

Anne Kanında Fetüse Ait Hücreler; Girişimsel Olmayan Doğum Öncesi Tanıda Kullanımı?

FETAL CELLS IN MATERNAL BLOOD; FEASIBILITY IN NON-INVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS?: REVIEW

Dr. Azize Yasemin GÖKSU^a

^aHistoloji ve Embriyoloji AD, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, ISPARTA

Özet

Gebelik esnasında, hematopoetik hücrelerin plasenta yoluyla iki taraflı geçişinin olduğu, yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Fetüse ait hücreler, annenin periferik kanında dolaşmaktadır ve girişimsel olmayan doğum öncesi tanı için kullanılmaya uygundur. Dolaşımdaki fetüs kaynaklı bu hücreler; trofoblastları, beyaz kan hücrelerini, çekirdekli kırmızı kan hücrelerini ve hematopoetik kök hücreleri içermektedir. Bu hücreler, anneye ait hücrelerden farklı özellik ve antijeniteye sahip olup; elde edilip incelenmeye müsaittirler. Anne kanından elde edilen fetüse ait hücrelerin analiz edilebilirliği sayesinde, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile karakterize ve gelişmekte olan fetüse direkt hiçbir riski olmayan doğum öncesi takip ve tanı protokollü sağlanabilir. Ancak, fetüse ait hücrelerin anne kanındaki sayılarının azlığı (5000-10⁸ anne hücresi başına 1 fetüse ait hücre), teknik bir engel oluşturmaktadır ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH) gibi duyarlı analiz tekniklerine ihtiyaç vardır. Yıllardır yapılan araştırmalar, henüz güvenilir ve sabit protokollerin gelişmesine olanak sağlayamamış olsa da, fetüse ait hücre elde edilmesi, girişimsel olmayan doğum öncesi tanıya önemli bir katkı vaat etmektedir. Bu derlemede, fetüse ait hücre tipleri, bu hücrelerin elde edilmesindeki genel stratejiler, halen var olan teknik sorunlar ve gelecek için tasarlanan klinik uygulamalar yer almaktadır. Ayrıca, fetüse ait hücre mikrokimerizmine olan artmış ilgiye ve doğum sonrası otoimmün hastalıkların gelişimiyle ilişkisine de değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kan, fetüse ait hücre, gebelik, girişimsel olmayan doğum öncesi tanı,

Abstract

During pregnancy, bi-directional trafficking of hematopoietic cells through the placenta has been demonstrated. Fetal cells circulate in maternal peripheral blood and may be appropriate targets for non-invasive prenatal diagnosis. Circulating cells of fetal origin include trophoblasts, white blood cells, nucleated red blood cells, and hematopoietic stem cells. These cells demonstrate different characteristics and antigenicity when compared to maternal cells and are thus amenable to recovery and analysis. The possibility of analyzing fetal cells recovered from maternal blood could provide high sensitivity and specificity pre-natal screening and diagnostic protocols with no direct risk to the developing fetus. However, the small number of fetal cells in maternal blood (1 fetal cell for 5000 to 10⁸ maternal cells) presents a technical challenge. Sensitive analytical techniques such as polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence in situ hybridization (FISH) are essential. Years of investigation have as yet to lead to the development of reliable and consistent protocols. Nonetheless, fetal cell recovery promises to be an attractive addition to non-invasive prenatal diagnosis. This review describes fetal cell types, general strategies of fetal cell isolation, current technical challenges, as well as clinical applications that have been envisioned for the future. The increased appreciation of fetal cell micro-chimerism and its association with the postpartum development of autoimmune diseases is also discussed.

Key Words: Blood, fetal research, prenatal diagnosis, pregnancy

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005, 25:238-252

Son yıllarda doğum öncesi genetik tanı çok ilerleme kaydetmiştir. 1950'lerde genetik danışmanlık elde var olan tek imkandı. Çiftler, tanınmış birkaç 'Mendelian' geçişli hastalığın tekrarlama riski açısından bilgilendiriliyor, fakat bu çiftlere hiçbir tanı ya da

işlem yapılamıyordu.¹ 1968'de 'amniyosentez' yoluyla anne karnında iken tanı koymanın mümkün hale gelmesiyle, aniden büyük bir değişim oldu. 1982-1984 yılları arasında koryonik villüs örnekleme ile gebeliğin ilk 3 ayında doğum öncesi tanının yapılabildiği gösterildi. Daha sonraki yıllarda, bu yöntemin amniyosentez kadar güvenli ve etkin olduğu anlaşıldı.²

Bu önemli ilerlemelere rağmen, doğum öncesi genetik tanı eksiklikler devam etmektedir. Hem 'koryonik villüs örnekleme' hem de 'amniyosentez', girişimsel yöntemlerdir ve

Geliş Tarihi/Received: 19.04.2004 Kabul Tarihi/Accepted: 21.12.2004

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Azize Yasemin GÖKSU
İstiklal Mah. Fatih Sok. No: 21/5
32300, ISPARTA
yasemin_goksu@yahoo.com

Copyright © 2005 by Türkiye Klinikleri

gebeliğin sonlanması açısından düşük fakat ölçülebilir bir risk taşırlar.¹ Ayrıca, koryonik villüs örneklemesinin ardından ciddi kol ve bacak anomalileri bildirilmiştir.³ Muhtemel komplikasyonları sebebiyle, bu testler bütün toplum geneline sunulamayıp, sadece genetik bozukluklar için yüksek risk taşıyan gebe kadınlara uygulanabilir. Daha önceden 'Mendelian' geçişli bir hastalığa sahip çocuk doğurma hikayesi olan gebe kadın ya da 35 yaş üstünü kapsayan ileri gebelik yaşı buna örnek verilebilir.¹

Bu metotlara eşlik eden risklerden dolayı, girişimsel olmayan yöntemlere büyük gereksinim vardır. Günümüzde, klinik genetik uzmanlarının kullanabileceği metotlar ultrason ve anne serum analizi (Üçlü test: Alfa-fetoprotein, Human koryonik gonadotropin, birleşik olmayan östriol düzeyi ölçümü) ile sınırlıdır.⁴ Ancak, bu girişimsel olmayan testler, girişimsel testlerin duyarlılığından yoksundur. Bazı çalışmalar, yapısal anomalilerin nispeten büyük bir oranının ultrason ile saptanabildiğini düşündürse de, Amerika'da düşük riskli kadınlar üzerinde yapılan geniş çaplı bir deney bunu doğrulamamıştır.⁵ Aynı şekilde, anne serum analizi de doğum öncesi tanı koymada optimalin altındadır. Otuz beş yaşın üstündeki kadınların serum analizi ile 'Down Sendromu' olgularının yaklaşık %90'ı tespit edilebilirken; 35 yaş altındaki kadınlarda bu oran %60'a düşmektedir.⁶

Ne ultrasonun ne de anne serum analizinin girişimsel testlerin duyarlılığına yaklaşamaması nedeniyle, doğum öncesi genetik tanı için hem risk taşımayan, hem de duyarlılığı yüksek olan yeni bir metoda gereksinim duyulmuştur. Böylece, anne kanından yeterli miktarda fetüse ait hücre elde edilerek genetik tanı için incelenmesi fikrine odaklanılmıştır. Bu yöntemde şimdiki girişimsel yöntemlere eşlik eden risklerin olmaması ve böylece bütün gebeleri takip etme imkanının doğabilmesi de bu olguya yönelmede uyarıcı bir etken olmuştur.¹

Tarihçe

Trofoblastların ilk histolojik kanıtı, 1893'te Alman patolog Schmorl tarafından yapıldı.

Schmorl, eklampsi nedeniyle ölen gebe kadınların kan dolaşımında trofoblastları saptadı.⁷ Douglas ve ark., eklampsi hastalarının toplardamar kanında trofoblastların varlığını rapor ettiler.⁸ Clayton ve ark., anneden aldıkları kan örneklerinde HbF içeren hücreler saptadılar.⁹

Bu veriler, anne kanında fetüse ait hücre bulunma olasılığını arttırdı. Bu delillere dayanarak sitogenetik uzmanları, anne kanında fetüse ait hücreleri alışılmış tekniklerle araştırmaya başladılar. Walknowska ve ark., erkek fetüs taşıyan gebe kadınların kanında 46,XY metafazlarını ilk kez rapor edenlerdir.¹⁰ De Grouchy ve Trebuchet'in anne kanında 46,XY metafazlarını; Schroder ve Grossett'in ise Y kromatin pozitif hücreleri saptamalarıyla, önceki bulgular destek buldu.¹¹⁻¹³ Tüm bu çalışmalarda görülen bir problem, 46,XY metafazlarının ve Y kromatinin dişi fetüs taşıyan gebelerde de gözlenmesiydi. Başka tutarsızlıklar da bildirildi. Örneğin, Zilliacus ve ark., erkek fetüs taşıyan 8 gebe kadının 7'sinin kanında ve dişi fetüs taşıyan 7 gebe kadından birinin kanında Y kromatini rapor ettiler.¹⁴ Ancak hiçbir örnekte 46,XY metafazı bulunamadı ve hiçbirinde anne kanındaki hücreler fetüse ait hemoglobin göstermediler. 1970'lerin ortalarından sonlarına doğru, anne kanında fetüse ait hücrelerin var olup olmadığına yönelik yoğun ilgiye rağmen hiçbir görüş birliği elde edilememiş oldu. Geleneksel sitogenetik metotların bu inceleme için pratik bir yöntem olmadığı kanısına varıldı.¹

1970'lerin sonlarına doğru oluşan bu hayal kırıklığı, araştırmacıları farklı yaklaşım arayışına yöneltti. A. Martin, Simpson ve Alias, otomatik sitogenetik teknolojileri kullanmaya yöneldiler ve örnek hazırlama ünitelerine ek olarak metafaz analiz birimleri geliştirdiler.¹⁵ Bunda temel nedenleri şu bilgiye dayanıyordu: "Eğer anne kanında fetüse ait hücreler varsa, analiz için çok fazla sayıda metafaza ihtiyaç vardır. Bu sayı, geleneksel sitogenetik teknikler için gerekli olan elle yapılacak çalışmanın çok üstündedir".

