

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΝΕΕΣ ΕΞΕΛΙΞΕΙΣ ΣΤΗ ΜΗ ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΗ
ΠΡΟΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

**ΣΤΑΜΑΤΙΑ ΖΟΥΡΔΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2011**

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ
ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΑΝΥΦΑΝΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ-ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛ.
Περίληψη.....	4
Εισαγωγή.....	5
1. Εμβρυϊκά Κύτταρα	
1.1 Τροφοβλαστικά.....	8
1.2 Λευκοκύτταρα	12
1.3 Εμπύρηνια ερυθρά αιμοσφαίρια	14
1.3.1 Μέθοδοι εμπλουτισμού εμβρυϊκών κυττάρων και Εφαρμογές	16
Φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας.....	16
Μέθοδος FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).....	18
Μέθοδος MACS (Magnetic Cell Sorting).....	18
Μέθοδος βασισμένη στη λεκτίνη.....	21
1.3.2 Ex vivo Καλλιέργεια Εμβρυϊκών Κυττάρων μητρικής κυκλοφορίας.....	22
1.3.3 Τα εμβρυϊκά NRBCs στο μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο σήμερα.....	24
1.3.4 Περιορισμοί στη χρήση εμβρυϊκών NRBCs.....	26
1.3.5 Μελλοντική προοπτική-Καλλιέργεια Αρχέγονων Ερυθροβλαστών για Επαγωγή Πολυδύναμων Βλαστικών Κυττάρων	27
2. Εμβρυϊκά Νουκλεϊκά Οξέα.....	31
2.1 Ελεύθερο Εμβρυϊκό DNA	
2.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά.....	31
2.1.2 Μέθοδοι εμπλουτισμού.....	34
2.1.3 Μάρτυρες εμβρυϊκού DNA	35
2.1.4 Κλινικές Εφαρμογές.....	37
Προσδιορισμός Φύλου.....	38
Προσδιορισμός Rhesus	40

Διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων	42
Θαλασσαιμίες.....	44
Κυστική Ίνωση.....	46
Huntington's, Αχονδροπλασία, Μυοτονική Δυστροφία	
Συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων	47
Ψηφιακή PCR- Σχετική Δόση Μετάλλαξης	48
Διάγνωση ανευπλοειδιών	50
A. Ψηφιακή PCR	50
A.1 Σχετική Χρωμοσωμική Δόση.....	51
A.2 Χρωμοσωμική Δόση μετά από ενίσχυση ειδικά	
μεθυλιωμένης περιοχής εμβρυϊκού DNA	53
B. Αναλογία μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε γονίδια	
με διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης μεταξύ μητέρας-εμβρύου.....	54
Γ. Μαζική παράλληλη αλληλούχιση.....	56
2.2 Εμβρυϊκό mRNA- Διάγνωση ανευπλοειδιών	59
Τελευταίες εξελίξεις στη μη επεμβατική προγεννητική	
διάγνωση	61
Συμπεράσματα	64
Βιβλιογραφία.....	66

Περίληψη

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση πραγματοποιείται με εμβρυϊκό υλικό που συλλέγεται με απλή αιμοληψία από το μητρικό πλάσμα χωρίς τον κίνδυνο αποβολών που ενέχουν μέθοδοι όπως η αμνιοπαρακέντηση και η λήψη χοριακών λαχνών. Το υλικό που συλλέγεται μπορεί να είναι εμβρυϊκά κύτταρα, ελεύθερο εμβρυϊκό DNA ή εμβρυϊκό mRNA.

Τύποι εμβρυϊκών κυττάρων που συναντώνται στη μητρική κυκλοφορία είναι τα τροφοβλαστικά, τα λευκοκύτταρα, τα εμπύρηνια ερυθροκύτταρα και διάφορα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα όπως μεσεγγυματικά (HMCs) και CD34+.

Τα εμπύρηνια ερυθροκύτταρα αποτελούν τον πιο σημαντικό κυτταρικό τύπο για χρήση στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση. Δεδομένης της χαμηλής τους συγκέντρωσης στη μητρική κυκλοφορία, μελετήθηκαν διάφορες μέθοδοι εμπλουτισμού στις οποίες περιλαμβάνονται η φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας και η κυτταρομετρία ροής (FACS, MACS) με χρήση αντισωμάτων για αντιγόνα επιφάνειας των κυττάρων. Ωστόσο, οι δυσκολίες που συναντώνται τόσο στην απομόνωσή τους όσο και στη μετέπειτα ανάλυσή τους με FISH και PCR δεν επέτρεψαν τη ευρεία χρήση τους στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση σήμερα.

Οι έρευνες έχουν στραφεί προς τη χρήση αρχέγονων εμβρυϊκών ερυθροβλαστών για την επαγωγή πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, με στόχο αφενός την καλλιέργειά τους ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των διαθέσιμων κυττάρων για προγεννητική διάγνωση και αφετέρου τη διαφοροποίησή τους για κυτταρική θεραπεία.

Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA χρησιμοποιείται σήμερα για προσδιορισμό φύλου, Rhesus και μονογονιδιακών ασθενειών σε κάποιες περιπτώσεις. Η τεχνολογία της ψηφιακής PCR αναμένεται να ανοίξει το δρόμο προς τη διάγνωση ανευπλοειδιών αλλά και μονογονιδιακών ασθενειών σε κάθε περίπτωση ανεξάρτητα από ομοιότητα μεταλλάξεων μεταξύ μητέρας-πατέρα. Τέλος η μέθοδος ανοσοκαθίζησης με αντισώματα για μεθυλιωμένο DNA, σε συνδυασμό με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου και τη βιοπληροφορική, έχει προοπτική να εφαρμοστεί στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση των κυριότερων ανευπλοειδιών χάρη στην υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά της (100%).

Εισαγωγή

Ο προγεννητικός έλεγχος είναι ένα σύνολο εξετάσεων που πραγματοποιούνται με σκοπό να διαπιστωθεί η υγεία του εμβρύου πριν τον τοκετό. Διακρίνεται σε επεμβατικό και μη επεμβατικό ανάλογα με την επιρροή που ασκείται στο έμβρυο κατά τη λήψη του εμβρυϊκού υλικού. Το υλικό που συλλέγεται ελέγχεται με FISH ή καρυότυπο για χρωμοσωμικές ανωμαλίες και PCR όταν πρόκειται για ασθένειες που οφείλονται σε μεταλλάξεις γονιδίων.

Σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο υποβάλλονται οι μέλλουσες μητέρες όταν α) είναι φορείς σοβαρών φυλοσύνδετων ασθενειών όπως της αιμοφιλίας, β) είναι άνω των 35 ετών, γ) στην οικογένεια υπάρχουν νοσήματα που οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες, δ) υπάρχει υποψία για αιμοσφαιρινοπάθεια, κυστική ίνωση ή κληρονομικά μεταβολικά νοσήματα, ή ε) οι γονείς ή/και το έμβρυο έχουν εκτεθεί σε μεταλλαξιογόνους παράγοντες.

Μέθοδοι επεμβατικού προγεννητικού ελέγχου αποτελούν η αμνιοπαρακέντηση, η λήψη χοριακών λαχνών και η ομφαλοκέντηση. Η αμνιοπαρακέντηση είναι μια διαδικασία κατά την οποία λαμβάνονται, καλλιεργούνται και ελέγχονται ζωντανά κύτταρα αμνιακού υγρού. Πραγματοποιείται μετά τη 15^η εβδομάδα της κύησης, συνήθως 17^η με 18^η, όταν το άμνιο (εσωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το έμβρυο) έχει ενωθεί με το χόριο (εξωτερική μεμβράνη) έτσι ώστε ο κίνδυνος αποβολής να είναι μικρότερος. Η εφαρμογή της ξεκίνησε από το 1968.

Αργότερα, το 1984, η λήψη χοριακών λαχνών αποδείχθηκε εναλλακτική μέθοδος προγεννητικού ελέγχου πρώτου τριμήνου, το ίδιο ασφαλής με την αμνιοπαρακέντηση (Kuliev *et al.*, 1993). Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κατά την 11^η με 14^η εβδομάδα, δίνοντας τη δυνατότητα γρηγορότερης διάγνωσης σε σχέση με την αμνιοπαρακέντηση και επιτρέποντας πρόωμη και ασφαλέστερη διακοπή της εγκυμοσύνης.

Μειονέκτημα των παραπάνω επεμβατικών μεθόδων είναι ο κίνδυνος αποβολής του εμβρύου που αγγίζει το 1% (Mujezinovic and Alfirevic, 2007).

Στο Ηνωμένο Βασίλειο την περίοδο 2002-2003, από τις ~700.000 έγκυες γυναίκες, γύρω στις 30.000 υποβλήθηκαν σε αμνιοπαρακέντηση και 8.000 σε λήψη χοριακών λαχνών, που είχαν ως αποτέλεσμα 460 αποβολές υγιών εμβρύων (Human Genetics Commission, 2004).

Δεδομένου του κινδύνου αποβολής που ενέχουν αυτές οι διαδικασίες, όταν πρόκειται για έλεγχο ανευπλοειδιών χρησιμοποιούνται πρώτα κάποιοι screening δείκτες που καθορίζουν ποιά περιστατικά έχουν υψηλό κίνδυνο γέννησης παιδιού με χρωμοσωμική ανωμαλία και αυτά μόνο υποβάλλονται σε αμνιοπαρακέντηση ή λήψη χοριακών λαχνών.

Το υπερηχογράφημα που πραγματοποιείται κατά το 1^ο τρίμηνο της κύησης (εβδομάδα 11^η – 13^η + 6 ημέρες) αποτελεί μια μη επεμβατική μέθοδο προγεννητικού ελέγχου που δείχνει πιθανότητα γέννησης παιδιού με χρωμοσωμικές ανωμαλίες και άλλες συγγενείς ανωμαλίες.

Στο υπερηχογράφημα αυτό είναι δυνατό να ελεγχθούν η αυχενική διαφάνεια, η παρουσία ή όχι ρινικού οστού, η ροή του φλεβώδους πόρου, η ανεπάρκεια τριγλώχινος, η καρδιακή συχνότητα, το κεφαλοουραίο μήκος (CRL) και άλλα.

Συγκεκριμένα, η αυχενική διαφάνεια (NT-Nuchal Translucency) σε συνδυασμό με την ηλικία της μητέρας δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης εμβρύων με τρισωμία 21 σε ποσοστό 77% με ποσοστό ψευδώς θετικών (FPR-False Positive Rate) 5% (Snijders *et al.*, 1998). Το ποσοστό αυτό μπορεί να φτάσει το 90% (FPR: 5%) αν συνεκτιμηθούν η μέτρηση της β- χοριακής (β-hCG) και της PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A) στον ορό του αίματος της μητέρας (Cicero *et al.*, 2006). Έχει βρεθεί ότι σε περιπτώσεις τρισωμίας 21 η ελεύθερη β-hCG είναι αυξημένη ενώ η PAPP-A μειωμένη (Nicolaidis *et al.*, 2005).

Απουσία του ρινικού οστού έχει βρεθεί σε 65% των εμβρύων με τρισωμία 21 και σε 1% των φυσιολογικών εμβρύων (Cicero *et al.*, 2001), ενώ ανεπάρκεια τριγλώχινος έχει εντοπιστεί σε 62% εμβρύων με τρισωμία 21 και 8% των φυσιολογικών (Faiola *et al.*, 2005).

Ο συνδυασμός αυχενικής διαφάνειας με βιοχημικούς δείκτες έχει χρησιμοποιηθεί για διάγνωση και άλλων ανευπλοειδιών όπως της τρισωμίας 18 και 13 και του συνδρόμου Turner.

Επιπλέον αύξηση στην καρδιακή συχνότητα του εμβρύου και ολοπροσεγκεφαλία έχουν συσχετιστεί με κίνδυνο για τρισωμία 13, ενώ μείωση στην καρδιακή συχνότητα και στο κεφαλοουραίο μήκος με τρισωμία 18 (Nicolaidis *et al.*, 2005).

Ωστόσο κανένας υπερηχογραφικός ή βιοχημικός δείκτης δεν αποτελεί διάγνωση. Στόχος της έρευνας είναι η εύρεση ασφαλέστερων τεχνικών προγεννητικού ελέγχου με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα αλλά και εφικτές από οικονομικής πλευράς.

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στον μη επεμβατικό προγεννητικό με τη χρήση εμβρυϊκού υλικού που κυκλοφορεί στο μητρικό αίμα. Εμβρυϊκά κύτταρα και νουκλεϊκά οξέα αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης για διάγνωση φύλου, Rhesus, μονογονιδιακών ασθενειών και ανευπλοειδιών.

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής είναι να παρουσιάσει τις νέες εξελίξεις στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μέσω μιας ανασκόπησης στους βασικούς σταθμούς της έρευνας που οδήγησαν σε ό,τι έχει επιτευχθεί μέχρι σήμερα.

1. Εμβρυϊκά κύτταρα

1.1 Τροφοβλαστικά

Η παρουσία τροφοβλαστικών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία είναι γνωστή από το **1893** όταν ο Γερμανός παθολόγος **Schmorl** ταυτοποίησε τροφοβλαστικά κύτταρα σε παθολογοανατομικά παρασκευάσματα από πνεύμονες εγκύων που πέθαναν από προεκλαμψία. Αργότερα, το 1959 οι Douglas *et al.*, εντόπισαν τροφοβλάστες στο μητρικό αίμα χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο. Ωστόσο ο περιορισμένος αριθμός τροφοβλαστών που υπάρχουν φυσιολογικά στη μητρική κυκλοφορία καθιστά δύσκολη την επαναληψιμότητα αυτών των ευρημάτων.

Η χρήση τροφοβλαστικών κυττάρων στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση είναι περιορισμένη εξαιτίας των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων τους. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα εξής :

- Τα τροφοβλαστικά είναι μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα που παγιδεύονται στους πνεύμονες και απομακρύνονται γρήγορα από τη μητρική κυκλοφορία (Benirschke K. *et al.*, 1994). Το γνώρισμα αυτό καθιστά δύσκολη την εφαρμογή της τεχνικής FISH για διάγνωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών.
- Ο αριθμός τους στη μητρική κυκλοφορία είναι περιορισμένος.
- Υπάρχει έλλειψη ειδικών αντισωμάτων για την ανίχνευσή τους (Bertero *et al.*, 1988; Covone *et al.*, 1988).
- Τέλος το φαινόμενο μωσαϊσμού του πλακούντα (ο καρυότυπος από το 1% των κυττάρων του πλακούντα διαφέρει από αυτόν του εμβρύου) που μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στη σωστή προγεννητική διάγνωση (Henderson *et al.*, 1996; Goldberg and Wohlferd, 1997).

Εφαρμογές

Μικρός αριθμός ερευνητών έχει χρησιμοποιήσει τα τροφοβλαστικά κύτταρα ως πηγή εμβρυϊκού κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία ενώ υπάρχουν αναφορές μη επιτυχημένης απομόνωσής τους. Στον Πίνακα 1 παρατίθενται οι ανάλογες εφαρμογές. όπου φαίνεται ότι τα ποσοστά επιτυχούς διάγνωσης φύλου σε κάποιες περιπτώσεις δεν ξεπερνούν το 39%.

Πίνακας 1. Εφαρμογές χρήσης τροφοβλαστικών κυττάρων στη μη επεμβατική διάγνωση.

Αναφορά	Μέθοδος απομόνωσης	Διάγνωση
Mueller <i>et al.</i>, 1990	Μονοκλωνικά αντισώματα (mAb) από ποντικό	Επιτυχής διάγνωση φύλου σε 12/13 (PCR-Y)
Bruch <i>et al.</i>, 1991	Αποτυχία απομόνωσης μετά από χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων GB17, GB21 και GB25	–
Cacheux <i>et al.</i>, 1992	Αντισώματα GB25 και GB17	Διάγνωση εμβρύου με τρισωμία 47,XYΥ με FISH
Hawes <i>et al.</i>, 1994	Μίγμα mAbs	Επιτυχής εντοπισμός μετάλλαξης στην εμβρυική β αιμοσφαιρίνη
Durrant <i>et al.</i>, 1996	Μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb)	Επιτυχής διάγνωση φύλου σε ποσοστό 39%

Διατραχηλική Απομόνωση Τροφοβλαστικών Κυττάρων

Σήμερα η χρήση τροφοβλαστικών κυττάρων από την μητρική κυκλοφορία δεν ενδείκνυται. Ωστόσο μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί στη διατραχηλική απομόνωση τροφοβλαστικών κυττάρων και στη μετέπειτα χρήση τους στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση.

Πρόκειται για ελάχιστα επεμβατικές μεθόδους που πραγματοποιούνται κατά το 1^ο τρίμηνο της κύησης (6-14 εβδομάδες), ακόμα και 5^η εβδομάδα (Cioni *et al.*, 2005) και περιλαμβάνουν αναρρόφηση τραχηλικής βλέννης, επιχρίσματα τραχήλου, πλύσεις τραχήλου και ενδομητρίου (Imudia *et al.*, 2010).

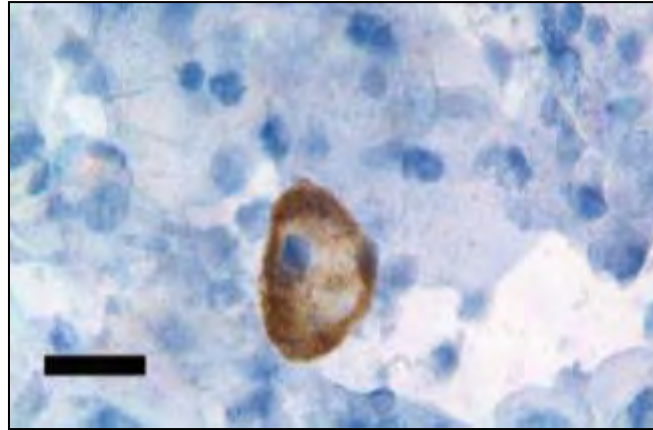
Τα ποσοστά ανίχνευσης τροφοβλαστικών κυττάρων στο δείγμα που λαμβάνεται διατραχηλικά (TCC-TransCervical Cells) εξαρτώνται από την ηλικία κύησης, τη μέθοδο συλλογής, τη μεταβλητότητα του χειριστή, την ευαισθησία ανίχνευσης και την κατάσταση της εγκυμοσύνης και ποικίλλουν από 40-90%. Στον Πίνακα 2 αναφέρονται μέθοδοι διακοπικής λήψης κυττάρων και τα αντίστοιχα ποσοστά % ανίχνευσης εμβρυϊκών κυττάρων στο σύνολο του δείγματος (TCC).

Πίνακας 2. Σύγκριση των διαφορετικών μεθόδων διατραχηλικής λήψης κυττάρων (Imudia *et al.*, 2010)

Μέθοδος	Περιγραφή	% TCC δείγματος με εμβρυϊκά κύτταρα	Αναφορές
Antenatal cell extractor	Ξέπλυμα ενδοτραχηλικού καναλιού με φυσιολογικό ορό για ανάκτηση εμβρυϊκών κυττάρων	50%	Goldberg <i>et al.</i> , 1980; Rhine <i>et al.</i> , 1975, 1977
Διατραχηλικό επίχρισμα με βουρτσάκι	Τοποθετείται ενδοτραχηλικά βουρτσάκι 2-3 cm, περιστρέφεται 360 ⁰ και κατόπιν αποσύρεται για να ληφθεί τραχηλική βλέννη	96,7% 23,9%* 95%	Cioni <i>et al.</i> , 2005; Fejgin <i>et al.</i> , 2001; Imudia <i>et al.</i> , 2009
Αναρρόφηση με Pipelle De Cornier and Aspiracath	Εισαγωγή της Pipelle ή του Aspiracath στον τράχηλο για αναρρόφηση βλέννης από το τραχηλικό κανάλι πριν από διακοπή κύησης μετά από επιλογή	50%	Katz-Jaffe <i>et al.</i> , 2005
Ενδοτραχηλικό ξέπλυμα	Εφαρμογή ενός ελαστικού πλαστικού καθετήρα συνδεδεμένου με σύριγγα 10 cc στον ενδοτράχηλο ο οποίος πλένεται και το περιεχόμενο αναρροφάται αμέσως πίσω για ανάκτηση κυτταρικού περιεχομένου	83,3% 50% 59,2%	Bulmer <i>et al.</i> , 2003; ErgIn <i>et al.</i> , 2001; Fang <i>et al.</i> , 2005; Bahado-Singh <i>et al.</i> , 1995
Ενδομητρικό ξέπλυμα με ή χωρίς υπερηχογραφική καθοδήγηση	Λεπτός εύκαμπτος πλαστικός καθετήρας συνδεδεμένος με σύριγγα 10 cc εισάγεται στη μήτρα διαμέσου του τραχήλου, γίνεται έκχυση 5 cc φυσιολογικού ορού και προσεκτική αναρρόφηση του περιεχομένου	84,8% 82% 92,3% με υπερηχογραφική καθοδήγηση	Cioni <i>et al.</i> , 2005; ErgIn <i>et al.</i> , 2001; Bussani <i>et al.</i> , 2007

Από τον Πίνακα 2 φαίνεται ότι καλύτερα ποσοστά απομόνωσης εμβρυϊκών κυττάρων επιτυγχάνονται με χρήση τραχηλικού επιχρίσματος με βουρτσάκι και ξέπλυμα ενδομητρίου υπό υπερηχογραφική καθοδήγηση.

Μετά την απομόνωσή τους τα δείγματα μπορούν να υποστούν ή όχι επεξεργασία με βλεννολυτικά για πέψη της βλέννης και ευκολότερη αναγνώριση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Η περαιτέρω ανάλυση των κυττάρων περιλαμβάνει Α) είτε χρώση με ανοσοϊστοχημεία για αναγνώριση των τροφοβλαστικών κυττάρων (Εικόνα 1) Β) είτε μικροχειρισμούς ή Leiser για απομόνωση των εμβρυϊκών κυττάρων και εφαρμογή FISH ή PCR.



Εικόνα 1. HLA-G θετικό κυτοτροφοβλαστικό κύτταρο σε διατραχηλικό δείγμα. Η αντικειμενοφόρος ετοιμάστηκε όπως περιγράφεται από τους Imudia *et al.* (2009) από δείγμα που λήφθηκε κατά το 1^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα G233 ενάντια στο HLA-G και δεύτερο αντίσωμα συζευγμένο με υπεροξειδάση για την παραγωγή καφέ χρώματος γύρω από το κυτοτροφοβλαστικό κύτταρο. Counterstaining με αιματοξυλίνη αποκαλύπτει τον πυρήνα του κυττάρου (μπλε). Μπάρα : 20 μm. (Imudia *et al.*, 2010)

A) Ανοσοϊστοχημεία

Η αναγνώριση τροφοβλαστικών κυττάρων με ανοσοϊστοχημεία είναι χρήσιμη στη διάγνωση έκτοπης κύησης (**Ectopic Pregnancy**) και κατεστραμμένου ωαρίου (**Blighted Ovum**). Έχει βρεθεί ότι μετά από λήψη με βουρτσάκι ανιχνεύονται 4 φορές ($P < 0.001$) περισσότερα τροφοβλαστικά σε EP και BO σε σχέση με τις φυσιολογικές όπου η αναλογία είναι 1/2000. (Imudia *et al.*, 2009). Η ευαισθησία της μεθόδου στη διάκριση των κυήσεων είναι 93% ενώ η ειδικότητα 95%.

B) Γενετική Ανάλυση με FISH και PCR

Η επιτυχής διάγνωση φύλου μετά από απομόνωση τροφοβλαστικών κυττάρων με πλύση ενδομητρίου (IUL-Intrauterine Lavage) αγγίζει το 91% με εφαρμογή διπλής FISH, και το 95,5% με PCR (Bussani *et al.*, 2002).

Η διατραχηλική λήψη εμβρυϊκών κυττάρων (TCC sampling) έχει εφαρμοσθεί επιτυχώς στον προσδιορισμό Rhesus του εμβρύου σε μητέρες με Rh(D)- αρνητικό (Adinolfi *et al.*, 1997), όπως επίσης και σε screening για θαλασσαιμία και δρεπανοκυττατική αναιμία (Adinolfi *et al.*, 1997).

Τέλος, η QF-PCR έχει χρησιμοποιηθεί για διάγνωση ανευπλοειδιών (13, 18, 21, X και Y) από τους Bussani et al. (2007) οι οποίοι απομόνωσαν εμβρυικά κύτταρα μετά από πλύση ενδομητρίου (IUL).

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία για τη χρήση των κυττάρων από διατραχηλική απομόνωση (TCC- TransCervical-Cell) στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση είναι σε πειραματικό στάδιο. Τα δεδομένα όμως δείχνουν ότι με την βελτίωση και την τυποποίηση των εργαστηριακών τεχνικών υπάρχει μια άριστη δυνατότητα να εξελιχθεί σε χρήσιμο εργαλείο τόσο για γενετική διάγνωση όσο και για την έκβαση της εγκυμοσύνης.

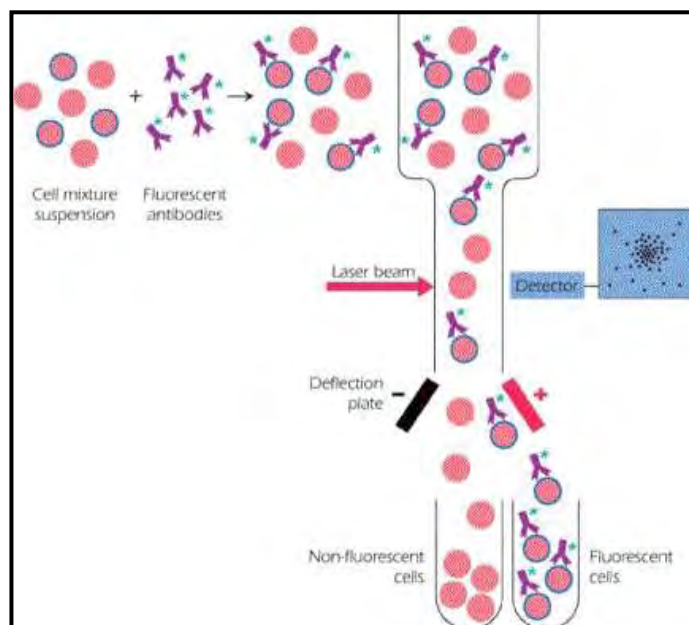
1.2 Λευκοκύτταρα

Παρόλο που ο Schmorl ανακάλυψε την παρουσία τροφοβλαστών στη μητρική κυκλοφορία σχεδόν έναν αιώνα πριν, η χρήση εμβρυικών κυττάρων στην προγεννητική διάγνωση δεν ήταν εφικτή έως το **1969** όταν οι **Walknowska et al.** παρατήρησαν κύτταρα με 46, XY καρυότυπο σε καλλιέργειες λεμφοκυττάρων από 21 έγκυες γυναίκες, 19 από τις οποίες γέννησαν επιτυχώς αγοράκια. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε στις αρχές του 1970 και από άλλους ερευνητές που απέδειξαν την παρουσία Y χρωματίνης εντός κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία εγκύων γυναικών που κυοφορούσαν αρσενικά έμβρυα (Schroder and De la Chapelle, 1972; Grosset et al., 1974). Ωστόσο χρειάζεται να αναλυθούν εκατοντάδες μητρικά κύτταρα για να αναφερθεί η παρουσία μερικών απλά εμβρυικών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία, μια εντατική εργαστηριακή διαδικασία.

