مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۳۱۳/هفته دوم بهمن ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۷

سلول‌های جنینی در خون مادر: جنبه‌های بالینی و تکنیکی

میثم مصلایی[۱]، دکتر رسول صالحی[۲]

مقاله مروری

چکیده

روش‌های رایج برای به دست آوردن نمونه از جنین برای تشخیص پیش از تولد، برای جنین و مادر خطرناک می‌باشد. این موضوع سبب انجام تلاش‌های زیاد دانشمندان در زمینه‌ی به دست آوردن سلول‌های جنینی به روش‌های غیر تهاجمی شده است که از آن جمله، به دست آوردن آن‌ها از خون محیطی مادران باردار قابل ذکر است. انواع سلول‌هایی که توسط بسیاری از دانشمندان در سر تا سر جهان بر روی آن‌ها در این زمینه مطالعه صورت گرفته است، شامل لوکوسیت‌های جنینی به ویژه لنفوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها، گلبول‌های قرمز هسته‌دار جنینی و سلول‌های تروفوبلاست می‌باشد. بسیاری از مطالعات بر روی گلبول‌های قرمز هسته‌دار جنینی صورت گرفته است که از علل این توجه می‌توان به میزان بالای این سلول‌ها در خون مادر در اوایل بارداری، سرعت تمایز این سلول‌ها و نیمه‌عمر کوتاه آن‌ها در خون مادر و در نهایت، نشانگرهای اختصاصی‌ای که برای جدا سازی این سلول‌ها وجود دارد، اشاره نمود. به هر حال، میزان این سلول‌ها در خون مادر بسیار کم است که نیاز به تکنیک‌های مناسبی برای خالص سازی آن‌ها دارد. در حال حاضر، تکنیک‌هایی که به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل جداسازی سلولی به روش فعال‌سازی فلئورسنتی، جداسازی مغناطیسی و جداسازی بر اساس شیب بار می‌باشد. پس چنانچه سلول‌های جنینی جداسازی شوند، می‌توان از آن‌ها در کاربردهای بالینی همانند غربال‌گری برای ناهنجاری‌های کروموزومی به وسیله‌ی تکنیک هیبریداسیون فلئورسنتی درجا، یا تشخیص ناهنجاری‌های ژنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون استفاده نمود.

واژگان کلیدی: تشخیص پیش از تولد، سلول‌های جنینی، غیر تهاجمی، خون مادر

ارجاع: مصلایی میثم، صالحی رسول. **سلول‌های جنینی در خون مادر: جنبه‌های بالینی و تکنیکی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۳): ۲۱۷۳-۲۱۶۵

مقدمه

تشخیص پیش از تولد به طور کلی به دو دسته‌ی تهاجمی (Invasive) و غیر تهاجمی (Non-invasive) تقسیم می‌شود.

از انواع تکنیک‌های تهاجمی می‌توان به آمنیوسنتز، نمونه‌برداری از پرزهای کوریونی (Chorionic villus sampling) و کوردوسنتز اشاره نمود؛ از معایب این روش‌ها، زمان طولانی برای گرفتن جواب تست تشخیصی، که امکان از دست رفتن زمان مناسب برای سقط درمانی را در پی دارد (۲-۱) و خطر سقط جنین، علاوه بر خطر انجام تکنیک، استرس وارد شده در طی انجام آن نیز برای جنین خطرناک می‌باشد.

در حالی که در روش‌های غیر تهاجمی که شامل دو دسته‌ی کلی بررسی سلول‌های جنینی آزاد در خون مادر باردار و اسیدهای نوکلئیک جنینی آزاد در

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر رسول صالحی
Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

خون مادر می‌باشد، می‌توان ضمن انجام تشخیص در ماه‌های اولیه‌ی بارداری، خطر سقط جنین در اثر آن را هم به صفر کاهش داد (۳).

این مقاله‌ی مروری سعی بر ارایه‌ی اطلاعات در زمینه‌ی تاریخچه و انواع سلول‌های جنینی موجود در خون مادر و نحوه‌ی جداسازی و خالص سازی آن‌ها دارد.

