

Praenatalis genetikai diagnosztika az anyai vérkeringésbe kerülő magzati sejtekből – helyzetkép az eddigi eredményekről

NAGY GYULA RICHÁRD DR., NAGY BÁLINT DR., PAPP ZOLTÁN DR.

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

Összefoglalás: Napjaink praenatalis diagnosztikájában a kutatók érdeklődése olyan eljárások felé irányul, melyek nem igényelnek invazív beavatkozást. Erre adhat lehetőséget terhesség alatt az anyai keringésben megjelenő magzati sejtek genetikai vizsgálata. A diagnosztika nehézségét a kis sejtszám adja, ezért különböző dúsítási módszerekre van szükség. A kinyert magzati sejtek fluoreszcens in situ hibridizációval vagy polimeráz láncreakció segítségével vizsgálhatók. Cikkünkben összefoglalást nyújtunk a napjainkban egyre többet ígérő eljárás alkalmazásának eddigi lehetőségeiről.

Kulcsszavak: magzati sejt, anyai vér, praenatalis diagnosztika

Napjainkban egyre gyakrabban találkozunk olyan nőkkel, akik 35 éves kor felett vállalnak terhességet, s közülük sokan csak egy gyermeket kívánnak szülni. Az előrehaladottabb anyai életkorban emelkedik a magzati kromoszóma-rendellenességek gyakorisága, ez praenatalis genetikai diagnosztika szükségességét veti fel.

Az invazív praenatalis diagnosztikai eljárások (genetikai amniocentesis, a chorionboholy-mintavétel és a chordocentesis) bizonyos fokú kockázatot hordoznak magukban (pl.: a genetikai amniocentesis után a spontán vetélés esélye kb. 1%), az anyák pedig nem szívesen vállalják az e módszerekkel járó szövődményeket. A noninvazív genetikai diagnosztika iránti igény növekedése olyan módszerek kifejlesztésére ösztönzi a kutatókat, amelyek nem igényelnek inva-

zív beavatkozást. Ilyen módszer a kialakult morfológiai eltérések kimutatására a magzati ultrahangvizsgálat vagy újabban az anya keringésében megjelenő magzati sejtek genetikai vizsgálata. [1]

Schmorl [2] német patológus már a XIX. század végén említést tett terhesség alatt az anyai keringésbe kerülő magzati sejtekről, amikor eclampsia miatt meghalt terhes nők tüdejében trophoblastok jelenlétét fedezte fel. 1969-ben *Walknowska és mtsai* [3] peripheriás anyai vér lymphocytá-tenyésztéseinek vizsgálata során „XY” metaphasisokat találtak fiúmagzatot hordozó anya vérében. *De Grouchy és Trubuchet* [4] szintén hasonló megfigyeléseket tett. Később *Herzenberg és mtsai* [5] HLA-A2 lymphocytáknak tartott sejteket próbáltak dúsítani,

melyeket azért tartottak magzati eredetűnek, mert ez az antigén jelen volt az apa családjában, az anyáéban viszont nem. A vércsoport-incompatibilitás vizsgálatát célzó tanulmányok során az is világossá vált, hogy magzati vörösvérsejtek és vérlemezkék is bejutnak az anya keringésébe terhesség alatt.

Magzati sejttípusok

Trophoblastok

A trophoblastok jelentik az egyik lehetséges sejttípust a praenatalis vizsgálatokhoz, hiszen biztosan magzati eredetűek, és további előnyös tulajdonságuk, hogy ellentétben a többi magzati eredetű sejtessel, egyedi morfológiájuk is segít felismerésükben. A blastocysta falát alkotó trophoblastsejtek szaporodásával kitüremkedő trophoblastbimbók felszínén a syncytiotrophoblast, alatta a cytotrophoblast réteg alakul ki. A trophoblastbimbók sejtszlopokká fejlődnek, melyek tengelyébe kerül a pete extraembryonális mesenchymája, valamint ezzel együtt benyomulnak az erek. A sejtszlopok elágazódó oldalakat fejlesztenek, egy bonyolult üregrendszer, végső soron a chorionbolyhokat létrehozva. [6] Az invazív trophoblastok két típusát különböztethetjük meg, az intersticiális trophoblastokat, melyek közvetlen kapcsolatban vannak az anyai decíduával és myometriummal, valamint az endovascularis trophoblastokat, melyek a spirális arteriák lumenében helyezkednek el. [7] Az utóbbi képezi azt az altípust, mely két fázisban kerül nagyobb mennyiségben az anyai keringésbe. Először az első trimeszter közepén, amikor a decidua arteriái, majd második fázisban a 11-12. héten, amikor az uterus spirális arteriái felé meginduló trophoblastok inváziója következtében e sejtek átveszik ezen erek endotheljének és muscularis falának helyét. Ennek eredményeként vékony falú, alacsony ellenállású erek jönnek létre. Az anyai keringésbe kerülő trophoblastsejtek gyorsan eliminálódnak az anyai tüdőben.