Diğer yandan, çeşitli zenginleştirme teknolojileri üzerine odaklanıldı. Bunun mantığı, fetüse ait hücreleri anne hücrelerinden ayırmak için 'flow-sorting' yani akımla ayırıştırma yönteminin

kullanılması esasına dayanıyordu. Annede mevcut olmayan, babaya ait DNA zinciri içeren hücrelerin fetüs kaynaklı olduğu varsayıyordu, çünkü bu DNA zinciri ancak babadan kalıtsal yolla edinilmiş olabilirdi. Herzenberg ve ark., Iverson ve ark., dolaşımdaki fetüse ait hücrelerin sayısını arttırmak amacıyla, kanın zenginleştirilmesi için flow sitometrinin kullanımını ilk kez rapor edenlerdir.^{16,17} Tharapel ve ark. da anne ve fetüsün "Human Leucocyte Antigens (HLA)" farkına dayanarak 'flow sitometri' cihazı ile lenfositleri ayırıştırıp fetüse ait metafazları analiz ettiler.¹⁸

Bir diğer yaklaşım olarak bağışıklık bilimi ile bağlantılı çalışmalar denendi. Covone ve ark., trofoblast-özgül antikorları teşhis etmeye çalıştılar.^{19,20} Trofoblastlara özgü antikorları tanımladıkları söylenebilse de, bunların özgüllüğünün düşük olduğu saptandı. 1980'li yıllarda, bağışıklık bilimi ile yaklaşım hayal kırıklığıyla neticelendi.¹

1980'lerin sonlarında mevcut moleküler teknolojilerin devreye girmesiyle, daha iyimser bir yaklaşım ve ilerleme sağlandı. Lo ve ark., erkek fetüs taşıyan gebe kadınların kanındaki Y kromozomu dizilerinin varlığını tespit etmek için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanan ilk gruptur.^{21,22} Y zincirlerinin hacmini arttırmak için PZR kullanarak, ayıklanmamış çekirdekli hücrelerin içinde fetüse ait hücrelerin var olduğunu gösterdiler. Price ve ark., kromozoma-özgül DNA problemleriyle Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH) uygulayarak, akımla ayırıştırılmış fetüse ait çekirdekli eritrositlerin incelenmesi ile anöploidilerin doğum öncesi tanısında ilk başarılı sonucu elde ettiler. Price ve ark., koryonik villüs örneklemeinden hemen önce alınan anne kan örneğinde bir trizomi 18 olgusu tespit ederken; koryonik villüs örneklemeinden 1 hafta sonra bir anneden alınan kanda yaptıkları başka bir çalışmada bir trizomi 21 (Down Sendromu) olgusu saptadılar.²³ Elias ve ark. da gebeliğin ilk 3 ayında anne kanındaki fetüse ait hücrelerde trizomi 21'in doğum öncesi tanısını koydular.²⁴ Bianchi ve Klingler, Holzgreve ve Ganshirt-Ahlerlert anne kanından elde edilen trizomi 18 ve 21 hücrelerini rapor ettiler.²⁵⁻²⁷

Fetüse Ait Hücre Tipleri

Çeşitli dokulardan kaynaklanan fetüse ait hücreler, çoğunlukla 'plasentanın intervillöz boşluğunda' görülmektedir ve embriyon/fetüse ait hücrelerin anne kanına geçtiği ispatlanmıştır.²⁸ Fetüse ait kan hücrelerinin anne dolaşımına geçişinin fetüsten anneye kanama sonucunda olduğu düşünülmektedir. Ancak bunun mekanizması henüz açıklanamamıştır. Bu kanamaların plasentanın normal gelişiminin bir parçası mı ya da travmadan kaynaklanan bir olay mı olduğu bilinmemektedir.²⁹

Gebelik esnasında maternal dolaşımda var oldukları gösterilen fetüse ait hücreleri kullanarak girişimsel olmayan doğum öncesi tanı yürütülmek isteniyorsa, bu hücrelerin zenginleştirilmesi, teşhisi ve analizi mutlaka gereklidir.³⁰ Kromozom kaynaklı ve Mendelian anomalilerin tanısı için fetüse ait çekirdekli hücrelerin elde edilmesi gerekir ki, kromozom-özgül problemler kullanılarak FISH yöntemiyle interfaz hücre analizi yapılabilir. Tanı için yeterli sayıda hücre elde etmek için, özgül bir hücre tipi hedeflenip, az miktardaki fetüse ait hücrenin zenginleştirilmesi sağlanmalıdır.³¹

Çalışılmış ve halen çalışılmakta olan fetüse ait hücre tipleri şunları içerir:

- Trofoblastlar,
- Beyaz kan hücreleri (lenfositler, granülositler),
- Çekirdekli kırmızı kan hücreleri (ÇKKH),
- Hematopoetik kök hücreler.³¹

Anne kanındaki fetüse ait hücrelerin rutin doğum öncesi genetik tanıda kullanılabilmesi için belli kriterler sağlanmalıdır:

- Tüm gebe kadınların kanında bulunmalıdırlar.
- Gebeliğin erken dönemlerinde yeterli miktarda bulunmalıdırlar ki, genetik analize izin versin ve gerekirse gebelik sonlandırılabilir.
- Bir sonraki gebelikte anne kanında varlıklarını devam ettirmemelidirler.
- Maternal hücrelerden ayrılmaları

sağlayabilecek kendilerine özgül işaretleri (marker) olmalıdır.³²

Anne Kanında Fetüse Ait Hücrelerin Sıklığı

Fetüse ait hücrelerin annenin periferik kanındaki sıklığı hakkında farklı veriler vardır ve literatürde geniş bir aralık rapor edilmiştir, bu aralık 5000'de 1 çekirdekli hücreden, 10⁸'de 1'e kadar uzanır.^{23,33} Bu sıklığı etkileyebilen faktörler şunları içerir: Analiz edilen hücre tipi, kan örneğinin alındığı gebelik yaşı ve fetüse ait hücre topluluğunu zenginleştirme, teşhis etme ve rakamlarla belirtmede kullanılan metotların doğruluğudur.³⁴ Anne kanındaki fetüse ait hücre insidansının arttığı bildirilen durumlar; gebeliğin ilerlemesi, toksemi, düşük, sezaryan, amniyosentez ya da bimanuel pelvik muayene sonrasında, fetüs ve plasenta karyotipinin anormal olduğu gebelikleri içerir.^{24,26,31,35-37}

Anne kanında nispeten az miktarda fetüse ait hücre bulunmaktadır. En sık tespit edilen değer, anne kanının mililitresine 1 hücre düştüğü yönündedir.³¹ Fetüse ait çekirdekli hücrelerin anne kaynaklı hücrelere oranının tespiti, öncelikli olarak PZR ya da FISH kullanılarak Y kromozomu için DNA analizine dayanmaktadır. Fetüse ait hücrelerin anne hücrelerine oranı, 1/50 bin'den 1/10 milyon'a uzanmaktadır.³³ Kesin bir sayı henüz belirlenememiş olsa da, çoğu araştırmacı yaklaşık 100 bin anne hücresi başına 1 fetüs hücresi düştüğü fikrine katılmaktadır.³⁸

Hall ve Williams, avidin-biotin tabanlı immünoafinite sistemi kullanarak fetüse ait çekirdekli hücrelerin annenin çekirdekli hücrelerine oranının 1 : 4.75 x 10⁶-1.6 x 10⁷ olduğunu ileri sürdüler.³⁹ Hamada ve ark., tekrarlayıcı Y-DNA dizisi DYZ1'e özgü bir DNA probu kullanarak ayrılaşmamış anne kanında FISH analizi yaparak fetüse ait çekirdekli hücrelerin annenin çekirdekli hücrelerine oranını tespit etmeye çalıştılar.³³ Gebelik yaşı ilerledikçe sıklık daha fazla bulundu; bu oran birinci 3 aylık dönemde 0.27, ikinci 3 aylık dönemde 3.52 ve üçüncü 3 aylık dönemde 8.56 x 10⁵ olarak saptandı. Bianchi ve ark., ölçümsel PZR kullanarak 16 mL'lik bir anne kanı örneğinin 19 fetüse ait DNA zinciri içerdiğini öne sürdüler.⁴⁰