Συνεπώς, στις παραπάνω μελέτες ήταν αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι εμπλουτισμού των εμβρυικών κυττάρων για ανίχνευσή τους. Στις μεθόδους αυτές περιλαμβάνονται η χρήση νάιλον-μάλλινης στήλης και η επιλεκτική καλλιέργεια κυττάρων.

Οι Herzenberg et al. (1979) και Iverson et al. (1981) ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν διαχωρισμό κυττάρων με κυτταρομετρία ροής βασισμένο σε φθορισμό (FACS-Fluorescence Activated Cell Sorting) για να εμπλουτίσουν επιτυχώς εμβρυικά λευκοκύτταρα από μητρική κυκλοφορία (Εικόνα 2). Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται αντισώματα συνδεδεμένα με χρωστική που αναγνωρίζουν ειδικά πατρικά αντιγόνα ιστοσυμβατότητας στην επιφάνεια των λευκοκυττάρων.

Στη συνέχεια ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται βάσει συστήματος που εντοπίζει τα κύτταρα που φθορίζουν.



Εικόνα 2. Μέθοδος διαχωρισμού κυττάρων βασισμένη σε φθορισμό- FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Τα κύτταρα αναμειγνύονται με αντισώματα ειδικά για αντιγόνα της επιφάνειας των επιθυμητών κυττάρων. Τα αντισώματα είναι συνδεδεμένα με φθορίζουσα χρωστική βάση της οποίας επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής.

Η ομάδα αυτή έδειξε μια σημαντική συσχέτιση μεταξύ αρσενικών εμβρύων και ανθρώπινου λευκοκυτταρικού αντιγόνου HLA-A2 με ανίχνευση Y χρωμοσώματος σε flow-sorted κύτταρα.

Η μέθοδος αυτή, η οποία απαιτεί προσδιορισμό των HLA αντιγόνων του πατέρα, επιβεβαιώθηκε σε μεταγενέστερη μελέτη με χρήση PCR κατά την οποία πολλαπλασιάστηκαν ειδικές για το Y χρωμόσωμα αλληλουχίες μετά από flow-sorting βασισμένο σε πατρικούς HLA πολυμορφισμούς (Sargent *et al.*, 1994).

Ωστόσο άλλες ομάδες ερευνητών είχαν περιορισμένη επιτυχία εφαρμόζοντας την ίδια μέθοδο, ακόμα μετά από επιλογή με μονοκλωνικά αντισώματα βασισμένη σε αρκετές HLA διαφορές. Για παράδειγμα μια έρευνα βρήκε μόνο 18 HLA πληροφοριακά ζευγάρια μεταξύ 78 που ελέγχθηκαν (Tharapel *et al.*, 1993).

Τα εμβρυικά λευκοκύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται *in vitro*, γεγονός που προκάλεσε ενδιαφέρον για τη χρήση τους στον προγεννητικό έλεγχο.

Ωστόσο η ιδιότητά τους αυτή δείχνει ότι θα μπορούσαν να πολλαπλασιάζονται και *in vivo* σε διάφορα μητρικά όργανα, κάτι που θα οδηγούσε σε λανθασμένες διαγνώσεις σε περιπτώσεις που οι γυναίκες είχαν γεννήσει τουλάχιστον μια φορά στο παρελθόν.

Το βασικότερο **μειονέκτημα** των εμβρυϊκών λευκοκυττάρων είναι η **μεγάλη διάρκεια ζωής** τους. Οι Schroder *et al.* (1974) υπολόγισαν ότι εμβρυϊκά λευκοκύτταρα μπορούν να εντοπιστούν στη μητρική κυκλοφορία ακόμα και μετά από 1 χρόνο μετά τη γέννα. Το τελευταίο προσδιορίστηκε μετά από διέγερση λευκοκυττάρων με μιτογόνα προκειμένου εντοπίσουν Y χρωματίνη σε γυναίκα που είχε γεννήσει αγόρι. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και από άλλους επιστήμονες οι οποίοι έδειξαν ότι σε κάποιες περιπτώσεις λευκοκύτταρα είναι δυνατόν να εντοπιστούν μετά το πέρας 5 ακόμα και 6 ετών από τη γέννα (T lymphocytes-CD 3+, 4+, 5+) (Ciaranfi *et al.*, 1977; Hsieh *et al.*, 1993; Liou *et al.*, 1994).

Αξίζει να αναφερθεί ότι εμβρυϊκά πρόδρομα κύτταρα CD34+ και CD38+ έχουν αναγνωριστεί με τη μέθοδο εμπλουτισμού FACS και η παρουσία τους στη μητρική κυκλοφορία έχει επιβεβαιωθεί και 27 χρόνια μετά τη γέννα (Bianchi *et al.*, 1996).

Όλες αυτές οι έρευνες δείχνουν ότι **τα λευκοκύτταρα δεν προτιμούνται για διαχωρισμό και διάγνωση**. Κατά την μελέτη εμβρυϊκών κυττάρων μητρικής κυκλοφορίας για προγεννητική διάγνωση πρέπει να χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι με μικρή διάρκεια ζωής.

1.3 Εμβρυϊκά ερυθροκύτταρα/ εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια (NRBCs)

Η παρουσία ανώριμων ερυθροκυττάρων στη μητρική κυκλοφορία δείχθηκε για πρώτη φορά από τους Kleihauer *et al.* (1957) με χρήση μιας νέας μεθόδου χρώσης. Τα NRBCs (Nucleated Red Blood Cells) είναι μονοπύρηννα και σχετικά καλά διαφοροποιημένα κύτταρα. Μπορούν να ανιχνευτούν νωρίς στην εγκυμοσύνη καθώς είναι από τις πρώτες αιμοποιητικές σειρές που σχηματίζονται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και είναι άφθονα στην εμβρυϊκή κυκλοφορία από την αρχή της κύησης (Ganshirt *et al.*, 1994). Το σημαντικότερο πλεονέκτημα που έχουν σε αντίθεση με τα λευκοκύτταρα είναι η μικρή διάρκεια ζωής τους (25-35 ημέρες) (Pearson *et al.*, 1967).

Αυτό οφείλεται στην περιορισμένη πολλαπλασιαστική ικανότητά τους, κάτι που καθιστά αδύνατη την παραμονή τους στο μητρικό πλάσμα καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης. Τα χαρακτηριστικά αυτά έκριναν κατάλληλη τη χρήση των NRBCs στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση.

Αριθμός εμβρυικών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία

Η απομόνωση εμβρυικών κυττάρων από τη μητρική κυκλοφορία παρουσιάζει σημαντικές προκλήσεις, δεδομένου ότι ο αριθμός αυτών των κυττάρων είναι πολύ περιορισμένος. Υπολογίζεται ότι η συχνότητα των εμβρυικών κυττάρων στο μητρικό αίμα ποικίλλει από 1 στα 10^5 - 10^9 με μεγαλύτερη τιμή 1 στα 10^4 προς το τέλος της κύησης (Ganshirt-Ahlert *et al.*, 1990; Price *et al.*, 1991). Ωστόσο οι αριθμοί αυτοί είναι δυνατόν να αυξηθούν σε κάποιες περιπτώσεις.

Οι Clayton *et al.* (1964) ήταν η πρώτη ερευνητική ομάδα που παρατήρησε ότι η συχνότητα των NRBCs αυξάνεται όταν υπάρχει α). Rhesus ασυμβατότητα, κάτι που επιβεβαιώθηκε μεταγενέστερα και από τους Nelson *et al.* (1998), β). μετά την αμνιοπαρακέντηση αλλά και γ). με τον τερματισμό της κύησης.

Αργότερα άλλοι ερευνητές συσχέτισαν την αύξηση στον αριθμό εμβρυικών κυττάρων που ανακτώνται, με ανευπλοειδία στο έμβρυο (Bianchi *et al.*, 1997; Ganshirt *et al.*, 1994). Αυτό πιθανώς οφείλεται στην δομή του πλακούντα σε εγκυμοσύνες με ανευπλοειδικό έμβρυο (Rochelson *et al.*, 1990; Kuhlmann *et al.*, 1990). Επίσης μπορεί να σχετίζεται με το μέγεθος των ερυθροκυττάρων που διαφέρει από το αντίστοιχο σε περιστατικά κυτογενετικά φυσιολογικά της ίδιας ηλικίας κύησης (Sipes *et al.*, 1991).

Τέλος ο αριθμός των εμβρυικών κυττάρων αυξάνεται στην προεκλαμψία και πιθανώς στην πολλαπλή κύηση, σε επιπλοκές όπως ο διαβήτης ή η αιμορραγία και σε αυτοάνοσα όπως το σκληρόδερμα (Nelson *et al.*, 1998).

1.3.1 Μέθοδοι εμπλουτισμού εμβρυϊκών κυττάρων και Εφαρμογές

Ο περιορισμένος αριθμός των εμβρυϊκών NRBCs στη μητρική κυκλοφορία έκρινε απαραίτητη την εύρεση και χρήση μεθόδων εμπλουτισμού προκειμένου να απομονωθεί επαρκής ποσότητα κυττάρων για περαιτέρω γενετικές αναλύσεις. Στις μεθόδους αυτές περιλαμβάνονται :

Πίνακας 3. Μέθοδοι εμπλουτισμού εμβρυϊκών κυττάρων

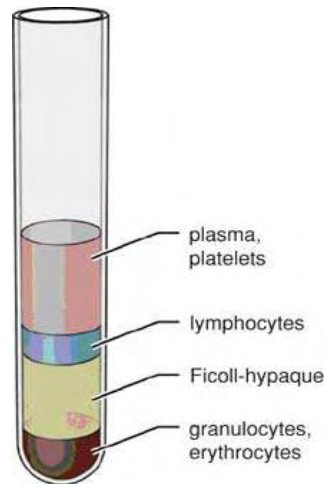
❖ Φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας
❖ FACS (Fluorescence Activated Cell-Sorting)
❖ MACS (Magnetic Cell Sorting)
❖ Μέθοδος βασισμένη στη λεκτίνη
❖ Επιλεκτική λύση ερυθροκυττάρων
❖ Διαχωρισμός ροής βασισμένος στη χαρακτηριστικά φορτισμένη πυκνότητα της επιφάνειας των κυττάρων (charge flow separation-CFS)

Από τις παραπάνω μεθόδους η επιλεκτική λύση ερυθροκυττάρων δεν επιτεύχθηκε, ενώ ο διαχωρισμός ροής βασισμένος στη χαρακτηριστικά φορτισμένη πυκνότητα της επιφάνειας των κυττάρων δεν χρησιμοποιείται.

Σύμφωνα με τους Wachtel et al., (1996,1998) με την τελευταία μέθοδο ανακτήθηκαν 2000 NRBCs/ 20 ml δείγματος, από τα οποία μόνο το 30% ήταν εμβρυϊκά. Επίσης η ομάδα αυτή πέτυχε προσδιορισμό φύλου με τα απομονωθέντα κύτταρα σε 4/6 αρρενα εφαρμόζοντας PCR για ενίσχυση αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος.

Φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας

Για την αποτελεσματική απομόνωση των NRBCs πολύ σημαντικό βήμα είναι η απομάκρυνση των υπόλοιπων τύπων κυττάρων του αίματος. Ήδη από τις αρχές του 1990 χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος διαχωρισμού η φυγοκέντρηση σε διαλύματα με διάφορες πυκνότητες.



Εικόνα 3. Διαχωρισμός συστατικών αίματος με χρήση Ficoll. Μετά τη φυγοκέντρωση, τα κύτταρα διαχωρίζονται με βάση την πυκνότητά τους και σχηματίζουν στρώματα. Τα ερυθροκύτταρα που έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από τα λεμφοκύτταρα παρατηρούνται κάτω από το στρώμα της Ficoll ενώ τα λεμφοκύτταρα πάνω αυτό. Έτσι μπορεί να γίνει απομόνωση του επιθυμητού κυτταρικού τύπου. (Fuss *et al.*, 2009)

Το 1993 οι Bhat *et al.*, έδειξαν ότι επιτυγχάνεται 25 φορές καλύτερη απομόνωση NRBCs με χρήση διαλύματος τριπλής πυκνότητας. Αργότερα οι Takabayashi *et al.* (1995) χρησιμοποίησαν ασυνεχή διαλύματα Percoll (1,075 g/ml και 1,085 g/ml) για να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός. Στη συνέχεια με χρώση May-Giemsa υπολόγισαν τον αριθμό απομονωθέντων NRBCs σε 4,1 NRBC/δείγμα, ενώ πέτυχαν διάγνωση φύλου σε 10/11 περιπτώσεις (ποσοστό 90%). Εκτός από την Percoll έχει χρησιμοποιηθεί και η Ficoll 1119 στο διαχωρισμό κυττάρων με φυγοκέντρωση (Troeger *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2001).

Το 2000 οι Samura *et al.*, χρησιμοποιώντας διάλυμα πυκνότητας 1,119 g/ml απομόνωσαν διπλάσιο αριθμό NRBCs από τον αντίστοιχο με χρήση διαλύματος με πυκνότητα 1,090 g/ml.

Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι τα NRBCs είναι πυκνότερα από λευκοκύτταρα (Voullarie *et al.*, 2001) και επομένως καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται με μεγαλύτερης πυκνότητας διαλύματα.

Η φυγοκέντρωση διαβαθμισμένης πυκνότητας χρησιμοποιείται ως πρώτο βήμα στα περισσότερα πρωτόκολλα εμπλουτισμού. Ωστόσο σε αυτή τη διαδικασία είναι δυνατόν να χαθεί ένα ποσοστό 3-4% των επιθυμητών κυττάρων (Oosterwijk *et al.*, 1998).

Μέθοδος FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)

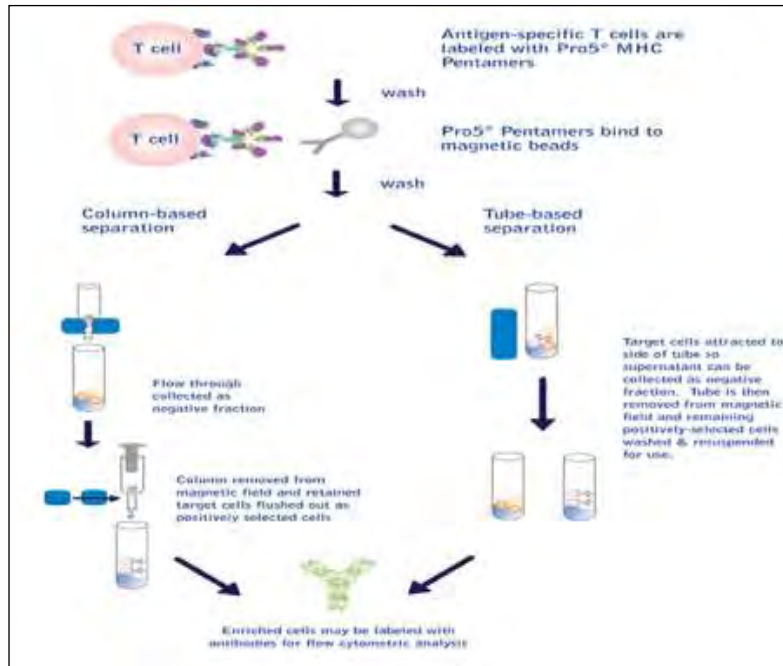
Η μέθοδος FACS (Εικόνα 2) εφαρμόστηκε αρχικά στον εμπλουτισμό λευκοκυττάρων (Herzenberg *et al.*, 1979; Iverson *et al.*, 1981). Το 1990 οι Bianchi *et al.* επέκτειναν τη χρήση της μεθόδου και στα NRBC χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ενάντια στον υποδοχέα της τρανσφερίνης (CD71) που εκφράζεται σημαντικά στους ερυθροβλάστες. Μετά την απομόνωση χρησιμοποίησαν PCR για να ενισχύσουν αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος και πέτυχαν προσδιορισμό φύλου σε ποσοστό 75%.

Από τότε ανάλογες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τη δυνατότητα αυτή χρησιμοποιώντας διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα αλλά και τεχνικές εμπλουτισμού (Price *et al.*, 1991; Wachtel *et al.*, 1991; Von Koskull *et al.*, 1995). Οι Price *et al.*, (1991) ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν διάγνωση τρισωμίας 21 με εφαρμογή της FISH σε NRBCs που απομονώθηκαν από τη μητρική κυκλοφορία. Η ομάδα αυτή χρησιμοποίησε συγκεκριμένη χρώση για γ-αιμογλοβίνη που υπάρχει μόνο στα εμβρυικά NRBCs.

Η καθαρότητα των ανακτώμενων NRBCs βελτιώθηκε αργότερα με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ενάντια στη γ-αιμοσφαιρίνη (DeMaria *et al.*, 1996; Sekizawa *et al.*, 1999).

Μέθοδος MACS (MAGnetic Cell Sorting)

Ο διαχωρισμός κυττάρων με μαγνητισμό βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με μαγνητικά σωματίδια. Τα αντισώματα συνδέονται με τα αντιγόνα της επιφάνειας των επιθυμητών κυττάρων και στη συνέχεια τα κύτταρα είτε κατακρατούνται σε στήλη με χρήση μαγνήτη και λαμβάνονται μετά από ξέπλυμα είτε έλκονται από μαγνήτη στον πυθμένα και επιλέγονται μετά από αφαίρεση του υπερκείμενου (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Μέθοδος εμπλουτισμού MACS (Magnetic Cell Sorting). Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων συνδεδεμένων με μαγνητικά σωματίδια. Τα κύτταρα στα οποία συνδέθηκαν τα αντισώματα επιλέγονται με τη βοήθεια μαγνήτη είτε με κατακράτηση στη στήλη και ξέπλυμα είτε με προσκόλλησή τους στον πυθμένα και αφαίρεση του υπερκείμενου ώστε να παραμείνουν μόνο τα επιθυμητά κύτταρα. (proimmune.com)

Το 1990 οι Miltenyi *et al.* εφάρμοσαν πρώτη φορά αυτή την τεχνική χρησιμοποιώντας αντίσωμα για τον CD71. Αργότερα οι Ganshirt-Ahlert *et al.* πραγματοποίησαν συνδυασμό διαβαθμισμένης φυγοκέντρησης πυκνότητας με MACS και FISH για διάγνωση τρισωμίας 21 και 18 (Ganshirt-Ahlert *et al.*, 1993).

Εκτός από αντίσωμα για τον CD71, έχουν χρησιμοποιηθεί αντισώματα και για άλλα αντιγόνα επιφάνειας των ερυθροκυττάρων όπως η γλυκοφορίνη A (GPA) (Bigbee *et al.*, 1994) και ο CD45. Οι Busch *et al.*, (1994) μάλιστα εφάρμοσαν διπλή MACS, χρησιμοποιώντας αρχικά αντίσωμα για το CD45 και στη συνέχεια για το CD71.

Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί συνδυασμός φυγοκέντρησης με FACS που ακολουθούνται από MACS (Sekizawa *et al.*, 1999). Με τα απομονωθέντα κύτταρα επιτεύχθηκε προσδιορισμός φύλου και Rhesus του εμβρύου.

Οι επιτυχημένες αυτές προσπάθειες στον εμπλουτισμό των NRBC και τον προσδιορισμό ανωμαλιών στο έμβρυο δείχνουν την δυνατότητα χρήσης των NRBC στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο.

Στα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής συγκαταλέγονται το γεγονός ότι είναι γρήγορη και έχει χαμηλό κόστος. Επίσης μπορεί να πραγματοποιηθεί στα περισσότερα εργαστήρια χωρίς εξειδικευμένο προσωπικό ενώ δεν απαιτεί υψηλό κόστος συντήρησης (Ho *et al.*, 2003).

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου σχετίζονται με την καθαρότητα των NRBCs που ανακτώνται αλλά και με την απώλεια κυττάρων σε ποσοστό 10-20% είτε λόγω κατακράτησης στη στήλη είτε κατά τη διάρκεια των πλύσεων (Oosterwijk *et al.*, 1998; Babochkina *et al.*, 2005)

Σύγκριση μεθόδων MACS-FACS και εφαρμογές

Μεταξύ 1995-1999 πραγματοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής μεγάλης κλίμακας έρευνα στην οποία συμμετείχαν 9 ακαδημαϊκά κέντρα (8 σε USA, 1 στη Σουηδία).

Η έρευνα αυτή χρηματοδοτήθηκε από το NIFTY (**National Institute of Child Health and Human Development Fetal Cell Isolation Study**) με σκοπό να εκτιμηθεί η ακρίβεια των κυτογενετικών μεθόδων στον προσδιορισμό φύλου και ανευπλοειδιών σε εμβρυϊκά NRBCs που εμπλουτίστηκαν με FACS ή MACS. Η ακρίβεια των μεθόδων καθορίστηκε μετά από σύγκριση με τα αποτελέσματα από αμνιοπαρακέντηση και λήψη χοριακών λαχνών.

Εξετάστηκαν 2700 δείγματα αίματος από γυναίκες >35 ετών ή γυναίκες των οποίων το υπερηχογράφημα ή οι βιοχημικοί έλεγχοι έδειξαν ρίσκο κυοφορίας παιδιού με ανευπλοειδία.

Η ευαισθησία εντοπισμού εμβρυϊκών κυττάρων με χρήση FACS υπολογίστηκε **13%** ενώ με χρήση MACS **44%**. Ωστόσο υψηλότερη καθαρότητα σε NRBC επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας FACS (αντίσωμα για την γ-αιμογλοβίνη) παρόλο που ο συνολικός αριθμός NRBC ήταν μικρότερος σε σχέση με αυτόν μετά από MACS.

Συνολικά όμως η μέθοδος MACS θεωρήθηκε αποτελεσματικότερη σε σχέση με τη FACS

Το ποσοστό ανίχνευσης ανευπλοειδιών ήταν **74,4%** (δ.ε 95%, 76%,99%), όχι ικανοποιητικό για άμεση εφαρμογή στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο, ενώ το ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στη διάγνωση φύλου ήταν **11,1%** (δ.ε. 95%, 6,1%, 16,1%) (Bianchi *et al.*, 2002).

Η μελέτη αυτή έδειξε ότι ο διαχωρισμός των NRBCs που βασίζεται στη χρήση ειδικών για αυτά αντισωμάτων (FACS και MACS) είναι σχετικά περιορισμένος.

Μέθοδος βασισμένη στη λεκτίνη

Τα NRBCs, εκφράζουν σε υψηλό βαθμό γαλακτόζη. Βάσει αυτής της ιδιότητας μπορούν να δεσμευτούν επιλεκτικά σε ένα υπόστρωμα επικαλυμμένο με πολυμερές που περιέχει γαλακτόζη μέσω soybean agglutinin (SBA), μια λεκτίνη ειδική για γαλακτόζη.

Οι Kitagawa *et al.* (2002) εφαρμόζοντας τη μέθοδο αυτή εντόπισαν από 1 έως μερικές εκατοντάδες NRBCs (mean+/-SD, 7.8+/-8.5) σε 2.3 ml από δείγματα περιφερικού αίματος στο 96% των εγκύων γυναικών. Αξίζει να αναφερθεί ότι προηγήθηκε φυγοκέντρηση με διάλυμα Ficoll, κάτι που αποτελεί πρώτο βήμα στα περισσότερα πρωτόκολλα απομόνωσης εμβρυϊκών κυττάρων από μητρικό αίμα.

Στη συνέχεια επιτεύχθηκε ακριβής προσδιορισμός του Y χρωμοσώματος με FISH σε όλες τις εγκυμοσύνες με άρρεν. Τέλος υπολογίστηκε ότι περισσότερα από το ήμισυ των NRBCs που απομονώθηκαν ήταν εμβρυϊκά.

Οι Babochkina *et al.* (2005) σύγκριναν τη μέθοδο της λεκτίνης με τη μέθοδο MACS και έδειξαν ότι με την πρώτη μέθοδο ανακτώνται 8 φορές μεγαλύτερος αριθμός ερυθροβλαστών οι οποίοι έχουν καλύτερη μορφολογία για αναγνώριση (May-Gruenwald Giemsa -MGG) και περαιτέρω ανάλυση. Ωστόσο η μεγάλη πρόσμιξη με μητρικά κύτταρα καθιστά χρονοβόρα την αναγνώριση των επιθυμητών κυττάρων.

Ταυτόχρονος εντοπισμός με αντισώματα για εμβρυϊκά κύτταρα και FISH

Ορισμένες ομάδες ερευνητών προκειμένου να διευκολύνουν τη διαδικασία αναγνώρισης των εμβρυϊκών κυττάρων σε δείγματα με πολλά μητρικά χρησιμοποιήσαν μετά το διαχωρισμό με φυγοκέντρηση ή/και MACS, ειδικά φθορίζοντα αντισώματα για την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, UCH-γ και στη συνέχεια εφαρμόσαν FISH για τα χρωμοσώματα X και Y. Έτσι κατά τον έλεγχο των αποτελεσμάτων εντόπισαν και αξιολόγησαν μόνο τα φθορίζοντα κύτταρα (Zheng *et al.*, 1993; Ferguson-Smith *et al.*, 1994).

Οι Yang *et al.* (2000) χρησιμοποίησαν συνδυασμό μεθόδων εμπλουτισμού NRBCs (Τριπλής πυκνότητας διάλυμα- MACS CD-45- MACS CD-71- cytospin φυγοκέντρηση- K-B (Kleihaur-Betke) χρώση- αντι- GPA- FISH) αλλά και ειδική χρώση για εμβρυϊκά κύτταρα και απομόνωσαν κατά μέσο όρο 13,7 +/- 6,2 NRBC ανά 20 ml. Επίσης υπολόγισαν ότι μεγαλύτερος αριθμός NRBCs απομονώνεται μεταξύ 12η-18η εβδομάδας κύησης. Τέλος η ευαισθησία προσδιορισμού φύλου σε αρσενικά έμβρυα βρέθηκε ίση με 100% ενώ η ειδικότητα ίση με 97,1%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για θήλυ έμβρυα βρέθηκαν ίσα με 91,7% και 100%.