Amennyiben a trophoblastokat izolálni akarjuk, hátrányos tulajdonságként jelentkezik a felszíni antigénjei ellenes antitestek relatív hiánya. Több kutatócsoport is próbálta megtalálni azt a specifikus markert, melynek segítségével a trophoblastok izolálhatók. *Covone és mtsai* [8] írták le elsőként, hogy a trophoblastok különbö-

ző terhelességi korokban a H315 sejtfelszíni antigén ellenes monoclonális antitest segítségével szeparálhatóak. Sajnálatos módon a későbbiekben éppen ez a kutatócsoport mutatta ki, hogy a szeparált H315 pozitív sejtek nem magzati trophoblastok, hanem inkább anyai sejtek, melyek felületére a H315 antigén adszorbeálódott [9]. A későbbiekben más csoportok trophoblast-ellenes monoclonális antitestek készítésével próbálkoztak. *Mueller és mtsai* [10] 6 800 lepényszövet elleni antitestből 5 olyat találtak, mely a magzati eredetre specifikus. Miután ezek közül két monoclonális antitest segítségével sejtszeparálást végeztek, polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction-PCR) segítségével Y kromoszóma-specifikus DNS-t kerestek. A magzat nemének meghatározása 7-ből 7 fiú, és 7-ből 6 leánymagzatnál sikeres volt. *Durrant és mtsai* [11] egy „340” néven ismert, mind a syncytiotrophoblastsejtek felszínén megtalálható antigén ellenes monoclonális antitestet írtak le. *Van Wijk és mtsai* [12] a HLA-G segítségével XY kromoszómát mutattak ki anyai keringésbe került trophoblastból.

A trophoblastok alkalmazásánál hátrányos lehet, hogy a placentában előforduló chorion-mosaicismus esetén a trophoblastsejt vizsgálatokor pathológiás eredmény ellenére a magzat egészséges; ez diagnosztikus tévedéshez vezethet.

Magzati fehérvérsejtek

Herzenberg és mtsai [5] 1979-ben írták le fluoreszcens sejtszeparálás (fluorescent activated cell sorting-FACS) segítségével végzett eredményeiket, melynek során sejtfelszíni antigének elleni fluoreszcens antitestek segítségével választották el a magzati és az anyai sejteket egymástól. Kutatásuk során 138 terhést és férjeiket vizsgálták. Azon terhesek vérmintáit használták sejtszeparálásra, akik HLA-A2 negatívak, férjeik pedig HLA-A2 pozitívak voltak (magzati markerként tehát a HLA-A2-t használták). A perifériás anyai vér Ficoll-Hypaque gradiens centrifugálását követően a sejteket HLA-A2 monoclonális antitestekkel festették meg, majd FACS-ot végeztek, a HLA-A2 pozitív sejtekben pedig Y kromoszómát kerestek. A 12 terhességből, ahol fiú született, 5 esetben találtak Y pozitív sejtet. A másik 7 esetben, ahol a sejtek nem reagáltak az anti-HLA-A2 antitestekkel, egyik esetben sem találtak Y pozitív sej-

tet. Eredményeik alapján nagy volt az egyezés a HLA-A2 pozitív perifériás sejten (tehát magzati eredetűnek vélelmezett sejten) észlelt Y kromoszóma, valamint az újszülött fiú neme és HLA-A2 pozitivitása között.

A HLA ellenes antitestekkel történő magzati eredet azonosítása a mindennapi gyakorlatban nehézkes, mert a hatalmas HLA polimorfizmus miatt nehéz alkalmas antitestet választani, főleg abban az esetben, ha az apa nem ismert. A magzati lymphocyták alkalmazását tovább nehezíti az a tény, hogy több kutatócsoport is leírta e sejtek perzisztálását az anyai keringésben több évvel (akár 27 évvel) a terhesség után is, ami egy későbbi terhesség esetén diagnosztikus probléma lehet [13].

A magzati granulocyták kevésbé kerültek a figyelem középpontjába. 13 évvel ezelőtt *Wessman és mtsai* [14] Ficoll-Paque gradiens centrifugálást követően fluoreszcens in situ hibridizációt (FISH) végeztek Y specifikus próbával. Találtak egy kis csoportot az anyai mononuclearis sejtek között (0,26%), melyek Y-pozitívak voltak, morfológiailag pedig granulocytáknak tűntek. A meglepő eredmény feltehetően a próba aspecifikus kötődésével magyarázható, hisz a későbbiekben senkinek nem sikerült igazolnia.