Wachtel ve ark., anne kanında yüksek sayıda fetüse ait hücre varlığını gösteren çalışmalarıyla farklı bulgular rapor ettiler.⁴¹ Çıkardıkları sonuçların kaynağı fetüse ve anneye ait hücreleri fiziksel farklılıklarına dayanarak ayırtıran bir teknik olan 'charged flow separation' yani, yüklü akımla ayırıştırma tekniğiydi. Anne kanındaki ÇKKH %30'una yakınının fetüs kaynaklı olduğunu buldular. Ne yazık ki, daha sonra bu teknikte elde edilen hücrelerin çoğunun fetüse ait olmadığı kanısı hakim oldu. Çünkü Shulman ve ark., çok az sayıda ayrılaşmış numuneyi kromozoma özgü prob kullanarak FISH ile değerlendirdiler ve sonuç olarak fetüse ait hücre sayısı ile gebelik yaşı arasında hiçbir bağlantı gözlemediler.⁴²

Trofoblastlar

Trofoblast hücrelerinin dökülmesi erken plasental gelişimde normal bir olaydır. Fetüse ait kanamalar ise sadece bazı gebeliklerde oluşabilen ikincil bir olaydır. Trofoblast hücrelerinin anne kanına geçişi her ikisine de bağlı olabilir. Eğer gerçekten trofoblast hücreleri anne dolaşımına girebiliyorlarsa, fetüse ait çekirdekli eritrositlerin ve fetüse ait lenfositlerin genetik tanı için kullanılmasıyla karşılaştırıldığında bazı potansiyel avantajları vardır. Trofoblastlar, anne kanı hücrelerinden şekilleri sayesinde kolayca ayırt edilebilirler. Kan hücrelerinden ayrı bir hücre serisi oldukları için, bu hücreleri izole etmede kullanabilecek trofoblast-özgül antikörlerin geliştirilebilmesi teorik olarak mümkündür.³² Yalnızca gebelik esnasında var olmaları ve farklı şekillerinin kesin bir mikroskopik ayırma izin vermesi sayesinde trofoblastlar inceleme için iyi bir adaydır.³¹

Bununla birlikte, trofoblast hücrelerinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır: Trofoblastlar, gebeliğin ilk 3 ayında anne dolaşımına geniş miktarda dökülürler ve akciğer dolaşımı yoluyla kandan rutin olarak temizlenirler. Bu ise, annenin kanında tanı için kullanılacak trofoblastik hücre sayısında hızlı ve belirgin bir düşüşe sebep olur. Tanıda sorun olacak bu güçlüğü ek olarak, trofoblast-özgül monoklonal antikörlerin eksikliği söz konusudur.^{19,20,43} Bu eksiklik, trofoblastik

antijenlerin maternal lökositlerin yüzeyine doğru çekilmesinin bir sonucu olabilir. Ancak "Human Achaete Scute Homolog 2 (HASH-2)", Human plasental laktojen ya da HLA-G gibi diğer işaretleyiciler ile bu olayın üstesinden gelinebilir.⁴⁴ Trofoblastlarla ilgili diğer bir durum ise, plasentanın bir parçası olmaları yönüyle, koryonik villüs örnekleme çalışmalarından bilindiği üzere, bu hücrelerin nispeten yüksek oranda (%1-2) kromozomal mozaizm göstermeleridir. Bu yüzden bir plasental trofoblastik hücrenin genetik analizi, fetüse ait karyotipi tam olarak ve güvenilir bir şekilde yansıtmaz ve trofoblast hücrelerinin kültürde bölünme ihtimali olmayacaktır.³²

Ek olarak, trofoblastlar çok çekirdekli olabilirler ve böylece interfaz FISH'ı ve DNA analizlerinde zorluk çıkarabilirler. Bu teknik ve biyolojik sorunlara rağmen, birkaç çalışma grubu başarılı bir şekilde anne dolaşımından trofoblastları izole ettiler ve morfolojik ve genetik tanı gerçekleştirdiler.⁴⁵⁻⁴⁷

Daha önceleri yapılan çalışmalar, trofoblast hücrelerini sadece şekillerini baz alarak ayırt etmişlerdir. Fakat yakın zamanda ise trofoblast-özgül monoklonal antikolar kullanılarak -flow sitometride ya da immünmanyetik yataklarla- anne kanından trofoblast hücreleri zenginleştirilmeye çalışıldı.³²

Anne kanından trofoblastları izole etmek için 3'lü anti-trofoblast monoklonal antikoları; GB17, GB21 ve GB25 kullanıldı. Sekiz-32. haftalar arasında farklı zamanlarda kan örneği alınan 23 gebeden 14'ünde kontrollere kıyasla daha fazla antikor pozitif hücre saptandı.⁴⁸ Ancak aynı yolla Covone ve ark., akımla ayrıştırılan hücrelerin %95'inden fazlasının anneye ait lökosit olduğunu tespit ettiler ve ayrımlaşan trofoblast hücrelerinin olup olmadığı bile sorgulanmaya başlandı.²⁰

Denenen alternatif bir yaklaşım ise; anne kanından trofoblast hücrelerini zenginleştirmek amacıyla, FD066Q ve FD0338P anti-trofoblast monoklonal antikolarla birleştirilen immünmanyetik bilyelerin kullanılmasıydı.⁴⁵ Ancak izole edilen hücrelerin tanımlanması bu çalışmayla mümkün olmadı.

Hücre yüzey antijenlerine karşı olan anti-trofoblast antikolarını kullanmada problemler görülmektedir. Çünkü trofoblastların hücre yüzey antijenleri plasentadan dökülebilmekte ve anne hücrelerinin yüzeyine doğru çekilip yapışabilmektedirler. Bu problemi yenmek amacıyla Sargent ve ark., sitokeratine karşı bir monoklonal antikor kullandılar.³² Sitokeratinin trofoblast hücrelerinde bir hücre yüzey işaretleyicisi değil, sitoplazmik bir işaretleyici olması sebebiyle, anne hücreleri tarafından pasif olarak edinilmesi mümkün değildir. Bu sistemin bir dezavantajı, sitokeratin gibi işaretleyicilerin flow sitometride ya da immünmanyetik bilyelerle beraber kullanılamamasıdır. Bununla beraber, eğer anneden alınan kan yaymalarında sitokeratine karşı antikolar kullanılarak trofoblastlar bulunursa, bu durumda FISH'ı devreye sokmak ve bu hücrelerde fetüse ait hücrelere özgül sinyalleri araştırmak mümkün olacaktır.

Sargent ve ark., bu tekniği uygulayarak 3 tip hücre teşhis ettiler:

1- Geçmişteki morfolojik çalışmalarda tanımlanmış hücrelerle özdeş olan, 20-90 µm çaplı çok çekirdekli hücreler. Bunların kaynağı muhtemelen plasental tomurcuklanmalardır. Hücreler buradan kopmakta ve intervillöz boşluk yoluyla anne kanına girmektedirler.

2- Çapları 11-15 µm arasında değişen tek çekirdekli hücreler. Bunların kaynağı belirsiz olmakla birlikte, bu hücreler olasılıkla villöz sitotrofoblastik hücrelerdir.

3- Sitokeratin antikoruyla iyi boyanan çekirdeksiz hücreler. Bunlar sinsityotrofoblast sitoplazmasının kalıntıları olabilir.

Sargent ve ark. çalışmalarının sonunda şu sonuca vardılar; her ne kadar anne kanından izole edilen trofoblast hücrelerini kullanarak doğum öncesi genetik tanı koymanın potansiyel faydaları klinik ve ekonomik açıdan çok cazip görünse de, bu amaç için bu hücreler çok zor ele geçirilir niteliktedir. Bu konu üzerinde daha yoğun çalışmalara ve özgül trofoblast işaretleyicilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.³²

Lökositler

Fetüse ait çekirdekli eritrositlerin erken gebelikte anne dolaşımına geçtiğinin kesin delillerle gösterilmesi, araştırmacıları fetüse ait lökositlerin de eritrositlerle birlikte anne kanına geçeceği fikrine yöneltmiştir. Eğer fetüse ait lökositler anne dolaşımına giriyorsa, fetüse ait çekirdekli eritrositler ve trofoblastlarla karşılaştırıldığında doğum öncesi tanı için bazı potansiyel avantajları vardır:

1- HLA antijenleri sayesinde kolayca ayırt edilebilirler (Trofoblastlar ya da fetüse ait ÇKKH'inde HLA ekspresyonu yoktur).

2- Trofoblast hücrelerinin gösterdiği genetik mozaizm fetüse ait lökositlerde görülmez.

Fetüse ait lökositlerin anne kanındaki varlığının 3 ana kanıtı vardır:

1- Gebe kadın tarafından fetüse ait olmayan HLA antikorlarının geliştirilmesi,

2- XY metafazlarının ya da Y kromatininin direkt saptanması,

3- Fetüse ait lökositlerin flow sitometri ile izole edilmesi.²⁹

Walknowska ve ark., fetüse ait lenfosit olarak kabul ettikleri hücreleri mitojenle uyararak, bu hücrelerde Y kromozomunun varlığını gösterdiler.¹⁰ 1970'li yılların başlarındaki Kinakrinle boyalı Y cisimlerinde interfaz analizini gösteren çalışmaların da lenfositleri ilgilendirdiği düşünüldü. 1974-1977'de hamile kadınların kanında, erkek bebek doğumundan sırasıyla 1 ve 5 yıl sonra, erkek Y (+) lenfositlerin var olduğu Schroder ve ark. ve Ciaranfi ve ark.nın yaptıkları çalışmalarla gösterildi.^{49,50} Bunun amacı, fetüse ait hücrelerin lenfosit hücresi olabildiğini göstermenin yanında, doğumdan sonra da varlıklarını sürdürdüğünü göstermekti. Bu çalışmalar ışığında, 1979'da Herzenberg ve ark., akımla ayırtırmak (flow sorting) için lenfositleri ve mononükleer hücreleri hedef olarak seçtiler.¹⁶ Daha önce de belirtildiği gibi, bu grup HLA-A2'ye özgül bir monoklonal antikor kullandı ve HLA-A2'ye sahip olmayan hamile kadınlarda fetüse ait HLA-A2 pozitif hücreleri akımla ayırtırmayı başardılar.

