

MIKROCHIMERYZM PŁODOWO-MATCZYNY I JEGO ZNACZENIE KLINICZNE*

FETOMATERNAL MICROCHIMERISM AND CLINICAL IMPLICATIONS

Magdalena SZARYŃSKA

Zakład Histologii, Katedra Histologii i Immunologii,
Akademia Medyczna w Gdańsku

Streszczenie: Analiza płodowych komórek oraz DNA wyizolowanych z krwi obwodowej matki stwarza nadzieję na stworzenie nowej bezinwazyjnej metody badań prenatalnych. Różne typy komórek były rozważane jako cel w tych badaniach. Prawdopodobnie płodowe komórki i kwasy nukleinowe przechodzą do krwi matki podczas każdej ciąży. Mogą one utrzymywać się we krwi lub tkankach matki przez lata, będąc źródłem fizjologicznego mikrochimeryzmu. Badania pokazały, że zmiany w tych dwóch parametrach mogą pojawić się, gdy wystąpią stany patologiczne ciąży oraz płodu. Mikrochimeryzm jest prawdopodobnie zaangażowany w patologię chorób autoimmunologicznych i chorób, na które preferencyjnie częściej zapadają kobiety, dlatego długoterminowe konsekwencje tego zjawiska dla zdrowia matki zaczynają być badane. Wprowadzenie do praktyki klinicznej testów prenatalnych z użyciem płodowych komórek oraz płodowego DNA wymaga jeszcze dużego nakładu pracy i rozwiązania wielu problemów związanych z niewystarczającą czułością dostępnych technik.

Słowa kluczowe: mikrochimeryzm, choroby autoimmunologiczne, komplikacje ciąży, diagnostyka prenatalna.

Summary: Analysis of fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal peripheral blood raises hopes for development of new non-invasive prenatal diagnosis. Many different cell types were considered as possible targets for prenatal diagnosis. Probably, fetal cells and cell-free fetal DNA enter the maternal circulation during all pregnancies. They may persist for years in maternal blood and tissues, resulting in a physiological microchimerism. It has been shown that changes in these two parameters may accompany some pregnancy-related disorders. Microchimerism is associated with pathology of several autoimmune diseases and diseases which preferentially affect women. However, its long-term consequences are still under investigation. Widespread clinical implications of fetal cells and cell-free fetal DNA as diagnostic tools awaits further research aiming at improvement of insufficiently sensitive techniques.

Key words: microchimerism, autoimmune diseases, pregnancy complications, prenatal diagnosis.

*Praca finansowana z Grantu KBN 2 PO5A 088 30.

WSTĘP

Analiza płodowych komórek i płodowych wolnych kwasów nukleinowych wyizolowanych z krwi matki stanowić może nową, potencjalną, nieinwazyjną, alternatywną metodę diagnostyki prenatalnej. Diagnostyka prenatalna anomalii genomowych oraz wielu chorób genetycznych oparta jest obecnie głównie na inwazyjnych technikach, takich jak: amniocenteza, choriocenteza, kordocenteza. Są one bardzo wiarygodne i dają jednoznaczne wyniki dla większości przypadków. Każda z nich stanowi jednak zagrożenie dla ciąży i ryzyko poronienia oszacowano na 0,5–2% [51]. Nieinwazyjne metody oparte na analizie mikrochimerycznych komórek i kwasów nukleinowych mogą umożliwić diagnozę bez tego ryzyka.

Zgodnie z definicją, mikrochimeryzm to stan, gdy jedna osoba ma dwie populacje komórek różniące się genetycznie i o różnym pochodzeniu, gdy jedna z tych populacji występuje w małej ilości [86]. Komórki płodowe przechodzą do krwi matki podczas każdej ciąży [8,52]. Mogą one utrzymywać się we krwi lub tkankach matki przez lata, będąc źródłem fizjologicznego mikrochimeryzmu u ciężarnych kobiet. Ostatnie badania wykazały obecność męskich komórek o przypuszczalnym płodowym pochodzeniu u 30–50% [54] lub nawet 50–70% [44] zdrowych kobiet, które wcześniej miały męską ciążę.

Wyniki badań pokazały również, że męski mikrochimeryzm nie jest zjawiskiem rzadkim u kobiet, które nigdy nie urodziły syna [56,86]. Poza ciążą innymi źródłami mikrochimeryzmu męskiego mogą być: komórki starszego brata przekazane przez matkę [53], poronienie, zanik bliźniaka-chłopca oraz stosunek seksualny [86]. Również maczyny mikrochimeryzm został opisany u dorosłego potomstwa, komórki matki, bowiem mają także zdolność przenikania do krwi płodu [53]. Jatrogenny mikrochimeryzm donora występuje jako konsekwencja przeszczepów [14] oraz transfuzji krwi [81].

PŁODOWE KOMÓRKI CHIMERYCZNE

Trzy typy komórek były rozważane jako cel w nieinwazyjnych badaniach prenatalnych: limfoblasty, erytroblasty oraz trofoblast. Prekursory krwiotwórcze CD34⁺CD38⁺ zostały odrzucone ze względu na to, że utrzymują się one w krążeniu matki przez lata, dlatego trudno by było odróżnić komórki z obecnej i poprzednich ciąż. W krążeniu matki nawet po 21 latach od urodzenia ostatniego syna wykryto bowiem męskie komórki CD34⁺ pochodzenia płodowego [29].

Transport płodowych komórek najczęściej następuje po przypadkowym uszkodzeniu kosmka łożyska lub w warunkach promujących ekspozycję płodowego śródbłónka i w konsekwencji uszkodzenie go przez układ immunologiczny matki [31]. W czasie ciąży komórki płodowe, które wchodzą do krwi matki, w większości należą do linii hematopoezy, np. jądrzaste erytroblasty, limfocyty czy krwiotwórcze komórki macierzyste [69]. Fragmenty trofoblastu i mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia

płodowego także można znaleźć we krwi matki [68,84]. Po urodzeniu, męskie komórki płodowe należące do populacji CD34-pozytywnych progenitorów zidentyfikowano we krwi matki [1,29]. Komórki męskie zostały również zidentyfikowane pośród innych populacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej matki: limfocytów B i T, komórek NK oraz monocytów [9,54], co sugeruje, że płodowe komórki mają zdolność zasiedlania się we krwi matki i różnicowania wzdłuż różnych ścieżek hematopoezy. Inne mechanizmy są zaangażowane w transport trofoblastu poprzez barierę łożyskową. Trofoblast najczęściej przechodzi do krwi matki poprzez złuszczenie się syncytiotrofoblastu [36]. U podstawy tego typowego sposobu uwalniania trofoblastu z kosmków łożyska leżą mechanizmy apoptozy, normalnie zachodzące w trakcie odnowy kosmków. U kobiet ze zdrową ciążą takie wielojądrzaste syncytia można znaleźć we krwi pobranej z żyły macicy. Są to apoptotyczne wielojądrzaste fragmenty syncytiotrofoblastu najczęściej uwalniane z wierzchołka kosmka. Źródłem prawdziwych komórek trofoblastu jest pula pozakosmkowych komórek [70], HLA-G pozytywnych, penetrujących tkanki macicy poprzez tętniczki spiralne i ostatecznie przedostających się do krwi matki jako wewnątrzmaczyniowy trofoblast [43].

