

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE

KATEDRA GENETIKY A MIRKOBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Využití extracelulárních nukleových kyselin přítomných v mateřské
cirkulaci pro
predikci závažných komplikací**



Markéta Šafaříková

Školitel: Doc. RNDr. Hromadníková Ilona, PhD.

2008/2009

Chtěla bych poděkovat paní Doc. RNDr. Iloně Hromadníkové, PhD. za její cenné rady, které mi velmi pomohly při vypracování této práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svou školitelkou.

Praha 2009

Markéta Šafaříková

Obsah

1. Abstrakt	3
2. Klíčová slova	3
3. Abstract	3
4. Key words	3
5. Úvod	3
6. Historie a možnosti použití fetálních nukleových kyselin v mateřské cirkulaci	4
7. Fetální jaderné buňky v mateřské krvi	5
8. Extracelulární fetální DNA v mateřské plazmě a séru	8
9. Přenos DNA a jaderných buněk mezi matkou a plodem	11
10. Určení pohlaví plodu	12
11. Určení RHD genotypu plodu	15
12. Predikce preeklampsie	17
13. Predikce IUGR	21
14. Predikce předčasného porodu	24
15. Predikce trizomie 21	25
16. Závěr	26
17. Seznam literatury	27

1. Abstrakt

Tato práce se zaměřuje na prenatální neinvazivní diagnostiku založenou na vyšetření mateřské krve respektive plazmy a séra. Práce je rozdělena na dvě části. První část práce se zaměřuje na historii neinvazivní diagnostiky a na to, co je možné izolovat z mateřské krve, plazmy a séra. Tím míním buňky a nukleové kyseliny fetálního původu. Druhá část práce je zaměřena na konkrétní možnosti neinvazivní diagnostiky. To znamená určení pohlaví dítěte, RHD genotyp, chromozomální aneuploidie atd.

2. Klíčová slova

mateřský krevní oběh, fetální DNA, fetální buňky, preeklampsie, předčasný porod, intrauterinní růstová retardace (IUGR), pohlaví plodu, RHD genotyp plodu, trizomie 21

3. Abstract

Theme: The usage of the extracellular nucleic acids present in maternal circulation for the purpose of non-invasive prenatal diagnosis

This work is focused on the noninvasive prenatal diagnostic based on the investigation of the maternal blood, plasma and serum, respectively. The work is divided in two parts. The first part is focused on the history of the noninvasive diagnostics and what is possible to isolate from maternal blood, plasma and serum. It means fetal cells and fetal nucleic acids. The second part discussed concrete possibilities of the noninvasive diagnostics, f.e. gender detection, RHD genotyping, chromosomal aneuploidy etc.

4. Key words

maternal blood circulation, fetal DNA, fetal cells, pre-eclampsia, preterm labour, IUGR, fetal gender, fetal RHD genotype, trisomy 21

5. Úvod

Prenatální péči a diagnostiku lze rozdělit do dvou skupin: invazivní a neinvazivní. Mezi invazivní metody patří např. AMZ (amniocentesis, odběr plodové vody), CVS (chorionic

villus sampling, odběr choriových klků) a PUBS (percutaneous umbilical blood sampling, odběr pupečnickové krve). Při těchto vyšetření stále zůstává nízké riziko poškození nebo ztráty plodu. Do skupiny neinvazivních metod se zahrnují např. fetální MRI (fetal magnetic resonance imaging), ultrazvukové vyšetření, ultrasonografie a analýza fetální DNA získané z mateřského krevního oběhu. Právě objevení fetální DNA v mateřském krevním oběhu dalo naději, že by mohly být diagnostikovány různé poškození plodu, dědičné choroby nebo komplikace během těhotenství bez rizika ztráty plodu. Průkopníkem v tomto oboru je Dr. Y.M. Dennis Lo, profesor chemické patologie působící na Chinese University of Hong Kong, jehož skupina jako první objevila přítomnost fetální DNA v mateřské plazmě. Prenatální neinvazivní diagnostika je rychle se rozvíjející odvětví vědy vzniklé na konci devadesátých let minulého století a stavící na poznatcích zjištěných u pacientů s nádorovým onemocněním. Mnohé metody prenatální neinvazivní diagnostiky byly zavedeny do klinické praxe a s úspěchem pomáhají při zlepšování péče o těhotné ženy

6. Historie a možnosti použití fetálních nukleových kyselin v mateřské cirkulaci

První objev přítomnosti fetálních buněk v mateřské cirkulaci byl publikován v roce 1893 německým patologem Schmorlem, který objevil trofoblasty v plicích ženy, která zemřela na eklampsii, (1,2) a objevení volných nukleových kyselin v krevním oběhu se datuje do roku 1948, kdy Mandel a Metais publikovali o přítomnosti nukleových kyselin v lidské krevní plazmě. V roce 1977 byla ukázána možnost využít přítomnost nukleových kyselin v oběhu pro diagnózu nádorových onemocnění. V krevním séru pacientů byla hladina cirkulující DNA před radioterapií zvýšena a po jejím absolvování se snížila. V následujících letech bylo potvrzeno, že v plazmě a séru pacientů s nádorovým onemocněním je možno detekovat nukleové kyseliny pocházející z nádorových buněk. (3,4) Tyto poznatky vedly k domněnce, že by volná fetální DNA mohla být přítomna v mateřské plazmě a séru, což bylo v roce 1997 sérií výzkumů potvrzeno. Po potvrzení přítomnosti fetální DNA v plazmě a séru matky se začalo uvažovat, že tyto poznatky mohou být využity v prenatální neinvazivní diagnostice pro určení pohlaví plodu, RHD genotypu plodu, některých typů chromozomálních aneuploidií, dědičných chorob vázaných na pohlaví, těhotenských komplikací typu preeklampsie, IUGR a předčasného porodu. (4,5,6) Zdrojem extracelulární fetální DNA jsou apoptotická tělíška trofoblastu přítomná v mateřské plazmě a séru. Extracelulární fetální DNA je možno