Αυτόματος αναλυτής εικόνας

Δεδομένου ότι η καθαρότητα δειγμάτων μετά από εμπλουτισμό είναι χαμηλή και η διαδικασία του screening για εντοπισμό των εμβρυϊκών κυττάρων είναι χρονοβόρα υπάρχει ανάγκη για χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων. Τα συστήματα αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνουν σαρωτή μεσολαβούμενο από laser ή μια charge-couple device (CCD) με υπολογιστή για λήψη εικόνων και σύστημα ανάλυσης για μέτρηση κουκίδων.

Τα ζητούμενα κύτταρα θα αναγνωρίζονται από αλγόριθμο με βάση το σχήμα και διάφορα μορφολογικά χαρακτηριστικά, θα επισημαίνονται και θα ακολουθεί έλεγχος από το επιστημονικό προσωπικό (Sekizawa *et al.*, 2007).

1.3.2. Ex Vivo Καλλιέργεια Εμβρυϊκών Κυττάρων μητρικής κυκλοφορίας

Μια άλλη προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η καλλιέργεια των NRBCs. Αν συνέβαινε επιλεκτικός πολλαπλασιασμός των NRBCs *in vitro*, το εμβρυϊκό γενετικό υλικό θα μπορούσε να «ενισχυθεί» και να χρησιμοποιηθεί στον μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Έχει αναφερθεί ότι οι καλλιέργειες των εμβρυϊκών αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων είναι πιο ευαίσθητες στην ερυθροποιητίνη σε σχέση με άλλες καλλιέργειες που περιέχουν κύτταρα ενηλίκων (Valerio *et al.*, 1996; Saknan *et al.*, 2002). Οι Lo *et al.* (1994) ήταν οι πρώτοι που καλλιέργησαν μονοπύρηνια κύτταρα και απομόνωσαν εμβρυϊκά προγονικά ερυθροειδή κύτταρα από το περιφερικό αίμα εγκύων γυναικών.

Μεταγενέστερα και άλλοι ερευνητές καλλιέργησαν επιτυχώς μονάδες που σχηματίζουν αποικίες, όπως επίσης και ερυθροειδή, από εμβρυϊκά προγονικά αιμοποιητικά προερχόμενα από εμπλουτισμό μητρικού αίματος (Valerio *et al.*, 1996). Ωστόσο άλλοι επιστήμονες έδειξαν ότι οι αποικίες ερυθροειδών που ανακτώνταν μετά την καλλιέργεια ήταν από μητρικά πρόδρομα κύτταρα και όχι εμβρυϊκά (Chen *et al.*, 1998; Han *et al.*, 1999 & 2001). Τα αρχικά επιτυχή αποτελέσματα δεν επαναλήφθηκαν και έτσι ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός εμβρυϊκών προγονικών αιμοποιητικών σε σχέση με τα μητρικά δεν επιτεύχθηκε (Bohmer *et al.*, 2001; Campagnoli *et al.*, 2002).

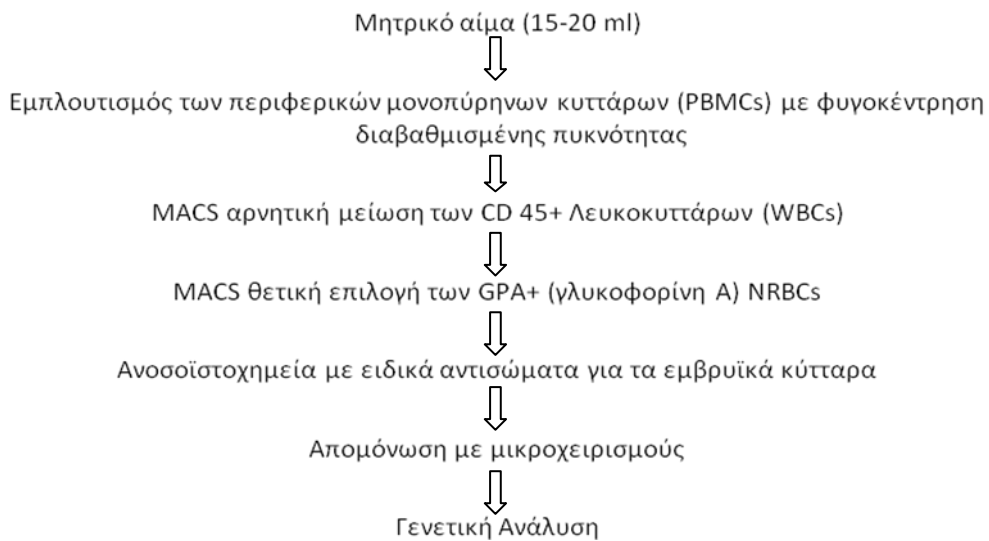
Ο Πίνακας 4 συνοψίζει όλες τις ερευνητικές ομάδες που ασχολήθηκαν με την απομόνωση και *ex vivo* καλλιέργεια εμβρυϊκών κυττάρων από τη μητρική κυκλοφορία.

Πίνακας 4. Ex Vivo Καλλιέργεια Εμβρυϊκών Κυττάρων Από Τη Μητρική Κυκλοφορία Για Μη Επεμβατική Προγεννητική Διάγνωση.

Αναφορές	Κυτταρικός τύπος	Εφαρμογή
Lo et al. [1994]	Erythroid cells	FISH
Valerio et al. [1996]	BFU-E, CFU-E	PCR, FISH, HbF
Little et al. [1997]	CD34+ cells	FISH
Valerio et al. [1997]	BFU-E, CFU-E, CFU-GEMM	FISH
Chen et al. [1998]	BFU-E, CFU-E	PCR, FISH, HbF
Han et al. [1999]	CD71/GPA+ cells	PCR, HbF
Bohmer et al. [1999]	Nucleated red cells	FISH
Jansen et al. [2000]	CD34+ cells	FISH
Valerio et al. [2000]	Erythroid cells	FISH
Huber et al. [2000]	Erythroid cells	PCR, FISH, HPLC
Tutschek et al. [2000]	BFU-E, CFU-GM	PCR
Coata et al. [2001]	CD34+ cells	PCR, FISH
Han et al. [2001]	Erythroid cells	PCR, HbF
Campagnoli et al. [2002]	CD34+ cells	FISH
Zimmermann et al. [2002]	Erythroid cells	PCR
Manotaya et al. [2002]	CD34+ cells	PCR, FISH
Gussin et al. [2002]	Endothelial precursor cells	FISH
Bohmer et al. [2002]	Nucleated red cells	PCR, FISH
Donoghue et al. [2003]	Foetal MSC	FISH

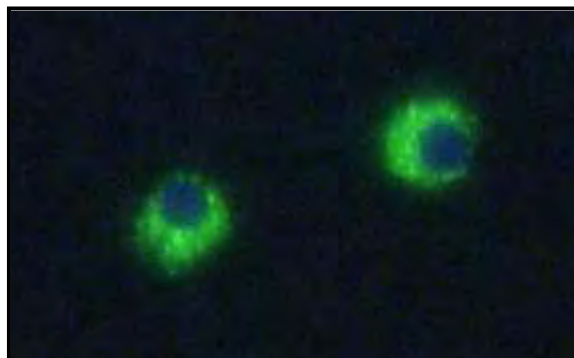
1.3.3 Τα εμβρυϊκά NRBCs στο μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο σήμερα

Η χρήση των εμβρυϊκών NRBCs στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση παραμένει σε πειραματικό επίπεδο. Ένα από τα πιο κοινά πρωτόκολλα απομόνωσης εμβρυϊκών NRBCs περιλαμβάνει φυγοκέντρηση διαβαθμισμένης πυκνότητας, 2 διαδοχικές MACS με αντισώματα πρώτα για τον CD45+ και στη συνέχεια για τη γλυκοφορίνη A, ανοσοϊστοχημεία με ειδικά αντισώματα για να εντοπιστούν τα εμβρυϊκά κύτταρα, και τέλος απομόνωση αυτών των κυττάρων με μικροχειρισμούς για γενετική ανάλυσή τους (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Στο παραπάνω σχήμα εικονίζεται ένα από τα πιο κοινά πρωτόκολλα απομόνωσης εμβρυϊκών NRBCs από τη μητρική κυκλοφορία. *PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cell*, *WBC White Blood Cell*, *NRBC Nucleated Red Blood Cell* *MACS Magnetic Activated Cell Sorting*. (Rosatelli & Saba, 2009)

Πλέον έχει καθιερωθεί η χρήση αντισωμάτων για εμβρυονικές αλυσίδες αιμοσφαιρίνης (ε, ζ ή γ) μετά τον εμπλουτισμό των NRBCs με οποιαδήποτε από τις μεθόδους που έχουν αναφερθεί (φυγοκέντρηση, FACS, MACS), ούτως ώστε να διευκολύνεται η αναγνώριση και η απομόνωσή τους με laser για να ακολουθήσει γενετικός έλεγχος. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα που λαμβάνεται μετά τη χρήση αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσα χρωστική για εντοπισμό εμβρυϊκών κυττάρων.



Εικόνα 6. Ερυθροβλάστες εμπλουτισμένοι από μητρικό αίμα και επεξεργασμένοι με αντίσωμα για την ε- αιμοσφαιρίνη συνδεδεμένο με FITC. Οι πυρήνες έχουν χρωματιστεί μπλε με χρήση DAPI (Rosatelli & Saba, 2009) .

Παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει σημειωθεί στην απομόνωση NRBCs από τη μητρική κυκλοφορία, η πρόσμιξη με κύτταρα μητρικής προέλευσης παραμένει ως πρόβλημα. Προκειμένου να δοθεί λύση σε αυτό πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν στραφεί στην εύρεση νέων αντιγόνων επιφάνειας που να υπάρχουν αποκλειστικά στους εμβρυϊκούς ερυθροβλάστες.

1.3.4 Περιορισμοί στη χρήση εμβρυϊκών NRBCs

Παρόλο που η παρουσία των εμβρυϊκών NRBC είναι καλά ορισμένη και αποτελούν τον καλύτερο στόχο για μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο, ο εντοπισμός τους παραμένει δύσκολος εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού τους.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι Hamada *et al.* (1993), χρειάστηκε να ελέγξουν 144.000 πυρήνες από κύτταρα που απομόνωσαν από μητρικό αίμα για να βρουν με την τεχνική FISH ένα μόνο εμβρυϊκό κύτταρο με DNA που υβριδίζεται στο Y χρωμόσωμα. Μια άλλη ερευνητική ομάδα υπολόγισε ότι η συχνότητα εμβρυϊκών κυττάρων σε αίμα εγκύων με έμβρυα 46,XY είναι κατά μέσο όρο 1 κύτταρο/ ml μητρικού αίματος (Bianchi *et al.*, 1997).

Ένας ακόμη περιορισμός στη χρήση των NRBCs είναι η προέλευσή τους. Αναμφίβολα, μερικά NRBCs ακόμα και μετά τον εμπλουτισμό, είναι μητρικής προέλευσης (Hamada *et al.*, 1995; Slunga-Tallberg *et al.*, 1995,1996). Οι Troeger *et al.* (1999) έδειξαν ότι μόνο το ήμισυ των NRBCs στη μητρική κυκλοφορία είναι εμβρυϊκής προέλευσης. Επίσης οι De Graff *et al.* (1999) χρησιμοποίησαν την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη για να διαχωρίσουν τα μητρικά από τα εμβρυϊκά NRBCs και παρατήρησαν ότι 20% των HbF θετικών NRBCs εξακολουθούν να είναι μητρικής προέλευσης.

Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ότι για αξιόπιστη κλινική εφαρμογή των εμβρυϊκών κυττάρων στο μη επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο θα πρέπει να ελέγχεται η προέλευση κάθε κυττάρου με μικροχειρισμούς.

Σε μεταγενέστερη έρευνα δείχθηκε ότι το 43% των εμβρυϊκών NRBCs που συλλέγονται από το μητρικό αίμα είναι αποπτωτικά και επομένως όχι κατάλληλα για FISH αφού το μέγεθος του πυρήνα τους είναι μειωμένο (Sekizawa *et al.*, 2000).

Η απόπτωση προκαλείται από το γεγονός ότι τα επίπεδα οξυγόνου στο μητρικό αίμα είναι υψηλά.

Δεδομένου ότι τα σήματα του FISH δεν εντοπίζονται εντός του πυρήνα απαιτείται αλλαγή στη μέθοδο FISH για NRBCs με πολύ συμπυκνωμένο πυρήνα.

Στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση από εμβρυϊκά κύτταρα χρησιμοποιείται η Single Cell PCR, δυνατότητα που δόθηκε χάρη στην τυχαία PEP-Primer Extension Preamplification ολόκληρου του γονιδιώματος. Με τη μέθοδο αυτή έχει επιτευχθεί διάγνωση μονογονιδιακών ασθενειών όπως η μυϊκή δυστροφία Duchenne (Sekizawa *et al.*, 1996) και η orthinine transcarbamylase ανεπάρκεια (Watanabe *et al.*, 1998).

Ωστόσο χρειάζονται περισσότεροι από 100 κύκλοι χρειάζονται για να βρεθεί η προέλευση του κυττάρου όπως επίσης και οι αλλαγές στο DNA που οδηγούν σε μία ή σε περισσότερες μονογονιδιακές ασθένειες (Sekizawa *et al.*, 2007).

Επιπλέον απαιτείται έλεγχος πολλών κυττάρων με PCR για να αποφευχθούν λανθασμένες διαγνώσεις εξαιτίας του allele drop out- αποτυχίας ενίσχυσης ενός εκ των δύο αλληλομόρφων (συμβαίνει όταν η αρχική ποσότητα DNA είναι μικρή), αποτυχίας της PCR και επιμολύνσεων.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα των προβλημάτων που συναντώνται ακόμα και σήμερα στη χρήση εμβρυϊκών εμπύρηνων ερυθροκυττάρων αποτελεί πρόσφατη έρευνα για διάγνωση β-θαλασσαιμίας. Στην έρευνα αυτή από τα 224 κύτταρα που απομονώθηκαν από το μητρικό πλάσμα μόνο 22 ήταν εμβρυϊκά, 26 ήταν μητρικά και 80 άγνωστης προέλευσης εξαιτίας μη πολλαπλασιασμού του ενός αλληλομόρφου (ADO) ή ομοζυγωτίας. Η χαμηλή ευαισθησία της PCR οφείλεται τόσο στην πτωχή ποιότητα των απομονωθέντων κυττάρων όσο και στο μεγάλο μέγεθος του γονιδίου της β μεσογειακής αναιμίας (Kolialexi *et al.*, 2007).

Επομένως υπάρχουν ακόμα κάποιοι περιορισμοί στη χρήση των εμβρυϊκών εμπύρηνων ερυθροκυττάρων στην κλινική πράξη.

1.3.5 Μελλοντική Προοπτική- Καλλιέργεια Αρχέγονων ερυθροβλαστών και δημιουργία Πολυδύναμων Βλαστικών Κυττάρων

Οι αρχέγονοι εμβρυϊκοί ερυθροβλάστες (pFEs- primitive Fetal Erythroblasts) θεωρούνται καλός υποψήφιος για μη επεμβατική διάγνωση νωρίς στο πρώτο τρίμηνο. Όμως η φύση τους, οι ιδιότητες και οι χειρισμοί τους προκειμένου να προσφέρουν αξιόλογους αριθμούς κυττάρων για γενετικές αναλύσεις παραμένουν μια πρόκληση.

Οι Huang *et al.*, (2011) προτείνουν νέες προσεγγίσεις ούτως ώστε να ξεπεραστούν τα προβλήματα και να αξιοποιηθεί η χρήση των pFEs στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση. Οι τελευταίες περιλαμβάνουν :

1. Εμπλουτισμό του αριθμού των pFEs με μικροχειρισμούς και καλλιέργεια σε μικροσταγόνες.
2. Κατανόηση της διαδικασίας ωρίμανσης των pFEs κατά την οποία συμβαίνει συμπύκνωση του πυρήνα τους.
3. Επέκταση της καλλιέργειάς τους με χρήση μιτογόνων (φυτοαιμαγλουτινίνη, κονκαναβαλίνη-A, pokeweed mitogen).
4. Παρεμπόδιση της διαδικασίας συμπύκνωσης του πυρήνα με αναστολείς της δεακετυλάσης των ιστονών (HDAC).
5. Επαναπρογραμματισμός των κυττάρων ώστε να δημιουργηθούν Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα (iPSCs-induced Pluripotent Stem Cells) με την τεχνική Μεταφοράς πυρήνα σε σωματικά κύτταρα (Somatic Cell Nuclear Transfer).

Με την τελευταία τεχνική μεταφέρονται σε διαφοροποιημένα σωματικά κύτταρα με τη βοήθεια κυρίως ιών, 4 γονίδια, τα oct4, sox2, c-myc και klf4 (Takahashi *et al.*, 2007). Έτσι αλλάζει το μεταγραφικό τους προφίλ και μετατρέπονται σε πολυδύναμα κύτταρα που έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης προς συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους.

Τα γονίδια αυτά αποτελούν ένα σύστημα με τρανσποζόνια που μπορεί να απομακρυνθεί μετά την εγκαθίδρυση της πολυδυναμικότητας (Woltjen *et al.*, 2009).

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου μπορεί να ενισχυθεί έως και 200 φορές με χρήση μικρών μορίων όπως τα SB431542 και PD0325901 που μπλοκάρουν τα μονοπάτια TGF και MARK/ERK (Lin *et al.*, 2009).

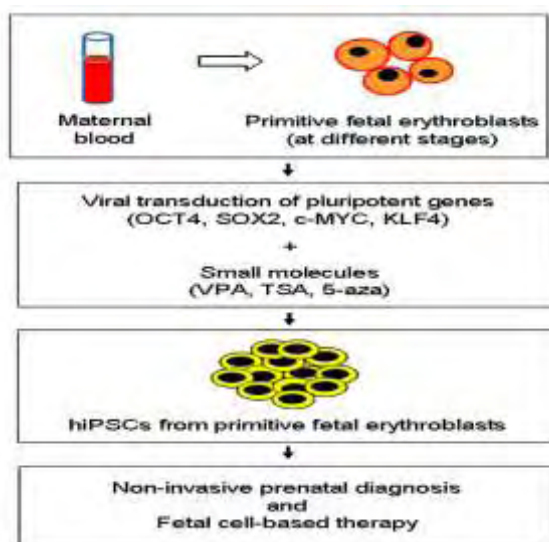
Εκτός από ιούς, για τη μεταφορά των γονιδίων έχουν χρησιμοποιηθεί και πλασμίδια με χαμηλή όμως αποτελεσματικότητα (Okita *et al.*, 2010). Επίσης επαγωγή PSCs έχει επιτευχθεί και με απευθείας μεταφορά mRNA που κωδικοποιεί για μεταγραφικούς παράγοντες (Yakobov *et al.*, 2010), αλλά και απευθείας μεταφορά πρωτεϊνών (Kim *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

Εμβρυϊκά κύτταρα από αμνιακό υγρό και χοριακές λάχνες έχουν επιτυχώς επαναπρογραμματιστεί (Ye *et al.*, 2010), τα οποία στη συνέχεια θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε επιθυμητούς ιστούς και να επιτευχθεί θεραπεία του εμβρύου όσο είναι μέσα στη μήτρα αλλά και μετά τη γέννηση.

Επαναπρογραμματισμός έχει επιτευχθεί και σε μεσεγγυματικά (HMCs), Τ λεμφοκύτταρα και μυελογενή αλλά όχι σε ερυθροειδή (Staerk *et al.*, 2010).

Στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση εμβρυϊκά κύτταρα (pFEs) που απομονώνονται από το μητρικό αίμα θα μπορούσαν να επαναπρογραμματιστούν προσφέροντας δύο βασικά πλεονεκτήματα :

1). αύξηση του αριθμού των εμβρυϊκών κυττάρων που προσφέρονται για γενετική ανάλυση, λύνοντας το πρόβλημα του περιορισμένου αριθμού κυττάρων που απομονώνονται και 2). διαφοροποίηση των καλλιεργούμενων κυττάρων προς επιθυμητούς ιστούς και θεραπεία του εμβρύου όταν αυτό κρίνεται απαραίτητο (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση ανθρώπινων επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων (hiPSCs- human induced Pluripotent Stem Cells) προερχόμενους από αρχέγονους εμβρυϊκούς ερυθροβλάστες (pFEs- primitive Fetal Erythroblasts) χρησιμοποιώντας πολυδύναμα γονίδια και μικρά μόρια. VPA: Valproic acid; TSA: Trichostatin A; 5-aza: 5-azacytidine. (Huang *et al.*, 2011)

Τα εμβρυϊκά κύτταρα που υπάρχουν στη μητρική κυκλοφορία εξακολουθούν να αποτελούν ιδανικό στόχο για μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση (NIPD- Non Invasive Prenatal Diagnosis) παρά τις δυσκολίες που συναντώνται στην απομόνωσή τους και το διαχωρισμό από τα μητρικά, στην εφαρμογή των τεχνικών FISH και PCR αλλά και στην καλλιέργειά τους.

Βασικό πλεονέκτημά τους σε σχέση με το εμβρυϊκό DNA που κυκλοφορεί στο αίμα της μητέρας είναι ότι διαθέτουν ένα πλήρες αντίγραφο του εμβρυϊκού γονιδιώματος.

Οι έρευνες για τη χρήση τους στην NIPD συνεχίζονται. Η μελέτη της φύσης και των ιδιοτήτων της αρχικής ερυθροποίησης στον άνθρωπο, θα μπορούσε να δώσει περισσότερες γνώσεις για αυτό το φαινόμενο και να βοηθήσει στην επίλυση των παραπάνω προβλημάτων και στην αξιοποίηση των εμβρυϊκών ερυθροβλαστών στην μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση.

2. Εμβρυϊκά Νουκλεϊκά Οξέα

Στο μητρικό αίμα εκτός από εμβρυϊκά κύτταρα κυκλοφορούν και εμβρυϊκά νουκλεϊκά οξέα, DNA και mRNA. Πρώτοι οι Mandel and Metais (1948) ανέφεραν την ύπαρξη ελεύθερου DNA στο αίμα (cfDNA- cell free DNA), η οποία αρχικά συσχετίστηκε με την παρουσία όγκων (Leon *et al.*, 1977). Θεωρήθηκε ότι ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων ευθύνεται για την απελευθέρωση ελεύθερου DNA στο πλάσμα (Fournie *et al.*, 1995; Giacona *et al.*, 1998).

Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA (cffDNA- cell free fetal DNA) εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο πλάσμα εγκύων γυναικών από τους **Lo *et al.* το 1997** μετά από ενίσχυση αλληλουχιών του Y χρωμοσώματος με PCR.

Τρία χρόνια αργότερα, οι **Poon *et al.* (2000)** απέδειξαν την παρουσία και **ελεύθερου εμβρυϊκού mRNA** στο μητρικό πλάσμα. Το mRNA αυτό προέρχεται από γονίδια που εκφράζονται αποκλειστικά στον πλακούντα (Ng *et al.*, 2003) και ο χρόνος ημιζωής του έχει υπολογιστεί σε 14 λεπτά (Chiu *et al.*, 2006).

Επίσης έχει αποδειχθεί ότι τα μόρια RNA είναι εξαιρετικά σταθερά στο μητρικό πλάσμα (Tsui *et al.*, 2002), λόγω της ένωσής τους με συγκεκριμένο τρόπο (Ng *et al.*, 2002) κάτι που τα προστατεύει ενάντια στην αποικοδόμησή τους από τις RNAάσες του πλάσματος (Hsselmann *et al.*, 2001).

2.1 Ελεύθερο εμβρυϊκό DNA (cffDNA)

2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι **Lo *et al.* (1998)** απέδειξαν ότι το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA (cffDNA-cell free fetal DNA) αποτελεί το 3-6% του συνολικού DNA που κυκλοφορεί στο μητρικό πλάσμα ενώ η ποσότητά του αυξάνεται με την πρόοδο της εγκυμοσύνης. Πρόσφατες έρευνες με τη χρήση microfluidic ψηφιακής PCR έδειξαν ότι το cffDNA υπάρχει σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που μπορεί να φθάσουν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10-20% του συνολικού DNA (Lun *et al.*, 2008).

Το cffDNA (cell free fetal DNA) αποτελείται από μικρά κομμάτια DNA (τεμαχισμένο) και όχι από ολόκληρα χρωμοσώματα. Από αυτά τα τμήματα DNA, 80% έχουν μέγεθος < 193 bp (Chan *et al.*, 2004).

Μπορεί να ανιχνευτεί από την 4^η εβδομάδα της κύησης, ωστόσο αξιόπιστα από την 7^η και μετά, ενώ η συγκέντρωσή του αυξάνεται με την πρόοδο της εγκυμοσύνης από 16 εμβρυικά γενώματα/ml (πρώτο τρίμηνο) στα 80 εμβρυικά γενώματα/ml στο τρίτο τρίμηνο (Birtch *et al.*, 2005) με μια αιχμή τις τελευταίες 8 εβδομάδες (Lo *et al.*, 1998b, Birch *et al.*, 2005).

Σε αντίθεση με τα εμβρυϊκά κύτταρα, το εμβρυϊκό DNA απομακρύνεται γρήγορα από τη μητρική κυκλοφορία με χρόνο ημιζωής 16,3 λεπτά, ενώ δεν εντοπίζεται μετά από 2 ώρες απ' τον τοκετό (Lo *et al.*, 1999c). Ωστόσο οι Wataganara *et al.* (2004a) υποστηρίζουν ότι μπορεί να ανιχνευτεί και κάποιες ημέρες μετά τη λήξη μιας εγκυμοσύνης. Η απομάκρυνση του εμβρυϊκού DNA γίνεται πιθανώς με συμμετοχή ηπατικού-νεφρικού συστήματος (Botezatu *et al.* 2000).

❖ Προέλευση εμβρυϊκού DNA

Υπάρχουν τρεις εκδοχές για την προέλευση του εμβρυϊκού DNA από τις οποίες επικρατέστερη είναι η 3^η.

Η πρώτη άποψη υποστηρίζει ότι το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA προέρχεται από απόπτωση εμβρυϊκών κυττάρων που κυκλοφορούν σε μητρική κυκλοφορία (Holdenrieder *et al.*, 2005). Η ποσότητα όμως των NRBCs σε σχέση με το cffDNA είναι μικρότερη γεγονός που δείχνει ότι δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ εμβρυϊκών NRBCs με ελεύθερο εμβρυϊκό DNA (Lo *et al.*, 1998). Επίσης σε γυναίκες με πρόωρο τοκετό, υπάρχει αυξημένη ποσότητα cffDNA (Leung *et al.*, 1998) αλλά όχι και NRBCs (Hoesli *et al.*, 2002). Επομένως τα εμβρυϊκά κύτταρα της μητρικής κυκλοφορίας δεν μπορεί να αποτελούν την κύρια πηγή εμβρυϊκού DNA.