W ostatnich latach poszukiwanie płodowych komórek we krwi matki było przedmiotem badań w wielu laboratoriach. Grupa Hamada jako pierwsza już w 1993 roku [za 49], potem także grupa Krabchi [52] użyły metody ilościowej oceny komórek płodowych w krążeniu matki. Te dwie grupy badaczy skupiły się głównie na określeniu liczby komórek płodowych bez względu na ich typ, gdzie markerem była obecność chromosomu Y. Zastosowali metodę FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) po utrwalaniu metodą Carnoya i po lizie erytrocytów. Metoda ta pozwala na utrwalenie jądra komórkowego, co umożliwia znakowanie specyficznymi sondami. Wadą tej metody jest jednak to, że powoduje usunięcie z komórki większości cytoplazmy, co uniemożliwia późniejszą identyfikację jej typu. W tych dwóch pracach wszystkie jądrzaste płodowe komórki były liczone u kobiet będących pomiędzy 18 a 22 tygodniem ciąży, noszących męski zdrowy płód. Wykazano, że 2–6 płodowych komórek znajdowało się w 1 ml maczynnej krwi. Później jeszcze raz przetestowano tę metodę na większej populacji [62]. Przeprowadzono ślepą analizę 40 próbek ze zdrowych ciąż o nieznaney płci przy użyciu dwóch różnych zestawów sond FISH (XY, YY). Zastosowanie zestawu sond YY zwiększyło czułość testu z 69,4% do 89,5% w porównaniu z sondami XY. Oszacowano 12–20 męskich płodowych komórek w 1 ml krwi matki. Przy użyciu podobnej metody Kolvraa i wsp. [49] znaleźli 28 płodowych komórek w 15 ml krwi matki i erytroblasty stanowiły tylko niewielką ich frakcję (3 płodowe erytroblasty w 573 ml krwi matki). Obecność płodowych komórek we krwi matki wszystkich przebadanych ciężarnych kobiet została bezspornie potwierdzona przez wiele niezależnych zespołów już dzięki tylko tej jednej metodzie [49,52,62].

Inni badacze znaleźli wprawdzie więcej erytroblastów we krwi matki (ta liczba waha się od 1 komórki na 10^4 do 1 na 10^9 jednojądrzastych komórek matki), jednakże przypuszczalnie część z nich mogło być fałszywymi sygnałami, gdy komórki płodowe były identyfikowane tylko przy użyciu jednego markera [34,76]. Uważa się, że dwa niezależne markery pochodzenia płodowego czy to w postaci dwóch procedur FISH,

czy dwóch różnych specyficznych płodowych markerów dają bardziej wiarygodne rezultaty [49]. Możliwe jest, że płodowe komórki, które utrzymały się we krwi matki od czasu poprzednich ciąż, mogły również zaburzyć wyniki [67].

Pojawił się problem czy badać różne odrębne populacje komórek chimerycznych, czy raczej analizować wszystkie komórki płodowego pochodzenia niezależnie od ich typu. Dowód na to, że drugi pomysł wydaje się lepszy, pojawił się po raz pierwszy w 1993 roku [za 49], a później w 2000 r. stosowali go Krabchi i wsp. [52]. Drugi wymieniony zespół wykazał 100% czułość zarówno dla męskich prób, jak i dla żeńskich próbek kontrolnych. Analiza była przeprowadzana przy użyciu metod FISH i PRINS (ang. *primed in situ labeling*) z zastosowaniem sond specyficznych dla chromosomów X i Y.

Płodowe erytroblasty są najczęściej badaną populacją komórek chimerycznych. Choolani i wsp. [23] scharakteryzowali populację erytroblastów z pierwszego trymestru ciąży. Gęstość ich wahała się od 1,077 do 1,130 g/ml i dlatego najlepszy odzysk uzyskiwano w wyniku izolacji na Percoll 1118. Prymitywne erytroblasty mają negatywny ładunek i dlatego były odporne na liżę NH_4Cl . Immunofenotypowanie pokazało, że podobnie jak ostateczne erytroblasty, również te prymitywne (z pierwszego trymestru) były pozytywne pod względem obecności markerów, tj. GPA, CD47, i negatywne pod tym względem: CD45, CD35. Ekspresja CD71 była słaba lub niewykrywalna na prymitywnych erytroblastach, podczas gdy 100% dojrzałych erytroblastów było pozytywnych pod względem tego markera [49].

W czasie normalnej ciąży ilość płodowych erytroblastów CD71^+ we krwi matki systematycznie zmniejsza się wraz ze stopniem zaawansowania ciąży [5]. Inna praca pokazała, że liczba płodowych erytroblastów rośnie od pierwszego do drugiego trymestru ciąży. Te badania pokazały, że piętnasty tydzień jest optymalnym czasem pobierania krwi obwodowej matki do nieinwazyjnej diagnozy płodu przy wykorzystaniu płodowych komórek chimerycznych [76]. Nagy i wsp. [63] sugerują, że dzięki analizie erytroblastów płodowych mających hemoglobinę embrionalną z krwi matki możliwe jest określenie płci płodu i niektórych anomalii genomowych (np. zespołu Klinefeltera). Dla mnogich ciąż wykazano kilkakrotnie większy przepływ komórek płodowych do krwi matki w porównaniu z ciążami pojedynczymi, co wynika prawdopodobnie z większej powierzchni łożyska i większej sieci naczyń [3].

Utrzymanie się komórek płodowych w organizmie matki być może dotyczy wyłącznie komórek prekursorowych odpornych na apoptozę lub innych prekursorów w przypadku zaburzenia mechanizmów regulujących apoptozę. Badając poziom apoptozy i liczbę komórek płodowych przed i po porodzie, zaobserwowano, że podwyższony poziom apoptozy we krwi ciążarnej kobiety odpowiadał umieraniu płodowych komórek i poziom ten znacznie spadał po 2–3 godzinach po porodzie wraz z drastyczną redukcją liczby komórek pochodzenia płodowego [48].

Guetta i wsp. [29] we wszystkich przebadanych próbkach pochodzących od kobiet noszących męskie płody wykryli płodowe komórki CD34^+ . Niewielka liczba komórek płodowych utrzymujących się od czasu poprzedniej ciąży została zidentyfikowana pośród tych prekursorów w niespełna 1/3 próbek (1–3 męskie komórki w 20 ml krwi matki)

pobranych od kobiet niebędących w ciąży lub noszących żeńskie płody. W czasie hodowli wyizolowane płodowe komórki CD34⁺ proliferowały i dzięki temu mogą stać się dodatkowym źródłem danych, uzupełniających dane pochodzące z analizy innych płodowych populacji. Szczególnie hodowla prekursorów CD34-pozytywnych wyizolowanych z krwi matki w czasie pierwszego trymestru ciąży może w przyszłości stać się metodą przydatną do amplifikacji komórek płodowych, ponieważ prekursorzy te przewyższają maczyne większym potencjałem proliferacyjnym oraz krótszym czasem hemoglobinizacji [18].

Aby zbadać prawdziwość hipotezy, że płodowe macierzyste komórki mezenchymalne (MKM) także utrzymują się w organach matki, przebadano próbki szpiku kostnego i żeber pochodzące od kobiet, które wcześniej urodziły synów. Męskie komórki zidentyfikowano pośród MKM zarówno ze szpiku kostnego, jak i w skrawkach żeber, ale brak było takich komórek w próbkach pochodzących z grupy kontrolnej [67]. Chimeryczne MKM były identyfikowane na podstawie morfologii i fenotypu, zdolności do samoodnowy i różnicowania *in vitro* w linii adipogenezy i osteogenezy. Znalezione także męskie komórki MKM u kobiety, która trzykrotnie poroniła (płeć nieznana), ale nigdy syna nie urodziła. Wskazuje to, że poronienie jest źródłem chimerycznych płodowych komórek i pozwala na przejście większej liczby komórek niż w przypadku zdrowej ciąży [44]. Nawet 50 (13–51 lat) lat po urodzeniu ostatniego syna wykrywano męskie komórki pochodzenia płodowego. Wyniki badań tej grupy sugerują, że płodowe komórki znajdowane we krwi matki po poronieniu, prawdopodobnie są to wczesne prekursorzy o naturze mezenchymalnych komórek macierzystych.

Wyjątkowa rzadkość płodowych komórek chimerycznych wymusza zastosowanie niezwykle wydajnych metod izolacji i detekcji. Wiele publikacji opisuje zastosowanie bardziej lub mniej złożonych metod izolacji komórek chimerycznych – sortowanie przy użyciu cytometru sortującego (FACS) lub metody immunomagnetycznej (MACS) [2,19,63]. Odzysk komórek płodowych był wyższy przy zastosowaniu metody izolacji immunomagnetycznej w porównaniu z sortowaniem fluorometrycznym [13]. Wydaje się, że spośród czterech metod, które przetestowali Kolvaraa i wsp. [49], separacja immunomagnetyczna komórek CD71 pozytywnych powodowała najmniejsze straty.

