

Artikelen

Trofoblastcellen circulerend in het moederlijk bloed: mogelijkheden voor diagnostiek

I.J. van WIJK, J.M.G. van VUGT¹ en C.B.M. OUDEJANS

Tijdens de vroege zwangerschap migreren extravilleuze trofoblastcellen afkomstig van de placenta in het baarmoederweefsel van de vrouw. Naast ingroei in het decidua- en spierweefsel van de baarmoeder (interstitiële invasie) vindt er ook ingroei in de vaatwanden (endovasculaire invasie) plaats. Dit proces leidt tot specifieke veranderingen in de wanden van de toevoerende moederlijke vaten in de baarmoederwand en is essentieel voor de zwangerschap. Als gevolg van dit invasieproces komen foetale cellen (endovasculaire trofoblastcellen) in de perifere circulatie van de moeder terecht en zijn, na een relatief simpele ingreep (venapunctie), toegankelijk voor diagnostiek. Na verrijking kunnen deze trofoblastcellen gebruikt worden voor niet-invasieve vroege prenatale diagnostiek van numerieke chromosomale afwijkingen van de foetus. Tevens zouden, naast het gebruik voor prenatale diagnostiek, deze circulerende trofoblastcellen informatief kunnen zijn voor vroege detectie van pre-eclampsie, een veel voorkomende zwangerschapsaandoening gerelateerd aan trofoblastdysfunctie.

Trefwoorden: trofoblast; extravilleus; invasief; prenatale diagnostiek; pre-eclampsie

Trofoblastinvasie

Succesvolle implantatie van de bevruchte eicel en het tot stand komen van een verbinding tussen de bloedcirculaties van de zwangere vrouw en de groeiende foetus middels vorming van een placenta zijn afhankelijk van de actieve ingroei en interactie van de trofoblastcel in en met het baarmoederweefsel tijdens het eerste trimester van de zwangerschap. Trofoblastcellen zijn cellen van foetale oorsprong die buiten het embryo gelegen zijn (extraembryonaal) en de barrière c.q. uitwisselingszone vormen tussen moeder en kind. In deze interactie tussen moederlijk en foetaal weef-

sel speelt een subtype van trofoblastcellen, de zgn. extravilleuze trofoblastcellen, een essentiële rol. Deze trofoblastcellen migreren vanuit de placentaire celkolommen die verankerd zijn met het moederlijk weefsel, actief en selectief in de decidua en het spierweefsel (placentabed), alsook in bepaalde toevoerende bloedvaten van de baarmoeder. Op grond van deze locatie worden deze cellen, respectievelijk interstitiële en endovasculaire trofoblastcellen genoemd. Deze vorm van migratie van de extravilleuze trofoblast in de baarmoeder is uniek voor de mens. De invasie is een complex en dynamisch proces waarbij de cellen stoppen met prolifereren en onder andere MMP-9 (het 92 kDa matrix metalloproteïnase molecuul), HLA-G en specifieke hormonen zoals 'human placental lactogen' (hPL) tot expressie brengen (1,2). Tevens vinden er uitgebreide veranderingen plaats in het expressiepatroon van adhesiemoleculen op de cytotrofoblast als weerspiegeling van het invasieve karakter van deze cel (3).

Migratie door de extravilleuze trofoblast in het placentabed is een specifiek, actief, selectief en tijdsafhankelijk proces (4). Het meest opvallende resultaat van dit proces is dat de vaatwand, en wel alleen de vaatwand van de spiraalarteriën, uiteindelijk bestaat uit een binnenbekleding van trofoblastcellen die de maternale endotheelcellen vervangen hebben en waarbij fibrinoïd de plaats heeft ingenomen van de musculo-elastische media. Op deze manier wordt de diameter van de arteriën, welke de groeiende foetus van bloed voorzien, vergroot, wordt de toevoer van voedingsstoffen alsook zuurstof naar de groeiende foetus gegarandeerd en wordt de moederlijke vaatwand ter plaatse onafhankelijk van de invloed van maternale vasoconstrictors.

