

---

KÜLÖNLENYOMAT A

# Magyar Nőorvosok Lapja

C. FOLYÓIRATBÓL

---

## Anyai eredetű DNS kimutatása kora- és érett újszülöttek perifériás keringésében

LÁZÁR LEVENTE DR., HARMATH ÁGNES DR., NAGY BÁLINT DR.,  
BÁN ZOLTÁN DR., NAGY GYULA RICHÁRD DR., PAPP ZOLTÁN DR.

*Semmelweis Egyetem Budapest Általános Orvostudományi Kar, I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika (igazgató: Papp Zoltán dr. egyetemi tanár) közleménye*

**Összefoglalás:** Az elmúlt két évtizedben számos kutatás foglalkozott a fetomaternalis és maternofetalis sejt, illetve sejttől független DNS-cserével. A magzati sejtek, illetve magzati DNS jelenléte az anyai vérben számos új lehetőséget nyitott a praenatalis diagnosztika, valamint különböző anyai betegségek pathomechanizmusának vizsgálata területén. Hasonlóképpen a magzati DNS és sejtek anyai vérben történő kimutatásához az anyai sejtek, valamint DNS jelenlétének igazolása a magzat, újszülött keringésében további kérdéseket vet fel. Vizsgálatunk célja az volt, hogy anyai eredetű DNS-t mutassunk ki érett, valamint koraszülöttek véréből. Tíz Rh-pozitív anya és Rh-negatív újszülött pár esetében perifériás vért gyűjtöttünk a megszületést követő 35–120 percben. DNS-izolálást követően a RhD allél hetes exonjának real-time polimeráz láncreakcióval (PCR) történő meghatározását, illetve az újszülöttek vérének ellenanyag-meghatározását végeztük. Az elvégzett real-time PCR során mind a tíz esetben kimutatható volt az RhD allél hetes exonja. Az ellenanyag-meghatározás során az újszülöttek vérében nem volt kimutatható ellenanyag. Eredményeink szerint az anyai eredetű DNS kimutatható az újszülöttek vérében. Ezek a sejtek, illetve a DNS vélhetően szerepet játszanak a veleszületett autoimmun betegségek, valamint Rh-negatív nem szült nők szenzitizációjában.

**Kulcsszavak:** anyai DNS, real-time PCR, grandmother jelenség

### Bevezetés

Az intrauterin életben az anyai és magzati keringést az emberre jellemző haemochorialis típusú méhlepény választja el egymástól. A méhlepény szerkezetéből adódóan anatómiai és élettani ismereteinknek megfelelően az anyai és magzati vér nem keveredik egymással. Az elmúlt évtizedben számos olyan kutató-

si eredmény látott napvilágot, amely az anyai, illetve magzati sejteknek „vándorlásáról” számol be az anyai és magzati keringés között [1, 2]. A magzati sejtek kimutatása az anyai szövetekben több mint egy évszázados múltra tekint vissza [3]. Ennek ellenére a magzati sejtek anyai perifériás vérből történő izolálására és vizsgálatára csak néhány évtizede, a sejttől független magzati eredetű DNS izolálására és

kimutatására a kilencvenes évek második felében került sor [4, 5, 6].

A magzati eredetű sejtek, valamint szabad DNS jelenléte az anyai vérben új lehetőségeket nyitott a noninvazív praenatólis diagnosztika számára. A szabad magzati DNS már a terhesség 5. hetétől kimutatható, és mennyisége a terhesség előrehaladtával folyamatosan növekszik, majd a szülést követően exponenciálisan csökken. Megfelelő markerek felhasználásával a szabad magzati DNS alkalmas a magzat nemének és Rh-státusának meghatározására, és ezáltal a nemhez kötöten öröklődő betegségek, valamint az Rh-összeférhetetlenség által okozott magzati szövődmények praenatólis diagnosztikájára is [7, 8].