PŁODOWE DNA

Odkrycie płodowych wolnych kwasów nukleinowych w surowicy krwi matki dało nowe możliwości rozwoju badania bezinwazyjnego genów płodu i oceny jego kondycji. Wzrost natężenia transportu komórek płodowych do krwi matki jest już od dawna kojarzony ze stanem przedrzucawkowym. Ilościowa analiza wykazała także wzrost stężenia wolnych kwasów nukleinowych w surowicy krwi matki z ciążą patologiczną, głównie w przypadku stanu przedrzucawkowego [84]. Badania pokazały, że zmiany w tych dwóch parametrach mogą także pojawić się, gdy wystąpią inne stany patologiczne: przedwczesny poród, upośledzenie rozwoju płodu, niepowściągliwe wymioty ciężarnych

oraz w przypadku ciąży o dużym stopniu ryzyka. Zaskakujące było to, że zaobserwowano wzrost poziomu wolnych kwasów nukleinowych po przedwczesnym porodzie przy braku zmiany natężenia transportu komórek płodowych do krwi matki. Sugeruje to, że analiza mechanizmów regulujących zarówno transport komórek przez łożysko, jak i uwalnianie wolnych płodowych kwasów nukleinowych może dać ważne wskazówki na temat zmian patologicznych łożyska będących podstawą wymienionych patologii [31].

Odkrycie wolnego płodowego DNA [31] w surowicy krwi obwodowej matki otworzyło nową drogę dla bezinwazyjnej diagnostyki płodu. Zaletą analizy tego DNA jest jego relatywnie duża ilość. Stanowi on prawie 5% całego wolnego DNA surowicy krwi matki. Jest to kilkaset razy większy odsetek w porównaniu z odsetkiem komórek płodowych do komórek krwi matki. Fragmenty DNA, jakie znaleźć można w surowicy krwi kobiety ciężarnej, są znacznie dłuższe od tych, które występują u kobiet niebędących w ciąży. Spośród fragmentów DNA, jakie znaleźć można we krwi kobiety ciężarnej, płodowe są krótsze w porównaniu z matczynymi [21].

Analiza przy pomocy PCR pokazała, że poziom tego DNA wzrasta w przypadku wielu patologii [30,84]. Ograniczeniem jest to, że analizowane mogą być tylko płodowe sekwencje DNA, które są nieobecne w genomie matki, np. chromosom Y lub geny RhD dla ciąży, w których wystąpił konflikt serologiczny [17,35,60,74]. Dlatego większość badań koncentruje się wokół ciąży męskich. Jednakże, metoda ta okazała się na tyle wydajna i godna zaufania, że już używa się jej w praktyce klinicznej w celu diagnozy ciąży z konfliktem serologicznym [28] lub określania płci płodu w przypadku ciąży z ryzykiem wystąpienia niektórych chorób genetycznych sprzężonych z chromosomem X [80]. Ostatnio opisano także metodę odróżniania fragmentów DNA płodu i matki na podstawie cech epigenetycznych, ponieważ matka i dziecko mają inny wzór metylacji DNA [71].

Pochodzenie tego DNA w surowicy matki było przedmiotem wielu rozważań. Prawdopodobnie większa część płodowego wolnego DNA pochodzi z łożyska [10]. To rozwiązanie zasugerowane zostało zanikaniem tego DNA zaraz po porodzie [8], co jest przeciwieństwem do zachowania się komórek pochodzenia płodowego, które utrzymują się tygodniami, a niewielka ich pula może utrzymać się przez lata, a nawet dekady [67]. Kolejnym dowodem na to, że DNA w większości jest łożyskowego pochodzenia, jest brak krążącego płodowego normalnego DNA w kilku przypadkach mozaikowości łożyska [61] oraz obecność DNA po porodzie w przypadku wrośniętego łożyska [39]. Jednakże istnieje również praca, która pokazuje, że płodowe DNA może utrzymać się długo po porodzie podobnie, jak to jest w przypadku komórek płodowych [38].

Rozważa się zastosowanie testów prenatalnych analizujących płodowe DNA w celu wykluczenia istnienia chorób związanych z płcią [24], konfliktu serologicznego [35], dystrofii mitotycznej [58], achondroplazji [57] oraz wrodzonego rozrostu kory nadnerczy [22].

Dowodem na to, że przenikanie komórek i DNA do krwi matki są zjawiskami niezależnymi, jest brak korelacji pomiędzy nimi [87]. W niektórych przypadkach poziom DNA wzrastał, podczas gdy liczba komórek pozostawała niezmienną. Jeżeli okazałoby się, że prawdziwa jest teza głosząca łożyskowe pochodzenie wolno krążącego DNA, to jego uwalnianie byłoby związane ze specyficzną formą obrotu komórek lub ich śmierci

(nekroza, aponekroza), a wzrost stężenia tego DNA wskazywałby na uszkodzenie łożyska. Pokazano [31], że wzrost ilości płodowego DNA we krwi matki poprzedza pojawienie się klinicznych objawów stanu przedrzucawkowego, a wzrost wolnego matczynego DNA we krwi matki pojawia się dopiero po tym, jak choroba jest widoczna. To pokazuje, że stan przedrzucawkowy składa się z 2 stadiów: asymptomatycznego przedklinicznego (uszkodzenie łożyska i wzrost stężenia płodowego DNA w surowicy krwi matki) oraz klinicznego (uszkodzenie komórek matki).

Płodowy materiał genetyczny wykrywany jest w czasie całej ciąży, jego ilość jest funkcją zaawansowania ciąży i jego stężenie wzrasta wraz z rozwojem płodu [86]. Absolutna ilość płodowego DNA i jego stosunek do totalnego DNA (matczyny + płodowe) jest większe w surowicy krwi matki niż w przedziale komórkowym. Płodowe DNA raptownie znika z obu przedziałów po porodzie, co sugeruje jego dynamiczny obrót [8].

Płodowe wolne DNA może być bardzo wydajnie izolowane i analizowane przy użyciu metody PCR. Można w ten sposób prowadzić diagnozę trisomii chromosomu 21 i mutacji punktowych pochodzenia rodzicielskiego. PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real-time* PCR) jest bardzo dobrą metodą do wykrywania DNA pochodzenia płodowego z czułością i specyficznością bliską 100%. Porównanie wydajności metod diagnostycznych aneuploidii płodu przy zastosowaniu analizy komórek chimerycznych oraz płodowego wolnego DNA wykazało, że ta druga strategia jest przynajmniej cztery razy wydajniejsza [15].

ZNACZENIE KLINICZNE

W czasie ciąży płodowe komórki przechodzą przez łożysko do układu krążenia matki i ostatecznie mogą osiadać w wielu jej tkankach. Odkrycie tego zjawiska nasunęło pytania, czy mikrochimeryzm jest zaangażowany w patologię chorób ciąży lub chorób, na które preferencyjnie częściej zapadają kobiety. Immunologiczne konsekwencje mikrochimeryzmu nie są do końca poznane, potencjalnie może powodować on zarówno szkodliwe, jak i pozytywne efekty. Znaczenie tego zjawiska dla zdrowia matki dopiero zaczyna być badane.

Już od dawna istnieją dowody [31,49] na to, że płodowe komórki i kwasy nukleinowe przedostają się do krwi matki i że wzrasta natężenie tego procesu w przypadku ciąż patologicznych (tab. 1). Niemiecki patolog George Schmorl już w XIX wieku zaobserwował obecność komórek trofoblastu w płucach 14 na 17 kobiet, które umarły z powodu rzucawki. Odkrycia dotyczące trofoblastu przedstawione na podstawie badań, które Attwood i Parka przeprowadzili ponad 60 lat po G. Schmorlu, dowiodły, że duże komórki trofoblastu były rzeczywiście obecne w płucach większości próbek przebadanych po śmierci kobiet i komórki te były najczęstsze w przypadku rzucawki. Inni badacze wykorzystywali metody barwienia pozwalające odróżnić krwinki czerwone matki i płodu. Potwierdziły one, że stan przedrzucawkowy wiązał się ze zwiększonym transportem tych komórek od płodu do krążenia matki.