Invasie door extravilleuze trofoblastcellen vindt plaats in twee perioden tijdens de zwangerschap. De eerste invasiegolf start in de eerste maand van de zwangerschap en duurt tot 12 weken, leidend tot bovengenoemde veranderingen in de decidua-segmenten van de spiraalarteriën. De tweede golf vindt plaats in het tweede trimester, vanaf week 14 tot ongeveer 18 weken en leidt tot veranderingen in de myometriumsegmenten van de spiraalarteriën (4). Deze laatste golf van invasie door extravilleuze trofoblastcellen in de myometriumsegmenten van de spiraalarteriën is gestoord bij zwangerschappen die leiden tot pre-eclampsie (4,5,6).

Moleculair Biologisch Laboratorium, Afdeling Klinische Chemie en Afdeling Verloskunde en Gynaecologie¹, Academisch Ziekenhuis der Vrije Universiteit in Amsterdam

Correspondentie: Dr. I.J. van Wijk, Moleculair Biologisch Laboratorium, Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis der Vrije Universiteit, Postbus 7057, 1007 MB Amsterdam.
Ingekomen: 22.04.98

Niet-invasieve prenatale diagnostiek van genetische afwijkingen

Als gevolg van het hierboven beschreven invasieproces komen extravilleuze trofoblastcellen al vroeg tijdens de zwangerschap in het perifere bloed van de vrouw terecht. Deze cellen circulerend in het moederlijke bloed zijn een bron van foetaal genetisch materiaal en daardoor interessant voor niet-invasieve prenatale diagnostiek. Reeds meer dan 100 jaar geleden werden trofoblastcellen in de bloedvaten van de long van een vrouw met een door eclampsie gecompliceerde zwangerschap gevonden (7). De laatste decennia is door nieuwe ontwikkelingen op het gebied van de cellulaire en moleculaire biologie zoals PCR en DNA/RNA in situ hybridisaties, diagnostische analyse van deze in lage aantallen in het moederlijk bloed circulerende cellen mogelijk geworden (8). Behalve trofoblastcellen circuleren tevens foetale lymfocyten en kernhoudende erythrocyten in het bloed van de zwangere vrouw. In theorie kunnen deze cellen ook voor prenatale diagnostiek gebruikt worden. Echter, foetale lymfocyten kunnen nog zeer lang na de zwangerschap blijven circuleren in het bloed van de vrouw en zijn moeilijk te onderscheiden van maternale lymfocyten (9,10). Dit kan leiden tot vals positieve resultaten in latere zwangerschappen. Kernhoudende erythrocyten zijn net als trofoblastcellen goede kandidaatcellen voor niet-invasieve prenatale diagnostiek, hoewel de identificatie van de kernhoudende rode bloedcellen bemoeilijkt wordt door het feit dat zij ook in lage percentages voorkomen in normaal bloed van volwassenen (11). Veel gebruikte argumenten voor het gebruik van foetale rode bloedcellen in plaats van trofoblastcellen, zijn dat rode bloedcellen in hogere aantallen aanwezig zouden zijn in het perifere bloed (12,13) en dat door zijn polynucleaire karakter de trofoblastcel ongeschikt zou zijn voor prenatale diagnostiek (14). Het eerste argument is echter reeds weerlegd door een recente studie waarin beschreven wordt dat net als in het geval van trofoblastcellen, gemiddeld één foetale rode bloedcel per milliliter bloed tijdens de vroege zwangerschap geïsoleerd kan worden (15). Voorts kunnen problemen met eventuele multinucleaire trofoblastelementen vermeden worden door specifiek uninucleaire trofoblastcellen als target cel te gebruiken. Voor identificatie van foetale kernhoudende erythrocyten kan gebruik worden gemaakt van foetaal hemoglobine (16), voor identificatie van trofoblastcellen kan gebruik worden gemaakt van trofoblastspecifieke antilichamen (17,18). Wij hebben door middel van visualisatie van transcripten (mRNA) van het HASH2-gen trofoblastcellen in het perifere bloed van zwangere vrouwen geïdentificeerd (19). HASH2 is het humane homoloog van het 'Mammalian Achaete Scute Homologue 2' gen (Mash-2) (20). In de muis wordt Mash-2 exclusief tot expressie gebracht in spongiotrofoblastcellen welke verantwoordelijk zijn voor de ontwikkeling van het gedeelte van de placenta, dat grenst aan moederlijk weefsel (21). In de mens wordt HASH2, analoog aan de situatie bij de muis, exclusief tot expressie gebracht in de extravilleuze trofoblastcellen van de placenta zoals aangetoond met behulp van