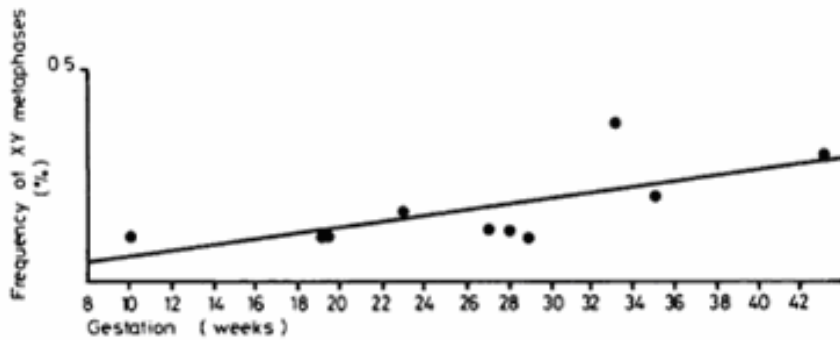
detekovat i ve vzorcích poševního nebo děložního hlenu a v plodové vodě. (6) V mateřské plazmě a krvi nebyla objevena jen přítomnost fetální DNA, ale i přítomnost fetální RNA a placentální miRNA a dále přítomnost fetálních krevních buněk, které jsou používány pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky. (1,7,8)

7. Fetální jaderné buňky v mateřské krvi

Fetální jaderné buňky jsou dobrým zdrojem fetální DNA. Jejich procentuální zastoupení v mateřské krvi je však velmi nízké. (9) V mateřské krvi lze najít tři typy fetálních jaderných buněk. Mezi ně patří trofoblasty, jaderné erytrocyty (erytroblasty) a leukocyty (lymfocyty a granulocyty). Dále lze najít např. krevní destičky, avšak ty neobsahují DNA. Pomocí fetálních jaderných buněk lze např. diagnostikovat různé aneuploidie u plodu.

Trofoblasty jsou velké mnohjaderné buňky uvolňující se do mateřského oběhu převážně během prvního trimestru těhotenství. Byly objeveny v mateřském oběhu již koncem devatenáctého století německým patologem Schmorlem. U normálních těhotenství jsou však velmi těžko izolovatelné, protože jsou z mateřského oběhu rychle odstraňovány, protože vstupují do plicního oběhu, a není možno je detekovat v krvi při každém těhotenství. Rozdíl je u žen, které během těhotenství trpí vysokým tlakem. U nich byly trofoblasty izolovány z vena cava inferior, děložní žíly a periferního oběhu. Pomocí trofoblastů byly úspěšně detekovány specifické sekvence na Y chromozomu a mutace fetálního β -globinu.

První objev leukocytů v mateřském oběhu učinila Walknoska a kolektiv, když roku 1969 izolovaly lymfocyty v metafázi s karyotypem 46,XY z krve těhotných žen s plodem mužského pohlaví. Tyto nálezy byly počátkem sedmdesátých let potvrzeny, kdy byly izolovány leukocyty v interfázi. (2,10,11) Roku 1979 skupina kolem Herzenberga publikovala o možnosti použití metody FACS k izolaci fetálních leukocytů z mateřské krve. Byli první, kdo tuto metodu pro izolaci leukocytů úspěšně použil. Herzenberg použil králičí antisérum proti antigenu HLA-A2 děděnému po otci, protože matky byly HLA-A2 negativní. Ze 12 žen s plodem mužského pohlaví zahrnutých do této studie mělo 5 žen pozitivní nález fetálních leukocytů ve svém krevním vzorku a 7 žen mělo detekci negativní. Tyto výsledky byly potvrzeny izolací lymfocytů z pupečnickové nebo periferní krve narozeného dítěte. Lymfocyty 5 dětí reagovaly s antisérem anti-HLA-2 a v 7 případech tato reakce neproběhla. (12) V následujících letech byly pro tuto metodu využívány další HLA antigeny. (2) Důležitým faktem je, že množství fetálních leukocytů v mateřské krvi se během těhotenství zvyšuje (viz Obrázek 1). (13)



Obrázek 1: Zvyšování fetálních leukocytů během těhotenství, osa x zobrazuje dobu těhotenství (týdny) a osa y frekvenci metafázních XY leukocytů (%). (13)

Problémem fetálních leukocytů je, že mohou zůstat v mateřské krvi dlouhou po porodu. Více než roční přetrvání publikovali roku 1974 Schroder a kolektiv, kdy tyto výsledky vyplynuly z jejich studie. Doba přetrvání byla postupně zvyšována, až roku 1996 byly publikovány výsledky studie provedené Dianou Bianchi a kolektivem. Tyto výsledky hovořily dokonce o dvaceti sedmiletém přetrvání fetálních lymfoidních progenitorových buněk v mateřské krvi. (2) Do studie bylo zahrnuto 32 těhotných žen a 8 netěhotných žen, které porodily chlapce před 6 měsíci až 27 lety. Ze vzorků krve byly izolovány mononukleární buňky pomocí CD antigenů 3, 4, 5, 19, 23, 34 a 38. Poté byla použita PCR se zaměřením na Y chromozomální sekvenční. Správná identifikace mužského plodu byla ve 13 z 19 případů, kdy žena nosila plod mužského pohlaví. To odpovídá úspěšnosti 68,42 %. Třináct žen nosilo plod ženského pohlaví. Avšak vzorky 4 těchto žen obsahovaly také mužskou DNA. Tyto 4 ženy byly těhotné již dříve. Dvě ženy měly chlapce a u 2 bylo přerušeno těhotenství. Ve vzorcích 6 z 8 netěhotných žen byla v lymfoidních progenitorových buňkách detekována mužská DNA, přičemž jednu z pozitivních detekcí měla žena, která porodila chlapce již před 27 lety (viz Tabulka 1). V jednom případě byly nalezeny hematopoetické kmenové buňky CD 34⁺. (14)

Tabulka 1: Přetrvání fetálních buněk v mateřské krvi. (14)