انواع سلول‌های جنینی موجود در خون مادر

- تروفوبلاست‌ها (Trophoblasts): تروفوبلاست‌ها نخستین سلول‌هایی بودند که در خون مادر توسط Schmorl پاتولوژیست آلمانی در سال ۱۸۹۳ تشخیص داده شد (۴). نتایج تحقیقات انجام شده بر روی تروفوبلاست‌ها نشان می‌دهد که:

۱- تروفوبلاست‌ها سلول‌های بزرگی هستند که در مویرگ‌های ریه به دام می‌افتند (۵) و به همین خاطر، اولین بار Schmorl آن‌ها را در مویرگ‌های ریه تشخیص داد (۴). این سلول‌ها در خون محیطی دیده نمی‌شوند ولی در رگ‌های رحم حضور دارند که می‌توان نتیجه گرفت، در اثر عبور از رگ‌های ریه، این تروفوبلاست‌های بزرگ از گردش خون مادر حذف می‌شوند (۶).

۲- تروفوبلاست‌ها در خون تمامی زنان باردار دیده نمی‌شوند (۷).

۳- اغلب دارای وضعیت هتروژن هستند؛ از یک طرف به خاطر چند هسته‌ای بودن و از طرف دیگر، امکان وجود موزائیسم را نیز دارند (۹-۸).

۴- خالص‌سازی تروفوبلاست‌ها به علت کم بودن آنتی‌بادی اختصاصی برای آن‌ها، با مشکل روبه‌رو می‌باشد (۱۱-۱۰).

در نتیجه، این نوع سلول‌ها کمتر مورد توجه دانشمندان برای بررسی و تشخیص پیش از تولد قرار گرفته و تنها در مواردی مثل تعیین وضعیت جنین در بیماری‌های مربوط به هموگلوبین (Hemoglobinopathies) مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۲)؛ برای این منظور، جداسازی تروفوبلاست‌ها به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال موشی (Murine monoclonal antibody) برای شناسایی آنتی‌ژن‌های سطح تروفوبلاست‌ها انجام شده است (۱۳).

- لوکوسیت‌ها (Leukocytes): در سال ۱۹۶۹، Walkonska و همکاران با استفاده از لنفوسیت‌های تحریک شده توسط میتوژن‌ها (Mitogen stimulated lymphocytes) به طور قطعی اثبات کردند که این نوع سلول‌های جنینی در خون مادر حضور دارند (۱۴)؛ در واقع، این موضوع از طریق نشان دادن برخی لنفوسیت‌ها در خون مادر، که دارای کروموزوم y هستند، به اثبات رسید (۱۵-۱۴). لوکوسیت‌ها نخستین سلول‌های جنینی بودند که به طور موفقیت آمیزی با روش جداسازی بر اساس فعال سازی فلئورسنتی (FACS یا Fluorescent activated cell sorting) از سلول‌های مادری جدا و خالص سازی شدند (۱۶).

مشکل بزرگی که در زمینه‌ی خالص سازی این سلول‌ها وجود دارد، جداسازی بر اساس آنتی‌بادی‌های مخصوص آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های لوکوسیتی (HLA) به ارث رسیده پدری می‌باشد، که نیاز است تا ابتدا وضعیت آنتی‌ژن لوکوسیتی انسانی (HLA) پدری را بدانیم (۱۷). مشکل دیگر استفاده از لنفوسیت‌های جنینی،

ماندگاری بالای آن‌ها در خون مادر است. بررسی‌های صورت گرفته نشان داده است که سلول‌های لنفوسیتی T (CD۳+، CD۴+ و CD۵+) ۵ تا ۶ سال و سلول‌های هماتوپویتیکی (CD۳۴+ و CD۳۸+) تا ۲۷ سال در خون مادر ماندگاری دارند (۱۹–۱۸)؛ این حالت باعث می‌شود تا تشخیص پیش از تولد ما را با اشتباه روبه‌رو کند، پس باید به دنبال سلول‌هایی بود که ماندگاری پایین‌تری در خون مادر دارند.

– گلبول‌های قرمز هسته‌دار جنینی (NRBC یا Nucleated red blood cell): تأیید حضور NRBCها نخستین بار توسط Clayton و همکاران در سال ۱۹۶۶ صورت گرفت (۲۰). در ابتدا، مشکل اغلب مطالعات این بود که تأیید منشأ سلول‌های نابالغ اریتروسیتی، با توجه به هسته‌دار بودن این سلول‌ها، تنها بر اساس تشخیص کروموزوم y امکان پذیر بود (۲۱). نخستین خالص سازی این سلول‌ها توسط Bianchi و همکاران در سال ۱۹۹۰ با روش FACS و با استفاده از آنتی‌بادی ضد CD۷۱ (گیرنده‌ی ترانسفرین) که در سطح اریتروبلاست‌ها به میزان زیادی بیان می‌شود، انجام شد (۲۲). این در حالی است که با استفاده از همین آنتی‌ژن می‌توان با روش جداسازی بر اساس فعال سازی مغناطیسی (MACS یا Magnetic cell sorting) نیز این سلول‌ها را جداسازی نمود (۲۳).

