

## Fosterceller i gravide kvinders blod som materiale til fosterdiagnostik

John Philip, cand.scient. Britta Christensen, Steen Kølvraa, bioanalytiker Lene Lykke-Hansen, Jens Bang, Steen Smidt-Jensen, stud.med. Jonas Egebart & Jens Hertz

Fosterdiagnostik indgår som en naturlig del af svangreomsorgen. Diagnostik af kromosomsygdomme og monogene sygdomme baseres på fosterceller, der udtages enten ved fostervands- eller moderkageprøve. Disse undersøgelser er behæftede med en risiko på 0,3-1,5% for spontan abort. Derfor tilbydes de kun til gravide med kendt øget risiko for at få et barn med en medfødt sygdom. Det er et mål for genetisk forskning at basere fosterdiagnostikken på risikofri isolering af fosterceller fra den gravide kvindes blodbane [1].

Et holdpunkt for, at der findes fosterceller i den gravides blodbane, er, at det har været muligt at påvise kromosomsygdomme og monogene genetiske sygdomme hos fostre på grundlag af celler, isoleret fra den gravides blodbane. De to væsentligste årsager til, at der ikke allerede foreligger klinisk anvendelige metoder til at udnytte teknikken er: 1) Fosterceller forekommer med meget ringe hyppighed i den gravides blod; der er derfor behov for opkoncentrering eller andre metoder, der kan gøre opsøgning af fostercellerne mulig i praktisk klinik, 2) det har vist sig vanskeligt at udvikle velegnede (specifikke) markører til isolation og identifikation af fosterceller.

Hyppigheden af fosterceller hos gravide antages at være 2-6 celler pr. ml moderblod ( $1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-7}$  kerneholdige celler). Antagelsen baseres på undersøgelser af *Hamada et al* [2] og *Krabchi et al* [3]. Disse undersøgere har foretaget tælling af fosterceller på grundlag af forekomsten af Y-kromosom-signaler i interfaseceller i blodpræparater fra gravide kvinder med hanlige fostre. Undersøgelserne blev baserede på blodprøver, der ikke var udsat for berigelsesprocedurer, hvorfor resultatet kan anses for holdbart. Når Y-signalet anvendes som fostercellemarkør, er analysen uafhængig af celletype. Herved adskiller *Hamadas* og *Krabchis* undersøgelser sig fra de andre, hvor en specifik celletype har været mål for analysen, idet der ved disse blev anvendt forudgående berigelse af blodprøverne. Berigelse kan f.eks. være positiv selektion af celletypen ved hjælp af immunomagnetisk teknik (MACS) eller immunbaseret flowcytometriteknik (FACS); der kan også anvendes negativ selektion, hvor fjernelse af erythrocytter og leukocytter fra blodprøven foretages for at lette (muliggøre) tællearbejdet.

Forskellige fostercelletyper findes i den gravide kvindes blodbane. Man har påvist trofoblastceller og celler fra den hvide og den røde cellelinje [4, 5].

Interessen har i de senere år specielt været rettet mod føtale erythroblaster [6]. Disse er velegnede, fordi de kan identificeres ved mærkning med antistoffer mod embryonale hæmoglobinkæder. Endvidere er de hyppigt forekommende hos fosteret i den tidlige graviditet og kan derfor forventes at passere hyppigt over i den gravides blodbane. Erythroblasterne fra fosteret har endvidere en kort levetid i moderens blodbane. Det har vist sig muligt at isolere føtale erythroblaster fra gravide (Fig. 1).

Vi har på Rigshospitalet blandt andet udviklet en anvendelig protokol til at isolere og identificere føtale erythroblaster fra gravide kvinders blod [7]. Anvendelsen af denne protokol er baseret på »mild berigelse« af fosterceller i forhold til materielle celler og opsøgning af fostercellerne ved hjælp af en mikroskopbaseret hurtig skanner. To modeller har været anvendt til udviklingen: 1) tilblending af fosterceller til blod fra ikkegravide og 2) blodprøver fra gravide taget efter moderkageprøve. I sådanne blodprøver findes nemlig en forøget hyppighed af fosterceller, fordi fosterceller fra placenta går over i moderens blod i forbindelse med indgrebet. Ved undersøgelse af sådanne blodprøver finder vi fostererythroblaster i stort tal. Når denne teknik anvendes på blodprøver fra gravide kvinder, der ikke har fået taget moderkageprøve, har vi imidlertid fundet langt færre fostererythroblaster end forventet ifølge