Daha sonraları, fetüse ait lenfositler üzerinde yapılan çalışmalar birkaç faktör yüzünden sınırlandırıldı. Bunların başlıcaları; yalnızca fetüse ait olan lenfosit antijenlerine özgül monoklonal antikorların olmaması ve fetüse ait lenfositlerin bir önceki hamilelikten kalabileceğine ilişkin şüphelerdi.

Eritroblastlar

Fetüse ait ÇKKH (eritroblast) çok ilgi çekici bir aday hücredir, çünkü birçok istenen özelliğe sahiptir. ÇKKH'nin sınırlı bir yaşam süresi vardır.⁵¹ Erişkinde 5 günden daha uzun süre kalmazlar ve bu yüzden erişkin periferik kanında çok nadirdirler (hematolojik habis tümörler hariç).³¹ Eritroblastlar farklı bir şekilde sahiptirler ve gebelik süresince anne kanında sürekli bulunurlar.⁵² Fetüse ait genleri iyi temsil ederler. On bir haftalık fetüste eritroblastlar kırmızı kan hücrelerinin yaklaşık %10'unu ve 19 haftalık fetüste ise %0.5'ini oluşturur. Yani, gebeliğin birinci 3 aylık döneminde ve erken ikinci 3 aylık dönemde en fazla bulunan fetüse ait hücre tipi eritroblastlardır.^{31,53} Tek çekirdeklidirler. Sınırlı çoğalma yetenekleri nedeniyle, gebelik sona erdikten sonra varlıklarını devam ettirme olasılığı çok düşüktür. Olgunlaşmamış eritroid hücreleri karakterize eden yüzey antijenlerinin (CD71 ve CD36) varlığı, bu hücrelerin zenginleştirilmesinin, sadece HLA'sı hakkında bilgi sahibi olunan çiftlerle sınırlı kalmamasına, aksine tüm gebelerden zenginleştirilebilmesine imkan tanır.⁵⁴

Bianchi ve ark., eritroblastlar üzerinde ilk odaklanan araştırma grubudur.⁵⁵ Bu grup, transferrin reseptör (CD71) ekspresyonu için 'flow-sorting' ve Y zinciri için PZR kullandılar. Zenginleştirme sonrası, erkek fetüs taşıyan 8 hamile kadının 6'sında Y zinciri buldular.

Tennessee Üniversitesi, Memphis grubu daha sonra eritroblastları CD71'e göre ayırtırmakla kalmadı, aynı zamanda hücre boyutu, hücre granülaritesi ve glikoforin-A pozitifliğine göre de ayırtırmada başarılı oldular.^{23,56} Bir Y-özgül zincir için, kümelenmiş primerler (nested primer) kullanılarak, akım ile ayırtırılmış örneklerde 12 erkek fetüsten 12'si ve 6 dişi fetüsten 5'i doğru

olarak teşhis edildi.⁵⁶

Bu grup, daha sonra ilk defa anne kanı analizi ile fetüse ait anöploidinin doğum öncesi tanısını rapor ettiler. Kromozom-özümler kullanılarak FISH tekniğiyle interfaz hücrelerini analiz ederek 1991'de trizomi 18, 1992'de ise trizomi 21'i saptadılar.^{23,24} Altmış dokuz anne kanı örneğiyle yapılan başlangıç çalışması, yalancı-pozitif hiçbir sonuç olmamasıyla ümit vericiydi.¹ 2001'de Choolani ve ark., bütün fetüse ait primitif eritroblastların, annenin ÇKKH'ıyla karşılaştırıldığında, epsilon-globin pozitif olduğunu buldular.⁵⁷ Çalışmalarında epsilon-globin'in fetüse ait eritroblast işaretleyicisi olarak çok yüksek bir özgüllüğe sahip olduğunu ve girişimsel olmayan doğum öncesi tanı için ideal olan hedef hücre tipinin fetüse ait primitif eritroblastlar olduğunu ispatladılar.

Gebelik Sonrası Fetüse Ait Hücrelerin Varlığını Devam Ettirmesi

Bir önceki gebelikten kalan fetüse ait hücreler, anneye ait dolaşımında varlığını devam ettirebilir ve bu da tanısız yanlışlıklara neden olabilir. Bu durum, özellikle kromozomal anomalili bir canlı doğum ya da daha sık olarak kendiliğinden olan düşük sonrasında, anöploid hücreler anne dolaşımında varlıklarını sürdürmeye devam ederlerse oldukça büyük sorun yaratır. Bununla birlikte, fetüse ait hücreler doğumdan çok yakın bir zaman sonra dolaşımdan hızla kaybolurlar.³¹ Hamilelikten 1 hafta sonra, erkek doğuran 28 kadından 26'sında XFY ve SRY zincirleri görülürken; 4 hafta sonra ise 23 kadından sadece 2'sinde gözlemlendi.⁵⁸ Diğer araştırmacılar da, Elias ve ark. da dahil, benzer sonuçlarla karşılaştılar.⁵⁹ Ancak Bianchi ve ark., fetüse ait hücrelerin doğumdan sonra oldukça uzun bir süre devam edebileceğini rapor ettiler.⁶⁰

Sonraki bir çalışmada ise Lo ve ark. erkek doğuran 8 kadından doğum sonrası ardışık aldıkları kan örneklerinde Y zincirlerinin analizini yaptılar.⁶¹ Sekiz kadının tümü fetüse ait DNA zincirleri gösterdi, fakat fetüse ait DNA miktarı doğum sonrası hızla düştü. İki saat sonra ise çoğu kadında DNA düzeyleri tespit edilemiyordu.

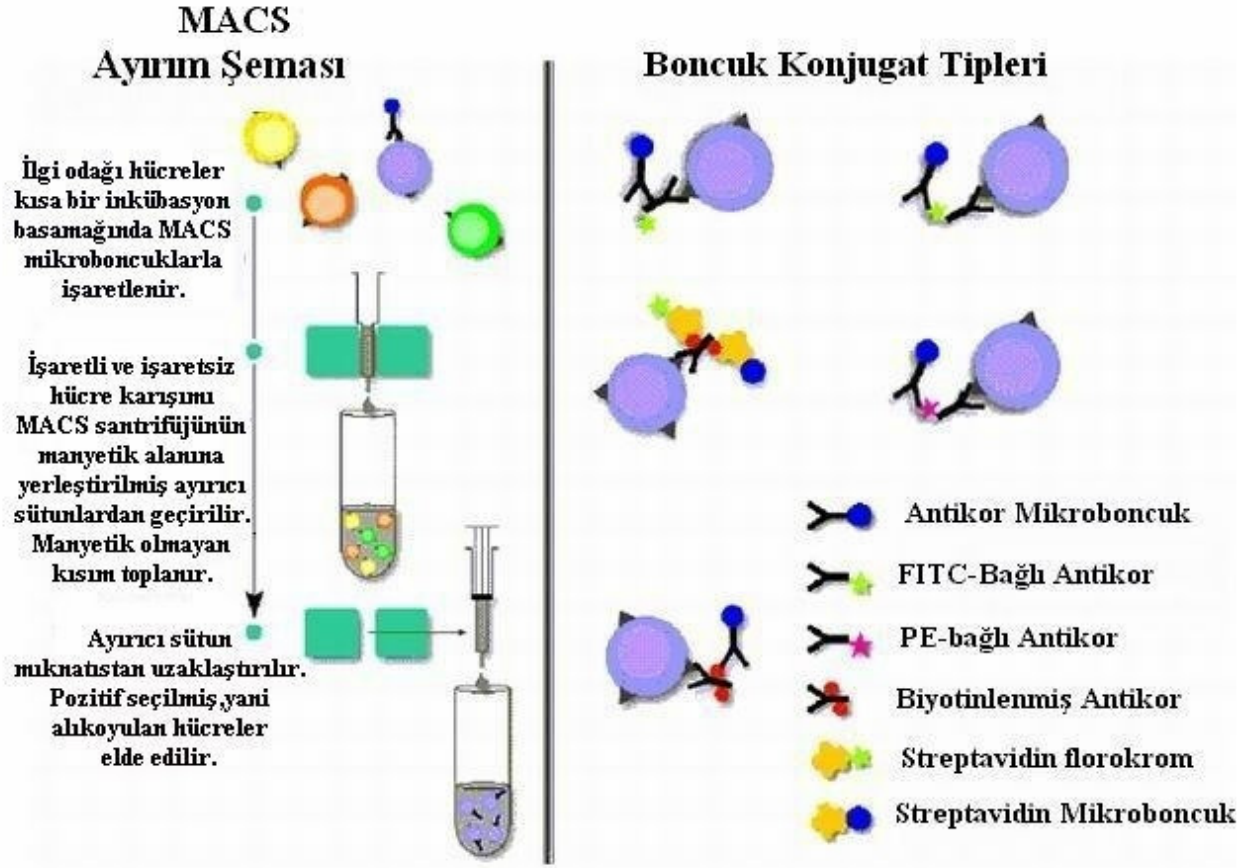
Zenginleştirme Yöntemleri

100.000 anneye ait hücre (1 mL kan) başına en fazla bir fetüse ait hücre düştüğünü kabul eden fikir birliği göz önüne alındığında; fetüse ait kromozom anomalilerinin tespitine yönelik FISH analizi yapabilmek için, kaçınılmaz olarak birtakım hücresel zenginleştirme yöntemlerine ihtiyaç duyulacaktır. Zenginleştirmenin altında yatan genel strateji, sadece fetüse ait hücreleri içeren saf bir örnek elde etmekten çok, çoğunluğunu fetüse ait hücrelerin oluşturduğu bir örnek elde etmektedir. Zenginleştirmeden sonra dahi çoğu hücreler anne kaynaklıdır. Ancak %0.1 fetüse ait hücre sıklığı bile, kromozom özgül problemlerle yapılan FISH yöntemiyle, fetüse ait anöploidilerin etkin analizine izin verir.³¹