نخستین تشخیص آنیوپلوئیدی با استفاده از NRBCها توسط Price و همکاران در سال ۱۹۹۱ (۲۴) و سپس توسط Bianchi و همکاران در سال ۱۹۹۲ صورت گرفت (۲۵). NRBCها از این نظر که جزء نخستین سلول‌هایی هستند که از سلول‌های هماتوپویتیک مشتق می‌شوند، در اوایل بارداری در خون مادر قابل تشخیص هستند و ماندگاری پایینی در خون مادر دارند (۲۶)؛ همچنین، با توجه به این که طبق بررسی‌های انجام شده، در حدود نیمی از اریتروبلاست‌های موجود در خون مادر منشأ جنینی دارند (۲۷)، کاندید مناسبی برای بررسی و استفاده در تشخیص پیش از تولد می‌باشند.

روش‌های رایج برای جداسازی سلول‌های جنینی از سلول‌های مادر

از آن جایی که سلول‌های جنینی در خون مادر بسیار کمیاب می‌باشند، به طوری که مقدار آن طی بررسی‌های انجام شده در حدود ۱ سلول جنینی در برابر 10^5 تا 10^7 سلول مادری برآورد شده است (۳۰–۲۸)، جهت خالص سازی این سلول‌ها به یک روش مناسب نیاز می‌باشد. به عنوان مثال، تعدادی از روش‌هایی که برای خالص سازی NRBCها مورد استفاده قرار می‌گیرد، از این قرار است:

– روش FACS: این روش توانایی جداسازی سلول‌های جنینی از سلول‌های مادری با درجه‌ی خلوص بالا و امکان بررسی چندین پارامتر مختلف روی یک رده‌ی سلولی را دارد. در این روش، علاوه بر استفاده از CD۷۱، که در سطح اریتروسیت‌ها به مقدار زیاد بیان می‌شود، به طور همزمان، امکان بررسی هموگلوبین جنینی (HbF) (۳۲–۳۱) و سایر نشان‌گرهای سطحی نظیر گلیکوفورین A (۳۴–۳۳) نیز وجود دارد. برای خالص سازی بیشتر می‌توان علاوه بر انتخاب مثبت برای سلول‌های NRBC، انتخاب منفی ضد سلول‌های مادری نیز داشت و با استفاده از آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن CD۴۵، سلول‌های لنفوسیتی را از سلول‌های NRBC جدا نمود

(۳۵-۳۳). از مشکلات این روش نیز هزینه‌ی بالا، وقت‌گیر بودن و نیاز به مهارت آزمایشگاهی بالا برای انجام آن قابل ذکر می‌باشد (۳۶، ۲۳).

– روش MACS: این روش نسبت به روش FACS آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر می‌باشد و همانند آن، امکان انتخاب مثبت برای سلول‌های NRBC و انتخاب منفی برای حذف سلول‌های مادری را دارد. اما، در مقایسه با روش FACS، سلول‌هایی با درجه‌ی خلوص پایین‌تری ایجاد می‌کند؛ چرا که تنها می‌تواند یک پارامتر را بر روی سلول‌ها بررسی کند (۳۸-۳۷، ۲۳). در هر دو روش FACS و MACS، در نهایت می‌توان به ازای هر ml ۲۰ خون گرفته شده، تنها ۲۰ سلول جنینی را جدا نمود (۳۵).