Magzati magvas vörösvérsejtek

A magzati magvas vörösvérsejtek (nucleated red blood cells–NRBC), vagy erythroblastok anyai keringésbe jutását először *Creger és Steele* [15] írta le, akik az erythroblastosis fetalis okát keresve 23 „A” vércsoportú nőt vizsgáltak, akiket két csoportra osztottak aszerint, hogy az újszülött „0” vagy „A” vércsoportú volt. Az anyai vérmintákban megszámozták azokat a sejteket, amelyek nem agglutináltak anti-A antitestek hatására. Azon anyáknál, ahol az újszülött „0”-s vércsoportú volt, szignifikánsan több sejt nem agglutinált, mint az „A”-s vércsoportú újszülöttek édesanyjainál. A sejtek mennyisége jelentősen lecsökkent a gyermekágyas időszak végére.

Voltak kutatócsoportok, akik a Kleihauer-Betke teszt segítségével próbálták meg az anyai keringésbe jutó magzati vörösvérsejtek számát meghatározni. [16]

Bianchi és mtsai [17] voltak az elsők, akik a CD71 (transzferrin receptor) ellenes antitest segítségével végeztek FACS-ot, a CD71 pozitív sejteket lemezre gyűjtötték ki, majd magzati sej-

teket kerestek a morfológiai kép és a Kleihauer-Betke teszt alkalmazásával. A CD71 pozitív sejtek főleg reticulocyták voltak, emellett magzati haemoglobint tartalmazó erythroblastok, lymphocyták, monocyták, anyai haemoglobint tartalmazó erythrocyták.

Napjainkban a legtöbb kutatócsoport a magzati erythroblastokat vizsgálja [18, 19, 20]. A magzati sejtek közül ezek jutnak a legnagyobb mennyiségben az anyai keringésébe, ugyanakkor felnőtten nem jellemző, hogy saját erythroblastok a perifériás vérben keringjenek. *Troeger és mtsai* [21] 11–17 hetes terhesek vizsgálta során arra a következtetésre jutottak, hogy az anyai perifériás vérben lévő erythroblastok mintegy fele magzati eredetű. Ezen sejtek további előnyös tulajdonsága, hogy tartalmazzák a teljes magzati DNS állományt és csak a terhesség ideje alatt persistálnak az anyai keringésben (élettartamuk kb. 90 nap) [22], így nincs meg annak a lehetősége, hogy egy esetleges előző terhességből származó magzati erythroblast diagnosztikus problémát jelentsen.

Magzati sejtek száma az anyai keringésben

Annak ellenére, hogy terhesség alatt az anyai keringésébe kerülő magzati sejtekről már a XIX. század elején említést tettek, a kutatómunka döntő hányada mégis a XX. század második felére tehető. A molekuláris biológiai módszerek, a kifinomult sejtzitológiás technikák elengedhetetlenek voltak a kutatásokhoz. Napjaink fejlett technikája ellenére sem sikerült még a kutatócsoportoknak egy olyan protokollt összeállítaniuk, ami jó költséghatékonysággal és nagy biztonsággal alkalmazható lenne a mindennapos praenatalis diagnosztika során. A magyarázat az anyai keringésbe kerülő magzati sejtek alacsony számában rejlik. Hány magzati sejt jut át az anyai vérbe terhesség alatt?

Krabchi és mtsai [23] 12, fiúmagzattal várandós nő második trimeszterben levett 3-3 ml perifériás vérmintáját vizsgálták. Semmiféle dúsítási eljárást nem alkalmaztak, minden esetben a teljes vérmintát feldolgozták. Az anyai teljes vérben milliliterenként 2-6 magzati sejtet találtak.

Bianchi és mtsai [24] által végzett PCR vizsgálatok szerint átlagosan 1 magzati sejt van az anyai vér 1 ml-ében, azonban emelkedett értéket

figyeltek meg aneuploid magzatok esetén. Ez utóbbi megfigyelés éppen azért értékes, mert így pontosan egy patológiás kórképben van nagyobb esély a sejtek kimutatására és a diagnózis felállítására. Praeclampsia, az arteria uterina Dopplerrel megfigyelhető keringésromlása praecclampsia tüneteinek megjelenése előtt, magzati növekedésbeli visszamaradás, polyhydramnion vagy az invazív genetikai diagnosztika módszerei is kapcsolatba hozhatóak az emelkedett sejtszámmal. *Falcidia és mtsai* [25] hatszoros emelkedést tapasztaltak az anyai keringésben megjelenő magzati erythroblastszámban 2-3 héttel az amniocentesis után, ha a magzat Down-szindrómás volt.