Η δεύτερη άποψη υποστηρίζει ότι το cffDNA μεταφέρεται διαμέσου του πλακούντα (Sekizawa *et al.*, 2003). Ωστόσο ισχύει ότι η συγκέντρωση cffDNA στη μητρική κυκλοφορία είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι τη συγκέντρωση μητρικού DNA στο ομφαλικό πλάσμα. Αντίθετα, η συγκέντρωση του ελεύθερου μητρικού DNA στο εμβρυϊκό αίμα δεν επηρεάζεται από προεκλαμψία που σχετίζεται με τροφοβλαστική βλάβη και αυξημένα επίπεδα εμβρυϊκού DNA στο πλάσμα εγκύων γυναικών. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν μια άνιση μεταφορά cffDNA από την εμβρυϊκή στη μητρική κυκλοφορία (Lo *et al.*, 1999; Sekizawa *et al.*, 2003; 2004).

Η επικρατέστερη άποψη υποστηρίζει ότι το cffDNA προέρχεται από λύση κυττάρων πλακούντα. Στον πλακούντα, τα τροφοβλαστικά κύτταρα των χοριακών λαχνών συνορεύουν με τα τμήματα μεταξύ των λαχνών που γεμίζουν με μητρικό αίμα. Στην προεκλαμψία, ανεπαρκής εισβολή αυτών των εξωχοριακών τροφοβλαστών προκαλεί υποξία στα τροφοβλαστικά κύτταρα των χοριακών λαχνών με αποτέλεσμα να υφίσταται απόπτωση (Loke *et al.*, 1997).

Επομένως τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του πλακούντα είναι κυρίως υπεύθυνα για τις υψηλές συγκεντρώσεις cffDNA στο μητρικό πλάσμα (Tjoa *et al.*, 2006). Αυτό εξηγεί και την υψηλή ποσότητα εμβρυϊκού DNA που ανιχνεύεται σε περιπτώσεις προεκλαμψίας και ενδομήτριας καθυστέρησης ανάπτυξης (Ishihara *et al.*, 2002).

Συγκέντρωση του cffDNA ως δείκτης ασθενειών που σχετίζονται με εγκυμοσύνη και ανευπλοειδιών

Η συγκέντρωση του cffDNA ποικίλλει από περιστατικό σε περιστατικό ενώ έχει βρεθεί ότι μπορεί να αυξηθεί σε περιπτώσεις όπου υπάρχει πιθανότητα για επιπλοκές στην κύηση ή/και χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο έμβρυο. Πιο συγκεκριμένα αυξημένη συγκέντρωση cffDNA έχει παρατηρηθεί σε περιστατικά με :

1. Προεκλαμψία (Lo *et al.*, 1999b; Leung TN *et al.*, 2001; Swinkels DW *et al.*, 2002; Levine RJ *et al.*, 2004)
2. Πρόωρο τοκετό (Leung TN *et al.*, 1998, Farina *et al.*, 2005)
3. Ιδιοπαθές πολυδράμνιο (Zhong XY *et al.*, 2000)
4. Hyperemesis gravidarum (Sekizawa A. *et al.*, 2001)
5. Διεισδυτικό πλακούντα (Sekizawa A. *et al.*, 2002)
6. Εμβryo-μητρική αιμορραγία (Lau TK *et al.*, 2002)
7. Ανευπλοειδίες όπως τρισωμίες 21 και 13 αλλά όχι στην 18.(Lo *et al.*, 1999a; Wataganara T. *et al.*, 2003).

Η αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερου εμβρυϊκού DNA αποτελεί απλά ένα δείκτη και όχι διάγνωση μιας πάθησης που είναι το ζητούμενο.

2.1.2 Μέθοδοι εμπλουτισμού του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA

Οι βασικές δυσκολίες που συναντώνται στην ανίχνευση του εμβρυϊκού DNA είναι :

1. Η σχετικά χαμηλή συγκέντρωσή του, που όμως είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη των εμβρυϊκών κυττάρων.
2. Η συνολική του ποσότητα η οποία ποικίλλει ανάλογα με το περιστατικό.
3. Η αναλογία του προς το μητρικό cell free DNA που είναι 1:20.
4. Το γεγονός ότι το έμβρυο κληρονομεί το μισό γενετικό του υλικό από τη μητέρα του.

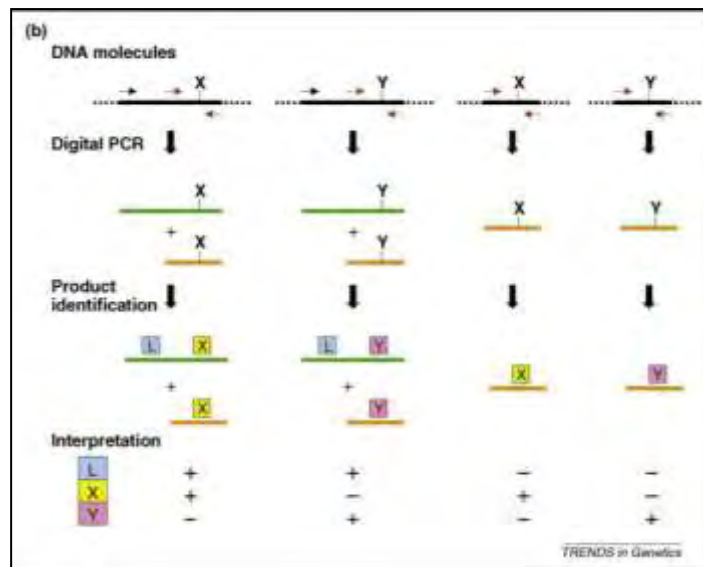
Για τους παραπάνω λόγους κρίθηκε απαραίτητο να εφαρμοσθούν μέθοδοι με τις οποίες θα αυξάνεται το ποσοστό του cffDNA που απομονώνεται σε σχέση με το μητρικό. Σε αυτές περιλαμβάνονται :

1. Η ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε gel αγαρόζης και η επιλογή των τμημάτων που έχουν μέγεθος μικρότερο από 300bp τα οποία αντιστοιχούν στο εμβρυϊκό DNA. Με αυτό τον τρόπο το cffDNA που απομονώνεται από το μητρικό πλάσμα μπορεί να εμπλουτιστεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να αποτελεί το 70% του συνολικού ελεύθερου DNA του δείγματος (Li *et al.*, 2004b).

Η διαδικασία αυτή προηγείται της γενετικής ανάλυσης του cffDNA με PCR ή φασματογράφο μάζας και βοηθά στη λήψη καλύτερων αποτελεσμάτων με τις αναφερθείσες τεχνικές.

2. Η χρήση φορμαλδεΐδης, που θεωρείται ότι σταθεροποιεί τα μητρικά λευκοκύτταρα και έτσι αποτρέπει την απελευθέρωση επιπλέον μητρικού DNA (Dhallan *et al.*, 2004). Ωστόσο οι απόψεις για τη χρήση της είναι αντιτιθέμενες καθώς ο εμπλουτισμός που επιτυγχάνεται παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση από 5% έως 96% του συνολικού ελεύθερου DNA (Benachi *et al.*, 2005). Επιπλέον η επαναληψιμότητα του δημοσιευμένου πρωτοκόλλου έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση από αρκετούς ερευνητές (Chinnarapagari *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2005)
3. Τέλος, η ψηφιακή επιλογή νουκλεϊκών οξέων βάσει του μεγέθους τους (Digital Nucleic Acid Size Selection-NASS) που αξιοποιεί το γεγονός ότι τα εμβρυϊκά μόρια DNA είναι μικρότερα σε μέγεθος από τα μητρικά (Chan *et al.*, 2004).

Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την εκτέλεση διπλής (Duplex) PCR για την ανάλυση κάθε DNA μορίου. Οι αρχές της τεχνικής παρουσιάζονται στην Εικόνα 8. Συμπερασματικά η παρουσία ενός μικρού μορίου DNA υποδηλώνεται όταν δεν εντοπίζεται το μεγάλο προϊόν της αντίδρασης PCR. Δεδομένου ότι το εμβρυϊκό DNA είναι μικρότερο από το μητρικό, θα εκπροσωπείται περισσότερο στη δεξαμενή μορίων DNA με το μικρό προϊόν. Έτσι, εστιάζοντας μόνο στα μικρού μεγέθους τμήματα DNA, θα μπορεί να ληφθεί ένα πιο αποτελεσματικό κλάσμα εμβρυϊκού DNA για περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 8. Digital NASS. Η ψηφιακή PCR (Digital PCR) πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας 2 Forward και 1 Reverse primers που έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να παράγουν 1 μικρό αμπλικόνιο (X,Y) που επικαλύπτεται με ένα μεγάλο αμπλικόνιο (L). Όταν ένα μονό μόριο DNA είναι τόσο μεγάλο όσο το μεγάλο αμπλικόνιο τότε στο πηγαδάκι της αντίδρασης παράγονται και το μεγάλο αλλά και το μικρό προϊόν της PCR (L, X, Y). Όταν όμως το μόριο DNA είναι μικρότερο από το μεγάλο αμπλικόνιο τότε παράγεται μόνο το μικρό προϊόν της PCR (X, Y). Η παρουσία του μεγάλου ή/και του μικρού αμπλικονίου μπορεί να προσδιορισθεί με τη χρήση probes που υβριδίζονται με τα προϊόντα της PCR ή εκκινητών επέκτασης (extension primers). (Lun *et al.*, 2008)

2.1.3 Μάρτυρες εμβρυϊκού DNA

Είναι γνωστό ότι το εμβρυϊκό DNA βρίσκεται σε μια δεξαμενή όπου κυριαρχεί μητρικό DNA. Επομένως πολύ σημαντικό είναι να ελέγχεται η προέλευση του απομονωμένου DNA πριν αναλυθεί.

Για το σκοπό αυτό μεγάλο κομμάτι της έρευνας έχει στραφεί στην εύρεση μαρτύρων εμβρυϊκού DNA. Οι μάρτυρες αυτοί λειτουργούν είτε ως διαγνωστικά τεστ από μόνοι τους είτε ως απόδειξη παρουσίας εμβρυϊκού DNA στο ληφθέν δείγμα. Ειδικά το τελευταίο εξυπηρετεί την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που προκαλούνται εξαιτίας πολύ μικρής ποσότητας απομονωμένου εμβρυϊκού DNA ή προβλημάτων στις διαδικασίες απομόνωσης.

Ως μάρτυρες εμβρυϊκού DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν πατρικώς κληρονομούμενοι πολυμορφισμοί οι οποίοι όμως απουσιάζουν από το DNA της μητέρας. Οι πολυμορφισμοί αυτοί δεν είναι απαραίτητο να συνδέονται με συγκεκριμένες ασθένειες. Σε αυτούς ανήκουν οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs-Single Nucleotide Polymorphisms) ή Μεταλλάξεις σημείου και οι μικρές τυχαίες επαναλήψεις (STRs-Short Tandem Repeats).

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs) έχουν χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τον εντοπισμό εμβρυϊκού DNA (Li *et al.*, 2006, Dhallan *et al.*, 2007). Ωστόσο υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση τους καθώς απαιτείται η ύπαρξη πληροφοριακών SNPs, δηλαδή πατρικών πολυμορφισμών που απουσιάζουν από το μητρικό DNA. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή βασίζεται σε εκλεκτικό εμπλουτισμό του cffDNA που ακολουθείται από ανάλυση με εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική όπως ο φασματογράφος μάζας. Αυτό είναι απαραίτητο αφού μητρικό και εμβρυϊκό DNA διαφέρουν σε ένα ζεύγος βάσεων κάτι που αποτελεί πρόκληση για να διακριθεί.

Οι μικρές τυχαίες επαναλήψεις (STRs) παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία, έτσι ώστε οι περισσότεροι άνθρωποι παρουσιάζουν συνήθως 2 αλληλόμορφα, κληρονομούμενα ένα από κάθε γονέα, με διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων. Έτσι το πατρικώς κληρονομούμενο αλληλόμορφο θα διαφέρει από το μητρικό και μετά την ενίσχυση με PCR θα προκύπτουν 2 μεγάλα προϊόντα, που αντιστοιχεί στα μητρικά αλληλόμορφα και ένα μικρό που αντιστοιχεί στο πατρικό.

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τους Pertl *et al.* (2000) και αναπτύχθηκε περαιτέρω από τους Liu *et al.*, 2007, οι οποίοι χρησιμοποίησαν real time PCR για την αυτόματη ανίχνευση των διαφορετικών STR περιοχών. Ωστόσο η τεχνική αυτή δεν έχει βελτιστοποιηθεί για κλινική χρήση, ενώ η ευαισθησία και η ειδικότητά της δεν έχουν ακόμα καθορισθεί.

Μια άλλη μέθοδος διάκρισης του εμβρυϊκού από το μητρικό DNA είναι οι **διαφορές στην έκφραση των γονιδίων. Επιγενετικές αλλαγές**, κυρίως μεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων, που επηρεάζουν τη μεταγραφή τους, όπως και προϊόντα γονιδίων (**mRNA** και **πρωτεΐνες**) που εκφράζονται αποκλειστικά στον πλακούντα μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες εμβρυϊκού υλικού.

Η μεθυλίωση συγκεκριμένων γονιδίων διαφέρει μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού DNA (Chim *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006b). Για παράδειγμα γονίδια που είναι σημαντικά για την αύξηση και την ανάπτυξη μπορεί να είναι μεθυλιωμένα (σιωπηλά) στους ενήλικες, αλλά μη μεθυλιωμένα και ενεργά στο αναπτυσσόμενο έμβryo. Αυτό αποδείχθηκε από τους Chim *et al.*, (2005) με τη χρήση μετατροπής με δισουλφίδιο (μετατροπή κυτοσίνης σε ουρακίλη) στο DNA και PCR ειδική για μεθυλιωμένο DNA με ειδικούς εκκινητές. Η ομάδα αυτή καθιέρωσε το υπομεθυλιωμένο στον πλακούντα γονίδιο SERPINB5 ως τον πρώτο καθολικό μάρτυρα εμβρυϊκού DNA.

mRNA προερχόμενο αποκλειστικά από γονίδια που εκφράζονται στον πλακούντα ή στο έμβryo έχει χρησιμοποιηθεί από κάποιες ερευνητικές ομάδες στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση (Oudejans *et al.*, 2003; Go *et al.*, 2004; Tsui *et al.*, 2004; Tsui & Lo, 2006), αλλά η χρήση εμβρυϊκών πρωτεϊνών είναι ακόμη σε πολύ αρχικό στάδιο έρευνας (Avent *et al.*, 2008).

2.1.4 Κλινικές Εφαρμογές

Το cfDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις ακόλουθες περιπτώσεις:

1. Στον προσδιορισμό φύλου στην περίπτωση που υπάρχει κίνδυνος για φυλοσύνδετες ασθένειες.
2. Στον προσδιορισμό Rhesus όταν η μητέρα είναι Rhesus(-).
3. Στην διάγνωση μονογονιδιακών ασθενειών όταν οι γονείς φέρουν παθολογικά αλληλόμορφα.
4. Στη διάγνωση ανευπλοειδιών όταν η ηλικία της μητέρας είναι προχωρημένη, σε γυναίκες με πολλές αποβολές ή όταν υπάρχει ιστορικό γέννησης παιδιού με κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία.

▪ Προσδιορισμός φύλου

Ο προσδιορισμός φύλου του εμβρύου από cfDNA μητρικού πλάσματος επιτεύχθηκε για πρώτη φορά από τους Lo *et al.* (1998). Έκτοτε πολλοί επιστήμονες προσδιόρισαν το φύλο του εμβρύου ενισχύοντας με PCR διάφορες περιοχές του Y χρωμοσώματος SRY (Galbiati *et al.*, 2005), DYS (DYS1,DYS14) (Honda *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006), DYZ (DYZ1,DYZ3) (Honda *et al.*, 2001) and DAZ (Stanghellini *et al.*, 2006), ZFY (Lun *et al.*, 2008) και την αμυλογενίνη (Dong-ling *et al.*, 2008).

Οι αρχές της μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης (NIPD) φύλου χρησιμοποιώντας cfDNA μπορούν να εφαρμοσθούν σε οποιαδήποτε φυλοσύνδετη ασθένεια. Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει το σύνολο των ασθενειών για τις οποίες πραγματοποιήθηκε NIPD με χρήση cfDNA από το μητρικό πλάσμα (Costa *et al.*, 2002). Σε αυτές αξίζει να προστεθούν ενδοκρινολογικές ασθένειες όπως η συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων (Chitty *et al.*, 2007). Ο προσδιορισμός φύλου σε αυτή την περίπτωση είναι πολύ σημαντικός καθώς στην περίπτωση που το έμβρυο είναι θήλυ θα πρέπει να χορηγηθούν στη μητέρα κορτικοστεροειδή για να αποφευχθεί ανδροποίηση του θήλεος.

Πίνακας 5. Φυλοσύνδετες ασθένειες για τις οποίες εφαρμόστηκε η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση με απομόνωση εμβρυϊκού DNA από μητρικό πλάσμα (Costa *et al.*, 2002).

Ασθένειες	Αριθμός περιπτώσεων
Hemophilia	39
Muscular dystrophy	31
X-linked mental retardation	8
Adrenoleukodystrophy	7
Alport's syndrome	7
X-linked severe immunodeficiency	6
Retinitis pigmentosa	6
X-linked hydrocephalus	5
Anhidrotic ectodermal dysplasia	4
Hunter's syndrome	3
Menkes' syndrome	3
Lesch-Nyhan syndrome	2
Άλλες	10

Οι δύο πιο αντιπροσωπευτικές μελέτες σχετικές με αυτήν την κλινική εφαρμογή περιλαμβάνουν μια Ιταλική (Galbiati *et al.*, 2005) και μια Ιαπωνική έρευνα (Sekizawa *et al.*, 2001).

Στην πρώτη μετά από ενίσχυση της SRY αλληλουχίας η ακρίβεια προσδιορισμού φύλου υπολογίστηκε σε 99,4% (1ο τρίμηνο), 97,8% (2^ο τρίμηνο) και 100% (3^ο τρίμηνο), ενώ αποτυχία διάγνωσης φύλου παρατηρήθηκε σε 7/246 αρσενικά (Galbiati *et al.*, 2005).

Στη δεύτερη έρευνα ο προσδιορισμός φύλου έγινε με ενίσχυση της DYS14 αλληλουχίας από 7^η-16^η εβδομάδα της κύησης και έδειξε ευαισθησία 97,2%, ειδικότητα 100% ειδικότητα, θετική προβλεπτική αξία 100% και αρνητική προβλεπτική αξία 97,5% (Sekizawa *et al.*, 2001).

Στο Ηνωμένο Βασίλειο (UK) πραγματοποιήθηκε μια προοπτική μελέτη όπου καταγράφηκαν περιστατικά προγεννητικού ελέγχου για 3 χρόνια, από 1/4/2006 έως 31/3/2009 (Hill *et al.*, 2011). Στο διάστημα αυτό μόνο το 32,9% των ζευγαριών υποβλήθηκε σε επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο. Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση φύλου πραγματοποιήθηκε με ενίσχυση των αλληλουχιών *DYS14* ή *SRY* χρησιμοποιώντας real-time PCR σε cfDNA που απομονώθηκε από μητρικό πλάσμα. Τα αποτελέσματα της NIPD συγκρίθηκαν με αυτά από υπερηχογράφημα, από επεμβατικό προγεννητικό έλεγχο (όπου πραγματοποιήθηκε) ή από το φύλο μετά τη γέννηση.

Στα πρώτα 135 περιστατικά συμφωνία βρέθηκε στο 96.3% (95% CI 91.6–98.8%). Στα επόμενα 511 ζευγάρια, έγινε αλλαγή των κριτηρίων αναφοράς και η συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων έφτασε το 99.5% (95% CI 98.2–99.9%).

Η έρευνα αυτή δείχνει ότι ο προσδιορισμός φύλου με χρήση cfDNA είναι εξαιρετικά ακριβής όταν γίνεται σε National Health Service laboratories με αυστηρά κριτήρια αναφοράς (Hill *et al.*, 2011). Πολύ σημαντική είναι η χρήση μαρτύρων εμβρυϊκού DNA διαφορετικών από αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος ώστε να αποφεύγονται ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που οφείλονται σε μικρή ποσότητα απομονωμένου DNA ή αποτυχία απομόνωσής του.

Η χρήση του cfDNA χρησιμοποιείται σήμερα στην κλινική πράξη και έχει αποδειχθεί πιο αποτελεσματική μέθοδος από το υπερηχογράφημα στη διάγνωση φύλου στο 1ο τρίμηνο (Avent & Chitty, 2006).

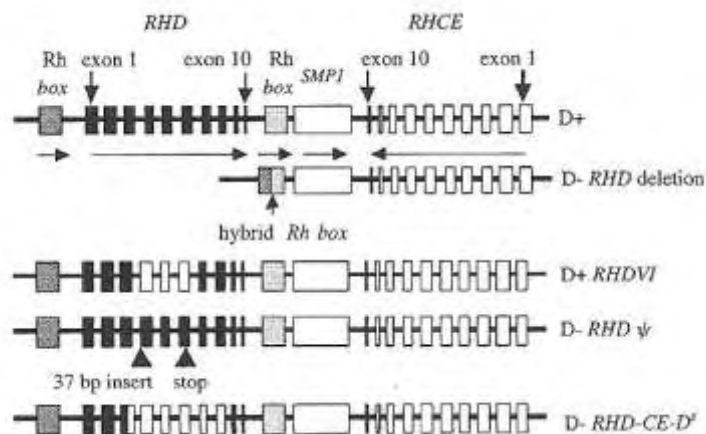
▪ Προσδιορισμός Rhesus

Ο προσδιορισμός Rhesus του εμβρύου από cfDNA μητρικού πλάσματος επιτεύχθηκε για πρώτη φορά από τους Lo *et al.* (1998) και τους Faas BH *et al.* (1998). Έγινε δεκτό σαν κλινικό τεστ από τη British National Blood Service ήδη από το 2001 (Finning *et al.*, 2002).

Τα αντιγόνα του συστήματος Rhesus κωδικοποιούνται από ένα ζευγάρι γονιδίων στο 1^ο χρωμόσωμα, το RHD και το RHCE. Η δομή τους παρουσιάζεται στην Εικόνα 10.

Στο λευκό πληθυσμό, σχεδόν όλα τα D αρνητικά περιστατικά είναι ομόζυγα για έλλειψη του RHD και μέρος από τα Rh boxes (Wagner and Flegel, 2000). Επομένως ο Rh αρνητικός φαινότυπος προκύπτει από την ολοκληρωτική απουσία της RhD πρωτεΐνης από την επιφάνεια των ερυθροκυττάρων (Εικόνα 10).

Στους Αφρικάνους μόνο το 18% των D αρνητικών είναι ομόζυγοι για την παραπάνω έλλειψη. Σε γενικές γραμμές 66% των D αρνητικών Αφρικανών έχουν ένα μη ενεργό γονίδιο RHD, γνωστό ως RHD ψ (Singleton *et al.*, 2000). Επιπλέον 15% των D αρνητικών έχουν ένα υβριδικό γονίδιο, το RHD-CE-D^s, που περιλαμβάνει κάποια εξόνια ή τμήματα αυτών από τα γονίδια RHD και RHCE (Faas *et al.*, 1997; Daniels *et al.*, 1998). Τόσο το RHD ψ όσο και το RHD-CE-D^s δεν παράγουν επιτόπια του D (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Διάγραμμα των Rh γονιδίων. Παρουσιάζονται 5 απλότυποι, δύο παράγουν D (D+) και τρεις δεν παράγουν (D-). (Copyright © John Wiley and Sons, Ltd)

Βάσει αυτών των πληθυσμιακών διαφορών στη δομή των γονιδίων που προκαλούν τον RhD αρνητικό φαινότυπο, ενισχύονται τα ανάλογα εξόνια για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Επίσης τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα αποφεύγονται με τη παράλληλη χρήση δεικτών εμβρυϊκού DNA όπως αλληλουχίες στο Y χρωμόσωμα (SRY) (Minon *et al.*, 2008) , ο RASSF1A (Chan *et al.*, 2006) και ο CCR5 (Finning *et al.*, 2008).

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι τρεις πιο πρόσφατες μελέτες μεγάλης κλίμακας σχετικά με τη χρήση του cffDNA στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση. Οι Finning *et al.* (2008) προσδιόρισαν με ακρίβεια 95,7% το φαινότυπο Rhesus ενισχύοντας τα εξόνια 5 και 7 του RHD χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα εμβρυϊκού DNA το γονίδιο CCR5. Οι Minon *et al.* (2008) άγγιξαν το 99,8% στον προσδιορισμό Rhesus ενισχύοντας τα εξόνια 4, 5 και 10 του RHD με μάρτυρα εμβρυϊκού DNA την αλληλουχία SRY.

Πίνακας 6. Σύνοψη των πιο πρόσφατων μελετών μεγάλης κλίμακας για την εφαρμογή της μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης με χρήση cffDNA στον προσδιορισμό Rhesus (RhD) σε έγκυες γυναίκες RhD- αρνητικού.

Αναφορά	Τοποθεσία	Αριθμός	Ακρίβεια*(%)	Ψευδώς αρνητικά **
Finning <i>et al.</i> (2008)	UK	1997	95,7	3 δείγματα
Minon <i>et al.</i> (2008)	Βέλγιο	563	99,8	0 δείγματα
Rouillac-Le Sciellour <i>et al.</i> (2007)	Γαλλία	300	99,3	0 δείγματα

*Λόγος των σωστά θετικών αποτελεσμάτων και σωστά αρνητικών αποτελεσμάτων αποκλείοντας αποτελέσματα που δεν λήφθηκαν ή μη ολοκληρωμένα αποτελέσματα.

**Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα είναι η κύρια αιτία ανησυχίας, καθώς έλλειψη anti-D θεραπείας θέτει το έμβρυο σε ρίσκο για HDN (Haemolytic Disease of the Newborn). Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα δεν έχουν κλινικές ανησυχίες, καθώς οι γυναίκες που έλαβαν anti-D χωρίς να χρειάζεται φθάνουν των 40% των RhD-αρνητικών κύησεων.