طی تحقیقی که طی سال‌های ۱۹۹۷ تا ۲۰۰۲ توسط مؤسسه‌ی بین‌المللی سلامت کودکان و توسعه‌ی مطالعه‌ی جداسازی سلول‌های جنینی (Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study) بر روی حدود ۳۰۰۰ زن باردار مشکوک به داشتن جنین با سندروم‌های آنیوپلوئیدی انجام گرفت، سلول‌های جنینی با روش FACS و MACS از سلول‌های مادری جداسازی شد و بر روی سلول‌های حاصل تست هیبریداسیون فلئورسنتی درجا (Fluorescence in-situ hybridization یا FISH) برای تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی و تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گرفت. در انتها، نتایج با یافته‌های حاصل از نمونه‌گیری با روش CVS (Chorionic villus sampling) یا آمنیوسنتز مقایسه شد که در تعیین جنسیت، ۱۱/۱ درصد و در تشخیص سندرم‌های آنیوپلوئیدی، بین ۰/۶ تا ۴/۱ درصد جواب مثبت کاذب (False positive) وجود داشت.

همچنین، حساسیت جداسازی با روش MACS حدود ۴۵ و با روش FACS حدود ۱۶ درصد بود (۳۹). این نتایج، با این یافته که روش FACS سلول‌هایی با درجه‌ی خلوص بیشتری ایجاد می‌کند، همخوانی ندارد.

– روش جداسازی بر اساس بار الکتریکی (Charge flow separation): روشی برای جداسازی سلول‌های جنینی می‌باشد که نیازی به آنتی‌بادی برای انتخاب سلول‌ها ندارد. این روش، بر پایه‌ی مهاجرت سلول‌ها بر اساس بار الکتریکی سطح آن‌ها در یک میدان الکتریکی است که می‌توان به کمک آن، سلول‌های NRBC را جدا نمود؛ اما مشکل این روش، تشخیص منشأ سلول‌های جداسازی شده است (۴۰-۳۹).

سایر روش‌هایی که برای جداسازی سلول‌های جنینی به کار می‌رود، شامل ستون‌های آویدین بیوتین (Avidin-Biotin columns) (۴۱)، جریان مغناطیسی آهن (Magnetic ferro-fluids) (۴۲) و شیب چگالی (New density gradient) می‌باشد.

آنتی‌بادی‌هایی که برای جداسازی NRBCها مورد استفاده قرار می‌گیرد

تعداد زیادی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای جداسازی NRBCها مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ ولی اغلب دانشمندان از آنتی‌بادی ضد گیرنده‌ی ترانسفرین (CDV۱) استفاده می‌کنند (۴۴، ۲۸، ۲۲). CDV۱ در سطح همه‌ی سلول‌های فعال در انتقال آهن و در حدود ۳ ماهه‌ی اول بارداری، در تمامی سلول‌های NRBC جنینی وجود دارد (۳۹، ۲۵-۲۴)؛ مقدار CDV۱ در NRBCها با افزایش زمان بارداری کاهش می‌یابد ولی در جنین‌های با ناهنجاری‌های

کروموزومی، میزان آن در سطح NRBCها افزایش می‌یابد (۴۶-۴۵). مشکل استفاده از CD۷۱ به عنوان نشان‌گر انتخابی برای جداسازی سلول‌های NRBC از سلول‌های مادری، بیان این آنتی‌ژن در سطح سلول‌های لنفوسیت فعال می‌باشد که سبب کاهش خلوص سلول‌های NRBC می‌گردد (۴۷).

آنتی‌بادی دیگری که برای جداسازی NRBCها مورد استفاده قرار می‌گیرد، ضد GPA (Golycophorin A) می‌باشد. GPA در سطح اریتروسیت‌های در حال بلوغ وجود دارد، در حالی که در سطح لنفوسیت‌ها موجود نیست، و هنگامی که به همراه آنتی‌بادی‌های مخصوص CD۷۱ برای جداسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد، سبب می‌شود تا سلول‌های NRBC با درجه‌ی خلوص بالاتری جداسازی شوند (۲۴)؛ اما چون باعث آگلوتینه کردن سلول‌های NRBC می‌شود، کارایی جداسازی را کاهش می‌دهد (۳۳).

یکی دیگر از مونوکلونال آنتی‌بادی‌هایی که برای جداسازی NRBCها مورد استفاده قرار می‌گیرد، آنتی‌بادی‌هایی هستند که هموگلوبین امبریونیک (HbE) و هموگلوبین جنینی (HbF) را هدف قرار می‌دهند. HbE که از زنجیره‌های ζ و ε تشکیل شده است، اگر چه مختص سلول های جنینی است، اما بیان آن مربوط به دوره‌ی کوتاهی از بارداری می‌باشد و تنها در اوایل ۳ ماهه‌ی اول بارداری قابل بررسی است (۴۶). در مورد Hbf نیز می‌توان از زنجیره‌ی γ به عنوان یک نشان‌گر انتخابی برای سلول‌های NRBC استفاده نمود؛ اما مشکل این است که HbF تنها در سلول‌های جنینی موجود نیست، بلکه در حدود ۱ درصد از سلول‌های قرمز بزرگسالان نیز وجود دارد (۴۸).

