betke, η έκπλυση με οξύ της αιμοσφαιρίνης της μητέρας καθιστά τα μητρικά ερυθρά αιμοσφαίρια ασταθή. Τα μεγαλύτερα εμβρυϊκά αιμοσφαίρια, τα οποία περιέχουν εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, είναι σταθερά στην τεχνική αυτή και παραμένουν ξεκάθαρα χρωματισμένα. Με αυτή την τεχνική επιτεύχθηκε ανίχνευση εμβρυϊκών ερυθρών στο περιφερικό μητρικό αίμα από την 8η εβδομάδα κύησης¹⁸. Τα εμπύρηνια εμβρυϊκά ερυθρά κύτταρα (Nabs) και οι προγεννητορές τους έχουν κερδίσει την ερευνητική προσοχή σαν κύτταρα στόχος για ανίχνευση, λόγω του ότι: είναι μονοκύτταρα, είναι άφθονα στο πρώτο τρίμηνο στην εμβρυϊκή κυκλοφορία όταν και αρχίζει η αιμοποίηση στο λεκιθικό ασκό, είναι διαφοροποιημένα, εκφράζοντας ειδικά αντιγόνα όπως οι υποδοχείς της τρανσφερίνης, παράγουν μοναδικές αλύσους αιμοσφαιρίνης όπως η ζ και η γ και τέλος έχουν μικρό χρόνο ζωής. Τα εμπύρηνια εμβρυϊκά ερυθρά περιέχουν μεγάλη ποσότητα από πυρηνικά γονίδια. Εάν η εμβρυομητρική μετάγγιση αντανακλά το εμβρυϊκό αίμα, τότε η αναλογία ανάμεσα στα ερυθρά προς τα λευκά αιμοσφαίρια είναι 1.000 προς 1. Έως τώρα δεν έχει αναφερθεί περίπτωση παραμονής εμπύρηνων εμβρυϊκών ερυθρών σε επόμενη εγκυμοσύνη. Γενικά μπορεί να ειπωθεί πως τα εμπύρηνια εμβρυϊκά ερυθρά έχουν χαρακτηριστική μορφολογία του πυρήνα, σχήμα, θετική χρώση γ σφαιρίνης στο κυτταροπλάσμα, περιφερική φωτεινότητα του κυτταροπλάσματος, που τα κάνει να ξεχωρίζουν από τα μητρικά κύτταρα⁶⁵.

Τα Nabs είναι πολύ σπάνια στο αίμα της μητέρας. Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για ανίχνευση εμβρυϊκών χρωμοσωμικών ανωμαλιών, θα πρέπει πρώτα να γίνει κάποιου είδους εμπλουτισμός τους. Έχουν αναπτυχθεί δύο μέθοδοι προσέγγισης: ο «θετικός» διαχωρισμός των Nabs και η «αρνητική» απομάκρυνση των ανεπιθύμητων μητρικών κυττάρων. Κάποιες μέθοδοι διαχωρισμού συνδυάζουν και τις δύο τεχνικές. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα όσον αφορά στην απομόνωση των κυττάρων, στο κόστος, στην ευκολία και στον απαιτούμενο χρόνο. Σημαντικός παράγοντας είναι αφενός η απομόνωση των κυττάρων (ακριβής αριθμός) και αφετέρου η καθαρότητα (ποσοστό των εμβρυϊκών κυττάρων σε σχέση με τα μητρικά στο εμπλουτισμένο δείγμα). Έχουν αναφερθεί πολλές μέθοδοι διαχωρισμού των εμβρυϊκών κυττάρων από το μητρικό αίμα όπως: η βαθμίδωση πυκνότητας, η αναστολή της ανθρακικής ανυδράσης, ο μαγνητικός διαχωρισμός, ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός, η κυτταρομετρία ροής και οι μικροχειρι-

σμοί σε κάθε κύτταρο χωριστά³⁰.