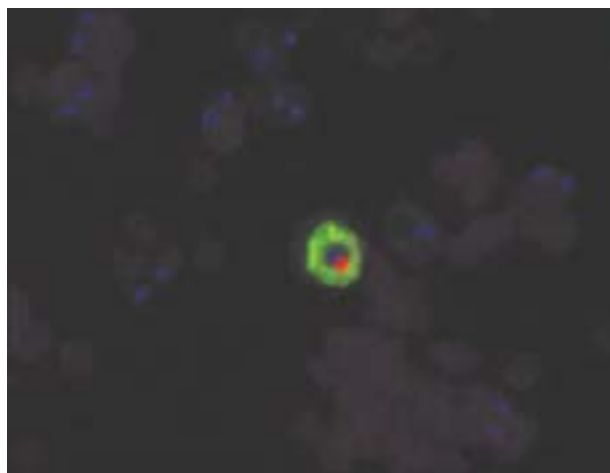


Fig. 1. Udstrykningspræparat fra en blodprøve fra en gravid kvinde. Blodprøven er taget efter en chorionbiopsi. Fostercellen er identificeret ved farvning af cytoplasmaet med FITC-mærket anti-zeta-hæmoglobin-antistof. Efter hybridisering med X (blå) og Y (rød) kromosomprober ses tydeligt et blåt og et rødt signal.

Der findes fosterceller i gravide kvinders blod. Antallet er meget ringe: 2-6 pr. ml. Dette tal er baseret på tælling af hanlige celler i uselekteret blod fra graviditeter med drengefostre.

De tekniske krav til identifikation og isolation er derfor meget store:

Koncentrationen af fosterceller i den enkelte prøve må forøges og/eller store mængder blod må undersøges.

Fostercellerne skal mærkes specifikt for at kunne anvendes til fosterdiagnostik; f.eks. kan fosterceller af den røde blodlinje mærkes med antistof mod embryonalt hæmoglobin; trofoblastceller kan måske mærkes med antistof mod HLA-G-antigen. Hanlige celler kan mærkes med Y-kromosom-specifikt materiale (Y-prober).

ovennævnte undersøgelser. Vi har derfor måttet konkludere, at der er et misforhold mellem antallet af fostererytrobaster i gravide kvinders blod (før moderkageprøve) og det almindeligt anslåede antal fosterceller, og at en klinisk anvendelig metode ikke alene kan baseres på fostererytrobaster.

Det konstaterede misforhold mellem undersøgelser af hyp-pighederne af fosterceller fundet ved anvendelse af Y-signalen uden forudgående berigelse og undersøgelser baseret på forudgående berigelse af blodprøverne for fosterceller indikerer, at andre celletyper end fostererytroblasten forekommer i den gravides blodbane og formentlig udgør den største del.

Man har tidligt interesseret sig for at isolere trofoblastceller fra den gravides blodbane [8]. Flere forskergrupper har arbejdet med identifikation af antistoffer til isolation og identifikation af trofoblastceller [9]. Det har imidlertid vist sig vanskeligt at identificere velegnede antistoffer. En fransk gruppe har fokuseret på det forhold, at trofoblastcellen er større end andre celler i moderens blod [10]. Disse undersøgere har udviklet et specielt finmasket filter, som har muliggjort frasortering af trofoblastcellerne for videre testning. Det forventes at blive testet i forbindelse med et samarbejde i EU-regi. Vi gennemprøver nu et antistof mod HLA-G-antigenet [11].

Lymfocytter har ligeledes været mål for den noninvasive prænatale diagnostik. Lymfocytter og lymfocytforstadier kan selekteres ved hjælp af specifikke antistoffer f.eks. CD45. Interessen for lymfocytter er imidlertid aftaget efter at *Bianchi et al* [12] påviste, at lymfocytten og dens forstadier kan findes i den gravide kvindes organisme i mange år. Dette medfører en teoretisk risiko for, at fosterdiagnostik kan blive baseret på celler fra en tidligere graviditet.