Vzorek	Historie těhotenství					Detekce mužské DNA pomocí 198 bp primeru		
	Počet těhotenství	Počet narozených chlapců	Počet narozených děvčat	potraty	Doba od narození posledního chlapce	B buňky CD(19 ⁺ 23 ⁺)	T buňky CD(3 ⁺ 4 ⁺ 5 ⁺)	Lymfoidní progenitorové buňky CD(34 ⁺ 38 ⁺)
1	4	3	1	0	1 rok	-	-	+
2	3	1	2	0	7 let	neděláno	neděláno	+
3	2	2	0	0	2 roky	-	neděláno	+

4	3	2	1	0	3 roky	-	-	+
5	10	6	3	1	27 let	-	neděláno	+
6	3	2	0	1	6 let	-	+	+
7	4	2	1	1	10 měsíců	-	-	-
8	1	1	0	0	6 měsíců	-	-	-

Fetální jaderné erytrocyty (označovány také jako NRBCs, tedy nucleated red blood cells) jsou jednojaderné buňky objevující se ve fetálním krevním oběhu již v raných fázích těhotenství a je tedy možná izolovat brzy po počátku těhotenství. Jejich důležitou vlastností je, že mají krátkou dobu života např. ve srovnání s fetálními lymfocyty. Jsou to buňky s největším potenciálem pro užití v prenatální neinvazivní diagnostice. O přítomnosti NRBCs publikovali již roku 1957 Kleihauer a kolektiv, přičemž Kleihauer-Betkeho metoda pro detekci fetálních erytrocytů v mateřské krvi je používána dodnes. (2,10) Roku 1990 publikovaly Diana Bianchi a kolektiv o metodě detekce NRBCs v mateřské krvi založené na použití protilátek proti transferínovému receptoru. Byly testovány vzorky od 19 těhotných žen. Testování fetální DNA bylo založeno na 222 bp sekvenci přítomné na krátkém raménku Y chromozomu. V 7 z 19 případů byla tato sekvence detekována, přičemž u 6 z těchto 7 případů bylo těhotenství s mužským pohlavím plodu potvrzeno. U zbývajících případů, kdy narozené dítě bylo děvče, byla však také prokázána přítomnost detekované Y sekvence. Vysvětlením může být translokace této sekvence nebo mozaika. Ve 12 vzorcích nebyla zkoumaná sekvence detekována. V 10 z těchto 12 případů byl plod opravdu ženského pohlaví. Celkově shrnuto: z 8 těhotenství, kdy plod byl mužského pohlaví, bylo správně identifikováno 6 případů, to činí 75%. (15) Množství fetálních NRBCs se během těhotenství a po porodu mění. To potvrzují studie publikované v letech 1998 a 1999. V první studii byly testovány vzorky od 100 těhotných žen a 30 netěhotných žen po porodu. Množství fetálních erytrocytů se během těhotenství zvyšuje a po porodu rychle klesá (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Změna frekvence fetálních NRBCs během těhotenství a po porodu. (16)

Doba těhotenství nebo po porodu (počet případů)	Přítomnost NRBCs	Průměrná frekvence NRBCs
5-10 týdnů (20)	15/20 (75 %)	$2,4 \cdot 10^{-7}$
11-14 týdnů (20)	18/20 (90 %)	$5,6 \cdot 10^{-7}$
15-24 týdnů (20)	20/20 (100 %)	$18,3 \cdot 10^{-7}$
25-32 týdnů (20)	20/20 (100 %)	$26,2 \cdot 10^{-7}$
33-39 týdnů (20)	20/20 (100 %)	$41,9 \cdot 10^{-7}$
6 týdnů po porodu (15)	3/15 (20 %)	$1,0 \cdot 10^{-7}$
3 měsíců po porodu (15)	0/15 (0 %)	0

Tato studie také zahrnovala detekci přítomnosti mužských fetálních NRBCs. Výsledky tohoto výzkumu jsou vskutku zajímavé. Průměrná frekvence přítomnosti těchto buněk se během těhotenství zvyšovala, ale v období dvacátého pátého až třicátého druhého týdne klesla a poté se opět zvyšovala. Po porodu pak rychle klesla (viz Tabulka 3). (16)

Tabulka 3: Změna frekvence mužských fetálních NRBCs během těhotenství a po porodu. (16)

Doba těhotenství nebo po porodu (počet případů)	Přítomnost mužských NRBC	Průměrná frekvence mužských NRBC
5-10 týdnů (11)	6/11(54,5 %)	$2,7 \cdot 10^{-7}$
11-14 týdnů (8)	6/8 (75 %)	$8,0 \cdot 10^{-7}$
15-24 týdnů (10)	8/10 (80 %)	$14,8 \cdot 10^{-7}$
25-32 týdnů (9)	9/9 (100 %)	$12,9 \cdot 10^{-7}$
33-39 týdnů (12)	12/12 (100 %)	$13,1 \cdot 10^{-7}$
6 týdnů po porodu (10)	3/10 (30 %)	$3,6 \cdot 10^{-7}$
3 měsíců po porodu (10)	1/10 (10 %)	Průměrná frekvence nestanovena

Druhá studie již hovoří o kontinuálně vzrůstající frekvenci mužských NRBCs. Zde bylo zahrnuto 38 těhotných žen. Množství NRBCs se nejprve detekovalo dohromady nezávisle na pohlaví plodu a poté v závislosti na pohlaví plodu. Frekvence mužských a ženských NRBCs se v průběhu těhotenství přibližně shodovala a vždy rostla nezávisle na ABO krevní kompatibilitě mezi matkou a plodem. V souvislosti s tímto samozřejmě rostla i celková frekvence NRBCs (viz Tabulka 4). (17)

Tabulka 4: Změna frekvence NRBCs během těhotenství a po porodu. (17)

Doba těhotenství nebo po porodu	Průměrná celková frekvence NRBCs	Průměrná frekvence mužských NRBC	Průměrná frekvence ženských NRBCs
6-10 týdnů	3,9	4,1	3,7
11-14 týdnů	12,8	12,8	12,7
15-24 týdnů	37,3	37,8	36,7
25-32 týdnů	72,2	69,2	75,3
33-39 týdnů	112,0	107,6	116,2
6 týdnů po porodu	3,6	3,7	3,5
3 měsíců po porodu	0,1	0,2	0,0

Uvedené frekvence jsou z množství 10^7 jaderných buněk.