Flow cytometriás vizsgálatok szerint kb. 10^7 anyai sejtre jut 1 magzati sejt [26], ami szintén azt támasztja alá, hogy a magzati sejtek igen kis számban fordulnak elő az anyai keringésben, így szükségessé vált a vizsgálatok előtti feldúsításuk.

Dúsítási módszerek

Kezdő lépésként tartják számon a (gyakran) Percollal történő sűrűség-gradiens szeparálást [27, 28], melynek segítségével sok anyai sejt, köztük vörösvértestek és lymphocyták is eltávolíthatóak. A Percoll polyvinylpyrrolidonnal bevont silicáreszecskeket tartalmaz (átmérőjük 15–30 nm). 1,0–1,3 g/ml közötti tartományban készíthetőek el belőle különböző gradiensek, melyek segítségével a vörösvértestek, az NRBCk és a mononuclearis sejtek szétválaszthatók. Vannak kutatócsoportok, melyek egy, mások két vagy három különböző sűrűségű Percoll-oldatot rétegeznek egymásra, erre kerül a minta, majd centrifugálás után a kinyert magvas vörösvérsejtgazdag réteget használják fel a további vizsgálatokhoz. A magzati sejtek további dúsítására két módszert ajánlanak: a fluoreszcens vagy a mágneses sejtszeparálást (fluorescent activated cell sorting-FACS, magnetic cell sorting-MACS). A FACS esetében fluoreszkáló antitestek segítségével jelölik a sejteket, majd egy drága és nagy szakértelmet igénylő szeparáló berendezés (flow sorter) segítségével választják el őket a jelöletlen sejtektől. A MACS jóval olcsóbb, és könnyen kivitelezhető. Itt mágnesesen jelölt antitesteket adnak a sejtszuspenzióhoz, ezek a megfelelő sejtekhez kötődnek. Ezután egy megfelelő oszlopon átfolyatják, mely-

nek során a jelölt sejtek „fennakadnak”. Az utolsó lépés a jelölt sejtek elválasztása az oszlopról. A sejtszeparálás során egyes antitestek az anyai sejtek depletióját szolgálják, ilyen például a CD45 vagy a CD14 ellenes antitest. Számos monoclonalis antitestet használnak magzati sejtek szelekciójához. Ilyen a CD36, a thrombospondinreceptor, a glycophorin A vagy a haemoglobin F gamma lánc ellenes antitestek. Az egyik leggyakrabban használt a CD71 (transferrin receptor) ellenes antitest. Figyelembe kell azonban venni, hogy ezek az antitestek nem specifikusak, így anyai sejtek is jelölődhetnek velük. Napjainkban a magzati eredet igazolására specifikus markerként az embryonalis haemoglobin epsilon vagy zeta lánc ellenes antitest szolgál. *Al-Mufti és mtsai* [29] szerint chromosoma-abnormalitás nélküli terhességek esetén az anyai keringésben lévő erythroblastok 97%-a expresszálja az epsilon haemoglobinláncot 10 hetes terhességben, azonban ez a szám kevesebb, mint 1% a 25. hétre. A trophoblastspecifikus Hash2 protein vagy a trophoblastok felszínén megjelenő HLA G [7, 18] használata is biztató lehet.

A fetalis sejtek genetikai vizsgálatában a leggyakrabban alkalmazott módszerek a FISH (fluorescence in situ hybridization) és a PCR.

Elemzési módszerek – FISH

A molekuláris genetikában alkalmazott módszerek fejlődése lehetővé tette, hogy a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) módszerének birtokában ritka, nem osztódó sejtekből kiindulva is meghatározható lehessen a nem vagy a kromoszómális számbeli rendellenesség. Több kutatócsoport is sikeres eredményeket írt le, köztük *Simpson és Elias* [30], akik 69 anyai vérmintát dolgoztak fel. A mintákból a magzati erythroblastokat CD71 és glycophorin-A ellenes antitestek segítségével, FACS használatával dúsították, majd FISH vizsgálatot végeztek. Sikeresen diagnosztizáltak Klinefelter-szindrómát (47,XXY), 18-as és 21-es triszómiát. *Ganshirt-Ahlert és mtsai* [31] MACS alkalmazásával írtak le sikeres eredményeket magzati erythroblastokból végzett aneuploidiák kimutatása területén. Mivel több kutatócsoport is biztató kezdeti eredményekről számolt be, ezek alapján indult meg 1994–2003 között az Egyesült Államokban lévő