Zenginleştirme, genellikle ilk olarak dansite gradiyenti (yoğunluk farkı) ya da protein ayırma teknikleriyle yapılır.^{62,63} Bazı gruplar, sadece 'tekli Fikol dansite gradiyenti' ile gerçekleştirilen nispeten basit bir zenginleştirmeden sonra fetüse ait tanının mümkün olduğunu savunurken; diğer grupların çoğu daha ileri zenginleştirme yöntemlerinin gerekli olduğuna inanmaktadırlar.^{31,64}

Başlangıç yaklaşımı olarak, flow sitometri ya da Manyetik Etkinlikli Hücre Ayırma Yöntemi "Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)" kullanılabilir (Şekil 1).^{26,65} Her iki teknik de pozitif seleksiyon (analizi istenen hücrelerin seçilmesi) ya da negatif seleksiyon (analizi istenmeyen hücrelerin aleyhine seçim) sağlama kapasitesine sahiptirler. Flow sitometrinin birçok çalışmada faydalı olduğu ispatlanmıştır, fakat bu teknoloji MACS'a göre daha pahalıdır ve kullanımı daha zordur.⁶⁶

MACS'ın alternatif bir kullanımında ise, 50 nm'lik manyetik bilyeler ile birleştirilmiş antikolar, zenginleştirilmek istenen hücrelere doğru yöneltilir; bu bilyeler (ki bunların istenen hücre tipine bağlanması beklenir), solüsyondaki hücreler geçerken manyetik bir alanda alıkonulur (pozitif seleksiyon). Sorgulanan antijenlerden yoksun olan hücreler ise, bilyelere bağlanamazlar, manyetik alanda tutulmazlar ve engelsiz geçip atılırlar. Manyetik alanın serbest bırakılmasından sonra bilyelere bağlı hücreler, artık bir sonraki analiz için



Şekil 1. MACS (Magnetic Activated Cell Sorting; Manyetik Etkinlikli Hücre Ayırıştırma Yöntemi) Şeması (Şekil, 'www.miltenyibiotec.com' adresinden alınarak modifiye edilmiştir.)

toplanabilir. Ayrıca, bunun tersi de yapılabilir; istenen hücrelerin serbest geçişine izin verilip, istenmeyen hücrelerin manyetik alanda tutulması sağlanabilir.

MACS'ın avantajı, Floresan Etkinlikli Hücre Ayırıştırma Yöntemi "Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)" ile karşılaştırıldığında daha ucuz olması ve kullanımının kolaylığıdır.³¹ Bahsedildiği gibi, MACS fetüse ve anneye ait hücreler arasındaki fiziksel farklılık temeline dayanır.^{41,67} Diğer bir zenginleştirme yaklaşımı ise, MACS ile birlikte yapılan zıt akım teknolojisidir (Charged flow separation; yüklü akımla ayırıştırma tekniği). Bununla birlikte, en uygun zenginleştirme yaklaşımı henüz belirlenmemiştir.³¹

İmmünojenik Bir Yöntemle Homozigot α^0 -Talaseminin Doğum Öncesi Tanısı

İnsanda α^0 -Talasemi, hem α_1 , hem α_2 globin genlerini yok eden geniş 'delesyonların' sonucudur. Homozigot durum ölümcüldür ve hastalığa yakalanan fetüsler, 23-38. haftalık iken ya da doğumdan kısa bir süre sonra ölürlür. Hb üretimi, HbBart's (γ_4), Portland I (ζ_2, γ_2) ve çok düşük miktarda Portland II (ζ_2, γ_2) ile sınırlıdır. Portland I ve II'nin oksijene normal ilgisi vardır ve gebeliğin üçüncü 3 aylık dönemine kadar fetüsün yaşayabilmesini sağlarlar.

HbBart's Hidrops Fetalis Sendromu'nun çok sık görülen anneye ait komplikasyonları vardır; pre-eklampsi, doğum öncesi ve sonrası kanama gibi. Bu durumlar göz önüne alındığında, Hb Bart's hastalığında, doğum öncesi tanı ve selektif

abortus (seçime bağlı düşük) için tıbbi bir endikasyon vardır.

Homozigot α^0 -talaseminin anne karnında tanısını koymak için Bernini ve ark. tarafından uygulanan ek bir prosedür ve sonuçları: Bu prosedür, Hidrops Fetalis Sendrom'lu bebeklerin eritroblast ve eritrositlerinde normal α -globin zincirlerinin yokluğunu immünolojik olarak ispatlama temeline dayanmaktadır.⁶⁸

Yöntemler: Gebeliğin 10-12. haftalarında 'transservikal yolla koryonik villüs örnekleme' yapıldı. Biyopsi materyalinin yıkamalarından anne ve fetüse ait hücre karışımı elde edildi. İnsana ait olmayan kontrol eritrositler 1/10 oranda eklendi ve santrifüj ile örnekler hazırlandı. Tüm örneklerde mutlaka 10-100 üzerinde fetüse ait eritroblast ve daha az fetüs eritrositi mevcuttu. Homozigot α^0 -talasemili fetüslerin eritroblast ve eritrositlerini, heterozigot ve normal bebeklerinkinden ve anne hücrelerinden ayırtırmak için örnekler, insan α -globin zincirlerine, γ -globin zincirlerine, karbonik anhidraz B'ye karşı özgül poliklonal antiserum ile tekli ve çiftli immünfloresan tekniğiyle test edildi. Aynı zamanda fetüse ait dokulardan elde edilen genomik DNA'nın analizi yapıldı.

Sonuçlar: Riskli 5 gebe, hem immünfloresan hem de standart DNA analizi yapılarak takip edildi. Fetüse ait kırmızı kan hücreleri, boyut ve morfolojileri sayesinde kolayca tespit edilebiliyordu. Üç gebeden alınan örneklerde mevcut olan tüm fetüse ait eritroblast ve eritrositler, anti- α -polipeptid antiserum ile reaksiyon vermediler. Böylece α^0 -talaseminin homozigot taşıyıcıları olarak sınıflandırıldılar. α -zincir antiserumu ile pozitif immünfloresan gösteren diğer 2 fetüs ise normal ve heterozigot olarak saptandı. DNA analizleri, immünolojik metotlarla elde edilen sonuçları aynen onayladı.⁶⁸

Sonuç olarak, insan α -globin polipeptidine karşı özgül antikolar kullanılarak, HbBart's Hidrops Fetalis'li bebeklerin eritroid hücrelerinde α -globin eksikliğini göstermek mümkündür.

Anne Kanından İzole Edilen Trofoblastlarda β -Talasemi Mutasyonlarının Saptanması

β -talasemi, kalıtsal bir hemoglobin sentez bozukluğudur. β -globin polipeptid zincirlerinin belirgin azalması ya da tamamen yokluğu ile karakterizedir. β -talasemi, başlıca 100'den fazla bilinen nokta mutasyonları sonucu meydana gelir. Homozigot formu çok ciddi olup, hayatı tehdit eden anemiye yol açar. Hastalar, aylık kan transfüzyonu ve günlük şelasyon ile ancak hayatta kalabilirler. Bu yüzden, risk altındaki çiftlerin çoğu doğum öncesi tanı için başvurumaktadırlar. Günümüzde koryonik villüs örnekleme gebeliğin ilk 3 ayında yapılarak DNA'daki mutasyonlar saptanmaktadır.