8. Extracelulární fetální DNA v mateřské plazmě a séru

Bylo zjištěno, že nejlepšími zdroji fetální DNA jsou mateřská plazma a sérum. Ze studie vypracované Y.M. Dennisem Lo a jeho kolegy se zaměřením na Y sekvence pocházející z

plodu v DNA fetálních jaderných krevních buněk v mateřské krvi a ve volné DNA v plazmě a séru vyplynuly jednoznačné výsledky. Výzkumu se účastnily těhotné ženy s plodem ženského pohlaví, těhotné ženy s plodem mužského pohlaví a netěhotné ženy jako kontrolní skupina. Ve skupině obsahující vzorky od 30 těhotných žen s plodem mužského pohlaví byly zjištěny následující výsledky. Ve 24 vzorcích plazmy, což činí 80 %, byly obsaženy Y sekvence pocházející z plodu. Ve 21 vzorcích séra, což je 70 %, byly zjištěny stejné sekvence. Avšak pouze 5 vzorků mateřské krve, což je 17 %, kdy DNA byla extrahována z jaderných krevních buněk, tyto sekvence také obsahovalo. Y sekvence pocházející z plodu nebyly nalezeny v žádném vzorku získaném od 13 těhotných žen s plodem ženského pohlaví. Tyto sekvence nebyly také zjištěny ve vzorcích získaných od netěhotných žen. V této studii byly užity vzorky o objemu 10 µl. (5) Celkové množství fetální DNA v mateřské plazmě a séru se během těhotenství zvyšuje. Tyto poznatky vyplývají ze studie publikované v roce 1998 týkající se analýzy přítomnosti SRY genu v mateřské plazmě a séru. Byly získány vzorky od 25 žen v raném stadiu těhotenství, což znamená jedenáctý až sedmnáctý týden těhotenství. V této skupině bylo 13 žen s plodem mužského pohlaví a 12 žen s plodem ženského pohlaví. Druhou skupinu tvořilo 25 žen v pokročilém stadiu těhotenství, což znamená třicátý sedmý až čtyřicátý týden těhotenství. V této skupině bylo 14 žen s plodem mužského pohlaví a 11 žen s plodem ženského pohlaví. Přítomnost SRY genu byla prokázána v každém vzorku získaném od ženy s plodem mužského pohlaví a v žádném vzorku získaném od ženy s plodem ženského pohlaví. V průměru vzorky plazmy získané v pozdním stadiu těhotenství obsahovaly 11,5krát vyšší koncentraci než vzorky získané v raném stadiu těhotenství. V případě séra byla zjištěna 11,9krát vyšší koncentrace u vzorků z pozdního stadia těhotenství. V průměru mateřská plazma obsahuje 3,4 % fetální DNA z celkového obsahu DNA v raném stadiu těhotenství a 6,2 % fetální DNA v pozdním stadiu těhotenství. V séru bylo zvýšení v průměru z 0,13 % v raném stadiu těhotenství na 1 % v pozdním stadiu těhotenství. K detekci byla použita PCR v reálném čase s využitím TaqMan specifických sond pro sekvenci SRY genu. (18) V mateřské plazmě jsou také detekovatelné ostatní fetální specifické fragmenty DNA (nezávisle na pohlaví plodu). Ve studii publikované v roce 2000 byly zkoumány vzorky plazmy od 12 těhotných žen. Jako markery bylo použito devět STR sekvencí, z nichž sekvence AMXY (X-Y homologous region of the amelogenin gene) je specifická pro Y chromozom. Kromě AMXY sekvence byly tyto markery detekovány v mateřské plazmě nezávisle na pohlaví plodu. Sekvence AMXY byla detekována pouze v plazmě žen s plodem mužského pohlaví, přičemž jich z celkového počtu bylo 6. Při součtu všech markerů byla

fetálně specifická alela nalezena v 84 % vzorků. STR sekvence chyběly v 16 % všech vzorků mateřské plazmy. (19)