National Institute of Child Health and Development (NICHD) által elkezdett multicentrikus klinikai tanulmány, az úgynevezett NIFTY Study (National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study). A részt vevő laboratóriumok közül kettő (Basel és Jefferson) MACS módszert, míg a másik két laboratórium (Boston és Houston) különböző FACS protokollokat használt a magzati erythroblastok feldúsítására, majd FISH módszert alkalmaztak az X és Y kromoszóma vagy a 13, 18, 21-es kromoszóma számbeli rendellenességeinek kimutatására. A kapott eredményeket az invazív genetikai diagnosztikus módszerek során nyert adatokkal vetették össze. Az első 5 év után elemezték az addigi eredményeket: 1999 novemberéig 3 658 vérmintát gyűjtöttek be olyan terhesektől, akikben fokozott volt a veszély magzati kromoszóma-rendellenességre, s akiknél emiatt a későbbiekben invazív genetikai diagnosztikus vizsgálatot terveztek. Ennek 10%-a technikai okokból nem került feldolgozásra. A megmaradt 3302 mintával tovább dolgoztak. A kiértékelés során fény derült a vizsgálatok nehézségeire. A minták 17%-ában nem találtak célsejtet a további FISH analízis elvégzéséhez. Ez a probléma különösen a FACS protokollokat alkalmazó laboratóriumoknál volt megfigyelhető (itt az esetek 49%-ban nem találtak target sejtet, míg a MACS-ot használó centrumoknál ez csak 2%-ban fordult elő). A megmaradt 2 744 mintát sikeresen feldolgozták. Az összes eredményt figyelembe véve fiúmagzatok esetén az, hogy legalább egy X és Y kromoszómával rendelkező sejtet találjanak, az esetek 41,4%-ban fordult elő. A vártnál nagyobb, 11,1%-os fals-pozitív arány az egyik laboratóriumban alkalmazott indirekten jelölt FISH próbának volt köszönhető. Az aneuploid esetek 74,4%-os kimutathatósága arra utal, hogy ilyen rendellenességeknél több magzati sejt jut az anyai keringésbe, megkönnyítve a kimutathatóságot. [32] Az eredmények alapján világossá vált, hogy a célsejtek kinyerése és kimutatása MACS esetén kedvezőbb, mint FACS alkalmazásakor. Különválasztva a két módszert, a FACS szenzitivitása kb. 20% volt, míg a MACS protokollokat alkalmazó laboratóriumok 50–60%-os szenzitivitást tudtak elérni; specifikitás területén >90%-ot értek el mind a FACS, mind a MACS sejtűsítési módszert alkalmazó centrumok [33].

A magzati erythroblastoknál alkalmazott FISH nehézségeiről számol be egy napjainkban megjelent tanulmány is. *Babochkina és mtsai* [34] szerint az anyai keringésben lévő erythroblastok mintegy fele magzati eredetű terhesség alatt, viszont ezeknek a nagy része FISH számára nem vizsgálható a különösen tömött sejtmagnak köszönhetően. Megfigyeléseik szerint a sejtmag tömörödését indukálja a magzatihoz képest az anyai vérben található magasabb oxigénkoncentráció.

Elemzési módszerek – PCR

Annak ellenére, hogy nagy erőfeszítések történnek annak érdekében, hogy az ultrahang- és a szérum-markerek vizsgálatának összekapcsolásával a kromoszóma-rendellenességek minél nagyobb pontossággal kiszűrhetőek legyenek, a noninvazív módszerek közül ezek még mindig alkalmatlanok monogénes betegségek diagnosztikájára; erre az anyai keringésből kinyert magzati sejtek vizsgálata adhat lehetőséget. *Takabayashi* [35] az elsők között volt, aki leírta, hogy mikromanipulátorral izolált magzati erythroblastok PCR vizsgálata lehetséges. A legtöbb ilyen tanulmány sajátossága, hogy a leírt módszer magzati sejtek „pool”-jainak vizsgálatokor működik, de egy sejt PCR esetében nem megbízható. Mivel periferiás anyai vérből sok esetben nem lehet nagy mennyiségű magzati sejtet kinyerni, sok tanulmány az anyai vérhez különböző mennyiségben hozzákevert magzati vért, mint mesterségesen előállított mintát vizsgált, vagy olyan helyzetet használt ki mintavételre, mint például közvetlenül a terhesség-megszakítás utáni állapot, amikor sok magzati sejt kerül az anyai keringésbe [33].