Dalszy rozwój badań nad mikrochimeryzmem mógł nastąpić tylko dzięki rozwojowi bardziej dokładnych molekularnych technik badawczych pozwalających na izolację, detekcję i analizę tych bardzo rzadkich komórek.

Mikrochimeryzm a choroby autoimmunologiczne

Wiele badań koncentruje się na związku występowania mikrochimeryzmu i rozwoju chorób autoimmunologicznych, szczególnie tych, które mają cechy reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi, na przykład: twardzina układowa [9,54], zespół Sjögrena (suchość) [7,25] czy pierwotna marskość żółciowa [66]. Znaleziono płodowe komórki w tkankach kobiet, które cierpiały także na inne choroby autoimmunologiczne: twardzina skóry [41], toczeń [40], zapalenie tarczycy typu Hashimoto [46,47,79]. Spośród chorób nie-autoimmunologicznych mikrochimeryzm został opisany, na przykład, dla zapalenia wątroby [42], nie-autoimmunologicznych chorób tarczycy [79] oraz nowotworu szyjki macicy [20]. Na większość z tych chorób, np. twardzina układowa, toczeń rumieniowaty czy choroba Hashimoto, kobiety chorują częściej od mężczyzn.

W przypadku tych schorzeń wykazano obecność komórek chimerycznych w większej ilości niż w przypadku grupy kontrolnej. Badania grupy Cha D. [20] wykazały w ten sposób potencjalną zależność pomiędzy mikrochimeryzmem a zachorowalnością na raka szyjki macicy. Negatywny wynik uzyskano dla wszystkich kobiet z grupy kontrolnej po przebadaniu wycinków tej tkanki.

Badania nad znaczeniem mikrochimeryzmu u kobiet cierpiących z powodu chorób tarczycy pokazują, jak trudno jest bezpośrednio powiązać obecność płodowych komórek płodowych z patogenezą tych chorób. W przypadku kobiet cierpiących na zapalenie tarczycy na podłożu autoimmunologicznym – typu Hashimoto nie wykazano zależności występowania komórek chimerycznych a zachorowalnością. Tylko u 8 spośród 21 kobiet wykryto komórki męskie z różną częstością (15–4900 komórek XY / 100000 wszystkich komórek) [46]. Wyniki te przeczą jednak wcześniejszym pracom tego samego zespołu [47], w których stwierdzono, że mikrochimeryzm był znacząco częstszym zjawiskiem u kobiet z chorobą Hashimoto w porównaniu z grupą kobiet mających wole guzkowate. Renne i wsp. [75] wykazali również, że płodowy mikrochimeryzm jest zjawiskiem częstszym u kobiet cierpiących na autoimmunologiczne choroby tarczycy w porównaniu z innymi typami schorzeniami. U 23 spośród 49 przebadanych pacjentek wykryto komórki chimeryczne. 60% kobiet z chorobą Hashimoto i 40% kobiet z chorobą Gravesa było pozytywne pod względem obecności tych komórek, a spośród kobiet cierpiących na gruczolakę pęcherzykowego tarczycy – tylko 22,2%. W innych badaniach [79] męskie płodowe komórki wykryto u 16 na 29 kobiet cierpiących na różne choroby tarczycy bez względu na etiopatogenezę. Komórki te na skrawkach występowały pojedynczo lub tworzyły skupiska bez względu na rodzaj patologii. W jednym przypadku postępującego rozrostu wola wykryto w pełni funkcjonalne, zróżnicowane komórki pęcherzykowe tarczycy zbudowane z komórek chimerycznych, których na pierwszy rzut oka nie można było odróżnić od macicznych komórek pęcherzykowych. Powyższe wyniki sugerują zależność obecności płodowych komórek chimerycznych a rozwojem chorób tarczycy. Płodowe komórki macierzyste prawdopo-

dobnie osiedlają się w tarczycy i są zdolne do różnicowania się w normalne, w pełni funkcjonalne komórki pęcherzyków pod wpływem nieznanych czynników.

W śliniankach 11 na 20 kobiet z syndromem Sjögrena znaleziono płodowe DNA, a w grupie kontrolnej tylko u 1 na 8. Identyfikacja płodowych komórek w śliniankach sugeruje reakcję przeciwko komórkom matki i to być może ma wpływ na rozwój syndromu Sjögrena [25]. Również w przypadku liszaja rumieniowatego układowego w tkankach dotkniętych chorobą znaleziono komórki męskie, a brak ich było w tkankach zdrowych [40].

Pierwsze badania dotyczące reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) sugerowały związek pomiędzy przepływem komórek płodowych a zachorowalnością. Wykazano bowiem mniejsze ryzyko RZS związane z ciążą. Stan pacjentki na okres ciąży znacznie poprawiał się, aby 3–4 miesiące po urodzeniu dziecka wrócić do stanu poprzedniego. To zjawisko zdaje się korelować ze stopniem niezgodności antygenów HLA klasy II pomiędzy matką i dzieckiem [85]. Pomimo to, badania 71 kobiet z RZS potwierdziły mikrochimeryzm tylko u 24% tych kobiet, co nie stanowiło znacząco wyższego odsetka w porównaniu z grupą kontrolną (19%) [86]. Później pokazano, że poziom wolnego płodowego DNA w surowicy krwi matki jest odwrotnie proporcjonalny do nasilenia choroby matki w czasie ciąży. Kobiety, u których nie zaobserwowano poprawy, miały znacząco niższe ilości płodowego DNA w surowicy [85]. Prawdopodobnie główną rolę w regulacji tego procesu odgrywają matczyne komórki prezentujące antygeny płodowe, indukujące regulatorowe limfocyty T i zmieniające repertuar limfocytów na obwodzie. Utrzymywanie się mikrochimeryzmu stanowi podstawę utrzymania się stanu wyciszenia układu immunologicznego gospodarza poprzez usunięcie limfocytów T reagujących z antygenami dawcy [16].

Mikrochimeryzm według niektórych badaczy jest prawdopodobnie uwikłany w genezę chorób autoimmunologicznych poprzez zdolność do stymulowania układu immunologicznego matki. Przemawiają za tym wyniki badań dotyczących wielu z tych chorób. Jednakże sprawę zdają się komplikować badania nad chorobami nie-autoimmunologicznymi, w których również potwierdzono obecność komórek chimerycznych [42,79]. Biorąc pod uwagę wszystkie te fakty sądzi się, że komórki te mogą uczestniczyć w odpowiedzi na uszkodzenie lub że nie mają z nim żadnego związku i są raczej konsekwencją choroby niż jej przyczyną. Mikrochimeryzm, więc przypuszczalnie nie jest bezpośrednio zaangażowany w patogenezę chorób autoimmunologicznych, lecz jest on tylko ich skutkiem [20]. Poza tym, dramatyczne różnice w ilości komórek chimerycznych pomiędzy chorymi, np. z twardziną układową i z chroniczną reakcją GVHD, nie pozwalają na prostą ekstrapolację mechanizmów GVHD na choroby autoimmunologiczne. Jednakże, tak nieproporcjonalny do liczby komórek chimerycznych efekt, jaki obserwuje się u chorych z chorobami autoimmunologicznymi, mógłby być spowodowany przez rozregulowanie układu immunologicznego matki. Dodatkowo reakcja mogłaby zostać wzmocniona przez limfocyty prezentujące antygeny płodowe innym komórkom gospodarza. Dokładnie tak dzieje się w przypadku odrzucania przeszczepów. Udowodniono także obecność klonów limfocytów T o płodowym pochodzeniu, które reagowały z antygenami HLA matki chorej na twardzinę układową