Οι περισσότεροι ερευνητές ξεκινούν με 20 έως 40ml μητρικού φλεβικού αίματος. Ένας αρχικός εμπλουτισμός επιτρέπει την απομάκρυνση των μητρικών απύρηνων ερυθρών αιμοσφαιρίων, είτε με βαθμίδωση πυκνότητας, είτε με έκθεση σε λυτικούς εξουδετερωτές (buffers). Ο διαχωρισμός με πυκνότητα ροής στηρίζεται σε συγκέντρωση των μητρικών και των εμβρυϊκών κυττάρων σε διαφορετικά διαλύματα με βάση τα χαρακτηριστικά πυκνότητάς τους⁶⁶. Επιπλέον, «κάθαρση» του μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες τεχνικές διαχωρισμού, κυρίως με μαγνητικό διαχωρισμό (MACS)^{67,68,69} ή με κυτταρομετρία ροής (FACS)⁷⁰. Με τη FACS τα δεσμευμένα εμβρυϊκά κύτταρα σε συζευγμένα αντισώματα φλουροσκεΐνης διαχωρίζονται με κυτταρομετρία ροής. Στη MACS τα μητρικά κύτταρα απομακρύνονται δια της αντίδρασής τους με ειδικά αντισώματα έναντι μη εμβρυϊκών αντιγόνων, με ή χωρίς επιπλέον εμπλουτισμό των εμβρυϊκών κυττάρων με αντισώματα έναντι εμβρυϊκών δεικτών⁶⁹. Η γεννητική ανάλυση των απομονωμένων κυττάρων στηρίζεται σε δύο τεχνικές, τον *in situ* υβριδισμό με φλουροσκεΐνη (FISH) με ειδικούς χρωμοσωμικούς δείκτες και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμέρασης (PCR). Η FISH βρήκε μεγάλη εφαρμογή, λόγω του ότι δεν απαιτείται ο διαχωρισμός του κυττάρου. Έτσι λοιπόν, οι κυριότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως τριπλοειδίες, αυτοσωματικές τρισωμίες και φυλετικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορεί να ανιχνευτούν³⁰. Η χρήση της PCR έπαιξε επίσης σημαντικό ρόλο, καθώς ο μικρός αριθμός των εμπύρηνων εμβρυϊκών κυττάρων έπαψε να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε PCR για το Y χρωμόσωμα, ώστε να αποδειχθεί η παρουσία των πατρικά κληρονομούμενων εμβρυϊκών γονιδίων στο αίμα της μητέρας^{6,7}. Στη συνέχεια η PCR χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί η παρουσία πατρικά κληρονομούμενων εμβρυϊκών γονιδίων, τα οποία δεν υπήρχαν στη μητέρα, όπως μεταλλάξεις της β σφαιρίνης, το Rh D, C, HLA DR³⁰.

Η Bianchi και συνεργάτες ήταν οι πρώτοι που επικεντρώθηκαν στα εμπύρηννα εμβρυϊκά ερυθρά αιμοσφαίρια⁷¹. Σε περιπτώσεις τρισωμίας 21 ο αριθμός των κυττάρων αυτών φαίνεται πως αυξάνει¹³ και η συχνότητά τους είναι περίπου 1 με 10 κύτταρα ανά ml¹³. Ο Hamada και συνεργάτες⁷² χρησιμοποίησαν και τη FISH και την PCR ώστε να υπολογίσουν τον ακριβή αριθμό των εμβρυϊκών ερυθρών στο μητρικό αίμα. Και με τις δύο αυτές τεχνικές μετρήθηκαν λιγότερα από 1 εμβρυϊκό κύτταρο στα 10.000 εμπύρηννα μητρικά σε τελειομένες κύησεις. Λόγω του μικρού αριθμού τους, τα εμπύρηννα εμβρυϊκά ερυθρά αιμοσφαίρια θα πρέπει να απομονωθούν από τα υπόλοιπα κύτταρα με