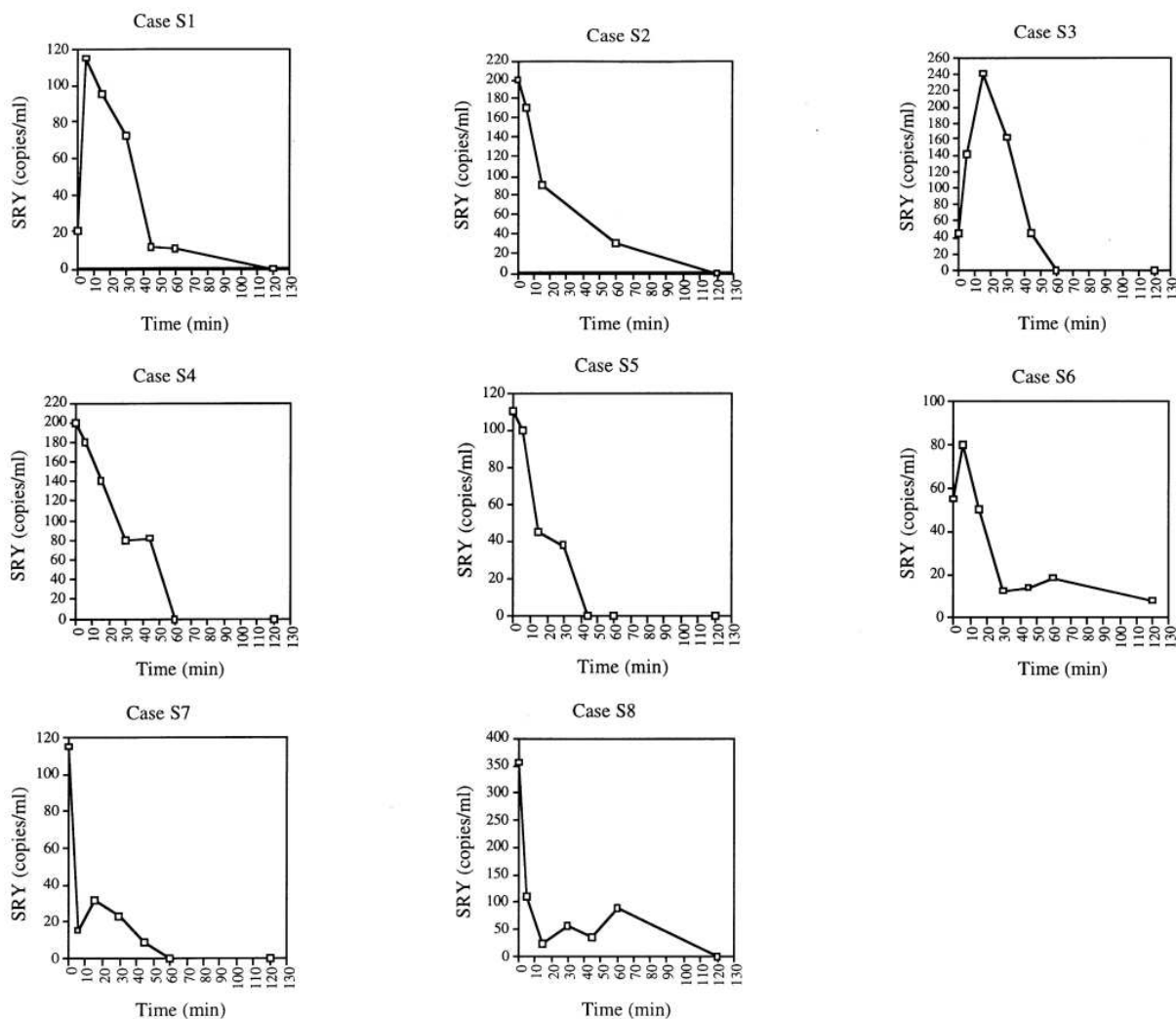
Ze studie publikované v roce 2004 plyne, že fragmenty DNA přítomné v plazmě jsou krátké. Při analýze vzorků plazmy získaných od 31 těhotných žen a od 34 netěhotných žen byl nalezen rozdíl v délkách fragmentů DNA ve vzorcích plazmy získaných od těhotných a netěhotných žen. Pro analýzu byl vybrán leptinový gen a SRY gen. Studie ukázala, že fragmenty DNA přítomné v plazmě těhotných žen jsou delší než fragmenty DNA v plazmě netěhotných žen. Ve vzorcích netěhotných žen délku 201 bp přesahovalo pouze 14 % molekul DNA a u těhotných žen přesahovalo tuto délku 57 % molekul DNA. Je také zajímavé, že fragmenty v plazmě těhotných žen pocházející od matky jsou delší než fragmenty pocházející z plodu. Velikosti molekul DNA pro SRY gen pocházejících z plodu byly pouze ve 20 % vzorků větší než 193 bp a v 0 % větší než 313 bp. (20) Další důležitou skutečností přináší studie publikovaná v roce 1999, která sledovala odstraňování fetální DNA z mateřského krevního oběhu. První skupinu tvořilo 12 žen s plodem mužského pohlaví a 10 netěhotných žen jako kontrola. Ve vzorcích plazmy získaných od netěhotných žen nebyla zjištěna přítomnost molekul DNA pro SRY gen. V každém vzorku získaném od těhotných žen před porodem byla zjištěna a změřena přítomnost fetální DNA reprezentovaná SRY genem. Analýza poporodních vzorků získaných v rozpětí 1 až 42 dnů po porodu prokázala nepřítomnost fetální DNA (viz Tabulka 5).

Tabulka 5: Odstraňování fetální DNA z mateřské plazmy. (21)

Vzorek	Před porodem (kopie / ml)	Po porodu (kopie / ml)	Čas po porodu (dny)
1	29,0	0	42
2	112,5	0	42
3	80,0	0	7
4	337,5	0	7
5	27,5	0	7
6	41,3	0	7
7	33,8	0	7
8	50,3	0	1
9	63,5	0	1
10	176,1	0	1
11	99,4	0	1
12	3024	0	1

Koncentrace kopií byla určena dle vzorce $C = Q \cdot (V_{DNA} / V_{PCR}) \cdot (1 / V_{ext})$, kde C = koncentrace DNA v plazmě, Q = počet kopií DNA, V_{DNA} = celkový objem DNA získané extrakcí, V_{PCR} = objem DNA, V_{ext} = objem extrahované plazmy.

Druhou skupinu tvořilo 8 žen, které následně podstoupily porod císařským řezem a porodily chlapce. Vzorky plazmy byly získány před porodem a 5, 15, 30, 45, 60 a 120 minut po porodu. V každém vzorku získaném před porodem byla zjištěna přítomnost fetální DNA reprezentovaná SRY genem. V 7 případech koncentrace fetální DNA klesla na 0 % do 2 hodin po porodu. V jednom případě bylo po 2 hodinách odstraněno 90 % množství fetální DNA. Průměrný čas odstranění jedné poloviny množství fetální DNA byl 16,3 min. (viz Obrázek 2). (21)



Obrázek 2: Odstraňování fetální DNA z mateřské plazmy, osa x zobrazuje čas po porodu (min) a osa y koncentrace SRY sekvence v plazmě matky (kopie / ml).(21)

9. Přenos DNA a jaderných buněk mezi matkou a plodem

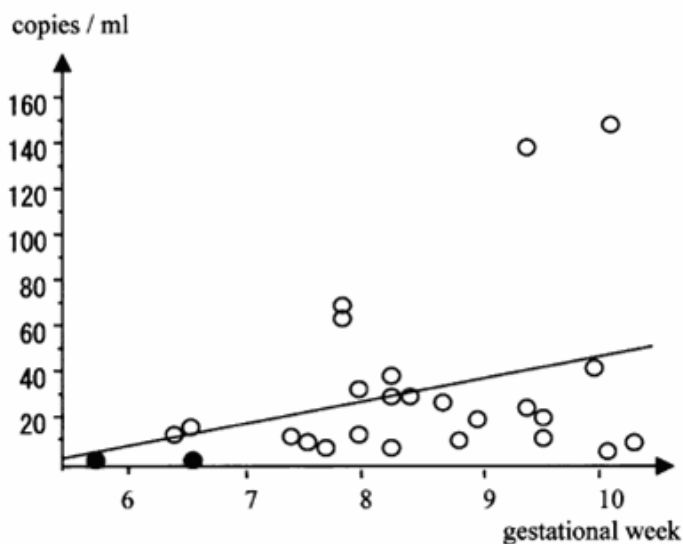
Přítomnost fetálních buněk v mateřské cirkulaci je známa již od roku 1893 (1), avšak neméně důležitá je skutečnost, že existuje i přenos v druhém směru, tedy mateřských buněk do