Sıklıkla babaya ait mutasyon, anneye ait mutasyondan farklıdır. Böyle durumlarda, eğer fetüsteki babaya ait allel rutin doğum öncesi tanı ile tespit edilirse ve anne kanından izole edilen trofoblastlarda saptanabilirse, bu şekilde çok güzel bir izleme sistemi oluşacaktır.⁶⁹

Daha önce bahsedildiği gibi, Hawes ve ark., immünmanyetik bir prosedürle trofoblast-reaktif antikoları kullanarak fetüse ait trofoblastları anne kanından izole etmişlerdir.⁴⁵ Aynı grup, β -talaseminin en sık sebebi olan nokta mutasyonlarını anne kanından elde etmiş oldukları trofoblastlarda saptayan ilk gruptur. Anne kanı örneklerini santrifüj ettikten sonra, monoklonal antikolar kullanarak trofoblastları işaretlediler. MACS ile bu işaretli hücreleri kısa sürede ayırttılar. β -globin geninin bulunduğu 5' bölgesi, PZR ile çoğaltıldıktan sonra, Tek Nükleotid Primeri Genişletilmesi "Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE)" tekniğiyle mutasyonları tespit ettiler. Böylece koryonik villüs örnekleme ile koyulan tanıyı doğrulamış oldular.⁶⁹

Trizomi 21'in Kültüre Edilmemiş Amniyositlerde FISH Tekniğiyle Saptanması

Kromozom bozukluklarının doğum öncesi tanısı, potansiyel anormal neticeleri yüzünden, kesinlik ve hız gerektirir. FISH yöntemi, doğum öncesi alınan kan örneklerinde interfaz safhasında

uygulanabileceği için amniyositlerin kültüre edilmesine gerek kalmaz ve zamandan kazanç sağlanır.⁷⁰ FISH yöntemi kullanılarak, kültüre edilmemiş amniyotik örnekler, X, Y, 13 ve 21 kromozomlarına özgül olan problarla test edilmiş ve genel olarak anöploidiler %73.3, trizomi 21 ise %63.3 oranında saptanabilmiştir.⁷¹ Davies ve ark., kültüre edilmemiş amniyositlerde trizomi 21'i tespit etmek için, üçlü-kozmid kontig (242c) kullanarak FISH uyguladılar.⁷⁰ Hibridizasyon kompleksleri, iki farklı florokrom sistemiyle oluşturuldu. Sadece ikili sinyaller gerçek sinyal olarak kabul edildi. Elde ettikleri sonuçlara göre, bu metotla trizomik örneklerin normal olarak değerlendirilmesinin çok düşük bir ihtimal olduğu ortaya çıktı.

Maternal Plazma ya da Serumda Fetüse Ait DNA

Önceleri, analiz için elde edilecek olan fetüse ait DNA'nın, çekirdek içinde mevcut olduğu düşüncesi hakimdi. Lo ve ark., maternal plazma ya da serumda hücreden bağımsız DNA'nın var olduğunu ve analizinin mümkün olduğunu gösterdiler.^{61,72} Anne kanındaki fetüse ait DNA, doğumdan hemen sonra temizlenir.⁷³ Bischoff ve ark., benzer olarak heterozigot fetüs (Dd) taşıyan Rh-negatif kadın (dd)'ların serumunda Rh(D) DNA'nın mevcut olduğunu gösterdiler.⁷⁴ Anne plazmasındaki fetüse ait DNA düzeyi önemli miktardadır ve araştırmacıların fetüsün cinsiyetini belirleyebilmelerine imkan tanır.^{75,76} Rijnders ve ark., 21-hidroksilaz eksikliği gibi X'e bağlı hastalıklar için risk taşıyan kadınlarda, fetüs cinsiyetini tespit etmede bu metodun kullanılabilirdiğini gösterdiler.⁷⁶

Fetüse Ait Hücre Kültürü

Anne kanında çok az fetüse ait hücre bulunduğu için, hücre dışı DNA'nın analizde kullanılması fikrine ihtiyaç duyulmuştur. Uygun olarak ele geçirilen hücrelerin bu kadar az olması, bu hücrelerin seçici olarak kültüre edilebilme yetenekleriyle telafi edilebilir. Çünkü, kültür sayesinde analiz için elde var olan hücre sayısı arttırılmış olur. Farklı hücre çeşitlerinin mitojenik uyarıya farklı cevap verdiği iyi bilinmektedir.

Dolayısıyla, anne kan örneklerinde anneye ait kök hücreler de var oldukları için anneye ait hücreleri uyarmaksızın, seçici olarak fetüse ait hücre büyümesini uyaran tekniklere ihtiyaç vardır.³¹

Bazı çalışma grupları, anne kan örneklerinden fetüse ait hücreleri kültüre etmede başarılı olduklarını rapor ettiler.⁷⁷⁻⁸⁰ Valerio ve ark., 5640 tane ölçülen hücre arasından 84 fetüs ait hücre (trizomi 18) kaydettiler.⁸⁰ Ancak, fetüse ait hücre kültürüne ilişkin evrensel bir başarı henüz bildirilmemiştir. Chen ve ark., başarı elde edemediler ve genel olarak elde ettikleri sonuçlar, Valerio ve ark. tarafından rapor edilenler kadar etkin olmadı.^{81,82}

Bilinen fetüs hücrelerinin büyümesine imkan tanıyan kültür teknolojilerini kullanmalarına rağmen, fetüse özgül DNA zincirlerini saptayamayan Huber ve ark.nın çalışmalarından sonra, araştırmacılar da fetüse ait hücre kültürünün güvenilirliğine ilişkin endişe uyandı.⁸³ Fetüse ait hücre kültürünün, fetüs hücrelerinin analitik incelenmesinin bir parçası haline gelebilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Fetüse Ait Hücre Kimerizmi

Fetüse ait hücreleri saptamada ve analiz etmede başlangıçtaki amaç, birincil olarak etkin, girişimsel olmayan doğum öncesi takip ve tanı protokollerinin geliştirilmesine yöneliktir. Ancak birçok grubun çalışmalarının neticesinde, hücrenel ve fizyolojik bilgilerdeki artış, anne kanında bulunan fetüse ait hücrelerin anne sağlığı üzerindeki etkisine ilişkin merak uyandırıcı ve beklenmedik bilgilere ulaşılmasını sağladı.

Daha önceleri de bahsedildiği gibi, doğum sonrası fetüse ait hücrelerin varlıklarını sürdürmeleri endişe vericidir, çünkü tanısız hatalarla sonuçlanabilir.³¹ Erkek bebek doğumunun ardından, 1-5 sene boyunca anne kanında erkek lenfositlerinin varlıklarını sürdürdüğü ispatlandı.^{49,50} Bianchi ve ark., flow sitometri kullanarak annede doğum sonrası 27 yıl kadar uzun bir süre fetüse ait hücrelerin varlığını devam ettirebileceğini gösterdiler.⁶⁰ Bu hücreler, çekirdekli eritrosit olmayıp, lenfoid ya da miyeloid progenitörlerdir.

Dolayısıyla, her ne kadar çok küçük sayıda ve

farklı evrelerde olsa bile, fetüse ait hücrelerin devam etmesine dayanarak, doğumu takiben düşük dereceli bir kimerik durumun var olduğu söylenebilir (Kimera: Birden fazla zigottan köken almış, genetik olarak farklı hücre popülasyonlarına sahip bir birey).

Nelson, fetüse ait hücre mikrokimerizminin otoimmün hastalıklarda rol oynadığı hipotezini öne sürdü.⁸⁴ Bilindiği gibi, otoimmün hastalıkların sıklığı kadınlarda çocuk sahibi olma dönemlerinin ardından artmaktadır. Sklerodermalı kadınların periferik kanında, sağlıklı kız kardeşleriyle ve normal kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, belirgin olarak artmış miktarda erkek fetüse ait DNA bulunmuştur.⁸⁵ Böylece, doğumun ya da kendiliğinden bir düşüğün sonucu olan fetüse ait hücre mikrokimerizmi, sklerodermanın etiyolojisinde rol oynayabilir. Artlett ve ark., sklerodermalı kadınların deri biyopsilerinde erkek lenfositlerini gösterdiler ve etkilenmiş annelerin başka farklı organlarında da erkek hücrelerini saptadılar.^{86,87}

Diğer taraftan, anneye ait hücre mikrokimerizmi, erkeklerde sklerodermanın neden nadir görüldüğünü de açıklayabilir. DNA polimorfizmi gösteren göbek kordonu kan örnekleri çalışılarak fetüse ait dolaşımda az sayıda anneye ait hücrenin tespit edildiği ortaya konmuştur.⁸⁸⁻⁹⁰ İki yönlü fetüs/anne hücre trafiği, hastalıkların patogenezi anlamamızda kayda değer önemi olabilecek bir olgudur.^{89,91,92}

Yeni Çalışmalar

1998 yılında, Leung ve ark., preterm doğum riski olan gebelerde fetüse ait serbest DNA seviyelerinin anne kanında arttığını ve fetüse ait DNA konsantrasyonuna bakılarak, gerçek ve yalancı preterm doğum eyleminin ayırt edilebileceğini rapor ettiler.⁹³

2000 yılında, Tutschek ve ark., anne kanından fetüse ait hücrelerin klonal kültürü üzerine yoğunlaştılar.⁹⁴ On iki sağlıklı gebe kadının periferik kanından saf fetüse ait koloniler elde etmek için, fetüs hematopoetik hücrelerinin klonal in-vitro ekspansiyonu (yayılmı) ve saf kolonilerin mikromanipülasyon ve floresan PZR'sini

kullandılar. Rastgele seçilmiş 2966 koloniden 42'si fetüse ait ve diğer hücreleri içeriyordu. Dört kadında, herbiri saf fetüs hücresi içeren 2-4 koloni saptandı. Bu şekilde, anne kanındaki fetüse ait hücre sayısının azlığına rağmen, analiz için birçok hücre elde edilmiş oldu.