συνδυασμό τεχνικών διαχωρισμού όπως η βαθμίδωση πυκνότητας, η FACS, ο MACS και η κυτταρομετρία δυναμικού. Υπάρχουν ανακοινώσεις επιτυχημένης προγεννητικής διάγνωσης εμβρυϊκών ανευπλοειδιών και μονογονιδιακών κληρονομούμενων παθήσεων, βασιζόμενες στην ανάλυση των εμβρυϊκών NRBC^{73,74}. Οι μέθοδοι που έχουν ανακοινωθεί είναι αρκετά πολύπλοκες και απαιτούν μεγάλη προσπάθεια. Στις μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε η FACS πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός και εμπλουτισμός των κυττάρων αυτών με ειδικούς δείκτες αντισώματα, τα οποία αναγνωρίζουν επιλεκτικούς επιφανειακούς κυτταρικούς ή ενδοκυτταρικούς δείκτες⁷³. Η MACS στηρίχθηκε στην παγίδευση σε μαγνητική επιφάνεια κυττάρων που έχουν επισημανθεί με σύμπλεγμα σιδήρου-αντισώματος⁶⁷. Η Bianchi και ο Holzgreve ήταν πρωτοπόροι σε αυτές τις τεχνικές. Για την επίτευξη της απομόνωσης των εμπύρηνων ερυθρών έχουν δημιουργηθεί διάφορα ειδικά αντισώματα. Οι ερυθροβλάστες αναγνωρίζονται με τη χρήση του anti-CD 71 αντισώματος, το οποίο αναγνωρίζει τους υποδοχείς της τρανσφερίνης⁷⁵, αλλά δυστυχώς αναγνωρίζει και άλλα εμπύρηννα ερυθρά κύτταρα, καθώς και κάποια κύτταρα της μητέρας και κατά συνέπεια απομονώνεται μείγμα εμβρυϊκών και μη εμβρυϊκών κυττάρων. Επιπλέον, μόνο οι μισοί περίπου από τους ερυθροβλάστες στο μητρικό αίμα είναι εμβρυϊκής προέλευσης⁷⁶. Η αντί-γ σφαιρίνη έχει επίσης χρησιμοποιηθεί, αλλά υπάρχει επιμόλυνση με μητρικά εμπύρηννα κύτταρα. Παρόλο που τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις εμβρυϊκές αλυσίδες ζ και ε είναι ειδικά για τα εμβρυϊκά κύτταρα, η έκφραση αυτών των μοριδίων των σφαιρινών μειώνεται δραματικά καθώς η κύηση προχωράει. Ειδικά η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τη ζ σφαιρίνη μειώνεται σημαντικά μετά την 7^η εβδομάδα κύησης και παρόλο που η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την ε σφαιρίνη μειώνεται αργότερα, είναι παρούσα μόνο στα μισά εμβρυϊκά εμπύρηννα ερυθρά στις 11 με 12 εβδομάδες κύησης και χάνεται μετά την 15^η εβδομάδα⁷⁷. Άλλοι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση των NRBC είναι ο CD36 υποδοχέας της θρομβοσπονδίνης⁷⁸, γλυκοφορίνης A⁶⁶ και εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης⁷⁹. Ασθενείς με συγκεκριμένες αιμοσφαιρινοπάθειες μπορεί να παρουσιάσουν παραμονή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης. Σε φορείς β θαλασσαιμίας βρέθηκε αυξημένος αριθμός γ θετικών κυττάρων^{80,20}.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Σήμερα η προγεννητική διάγνωση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών γίνεται με επεμβατικές μεθόδους, οι οποίες έχουν κάποιο κίνδυνο αποβολής. Αυτός είναι και ο λόγος που η ένδειξη για λήψη χοριακής λάχνης

ή αμνιοπαρακέντηση περιορίζεται σε συγκεκριμένες ομάδες υψηλού κινδύνου σύμφωνα με τα σημερινά τεστ ανίχνευσης (screening tests). Αυτά τα τεστ δεν έχουν 100% ευαισθησία. Όλα αυτά κάνουν επιτακτική την ανάγκη για την ανάπτυξη μη επεμβατικών μεθόδων για προγεννητική διάγνωση. Μια εναλλακτική μέθοδος θα ήταν ο διαχωρισμός και η γονιδιακή ανάλυση των σπάνιων αυτών εμβρυϊκών κυττάρων από το μητρικό αίμα. Εάν η προγεννητική διάγνωση γίνει εφικτή χωρίς χρήση επεμβατικής μεθόδου, τότε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για όλες τις έγκυες γυναίκες χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για το έμβρυο.

Summary

Daniilidis A, Kouzi-Koliakou K

The presence of fetal cells in maternal blood. What do we know today?

Helen Obstet Gynecol 19(4):353-365, 2007

Evidence for the presence of fetal cells in maternal circulation was first presented in 1959 by Douglas et al. Kleihauer et al. (1957) found fetal cells in the blood of pregnant women by using a stain for fetal haemoglobin. In contrast to the traditional knowledge that placenta is an impermeable barrier which prevents any kind of communication between maternal and fetal blood, multiple studies have already showed that intact fetal cells and fetal nucleic acids circulate freely within maternal blood. Fetal cells in maternal blood are very rare and a major issue is to understand the true number of fetal cells present in maternal circulation. Numerous reports suggest different numbers of fetal cells and DNA not only in various gestational ages but also in different pregnancies.