Az anyai eredetű sejtek jelenlétét a köldökzsinór vérében néhány kutatócsoport szintén leírta [9, 10, 11]. Az anyai sejtek a második és harmadik trimeszterben jelennek meg a köldökzsinórvérben. E sejtek pontos szerepe nem ismert. A sejtek mennyiségét illetően terminusban a köldökzsinórvérben fellelhető sejtek 6%-a anyai eredetű. A közelmúltban néhány kutatócsoportnak miniszatellita régió amplifikációjával sejttől független szabad anyai DNS-t is sikerült a köldökzsinórvérben fellelnie.

Az általunk végzett vizsgálat célja az anyai eredetű szabad magzati DNS kimutatása volt a megszületést követő 35–120 percen koraszülöttek és érett újszülöttek vérében.

### Anyag és módszer

Rh-pozitív anyák koraszülöttjei, illetve érett újszülöttjei véréből szerológiai módszerrel vércsoportmeghatározás történt a megszületést követő két órán belül. Az Rh-negatívnek bizonyult újszülöttek esetében 400 µl vénás vért gyűjtöttünk EDTA tartalmú csövekbe. A terhességi kor a megszületéskor 23–40. hét között volt.

A levett vénás vért –20°C-on tároltuk a DNS izolálásáig. Az izolálást 200 µl vérből szilárd fázisú adszorptíós oszlop felhasználásával (HighPure DNA Sample Preparation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) végeztük 1–10 órával a vérvételt követően. A DNS eluálása 120 µl elúciós pufferrel történt.

Az anyai eredetű DNS kimutatásához az RhD allél hetes exonjának meghatározását választottuk, sense és antisense primerek (I. táblázat), valamint fluorescein-tetramethyl rodamine-nel (FAM-TAMRA) jelzett próbák (TimorBiol, Berlin, Germany) felhasználásá-

Az anyai DNS kimutatáshoz használt primerek és próba

	Primer/próba	3'-5' szekvencia
RhD exon 7	D7b-sense	CTCCATCATGGGCTACAA
	D7b-antisense	CCGGCTCCGACGGTATC
	D7b-probe	FAM-AGCAGCACAATG TAGATGATCTCTCCA- TAMRA

val. A polimeráz láncreakciót 21 µl végtérfogatú oldattal végeztük, amely tartalmazta az izolált DNS-t (3 µl), 8 µl nukleázmentes vizet, 5,25 µl 25 mmol-os MgCl<sub>2</sub>-ot, mindkét primert, a FAM-TAMRA-val jelölt próbát, valamint 3 µl dNTP valamint Taq polimeráz tartalmú LC reakció mixet. A real-time PCR-t LightCycler eszközzel végeztük (RocheDiagnostics, Mannheim, Germany). 8 percig tartó, 95°C-on történő denaturációt követően 50 PCR ciklusra került sor: 10 s 95°C, 10 s 56°C, 15 s 72°C protokoll szerint. A terméket a PCR ciklusok amplifikációs fázisában a fluorescens szignál 530 és 640 nm-en történő szimultán detektálásával mértük. A DNS mennyiségének számolása során külső standard görbét használtunk. Minden PCR során pozitív és negatív kontrollt vetünk tekintetbe az álpozitív, valamint álnegatív esetek kiküszöbölésére. A pozitív kontrollhoz szükséges DNS-mintát Rh-pozitív nőktől, a negatív kontrollok esetében egyrészt DNS-mentes mixet, valamint Rh negatív nulligravid nőktől nyert DNS-mintát használtunk. A minták DNS-tartalmát globin specifikus primer próbával ellenőriztük.

Minden koraszülött és érett újszülött esetében ellennyag-meghatározás történt immunszerológiai módszerrel.

A vizsgálatok az EÜ Minisztérium Kutatás Etikai Bizottságának engedélyével történtek.

### Eredmények

Az általunk végzett tanulmány során tíz Rh-pozitív anyát és Rh-negatív koraszülöttjét, illetve érett újszülöttjét vizsgáltuk. Mind a tíz Rh-negatív újszülött esetében az RhD allél hetes exonja kimutatható volt a perifériás vérben. Álpozitív, valamint álnegatív esetet nem találtunk. Az anyai DNS számolt koncentrációja 14,66 és 5140 pg/µl közötti értéknek adódott. Az elvégzett immunszerológiai vizsgálat során nem volt kimutatható ellennyag az újszülöttek vérében (II. táblázat).