niet-radioactieve RNA in situ hybridisatie (20). Met deze moleculair biologische methode hebben wij uitgaande van 20 ml maternaal bloed, na verrijking van foetale trofoblastcellen door dichtheidsgradientcentrifugatie en negatieve immunoaffiniteits-isolatie, gemiddeld 25 foetale trofoblastcellen geïdentificeerd in het perifere bloed van zwangere vrouwen in week 6 tot 14 van de zwangerschap (n=25) (19). Als de RNA in situ hybridisatie die gebruikt wordt voor de identificatie van de trofoblastcellen gecombineerd wordt met een DNA in situ hybridisatie, kunnen tegelijkertijd enerzijds de trofoblastcellen als foetaal geïdentificeerd worden en anderzijds eventuele numerieke chromosomale afwijkingen zoals het syndroom van Down (trisomie 21) gedetecteerd worden.

Bij de huidige methoden voor prenatale diagnostiek zoals chorionvilli-biopsie, amniocentese en cordocentese, bestaat een reëel risico op een miskraam; resp. gemiddeld 1%, 0.5% en 1% (22). Deze invasieve methoden zijn tevens pas relatief laat in de zwangerschap uit te voeren (vanaf resp. 11, 14 en 18 weken zwangerschap). Het grote voordeel van prenatale diagnostiek met circulerende trofoblastcellen uit het perifere maternale bloed zou zijn dat deze methode niet-invasief is (geen risico voor de foetus) en al zeer vroeg tijdens de zwangerschap uitgevoerd kan worden. Met behulp van een zeer specifieke en gevoelige PCR-methode voor amplificatie van X- en Y-chromosomale sequenties is door onze en andere groepen aangetoond dat Y-chromosomaal DNA bevattende (en dus foetale) cellen circuleren in het maternale bloed vanaf week 8 resp. week 5 van de zwangerschap (23,24). In tabel 1 zijn de resultaten weergegeven van de PCR voor amplificatie van X- en Y-chromosomale sequenties van foetale cellen geïsoleerd uit perifere bloed van 36 zwangere vrouwen. De resultaten zijn vergeleken met de 'gouden standaard', te weten de geslachtsbepaling door middel van conventionele karyotypering na chorionvlokbopsie of amniocentese. Concluderend kan worden vastgesteld dat de voordelen van de trofoblast ten opzichte van bijvoorbeeld kernhoudende erythrocyten voor prenatale diagnostiek zijn dat (i) trofoblastcellen niet aanwezig zijn in normaal volwassen bloed, (ii) al vroeg tijdens de zwangerschap circuleren in het bloed, (iii) zeer waarschijnlijk na de bevalling niet langdurig in het perifere bloed blijven bestaan (iv) en mogelijkterwijs na isolatie in

Tabel 1. Geslachtsbepaling van de foetus met behulp van PCR van foetale cellen geïsoleerd uit maternaal bloed enerzijds en door middel van conventionele karyotypering na chorionvlokbopsie of amniocentese (CVS/AC) anderzijds

Aantal patiënten (zwangerschapsduur)	PCR foetale cellen	karyo-type CVS/AC	correlatie
20 patiënten (week 6-12)	V	V	correct
13 patiënten (week 8-15)	M	M	correct
2 patiënten (week 10)	V	M	fout negatief
1 patiënt (week 10)	M	V	fout positief