To date five types of fetal cells have been isolated/detected from maternal blood: trophoblasts, lymphocytes, granulocytes, nucleated erythrocytes, progenitor cells and also free fetal DNA. These cell types could potentially be used for prenatal diagnosis. However there are some drawbacks which prevent us from being optimistic for the use of these cells for accurate prenatal diagnosis.

Key words: prenatal diagnosis, fetal cells, free DNA.

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 Blutausstrieses. *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. Hamada H, Arimani T, Kubo T, Hamaguchi H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 1993; 91:427.
10. Liou JD, et al. Fetal cells in the maternal circulation during the first trimester in pregnancies. *Hum Genet* 1993; 91:427.
11. Joe Leigh S, Sherman E. Isolating fetal cells from maternal blood. *Jama* 1993 November; 270:19:2357-2361.
12. Bianchi AP, Shuber 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.
13. 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; 61:822-829.
14. Kuo PL. Frequencies of fetal nucleated red cells in maternal blood during different stages of gestation. *Fetal Diagn Ther* 1998; 13:375-379.
15. 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.
16. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Prenatal diagnosis. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF editors. *Thompson and Thompson genetics in medicine Philadelphia: Wb Saunders* 2001; p. 359-374.
17. Nikolides KH, Neil J. Sebire, Rosaline JM Snijeders. Nuchal translucency and chromosomal defects. *THE 11-14 WEEK SCAN*. Parthenon publishing

- 1999; 1:3-65.
18. Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002; 2:1:32-40.
 19. Hawes CS, Suskin H, Petropoulos A, Latham SE, Mueller UW. A morphologic study of trophoblast isolated from peripheral blood of pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1297-1300.
 20. Covone AE, Johnson PM, Mutton D, Adinolfi M. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet* 1984; 2:841-843.
 21. Mueller OW, Hawes CS, Wrigth AE, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 1990; 336:197-200.
 22. Cacheux V, Milesi-Fluet C, Tachdjian G, et al. Detection of 47, XYY trophoblast cells in maternal blood by fluorescence in situ hybridization after using immunomagnetic lymphocyte depletion and flow cytometry sorting. *Fetal Diagn Ther* 1992; 7:190-194.
 23. Rossa WK Chiu, YM Dennis Lo. Non-invasive prenatal diagnosis on the horizon? *Pharmacogenomics* 2003; 4(2):191-200.
 24. Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *The Journal of Pediatrics* 1995; 127:6:847-856.
 25. Steele CD, Wapner RJ, Smith JB, Haynes MK, Jackson LG. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal blood: a review. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 1996; 39:4:801-813.
 26. 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.
 27. Yeoh SC, Sargent IL, Redman CWG, Wordsworth BP, Thein SL. Detection of fetal cells in maternal blood. *Pren Diagn* 1991; 11:117-123.
 28. Wessman M, Ylinen K, Knuutila S. Fetal granulocytes in maternal blood detected by in situ hybridization. *Prenat Diagn* 1992; 12:12:993-1000.
 29. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria. Male progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:705-708.
 30. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation. Feasibility for prenatal diagnosis. *Brit J of Haematol* 1999; 105:574-583.
 31. Zilliacus R, de la Chapelle A, Schroder J, Tiilikainen A, Kohne E, Kleihauer E. Transplacental passage of fetal blood cells. *Scan J Hematol* 1975; 15:333-338.
 32. Wessman M, Ylinen K, Knuutila S. Fetal granulocytes in maternal venous blood detected by in situ hybridization. *Prenat Diagn* 1992; 12:993-1000.
 33. Little MT, et al. Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* 1997; 89:2347-2358.
 34. Jansen MW, et al. How useful is the in vitro expansion of fetal CD34+ progenitor cells from maternal blood samples for diagnostic purposes? *Prenat Diagn* 2000; 20:725-731.
 35. Guetta E, Simchen MJ, Mammon-Daviko K, Gordon D, Aviram-Goldring A, Rauchbach N, Barkai G. Analysis of fetal blood cells in the maternal circulation: challenges, ongoing efforts, and potential solutions. *Stem Cells and Development* 2004; 13:93-99.
 36. S Eridani, M Umberto, P Massaro, ML La Targia, AT Maiolo, AM Osca. Cytokine effect on ex vivo expansion of haemopoietic stem cells from deferent human sources. *Biotherapy* 1998; 11:291-296.
 37. Guetta E, Gordon D, Simchen MJ, Goldman B, Barkai G. Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal cells CD+34 and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2003; 30:13-21.
 38. Chen XQ, Stroum M, Magnenat JL, et al. Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:9:1033-1035.
 39. Lo YMD, N Corbetta, PF Chamberlain, V Rai, IL Sargent, CWG Redman, JS Wainscoat. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485-487.
 40. Bianchi DW. Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J Perinat Med* 1998; 26:175-185.
 41. Zhong XY, Holzgreve W, Haln 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.
 42. Honda H, Miharu N, Ohasi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002; 110:75-79.
 43. Chan LY, Leung TN, Chan KC, Tai HL, Lau TK, Wong EM, et al. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *Clin Chem* 2003; 49:678-680.
 44. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal blood. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1:218-224.

45. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, et al. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4360-4362.
46. Jouni U, Pfendner E, Jackson LG. Probing the fetal genome: progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Trends In Molecular Medicine* 2003; 9:8:339-343.
47. Poon LL, et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46:1832-1834.
48. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgata L, Bianchi DW, et al. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 2004 Mar; 81:3:638-644.
49. Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet* 2002; 110:6:587-591.
50. Lambert NC, Lo YMD, Erickson TD, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood* 2002; 100:8:2845-2851.
51. Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal blood. *Clin Chem* 2001; 47:1607-1613.
52. Lo YMD, Bowel PJ, Selinger M, et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of Rhesus negative mothers. *Lancet* 1993; 34:1147-1148.
53. Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, et al. Prenatal exclusion of b-thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002; 360:998-1000.
54. Gonzalez- Gonzalez MC, Garsia-Hoyos M, Trujillo MJ, et al. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22:10:946-948.
55. Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, et al. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002; 2:1:32-40.
56. Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell-free DNA in maternal blood, new insight into preeclampsia. *Hum Reprod Update* 2002; 8:501-508.
57. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001; 47:137-139.
58. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YMD. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352:1904-1905.
59. Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum, implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62:768-775.
60. Sekiwaza A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002; 48:353-354.
61. Sekiwaza A, Sugito Y, Iwasaki M, et al. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem* 2001; 47:2164-2165.
62. Sekiwaza A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, et al. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:480-484.
63. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum and plasma. *Clin Chem* 2002; 48:10:1647-1653.
64. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 360:998-1000.
65. Dong HC, Farina A, Bianchi DW, Johnson KL. ROC analysis of an erythroblast morphologic scoring system to improve identification of fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 2004; 24:117-120.
66. Troeger C, Holzgreve W, Hahn S. A comparison of different density gradients and antibodies for enrichment of fetal erythroblasts by MACS. *Prenat Diagn* 1999; 19:6:521-526.
67. Ganshirt D, et al. Successful prenatal diagnosis from maternal blood with MACS. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 731:103-114.
68. Ganshirt-Ahlert D, Burschik M, Garritsen HSP, et al. MACS and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1350-1355.
69. Busch J, Huber P, Pfluger E, Miltenyi S, et al. Enrichment of fetal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR-based genetic analysis. *Prenat Diagn* 1994; 14:12:1129-1140.
70. Bianchi DW, Zickwolf GK, Yih MC, et al. Erythroid specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat Diagn* 1993; 13:4:293-300.
71. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3279-3283.
72. Hamada H, Arimani T, Kudo T, et al. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood, frequency and relationship to gestational age. *Hum Gen* 1993; 91:427-432.

73. 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.
74. 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.
75. Ganshirt D, et al. MACS and the transferrin receptor as a potential means for prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:1350-1355.
76. Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, et al. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:12:1162-1165.
77. Choolani M, et al. Simultaneous fetal cell identification and diagnosis by ε globin chain immunophenotyping and chromosomal fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2001; 98:554-557.
78. Bianchi DW, Zickwolf GK, Yih MC, et al. Erythroid specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat diagn* 1993; 13:4:293-300.
79. Zheng YL, Demaria M, Zhen D, Vadnais TJ, Bianchi DW. Flow sorting of fetal erythroblasts using intracytoplasmic antifetal haemoglobin. Preliminary observations on maternal samples. *Prenat Diagn* 1995; 15:10:897-905.
80. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999; 105:3:574-583.