fetálního oběhu. V roce 1996 Dennis Lo a kolektiv publikovali výsledky studie na toto téma. Ze 66 párů matka a dítě bylo na základě RT (R a T haplotyp v β -globinovém klastru), GSTM1 (glutathione S-transferase M 1) a ACE (angiotensin converting enzyme) genotypování vybráno 38 párů pro studium maternálních buněk ve fetální pupečnickové krvi. Pozitivní detekce byla v 16 případech, to znamená ve 42 %. Pro detekci fetálních buněk v mateřské krvi bylo na základě RT, GSTM1 a ACE genotypování a fetálních Y specifických sekvencí vybráno 51 párů. Pozitivní detekce byla u 26 případů, to je v 51 %. Z původních 66 párů se narodilo 36 chlapců, přičemž detekce fetálních Y sekvencí byla pozitivní v 21 případech z těchto 36, to je 58,3 %. Ve 28 případech byl prokázán oboustranný přenos. (22) V další studii bylo dokázáno, že mateřská DNA je i v plazmě získané z pupečnickové krve po porodu. Do studie bylo ze 156 párů matka-dítě, kde dítě bylo chlapec, zahrnuto na základě GSTM1 a ACE genotypování 50 párů. Do kontrolní skupiny bylo vybráno 20 párů, kde dítě bylo děvče. Ve 12 případech, to je 24 %, byla zjištěna přítomnost mateřských jaderných buněk v pupečnickové krvi. V plazmě získané z pupečnickové krve byla maternální DNA zjištěna v 15 případech, to je 30 %. V případě druhého směru přenosu, tedy z plodu do mateřského oběhu byly získané hodnoty vyšší. Fetální jaderné buňky byly přítomné ve 13 vzorcích mateřské krve, to je 26 %, a fetální DNA byla v 50 vzorcích mateřské plazmy, což je 100 %. (23)

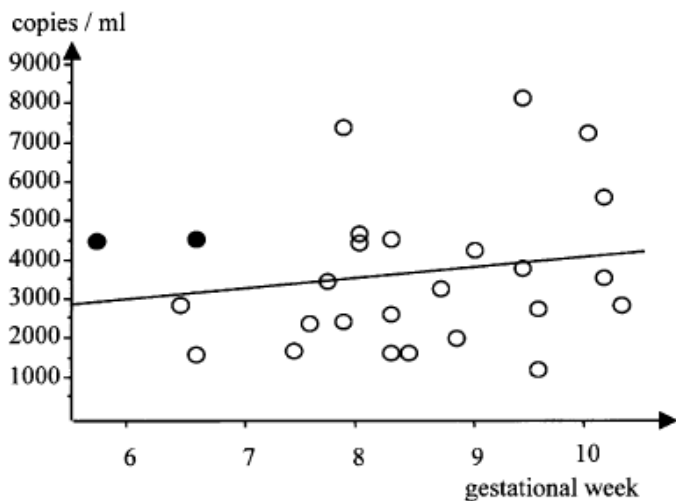
10. Určení pohlaví plodu

Pro určení pohlaví plodu jsou převážně používány vzorky mateřské plazmy a séra obsahující volnou fetální DNA. Pomocí vyšetření těchto vzorků lze stanovit pohlaví již v prvním trimestru těhotenství. Pro stanovení pohlaví může být použita tradiční PCR nebo PCR v reálném čase (real-time PCR). Citlivost obou metod srovnávali ve své studii Hiroshi Honda a kolektiv. Do této studie bylo zahrnuto 81 žen v pátém až desátém týdnu těhotenství, kterým byl vyšetřen vzorek jejich krevního séra. Čtyřicet žen následně porodilo chlapce a 41 žen dívku. Jako marker pro tradiční PCR byla použita Y chromozomální sekvence DYS 14 a pro real-time kvantitativní PCR β -globinový a SRY gen, kdy byla stanovována i koncentrace fetální DNA v mateřském séru. DYS 14 sekvence byla identifikována u 38 žen, to činí 95 %. Přičemž první špatně identifikovaný vzorek pocházel z pátého a druhý ze šestého týdne těhotenství. To znamená, že úspěšnost od sedmého týdne těhotenství je 100 %. Tato sekvence nebyla nalezena v žádném vzorku získaném od ženy s plodem ženského pohlaví. Celková úspěšnost této metody je tedy 79 správně určených pohlaví plodů, což činí 97,5 %. Pro metodu real-time kvantitativní PCR bylo náhodně vybráno 24 žen s plodem mužského

pohlaví a vzorky žen, které byly špatně určeny tradiční PCR, celkem tedy 26 vzorků. SRY gen byl identifikován ve vzorcích od všech těchto žen, což činí úspěšnost 100 %. Dále byla prokázána zvyšující se koncentrace SRY genu během těhotenství, avšak u β -globinového genu podobná korelace prokázána nebyla (viz Obrázky 3,4). (24)



Obrázek 3: Vztah mezi délkou těhotenství a koncentrací SRY genu, osa x zobrazuje dobu těhotenství (týdny) a osa y koncentrací SRY genu (kopie / ml). Černě vyplněné kroužky představují dva případy, které byly chybně určeny pomocí DYS 14 sekvence. (24)



Obrázek 4: Vztah mezi délkou těhotenství a koncentrací β -globinu, osa x zobrazuje dobu těhotenství (týdny) a osa y koncentrací β -globinu (kopie / ml). Černě vyplněné kroužky představují dva případy, které byly chybně určeny pomocí DYS 14 sekvence. (24)

Real-time PCR použili i J.M. Costa a kolektiv ve své studii zahrnující 121 žen, od kterých byly získány vzorky krevního séra v prvním trimestru těhotenství. Jako marker byl použit SRY gen. Ve vzorcích všech 61 žen s plodem mužského pohlaví, byl SRY gen identifikován.