Τέλος οι Rouillac-Le Sciellour *et al.* (2007) πέτυχαν προσδιορισμό RhD σε ποσοστό 99,3% χρησιμοποιώντας ένα Free DNA Fetal Kit RhD. Οι επιστήμονες αυτοί ανέφεραν ότι αν αυτά τα αποτελέσματα είχαν εφαρμοσθεί σαν οδηγός για λήψη θεραπείας, μόνο 2% θα είχαν λάβει θεραπεία χωρίς να το χρειάζονται σε αντίθεση με το 38% που λαμβάνουν χωρίς να γίνει έλεγχος γενοτύπου.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα χρήσης μάρτυρα εμβρυϊκού DNA στην αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων εξαιτίας μη απομόνωσης επαρκούς ποσότητας εμβρυϊκού DNA αποτελεί ο υπερμεθυλιωμένος στον πλακούντα RASSF1A (Chan *et al.*, 2006). Στη μελέτη αυτή πραγματοποιείται real-time PCR για ενίσχυση 2 περιοχών στα εξόνια 7 και 10 του RHD, του RASSF1A, της ακτίνης-β και του SRY. Επιπλέον χρησιμοποιούνται ένζυμα περιορισμού που πέπτουν ειδικά το μη μεθυλιωμένο DNA, δηλαδή το μητρικό στη συγκεκριμένη περίπτωση, έτσι ώστε να παραμένει για περαιτέρω ανάλυση μόνο το εμβρυϊκό. Εντοπισμός του RASSF1A με PCR μετά την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού πιστοποιεί την επιτυχή απομόνωση εμβρυϊκού DNA. Η πραγματοποίηση της πέψης μη μεθυλιωμένου DNA ελέγχεται με γονίδιο αναφοράς την ακτίνη β. Έτσι γίνεται διπλός έλεγχος για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων.

Οι έρευνες σχετικά με τη χρήση του cfDNA στην NIPD συνεχίζονται με άριστα αποτελέσματα. Αξίζει να αναφερθεί η πρόσφατη μελέτη των Amaral *et al.* (2011) οι οποίοι χρησιμοποιώντας PCR πραγματικού χρόνου για ενίσχυση των εξονίων 4, 5 και 10 του RHD και μάρτυρες εμβρυϊκού DNA τους SRY και CCR5 προσδιόρισαν με ακρίβεια 100% το Rhesus στη Νοτιοανατολική Βραζιλία όπου υπάρχει μείγμα εθνικοτήτων.

▪ Διάγνωση Μονογονιδιακών Νοσημάτων

Η μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών ασθενειών με χρήση cffDNA βασίζεται στον **εντοπισμό πατρικών αλληλουχιών διαφορετικών από αυτές της μητέρας** και προκύπτει εξ αποκλεισμού των παθολογικών που συνδέονται με την ασθένεια. Στις αλληλουχίες αυτές μπορεί να ανήκουν είτε παθολογικά αλληλόμορφα είτε πολυμορφισμοί που συνδέονται με μια ασθένεια. Η πολλαπλή φθορίζουσα PCR έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό πατρικών πολυμορφισμών (STRs) δείχνοντας ακρίβεια εντοπισμού του εμβρυϊκού DNA 100% (Dong-Ling *et al.*, 2008).

Στην περίπτωση επικρατούς (κληρονομούμενης από τον πατέρα) ή υπολειπόμενης αυτοσωμικής ασθένειας (πατρική μετάλλαξη διαφορετική από τη μητρική), εντοπισμός του φυσιολογικού πατρικού αλληλομόρφου ή ενός πολυμορφισμού που δεν συνδέεται με την ασθένεια υποδηλώνει υγιές έμβρυο. Με τον τρόπο αυτό έχουν διαγνωσθεί πλήθος μονογονιδιακών ασθενειών (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Ερευνητικές ομάδες που πέτυχαν μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών ασθενειών με χρήση cffDNA και αντίστοιχες ασθένειες που διαγνώστηκαν. Περιλαμβάνονται εργασίες που δημοσιεύτηκαν έως και το 2007. (Wright & Burton, 2009)

Ασθένειες		Αναφορά
Αιμοσφαιρινοπάθειες	β-θαλασσαιμία	Chiu <i>et al.</i> , 2002b, Fucharoen <i>et al.</i> , 2003
	β-θαλασσαιμία δρεπανοκυτταρική αναιμία	
	Hb Lepore	Lazaros <i>et al.</i> , 2006
Κυστική ίνωση		Gonzalez-Gonzalez <i>et al.</i> , 2002; Nasis <i>et al.</i> , 2004
Νόσος Huntigton's		Gonzalez-Gonzalez <i>et al.</i> , 2003
Αχονδροπλασία		Saito <i>et al.</i> , 2000; Li <i>et al.</i> , 2004a, 2007a
Μυοτονική δυστροφία		(Amicucci <i>et al.</i> , 2000)
Συγγενής υπερπλασία των επινεφριδίων		(Chiu <i>et al.</i> , 2002a)
		(Rijnders <i>et al.</i> , 2001; Bartha <i>et al.</i> , 2003)

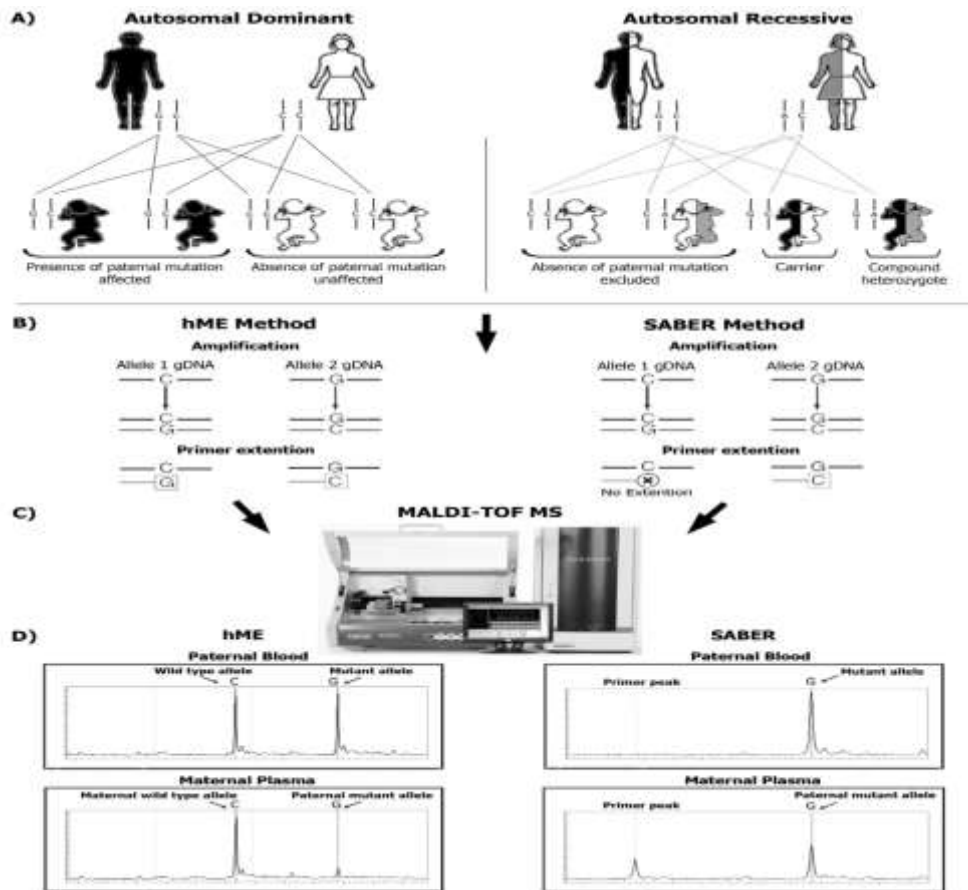
Διάγνωση θαλασσαιμίας

Το ελεύθερο εμβρυικό DNA έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό πατρικώς κληρονομούμενων μεταλλάξεων που προκαλούν β-θαλασσαιμία (Chiu *et al.*, 2002b, Fucharoen *et al.*, 2003) και στην περίπτωση που η μητέρα είχε διαφορετική μετάλλαξη για β-θαλασσαιμία αλλά και σε αυτή όπου είχε μετάλλαξη για δρεπανοκυτταρική αναιμία που οδηγεί σε δρεπανοκυτταρική β θαλασσαιμία. Επίσης έχει επιτευχθεί εντοπισμός πατρικώς κληρονομούμενων μεταλλάξεων για Hb Lepore (Lazaros *et al.*, 2006).

Οι Li *et al.* (2005) σε έρευνά τους εντόπισαν πατρικώς κληρονομούμενες μεταλλάξεις σε έμβρυα με κίνδυνο για β- θαλασσαιμία συνδυάζοντας μια μέθοδο εμπλουτισμού με 2 μεθόδους γενετικής ανάλυσης. Συγκεκριμένα εμπλούτισαν το εμβρυϊκό DNA με ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης και στη συνέχεια το ανέλυσαν με peptid nucleid acid clamp PCR (PNA), η οποία επιλεκτικά καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μητρικών αλληλομόρφων, και με PCR πραγματικού χρόνου για ειδικά αλληλόμορφα για ανίχνευση της μετάλλαξης. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου για ανίχνευση 4 μεταλλάξεων Μεσογειακής αναιμίας (IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110 και κωδικόνιο 39) σε 32 δείγματα ήταν αντίστοιχα **100%** και **93,8%**.

Σε πιο πρόσφατη έρευνά τους χρησιμοποιούν την ίδια μέθοδο εμπλουτισμού του εμβρυϊκού DNA αλλά τη συνδυάζουν με MALDI-TOFF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) φασματογράφο μάζας, ένα σύστημα που ανιχνεύει με υψηλή ευαισθησία την παρουσία γνωστών και άγνωστων μεταλλάξεων (Li *et al.*, 2009). Με τη μέθοδο αυτή δεν προκαλείται καταστολή στο μητρικό γενετικό υλικό ενώ η διάγνωση προκύπτει εξ αποκλεισμού του πατρικού μεταλλαγμένου αλληλομόρφου.

Ο φασματογράφος μάζας αρχικά αναπτύχθηκε για την ανάλυση πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Αργότερα η χρήση του επεκτάθηκε και στην ανάλυση DNA. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει PCR, αντίδραση επέκτασης βάσης (base extension reaction) και MALDI-TOFF MS ανάλυση. Στην αντίδραση επέκτασης προστίθεται εκκινητής επέκτασης σχεδιασμένος από το ομογενές (homogenous) MassEXTEND (hME) λογισμικό. Κάθε προϊόν επέκτασης έχει συγκεκριμένο μοριακό μέγεθος, δίνοντας διαφορετικό σήμα μετά από MALDI-TOFF MS ανάλυση (Zhong & Holzgreve, 2009)(Εικόνα 10).



Εικόνα 10. MALDI-TOF MS στην NIPD μονογονιδιακών νοσημάτων. Α. Δύο περιπτώσεις αυτοσωμικών κληρονομούμενων ασθενειών. Β. Δύο μέθοδοι : hME και SABER. Γ. Σύστημα MALDI-TOF MS. Δ. Προϊόντα επέκτασης ειδικά για τα αλληλόμορφα (μεταλλαγμένο ή/και φυσιολογικό) που εντοπίζονται με MALDI-TOF MS. (Zhong & Holzgreve, 2009)

Οι Ding *et al.*, (2008), προκειμένου να αυξήσουν την ευαισθησία ανίχνευσης της μειονότητας εμβρυϊκού DNA στη δεξαμενή του μητρικού DNA, τροποποίησαν το πρωτόκολλο του hME και ανέπτυξαν μια μέθοδο επέκτασης βάσης για ένα αλληλόμορφο (single allele base extension reaction-SABER) που ακολουθείται από MALDI-TOFF φασματογράφο μάζας (Εικόνα 11). Σε αντίθεση με την hME που περιλαμβάνει την επέκταση βάσης τόσο του μεταλλαγμένου όσο και του φυσιολογικού αλληλομόρφου η SABER επεκτείνει μόνο τα εμβρυϊκά αλληλόμορφα που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη (Ding *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006).

Η μέθοδος αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή διάγνωση των κυριότερων μεταλλάξεων β θαλασσαιμίας [CD 41/42 -CTTT, IVS2 654 (C→T), nt-28 (A→G), και CD17 (A→T)] σε 11/12 περιπτώσεις (Ding *et al.*, 2004) αλλά και σε 2 περιστατικά με αχονδροπλασία (Li *et al.*, 2007).

Παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνολογία αυτή, για να εφαρμοσθεί στην κλινική πράξη απαιτείται να δοκιμασθεί σε μεγαλύτερα δείγματα, αλλά ακόμα και αν αυτό πραγματοποιηθεί το υψηλό κόστος πραγματοποίησής της καθιστά δύσκολη τη χρήση της σε διαγνώσεις ρουτίνας.

Μια ακόμη μέθοδος για NIPD β θαλασσαιμίας που περιγράφηκε πρόσφατα είναι γνωστή ως APEX (Arrayed Primer EXtension). Πρόκειται για ένα σύστημα ανίχνευσης μεταλλάξεων που βασίζεται στη συνδυασμένη χρήση της τεχνολογίας των microchip και της μεθόδου single nucleotide base extension method. Χρησιμοποιήθηκε από τους Papasavva *et al.*, (2008) για τον εντοπισμό πατρικών μεταλλάξεων β-θαλασσαιμίας και σχετικών με τη β αιμοσφαιρίνη SNPs, σε cffDNA που απομονώθηκε από μητρικό πλάσμα. Η δυνατότητα ανάλυσης πολυμορφισμών που σχετίζονται με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο επεκτείνει την εφαρμογή της NIPD και σε ζευγάρια με ίδιο μεταλλαγμένο αλληλόμορφο αλλά και στην περίπτωση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Η τελευταία έχει διαγνωσθεί επιτυχώς χρησιμοποιώντας εμβρυικά κύτταρα προερχόμενα από τη μητρική κυκλοφορία (Cheung *et al.*, 1996), αλλά όχι με cffDNA αφού προκαλείται από 2 πανομοιότυπα αντίγραφα μιας σημειακής μετάλλαξης και δεν μπορεί να καθορισθεί η προέλευση του DNA που αναλύεται.

Διάγνωση κυστικής ίνωσης

Η κυστική ίνωση προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 και κωδικοποιεί για ένα κανάλι ιόντων σημαντικό για την παραγωγή βλέννης. Δεδομένου ότι περισσότερες από 1000 μεταλλάξεις έχουν συσχετιστεί με κυστική ίνωση, ειδικές πατρικώς κληρονομούμενες μεταλλάξεις που όμως απουσιάζουν από το μητρικό γονιδίωμα έχουν ανιχνευτεί χρησιμοποιώντας cffDNA (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2002; Nasis *et al.*, 2004).

Οι τελευταίες εξελίξεις στην NIPD της κυστικής ίνωσης περιλαμβάνουν τη χρήση της τεχνικής SNaPshot. Με αυτήν ενισχύονται με PCR πατρικοί πολυμορφισμοί (μεταλλάξεις σημείου) και τα αποτελέσματα αναλύονται σε ηλεκτροφορόγραμμα. Προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι η πατρική μετάλλαξη να διαφέρει από τη μητρική. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η τεχνική αυτή είναι εύκολη, γρήγορη, με χαμηλό κόστος και κατάλληλη για μελλοντική κλινική εφαρμογή στη διάγνωση της κυστικής ίνωσης (Bustamante-Aragones *et al.*, 2008).

Διάγνωση νόσου Huntington's

Η Νόσος Huntington's είναι αυτοσωμική επικρατής νευρολογική ασθένεια που εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία.

Προκαλείται από αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων CAG (>36) 3 ζεύγη νουκλεοτιδίων στο HD γονίδιο (χρωμόσωμα 4). Χρησιμοποιώντας cffDNA έχει επιτευχθεί ανίχνευση 37 επαναλήψεων που όμως κληροδοτήθηκαν από τον πατέρα (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2003).

Ο απευθείας προσδιορισμός του αριθμού των επαναλήψεων CAG στο γονίδιο IT-15 (4p16.3) δεν είναι πάντα πληροφοριακός. Ταυτόχρονη ανάλυση πληροφοριακών STRs δίνει πιο ασφαλή αποτελέσματα στην NIPD της νόσου Huntington's και θα μπορούσε να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη και για άλλες ασθένειες (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Διάγνωση αχονδροπλασίας

Η αχονδροπλασία είναι μια επικρατής μορφή νανισμού που προκαλείται από σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο FGFR3 (χρωμόσωμα 4) που συμμετέχει στην ανάπτυξη των χόνδρων. Μία συγκεκριμένη μετάλλαξη που ευθύνεται για περισσότερο από το 98% των περιπτώσεων έχει ανιχνευθεί με cffDNA (Saito *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004a,2007a).

Διάγνωση μυοτονικής δυστροφίας

Η μυοτονική δυστροφία είναι μια επικρατής μορφή μυϊκής δυστροφίας όψιμης εμφάνισης που προκαλείται από αύξηση στον αριθμό των αντιγράφων (50-5000) μιας αλληλουχίας τριών νουκλεοτιδίων στο γονίδιο DMPK (χρωμόσωμα 19) το οποίο σχετίζεται με σκελετικούς μύες. Με χρήση cffDNA έχει ανιχνευτεί πατρικώς κληρονομούμενη επέκταση 70 επαναλήψεων (Amicucci *et al.*, 2000).

Διάγνωση συγγενούς υπερπλασίας των επινεφριδίων

Η εκ γενετής υπερπλασία των επινεφριδίων (ανεπάρκεια 21-υδροξυλάσης) είναι μια υπολειπόμενη αυτοσωμική ασθένεια που έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ανδρογόνων. Προκαλείται από διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο CYP21 (χρωμόσωμα 6).

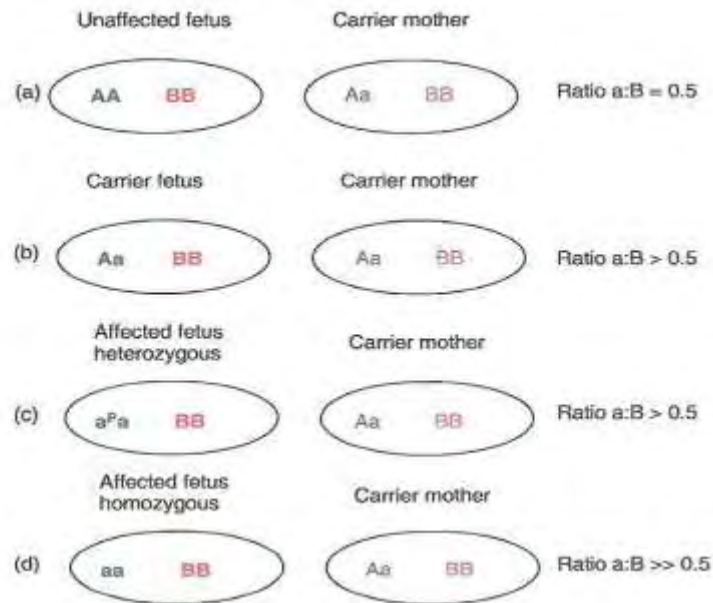
Μία στρατηγική NIPD περιλαμβάνει την ανίχνευση του φυσιολογικού πατρικού αλληλομόρφου σε εγκυμοσύνες υψηλού κινδύνου χρησιμοποιώντας πολυμορφικές περιοχές STRs που σχετίζονται με το γονίδιο (Chiu *et al.*, 2002a). Μια εναλλακτική επιλογή που απορρέει από το γεγονός ότι η ασθένεια αυτή προκαλεί στειρότητα σε θηλυκά άτομα αλλά δεν έχει καμιά επίδραση σε αρσενικά, είναι ο προσδιορισμός του φύλου με χρήση cffDNA για να διακριθούν εγκυμοσύνες με ρίσκο (Rijnders *et al.*, 2001; Bartha *et al.*, 2003) ούτως ώστε τα θηλυκά να λάβουν ανάλογη θεραπεία με στεροειδείς ορμόνες.

▪Ψηφιακή PCR- Σχετική Δόση Μετάλλαξης

Στην ψηφιακή PCR το DNA αραιώνεται σε συγκεντρώσεις κατά μέσο όρο μικρότερες του ενός μορίου ανά πηγαδάκι και αναλύεται σε εκατοντάδες έως χιλιάδες αντίγραφα (Vogelstein *et al.*, 1999). Κάποια πηγαδάκια θα είναι θετικά ενώ άλλα αρνητικά για το αμπλικόνιο στόχο. Δεδομένου ότι τα περισσότερα πηγαδάκια περιέχουν μόνο ένα μόριο DNA, η μέτρηση των θετικών επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του αυθεντικού DNA.

Η χρήση της Ψηφιακής PCR στην NIPD μονογονιδιακών ασθενειών θα μπορούσε να ανοίξει το δρόμο σε περιπτώσεις όπου οι γονείς φέρουν τις ίδιες μεταλλάξεις. Εκτός από την ενίσχυση αποκλειστικά πατρικών αλληλομόρφων που φέρουν τη μετάλλαξη, είναι εφικτή η σύγκριση των σχετικών ποσοτήτων του μεταλλαγμένου και του φυσιολογικού αλληλομόρφου στο μητρικό πλάσμα, έτσι ώστε να μπορεί να προσδιορισθεί η κληρονομούμενη δόση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου (Εικόνα 11).

Η προσέγγιση αυτή είναι γνωστή ως Σχετική Δόση της Μετάλλαξης (RMD-Relative Mutation Dosage) (Lun *et al.*, 2008; Zimmermann *et al.*, 2008). Αν το έμβρυο δεν έχει κληρονομήσει τη μετάλλαξη, τότε αναμένεται μια μειωμένη αντιπροσώπευση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου. Αν το έμβρυο είναι ομόζυγο για τη μετάλλαξη, αναμένεται μια υπερ- αντιπροσώπευση του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου ενώ αν το έμβρυο είναι ετερόζυγο για τη μετάλλαξη τότε τα δύο αλληλόμορφα θα αντιπροσωπεύονται εξίσου (Εικόνα 12).



Εικόνα 11. Πιθανό διάγραμμα για τη διάγνωση μονογονιδιακών ασθενειών απευθείας από ελεύθερο εμβρυϊκό DNA με Ψηφιακή PCR. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αντιδράσεις PCR ειδικές για το μητρικό αλληλόμορφο με τη μετάλλαξη (a). a). Αν το έμβρυο δεν έχει τη μητρική μετάλλαξη μόνο το μητρικό μεταλλαγμένο αλληλόμορφο θα εντοπιστεί και η αναλογία του προς το υγιές αλληλόμορφο ή κάποια άλλη χρωμοσωμική θέση θα μπορεί να υπολογιστεί. b). Αν το έμβρυο είναι φορέας της μητρικής μετάλλαξης, τότε η αναλογία a:B αναμένεται αυξημένη. c). Με τον ίδιο τρόπο επηρεάζεται η αναλογία αυτή όταν το έμβρυο πάσχει από την ασθένεια φέροντας 2 διαφορετικές μεταλλάξεις. d). Στην περίπτωση που το έμβρυο είναι ομόζυγο για τη μητρική μετάλλαξη αναμένεται μια ακόμη μεγαλύτερη αύξηση στην αναλογία a:B. (Zimmermann et al., 2008)

Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι χρειάζονται πολλοί κύκλοι PCR όταν το δείγμα περιέχει μικρή ποσότητα εμβρυϊκού DNA. Ωστόσο η Σχετική Δόση της μετάλλαξης (RMD) μπορεί να συνδυαστεί με Ψηφιακή επιλογή νουκλεϊκών οξέων βάσει μεγέθους (NASS) ώστε να πολλαπλασιαστούν τα μικρού μεγέθους τμήματα DNA και κατόπιν να ενισχυθούν περαιτέρω.

Οι Lun *et al.*, (2008) χρησιμοποίησαν ψηφιακή RMD ανάλυση του μητρικού πλάσματος για να προσδιορίσουν την κληρονομία από το έμβρυο ε- αιμοσφαιρίνης και μεταλλάξεων β-θαλασσαιμίας σε μητέρες ετερόζυγες για CD 41/42 και HbE G→A. Το ποσοστό επιτυχούς διάγνωσης ήταν 5/10 δείγματα. Σε 4 δείγματα δεν επιτεύχθηκε ενίσχυση των υπό μελέτη περιοχών εξαιτίας χαμηλής συγκέντρωσης DNA ενώ σε 1 η διάγνωση ήταν λανθασμένη.

Ωστόσο η τελειοποίηση αυτής της τεχνικής μπορεί να οδηγήσει στη χρήση της ως κλινικό διαγνωστικό τεστ ρουτίνας για την μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση μονογονιδιακών ασθενειών με cfDNA χωρίς περιορισμούς.

▪ Διάγνωση ανευπλοειδιών

Η χρήση του cfDNA στην NIPD ανευπλοειδιών παραμένει μια πρόκληση καθώς απαιτεί εντοπισμό, ποσοτικοποίηση και προσδιορισμό της χρωμοσωμικής προέλευσης μόνο του εμβρυϊκού τεμαχισμένου DNA που κυκλοφορεί στο μητρικό πλάσμα. Αντίθετα, τα εμβρυϊκά κύτταρα μετά τον εντοπισμό και την απομόνωσή τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με μεγαλύτερη ασφάλεια στη διάγνωση ανευπλοειδιών αφού περιέχουν το σύνολο των χρωμοσωμάτων.

Παρά τις δυσκολίες που ενέχει η NIPD ανευπλοειδιών, πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με αυτήν με αρκετά καλά αποτελέσματα. Χρειάζονται όμως πολλές μελέτες προκειμένου να τελειοποιηθούν οι τεχνικές και να εφαρμοσθεί στην κλινική πράξη η NIPD ανευπλοειδιών.

A. Ψηφιακή PCR

Το εμβρυϊκό συνυπάρχει με το μητρικό DNA στο πλάσμα του αίματος της μητέρας. Επομένως, ένα έμβρυο με τρισωμία 21, σε σύγκριση με ένα ευπλοειδικό, προσθέτει επιπλέον ποσότητες από ακολουθίες του χρωμοσώματος 21 σε απόλυτη αναλογία με τη συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA.

Για παράδειγμα, ένα δείγμα μητρικού πλάσματος από ευπλοειδική εγκυμοσύνη που περιλαμβάνει 100 ισοδύναμα γενώματος (genome-equivalents) (GE)/ml συνολικού DNA με 10 GE/ml DNA εμβρυϊκής προέλευσης (δεδομένου ότι η τυπική μέση συγκέντρωση εμβρυϊκού DNA για το 1^ο και 2^ο τρίμηνο της εγκυμοσύνης είναι 10%, Lun *et al.*, 2008) θα έπρεπε να περιλαμβάνει συνολικά 200 αντίγραφα (180 μητρικά + 20 εμβρυϊκά) ακολουθιών του χρωμοσώματος 21 ανά ml μητρικού πλάσματος.

Για μια εγκυμοσύνη με τρισωμικό έμβρυο ως προς το 21^ο χρωμόσωμα κάθε εμβρυϊκό θα συνεισέφερε 3 αντίγραφα του χρωμοσώματος 21, που θα οδηγούσε σε 210 αντίγραφα/ml (180 μητρικά + 30 εμβρυϊκά) ακολουθιών χρωμοσώματος 21 στο μητρικό πλάσμα.