Yine 2000 yılında, Poon ve ark., Down Sendromlu fetüs taşıyan 3 gebe kadının plazma örneklerinde FISH tekniği ile 3 tane kromozom-21 sinyali gösteren fetüse ait hücre tespit ettiler.⁹⁵ Pahalı 'fetüse ait hücre zenginleştirme ekipmanları'na ihtiyaç duyulmadan, basit bir prosedürle, annenin plazma analiziyle fetüse ait kromozom anöploidilerinin saptanabilirliğini bir kez daha göstermiş oldular.

2001 yılında, Honda ve ark., anne serumunda PZR analizi yaparak fetüs cinsiyetinin belirlenebileceğini rapor ettiler.⁹⁶ Aynı yıl Rodriguez de Alba ve ark., fetüse ait ÇKKH sayısının ilk 3 gebelik ayından ikinci 3 aylık döneme geçince arttığını bildirdiler.⁹⁷ Güvenilir bir doğum öncesi tanı için optimum haftanın 15. hafta civarı olduğunu rapor ettiler. 2002'de Gussin ve ark., gebe olmayanlarla karşılaştırıldığında gebe kadınların periferik kanlarında primitif endotelial öncül hücrelerin olup olmadığını ve bu öncüllerin fetüs kaynaklı mı yoksa anne kaynaklı mı olduğunu saptamaya çalıştılar.⁹⁸ Hücre kültürü ve FISH kullandıkları çalışmaları sonucunda, primitif endotelial öncül hücrelerin çoğunun gebe kadında ikinci 3 aylık dönemde var olduğunu ve bunların maternal kaynaklı olduğunu tespit ettiler. 2002'de Hoesli ve ark., bu çalışmadan yola çıkarak preterm doğum riski olan gebelerde, fetüs DNA'sında olduğu gibi fetüse ait hücrelerde de bir artış olup olmadığını araştırdılar.⁹⁹ Sonuç olarak, prematür doğum riski olan ya da preterm doğum yapan gebelerde fetüse ait DNA'nın aksine eritroblastlarda belirgin bir artış olmadığını tespit ettiler. Yine 2002'de Merchant ve ark., otomasyon ile incelenen fetüse ait hücre sayısının arttırılabileceğini, sonuçta duyarlılığın da yükseleceğini düşündüler.¹⁰⁰ Fetüse ait hücrelerin otomatik taranması amacıyla bilgisayarlı mikroskopik teknikler kullandılar. Ancak şu an

için otomatik mikroskop sisteminin fetüse ait hücre taranmasında kullanılması ticari açıdan mümkün değildir.

2003'te O'donoghue ve ark., birinci 3 aylık gebelik döneminde mezenkimal kök hücreleri anne kanından elde edebilmek için optimal protokolü kullandılar.¹⁰¹ Bu hücrelerin fetüse ait olduğunu FISH, immün fenotipleme yaparak ve osteojenik ve adipojenik farklılaşmalarına bakarak doğruladılar. Sonuç olarak, fetüse ait mezenkimal hücreleri anne kanından izole ettikleri halde; bu hücrelerin doğumun cerrahi olarak sonlandırılmasından sonra anne kanında çok az miktarda bulduklarına dayanarak, girişimsel olmayan doğum öncesi tanıda rollerinin olamayacağını rapor ettiler.

Sonuç

Fetüse ait hücreler anne dolaşımında yer alsalar da, çok düşük sayıdadırlar. Bu hücreler anneye ait hücrelerden farklı özellik ve antijenite gösterirler ve elde edilip incelenmeye uygundur. Ayrıca, birçok bulgu bu hücrelerin sistemik hastalıkların patogeneğinde büyük oranda rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, embriyon ya da fetüse ait sitogenetik ve mendelian bozuklukların takip ve tanısında, fetüse ait hücrelerin büyük vaatlerinin ve güçlü potansiyel faydasının olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, birçok merkez ve araştırmacı, anne dolaşımından fetüse ait hücre ve DNA'nın elde edilmesi ve değerlendirmesinde uygun, etkin bir protokol geliştirmeyi başaramamışlardır. Doğru ve girişimsel olmayan doğum öncesi tanıda ve hastalık sebeplerini belirlemede yüksek potansiyeli sebebiyle, fetüse ait hücrelerin klinik uygulamalarda kullanımında güvenilir ve ekonomik modellerin geliştirilmesi için araştırmalar devam etmekte ve desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Simpson JL, Elias S. Fetal cells in maternal blood: Overview and historical perspective. In: Simpson JL, Elias S, eds. *Fetal Cells in Maternal Blood: Prospective for Noninvasive Prenatal Diagnosis*. New York: New York Academy of Sciences; 1994. p.1-8.
2. Kuliev AM, Modell B, Jackson L, et al. Risk evaluation of CVS. *Prenat Diagn* 1993;13:197-209.
3. Firth HV, Boyd PA, Chamberlain P, MacKenzie IZ, Lindenbaum RH, Huson SM. Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days' gestation. *Lancet* 1991;337:762-3.
4. Graves JC, Miller KE, Sellers AD. Maternal serum triple analyte screening in pregnancy. *Am Fam Physician* 2002;65:915-20.
5. Ewigman BG, Crane JP, Frigoletto FD, LeFevre ML, Bain RP, McNellis D. Effect of prenatal ultrasound screening on perinatal outcome. *N Engl J Med* 1993;329:821-7.
6. Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, Cunningham GC, Lustig LS, Boyd PA. Reducing the need for amniocentesis in women 35 years of age or older with serum markers for screening. *N Engl J Med* 1994;330:1114-8.
7. Schmorl G. *Pathologisch-anatomische Untersuchungen ueber Publereklampsie*. Leipzig: Vogel; 1893.
8. Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1959;78:960-73.
9. Clayton EM, Feldhaus WD, Whitacre FE. Fetal erythrocytes in the maternal circulation of pregnant women. *Obstet Gynecol* 1964;23:915-9.
10. Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969;1:1119-22.
11. de Grouchy J, Trebuchet C. Fetomaternal transfusion of blood lymphocytes and identification of the sex of the fetus. *Ann Genet* 1971;14:133-7.
12. Schroder J, Schroder E, Cann HM. Fetal cells in the maternal blood. Lack of response of fetal cells in maternal blood to mitogens and mixed leukocyte culture. *Hum Genet* 1977;38:91-7.
13. Grosset L, Barrelet V, Odartchenko N. Antenatal fetal sex determination from maternal blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1974;120:60-3.
14. Zilliacus R, De la Chapelle A, Schroder J, Tilikainen A, Kohne E, Kleihauer E. Transplacental passage of foetal blood cells. *Scand J Haematol* 1975;15:333-8.
15. Martin AO, Shaunessy M, Sabrin H, et al. Evaluation and development of a system for automated preparation of blood specimens for cytogenetic analysis. In: Lunsteen C, Piper J, eds. *Automation of Cytogenetics: Advances in System and Technology*. Berlin: Springer Verlag; 1989. p.149-73.
16. Herzenberg LA, Bianchi DW, Schroder J. Fetal cells in the blood of pregnant women: Detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1453-5.
17. Iverson GM, Bianchi DW, Cann HM. Detection and isolation of fetal cells from maternal blood using the fluorescence-activated cell sorter (FACS). *Prenat Diagn* 1981;1:61-73.
18. Tharapel AT, Jaswaney VL, Dockter ME, et al. Inability to detect fetal metaphases in flow-sorted lymphocyte