از نشان‌گرهای با منشأ طبیعی جدیدی که برای جداسازی NRBCها مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌توان به ۲،۳- بی‌فسفوگلیسرات (BPG) و تیمیدین کیناز (TK) اشاره کرد. از BPG برای تشخیص هموگلوبین جنینی استفاده می‌شود؛ به این صورت که در نتیجه‌ی قرار دادن زنجیره‌ی Heme دارای آهن در معرض اکسیداسیون و واکنش پراکسیداز متعاقب آن، کمپلکس رنگی ایجاد می‌شود که می‌تواند در تشخیص سلول‌های NRBC جنینی مورد استفاده قرار گیرد (۴۹). با استفاده از آنالوگ فلئوروسنت‌دار تیمیدین می‌توان با روش FACS میزان بالای آنزیم تیمیدین کیناز را در NRBCهای جنینی هدف قرار داد؛ در سلول‌های بزرگسالان این آنزیم فعالیت ندارد و در جداسازی NRBCها از آن‌ها می‌توان از آن استفاده نمود (۵۰).

لیست سایر آنتی‌بادی‌هایی که برای جداسازی سلول‌های جنینی کاربرد دارند، در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. نشان‌گرهای سلولی استفاده شده برای غنی‌سازی گلبول‌های قرمز هسته‌دار جنینی و حذف سلول‌های مادری

موارد استفاده	بیان در	نشان‌گرهای سلولی
غنی‌سازی	سلول‌های اریتروئیدی	گیرنده‌ی ترانسفرین (۲۴)
غنی‌سازی	سلول‌های اریتروئیدی	هموگلوبین امبریونیک/جنینی (۳۸، ۳۴)
غنی‌سازی	سلول‌های اریتروئیدی	آنتی‌ژن‌های گروه خونی (۵۵-۵۴)
غنی‌سازی	سلول‌های اریتروئیدی	گیرنده‌ی اریتروپویتین (۵۷-۵۶)
غنی‌سازی	پلاکت‌ها/اریتروئیدها/مونوسیت‌ها	CD۳۶ (۳۱، ۵۵)
غنی‌سازی	سلول‌های اریتروئیدی	آنتی‌ژن‌های سطحی کبد جنین (۵۴، ۳۸)
تهی‌سازی	لوکوسیت‌ها	CD۴۵ (۵۸)
تهی‌سازی	گرانولوسیت‌ها	CD۱۴ (۳۸، ۵۹)

تأیید و بررسی سلول‌های خالص سازی شده

تأیید سلول‌های خالص سازی شده را می‌توان از طریق بررسی خودکار (Automated scanning) انجام داد؛ این روش، ترکیبی از FISH و رنگ آمیزی Immunocytochemical است (۵۱). ابتدا، سلول‌ها بر اساس وجود HbF در NRBCهای جنینی و سپس، توسط رنگ آمیزی Immunocytochemical بررسی می‌شوند و در نهایت، بررسی‌های کروموزومی با FISH که با استفاده از پروب‌های مخصوص کروموزومی می‌باشد، صورت می‌گیرد (۲۵-۲۴). سلول‌های خالص سازی شده را می‌توان برای بررسی‌های مولکولی، که بر پایه‌ی تکنیک‌های وابسته به واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون (PCR یا Polymerase chain reaction) انجام می‌شود، مورد بررسی قرار داد. با ظهور تکنیک PCR، اولین بار از آن برای تشخیص قطعی منشأ سلول‌های به دست آمده استفاده شد (۲۱). در مطالعات بعدی، از این تکنیک برای تکثیر توالی‌های کروموزوم y به منظور تعیین جنسیت (۵۲) و همچنین، در تعیین وضعیت گروه خونی رزوس (RhD) جنین استفاده شد (۵۳).