Totaal: 36 patienten; 91,7% correct voorspeld

kweek gebracht zouden kunnen worden. Dit laatste biedt de mogelijkheid van karyotypering van circulerende trofoblastcellen, waardoor de resultaten van niet-invasieve prenatale diagnostiek geheel vergelijkbaar zouden worden met die van de huidige invasieve methoden waarbij karyotypering van chorioncellen of amniocyten plaatsvindt na chorionvilli-biopsie of amniocentese. Bij het opzetten van een selectieve kweekmethode voor de extravillieuze trofoblastcellen kan gebruik gemaakt worden van de methoden die ontwikkeld zijn voor 'explant-cultures'; chorionvillibioten van een eerste trimester zwangerschap kunnen worden gekweekt op een specifieke coating, Matrigel, die verscheidene basaalmembraancomponenten en groeifactoren bevat. De invasieve extravillieuze trofoblastcellen zullen hechten aan en migreren over de coating en zijn enkele weken in kweek te houden (1,25).

Naast het gebruik voor prenatale diagnostiek van chromosomale afwijkingen (en tevens "single gene disorders") hebben trofoblastcellen additionele voordelen ten opzichte van andere in het bloed circulerende foetale cellen tijdens de zwangerschap. Deze mogelijkheden hangen samen met de placentaire afkomst en het invasieve karakter van de trofoblastcel en het feit dat zwangerschapsafwijkingen zoals pre-eclampsie gekenmerkt worden door trofoblastdysfunctie.

Pre-eclampsie en intra-uteriene groeivertraging

Pre-eclampsie treft 7 tot 10% van alle eerste zwangerschappen en 5% van alle volgende zwangerschappen. De moeder heeft hoge bloeddruk, proteïnurie en oedeem. De foetus van een zwangere met pre-eclampsie heeft een verhoogd risico op intra-uteriene groeivertraging (IUGR) en perinatale morbiditeit en mortaliteit (26). Hoewel de oorzaak van pre-eclampsie niet bekend is, is duidelijk dat de placenta er primair bij betrokken is. Verwijdering van de placenta is de enige afdoende 'behandeling' van pre-eclampsie (27). In pre-eclampsie vindt excessieve proliferatie van trofoblastcellen plaats en de invasie van de trofoblastcel in het maternale weefsel is verstoord: er is sprake van een ondiepe invasie van de trofoblastcellen (28,4,5). Hierdoor vindt de endovasculaire invasie en de ermee gepaard gaande transformatie van de moederlijke vaatwand slechts plaats in die gedeelten van de spiraalarteriën die in het decidua gelegen zijn. De vaatgedeelten die in het spierweefsel gelegen zijn blijven in patiënten met pre-eclampsie in tegenstelling tot de normale zwangerschap ongewijzigd wat leidt tot een gereduceerde bloedtoevoer naar de foetus. De bloedvaten van deze zwangere vrouwen vertonen uiteindelijk endotheeldisfunctie met lokaal in het placentabed acute atherosis gekarakteriseerd door fibrinoïdnecrose, infiltrerende leukocyten en macrofagen en het verschijnen van lipiden bevattende schuimcellen (27). Uiteindelijk resulteert dit in hypertensie van de zwangere. De klinische symptomen van pre-eclampsie worden pas na de 20e week van de zwangerschap zichtbaar.

Er wordt verondersteld dat bij zwangeren met pre-eclampsie tijdens het eerste trimester een vertraging

van de differentiatie van de trofoblastcellen optreedt, of dat de trofoblastcellen blijven steken in de ontwikkeling (28). Algemeen wordt ervan uitgegaan dat er in pre-eclampsie een defect is in de normale interactie tussen migrerende trofoblastcellen en het maternale weefsel van het placentabed.