- cultures based on maternal-fetal HLA differences. *Fetal Diagn Ther* 1993;8:95-101.
19. Covone AE, Mutton D, Johnson PM, Adinolfi M. Trophoblast cells in peripheral blood from pregnant women. *Lancet* 1984;2:841-3.
 20. Covone AE, Kozma R, Johnson PM, Latt SA, Adinolfi M. Analysis of peripheral maternal blood samples for the presence of placenta-derived cells using Y-specific probes and McAb H315. *Prenat Diagn* 1988;8:591-607.
 21. Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989;2:1363-5.
 22. Lo YM, Patel P, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA, Wainscoat JS. Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet* 1990;335:1463-4.
 23. Price JO, Elias S, Wachtel SS, et al. Prenatal diagnosis with fetal cells isolated from maternal blood by multiparameter flow cytometry. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1731-7.
 24. Elias S, Price J, Dockter M, et al. First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* 1992;340:1033.
 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;90:368-70.
 26. Ganshirt-Ahlert D, Borjesson-Stoll R, Burschik 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;30:194-201.
 27. Holzgreve W, Garritsen HS, Ganshirt-Ahlert D. Fetal cells in the maternal circulation. *J Reprod Med* 1992;37:410-8.
 28. Adinolfi M. On a non-invasive approach to prenatal diagnosis based on the detection of fetal nucleated cells in maternal blood samples. *Prenat Diagn* 1991;11:799-804.
 29. Sargent IL, Choo YS, Redman CW. Isolating and analyzing fetal leukocytes in maternal blood. *Ann N Y Acad Sci* 1994;731:147-53.
 30. Hahn S, Sant R, Holzgreve W. Fetal cells in maternal blood: Current and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 1998;4:515-21.
 31. Shulman LP. Fetal cells in maternal blood. *Curr Womens Health Rep* 2003;3:47-54.
 32. Sargent IL, Johansen M, Chua S, Redman CW. Clinical experience: Isolating trophoblasts from maternal blood. *Ann N Y Acad Sci* 1994;731:154-61.
 33. 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;91:427-32.
 34. Little MT, Langlois S, Wilson RD, Lansdorp PM. Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34⁺ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* 1997;89:2347-58.
 35. Chueh J, Golbus MS. Prenatal diagnosis using fetal cells in the maternal circulation. *Semin Perinatol* 1990;14:471-82.
 36. Adinolfi M. Non- or minimally invasive prenatal diagnostic tests on maternal blood samples or transcervical cells. *Prenat Diagn* 1995;15:889-96.
 37. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood: Advances in prenatal diagnosis through molecular technology. *JAMA* 1993;270:2357-61.
 38. Klinger KW. FISH: Sensitivity and specificity on sorted and unsorted cells. *Ann N Y Acad Sci* 1994;731:48-56.
 39. 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.
 40. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997;61:822-9.
 41. Wachtel SS, Sammons D, Twitty G. Charge flow separation: Quantification of nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy. *Prenat Diagn* 1998;18:455-63.
 42. Shulman LP, Phillips OP, Tolley E. Frequency of nucleated red blood cells in maternal blood during the different gestational ages. *Hum Genet* 1998;103:723-6.
 43. Bertero MT, Camaschella C, Serra A, Bergui L, Caligaris-Cappio F. Circulating 'trophoblast' cells in pregnancy have maternal genetic markers. *Prenat Diagn* 1988;8:585-90.
 44. Moreau P, Teyssier M, Kirszenbaum M, et al. HLA-G mRNA forms in human trophoblasts and peripheral blood lymphocytes: Potential use in prenatal diagnosis. *Folia Biol (Praha)* 1994;40:431-8.
 45. Mueller UW, Hawes CS, Wright AE, et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 1990;336:197-200.
 46. Hawes CS, Suskin HA, Kalionis B, 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.
 47. Hawes CS, Suskin HA, Petropoulos A, Latham SE, Mueller UW. A morphologic study of trophoblast isolated from peripheral blood of pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1297-300.
 48. Bruch JF, Metezeau P, Garcia-Fonknechten N, et al. Trophoblast-like cells sorted from peripheral maternal blood using flow cytometry: A multiparametric study involving transmission electron microscopy and fetal DNA amplification. *Prenat Diagn* 1991;11:787-98.
 49. Schroder J, Tiilikainen A, De la Chapelle A. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. I. Cytological aspects. *Transplantation* 1974;17:346-54.
 50. Ciaranfi A, Curchod A, Odartchenko N. Post-partum survival of fetal lymphocytes in the maternal blood. *Schweiz Med Wochenschr* 1977;107:134-8.
 51. Pearson HA. Life-span of the fetal red blood cell. *J Pediatr* 1967;70:166-71.

52. Parano E, Falcidia E, Grillo A, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by isolation and analysis of fetal cells from maternal blood. *Am J Med Genet* 2001;101:262-7.
53. Thomas DB, Yoffey JM. Human foetal haemopoiesis. I. The cellular composition of foetal blood. *Br J Haematol* 1962;8:290-5.
54. Ho SS, O'Donoghue K, Choolani M. Fetal cells in maternal blood: State of the art for non-invasive prenatal diagnosis. *Ann Acad Med Singapore* 2003;32:597-603.
55. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3279-83.
56. Wachtel SS, Elias S, Price J. Fetal cells in the maternal circulation: Isolation by multiparameter flow cytometry and confirmation by PCR. *Hum Reprod* 1991;6:1466-9.
57. Choolani M, O'Donnell H, Campagnoli C, et al. Simultaneous fetal cell identification and diagnosis by epsilon-globin chain immunophenotyping and chromosomal fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2001;98:554-7.
58. Hsieh TT, Pao CC, Hor JJ, Kao SM. Presence of fetal cells in maternal circulation after delivery. *Hum Genet* 1993;92:204-5.
59. Elias S, Lewis DE, Simpson JL. Isolation of fetal nucleated red blood cells from maternal blood: Persistence of cells from prior pregnancy is unlikely to lead to false positive results. *J Soc Gynecol Invest* 1996;3:359.
60. 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;93:705-8.
61. 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;62:768-75.
62. 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. *Prenat Diagn* 2000;20:281-6.
63. Troeger C, Holzgreve W, Hahn S. A comparison of different density gradients and antibodies for enrichment of fetal erythroblasts by MACS. *Prenat Diagn* 1999;19:521-6.
64. Oosterwijk JC, Mesker WE, Ouwerkerk-Van Velzen MC, et al. Prenatal diagnosis of trisomy 13 on fetal cells obtained from maternal blood after minor enrichment. *Prenat Diagn* 1998;18:1082-5.
65. Lewis DE, Schober W, Murrell S, et al. Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry. *Cytometry* 1996;23:218-27.
66. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells in the maternal circulation. *Hum Reprod Update* 1995;1:409-18.
67. Wachtel SS, Sammons D, Manley M, et al. Fetal cells in maternal blood: Recovery by charge flow separation. *Hum Genet* 1996;98:162-6.
68. Bernini LF, Kanhai HH, Losekoot M, Giordano P, Hartevelde CL. Prenatal diagnosis of homozygous alpha zero-thalassemia by an immunological method. *Ann N Y Acad Sci* 1994;731:193-6.
69. Hawes CS, Suskin HA, Kalionis B, 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.
70. Davies AF, Barber L, Murer-Orlando M, Bobrow M, Adinolfi M. An improved method for the detection of trisomy 21 in uncultured amniocytes by fluorescence in situ hybridization. *Ann N Y Acad Sci* 1994;731:67-72.
71. Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: Clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet* 1993;52:854-65.
72. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-7.
73. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-24.
74. Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise KJ Jr, Simpson JL, Elias S. Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:64-9.
75. Houfflin-Debauge V, O'Donnell H, Overton T, Bennett PR, Fisk NM. High sensitivity of fetal DNA in plasma compared to serum and nucleated cells using unnested PCR in maternal blood. *Fetal Diagn Ther* 2000;15:102-7.
76. Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MA, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001;98:374-8.
77. Lo YM, Morey AL, Wainscoat JS, Fleming KA. Culture of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood. *Lancet* 1994;344:264-5.
78. 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;16:1073-82.
79. Valerio D, Aiello R, Altieri V. Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Mol Hum Reprod* 1997;3:451-5.
80. Valerio D, Altieri V, Antonucci FR, Aiello R. Characterization of fetal haematopoietic progenitors circulating in maternal blood of seven aneuploid pregnancies. *Prenat Diagn* 1997;17:1159-69.
81. Chen H, Griffin DK, Jestic K, Hackett G, Cooper J, Ferguson-Smith MA. Evaluating the culture of fetal erythroblasts from maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 1998;18:883-92.
82. Valerio D, Altieri V, Cavallo D, Aiello R, Antonucci FR. Detection of fetal trisomy 18 by short-term culture of

- maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:222-5.
83. Huber K, Bittner J, Worofka B, et al. Quantitative FISH analysis and in vitro suspension cultures of erythroid cells from maternal peripheral blood for the isolation of fetal cells. *Prenat Diagn* 2000;20:479-86.
 84. Nelson JL. Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: Is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis Rheum* 1996;39:191-4.
 85. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, et al. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998;351:559-62.
 86. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:1186-91.
 87. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, et al. Fetal cells in maternal blood: NIFTY clinical trial interim analysis. DM-STAT. NICHD fetal cell study (NIFTY) group. *Prenat Diagn* 1999;19:994-5.
 88. Hall JM, Lingenfelter P, Adams SL, Lasser D, Hansen JA, Bean MA. Detection of maternal cells in human umbilical cord blood using fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1995;86:2829-32.
 89. Lo YM, Lo ES, Watson N, et al. Two-way cell traffic between mother and fetus: Biologic and clinical implications. *Blood* 1996;88:4390-5.
 90. Socie G, Gluckman E, Carosella E, Brossard Y, Lafon C, Brison O. Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of two minisatellite sequences. *Blood* 1994;83:340-4.
 91. Petit T, Gluckman E, Carosella E, Brossard Y, Brison O, Socie G. A highly sensitive polymerase chain reaction method reveals the ubiquitous presence of maternal cells in human umbilical cord blood. *Exp Hematol* 1995;23:1601-5.
 92. Tyndall A, Gratwohl A. Microchimerism: Friend or foe? *Nat Med* 1998;4:386-8.
 93. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998;352:1904-5.
 94. Tutschek B, Reinhard J, Kogler G, Wernet P, Niederacher D. Clonal culture of fetal cells from maternal blood. *Lancet* 2000;356:1736-7.
 95. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Prenatal detection of fetal Down's syndrome from maternal plasma. *Lancet* 2000;356:1819-20.
 96. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 2001;47:41-6.
 97. Rodriguez de Alba M, Palomino P, Gonzalez-Gonzalez C, et al. Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: Practical comparative evaluation of the first and second trimesters. *Prenat Diagn* 2001;21:165-70.
 98. Gussin HA, Bischoff FZ, Hoffman R, Elias S. Endothelial precursor cells in the peripheral blood of pregnant women. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:357-61.
 99. Hoesli I, Danek M, Lin D, Li Y, Hahn S, Holzgreve W. Circulating erythroblasts in maternal blood are not elevated before onset of preterm labor. *Obstet Gynecol* 2002;100:992-6.
 100. Merchant FA, Castleman KR. Strategies for automated fetal cell screening. *Hum Reprod Update* 2002;8:509-21.
 101. O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, et al. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: Implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003;9:497-502.