A vizsgált minták anyai DNS-tartalma, valamint az újszülött ellenanyagszűrésének eredménye

Minta	Terhességi kor (hét)	Vérvétel időpontja a szüléstől számítva (perc)	Új-/koraszülött Rh-statusa	RhD allél	DNS-koncentráció (pg/l)	ellenanyag
1	38	100	Rh-negatív	pozitív	3260	negatív
2	39	90	Rh-negatív	pozitív	5140	negatív
3	35	60	Rh-negatív	pozitív	2064,12	negatív
4	23	35	Rh-negatív	pozitív	14,66	negatív
5	40	35	Rh-negatív	pozitív	4420	negatív
6	33	120	Rh-negatív	pozitív	152	negatív
7	38	100	Rh-negatív	pozitív	1650	negatív
8	33	80	Rh-negatív	pozitív	235	negatív
9	32	100	Rh-negatív	pozitív	62,42	negatív
10	30	40	Rh-negatív	pozitív	82,26	negatív

### Megbeszélés

Az általunk végzett vizsgálat során a nemzetközi szakirodalomban elsőként mutattuk ki koraszülöttek és érett újszülöttek perifériás vérében az anyai eredetű szabad DNS-t.

Számos kutatás tanúbizonysága szerint az anya és a magzat között kétirányú sejt- és DNS-„áramlás” történik [1, 2]. E sejtek, illetve a szabad DNS szerepe jelenleg még nem tisztázott, azonban néhány tanulmány arról számol be, hogy bizonyos autoimmun betegségek, például scleroderma, autoimmun thyreoiditis esetén a magzati eredetű sejtek száma az érintett szervben, szövetben jóval nagyobb, mint a nem érintett egyéneknél [12, 13, 14]. Hasonlóképpen veleszületett systemás lupus erythematosus esetében az anyai eredetű sejtek nagy száma volt megfigyelhető az elhalt újszülöttben. Az anyai eredetű sejtek és DNS jelenléte az újszülöttek vérében érdekes kérdéseket vet fel, és lehetséges magyarázata az Rh-negatív nulligravid nők Rh-szenzitizációjának („grandmother effect”).

Számos kutatási eredmény van arra vonatkozóan, hogy honnan származnak az anyai keringésben jelenlévő magzati sejtek. Jelenleg azt gondoljuk, hogy a keringésben fellelhető sejtek nagy része magzati magvas vörösvérsejt, illetve trophoblastsejt, kis része magzati eredetű lymphocytá. Tekintettel arra, hogy a keringő szabad DNS mennyisége meghaladja a magzati vörösvérsejtek széteséséből származó DNS mennyiséget, való-

színűsíthető, hogy a szabad DNS az anyai tüdőben szétesett trophoblastsejtekből származik [2, 4]. Az anyai sejteket tekintve a köldökzsinórban, valamint a magzati keringésben lényegesen alacsonyabb sejt számmal állunk szemben, a sejtek eredetére vonatkozóan is kevesebb információ áll rendelkezésre, mivel a magzati oldalon nem található a trophoblastsejtekhez hasonló anyai sejtek, ezért ezek a sejtek vélhetően többségükben fehérvérsejtek, illetve anyai őssejtek. A legutóbbi kutatások a magzati eredetű DNS gyors lebomlásáról számolnak be a magzat megszületését követően [15]. Az anyai DNS-re vonatkozóan nem állnak rendelkezésre ilyen adatok.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az újszülöttek keringésében a megszületést követően jelen van az anyai eredetű sejtől független szabad DNS. Az újszülöttek vérében fellelhető DNS nagy valószínűséggel a magzatba kerülő anyai sejtek széteséséből származik. A magzati vérbe kerülő anyai sejtek és a DNS nagy valószínűséggel szerepet játszanak a congenitalis autoimmun betegségek kialakulásában. A koraszülöttek és érett újszülöttek vérében perzisztáló anyai sejtek és a DNS az újszülött immunrendszerének fejlődésével hozzájárulhat az Rh-negatív magzat szenzitizációjához. Emellett említést érdemel a köldökzsinórvérből nyert őssejtekkel történő transzplantáció szövődményeként jelentkező graft versus host reakció, melynek hátterében a köldökzsinórvér anyai őssejtekkel történő contaminációja is állhat.