Všechny vzorky získané od 60 žen s plodem ženského pohlaví byly na přítomnost tohoto genu negativní. Z těchto 60 žen porodilo 27 žen dříve alespoň jednoho chlapce. Celková úspěšnost určení pohlaví plodu byla tedy 100 %. (25) Hiroshi Honda a kolektiv provedli další studii s užitím metody tradiční PCR u žen v desátém až sedmáctém týdnu těhotenství. Od 61 těhotných žen byly získány vzorky plazmy a séra. V této skupině bylo 31 žen s plodem mužského pohlaví a 30 s plodem ženského pohlaví. Jako marker byly vybrány Y chromozomální specifické sekvence DYS 14 a DYZ 3. Obě sekvence byly identifikovány ve 27 vzorcích plazmy žen s plodem mužského pohlaví, což činí 87,1 %. Ve vzorcích séra byly detekovány u všech 31 žen, to činí úspěšnost 100 %. Žádná z těchto sekvencí nebyla nalezena ve vzorcích plazmy a séra žen s plodem ženského pohlaví. (26) Plazmu použil také Akihiko Sekizawa a kolektiv. Vzorky byly získány od 302 žen v sedmém až šestnáctém týdnu těhotenství, přičemž 143 žen bylo s plodem mužského pohlaví a 159 s plodem ženského pohlaví. Jako marker byl použit SRY gen. SRY gen byl napoprvé detekován u 139 žen s plodem mužského pohlaví, to je 97,2 %. Ve 4 vzorcích, kde tento gen nebyl detekován, ale žena nosila chlapce, byla provedena opětovná analýza a nové výsledky odpovídaly mužskému pohlaví plodu. SRY sekvence nebyla zjištěna v žádném vzorku ženy s plodem ženského pohlaví. (27) SRY gen jako marker při analýze mateřské plazmy použily také Ilona Hromadníková a kolektiv. Bylo vybráno 44 těhotných žen, u nichž bylo riziko, že plod trpí X vázanou hemofilií (12 případů) nebo chromozomální aneuploidií (32 případů). Ženy byly v desátém až osmáctém týdnu těhotenství, přičemž 17 žen bylo s plodem ženského pohlaví a 27 žen s plodem mužského pohlaví. SRY gen byl detekován ve všech případech mužského plodu a v žádném případě ženského plodu. (28)

Srovnání markerů užívaných pro určení pohlaví dítěte provedly Elena Picchiassi a kolektiv. U vzorků plazmy od 145 žen v jedenáctém až dvanáctém týdnu těhotenství použily jako marker DYS 14 sekvenční a SRY gen. Osmdesát dva žen bylo s plodem mužského pohlaví a 63 žen s plodem ženského pohlaví. DYS 14 sekvence byla detekována v 81 z 82 vzorků, což je 98,8 % a gen SRY v 54 z 82 vzorků, což je 65,9 % případů žen s plodem mužského pohlaví. Na základě analýzy pomocí sekvenční DYS 14 bylo správně určeno 61 ze 63 vzorků, to činí 96,8 % případů žen s plodem ženského pohlaví. U genu SRY je úspěšnost 98,4 %, což odpovídá 62 ze 63 případů. (29)

Pro určení pohlaví plodu může být samozřejmě použita i DNA izolovaná z fetálních trofoblastů a jaderných erytroblastů (NRBCs). Takový výzkum provedly Lindy Durrant a kolektiv. Vzorky krve byly získány od 14 žen v desátém až čtrnáctém týdnu těhotenství, které

před odběrem podstoupily CVS. Celková úspěšnost určení pohlaví plodu, kdy obojí bylo izolováno ze stejného vzorku, byla 92 %, což je 12 ze 13 případů (viz Tabulka 6). (30)

Tabulka 6: Úspěšnost při stanovení pohlaví dítěte.(30)

	Určení mužského pohlaví plodu		Určení ženského pohlaví plodu		Celkové určení pohlaví plodu	
	Správně / celkem	Procentuálně	Správně / celkem	Procentuálně	Správně / celkem	Celkem procentuálně
Trofoblasty	3/7	43 %	7/7	100 %	10/14	71 %
NRBCs	4/7	53 %	7/7	100 %	11/14	79 %
Trofoblasty a NRBCs *	5/6	83 %	7/7	100 %	12/13	92 %

* obojí izolováno ze stejného vzorku

Linda Durrant a kolektiv pokračovaly ve své studii a rozšířily ji na 46 žen. Tyto ženy byly v jedenáctém až šestnáctém týdnu těhotenství a před odběrem podstoupily CVS. V pokračování studie se celkově zhoršila úspěšnost určení pohlaví (viz Tabulka 7). (31)

Tabulka 7: Úspěšnost při stanovení pohlaví dítěte. (31)

	Určení mužského pohlaví plodu		Určení ženského pohlaví plodu	
	Správně / celkem	Procentuálně	Správně / celkem	Procentuálně
Trofoblasty	9/24	38 %	18/21	86 %
NRBCs	7/18	39 %	11/13	85 %
Trofoblasty a NRBCs *	10/18	56 %	10/12	83 %

*obojí izolováno ze stejného vzorku

11. Určení RHD genotypu plodu

Pokud je matka RhD negativní a otec RhD pozitivní, je riziko, že plod zdědí pozitivitu po otci. RhD pozitivita plodu komplikuje těhotenství a ohrožuje plod i novorozence v případě, je-li matka aloimunizovaná (má přítomny anti-D protilátky ve svém séru). Dennis Lo a kolektiv zkoumali možnost určení RHD genotypu plodu z mateřské plazmy. Vzorky pocházely od 57 RhD negativních těhotných žen, které byly v prvním až třetím trimestru těhotenství. Výsledky pro druhý a třetí trimestr měly bezchybný výsledek (viz Tabulka 8). Správnost výsledků byla ověřena vyšetřením plodové vody. (32)

Tabulka 8: Úspěšnost určení RHD genotypu plodu. (32)