Επομένως, όταν η συγκέντρωση εμβρυϊκού DNA είναι 10%, η ποσότητα των αλληλουχιών που προέρχονται από το χρωμόσωμα 21 θα είναι 1,05 φορές μεγαλύτερη από αυτή μιας ευπλοειδικής εγκυμοσύνης. Αυτός ο βαθμός ποσοτικής διαφοράς είναι δύσκολος να διακριθεί αξιόπιστα με ποσοτική φθορίζουσα PCR (Pohl *et al.*, 2004).

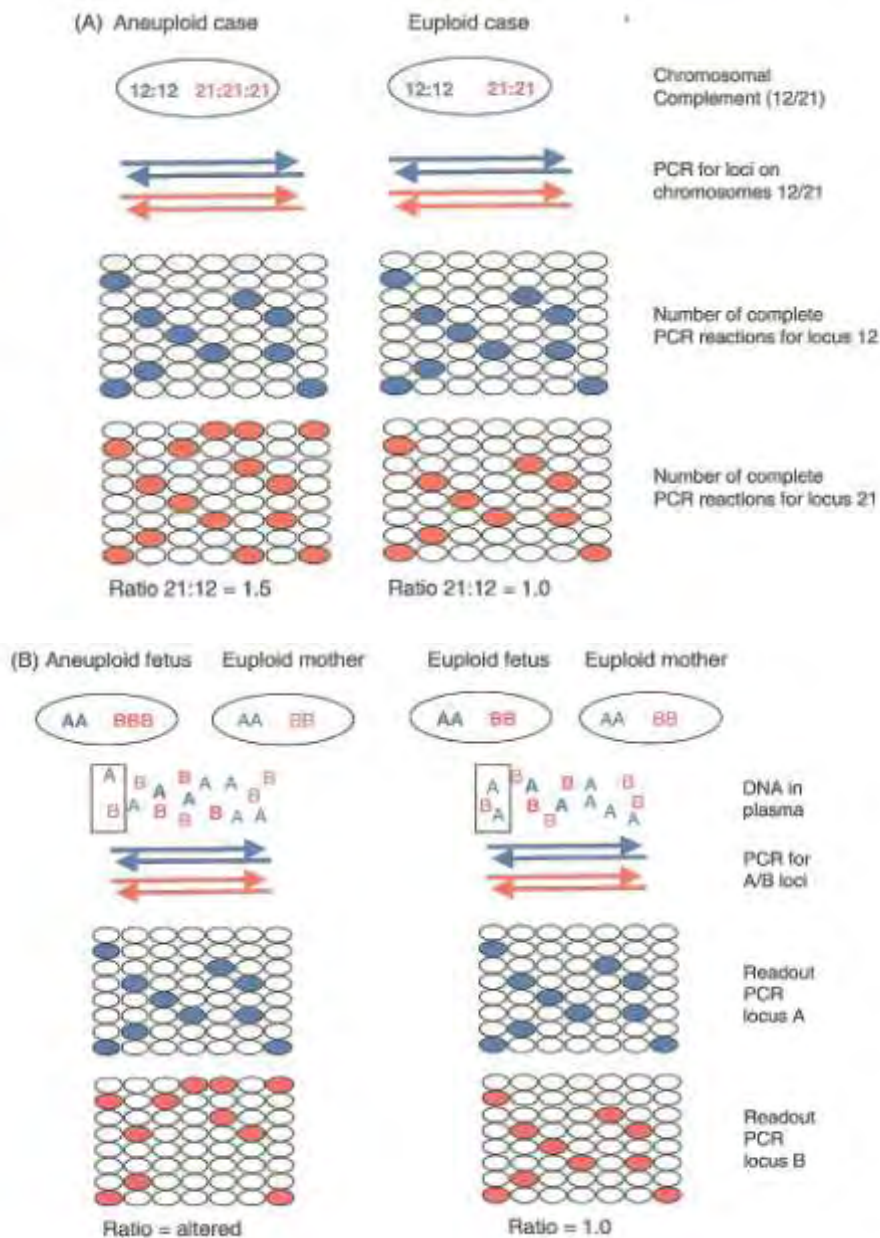
A.1 Ψηφιακή PCR- Σχετική Χρωμοσωμική Δόση

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ψηφιακή PCR για ένα αμπλικόνιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 και ένα άλλο σε διαφορετικό χρωμόσωμα, που θεωρείται χρωμόσωμα αναφοράς (Lo *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2007). Οι σχετικές ποσότητες των δύο αμπλικονίων συγκρίθηκαν με μία στρατηγική που ονομάστηκε **Σχετική Χρωμοσωμική Δόση (digital relative chromosome dosage-RCD)** (Lo *et al.*, 2007). Η στρατηγική αυτή παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 12A και 12B.

Παρόλο που στα έμβρυα με τρισωμία 21 αναμένεται υπερ-αντιπροσώπευση του αμπλικονίου του χρωμοσώματος 21, ο βαθμός αυτής εξαρτάται από τη συγκέντρωση του εμβρυϊκού DNA και επομένως είναι μικρότερος σε χαμηλές συγκεντρώσεις cfDNA. Για το λόγο αυτό απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός αναλυσεων ψηφιακής PCR για να εξασφαλιστεί στατιστική σημαντικότητα και να προσδιοριστεί με βεβαιότητα η παρουσία ή απουσία επιπλέον αντιγράφου του χρωμοσώματος 21 (Lo *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2007).

Χρήση της παραπάνω μεθόδου έδειξε ότι η NIPD τρισωμίας 21 πέτυχε σε 97% των περιπτώσεων μετά από εφαρμογή 7680 PCR αναλύσεις όταν το δείγμα περιείχε 25% εμβρυϊκό DNA (Lo *et al.*, 2007).

Μια ακόμα ομάδα επιστημόνων που επιβεβαίωσαν χρήση ψηφιακής PCR εντοπισμό υπερ-αντιπροσώπευσης του χρωμοσώματος 21 σε περιπτώσεις τρισωμίας 21 ήταν οι Fan *et al.* (2007), με μίγματα από DNA διαφόρων κυτταρικών τύπων. Οι ερευνητές αυτοί υποστήριξαν ότι η εφαρμογή της μεθόδου δεν περιορίζεται μόνο σε περιπτώσεις ετερόζυγων εμβρύων και δεν επηρεάζεται από το φύλο του εμβρύου. Τέλος διαθέτει ικανότητα εντοπισμού σημάτων παρουσία μωσαϊκών και μητρικού DNA.



Εικόνα 12. (Α) Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου που χρησιμοποίησαν οι Fan & Quake για τον προσδιορισμό τρισωμίας 21 με ψηφιακή PCR. Η PCR πραγματοποιήθηκε με χρήση εκκινητών και TaqMan ανιχνευτές για θέσεις στα χρωμοσώματα 21 και 12. Μετρήθηκαν οι θετικές αντιδράσεις για κάθε περιοχή και υπολογίστηκε η αναλογία. Στις περιπτώσεις τρισωμίας 21, αναμένεται αναλογία της τάξης του 1,5 ενώ στις ευπλοειδικές η αντίστοιχη αναλογία θα είναι 1. (Β) Πιθανό σχήμα για την ανίχνευση εμβρυϊκής ανευπλοειδίας απευθείας από το ελεύθερο DNA του μητρικού πλάσματος με χρήση ψηφιακής PCR. Όμοια με τον τρόπο που ήδη περιγράφηκε πραγματοποιείται PCR με χρήση ειδικών εκκινητών και TaqMan ανιχνευτές για θέσεις στα χρωμοσώματα A και B. Μετρώνται οι θετικές αντιδράσεις για κάθε περίπτωση και υπολογίζεται η αναλογία. Στις περιπτώσεις τρισωμίας για το χρωμόσωμα B, αναμένεται μια αναλογία μεγαλύτερη του 1, ενώ σε ευπλοειδικές η τελευταία θα είναι 1. (Zimmermann et al., 2008)

A.2 Ψηφιακή PCR – Χρωμοσωμική Δόση μετά από ενίσχυση ειδικά μεθυλιωμένης περιοχής εμβρυϊκού DNA

Η τεχνολογία της ψηφιακής PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει περιοχές με συγκεκριμένο πρότυπο μεθυλίωσης, σε μια διαδικασία όπου προηγείται αντίδραση πέψης του μη μεθυλιωμένου μητρικού DNA για να παραμείνει μόνο το μεθυλιωμένο εμβρυϊκό. Στη συνέχεια το αποτέλεσμα της PCR συγκρίνεται με το αντίστοιχο από ενίσχυση περιοχής σε άλλο χρωμόσωμα αναφοράς προκειμένου να υπολογιστεί η Χρωμοσωμική Δόση και να γίνει διάγνωση ανευπλοειδιών. Η προσέγγιση αυτή είναι γνωστή ως Χρωμοσωμική Δόση που βασίζεται στην Επιγενετική (Epigenetic Genetic Chromosome Dosage Approach- EGG).

Μια μελέτη στην οποία εφαρμόστηκε η προσέγγιση αυτή διέγνωσε με ευαισθησία 88,9% και ειδικότητα 96,3% 9 τρισωμίες 18 σε αρσενικά έμβρυα (Mann-Whitney test, $P = 0.029$). Η περιοχή του χρωμοσώματος 18 που ενισχύθηκε ήταν το γονίδιο VAPA- APCDD1, το οποίο είναι μεθυλιωμένο στο εμβρυϊκό αλλά όχι στο μητρικό DNA το οποίο μετά την απομόνωση απομακρύνθηκε με τη διαδικασία της πέψης. Η αναλογία του γονιδίου VAPA- APCDD1 προς την περιοχή ZFY βρέθηκε μεγαλύτερη σε όλες τις τρισωμίες που διαγνώστηκαν (Tsui et al., 2010).

Μια ακόμα μελέτη που χρησιμοποίησε την προσέγγιση της Χρωμοσωμικής δόσης με ενίσχυση ειδικά μεθυλιωμένων περιοχών εμβρυϊκού DNA διέγνωσε με ακρίβεια 96,5% 5 περιστατικά τρισωμίας 21 σε σύνολο 29 εμβρύων. Από τα 24 έμβρυα που διαγνώστηκαν ως φυσιολογικά στο 1 από αυτά η διάγνωση ήταν λανθασμένη. Ενισχύθηκε το γονίδιο HLCS (holocarboxylase synthetase) που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 και είναι μεθυλιωμένο μόνο στο εμβρυϊκό DNA, και υπολογίστηκε η αναλογία του ως προς περιοχή ZFY (Tong et al., 2010).

Η χρήση της ψηφιακής PCR στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση ανευπλοειδιών βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο και απαιτούνται πολλές έρευνες προκειμένου να βελτιωθούν τα πρωτόκολλα εφαρμογής της και να αυξηθούν τα επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητάς της.

B. Αναλογία μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών σε γονίδια με διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης μεταξύ μητέρας εμβρύου

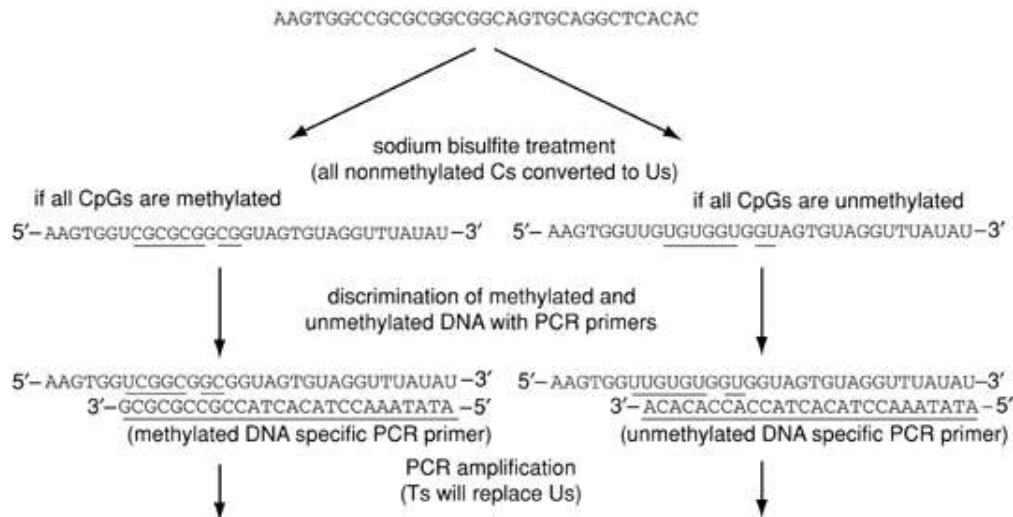
Το διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης μεταξύ μητρικού και εμβρυϊκού DNA έχει αξιοποιηθεί με διάφορους τρόπους ως εργαλείο για το διαχωρισμό και την περαιτέρω ανάλυση μόνο του εμβρυϊκού DNA. Μέχρι σήμερα έχουν προσδιορισθεί πλήθος γονιδίων που είναι διαφορετικά μεθυλιωμένα μεταξύ μητέρας-εμβρύου όπως το SERPINB5, το RASSF1A και πολλά άλλα που εντοπίζονται τόσο στο χρωμόσωμα 21 (Old *et al.*, 2007; Chim *et al.*, 2008) όσο και στα υπόλοιπα χρωμοσώματα.

Το γονίδιο SERPINB5, γνωστό και ως maspin, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18 και είναι υπομεθυλιωμένο στον πλακούντα και υπερμεθυλιωμένο στα μητρικά κύτταρα αίματος, γεγονός που τον καθιέρωσε ως τον πρώτο καθολικό μάρτυρα εμβρυϊκού DNA (Chim *et al.*, 2005).

Επιπλέον το SERPINB5 έχει δώσει μια αξιόπιστη ευκαιρία για εφαρμογή αυτού του διαφορετικού προτύπου μεθυλίωσης στην μη επεμβατική διάγνωση της τρισωμίας 18 (Tong *et al.*, 2006). Με τη χρήση μετατροπής με δισουλφίδιο, όπου οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλη, και PCR με ειδικούς εκκινητές για μεθυλιωμένο DNA, είναι εφικτή η ενίσχυση μόνο των επιθυμητών τμημάτων DNA (Εικόνα 13).

Στη συνέχεια με τον προσδιορισμό της αναλογίας αλληλομόρφων με διαφορετικούς πολυμορφισμούς SNPs, μπορεί να γίνει διάγνωση τρισωμίας 18 σε ετερόζυγα έμβρυα. Η μέθοδος αυτή είναι γνωστή ως **Αναλογία SNPs σε ειδικά μεθυλιωμένο DNA (Epigenetic SNP allelic ratio)** και πραγματοποιείται με ειδική PCR.

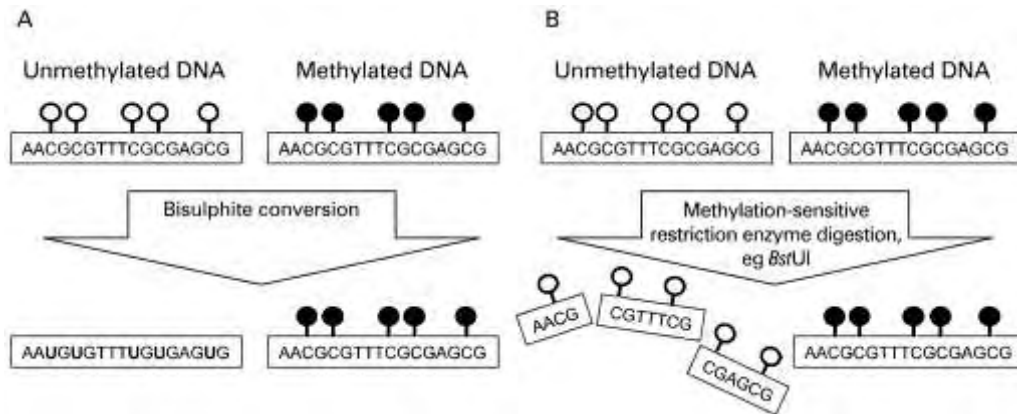
Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο όταν το έμβρυο να είναι **ετερόζυγο** για τον πολυμορφισμό στο SERPINB5 γονίδιο. Ένα ακόμα μειονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή με χρήση δισουλφιδίου, προκαλούν αποικοδόμηση του DNA μειώνοντας έτσι το DNA στόχο για περαιτέρω ανάλυση. Επίσης από την τελευταία διαδικασία προκαλούνται αλλαγές στην αλληλουχία του DNA.



Εικόνα 13. Διαδικασία μετατροπής με χρήση δισουλφιδίου και PCR ειδικής για μεθυλιωμένο DNA. Με τη διαδικασία αυτή όλες οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλη. Στη συνέχεια με χρήση ειδικών εκκινητών μεθυλιωμένων ή μη επιτυγχάνεται η ενίσχυση των επιθυμητών τμημάτων DNA με ειδική PCR. currentprotocols.com

Προκειμένου να αποφευχθούν οι αρνητικές συνέπειες της μετατροπής με χρήση δισουλφιδίου που σχετίζονται με αλλαγή στην αλληλουχία του DNA και αποικοδόμησή του, η τεχνική αυτή αντικαταστάθηκε από κάποιους ερευνητές με τη χρήση ειδικών ενζύμων περιορισμού που πέπτουν το υπομεθυλιωμένο DNA αφήνοντας το υπερμεθυλιωμένο ανέπαφο για περαιτέρω επεξεργασία με PCR (Εικόνα 14).

Με την εφαρμογή αυτής της τεχνικής ο RASSF1A καθιερώθηκε ως μάρτυρας εμβρυϊκού DNA (Chan *et al.*, 2006). Το γονίδιο αυτό όπως έχει ήδη αναφερθεί χρησιμοποιήθηκε στον προσδιορισμό Rhesus για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων που οφείλονται σε μικρή ποσότητα απομονωμένου DNA ή/και προβλήματα στη διαδικασία απομόνωσής του (Chiu *et al.*, 2007).



Εικόνα 14. Διάγραμμα που παρουσιάζει τις διαφορές μεταξύ της (Α) της bisulphite conversion και (Β) της χρήσης ενζύμων περιορισμού στην πέψη μη μεθυλιωμένου DNA. Τα μαύρα lollipops αντιπροσωπεύουν μεθυλιωμένες και τα άσπρα μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες. Hung *et al.* 2008

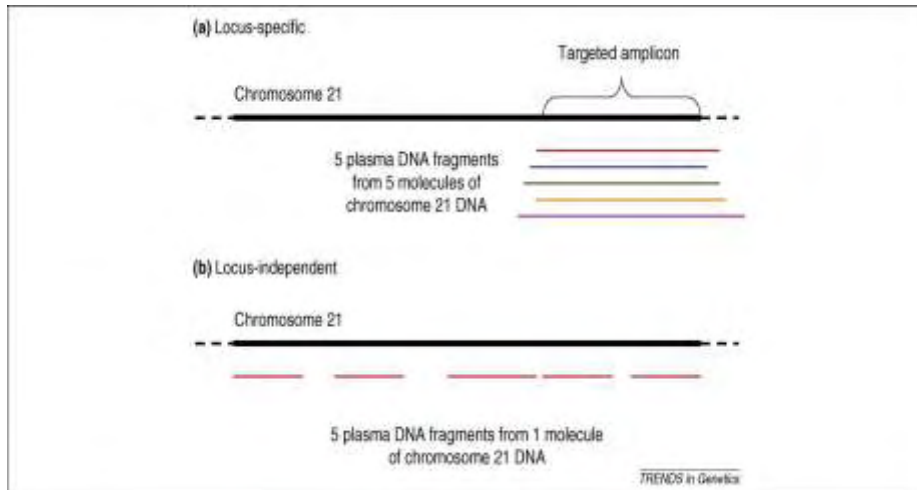
Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή θέτει τον περιορισμό το υπό μελέτη γονίδιο να είναι υπερμεθυλιωμένο στον πλακούντα σε σχέση με μητρικά κύτταρα και επιπλέον να υπάρχουν ανάλογες θέσεις κοπής που να αναγνωρίζονται από ειδικά ένζυμα περιορισμού.

Γ. Μαζική Παράλληλη Αλληλούχηση (Massive parallel sequencing)

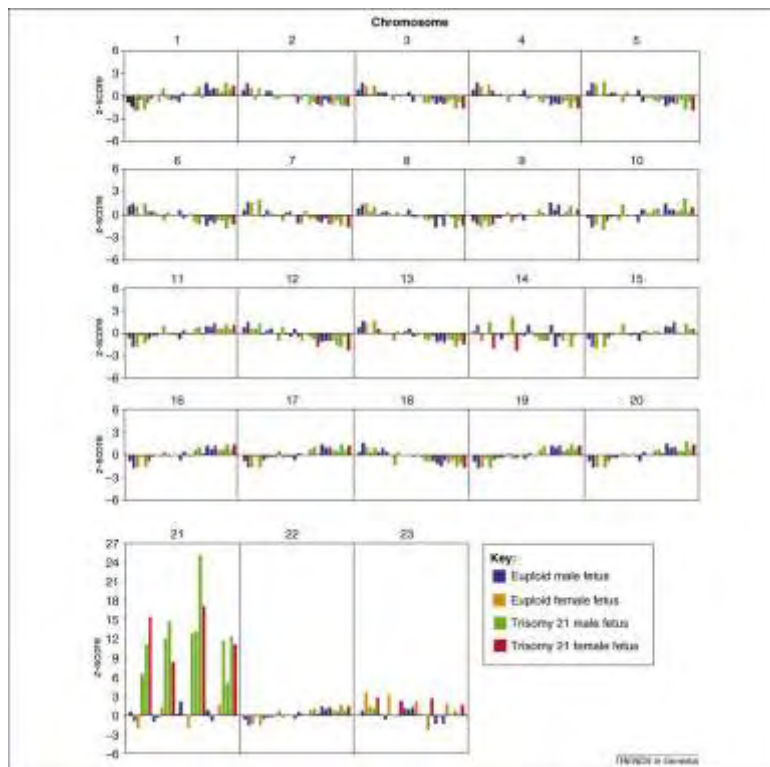
Δεδομένου ότι το ελεύθερο DNA του μητρικού πλάσματος είναι τεμαχισμένο για την ενίσχυσή του θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μια μέθοδος ανεξάρτητη μιας συγκεκριμένης θέσης σε αντίθεση με εφαρμογή ειδικής PCR. Έτσι ένα αντίγραφο για παράδειγμα του χρωμοσώματος 21 θα μετράται πολλές φορές και όχι μόνο μια όπως με τις μεθόδους που ενισχύουν συγκεκριμένες θέσεις στα χρωμοσώματα (Εικόνα 15) (Chiu *et al.*, 2009).

Οι Chiu *et al.* (2008) και οι Fan *et al.*, (2007) έδειξαν τη χρήση της μαζικής παράλληλης αλληλούχησης DNA από μητρικό πλάσμα για NIPD τρισωμίας 21 σε Illumina's Genome Analyzer platform (Bentley *et al.*, 2008).

Στη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται η αλληλουχία ενός μικρού τμήματος στο ένα άκρο κάθε μορίου DNA και ευθυγραμμίζεται (align) με τη βοήθεια υπολογιστή στο ανθρώπινο γονιδίωμα για να προσδιορισθεί η χρωμοσωμική του προέλευση (Εικόνα 16).



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση των μεθόδων που χρησιμοποιούν ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών στο γονιδίωμα (locus specific) και αυτών που ανεξάρτητες από τη θέση (locus independent). (a) Με τη χρήση αυτής της μεθόδου χρειάζεται να μετρηθούν 5 αντίγραφα συγκεκριμένης θέσης στο 21^ο χρωμόσωμα για να αποτελούν ένα σύνολο των 5. (b) Με τη μέθοδο αυτή 5 αντίγραφα από οποιοσδήποτε περιοχές στο 21^ο χρωμόσωμα θα μπορούσαν δυνητικά να αποτελούν ένα σύνολο των 5. (Chiu et al., 2009)



Εικόνα 16. Διάγνωση εμβρυϊκής τρισωμίας 21 με μαζική παράλληλη αλληλούχιση. Σε αυτή την προσέγγιση, γίνεται αλληλούχιση ενός τυχαίου αντιπροσωπευτικού μέρους των DNA μορίων του μητρικού πλάσματος. Στη συνέχεια η χρωμοσωμική προέλευση κάθε αλληλουχίας αναγνωρίζεται με μεθόδους βιοπληροφορικής. (Chiu et al., 2009)

Οι Fan et al., (2008), χρησιμοποίησαν shotgun sequencing για προσδιορισμό ανευπλοειδιών από το ελεύθερο DNA του μητρικού πλάσματος. Για κάθε ασθενή πραγματοποιήθηκαν 5 εκατομμύρια αναγνώσεις αλληλουχιών. Η πυκνότητα των αναγνώσεων για κάθε χρωμόσωμα συγκρίθηκε με την αντίστοιχη που λαμβάνεται από φυσιολογικό δείγμα γενωμικού DNA και βρέθηκε ότι στην περίπτωση τρισωμίας 21, οι προερχόμενες από αυτό αλληλουχίες ήταν 4-18% περισσότερες από αυτές στις δισωμικές περιπτώσεις.

Πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής αποτελούν η επιτυχημένη διάγνωση των βασικών τρισωμιών, 13, 18 και 21, το γεγονός ότι είναι ανεξάρτητη από την ύπαρξη πολυμορφισμών και μπορεί να εφαρμοσθεί σε όλες τις εγκυμοσύνες και τέλος ότι έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις.

Βασικό μειονέκτημά της όμως είναι το υψηλό της κόστος και ο μεγάλος αριθμός δεδομένων που αναλύονται και ερμηνεύονται. Με τη σημερινή μορφή δεν είναι εφικτή η υιοθέτησή της σε έλεγχο ρουτίνας (throughput screening).