چشم اندازهای رو به آینده

اصول پایه‌ای استفاده از سلول‌های جنینی موجود در خون مادر، خالص سازی و تشخیص قطعی جنینی بودن این سلول‌ها می‌باشد. با خالص سازی این سلول‌ها و وجود تکنیک‌های تشخیصی همانند FISH و تکنیک‌های مولکولی بر پایه‌ی PCR، در آینده‌ی نزدیک می‌توان از این سلول‌ها برای تشخیص پیش از تولد استفاده نمود؛ البته، این امر، مستلزم رسیدن به تکنیک‌های مناسب و کارآمدتری برای خالص سازی این سلول‌ها می‌باشد.

References

1. Dey M, Sharma S, Aggarwal S. Prenatal screening methods for aneuploidies. N Am J Med Sci 2013; 5(3): 182-90.
2. Kuliev AM, Modell B, Jackson L, Simpson JL, Brambati B, Rhoads G, et al. Risk evaluation of CVS. Prenat Diagn 1993; 13(3): 197-209.
3. Purwosunu Y, Sekizawa A, Koide K, Okazaki S, Farina A, Okai T. Clinical potential for noninvasive prenatal diagnosis through detection of fetal cells in maternal blood. Taiwan J Obstet Gynecol 2006; 45(1): 10-20.
4. Lapaire O, Holzgreve W, Oosterwijk JC, Brinkhaus R, Bianchi DW. Georg Schmorl on trophoblasts in the maternal circulation. Placenta 2007; 28(1): 1-5.
5. Attwood HD, Park WW. Embolism to the lungs by trophoblast. J Obstet Gynaecol Br Commonw 1961; 68: 611-7.
6. Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insights into pre-eclampsia. Hum Reprod Update 2002; 8(6): 501-8.
7. Sargent IL, Johansen M, Chua S, Redman CW. Clinical experience: isolating trophoblasts from maternal blood. Ann N Y Acad Sci 1994; 731: 154-61.
8. Henderson KG, Shaw TE, Barrett IJ, Telenius AH, Wilson RD, Kalousek DK. Distribution of mosaicism in human placentae. Hum Genet 1996; 97(5): 650-4.
9. Goldberg JD, Wohlferd MM. Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. Am J Obstet Gynecol 1997; 176(6): 1349-52.
10. Covone AE, Mutton D, Johnson PM, Adinolfi M. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. Lancet 1984; 2(8407): 841-3.
11. Bertero MT, Camaschella C, Serra A, Bergui L, Caligaris-Cappio F. Circulating 'trophoblast' cells in pregnancy have maternal genetic markers. Prenat Diagn 1988; 8(8): 585-90.
12. Hawes CS, Suskin HA, Kalionis B, Mueller UW, Casey G, Hall J, et al. Detection of paternally inherited mutations for beta-thalassemia in trophoblast isolated from peripheral maternal blood. Ann N Y Acad Sci