[77]. Kolejny intrygujący wątek powstał, gdy opisano niezwykle plastyczność komórek [73]. Prawdopodobnie komórki płodowe, które były zdolne utrzymać się w organizmie matki, potrafią się różnicować i przez to zaangażowane są w naprawę tkanki lub w przeciwnym wypadku, po zróżnicowaniu stają się celem dla maczynego układu immunologicznego i wtedy stymulują rozwój autoagresji [55]. Starano się dowieść prawdziwości hipotezy głoszącej, że płodowe komórki mogą reagować na uszkodzenie tkanek maczynych przez zdolność do różnicowania się w dojrzałe komórki danej niszy. Zbadano próbki od kobiet cierpiących na wiele chorób, które wcześniej miały męskie potomstwo [45]. Komórki pochodzenia płodowego noszące nabłonkowe, leukocytarne oraz wątrobowe markery zidentyfikowano, odpowiednio, w maczynych tkankach nabłonkowych (tarczycy, szyjki macicy, jelita, woreczek żółciowy), limfatycznych (grasica, grudki chłonne) oraz w wątrobie. Sugeruje to jednoznacznie istnienie płodowych komórek o zdolności do różnicowania w komórki wielu różnych linii. W niektórych badaniach komórki chimeryczne wykryto z podobną częstością u ludzi zdrowych i chorych [54]. Jeżeli płodowe chimeryczne komórki wykrywano u 50–70% kobiet po urodzeniu zdrowego dziecka, to inne czynniki niż choroba autoimmunologiczna czy haplotypy HLA mają wpływ na przeżycie tych komórek w organizmie matki. Prawdopodobnie te same czynniki, które mają wpływ na zwiększony napływ komórek płodowych, mają także znaczenie dla dłuższego ich przeżycia [44,45,65].

Mikrochimeryzm a komplikacje ciąży

Komplikacje przebiegu ciąży, takie jak: stan przedrzucawkowy, zmiany w tętnicy macicznej, łożysko przodujące, ograniczenie wzrostu płodu, wielowodzie oraz aneuploidie płodu, powodują wzrost liczby komórek chimerycznych i stężenie płodowego DNA we krwi matki [27,37,59]. Cukrzyca matki również powoduje pewne zmiany ilościowe i jakościowe w przepływie komórek pomiędzy płodem i matką. Poprzez opóźnienie dojrzewania erytroblastów – przełączenie syntezy hemoglobiny embrionalnej na płodową, powoduje transport większej liczby prymitywnych komórek linii erytropoezy [4].

Po przebadaniu populacji 16 ciężarnych kobiet noszących płody płci męskiej z zespołem Downa, zaobserwowano 6–32 płodowych komórek w 1 ml krwi obwodowej matki [51]. Jest to wartość 3–5 razy wyższa niż w przypadku zdrowego płodu, w którym znaleziono tylko 2–6 komórek płodowych w 1 ml krwi matki [52]. Prawidłowa diagnoza oparta na określeniu liczby erytroblastów płodowych we krwi matki w czasie ciąży dotyczyła aż 87,5% przebadanych położnic z aneuploidią płodu [72]. Na podstawie obserwacji zasugerowano, że określenie liczby płodowych erytroblastów może być potencjalną nieinwazyjną metodą badań przesiewowych pod kątem istnienia aneuploidii płodu, a w szczególności zespołu Downa [27,50,51].

Obserwowany wzrost liczby płodowych komórek we krwi matki może być także rezultatem zmian patologicznych w budowie łożyska, które stanowią podstawę wystąpienia wielu komplikacji w czasie ciąży. Badanie zjawiska mikrochimeryzmu może w przyszłości pomóc w określeniu ryzyka wystąpienia także tego zagrożenia dla rozwijającego się płodu wcześniej nawet, niż jest to możliwe przy zastosowaniu metody USG [78]. Taką właśnie zależność opisano już dla stanu przedrzucawkowego [31].

Ciężkie komplikacje, takie jak przedwczesny poród, nie mają wpływu na przepływ komórek płodowych do krążenia matki [33]. Zaobserwowano jednak, iż kobiety, które urodziły przed terminem (poniżej 30 tygodnia ciąży), miały podwyższony poziom płodowego DNA w swojej surowicy [26]. Poronienie znacząco wpływa na przechodzenie komórek płodowych do krążenia matki i ma znaczenie dla utrzymania się tych komórek w jej organizmie, prawdopodobnie ze względu na większą liczbę komórek przechodzących lub preferencyjny transport komórek szczególnie łatwo zagnieżdżających się w tkankach matki [44]. Inne badania pokazały, że mikrochimeryzm był najwyższy u kobiet, które przeprowadziły aborcję [86]. Zaobserwowano również wysoki poziom płodowego DNA w krążeniu matki po takim zabiegu [11]. Zwiększony transfer i większy potencjał proliferacyjny tych przechodzących komórek stanowią potencjalne wyjaśnienie, dlaczego po indukowanej aborcji utrzymuje się więcej komórek płodowych we krwi matki [86]. Ten drugi argument podparty jest obserwacjami, że wczesne progenitory CD34-pozytywne występują w większej ilości w pierwszym trymestrze ciąży niż w późniejszych jej fazach, co wskazywać może, że więcej tych komórek przenika do krążenia matki. Jednocześnie, zwiększony przepływ komórek lub uszkodzenie trofoblastu też może prowokować układ odpornościowy matki, co w konsekwencji prawdopodobnie prowadzi do przedwczesnego porodu. Jak widać, również w tym przypadku powiązanie przyczynowo-skutkowe nie jest prostą zależnością [26].

PODSUMOWANIE

Mikrochimeryzm i utrzymywanie się płodowych komórek długo po porodzie są to zjawiska przypuszczalnie związane z patogenezą wielu chorób autoimmunologicznych, na które preferencyjnie częściej cierpią kobiety mające dzieci i przypominają w swojej patogenezie reakcję przeszczep przeciwko gospodarzowi – znany stan chimeryzmu [64]. Płodowe komórki znalezione aż 50 lat po porodzie [44,67] i zróżnicowane męskie komórki znalezione w tkankach dotkniętych chorobą sugerują, że płodowe komórki macierzyste osiedlają się i różnicują w tkankach matki-gospodarza [45,79].

Prawdopodobnie mikrochimeryzm jest częstszym zjawiskiem niż się przypuszcza. Może mieć incydentalny charakter w przypadku zdrowej ciąży bez żadnego biologicznego znaczenia lub może dawać długoterminowe konsekwencje. Utrzymywanie się komórek płodowych może tłumaczyć fakt, dlaczego kobiety są kiepskimi dawcami szpiku i organów. Płodowe komórki w szpiku matki mogą zwiększać też rezerwuuar komórek macierzystych, co jednak stanowi potencjalnie dodatkowe utrudnienie w czasie przeszczepów zwiększając zagrożenie reakcją GVHD. Mikrochimeryzm być może także tłumaczy, dlaczego kobiety żyją dłużej i dlaczego ciąża chroni je przed niektórymi chorobami [67,85].

Podczas gdy obecność rzadkich komórek płodowych we krwi matki została bezspornie udowodniona, kliniczne zastosowanie rozwijających się technik jest na razie wciąż niemożliwe. Mała liczba tych komórek, niewystarczający odsetek powodzeń oraz brak specyficznych markerów komórek płodowych są największymi utrudnieniami

w czasie analizy, izolacji, identyfikacji płodowych komórek krążących we krwi matki i w związku z tym także diagnozy z ich zastosowaniem. Hodowla komórek płodowych może potencjalnie być środkiem pozwalającym na zniwelowanie niektórych tych trudności poprzez zwielokrotnienie liczby komórek do badań molekularnych i cytogenetycznych, włącznie z analizą kariotypu komórek dzielących się. Krwiotwórcze

TABELA 1. Liczba płodowych komórek zmienia się w zależności od stanu zdrowia kobiety oraz od istnienia komplikacji ciąży

Liczba komórek	Badane populacje	Rodzaj patologii	Lit.
3/573 ml krwi matki	Erytroblasty płodowe	Normalna ciąża	[49]
6,57 ± 7,12 /ml krwi matki			[82]
89,4 ± 92,6/10 ml krwi matki			[37]
56,7/10 ml krwi matki			[78]
545,5/10 ml krwi matki		Zahamowanie wzrostu płodu wewnątrz macicy	[78]
28/15 ml krwi matki	Płodowe męskie komórki	Normalna ciąża	[49]
2–6/ml krwi matki			[52]
12–20/ml krwi matki			[62]
0–5,1/mln komórek matki			[56]
1/100 komórek matki			[4]
15–4900/ 100000 komórek jednojądrzastych krwi matki		Zapalenie tarczycy typu Hashimoto	[46]
6–32/ml krwi matki		Trisomia chromosomu 21	[50]
1–165/skrawek tarczycy		Różne schorzenia tarczycy	[79]
0–23,7/mln komórek matki		Twardzina układowa	[56]
7,5/100 komórek matki		Cukrzyca matki	[4]
50–37618/16 ml krwi matki		Aborcja	[11]
13/20 ml krwi matki	Komórki D34+	Normalna ciąża	[29]
1–3/20 ml krwi matki	Komórki D34+ z poprzednich ciąży		

progenitorowe komórki CD34⁺ stanowią atrakcyjny cel dla hodowli i ekspansji komórek płodowych [29].