2.2 Εμβρυϊκό mRNA- Διάγνωση Ανευπλοειδιών

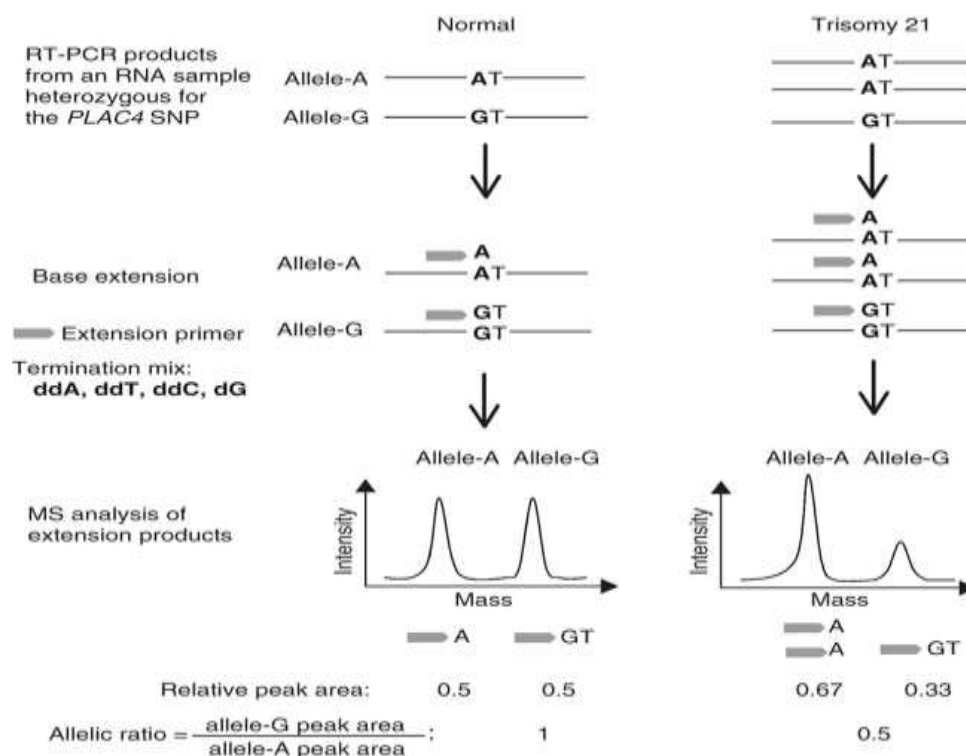
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα μόρια RNA αντιπροσωπεύουν έναν από τους μάρτυρες εμβρυϊκού γενετικού υλικού και μπορούν να αποτελέσουν στόχο προς ενίσχυση για περαιτέρω ανάλυση. Ένα ανάλογο γονίδιο για το οποίο το mRNA στο μητρικό πλάσμα έχει αποδειχθεί ότι είναι αποκλειστικά εμβρυϊκής προέλευσης είναι το placenta-specific 4 (PLAC4) (Lo et al., 2007). Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 21. Δεδομένης της θέσης του, το mRNA που προκύπτει από τη μεταγραφή του έχει χρησιμοποιηθεί στην NIPD τρισωμίας 21 με τη μέθοδο Αναλογίας μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNP- allelic ratio) (Lo et al., 2007).

Με τη μέθοδο αυτή υπολογίζεται η αναλογία αλληλομόρφων με διαφορετικές μεταλλάξεις σημείου. Πιο συγκεκριμένα, το mRNA μετά την απομόνωσή του από το μητρικό πλάσμα υφίσταται αντίστροφη PCR, αντίδραση επέκτασης βάσης και ανάλυση των αποτελεσμάτων με φασματογράφο μάζας.

Στην περίπτωση εμβρύου **ετερόζυγου** για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, λαμβάνονται 2 ισοϋψείς κορυφές (αναλογία 1:1) όταν πρόκειται για φυσιολογική κύηση και 2 κορυφές, η μια διπλάσια της άλλης (αναλογία 2:1) όταν το έμβρυο πάσχει από τρισωμία 21 (Εικόνα 17).

Η ευαισθησία της μεθόδου RNA-SNP-allelic ratio στη διάγνωση τρισωμίας από cfDNA μητρικού πλάσματος υπολογίστηκε στο 90%, ενώ η ειδικότητά της στο 96,5% (Lo *et al.*, 2007).

Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να εφαρμοσθεί μόνο σε περιπτώσεις που το έμβρυο είναι ετερόζυγο για τον υπό εξέταση πολυμορφισμό. Αυτό προϋποθέτει ότι οι γονείς θα διαθέτουν διαφορετικά SNPs στο γονίδιο PLAC4. Έτσι η κλινική εφαρμογή της μεθόδου είναι περιορισμένη.



Εικόνα 17. Μέθοδος RNA-SNP allelic ratio σε ετερόζυγα έμβρυα και MS (mass spectrometry). Το RNA μετά την απομόνωσή του υφίσταται RT-PCR, αντίδραση επέκτασης βάσης και ανάλυση των αποτελεσμάτων σε φασματογράφο μάζας. Στην περίπτωση φυσιολογικής κύησης λαμβάνονται 2 ισοϋψείς κορυφές (αναλογία 1:1) ενώ στην περίπτωση τρισωμίας 21 λαμβάνονται 2 κορυφές, η μια διπλάσια της άλλης (αναλογία 2:1). (Lo *et al.* 2007)

Σε πρόσφατη έρευνα για τη χρήση του mRNA στην NIPD τρισωμίας 21, εξετάστηκαν 153 δείγματα μητρικού πλάσματος γυναικών που κυοφορούσαν φυσιολογικά έμβρυα και έμβρυα με τρισωμία 21 (Tsui *et al.*, 2010). Για τα δείγματα στα οποία το έμβρυο ήταν ετερόζυγο για τον υπό μελέτη SNP πολυμορφισμό, μετρήθηκε η αναλογία των αλληλομόρφων τόσο με συμβατικές μεθόδους (φασματογράφο μάζας-MS), όσο και με ψηφιακές (ψηφιακή PCR). Για εγκυμοσύνες με έμβρυα ομόζυγα για το SNP, υπολογίστηκε και η συνολική συγκέντρωση PLAC4 mRNA στο μητρικό πλάσμα με PCR πραγματικού χρόνου και ψηφιακή PCR (Tsui *et al.*, 2010).

Με την RNA-SNP προσέγγιση επιτεύχθηκε διάγνωση τρισωμίας 21 με ευαισθησία 100% (95% CI, 40.2%–100%), και ειδικότητα 89.7% (95% CI, 78.8%–96.1%), τόσο με τη χρήση φασματογράφου μάζας (MS) όσο και Ψηφιακής PCR.

Στην προσέγγιση με ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA, οι περιοχές κάτω από τις ROC καμπύλες ήταν 0,859 0.859 (95% CI, 0.741– 0.903) και 0.833 (95% CI, 0.770–0.923).

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι η ποσοτικοποίηση του PLAC4 mRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε συνέργεια με την μέθοδο αναλογίας SNPs για να αυξήσει τον αριθμό των περιστατικών στα οποία μπορεί να εφαρμοσθεί NIPD τρισωμίας 21, ώστε να μην περιλαμβάνονται μόνο περιπτώσεις με ετερόζυγα έμβρυα.

Βασικό πλεονέκτημα της χρήσης RNA μητρικού πλάσματος στην NIPD είναι η ύπαρξη μιας ενδογενούς διαδικασίας πολλαπλασιασμού με την οποία ένα γονίδιο μεταγράφεται σε πολλαπλά αντίγραφα mRNA. Ένα ακόμα πλεονέκτημα είναι ότι τα μόρια RNA μπορούν να εντοπιστούν εύκολα με αντίστροφη PCR ή άλλες διαδικασίες πολλαπλασιασμού (Lo *et al.*, 2007).

Τελευταίες εξελίξεις στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση ανευπλοειδιών

Οι τεχνικές που αναφέρθηκαν ενέχουν πολλούς περιορισμούς ως προς την κλινική εφαρμογή τους σε όλες τις εγκυμοσύνες, όπως για παράδειγμα η εξάρτηση από την ύπαρξη ετεροζυγωτίας και διαφορετικών πολυμορφισμών. Επιπλέον μπορεί να απαιτούν συγκεκριμένο πρότυπο μεθυλίωσης ή/και συγκεκριμένες θέσεις κοπής από ένζυμα περιορισμού, μπορεί να προκαλούν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA και αποικοδόμησή του, ή να έχουν υψηλό κόστος. Επιπρόσθετα, καμία από όσες αναφέρθηκαν δεν έχει ευαισθησία και ειδικότητα ανίχνευσης ανευπλοειδιών 100%.

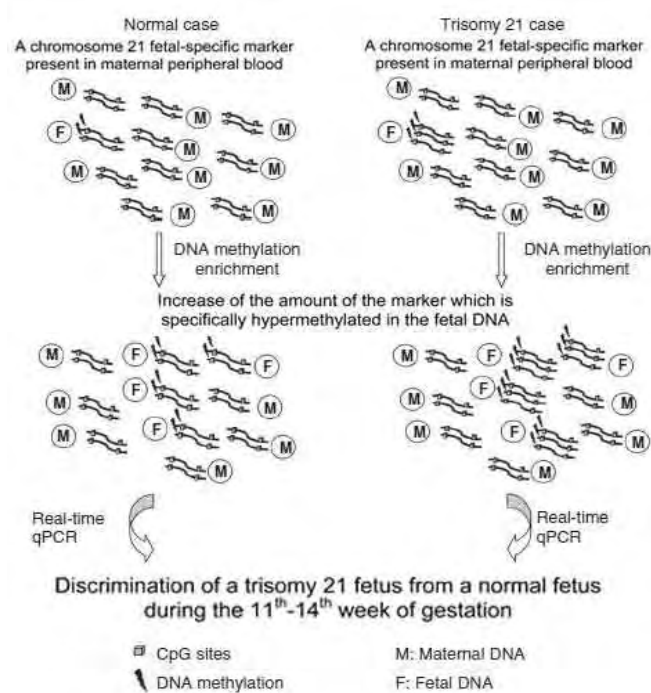
Πρόσφατα μια νέα τεχνική γνωστή ως Ανοσοκαθίζηση Μεθυλιωμένου DNA (MeDiP- methylated DNA immunoprecipitation) (Rakyan *et al.*, 2008; Parageorgiou *et al.*, 2009), άνοιξε το δρόμο για τη NIPD ανευπλοειδιών με απόλυτη ευαισθησία και ειδικότητα, και με δυνατότητα εφαρμογής από κάθε εργαστήριο και για όλες τις εγκυμοσύνες χωρίς περιορισμούς (Parageorgiou *et al.*, 2011).

Η MeDiP χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα ειδικό για την 5- μεθυλ-κυτιδίνη για να εντοπίσει τις μεθυλιωμένες περιοχές και έτσι να εμπλουτίσει το ειδικά μεθυλιωμένο εμβρυϊκό DNA (Weber *et al.*, 2005).

Οι Parageorgiou *et al.*, (2009) χρησιμοποίησαν αυτή την τεχνική για να ερευνήσουν το πρότυπο μεθυλίωσης των χρωμοσωμάτων 13, 18, 21, X και Y, όπου εντόπισαν περισσότερες από 2000 διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (DMRs) μεταξύ εμβρύου-μητέρας. Επιπλέον απέδειξαν ότι αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά και ως μέθοδος εμπλουτισμού του ελεύθερου εμβρυϊκού DNA.

Σε μεταγενέστερη έρευνά τους οι Parageorgiou *et al.*, (2011) χρησιμοποίησαν την παραπάνω μέθοδο σε συνδυασμό με ποσοτική φθορίζουσα PCR και με βιοπληροφορική για την επιτυχή διάγνωση τρισωμίας 21.

Η αρχική υπόθεση ήταν ότι θα μπορούσε να επιτευχθεί διαχωρισμός των φυσιολογικών από τις τρισωμικές κηύσεις συγκρίνοντας τις τιμές που θα λαμβάνονταν με χρήση επιλεγμένων, και όχι μίας μόνο, διαφορετικά μεθυλιωμένων περιοχών (DMRs) στο χρωμόσωμα 21. Η σχηματική αναπαράσταση της προσέγγισης αυτής που βασίζεται στο ειδικά μεθυλιωμένο εμβρυϊκό DNA παρουσιάζεται στην εικόνα 18.



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της προσέγγισης που βασίζεται στην αναλογία εμβρυϊκού μεθυλιωμένου DNA. Ένα έμβryo με τρισωμία 21 έχει ένα επιπλέον αντίγραφο της ειδικά μεθυλιωμένης περιοχής σε σύγκριση με ένα φυσιολογικό έμβryo. Ο εμπλουτισμός του cfDNA με ειδικό αντίσωμα που ακολουθείται από qPCR πραγματικού χρόνου μιας περιοχής ειδικά μεθυλιωμένης στο εμβρυϊκό DNA επιτρέπει μια σχετική ποσοτικοποίηση του cfDNA σε τρισωμικές και φυσιολογικές περιπτώσεις. (Parageorgiou *et al.*, 2011)

Το ελεύθερο εμβρυϊκό DNA θα πρέπει να είναι υπερμεθυλιωμένο στις θέσεις που εξετάζονται προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για τη χρωμοσωμική δόση.

Αρχικά επέλεξαν ένα υποσύνολο διαφορετικά μεθυλιωμένων περιοχών (DMRs-Differentially Methylated Regions) του χρωμοσώματος 21 και υπολόγισαν την αναλογία του ειδικά μεθυλιωμένου εμβρυϊκού DNA προς τον μέσο όρο σε φυσιολογικές και τρισωμικές περιπτώσεις για κάθε μία από 12 περιοχές σε **20 τρισωμικές και 20 ευπλοειδικές κήσεις (Εικόνα 18).**

Η αναλογία αυτή βρέθηκε **μεγαλύτερη του 1** όταν επρόκειτο για **τρисωμία 21** και **μικρότερη του 1** όταν επρόκειτο για **φυσιολογική κήση**. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε επιτυχής διάκριση των τρισωμικών από τις ευπλοειδικές κήσεις.

Στη συνέχεια, βάσει της στάθμης σημαντικότητας της τιμής κάθε περιοχής, δημιουργήθηκε με στατιστικό πρόγραμμα (Wilks' Lambda) μαθηματικός τύπος με ικανότητα πρόβλεψης της τρισωμίας 21:

$$\triangleright D = -6,331 + 0,959 X_{EP4} + 1,188 X_{EP5} + 0,424 X_{EP6} + 0,621 X_{EP7} + 0,028 X_{EP8} + 0,387 X_{EP10} - 0,683 X_{EP11} + 0,897 X_{EP12}$$

όπου $D =$ Discriminating value- Τιμή διαχωρισμού, $X_{EPn} =$ τιμή αναλογίας κάθε περιοχής, $n =$ αριθμός διαφορετικά μεθυλιωμένης περιοχής

Αποδείχθηκε ότι όταν η τιμή διαχωρισμού είναι **μεγαλύτερη του 0 τότε πρόκειται για κύηση με Τρισωμία 21**, ενώ όταν είναι **μικρότερη ή ίση του 0, πρόκειται για φυσιολογική κύηση**.

Η ισχύς αυτού του τύπου επιβεβαιώθηκε σε 40 τυφλά δείγματα όπου προσδιορίστηκαν με ευαισθησία και ειδικότητα 100% όλες οι τρισωμικές κυήσεις.

Η έρευνα των Parageorgiou *et al.*, 2011 αποτελεί τη μοναδική μέχρι σήμερα που πέτυχε διάγνωση τρισωμίας 21 με ευαισθησία και ειδικότητα 100%. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή, έχει προοπτική να εφαρμοσθεί στη διάγνωση και άλλων σημαντικών ανευπλοειδιών, αν ληφθούν υπόψη τα αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας σχετικά με τη μεθυλίωση στα χρωμοσώματα 13, 18, X και Y (Parageorgiou *et al.*, 2009).

Η τεχνολογία της ανοσοκαθίζησης με αντισώματα σε συνδυασμό με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου και βιοπληροφορική είναι ακόμα σε πειραματικό στάδιο. Ωστόσο η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά της έχουν ανοίξει το δρόμο προς την μελλοντική εφαρμογή της στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση των κυριότερων ανευπλοειδιών με ελεύθερο εμβρυϊκό DNA.

Συμπεράσματα

Ο προγεννητικός έλεγχος αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της καθημερινής μαιευτικής πράξης. Για την πραγματοποίηση του όμως απαιτείται ανάλυση εμβρυϊκού υλικού που λαμβάνεται με επεμβατικές μεθόδους όπως η αμνιοπαρακέντηση και η βιοψία τροφοβλάστης, οι οποίες ενέχουν μικρό αλλά υπαρκτό κίνδυνο αποβολής (~1%). Ως εκ τούτου, αναζητούνται συστηματικά μη επεμβατικοί τρόποι λήψης εμβρυϊκού υλικού, για να μπορεί να εφαρμοστεί η προγεννητική διάγνωση σε όλες τις εγκύους, ανεξαρτήτως ηλικίας ή αντικειμενικού κινδύνου που έχουν να αποκτήσουν παιδί με κάποιο γενετικό νόσημα.

Τα εμβρυϊκά κύτταρα και τα εμβρυϊκά νουκλεϊκά οξέα που απομονώνονται από το μητρικό πλάσμα αποτελούν πολύ σημαντικό βήμα προς την κατεύθυνση αυτή. Εμβρυϊκά τροφοβλαστικά αλλά και εμπύρηνια ερυθροκύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση φύλου, θαλασσαιμιών και ανευπλοειδιών. Ωστόσο ο πολύ μικρός αριθμός τους στην κυκλοφορία καθιστά δύσκολη την απομόνωσή τους, ακόμα και με τη χρήση μεθόδων εμπλουτισμού. Επιπλέον η αποπτωτική φύση των NRBCs δημιουργεί προβλήματα στη εφαρμογή της FISH αλλά της single cell PCR. Βασικά μειονεκτήματα της τελευταίας μεθόδου αποτελούν η πιθανότητα επιμόλυνσης και το φαινόμενο μη πολλαπλασιασμού του ενός αλληλομόρφου (ADO). Επομένως για την εφαρμογή της απαιτούνται δείκτες για να προσδιορίζεται η προέλευση του γενετικού υλικού και μεγάλος αριθμός κυττάρων για την αποφυγή λανθασμένης διάγνωσης εξαιτίας ADO. Το τελευταίο όμως δεν είναι ακόμη εφικτό παρά τις προόδους που έχουν γίνει στα πρωτόκολλα απομόνωσης εμβρυϊκών κυττάρων από μητρική κυκλοφορία.

Παρά τις δυσκολίες που αναφέρθηκαν, οι έρευνες για τη χρήση των εμβρυϊκών κυττάρων στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση συνεχίζονται. Η χρήση τροφοβλαστικών κυττάρων από διατραχηλική συλλογή είναι σε πειραματικό στάδιο αλλά οι επιστήμονες δείχνουν αισιόδοξοι. Επιπλέον η χρήση αρχέγονων εμβρυϊκών ερυθροβλαστών για την επαγωγή Πολυδύναμων Βλαστικών Κυττάρων που θα καλλιεργηθούν και θα δώσουν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων διαθέσιμων για ανάλυση, αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προοπτική.

Κάτι τέτοιο βρίσκεται σε πολύ πρώιμο στάδιο, καθότι δεν έχει επιτευχθεί ακόμα σε εμβρυϊκά κύτταρα μητρικού πλάσματος, αλλά μόνο σε κύτταρα αμνιακού υγρού και τροφοβλάστης, αλλά αν επιτευχθεί θα ανοίξει το δρόμο τόσο στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση με εμβρυϊκά κύτταρα όσο και στην κυτταρική θεραπεία.

Αντίθετα από τα εμβρυϊκά κύτταρα, το εμβρυϊκό DNA χρησιμοποιείται ήδη στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση του φύλου, του Rhesus και σε κάποιες περιπτώσεις μονογονιδιακών ασθενειών όταν η πατρική μετάλλαξη διαφέρει της μητρικής. Η βελτιστοποίηση της ψηφιακής PCR, θα βοηθήσει στη διάγνωση μονογονιδιακών νοσημάτων σε κάθε περίπτωση ανεξαρτήτως ομοιότητας μεταξύ πατρικών και μητρικών μεταλλάξεων.

Τέλος η τεχνολογία της ανοσοκαθίζησης με χρήση αντισωμάτων για μεθυλιωμένο DNA, σε συνδυασμό με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου και βιοπληροφορική έχει προοπτική να εφαρμοστεί στη μη επεμβατική προγεννητική διάγνωση των κυριότερων ανευπλοειδιών χάρη στην υψηλή ευαισθησία και ειδικότητά της (100%).

Οι νέες εξελίξεις στον τομέα της μη επεμβατικής προγεννητικής διάγνωσης είναι πιθανό ακόμη και μέσα στα επόμενα 5 έτη να καταστήσουν εφικτή εκτός από τη διάγνωση φύλου, Rhesus και μονογονιδιακών ασθενειών, αρχικά τη διάγνωση των συχνοτέρων αριθμητικών ανωμαλιών στο αίμα της εγκύου και στη συνέχεια τη διάγνωση όλων των χρωμοσωματικών ανωμαλιών.

Βιβλιογραφία

- Adinolfi M, el-Hashemite N, Sherlock J, Ward RH, Petrou M, Rodeck C. Prenatal detection of Hb mutations using transcervical cells. *Prenat Diagn* 1997;17:539–43.
- Adinolfi M, Sherlock J, Kemp T, Carritt B, Soothill P, Kingdom J, et al. Prenatal detection of fetal RhD DNA sequences in transcervical samples. *Lancet* 1995;345:318–9.
- Amaral D., Credidio D, Pellegrino J, Castilho L. Fetal RHD Genotyping by Analysis of Maternal Plasma in a Mixed Population. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2011; 25 : 100–104.
- Avent ND. The rhesus blood group system: Insights from recent advances in molecular biology. *Transfus Med Rev* 1999;13:245–266.
- Anthony N. Imudia, MD, Sanjeev Kumar, MD, Michael P. Diamond, MD, Alan H. DeCherney, MD, and D. Randall Armant, PhD. Transcervical retrieval of fetal cells in the Practice of modern medicine: a review of the current Literature and future direction. *Fertil Steril*. 2010 April ; 93(6): 1725–1730.
- Avent ND, Chitty LS. Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenat Diagn* 2006;26: 598–603.
- Avent ND, Plummer ZE, Madgett TE, Maddocks DG, Soothill PW. Post-genomics studies and their application to non-invasive prenatal diagnosis. *Sem Fetal Neonat Med* 2008;13:91–98.
- Babochkina T, Mergenthaler S, Lapaire O *et al*. Evaluation of a soybean lectin-based method for the enrichment of erythroblasts. *J Histochem Cytochem* 2005; **53**: 329–330.
- Bahado-Singh RO, Kliman H, Feng TY, Hobbins J, Copel JA, Mahoney MJ. First-trimester endocervical irrigation: feasibility of obtaining trophoblast cells for prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol* 1995;85:461–4.
- Bartha JL, Finning K, Soothill PW. Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol* 2003;101:1135–1136.
- Benachi A, Yamgnane A, Olivi M, Dumez Y, Gautier E, Costa JM. Impact of formaldehyde on the in vitro proportion of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem* 2005;51:242–244.
- Benirschke K. Anatomical relationship between fetus and mother. *Ann NY Acad Sci* 1994; **731**: 9–20.
- Bentley, D.R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008 456, 53–59
- Bertero MT, Camaschella C, Serra A, Bergui L, Caligaris- Cappio F. Circulating ‘trophoblast’ cells in pregnancy have maternal genetic markers. *Prenat Diagn* 1988; **8**: 585–590.
- Bhat NM, Bieber MM, Teng NN. One-step enrichment of nucleated red blood cells.A potential application in perinatal diagnosis. *J Immunol Meth* 1993; **158**: 277–280.
- 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**: 3279–3283.
- 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**: 705–708.
- Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997; **61**: 822–829.

- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG *et al.* Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn* 2002; **22**: 609–615.
- Bigbee WL, Grant SG. Use of allele-specific glycophorin A antibodies to enumerate fetal erythroid cells in maternal circulation. *Ann NY Acad Sci* 1994; **731**: 128–132.
- Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005; **51**:312–320.
- Bohmer RM, Johnson KL, Bianchi DW. Fetal and maternal progenitor cells in co-culture respond equally to erythropoietin. *Prenat Diagn* 2001; **21**: 818–823.
- Bohmer RM, Stroh HP, Johnson KL, LeShane ES, Bianchi DW. 2002. Fetal cell isolation from maternal blood cultures by flow cytometric hemoglobin profiles. *Fetal Diagn Ther* 17:83–89.
- Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V, Alechina R, Molyaka Y, et al. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clin Chem* 2000; **46**: 1078–1084.
- 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.
- Bulmer JN, Cioni R, Bussani C, Cirigliano V, Sole F, Costa C, et al. HLA-G positive trophoblastic cells in transcervical samples and their isolation and analysis by laser microdissection and QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003; **23**:34–9.
- Busch J, Huber P, Holtz J, Pfluger E, Radbruch A. Simple and fast 'double-MACS' sorting of fetal erythroblasts from maternal blood for PCR-based paternity analysis. *Ann NY Acad Sci* 1994; **731**: 144–146.
- Bussani C, Cioni R, Mattei A, Fambrini M, Marchionni M, Scarselli G. Prenatal diagnosis of common aneuploidies in transcervical samples using quantitative fluorescent-PCR analysis. *Mol Diagn Ther* 2007; **11**:117–21.
- Bussani C, Cioni R, Scarselli B, Barciulli F, Bucciattini S, Simi P, et al. Strategies for the isolation and detection of fetal cells in transcervical samples. *Prenat Diagn* 2002; **22**:1098–101.
- Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Ramos C. New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma. *Journal of Cystic Fibrosis* 7 2008; 505–510.
- Cacheux V, Milesi-Fluet C, Tachdjian G, Druart L, Bruch JF, Hsi BL, Uzan S. et al (1992) Detection of 47,XYY trophoblast fetal cells in maternal blood by fluorescence in situ hybridization after immunomagnetic lymphocyte depletion and flow cytometric sorting. *Fetal Diagn Ther* 7:190-194
- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S *et al.* Expandability of haemopoietic progenitors in first trimester fetal and maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2002; **22**: 463–469.
- Chan KCA, Zhang J, Hui ABY, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DWS, Lo YMD. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; **50**:88–92.
- Chan KCA, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RWK, Leung TN, Lau TK, Chim SSC, Chung GTY, Nicolaidis KH et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006b; **52**:2211–2218.
- Chen H, Griffin DK, Jestice K, Hackett G, Cooper J, Ferguson-smith MA. 1998. Evaluating the culture of fetal erythroblasts from maternal blood for noninvasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 18:883–892.