## Irodalom

- [1] Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS. Two-way traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1996; 11: 4390–4395.
- [2] Lo YMD, Lau TK, Chan LYS, Leung TN, Chang AMZ. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 2000; 46: 1301–1309.
- [3] Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen ueber Pubereklampsie. 1893, Vogel, Leipzig
- [4] Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768–775.
- [5] Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, Iwasaki M, Yukimoto Y, Ichizuka K, Saito H, Okai T. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet* 2003; 113: 307–310.
- [6] Nagy GR, Ban Z, Sipos F, Beke A, Papp C, Papp Z. Isolation of epsilon-haemoglobin-chain positive fetal cells with micromanipulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2005; 25: 398–402.
- [7] Lazar L, Ban Z, Szakacs O, Nagy B, Beke A, Orosz- ne NJ, Rigo J Jr, Papp Z. Szabad magzati DNS kimutatása a magzati Y-kromoszóma igazolásával anyai vérplazmából. *Orv Hetil* 2003; 49: 2405–2409.
- [8] Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bon- sel G, Paget-Christiaens LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol*. 2006; 13: 53–57.
- [9] Desai RG, Cregel WP. Maternofetal passage of leukocytes and platelets in man. *Blood* 1963; 21: 665–669.
- [10] Hall JM, Lingenfelter P, Adams SL, Lasser D, Han- sen JA, Bean MA. Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescent in situ hybridization. *Blood* 1995; 86: 2829–2832.
- [11] Socie G, Gluckman E, Carosella E, Brossard Y, La- fon C, Brison O. Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of two minisatellite sequences. *Blood* 1994; 83: 340–344.
- [12] Artlett CM, Smith B, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 1186–1191.
- [13] Nelson JL. Microchimerism and autoimmune disease. *N Engl J Med* 1998; 351: 559–562.
- [14] Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW. Mic- rochimerism and HLA-compatible relationship of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998; 351: 559–562.
- [15] Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1188–1193.

Lázár L, Harmath A, Nagy B, Bán Z, Nagy GYR, Papp Z: *Detection of maternal deoxyri- bonucleic acid in the peripheral blood of new- born infants*

In the past decade, lots of attention has been focused on the fetomaternal and maternofetal transfer of nucleated cells and plasma DNA. In some autoimmune diseases, the fetal DNA is presumed to have an important role in the etiology of the disease. In the same way, the presence of maternal cells and free plasma DNA in the fetal/newborn's circulation arouses interesting questions. The aim of our study was to detect maternal deoxyribonucleic acid in the peripheral blood of newborn infants. In case of ten RhD-positive mother-RhD-negative -newborn pairs, peripheral blood samples were collected from the new- born infants within 35-120 min after birth. The maternal origin of the DNA was determined by real-time PCR amplification of the exon 7 of the RhD-positive allele. The presence of anti-D IgG and IgM was determined. In all the ten cases, the RhD exon 7 was amplified during the PCR reaction. The result of our study proves that maternal DNA is present in the fetal pe- ripheral circulation. The presence of maternal-derived cells/DNA in the blood of the newborn infants might have a role in the immunization of the newborn infants and could also be a possible explanation for the 'grandmother effect' in case of Rh-negative nulligravida patients.

**Keywords:** maternal DNA, real-time PCR, Grandmother effect

Levelezési cím:

**DR. LÁZÁR LEVENTE**

Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar  
I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika  
1088 Budapest, Baross u. 27.

Telefon: 36 (1) 317-6178

Fax: 36 (1) 317-6174