Analiza płodowych komórek we krwi matki jest wciąż najlepszą potencjalną alternatywą dla inwazyjnych metod badań prenatalnych płodowych aneuploidii [12,30]. Niezależna wieloośrodkowa analiza przeprowadzona przez *National Institutes of Health Fetal Cell Study* (NIFTY) wykazała, że płodowe chimeryczne komórki nie mają zastosowania w diagnostyce i terapii ze względu na wciąż zbyt mało wydajne metody ich izolacji i detekcji, bez możliwości zapewnienia 100% pewności, że badane komórki płodowe pochodzą z teraźniejszej ciąży. Wydaje się, że dotychczasowe osiągnięcia w tym zakresie nie są wystarczające, by wprowadzić je do praktyki klinicznej [13].

Większość opisanych metod nieinwazyjnej diagnostyki prenatalnej z użyciem komórek chimerycznych ma poważne ograniczenie. Identyfikacja płodowych komórek oparta jest najczęściej na detekcji chromosomu Y, więc może być użyteczna tylko w przypadku, gdy kobieta spodziewa się potomka płci męskiej i niemożliwe staje się diagnozowanie żeńskich płodów. Jednakże, ostatnio Cha DH i wsp. [19] opracowali nową metodę pozwalającą na wydajną analizę komórek płodowych niezależnie od płci płodu. Zastosowano tutaj system zliczający płodowe erytroblasty na podstawie cech morfologicznych oraz typu hemoglobiny, jaki występuje wyłącznie w życiu płodowym. Ich płodowe pochodzenie potwierdziła dodatkowo analiza polimorfizmu krótkich tandemowych powtórzeń (STR – ang. *short tandem repeat*).

Diagnostyka z wykorzystaniem płodowego wolnego DNA z surowicy krwi matki stanowi kolejną potencjalną alternatywę. Wcześniejsze badania pokazały, że ilość matczynego i płodowego DNA w surowicy krwi matki zmienia się. W przeciągu trzech dni ilość płodowego wolnego DNA wahała się i czasami zmiany te naśladowały zmiany towarzyszące aneuploidii płodu [32]. Wyniki te przestrzegają przed oceną krótkotrwałych i niewielkich zmian w poziomie płodowego DNA i przed stawianiem diagnozy tylko na ich podstawie. Jednocześnie, optymistycznie nastraja fakt, iż ilość płodowego wolnego DNA po pobraniu jest stabilna w próbówce do 24 godzin i dzięki temu może stanowić użyteczne narzędzie badań prenatalnych [6]. Rozwój tych strategii diagnostyki sprawić może, że testy te staną się mniej stresujące dla matki, dla której priorytetem w czasie ciąży jest zdrowie i bezpieczeństwo nienarodzonego dziecka. Optymalizacja całej dostępnej metodologii powinna przyczynić się do zwiększenia jej użyteczności w praktyce klinicznej do diagnostyki prenatalnej i w przyszłości umożliwić wykonywanie w sposób łatwy i bezpieczny badań przesiewowych pod kątem istnienia jakichkolwiek zagrożeń zarówno dla matki, jak i dla płodu.

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania Panu Prof. dr hab. Andrzejowi Myśliwskiemu za wsparcie i wszechstronną pomoc w realizacji projektu oraz w tworzeniu niniejszej pracy.

LITERATURA

- [1] ADAMS KM, LAMBERT NC, HEIMFELD S, TYLEE TS, PANG JM, ERICKSON TD, NELSON JL. Male DNA in female donor apheresis and CD34-enriched products. *Blood* 2003; **102**(10): 3845–3847.
- [2] AL-MUFTI R, HAMBLEY H, FARZANEH F, NICOLAIDES KH. Assessment of efficacy of cell separation techniques used in the enrichment of foetal erythroblasts from maternal blood: triple density gradient vs. single density gradient. *Clin Lab Haematol* 2004; **26**(2): 123–128.
- [3] AL-MUFTI R, HAMBLEY H, FARZANEH F, NICOLAIDES KH. Distribution of fetal erythroblasts enriched from maternal blood in multifetal pregnancies. *Hum Reprod* 2003; **18**(9): 1933–1936.
- [4] AL-MUFTI R, HAMBLEY H, FARZANEH F, NICOLAIDES KH. Fetal and embryonic hemoglobins in erythroblasts from fetal blood and fetal cells enriched from maternal blood in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004; **15**(2): 109–114.
- [5] AL-MUFTI R, HAMBLEY H, FARZANEH F, NICOLAIDES KH. Fetal erythroblasts in maternal blood in relation to gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; **14**(6): 392–397.
- [6] ANGERT RM, LESHANE ES, LO YM, CHAN LY, DELLI-BOVI LC, BIANCHI DW. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem* 2003; **49**(1): 195–198.
- [7] ARACTINGIS, SIBILIA J, MEIGNIN V, LAUNAY D, HACHULLA E, LE DANFF C, JANIN A, MARIETTE X. Presence of microchimerism in labial salivary glands in systemic sclerosis but not in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; **46**(4): 1039–1043.
- [8] ARIGA H, OHTO H, BUSCH MP, IMAMURA S, WATSON R, REED W, LEE TH. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 2001; **41**(12): 1524–1530.
- [9] ARTLETT CM, COX LA, RAMOS RC, DENNIS TN, FORTUNATO RA, HUMMERS LK, JIMENEZ SA, SMITH JB. Increased microchimeric CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood from women with systemic sclerosis. *Clin Immunol* 2002; **103**: 303–308.
- [10] BIANCHI DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential – a review. *Placenta* 2004; **25** Suppl A: 93–101.
- [11] BIANCHI DW, FARINA A, WEBER W, DELLI-BOVI LC, DERISO M, WILLIAMS JM, KLINGER KW. Significant fetal-maternal hemorrhage after termination of pregnancy: implications for development of fetal cell microchimerism. *Am J Obstet Gynecol* 2001; **184**(4): 703–706.
- [12] BIANCHI DW, ROMERO R. Biological implications of bi-directional fetomaternal cell traffic: a summary of a National Institute of Child Health and Human Development-sponsored conference. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2003; **14**(2): 123–129.
- [13] BIANCHI DW, SIMPSON JL, JACKSON LG, ELIAS S, HOLZGREVE W, EVANS MI, DUKES KA, SULLIVAN LM, KLINGER KW, BISCHOFF FZ, HAHN S, JOHNSON KL, LEWIS D, WAPNER RJ, de la CRUZ F. 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**(7): 609–615.
- [14] BILEZIKCI B, SAHIN F, UYAR P, YILMAZ Z, DEMIRHAN B, TURAN M, ARAT Z, HABERAL M. Frequency of recipient-derived chimerism and relationship with acute rejection and HLA tissue typing in transplanted livers. *Transplant Proc* 2006; **38**(2): 598–601.
- [15] BISCHOFF FZ, SINACORI MK, DANG DD, MARQUEZ-DO D, HORNE C, LEWIS DE, SIMPSON JL. Cell-free fetal DNA and intact fetal cells in maternal blood circulation: implications for first and second trimester non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2002; **8**(6): 493–500.
- [16] BONILLA WV, GEUKING MB, AICHELE P, LUDEWIG B, HENGARTNER H, ZINKERNAGEL RM. Microchimerism maintains deletion of the donor cell-specific CD8⁺ T cell repertoire. *J Clin Invest* 2006; **116**(1): 156–162.
- [17] BROJER E, ZUPANSKA B, GUZ K, ORZINSKA A, KALINSKA A. Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005; **45**(9): 1473–1480.
- [18] CAMPAGNOLI C, ROBERTS IA, KUMAR S, CHOOLANI M, BENNETT PR, LETSKY E, FISK NM. Expandability of haemopoietic progenitors in first trimester fetal and maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2002; **22**(6): 463–469.