A monogénes betegségek mellett a PCR technika lehetővé teszi, hogy az izolált magzati sejtekből nemmeghatározás (*Nagy és mtsai* [36]), vagy aneuploidiák (*Cha és mtsai* [37]) is diagnosztizálhatók lehessenek.

A magzati erythroblastok mikromanipulációja során egyes kutatók a sejtek morfológiai jellemzőit igyekeznek felhasználni beazonosításukra, míg mások a sejtekben található magzati haemoglobin-ellenes antitesteket alkalmazzák [38]. A hagyományos mikromanipuláció mellett új, az egy-egy sejt kigyűjtésében egyszerűbb,

gyorsabb s a kontaminációt jobban kivédő technikák (pl. LCM–laser capture microdissection) irányába is folynak kutatások [39].

A magzati sejtek által okozott microchimaerismus

Terhességet követően az anyai keringésben fellelhető magzati lymphocyták kimutathatósága mint diagnosztikus probléma jelenik meg a következő terhességek során, ugyanakkor a jelenség felfedezése egy igen fontos élettani jelenségre hívhatja fel a figyelmünket. *Bianchi és mtsai* [13] 8 olyan anyát vizsgáltak, akik korábban (6 hónap–27 év) fiúmagzatnak adtak életet. A B lymphocytákon (CD19+, CD23+), T lymphocytákon (CD3+, CD4+, CD5+) és haemopoetikus ős- és progenitor sejteken (CD34+, CD38+) lévő antitestek alapján FACS módszerrel válogattak szét sejteket peripheriás vérből. A PCR vizsgálatok során a 8 közül 6 nőnél találtak férfi DNS-t a kiválogatott CD34+ CD38+ sejtekben, annál a nőnél is, aki 27 évvel megelőzően szült.

A microchimaerismus tehát nem csak szervátültetést vagy vértransfúziót követően, hanem mintegy élettani jelenségként, terhességet követően is létrejön. A perzisztáló magzati sejteknek az anyai szervezetre gyakorolt hatásáról két elképzelés létezik. A sejtek graft-versus-host reakciót eredményezve szerepet játszhatnak a nőkben gyakrabban előforduló autoimmun betegségek kialakulásában. *Nelson* [40] feltételezte, hogy a scleroderma létrejötte is erre vezethető vissza. A magzati sejtek szerepét az autoimmun eredetű pajzsmirigybetegségekben is feltételezték [41]. A perzisztáló magzati sejtek szerepéről ugyanakkor egy másik elképzelés is létezik, miszerint ezek a sejtek jelenthetik alapját egy olyan új őssejt-populációnak, melynek szerepe lehet betegségek esetén, vagy sérülésekkor az anyai szövetek regenerálásában. Bizonyítékok szólnak amellet, hogy magzati eredetű sejtek epithelialis sejtekké, leukocytákká vagy májsejtekké voltak képesek differenciálódni [42].

Összegzés

Az, hogy terhesség alatt az anyai keringésbe magzati sejtek jutnak be, ma már egyértelműen bizonyított. Amennyiben sikerül e sejteket ki-

nyerni és elemezni, segítségükkel noninvasív genetikai diagnosztika valósítható meg. Napjainkban a kutatócsoportok célsejtje a magzati magvas vörösvérsejt, ami nagyobb mennyiségben fordul elő a magzati keringésben, de ritkaság felnőtt peripheriás vérben; rövid életidejű, így egy esetleges előző terhességből visszamaradó sejtek nem befolyásolják a későbbi terhességben a diagnosztikát; a magzati eredetre specifikus markereket (embrionális haemoglobin molekulák) tartalmaz, s nincs benne genetikai mozaicizmus, ami diagnosztikus tévedéshez vezethetne. A magzati sejtek igen kis száma miatt dúsításukra van szükség ahhoz, hogy vizsgálhatóak lehessenek. A legtöbb kutatócsoport mágneses sejtseparálást alkalmaz erre a célra. Az erythroblastok magzati eredetének igazolására ma az embrionális haemoglobinlánc-ellenes antitestek a legelfogadottabbak. A NIFTY tanulmány, vagy a számos ezt megelőző és követő kutatás eredményei is arra utalnak, hogy az egyes csoportok sikeres eredményei ellenére még nincs egy kiforrott technika, egy megfelelő protokoll, mely bármelyik laboratóriumban alkalmazva megbízhatóan és használhatóan működik. Az anyai keringésbe kerülő magzati sejtek szűrő vagy akár diagnosztikus módszerként történő alkalmazásának kecsegtető lehetősége tehát adott, de további technikai fejlődésre, új antitestek keresésére, új sejtseparációs technikák alkalmazására van szükség. A kutatások „hozománya” ugyanakkor, hogy a noninvasív genetikai diagnosztika mellett felmerült az anyai keringésben akár évekig perzisztáló magzati sejtek szerepének kérdése, s annak a nők egészségi állapotára gyakorolt hatása.