- Chim SSC, Tong YK, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chan LYS, Oudejans CBM, Ding C, Lo YMD. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14753–14758.
- Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung Ty, Lau Tk, Chiu RWK, Dennis Lo YM. Detection and characterization of placental MicroRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 2008b;54:482–490.
- Chinnapapagari SKR, Holzgreve W, Lapaire O, Zimmermann B, Hahn S. Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. *Clin Chem* 2005;51:652–655.
- Chiu RWK, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YMD. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002a; 48:778–780.
- Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, Chui DH, Lo YD. Prenatal exclusion of [beta] thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002b;360:998–1000.
- Chiu RWK, Lui Wb, Cheung Mc, Kumta N, Farina A, Banzola I, Grotti S, Rizzo N, Haines CJ, Lo YMD. Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2006;52:313–316.
- Chiu RWK, Cantor CR, and Lo YMD. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends in Genetics* 2009 Vol.25 No.7.
- Chung GTY, Chiu RWK, Chan KCA, Lau TK, Leung TN, Lo YMD. Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment. *Clin Chem* 2005;51:655–658.
- Ciaranfi A, Curchod A, Odartchenko N. [Post-partum survival of fetal lymphocytes in the maternal blood]. *Schweiz Med Wochenschr* 1977; **107**: 134–138. (In French.)
- Cicero S, Curcio P, Papageorgiou A, Sonek J, Nicolaides K. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11–14 weeks of gestation: an observational study. *Lancet* 2001; **358**: 1665–1667.
- Cicero S, Avgidou K, Rembouskos G, Kagan KO, Nicolaides KH. Nasal bone in first-trimester screening for trisomy 21. *Am J Obstet Gynecol* 2006; **195**: 109–114.
- Cioni R, Bussani C, Bucciantini S, Scarselli G. Fetal cells in a transcervical cell sample collected at 5 weeks of gestation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2005; 18:271–3.
- Cioni R, Bussani C, Scarselli B, Bucciantini S, Marchionni M, Scarselli G. Comparison of two techniques for transcervical cell sampling performed in the same study population. *Prenat Diagn* 2005;25:198–202.
- Clayton EM Jr, Feldhaus WD, Whitacre FE. Fetal erythrocytes in the maternal circulation of pregnant women. *Obstet Gynecol* 1964; **23**: 915–919.
- Coata G, Tilesi F, Fizzotti M, Lauro V, Pennacchi L, Tabilio A, Di Renzo GC. 2001. Prenatal diagnosis of genetic abnormalities using fetal CD34+ stem cells in maternal circulation and evidence they do not affect diagnosis in later pregnancies. *Stem Cells* 19:534-542.
- Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *N Engl J Med* 2002;346:1502.
- 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.
- Daniels GL, Faas BHW, Green CA, et al. 1998. The Rh VS and V blood group polymorphisms in Africans: a serological and molecular analysis. *Transfusion* 38: 951–958.
- de Graaf IM, Jakobs ME, Leschot NJ, Ravkin I, Goldbard S, Hoovers JM. Enrichment, identification and analysis of fetal cells from maternal blood: evaluation of a prenatal diagnosis system. *Prenat Diagn* 1999; **19**: 648–652.

- DeMaria MA, Zheng YL, Zhen D, Weinschenk NM, Vadnais TJ, Bianchi DW. Improved fetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular antifetal hemoglobin and Hoechst 33342. *Cytometry* 1996; **25**: 37–45.
- Deng Z, Wu G, Li Q, Zhang X, Liang Y, Li D, Gao S, Lan Y. Noninvasive genotyping of 9 Y-chromosome specific STR loci using circulatory fetal DNA in maternal plasma by multiplex PCR. *Prenatal Diag* 2006;26: 362–368.
- Ding C: Maldi-TOF mass spectrometry for analyzing cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Methods Mol Biol* 2008;444:253–627.
- Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, Charoenkwan P, Ng IS, Law HY, Ma ES, Xu X, Wanapirak C, Sanguansermsri T, Liao C, Ai MA, Chui DH, Cantor CR, Lo YM: MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10762–10767.
- Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, Cronin M, Chou V, Mohr M. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* 2004; 291: 1114–1119.
- Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, Barry J, Betz J, Franz K, Gold K et al. A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study. *Lancet* 2007;369:474–481.
- Dong-ling T., Yan L., Xin Z., Xia L., Fang Z. Multiplex fluorescent PCR for noninvasive prenatal detection of fetal-derived paternally inherited diseases using circulatory fetal DNA in maternal plasma. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2009 144 : 35–39.
- Donoghue KO, Choolani M, Chan J, Fuente J, Kumar S, Campagnoli C, Bennett PR, Roberts IAG, Fisk NM. 2003. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: Implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 9:497–502.
- Douglas GW, Thomas L, Carr M, Cullen NM, Morris R. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1959; **78**: 960–973.
- Durrant LG, Martin WL, McDowall KM, Liu DTY (1996) Isolation of fetal trophoblasts and nucleated erythrocytes from the peripheral blood of pregnant women for prenatal diagnosis of fetal aneuploides. *Early Hum Dev* 47:S79-S83.
- ErgIn T, Baltaci V, Zeyneloglu HB, Duran EH, Ergeneli MH, Batioglu S. Non-invasive early prenatal diagnosis using fluorescent in situ hybridization on transcervical cells: comparison of two different methods for retrieval. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;95:37–41.
- Faas BHW, Beuling EA, Christiaens GCML, et al. 1998. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 352: 1196.
- Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998; **352**: 1196.
- Faiola S, Tsoi E, Huggon IC, Allan LD, Nicolaidis KH. 2005. Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with tricuspid regurgitation at the 11 to 13 + 6-week scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* **26**: 22–27.
- Fan, H.C. and Quake, S.R. Detection of aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *Anal. Chem.* 2007; 79, 7576–7579.
- Fang CN, Kan YY, Hsiao CC. Detection of fetal cells from transcervical mucus plug before firsttrimester termination of pregnancy by cytokeratin-7 immunohistochemistry. *J Obstet Gynaecol Res* 2005;31:500–7.
- Farina A, LeShane E, Romero R et al. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a Risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 421–425.
- Fejgin MD, Diukman R, Cotton Y, Weinstein G, Amiel A. Fetal cells in the uterine cervix: a source for early non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2001;21:619–21.

- Ferguson-Smith MA, Zheng YL, Carter NP. Simultaneous immunophenotyping and FISH on fetal cells from maternal blood. *Ann NY Acad Sci* 1994; **731**: 73–79.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: Introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42: 1079–1085.
- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *Br Med J* 2008; 336:816–818.
- Fournie GJ, Courtin JP, Laval F *et al.* Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett* 1995; **91**: 221–227.
- Fucharoen G, Tungwiwat W, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2003;23:393–396.
- Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005; 117:243–248.
- 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.
- Ganshirt D, Garritsen H, Miny P, Holzgreve W. Fetal cells in maternal circulation throughout gestation. *Lancet* 1994; **343**: 1038–1039.
- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 1998; **17**: 89–97.
- Go ATJI, Visser A, Mulders MAM, Blankenstein MA, van Vugt JMG, Oudejans CBM. Detection of placental transcription factor mRNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004;50:1413–1414.
- Goldberg JD, Wohlferd MM. Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. *Am J Obstet Gynecol* 1997; **176**: 1349–1352; discussion 1352–1353.
- Goldberg MF, Chen AT, Ahn YW, Reidy JA. First-trimester fetal chromosomal diagnosis using endocervical lavage: a negative evaluation. *Am J Obstet Gynecol* 1980;138:436–40.
- Gonzalez-Gonzalez C, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Gallardo E, Ayuso C, Ramos C. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002;22:946–948.
- Gonzalez-Gonzalez C, Trujillo-Tiebas MJ, Rodriguez de Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. Huntington disease—unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003;23:232–234.
- González-González C, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Bustamante Aragonés, Rodriguez de Alba M, Alvarez D, & Diaz-Recasens J, Ayuso C & Ramos C. Improvement in strategies for the non-invasive prenatal diagnosis of Huntington disease. *J Assist Reprod Genet* (2008) 25:477–481.
- Grosset L, Barrelet V, Odartchenko N. 1974. Antenatal fetal sex determination from maternal blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 120: 60–63.
- Gussin HA, Bischoff FZ, Hoffman R, Elias S. 2002. Endothelial precursor cells in the peripheral blood of pregnant women. *J Soc Gynecol Invest* 9:357–361.

- 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**: 427–432.
- Hamada H, Arinami T, Sohda S, Hamaguchi H, Kubo T. Mid-trimester fetal sex determination from maternal peripheral blood by fluorescence in situ hybridization without enrichment of fetal cells. *Prenat Diagn* 1995; **15**: 78–81.
- Han JY, Lee YH, Sin SD, Park JI, Kim IH, Je GH, Rodgers GP. 2001. Enrichment and detection of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood using liquid culture. *Prenat Diagn* 21:22–26.
- Han JY, Lee YH, Sin SD, Park JI, Kim IH, Je GH, Rodgers GP. 2001. Enrichment and detection of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood using liquid culture. *Prenat Diagn* 21:22–26.
- Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 2001;47:1488–9.
- Hawes CS, Suskin HA, Kalonis B, Mueller UW, Casey G, Hall J, Rudzki Z (1994) Detection of paternally inherited mutations for b-thalassemia in trophoblast isolated from peripheral maternal blood. *Ann N Y Acad Sci* 731:181–185
- Henderson KG, Shaw TE, Barrett IJ, Telenius AH, Wilson RD, Kalousek DK. Distribution of mosaicism in human placentae. *Hum Genet* 1996; **97**: 650–654.
- 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 USA* 1979; **76**: 1453–1455.
- Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G, Daniels G, Chitty LS. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice *Clinical Genetics* 2011; Volume 80, Issue 1, pages 68–75.
- Ho S S Y, K O'Donoghue, M Choolani, Fetal Cells in Maternal Blood: State of the Art for Non-Invasive Prenatal Diagnosis. *Ann Acad Med Singapore* 2003; 32:597–604
- 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**: 992–996.
- Holdenrieder S, Stieber P, Chan LY *et al.* Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem* 2005; **51**: 1544–1546.
- Holzgreve W, Ghezzi F, Di Naro E, Ganshirt D, Maymon E, Hahn S. Disturbed fetomaternal cell traffic in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998; **91**: 669–672.
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 2001; 47:41–46.
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Gene* 2002;110:75–79.
- Hsieh TT, Pao CC, Hor JJ, Kao SM. Presence of fetal cells in maternal circulation after delivery. *Hum Genet* 1993; **92**: 204–205.
- Huang Z, Fong CY, Gauthaman K, Sukumar P, Choolani M, and Bongso A. Novel Approaches to Manipulating Foetal Cells in the Maternal Circulation for Non-Invasive Prenatal Diagnosis of the Unborn Child. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011; 112:1475–1485
- Huber K, Bittner J, Worofka B, Rosen A, Hafner E, Philipp K, Bauer K. 2000. Quantitative FISH analysis and in vitro suspension cultures of erythroid cells from maternal peripheral blood for the isolation of fetal cells. *Prenat Diagn* 20:479–486.
- Human Genetics Commission. Choosing the future: genetics and reproductive decision making. July 2004.

- Imudia AN, Suzuki Y, Kilburn BA, Yelian FD, Diamond MP, Romero R, et al. Retrieval of trophoblast cells from the cervical canal for prediction of abnormal pregnancy: a pilot study. *Hum Reprod* 2009;24:2086–92.
- Iverson GM, Bianchi DW, Cann HM, Herzenberg LA. Detection and isolation of fetal cells from maternal blood using the fluorescence-activated cell sorter (FACS). *Prenat Diagn* 1981; **1**: 61–73.
- Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002; **186**: 158–166.
- Jansen MW, Korver-Hakkennes K, van Leenen D, Brandenburg H, Wildschut HI, Wladimiroff JW, Ploemacher RE. 2000. How useful is the in vitro expansion of fetal CD34+ progenitor cells from maternal blood samples for diagnostic purposes? *Prenat Diagn* 20:725–731.
- Katz-Jaffe MG, Mantzaris D, Cram DS. DNA identification of fetal cells isolated from cervical mucus: potential for early non-invasive prenatal diagnosis. *BJOG* 2005;112:595–600.
- Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* 4:472–476.
- Kitagawa M, Sugiura K, Omi H *et al.* New technique using galactose-specific lectin for isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn* 2002; **22**: 17–21.
- Kleihauer E, Braun H, Betke K. [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear.] *Klin Wochenschr* 1957; **35**: 637–638. (In German.)
- Kolialexi A., Vrettou C., Traeger-Synodinos J., Burgemeister R., Papantoniou N., Kanavakis E., Antsaklis A., and Mavrou A. Noninvasive prenatal diagnosis of β -thalassaemia using individual fetal erythroblasts isolated from maternal blood after enrichment. *Prenat Diagn* 2007; **27**: 1228–1232.
- Kuhlmann RS, Werner AL, Abramowicz J, Warsof SL, Arrington J, Levy DL. Placental histology in fetuses between 18 and 23 weeks' gestation with abnormal karyotype. *Am J Obstet Gynecol* 1990; **163**: 1264–1270.
- Kuliev AM, Modell B, Jackson L *et al.* Risk evaluation of CVS. *Prenat Diagn* 1993; **13**: 197–209.
- Lau TK, Lo KW, Chan LY, Leung TY, Lo YM. Cell-free fetal deoxyribonucleic acid in maternal circulation as a marker of fetal-maternal hemorrhage in patients undergoing external cephalic version near term. *Am J Obstet Gynecol* 2000; **183**: 712–16.
- Lazaros L, Hatzi E, Bouba I, Paraskevaidis E, Georgiou I. Non-invasive prenatal detection of paternal origin Hb Lepore in a male fetus at the 7th week of gestation. *Fetal Diagn Ther* 2006;21:506–509.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646–650.
- Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF, et al. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; **190**: 707–13.
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; **352**: 1904–1905.
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 2004b;50:1002–1011.
- Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for betathalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA*. 2005; Feb 16;293:843-9.

- Li Y, Wenzel F, Holzgreve W, Hahn S. Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation. *Electrophoresis* 2006; 27: 3889–3896.
- Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Grill S, Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Size Fractionation of Cell-Free DNA in Maternal Plasma Improves the Detection of a Paternally Inherited beta-Thalassemia Point Mutation by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Fetal Diagn Ther*. 2009; Jun 5;25:246-249.
- Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, Lin X, Hahn HS, Hao E, Hayek A, Ding S. 2009. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6:805–808.
- Lun FM, Chiu RW, Allen Chan KC, Yeung Leung T, Kin Lau T, Dennis Lo YM. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008; Oct; 54:1664-72.
- Little AT, Langlois S, Wilson D, Lansdorp PM. 1997. Frequency of fetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34⁺ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* 89:2347-2358.
- Liou JD, Hsieh TT, Pao CC. Presence of cells of fetal origin in maternal circulation of pregnant women. *Ann NY Acad Sci* 1994; **731**: 237–241.
- Liu FM, Wang XY, Feng X, Wang W, Ye YX, Chen H. Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis. *Acta Obstet Gyn Scand* 2007;86:535–541.
- Lo YM, Morey AL, Wainscoat JS, Fleming KA. Culture of fetal erythroid cells from maternal peripheral blood. *Lancet* 1994; **344**: 264–265.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK *et al*. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 768– 775.
- Lo YMD, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AMZ, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999a; 45:1747–1751.
- Lo YM, Leung TN, Tein MS *et al*. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999; **45**: 184–188.
- Lo YMD, Leung TN, Tein MSC, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CWG. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999b;45:184–188.
- Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999c; 64:218–224.
- Lo YMD, Tsui NBY, Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Heung MMS, *et al*. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007;13:218 –23.
- Lo, Y.M.D. *et al*. (2007) Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13116– 13121
- Loke YW, King A. Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today* 1997; **3**: 153–159.
- Lun, F.M.F. *et al*. (2008) Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 54, 1664–1672
- Lun, F.M.F. *et al*. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105, 19920–19925
- Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme. *C R Acad Sci Paris* 1948;142:241–243.
- Manotaya S, Elias S, Lewis DE, Simpson JL, Bischoff FZ. 2002. Evaluation of a culture system for enrichment of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells present in maternal blood. *Fetal Diagn Ther* 17:90-96.

- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; **11**: 231–238.
- Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008;48:373–381.
- Mueller UW, Hawes CS, Wright AE, Petropoulos A, Deboni E, Firgaira FA, Morley AA, et al (1990) Isolation of fetal trophoblasts cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 1990; **336**: 197–200.
- Mujezinovic F, Alfirovic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007;110:687–694.
- Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, Otevrel T. Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis. *Clin Chem* 2004;50: 694–701.
- Nelson JL, Furst DE, Maloney S *et al.* Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998; **351**: 559–562.
- Ng EKO, Tsui NBY, Lam NY, Chiu RWK, Yu SC, Wong SC, et al. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002;48: 1212–7.
- Ng EKO, Tsui NBY, Lau TK, Leung TN, Chiu RWK, Panesar NS, Lit LCW, Chan KW, Lo YMD. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4748–4753.
- Nicolaides KH. Review. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn* 2011; 31: 7–15.
- Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. 2005. Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first-trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol* **25**: 221–226.
- Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. 2010. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc* 5:418–428.
- Old RW, Crea F, Puszyk W, Hulten MA. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online* 2007;15:227–35.
- Oosterwijk J C, Mesker W E, Ouwerkerk-van Velzen M C, Knepfle C F, Wiesmeijer K C, van den Burg M J, et al. Development of a preparation and staining method for fetal erythroblasts in maternal blood: simultaneous immunocytochemical staining and FISH analysis. *Cytometry* 1998; 32:170–7.
- Oudejans CBM, Go ATJJ, Visser A, Mulders MAM, Westerman BA, Blankenstein MA, van Vugt JMG. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma. *Clin Chem* 2003;49:1445–1449.
- Papageorgiou, E.A. *et al.* Sites of differential DNA methylation between placenta and peripheral blood: molecular markers for noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am. J. Pathol.* **174**, 1609–1618 (2009).
- Papageorgiou EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC. Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med* 2011;7: 510–3.
- Papasavva T, Kalikas I, Kyrri A, Kleanthous M. Arrayed primer extension for the noninvasive prenatal diagnosis of betathalassemia based on detection of single nucleotide polymorphisms *Ann N Y Acad Sci.* 2008; Aug;1137:302–8.
- Pearson HA. Life-span of the fetal red blood cell. *J Pediatr* 1967; **70**: 166–171.
- Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 2000;106:45–49.
- Pohl, G. and Shih Ie, M. (2004) Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4, 41–47.

- Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Lo YMD. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:1832–1834.
- 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**: 1731–1737. *Prenat Diagn* 1995; **15**: 149–154.
- Rakyan, V.K. *et al.* An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome Res.* **18**, 1518–1529 (2008).
- Rhine SA, Cain JL, Cleary RE, Palmer CG, Thompson JF. Prenatal sex detection with endocervical smears: successful results utilizing Y-body fluorescence. *Am J Obstet Gynecol* 1975;122:155–60.
- Rhine SA, Palmer CG, Thompson JF. A simple alternative to amniocentesis for first trimester prenatal diagnosis. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1977;13:231–47.
- Rijnders RJP, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MAMJ, Christiaens GCML. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001;98:374–378.
- Rochelson B, Kaplan C, Guzman E, Arato M, Hansen K, Trunca C. A quantitative analysis of placental vasculature in the third-trimester fetus with autosomal trisomy. *Obstet Gynecol* 1990; **75**: 59–63.
- Rosatelli MC and Saba L. Prenatal Diagnosis of β -Thalasseмии. *Medit J Hemat Infect Dis* 2009, 1(1): e2009011
- Rouillac-Le Sciellour C, Serazin V, Brossard Y, Oudin O, Le Van Kim C, Colin Y, Guidicelli Y, Menu M, Cartron J-P. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma; use of a new developed Free DNA Fetal Kit RhDw. *Transfus Clin Biol* 2007;14:572–577.
- 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**: 281–286.
- Sargent IL, Choo YS, Redman CW. Isolating and analyzing fetal leukocytes in maternal blood. *Ann NY Acad Sci* 1994; **731**: 147–153.
- Schmorl G. Pathologisch-anatomische untersuchungen uber puerperaleklampsie. *Leipzig: Vogel*, 1893.
- Schroder J, De la Chapelle A. 1972. Fetal lymphocytes in the maternal blood. *Blood* 39:153–162.
- Schroder J, Tiilikainen A, De la Chapelle A. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. I. Cytological aspects. *Transplantation* 1974; **17**: 346–354.
- Sekizawa A, Kimura T, Sasaki M, Nakamura S, Kobayashi R, Sato T. Prenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy using a single fetal nucleated erythrocyte in maternal blood. *Neurology* 1996; **46**: 1350–1353.
- Sekizawa A, Farina A, Zhen DK *et al.* Improvement of fetal cell recovery from maternal blood: suitable density gradient for FACS separation. *Fetal Diagn Ther* 1999; **14**: 229–233.
- Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Bianchi DW. Fetal cell recycling: diagnosis of gender and RhD genotype in the same fetal cell retrieved from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1999; **181**: 1237–1242.
- Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Farina A, Bianchi DW. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 2000; **20**: 886–889.
- Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, *et al.* Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. *Clin Chem* 2001; **47**: 2164–165.

- Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H, Okai T. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2001;47:1856–1858.
- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002; **48**: 353–54.
- Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y *et al.* Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet* 2003; **113**: 307–310.
- Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y *et al.* Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet* 2003; **113**: 307–310.
- Sekizawa A., Purwosunu Y., Matsuoka R., Koide K., Okazaki S., Farina A., Saito H. and Okai T. Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *J. Obstet. Gynaecol.*2007; Res. Vol. 33, No. 6: 747–764.
- Sekizawa A, Farina A, Sugito Y *et al.* Proteinuria and hypertension are independent factors affecting fetal DNA values: a retrospective analysis of affected and unaffected patients. *Clin Chem* 2004; **50**: 221–224.
- Singleton BK, Green CA, Avent ND, et al. 2000. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in most Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 95: 12–18.
- Sipes SL, Weiner CP, Wenstrom KD, Williamson RA, Grant SS. The association between fetal karyotype and mean corpuscular volume. *Am J Obstet Gynecol* 1991; **165**: 1371–1376.
- Slunga-Tallberg A, el-Rifai W, Keinanen M *et al.* Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *Hum Genet* 1995; **96**: 53–57.
- Slunga-Tallberg A, el-Rifai W, Keinanen M *et al.* Maternal origin of transferrin receptor positive cells in venous blood of pregnant women. *Clin Genet* 1996; **49**: 196–199.
- Snijders RJ, Noble P, Sebire N, Souka A, Nicolaides KH. UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10–14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group [see comments]. *Lancet* 1998; **352**: 343–346.
- Staerk J, Dawlaty MM, Gao Q, Maetzel D, Hanna J, Sommer CA, Mostoslavsky G, Jaenisch R. 2010. Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7:20–24.
- Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L, Mazza V, Neri C, Percesepe A, Forabosco A. Quantitation of fetal DNA in maternal serum during the first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe. *Mol Hum Reprod* 2006;12:587–591.
- Swinkels DW, de Kok JB, Hendriks JC, Wiegeler E, Zusterzeel PL, Steegers EA. Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem* 2002; **48**: 650–653.
- Takabayashi H, Kuwabara S, Ukita T, Ikawa K, Yamafuji K, Igarashi T. Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood. *Prenat Diagn* 1995; **15**: 74–77.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
- 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.
- Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA. *Am J Pathol* 2006;169:400–404.

- Tong, Y.K. et al. (2010) Noninvasive prenatal detection of trisomy 21 by an epigenetic-genetic chromosome-dosage approach. *Clinical Chemistry* 56, 90-98.
- Troeger C, Zhong XY, Burgemeister R *et al.* Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol Hum Reprod* 1999; **5**: 1162–1165.
- Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002;48:1647–53.
- Tsui NBY, Lo YMD. Placental RNA in maternal plasma: toward noninvasive fetal gene expression profiling. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1075:96–102.
- Tsui NBY, Chim SSC, Chiu RWK, Lau TK, Ng EKO, Leung TN, Tong YK, Chan KCA, Lo YMD. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet* 2004;41:461–467.
- Tsui NBY, Akolekar R, Chiu RWK, Chow KCK, Leung TY, Lau TK, Nicolaides KH, and Lo YMD. Synergy of Total *PLAC4* RNA Concentration and Measurement of the RNA Single-Nucleotide Polymorphism Allelic Ratio for the Noninvasive Prenatal Detection of Trisomy 21. *Clinical Chemistry* 2010; 56:1 73–81
- Tsui, D.W. et al. (2010) Systematic identification of placental epigenetic signatures for the noninvasive prenatal detection of Edwards Syndrome. *PLoS One* 5, e15069
- Tutschek B, Reinhard J, Köhler G, Wernet P, Niederacher D. 2000. Clonal culture of fetal cells from maternal blood. *Lancet* 356:1736-1737.
- 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**: 1073–1082.
- Valerio D, Altieri V, Antonucci FR, Aiello R. 1997. Characterization of fetal hematopoietic progenitors circulating in maternal blood of seven aneuploid pregnancies. *Prenat Diagn* 17:1159-1169.
- Valerio D, Altieri V, Cavallo D, Aiello R, Antonucci FR. 2000. Detection of fetal trisomy 18 by short-term culture of maternal peripheral blood. *Am J Obstet Gynecol* 183:222-225.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1999) Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 9236–9241
- Von Koskull H, 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**: 149–154.
- Voullaire L, Ioannou P, Nouri S, Williamson R. Fetal nucleated red blood cells from CVS washings: an aid to development of first trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2001; **21**: 827–834.
- Wachtel S, Elias S, Price J *et al.* Fetal cells in the maternal circulation: isolation by multiparameter flow cytometry and confirmation by polymerase chain reaction. *Hum Reprod* 1991; **6**: 1466–1469.
- Wachtel SS, Sammons D, Manley *et al.* Fetal cells in maternal blood: recovery by charge flow separation. *Hum Genet* 1996; **98**: 162–166.
- Wachtel SS, Sammons D, Twitty G *et al.* Charge flow separation: quantification of nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy. *Prenat Diagn* 1998; **18**: 455–463.
- Wagner FF, Flegel WA. 2000. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 95: 3662–3668.
- Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969; **1**: 1119–1122.
- Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick JA, et al. Maternal serum cellfree fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet* 2003; **112**: 204–208.

- Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, Johnson KL. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 2004a;81: 638–644.
- Watanabe A, Sekizawa A, Taguchi A *et al.* Prenatal diagnosis of ornithine transcarbamylase deficiency by using a single nucleated erythrocyte from maternal blood. *Hum Genet* 1998; **102**: 611–615.
- Weber, M. *et al.* Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* **37**, 853–862 (2005).
- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hama-Ishii R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766–770.
- Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009;15:139–51.
- Yang YH, Jee KJ, Kim SK, Park YW, Kim IK, Cha DH, Chung JE, Kim SH. Prenatal genetic diagnosis from maternal blood: simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative and positive magnetic activated cell sorting. *Yonsei Med J.* 2000 Apr;41(2):258-65.
- Yakovov E, Rechavi G, Rozenblatt S, Givol D. 2010. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 394:189–193.
- Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. 2010. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9826–9830.
- Zheng YL, Carter NP, Price CM *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**: 1051–1056.
- Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report. *Prenat Diagn* 2000; **20**: 838–841.
- Zhong & Holzgreve, MALDI-TOF MS in Prenatal Genomics. *Transfus Med Hemother* 2009;36:263–272.
- Zhou W, Galizia G, Lieto E, *et al.* 2001. Counting alleles reveals a connection between chromosome 18q loss and vascular invasion. *Nat Biotechnol* **19**: 78–81.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4:381–384.
- Zimmermann B, Holzgreve W, Zhong XY, Hahn S. 2002. Inability to clonally expand fetal progenitors from maternal blood. *Fetal Diagn Ther* 17:97–100.
- Zimmermann B, El Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2005;51:1598–1604.
- Zimmermann, B.G. *et al.* Digital PCR: a powerful new tool for noninvasive prenatal diagnosis? *Prenatal Diagnosis* 2008; **28** : 1087-1093.