- [19] CHA DH, KHOSROTEHRANI K, BIANCHI DW, JOHNSON KL. The utility of an erythroblast scoring system and gender-independent short tandem repeat (STR) analysis for the detection of aneuploid fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 2005; **25**(7): 586–591.
- [20] CHA D, KHOSROTEHRANI K, KIM Y, STROH H, BIANCHI DW, JOHNSON KL. Cervical cancer and microchimerism. *Obstet Gynecol* 2003; **102**(4): 774–781.
- [21] CHAN KC, ZHANG J, HUI AB, WONG N, LAU TK, LEUNG TN, LO KW, HUANG DW, LO YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; **50**(1): 88–92.
- [22] CHIU RW, LAU TK, CHEUNG PT, GONG ZQ, LEUNG TN, LO YM. Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002; **48**(5): 778–780.
- [23] CHOOANI M, O'DONOGHUE K, TALBERT D, KUMAR S, ROBERTS I, LETSKY E, BENNETT PR, FISK NM. Characterization of first trimester fetal erythroblasts for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003; **9**(4): 227–235.
- [24] COSTA JM, GIOVANGRANDI Y, ERNAULT P, LOHMANN L, NATAF V, EL HALALI N, GAUTIER E. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 2002; **119**(1): 255–260.
- [25] ENDO Y, NEGISHI I, ISHIKAWA O. Possible contribution of microchimerism to the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *Rheumatology* (Oxford) 2002; **41**(5): 490–495.
- [26] FARINA A, LESHANE ES, ROMERO R, GOMEZ R, CHAIWORAPONGSA T, RIZZO N, BIANCHI DW. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2005; **193**(2): 421–425.
- [27] FALCIDIA E, PARANO E, GRILLO A, PAVONE P, TAKABAYASHI H, TRIFILETTI RR, SCOLLO P, DALLAPICCOLA B, GRAMMATICO P, NOVELLI A, PALADINI D, MONNI G, GULISANO A, SCASSELLATI G. Fetal cells in maternal blood: a six-fold increase in women who have undergone amniocentesis and carry a fetus with Down syndrome: a multicenter study. *Neuropediatrics* 2004; **35**(6): 321–324.
- [28] 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**(8): 1079–1085.
- [29] GUETTA E, GORDON D, SIMCHEN MJ, GOLDMAN B, BARKAI G. Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34+ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation. *Blood Cells Mol Dis* 2003; **30**(1): 13–21.
- [30] HAHN S, HOLZGREVE W. Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insights into pre-eclampsia. *Hum Reprod Update* 2002; **8**(6): 501–508.
- [31] HAHN S, HUPPERTZ B, HOLZGREVE W. Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta* 2005; **26**(7): 515–526.
- [32] HAHN S, ZHONG XY, BURK MR, TROEGER C, KANG A, HOLZGREVE W. Both maternal and fetal cell-free DNA in plasma fluctuate. *Ann NY Acad Sci* 2001; **945**: 141–144.
- [33] 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.
- [34] HROMADNIKOVA I, KARAMANOV S, HOUBOVA B, HRIDELOVA D, KOFER J, MRSTINOVA M. Non-invasive fetal sex determination on fetal erythroblasts from the maternal circulation using fluorescence *in situ* hybridisation. *Fetal Diagn Ther* 2002; **17**(4): 193–199.
- [35] HROMADNIKOVA I, VECHETOVA L, VESELA K, BENESOVA B, DOUCHA J, KULOVANYE, VLK R. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther* 2005; **20**(4): 275–280.
- [36] HUPPERTZ B, KINGDOM J, CANIGLIA I, DESOYE G, BLACK S, KORR H, KAUFMANN P. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta* 2003; **24**(2–3): 181–190.
- [37] IKEYA M, SHINYA M, KITAGAWA M. Basic investigation of the lectin method for separation and recovery of nucleated red blood cells in maternal blood, and a study into the frequency of nucleated red blood cells in fetomaternal disorders. *Congenit Anom* (Kyoto) 2005; **45**(1): 26–31.
- [38] INVERNIZZI P, BIONDI ML, BATTEZZATI PM, PEREGO F, SELMI C, CECCHINI F, PODDA M, SIMONI G. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet* 2002; **110**(6): 587–591.
- [39] JIMBO M, SEKIZAWA A, SUGITO Y, MATSUOKA R, ICHIZUKA K, SAITO H, OKAI T. Placenta increta: Postpartum monitoring of plasma cell-free fetal DNA. *Clin Chem* 2003; **49**(9): 1540–1541.

- [40] JOHNSON KL, MCALINDON TE, MULCAHY E, BIANCHI DW. Microchimerism in a female patient with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; **44(9)**: 2107–2111.
- [41] JOHNSON KL, NELSON JL, FURST DE, MCSWEENEY PA, ROBERTS DJ, ZHEN DK, BIANCHI DW. Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2001; **44(8)**: 1848–1854.
- [42] JOHNSON KL, SAMURA O, NELSON JL, MCDONNELL M D WM, BIANCHI DW. Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C: Evidence of long-term survival and expansion. *Hepatology* 2002; **36(5)**: 1295–1297.
- [43] KAUFMANN P, BLACK S, HUPPERTZ B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003; **69(1)**: 1–7.
- [44] KHOSROTEHRANI K, JOHNSON KL, LAU J, DUPUY A, CHA DH, BIANCHI DW. The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism: a systematic review. *Arthritis Rheum* 2003; **48(11)**: 3237–3241.
- [45] KHOSROTEHRANI K, JOHNSON KL, CHA DH, SALOMON RN, BIANCHI DW. Transfer of fetal cells with multilineage potential to maternal tissue. *JAMA* 2004; **292(1)**: 75–80.
- [46] KLINTSCHAR M, IMMEL UD, KEHLEN A, SCHWAIGER P, MUSTAFA T, MANNWEILER S, REGAUER S, KLEIBER M, HOANG-VU C. Fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis: a quantitative approach. *Eur J Endocrinol* 2006; **154(2)**: 237–241.
- [47] KLINTSCHAR M, SCHWAIGER P, MANNWEILER S, REGAUER S, KLEIBER M. Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86(6)**: 2494–2498.
- [48] KOLIALEXI A, TSANGARIS GT, ANTSAKLIS A, MAVROUA A. Rapid clearance of fetal cells from maternal circulation after delivery. *Ann NY Acad Sci* 2004; **1022**: 113–118.
- [49] KOLVRAA S, CHRISTENSEN B, LYKKE-HANSEN L, PHILIP J. The fetal erythroblast is not the optimal target for non-invasive prenatal diagnosis: preliminary results. *J Histochem Cytochem* 2005; **53(3)**: 331–336.
- [50] KRABCHI K, GADJI M, FOREST JC, DROUIN R. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood in different cases of aneuploidies. *Clin Genet* 2006; **69(2)**: 145–154.
- [51] KRABCHI K, GADJI M, SAMASSEKOU O, GREGOIRE MC, FOREST JC, DROUIN R. Quantification of fetal nucleated cells in maternal blood of pregnant women with a male trisomy 21 fetus using molecular cytogenetic techniques. *Prenat Diagn* 2006; **26(1)**: 28–34.
- [52] KRABCHI K, GROS-LOUIS F, YAN J, BRONSARD M, MASSE J, FOREST JC, DROUIN R. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 2001; **60(2)**: 145–150.
- [53] LAMBERT NC, ERICKSON TD, YAN Z, PANG JM, GUTHRIE KA, FURST DE, NELSON JL. Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time polymerase chain reaction: studies of healthy women and women with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2004; **50(3)**: 906–914.
- [54] LAMBERT NC, LO YM, ERICKSON TD, TYLEE TS, GUTHRIE KA, FURST DE, NELSON JL. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood* 2002; **100(8)**: 2845–2851.
- [55] LAMBERT N, NELSON JL. Microchimerism in autoimmune disease: more questions than answers? *Autoimmun Rev* 2003; **2(3)**: 133–139.
- [56] LAMBERT NC, PANG JM, YAN Z, ERICKSON TD, STEVENS AM, FURST DE, NELSON JL. Male microchimerism in women with systemic sclerosis and healthy women who have never given birth to a son. *Ann Rheum Dis* 2005; **64(6)**: 845–848.
- [57] LI Y, HOLZGREVE W, PAGE-CHRISTIAENS GC, GILLE JJ, HAHN S. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma—case report. *Prenat Diagn* 2004; **24(11)**: 896–898.
- [58] LO YMD. Recent Advances in Fetal Nucleic Acids in Maternal Plasma. *J Histochem Cytochem* 2005; **53(3)**: 293–296.
- [59] LO YM. Fetal DNA in maternal plasma/serum: the first 5 years. *Pediatr Res* 2003; **53(1)**: 16–17.
- [60] LO YM. Recent developments in fetal nucleic acids in maternal plasma: implications to noninvasive prenatal fetal blood group genotyping. *Transfus Clin Biol* 2006; **13**: 50–52.
- [61] MASUZAKI H, MIURA K, YOSHIURA KI, YOSHIMURA S, NIKAWA N, ISHIMARU T. Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet* 2004; **41(4)**: 289–292.