Irodalom

- [1] *Papp Z* (szerk.). A szülészet-nőgyógyászat tankönyve. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2002. 245–251.
- [2] *Schmorl G.* Pathologisch-anatomische untersuchungen über puerperal eklampsie. Leipzig. Vogel, Leipzig, 1893: 1–104.
- [3] *Walknowska J, Conte FA, Grumback MM.* Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969; 1: 1119–1122.
- [4] *De Grouchy J, Trubuchet C.* Transfusion foeto-maternelle de lymphocytes sanguins et detection du sexe du foetus. *Ann Genet* 1971; 14: 133–137.
- [5] *Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J, Cann HM, Iverson GM.* Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activa-

- ted cell sorting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1453–1455.
- [6] Papp Z (szerk.). *A szülészet-nőgyógyászat tankönyve*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2002, 215–219.
- [7] Bianchi DW. Prenatal diagnosis through the analysis of fetal cells and cell-free nucleic acids in the maternal circulation. In: Milunsky A.: *Genetic disorders and the fetus*. Fifth edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2004: 1034–1053.
- [8] Covone AE, Johnson PM, Mutton D, Adinolfi M. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet* 1984; 2: 841–843.
- [9] Covone AE, Kozman R, Johnson PM, Latt SA, Adinolfi M. Analysis of peripheral maternal blood samples for the presence of placental-derived cells using Y-specific probes and McAb H315. *Prenat Diagn* 1988; 5: 591–607.
- [10] Mueller UW, Hawes CS, Wright AE, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 1990; 336: 197–200.
- [11] Durrant LG, McDowall KM, Holmes RA, et al. Screening of monoclonal antibodies for isolation of trophoblasts from maternal blood for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 1994; 14: 131.
- [12] Van Wijk IJ, Griffioen S, Tjoa ML, et al. HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 991.
- [13] Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 705.
- [14] Wessman M, Ylinen K, Knuutila S. Fetal granulocytes in maternal venous blood detected by in situ hybridization. *Prenat Diagn* 1992; 12: 993–1000.
- [15] Creger WP, Steele MR. Human fetomaternal passage of erythrocytes. *N Engl J Med* 1957; 256: 158.
- [16] Cohen F, Zuelzer WW. Transplacental passage and postnatal survival of fetal erythrocytes in heterospecific pregnancies. *Blood* 1967; 30: 796.
- [17] 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.
- [18] Bianchi DW. Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J Perinat Med* 1998; 26: 175–185.
- [19] Mavrou A, Kolialexi A, Antsaklis A, Korantzis A, Metaxotou C. Identification of fetal nucleated red blood cells in the maternal circulation during pregnancy using anti-hemoglobin-epsilon antibody. *Fetal Diagn Ther* 2003; 18 (5): 309–313.
- [20] Munde Y, Bigelow NC, Davis BH, Porter JB. Simplified flow cytometric method for fetal hemoglobin containing red blood cells. *Cytometry* 2000; 42: 389–393.
- [21] Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, Minderer S, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod* 1999; 5 (12): 1162–1165.
- [22] Hahn S, Holzgreve W. Prenatal diagnosis using fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: What is currently feasible? *Clin Obst Gynec* 2002; 45 (3): 649–656.
- [23] Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd week of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 2001; 60: 145.
- [24] Bianchi DW, Williams JW, Sullivan LM, et al. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 822.
- [25] Falcidia E, Parano E, Grillo A, Pavone P, Takabayashi H, Trifiletti RR, Scollo P, Dallapiccola B, Grammatico P, Novelli A, Paladini D, Monni G, Gullisano A, Scassellati G. Fetal cells in maternal blood: a six-fold increase in women who have undergone amniocentesis and carry a fetus with Down syndrome: a multicenter study. *Neuropediatrics* 2004; 35(6): 321–324.
- [26] Prince J, Elias S, Wachtel SS, et al. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol*. 1991; 165: 1731–1737.
- [27] Sekizawa A, Farina A, Zhen DK, Wang JY, Falco VM, Elmes S, Bianchi DW. Improvement of fetal cell recovery from maternal blood: suitable density gradient for FACS separation. *Fetal Diagn Ther* 1999; 14 (4): 229–233.
- [28] Smits G, Holzgreve W, Hahn S. An examination of different Percoll density gradients and magnetic activated cell sorting (MACS) for the enrichment of fetal erythroblasts from maternal blood. *Arch Gynecol Obstet* 2000; 263: 160–163.
- [29] Al-Mufti R, Hambley H, Farzaneh F, Nicolaidis KH. Fetal and embryonic hemoglobins in erythroblasts of chromosomally normal and abnormal fetuses at 10–40 weeks of gestation. *Haematologica* 2000; 85: 690–693.
- [30] Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood: advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1993; 270: 2357.
- [31] Gänshirt-Ahlert D, Borjesson-Stoll R, Burschkyk M, et al. Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am J Reprod Immunol* 1993; 30: 194.
- [32] Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat Diagn* 2002; 22: 609–615.
- [33] Hahn S, Holzgreve W. Prenatal diagnosis using fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: What is currently feasible? *Clin Obst Gynec* 2002; 45 (3): 649–656.
- [34] Babochkina T, Mergenthaler S, De Napoli G, Hristoskova S, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S. Numerous erythroblasts in maternal blood are impervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to a dense compact nucleus with apoptotic character. *Haematologica* 2005; 90: 740–745.
- [35] Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, et al. Development of noninvasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn* 1995; 15: 74–77.