In de normale situatie vertonen endovasculaire trofoblastcellen een scala van fenotypische veranderingen die van belang zijn voor de invasie in en de interactie met de maternale bloedvaten. Zo is er bijvoorbeeld verminderde proliferatie, verhoogde expressie van endotheline-1 en MMP-9 en correleert de expressie van HLA-G met het proces van invasie (1,29-32). Maar vooral blijkt tijdens een normale zwangerschap in de trofoblastcellen een ingrijpende verandering van het expressiepatroon van celadhesiemoleculen plaats te vinden bij de overgangsfase van de extravillieuze trofoblast van niet-invasieve naar invasieve cel. De expressie van integrin $\alpha 6\beta 4$ en E-cadherin worden verlaagd, de expressie van bijvoorbeeld integrin $\alpha 1\beta 1$, PECAM, VE-Cadherin en VCAM-1 verhoogd. Deze veranderingen worden beschreven als 'endothelialisering' van de invasieve trofoblastcellen (3) of als een transitie van epitheliaal naar mesenchymaal celtype (33). Recent zijn er aanwijzingen gevonden dat in endovasculaire trofoblastcellen van zwangeren met pre-eclampsie deze fenotypische veranderingen wat betreft de expressie van adhesiemoleculen in de migrerende trofoblastcellen, niet plaats vinden (34,35). De extravillieuze endovasculaire trofoblastcellen van patiënten met pre-eclampsie blijven bijvoorbeeld integrin $\alpha 6\beta 4$ en E-cadherin tot expressie brengen, ware het trofoblastcellen die nog geen invasie vertonen. Tevens is er geen expressie van VE-Cadherin, VCAM-1, PECAM of integrin $\alpha 1\beta 1$ (35). Met andere woorden, het expressieprofiel van adhesiereceptoren van pre-eclamptische extravillieuze trofoblastcellen blijft steken in een ongedifferentieerd patroon.

Dit verschil in fenotype tussen de endovasculaire trofoblastcel van de gezonde zwangere vrouw en van de zwangere met pre-eclampsie is mogelijk te gebruiken voor vroege diagnostiek van pre-eclampsie. Door de circulerende trofoblastcellen te isoleren uit het perifere bloed van de vrouw, en deze cellen vervolgens te analyseren met betrekking tot expressie van specifieke adhesiemoleculen, zou het mogelijk kunnen zijn zeer vroeg tijdens de zwangerschap, lang voor de gevolgen van de afwijking klinisch zichtbaar worden, een diagnose: ontwikkelende pre-eclampsie, te stellen. Bij de op deze manier vastgestelde risico-zwangerschappen zouden preventieve maatregelen genomen kunnen worden om de secundaire effecten zoals hoge bloeddruk, proteïnurie en oedeem te beperken of te voorkomen. Dit onderzoek, gebaseerd op de analyse van expressie van specifieke adhesiemoleculen in uit het perifere bloed geïsoleerde trofoblastcellen voor detectie van deze veelvoorkomende zwangerschapsaandoening, is inmiddels in ons laboratorium opgestart.

In vitro analyse van de invasieve trofoblastcel

De processen waarin een tumorcel loskomt van een weefsel tijdens metastase, circuleert in het bloed en

vervolgens invasie vertoont in een nieuw weefsel, vertonen overeenkomsten met het proces van invasie van de trofoblastcel. De processen van invasie van trofoblastcellen en tumorcellen zijn sterk gerelateerd. Deregulatie van het invasieproces van de trofoblast speelt waarschijnlijk een rol bij de pathogenese van choriocarcinomen. Invasie van de trofoblastcel tijdens de zwangerschap is echter in een normale situatie een strikt gereguleerd proces. Het is daarom interessant om factoren te analyseren die de invasie controleren. Zo zijn bijvoorbeeld TNF- α en humaan uteroglobine geïdentificeerd als remmende factoren voor de mobiliteit van invasieve trofoblastcellen (36,37). TGF- β 1 blijkt een anti-invasief effect te bewerkstelligen door downregulatie van plasminogeen activatoren (PA) en inductie van weefsel-specifieke remmers van metalloproteïnases (zoals TIMP-1) (38). Alternatieve splicing van specifieke genen kan ook een strategie zijn om het invasieve karakter van een cel te beïnvloeden (39). Het is niet ondenkbaar dat analyse van dit type factoren in de trofoblastcel in de toekomst mede diagnostische waarde kan hebben voor bijvoorbeeld de ontwikkeling van specifieke carcinomen. Ook het fenomeen van 'genomic imprinting' van specifieke genen en daaraan gekoppeld verlies van imprinting (loss of imprinting, LOI), vaak geassocieerd met het ontstaan van specifieke tumoren, kan bij uitstek in deze trofoblastcellen bestudeerd worden (40,41).