- [62] MERGENTHALER S, BABOCHKINA T, KIEFER V, LAPAIRE O, HOLZGREVE W, HAHN S. FISH analysis of all fetal nucleated cells in maternal whole blood: improved specificity by the use of two Y-chromosome probes. *J Histochem Cytochem* 2005; **53**(3): 319–322.
- [63] NAGY GR, BAN Z, SIPOS F, BEKE A, PAPP C, PAPP Z. Isolation of epsilon-haemoglobin-chain positive fetal cells with micromanipulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 2005; **25**(5): 398–402.
- [64] NELSON JL. Microchimerism and human autoimmune diseases. *Lupus* 2002; **11**(10): 651–654.
- [65] NELSON JL. Microchimerism: incidental byproduct of pregnancy or active participant in human health? *Trends Mol Med* 2002; **8**(3): 109–113.
- [66] NOMURA K, SUMIDA Y, YOH T, MORITA A, MATSUMOTO Y, TAJI S, YOSHIDA N, MINAMI M, ITOH Y, HORIIKE S, KATAOKA K, TANIWAKI M, OKANOUE T. Lack of evidence for leukocyte maternal microchimerism in primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004; **10**(16): 2415–2416.
- [67] O'DONOGHUE K, CHAN J, de la FUENTE J, KENNEA N, SANDISON A, ANDERSON JR, ROBERTS IA, FISK NM. Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet* 2004; **364**(9429): 179–182.
- [68] O'DONOGHUE K, CHOLANI M, CHAN J, de la FUENTE J, KUMAR S, CAMPAGNOLI C, BENNETT PR, ROBERTS IA, FISK NM. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003; **9**(8): 497–502.
- [69] OSADA H, DOI S, FUKUSHIMA T, NAKAUCHI H, SEKI K, SEKIYA S. Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery. *Transfusion* 2001; **41**(4): 499–503.
- [70] OUDEJANS CB, TJOA ML, WESTERMAN BA, MULDER MA, Van WIJK IJ, Van VUGT JM. Circulating trophoblast in maternal blood. *Prenat Diagn* 2003; **23**(2): 111–116.
- [71] POON LL, LEUNG TN, LAU TK, CHOW KC, LO YM. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002; **48**(1): 35–41.
- [72] PRIETO B, CANDENAS M, VENTA R, LADENSON JH, ALVAREZ FV. Isolation of fetal nucleated red blood cells from maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Clin Chem Lab Med* 2002; **40**(7): 667–672.
- [73] QUESENBERRY PJ, DOONER G, COLVIN G, ABEDI M. Stem cell biology and the plasticity polemic. *Exp Hematol* 2005; **33**(4): 389–394.
- [74] RANDEN I, HAUGE R, KJELDSEN-KRAGH J, FAGERHOL MK. Prenatal genotyping of RHD and SRY using maternal blood. *Vox Sang* 2003; **85**(4): 300–306.
- [75] RENNE C, RAMOS LOPEZ E, STEIMLE-GRAUER SA, ZIOLKOWSKI P, PANI MA, LUTHER C, HOLZER K, ENCKE A, WAHL RA, BECHSTEIN WO, USADEL KH, HANSMANN ML, BADENHOOP K. Thyroid fetal male microchimerisms in mothers with thyroid disorders: presence of Y-chromosomal immunofluorescence in thyroid-infiltrating lymphocytes is more prevalent in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease than in follicular adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; **89**(11): 5810–5814.
- [76] RODRIGUEZ DE ALBA M, PALOMINO P, GONZALEZ-GONZALEZ C, LORDA-SANCHEZ I, IBANEZ MA, SANZ R, FERNANDEZ-MOYA JM, AYUSO C, DIAZ-RECASENS J, RAMOS C. Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical comparative evaluation of the first and second trimesters. *Prenat Diagn* 2001; **21**(3): 165–170.
- [77] SCALETTI C, VULTAGGIO A, BONIFACIO S, EMMIL, TORRICELLI F, MAGGIE, ROMAGNANI S, PICCINNI MP. Th2-oriented profile of male offspring T cells present in women with systemic sclerosis and reactive with maternal major histocompatibility complex antigens. *Arthritis Rheum* 2002; **46**(2): 445–450.
- [78] SIMCHEN MJ, BARKAI G, LUSKY A, GUETTA E. Fetal hemoglobin-expressing nucleated red blood cell frequencies in pregnancies with intrauterine growth restriction. *Prenat Diagn* 2001; **21**(1): 31–35.
- [79] SRIVATSA B, SRIVATSA S, JOHNSON KL, SAMURA O, LEE SL, BIANCHI DW. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet* 2001; **358**(9298): 2034–2038.
- [80] TACHDJIAN G, FRYDMAN N, AUDIBERT F, RAY P, KERBRAT V, ERNAULT P, FRYDMAN R, COSTA JM. Clinical applications of fetal sex determination in maternal blood in a preimplantation genetic diagnosis centre. *Hum Reprod* 2002; **17**(8): 2183–2186.
- [81] UTTER GH, OWINGS JT, LEE TH, PAGLIERONI TG, REED WF, GOSSELIN RC, HOLLAND PV, BUSCH MP. Blood transfusion is associated with donor leukocyte microchimerism in trauma patients. *J Trauma* 2004; **57**(4): 702–707.
- [82] WADA S, KITAGAWA M. Method of separation and concentration of fetal nucleated red blood cells in maternal blood and its application to fetal diagnosis. *CONGENIT ANOM (Kyoto)* 2004; **44**(2): 72–78.

- [83] Van WIJK IJ, GRIFFIOEN S, TJOA ML, MULDER MA, van VUGT JM, LOKE YW, OUDEJANS CB. HLA-G expression in trophoblast cells circulating in maternal peripheral blood during early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; **184(5)**: 991–997.
- [84] WONG BC, LO YM. Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; **3(6)**: 785–797.
- [85] YAN Z, LAMBERT NC, OSTENSEN M, ADAMS KM, GUTHRIE KA, NELSON JL. Prospective study of fetal DNA in serum and disease activity during pregnancy in women with inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; **54(7)**: 2069–2073.
- [86] YAN Z, LAMBERT NC, GUTHRIE KA, PORTER AJ, LOUBIERE LS, MADELEINE MM, STEVENS AM, HERMES HM, NELSON JL. Male microchimerism in women without sons: quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *Am J Med* 2005; **118(8)**: 899–906.
- [87] ZHONG XY, HOLZGREVE W, HAHN S. Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts. *Mol Hum Reprod* 2002; **8(9)**: 864–870.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 10.10. 2006 r.

Przyjęto: 29.11. 2006 r.

ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk,

e-mail: mszarynska@amg.gda.pl