Fokus på forskning i udnyttelsen af fosterceller i den gravide kvindes blodbane til fosterdiagnostik flyttes for øjeblikket fra erytrobaster til andre celletyper f.eks. trofoblastceller, hvor forbedrede antistoffer er tilgængelige.

Et særligt aspekt vil være at undersøge fordelingen af forskellige fostercelletyper i moderens blod. I sammenhæng her-

med skal der fokuseres på videreudvikling af berigelsesmetoder rettet mod celletyper, der udgør en større del af fostercellerne i den gravide kvindes blod end erytrobasterne. Berigelsesproceduren er vigtig, fordi berigelse medfører tab af fosterceller (egne upublicerede fund). Tabet kan skyldes, at der sorteres for andre celletyper end dem, der forekommer i størst mængde.

Vi har som nævnt på Rigshospitalet valgt en strategi, der baseres på meget begrænset berigelse; til gengæld gennemser vi store blodmængder ved hjælp af gennemskanning med en hurtig mikroskopbaseret skanner (MetaSystems). Skanneren finder automatisk de celler, der er specifikt mærkede med de fluorescensmærkede fosterspecifikke markører, disse kan f.eks. være hæmoglobinantistoffer eller trofoblastantistoffer. Efterfølgende kan mærkede celler automatisk genopsøges, betragtes på en skærm eller direkte i mikroskop. Kromosomdiagnostik vil kunne foretages ved in situ-hybridisering direkte på fosterceller på objektglasset, eller de vil kunne fjernes ved mikromanipulation og efter ekstraktion og opformering ved polymerasekædereaktion (PCR) analyseres genetisk [13]. (Skanneren er stillet til rådighed af MetaSystems, der også har modificeret den efter opgavens skiftende behov).

Der er betydelige muligheder for videreudvikling af skanneren. Af andre udviklingsperspektiver skal nævnes fosterspecifikke markører: Markørerne er indlysende vigtige for såvel sortering som opsøgning/identifikation. Nye markører kan forventes fundet ved proteinalyse og genekspressionsanalyse af fosterceller fra blod- eller vævsprøver fra aborter samt fostervands- og moderkageprøver. Der sker i øjeblikket store fremskridt inden for billedanalyse til cellegenkendelse og nanoteknologi til cellesortering i forbindelse med anvendelse af fosterceller fra maternelt blod til prænatal diagnostik.

En anderledes indgang til noninvasiv prænatal diagnostik er udnyttelsen af forekomsten af føtalt DNA i den gravide kvindes blod. En gennemgang af problemstillingerne heromkring falder uden for denne statusartikel. Det bør dog nævnes, at det i dag er muligt at bestemme fosterets rhesustype ved undersøgelse af føtalt DNA fra en blodprøve fra moderen. Dette udnyttes allerede klinisk i England. Teknikken tillader at bestemme rhesustypen hos alle fostre af rhesusnegative kvinder. Dette gør det muligt at sikre mod hæmolytisk sygdom hos

På Rigshospitalet har vi anvendt en metode til skånsom isolation af erytrobaster efterfulgt af hurtig mikroskopbaseret skanning af relativt store mængder blod.

Vi har fundet færre føtale erytrobaster end forventet.

Vi har konkluderet, at andre celletyper end erytrobaster må udgøre en stor del af fostercellerne i gravide kvinders blod. Vi undersøger nu forekomsten af trofoblastceller ved hjælp af antistof mod HLA-G-vævstypen.

rhesuspositive fostre/børn allerede i graviditeten. Det vil også være muligt at diagnosticere dominant arvelige og nogle recessivt arvelige sygdomme ved analyse af føtal DNA i materielt plasma.

Forskningsaktiviteten på området er høj, til trods for at de betydelige anstrengelser, der er gjort indtil nu, ikke har ført til en klinisk anvendelig metode. Dette fremgik blandt andet af indlæggen ved en lukket konference i Washington i begyndelsen af 2003, hvor National Institutes of Health ønskede en status på området med henblik på den fremtidige administration af støtten til området. Det fremgår også af, at der inden for EU's sjette rammeprogram er etableret en europæisk forskergruppe med knap 50 deltagende grupper.