1994; 731: 181-5.
13. Mueller UW, Hawes CS, Wright AE, Petropoulos A, DeBoni E, Firgaira FA, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. Lancet 1990; 336(8709): 197-200.
14. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. Lancet 1969; 1(7606): 1119-22.
15. Schindler AM, Martin-du-Pan R. Prenatal diagnosis of fetal lymphocytes in the maternal blood. Obstet Gynecol 1972; 40(3): 340-6.
16. Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J, Cann HM, Iverson GM. Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76(3): 1453-5.
17. Tharapel AT, Jaswaney VL, Dockter ME, Wachtel SS, Chandler RW, Simpson JL, et al. Inability to detect fetal metaphases in flow-sorted lymphocyte cultures based on maternal-fetal HLA differences. Fetal Diagn Ther 1993; 8(2): 95-101.
18. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93(2): 705-8.
19. Ciaranfi A, Curchod A, Odartchenko N. Post-partum survival of fetal lymphocytes in the maternal blood. Schweiz Med Wochenschr 1977; 107(5): 134-8. [In French].
20. Clayton EM, Feldhaus WD, Whitacre FE. Fetal erythrocytes in the maternal circulation of pregnant women. Obstet Gynecol 1964; 23: 915-9.
21. Holzgreve W, Garritsen HS, Ganshirt-Ahlert D. Fetal cells in the maternal circulation. J Reprod Med 1992; 37(5): 410-8.
22. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87(9): 3279-83.
23. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry 1990; 11(2): 231-8.
24. Price JO, Elias S, Wachtel SS, Klinger K, Dockter M, Tharapel A, et al. Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. Am J Obstet Gynecol 1991; 165(6 Pt 1): 1731-7.
25. Bianchi DW, Mahr A, Zickwolf GK, Houseal TW, Flint AF, Klinger KW. Detection of fetal cells with 47,XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood. Hum Genet 1992; 90(4): 368-70.
26. Ganshirt D, Garritsen H, Miny P, Holzgreve W. Fetal cells in maternal circulation throughout gestation. Lancet 1994; 343(8904): 1038-9.
27. Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R, Minderer S, Tercanli S, Holzgreve W, et al. Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. Mol Hum Reprod 1999; 5(12): 1162-5.
28. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Nakauchi H, Hamaguchi H, Kubo T. The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis. Prenat Diagn 1997; 17(8): 743-52.
29. Ganshirt-Ahlert D, Pohlschmidt M, Gal A, Miny P, Horst J, Holzgreve W. Ratio of fetal to maternal DNA is less than 1 in 5000 at different gestational ages in maternal blood. Clin Genet 1990; 38(1): 38-43.
30. Hamada H, Arinami T, Kubo T, Hamaguchi H, Iwasaki H. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. Hum Genet 1993; 91(5): 427-32.
31. Bianchi DW, Zickwolf GK, Yih MC, Flint AF, Geifman OH, Erikson MS, et al. Erythroid-specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. Prenat Diagn 1993; 13(4): 293-300.
32. Zheng YL, Demaria M, Zhen D, Vadnais TJ, Bianchi DW. Flow sorting of fetal erythroblasts using intracytoplasmic anti-fetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples. Prenat Diagn 1995; 15(10): 897-905.
33. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells in the maternal circulation. Hum Reprod Update 1995; 1(4): 409-18.
34. Lewis DE, Schober W, Murrell S, Nguyen D, Scott J, Boinoff J, et al. Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry. Cytometry 1996; 23(3): 218-27.
35. Bianchi DW, Klinger KW, Vadnais TJ, DeMaria MA, Shuber AP, Skoletsky J, et al. Development of a model system to compare cell separation methods for the isolation of fetal cells from maternal blood. Prenat Diagn 1996; 16(4): 289-98.
36. Ganshirt-Ahlert D, Borjesson-Stoll R, Burschyk M, Dohr A, Garritsen HS, Helmer E, 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(2-3): 194-201.
37. Andrews K, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Rubinsztein DC. Enrichment of fetal nucleated cells from maternal blood: model test system using cord blood. Prenat Diagn 1995; 15(10): 913-9.