Literatuur

1. Librach CL, Werb Z, Fitzgerald ML, Chiu K, Corwin NM, Esteves RA, Grobelny D et al. 92 Kda type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *J Cell Biol* 1991; 13: 437-449.
2. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A Class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990; 248: 220-223.
3. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. *J Clin Invest* 1997; 99: 2139-2151.
4. Pijnenborg R. Trophoblast invasion. *Rep Med Rev* 1994; 3: 53-73.
5. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, Asshe A van. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994; 101: 669-674.
6. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small for gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93: 1049-1059.
7. Schmorl G. Pathologische-anatomische Untersuchungen über Puerperal-Eklampsie. *Vogel* 1893.
8. Wijk IJ van, Vugt JMG van, Oudejans CBM. Foetale cellen in de maternale circulatie. In: *Prenatale Diagnostiek*. Ed. H Brandenburg. Bohn Stafleu Van Loghum bv. 1997: 90-102.
9. Schröder J, Tiilikainen A, Chapelle A de la. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. *Transplantation* 1974; 17: 346-354.
10. Tharapel AT, Jaswaney VL, Dockter ME, Wachtel SS, Chandler RW, Simpson JL, Shulman LP et al. Failure to detect fetal metaphases in lymphocytes flow sorted by maternal-fetal HLA differences. *Fetal Diagn Ther* 1993; 8: 95-101.
11. Slunga-Tallberg A, El-Rifai W, Keinmen M, Ylinen K, Kurki T, Klinger K, Ylikorkala O et al. Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women. *Hum Genet* 1995; 96: 53-57.
12. Adinolfi M. Non- or minimally invasive prenatal diagnostic tests on maternal blood samples or transcervical cells. *Pren Diagn* 1995; 15: 889-896.
13. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells in the maternal circulation. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 409-418.
14. Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *J Pediatr* 1995; 127: 847-856.
15. 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.
16. Zheng Y-L, Demaria M, Zhen D, Vadnais TJ, Bianchi DW. Flow sorting of fetal erythroblasts using intracytoplasmic anti-fetal haemoglobin: preliminary observations on maternal samples. *Prenat Diagn* 1995; 15: 897-905.
17. Hawes CS, Suskin HA, Petropoulos A, Latham SE, Mueller UW. A morphologic study of trophoblast isolated from peripheral blood of pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170: 1297-1300.
18. Durrant L, McDowall K, Holmes R, Liu D. Non-invasive prenatal diagnosis by isolation of both trophoblasts and fetal nucleated red blood cells from the peripheral blood of pregnant women. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 219-222.
19. Wijk IJ van, Vugt JMG van, Mulders MAM, Könst AAM, Florijn WJ, Oudejans CBM. Identification of HASH2 positive extravillous trophoblast cells in the peripheral blood of pregnant women. *Troph Res* 1998; 11: 23-33.
20. Alders M, Hodges M, Hadjantonakis AK, Postmus J, Wijk I van, Blik J, Meulemeester M de, et al. The human Achaete-scute homologue 2 (HASH 2) maps to chromosome 11p15 close to IGF2 and is expressed in extravillous trophoblast. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 859-867.
21. Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL. Essential role of Mash-2 in extraembryonic development. *Nature* 1994; 371: 333-336.
22. Vugt JMG van. Risico op het mislukken van de zwangerschap na invasieve prenatale diagnostiek: een literatuur-overzicht. *Ned Tijdschr Obstet Gynaecol* 1995; 108: 269-271.
23. Wijk IJ van, Vugt JMG van, Mulders MAM, Könst AAM, Weima SM, Oudejans CBM. Enrichment of fetal trophoblast cells from maternal blood followed by detection of fetal DNA using nested X/Y polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 871-876.
24. Thomas MR, Tutschek VB, Frost A, Rodeck CH, Yazdani N, Craft I, Williamson R. The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat Diagn* 1995; 15: 641-646.
25. Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinol* 1997; 138: 3976-3986.
26. Friedman SA, Taylor RN, Roberts JM. Pathophysiology of preeclampsia. *Clin Perinatol* 1991; 18: 661-682.
27. Sibai BM. Treatment of hypertension in pregnant women. *N Eng J Med* 1996; 335: 257-265.
28. Redline RW, Patterson P. Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol* 1995; 26: 594-600.
29. Cervar M, Puerstner P, Kainer F, Desoye G. Endothelin-1 stimulates the proliferation and invasion of first trimester trophoblastic cells in vitro- A possible role in the etiology of pre-eclampsia. *J Investig Med* 1996; 44: 447-453.
30. Bischof P, Friedli E, Martelli M, Campana A. Expression of extracellular matrix degrading metalloproteinases by cultured human cytotrophoblast cells: effects of cell adhesion and immunopurification. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165: 1791-1801.