At det har vist sig muligt risikofrit at stille såvel kromosomdiagnoser som diagnoser på monogenetiske sygdomme på fosterceller fra gravide kvinders blod vejer tungt for at området videreudvikles, når man sammenligner med risikoen ved fostervands- og moderkageprøve.

Korrespondance: John Phillip, Forskningsenheden for Prænatal Diagnostik, JMC-4074, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: philipj@rh.dk

Antaget den 9. oktober 2003.

H:S Rigshospitalet, Juliane Marie Centret, Forskningsenheden for Prænatal Diagnostik.

Vi takker følgende for værdifuld hjælp: Dhanesh Gohel, Immunicon, Andreas Plesch og Thomas Lörch, MetaSystems, Henning Djursing og afdelingssygeplejerske Grete Lovies, H:S Frederiksberg Hospital, Gynækologisk Afdeling og sekretær Anne-Grete Sidenius.

#### Litteratur

1. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. *Prenat Diagn* 2002;22:609-15.
2. Hamada H, Arinami T, Kubo T et al. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum Genet* 1993;91:427-32.
3. Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 2001;60:145-50.
4. Simpson JL, Elias S, eds. Prenatal diagnosis of aneuploidy using fetal cells isolated from maternal blood. *Ann NY Acad Sci (United States)* 1994;731:80-91.
5. Simpson J, Elias S. Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* 1994;14:1229-42.
6. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF et al. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:3279-83.
7. Christensen B, Phillip J, Lykke-Hansen L et al. Sensitivity and specificity of the identification of fetal cells in maternal blood by combined staining with antibodies against beta-, gamma- and epsilon-globin chains. *Fetal Diagn Therapy* 2003;18:479-84.
8. Oudejans CBM, Tjoa ML, Westerman BA et al. Circulating trophoblast in maternal blood. *Prenat Diagn* 2003;23:111-6.
9. Mueller UW, Hawes CS, Wright AE et al. Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 1990;336:197-200.
10. Vona G, Beroud C, Benachi A et al. Enrichment, immunomorphological and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood. *Am J Pathol* 2002;160:51-8.
11. McMaster M, Librach C, Zhou Y et al. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *Journal of immunology* 1995;154:3771-8.
12. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:705-8.
13. Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW. Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nature Genetics* 1996;14:264-8.

## Føtal programmering af kroniske sygdomme

Jørn Olsen

Føtal programmering af sygdomme hos voksne er en pompøs og vildledende titel for, hvad der må betegnes som et sæt af meget forskellige teorier. Programmering lyder deterministisk. Et edb-program fører til et bestemt resultat, hvis programmet er skrevet rigtigt. De teorier, der er knyttet til det biologiske programmeringsbegreb, er ikke deterministiske. De omfatter oftest ændringer i personens sårbarhed for senere miljøpåvirkninger. Er man programmeret til hjerte-kar-sygdomme, betyder det blot, at man er mere sårbar end andre over for de kendte risikofaktorer: inaktivitet, overvægt, rygning, fedt kost etc.

At påvirkninger i fostertilstanden kan have langsigtede virkninger, er naturligvis ikke nogen ny idé. Heller ikke at denne effekt først vil kunne manifestere sig senere i livet. At føtal alkoholeksponering kan føre til varige hjerneskader har

været en formodning, der bl.a. er beskrevet i Bibelen. Vi ved, at en række påvirkninger virker teratogent som f.eks. thalidomid, radioaktiv bestråling, infektioner som toksoplasmose, rubella og cytomegalovirus for blot at nævne nogle eksempler.

Det er dog en ny tanke, at organers funktion eventuelt kan påvirkes af deres vækstbetingelser i fosterlivet. Denne forskning er først og fremmest knyttet til *Barker*, en nu pensioneret britisk epidemiolog, men hans inspiration til disse teorier stammer fra *Forsdals* iagttagelser fra Norge. *Forsdal* viste, at 40-69-årige mænd havde en hjerte-kar-dødelighed, der på det makroepidemiologiske plan korrelerede tæt med den børnedødelighed, der var gældende i de kommuner, de blev født i, og i den periode de blev født [1]. Det kunne ligeledes vises, at denne korrelation også gælder mellem serumkolesterol i vok-