38. Zheng YL, Carter NP, Price CM, Colman SM, Milton PJ, Hackett GA, et al. Prenatal diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. J Med Genet 1993; 30(12): 1051-6.
39. Wachtel SS, Sammons D, Manley M, Wachtel G, Twitty G, Utermohlen J, et al. Fetal cells in maternal blood: recovery by charge flow separation. Hum Genet 1996; 98(2): 162-6.
40. Shulman LP, Phillips OP, Tolley E, Sammons D, Wachtel SS. Frequency of nucleated red blood cells in maternal blood during the different gestational ages. Hum Genet 1998; 103(6): 723-6.
41. Hall JM, Adams S, Williams S, Rehse MA, Layton TJ, Molesh DA. Purification of fetal cells from maternal blood using an avidin-biotin immunoaffinity column. Ann N Y Acad Sci 1994; 731: 115-27.
42. Steele CD, Wapner RJ, Smith JB, Haynes MK, Jackson LG. Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal peripheral blood: a review. Clin Obstet Gynecol 1996; 39(4): 801-13.
43. Sitar G, Manenti L, Farina A, Lanati V, Mascheretti P, Forabosco A, et al. Characterization of the biophysical properties of human erythroblasts as a preliminary step to the isolation of fetal erythroblasts from maternal peripheral blood for non-invasive prenatal genetic investigation. Haematologica 1997; 82(1): 5-10.
44. Ganshirt-Ahlert D, Burschyk M, Garritsen HS, Helmer L, Miny P, Horst J, et al. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. Am J Obstet Gynecol 1992; 166(5): 1350-5.
45. Thilaganathan B, Meher-Homji NJ, Nicolaides KH. Blood transferrin receptor expression in chromosomally abnormal fetuses. Prenat Diagn 1995; 15(3): 282-4.
46. Zheng YL, Zhen DK, Farina A, Berry SM, Wapner RJ, Williams JM, et al. Fetal cell identifiers: results of microscope slide-based immunocytochemical studies as a function of gestational age and abnormality. Am J Obstet Gynecol 1999; 180(5): 1234-9.
47. Bianchi DW, Yih MC, Zickwolf GK, Flint AF. Transferrin receptor (CD71) expression on circulating mononuclear cells during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1994; 170(1 Pt 1): 202-6.
48. Turpeinen U, Stenman UH. Determination of fetal hemoglobin by time-resolved immunofluorometric assay. Clin Chem 1992; 38(10): 2013-8.
49. Von KH, Gahmberg N. Fetal erythroblasts from maternal blood identified with 2,3-bisphosphoglycerate (BPG) and in situ hybridization (ISH) using Y-specific probes. Prenat Diagn 1995; 15(2): 149-54.
50. Hengstschlager M, Bernaschek G. Fetal cells in the peripheral blood of pregnant women express thymidine kinase: a new marker for detection. FEBS Lett 1997; 404(2-3): 299-302.
51. Oosterwijk JC, Knepfle CF, Mesker WE, Vrolijk H, Sloos WC, Pattenier H, et al. Strategies for rare-event detection: an approach for automated fetal cell detection in maternal blood. Am J Hum Genet 1998; 63(6): 1783-92.
52. Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet 1989; 2(8676): 1363-5.
53. Lo YM, Patel P, Baigent CN, Gillmer MD, Chamberlain P, Travi M, et al. Prenatal sex determination from maternal peripheral blood using the polymerase chain reaction. Hum Genet 1993; 90(5): 483-8.
54. Savion S, Carp H, Shepshelovich J, Irlin J, Kostykov M, Fein A, et al. Use of antibodies against the human antigen of erythroblasts for the detection of nucleated erythrocytes in the maternal circulation. Biol Neonate 1997; 71(2): 126-30.
55. 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): 521-6.
56. Valerio D, Altieri V, Antonucci FR, Aiello R. Characterization of fetal haematopoietic progenitors circulating in maternal blood of seven aneuploid pregnancies. Prenat Diagn 1997; 17(12): 1159-69.
57. Valerio D, Aiello R, Altieri V, Malato AP, Fortunato A, Canazio A. Culture of fetal erythroid progenitor cells from maternal blood for non-invasive prenatal genetic diagnosis. Prenat Diagn 1996; 16(12): 1073-82.
58. Busch J, Huber P, Pfluger E, Miltenyi S, Holtz J, Radbruch A. 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): 1129-40.
59. Ferguson-Smith MA, Zheng YL, Carter NP. Simultaneous immunophenotyping and FISH on fetal cells from maternal blood. Ann N Y Acad Sci 1994; 731: 73-9.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 04.09.2014
Vol. 32, No. 312, 2nd Week, February 2015
Accepted: 07.01.2015

Fetal Cells in Maternal Blood: Technical and Clinical Aspects

Meysam Mosallayi MSc[1], Rasoul Salehi PhD[2]

Review Article

Abstract

Currently, common used methods to obtain fetal material for prenatal diagnosis are potentially dangerous for fetus and mother; this has led to the effort by many groups to develop methods to recover fetal cells by non-invasive means, such as their enrichment from the peripheral blood of pregnant women. The fetal cell types studied by numerous investigators worldwide include fetal leukocytes, i.e. fetal lymphocytes and granulocytes, fetal nucleated red blood cells (NRBCs) and trophoblast cells. Fetal NRBCs have been the most commonly studied cell type, for this reason: the frequency of NRBCs in the fetus early in gestation is relatively high; these cells are also fairly well differentiated and likely to have a limited life span in the maternal circulation and finally, there are specific markers for the enrichment of these cells. However, the fetal cells in maternal blood are rare and a sophisticate technique is required for their enrichment; currently, the most commonly employed techniques are fluorescent activated cell sorting (FACS), magnetic cell sorting (MACS), and charge flow separation. Then, if the fetal cells can eventually be isolated, possible clinical applications will be included screening for fetal chromosome abnormalities via fluorescence in-situ hybridization (FISH) and for gene abnormalities by polymerase chain reaction (PCR).

Keywords: Fetal cells, Non-invasive, Maternal blood

Citation: Mosallayi M, Salehi R. **Fetal Cells in Maternal Blood: Technical and Clinical Aspects.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(313): 2165-73

1- MSc Student, Pediatric Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine AND Students Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Rasoul Salehi PhD, Email: r_salehi@med.mui.ac.ir