31. McMaster MT, Bass KE, Fisher SJ. Human trophoblast invasion. Autocrine control and paracrine modulation. *Annals NY Acad Sci* 1994; 734: 122-131.
32. Fisher SJ, Damsky CH. Human cytotrophoblast invasion. *Sem in Cell Biol* 1993; 4: 183-188.
33. Vicovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta anat* 1996; 156: 202-216.
34. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 1993; 91: 950-960.
35. Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: a cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997; 99: 2152-2164.
36. Todt JC, Yang Y, Lei J, Lauria MR, Sorokin Y, Cotton DB, Yelian FD. Effects of tumor necrosis factor alpha on human trophoblast cell adhesion and motility. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36: 65-71.
37. Kundu GC, Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Mukherjee AB. Recombinant human uteroglobin suppresses cellular invasiveness via a novel class of high-affinity cell surface binding site. *Proc Nat Acad Sci* 1996; 93: 2915-2919.
38. Graham CH. Effect of transforming growth factor beta on the plasminogen activator system in cultured first trimester human cytotrophoblasts. *Placenta* 1997; 18: 137-143.
39. Goshen R, Ariel I, Shuster S, Hochberg A, Vlodaysky I, Groot N de, Ben-Rafael Z et al. Hyaluronan, CD44 and its variant exons in human trophoblast invasion and placenta angiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 685-691.
40. Oudejans C, Westerman B, Elk E van, Könst A, Mulders M, Alders A, Vugt J van et al. Growth regulation of extraembryonic tissues. *Eur J Obst Gynaecol Reprod Biol* 1997; 75: 29-32.
41. Franklin GC, Adam GIR, Ohlsson R. Genomic imprinting and mammalian development. *Placenta* 1996; 17: 3-14

Summary

Use of circulating trophoblast cells for diagnosis of fetal genetic diseases and pregnancy associated diseases. Wijk IJ van, Vugt JMG van and Oudejans CBM. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 167-171.

During early human pregnancy, extravillous trophoblast cells invade the maternal uterine tissue, colonize the interstitium and replace the endothelium lining of spiral arteries in decidual and myometrial segments of the uterus. Invasion of endovascular trophoblast cells causes a physiological change of these arteries, in order to guarantee a constant bloodflow from the mother to the fetus. During early pregnancy, these extravillous endovascular trophoblast cells circulate in the maternal peripheral blood. Besides their use for prenatal diagnosis of genetic diseases, these extravillous trophoblast cells isolated from the peripheral blood of pregnant women can be useful for early detection of common pregnancy-associated diseases, like pre-eclampsia. In vitro culture of these trophoblast cells can be useful for investigation of regulation of the invasion process with respect to tumorbiology.

Key-words: trophoblast; invasion; extravillous; prenatal diagnosis; pre-eclampsia.