- [36] Nagy GyR, Bán Z, Sipos F, Beke A, Papp Cs, Papp Z. Isolation of epsilon-haemoglobin-chain positive fetal cells with micromanipulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2005; 25: 398–402.
- [37] Cha DH, Khosrotehrani K, Bianchi DW, Johnson KL. The utility of an erythroblast scoring system and gender-independent short tandem repeat (STR) analysis for the detection of aneuploid fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 2005; 25(7): 586–591.
- [38] Nagy GyR, Bán Z, Sipos F, Fent J, Oroszné Nagy J, Beke A, Fűrész J, Papp Z. Első lépéseink a magzati sejtek anyai keringésből történő kimutatásában. *Orv Hetil* 2004; 44: 2231–2236.
- [39] Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Laser-mediated micromanipulation systems: an important tool for the analysis of single cells. In: Hahn S, Holzgreve W (eds): *Fetal cells and fetal DNA in maternal blood. New developments for a new millenium. 11th Fetal Cell Workshop, Basel, 2000.* Basel, Karger, 2001; 16–20.
- [40] Nelson JL. *Viewpoint.* Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease auto-allo or all-autoimmune? *Arthritis Rheum* 1996; 39: 191.
- [41] Klintschar M, Schwaiger P, Mannweiler S, et al. Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2494.
- [42] Khosrotehrani K, Johnson KL, Cha DH, Salomon RN, Bianchi DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA* 2004; 292(1):104–105.

Nagy GyR, Nagy B, Papp Z: *Prenatal genetic diagnosis from fetal cells in maternal circulation – review of current results*

Nowadays in prenatal diagnosis researchers focus on noninvasive methods, such as genetic analysis of fetal cells in the maternal circulation. Rate limiting step is the low number of fetal cells found in most maternal samples, so there is a need for enrichment. Isolated fetal cells can be analyzed by fluorescent in situ hybridization or by polymerase chain reaction. In our paper we give an essential review of the results and efficacy of this promising method.

Keywords: fetal cell, maternal blood, prenatal diagnosis

Levélcím:

DR. NAGY GYULA RICHÁRD

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

SZÜLÉSZET-NŐGYÓGYÁSZAT HOMEOPÁTIÁS KÉPZÉS

ÉRDEKLŐDŐ NŐGYÓGYÁSZOK, SZÜLÉSZNŐK (HOMEOPÁTIÁS ELŐKÉPZETTSÉG NÉLKÜL IS) RÉSZÉRE SZÜLÉSZET-NŐGYÓGYÁSZAT TÉMAKÖRÉBEN EGY NAPOS KÉPZÉST SZERVEZ A CEDH HUNGÁRIA HOMEOPÁTIÁS OKTATÓ SZERVEZET. A KÉPZÉS A MINDENNAPI PRAXISBAN JÓL HASZNÁLHATÓ TUDÁSRA FEKTETI A HANGSÚLYT.

Témák	Terhesség és gyermekágy alatt felmerülő problémák, recidiv nőgyógyászati fertőzések homeopátiás megoldási lehetőségei
Tanfolyamvezető	Dr. Zarándi Ildikó
Időpont	2006. február 18., szombat 10–18 óráig
Jelentkezési határidő	2006. február 10.
Tanfolyam díja	8 000 Ft + ÁFA
Helyszín	Hotel Gellért (1111 Budapest, Gellért tér 1.)
Jelentkezés	Telefon: 209-5782, fax: 209-1793, e-mail: info@cedh.hu, web: www.cedh.hu