Doba těhotenství (trimestr)	RhD+ plod	RhD- plod
	Počet určení jako RhD+ / celkový počet plodů	
První	7/9 (78 %)	0/3
Druhý	22/22 (100 %)	0/8
Třetí	8/8 (100 %)	0/7

V dánské studii Frederika Clausena a kolektivu bylo zahrnuto 56 RhD negativních těhotných žen, přičemž 38 žen v sedmnáctém až třicátém šestém týdnu těhotenství pocházelo z Dánska a 21 vzorků od 18 těhotných žen pocházelo z International Blood Group Reference Laboratory v Bristolu (IBGRL), Velká Británie. Tyto ženy byly v patnáctém až třicátém šestém týdnu těhotenství. Úspěšnost predikovaného RHD genotypu plodů byla 100 %, avšak jeden vzorek byl neprůkazný a tedy RHD genotyp nebyl predikován a plod byl RhD pozitivní. (viz Tabulky 9 a 10). (33)

Tabulka 9: Úspěšnost určení RHD genotypu plodu u dánských vzorků. (33)

Predikovaný RhD typ / skutečný RhD typ plodu			
Doba těhotenství (týdny)	RhD+	RhD-	úspěšnost
17-25	2/2	3/3	100 %
26-29	7/7	Žádný	100 %
34-36	15/15	11/11	100 %

Tabulka 10: Úspěšnost určení RHD genotypu plodu u vzorků z IBGRL. (33)

Predikovaný RHD genotyp / skutečný RHD genotyp plodu			
Doba těhotenství (týdny)	RhD+	RhD-	úspěšnost
15*	neprůkazný	-	-
15-24	6/6	8/8	100 %
25-36	4/4	2/2	100 %

*plod, u něhož RhD typ nebyl predikován

Plazma byla také použita ve studii publikované v roce 2008. Vzorky poskytlo 13 RhD negativních žen, které byly ve dvanáctém až třicátém devátém týdnu těhotenství. S RHD genotypem bylo zároveň určováno i pohlaví plodu. Dvanáct vzorků bylo určeno jako RhD pozitivní, přičemž jedna žena nosila dvojčata, a jeden vzorek byl určen jako RhD negativní. Predikce byla ověřena testy po porodu. Všechny vzorky byly určeny správně a to v RHD genotypu i v určení pohlaví plodu. (34)

Kromě plazmy může být použito i krevní sérum. J.M. Costa a kolektiv analyzovali vzorky séra od 106 RhD negativních žen, které byly v prvním trimestru těhotenství. Všechna séra

byla určena správně. Šedesát dva žen opravdu porodilo RhD pozitivní dítě a 40 žen RhD negativní dítě. U 4 žen bylo těhotenství ukončeno, avšak i zde byla predikce RHD genotypu u plodu správná. (35) Do další studie analyzující sérum bylo vzato 285 RhD negativních žen. U dvou plodů však RHD genotyp nemohl být určen, protože matky neměly RHD gen kompletně deletovaný. Ze zbylých 283 vzorků bylo určeno, že 179 těhotenství je RhD pozitivní a 104 RhD negativní. Predikce nemohla být u 11 žen potvrzena, protože podstoupily rané ukončení těhotenství nebo nemohlo být provedeno ověření. Zbylých 272 žen porodilo 170 RhD pozitivních dětí a 102 RhD negativních dětí přesně dle predikce na základě vyšetření krevního séra matek. (36)

Akihiko Sekizawa použil fetální jaderné erytrocyty pro určení pohlaví a RHD genotypu plodu. Zahrnul vzorky krve od 4 RhD negativních žen v sedmém až sedmnáctém týdnu těhotenství, které 2 hodiny před odběrem krve podstoupily předčasné ukončení těhotenství. Pro všechny plody bylo obojí určeno správně. (37)

12. Predikce preeklampsie

Preeklampsie je syndrom vyskytující se ve druhé polovině těhotenství. Tento syndrom je svázan s těhotenstvím, protože se objevuje pouze pokud se v těle ženy nachází placenta. Četnost je asi 3-5 % a to ho staví do role nejčastější příčiny úmrtí matky nebo dítěte krátce před a po porodu nebo během porodu. Mezi příznaky patří např. zvýšení krevního tlaku nebo vylučování bílkovin do moče. Příčiny tohoto jevu nejsou dodnes zcela objasněny, avšak se zdá, že existuje více faktorů, které preeklampsii ovlivňují, mezi kterými nechybí ani genetické predispozice. Podstatou nemoci je nedostatečná invaze trofoblastu do spirálních arteriol vedoucí k placentální ischemii a poškození mateřského cévního endotelia. (38,39, 40)

Určujícím markerem pro predikci preeklampsie by se mohl stát zvýšený výskyt fetální DNA v mateřské krvi. Tuto skutečnost již potvrdily mnohé studie. Dennis Lo a kolektiv zkoumali sérum. Vzorky odebrali od 20 žen trpících preeklampsí a od 20 zdravých žen. V průměru se preeklampsie objevovala v třicátém druhém týdnu gravidity (rozmezí 27-41 týdnů), odpovídající kontrolní skupinu tvořily ženy bez těhotenských komplikací (průměr třicátý třetí týden, rozmezí 28-40 týdnů). Jako marker pro kvantifikaci fetální DNA byl určen SRY gen. Medián koncentrace fetální DNA činil u preeklamptický žen 381 genomových ekvivalentů / ml (IQR 194-788 genomových ekvivalentů / ml) a u zdravých žen 76 genomových ekvivalentů / ml (IQR 54-163 genomových ekvivalentů / ml). To činí pětinasobné zvýšení mediánu koncentrace fetální DNA u preeklamptických žen. (41) Xiao Zhongem a kolektivem

byla zkoumána mateřská plazma. I oni prokázali zvýšení koncentrace fetální DNA. Vzorke získali od 50 žen, přičemž se u 10 následně vyvinula preeklampsie. Ženy nosily jeden plod mužského pohlaví a byly ve druhém trimestru těhotenství. Medián koncentrace volné fetální DNA u zdravých žen činil 128,5 kopií / ml mateřské plazmy (rozmezí 30,6-318,4 kopií / ml) a u preeklamptických žen 422,9 kopií / ml mateřské plazmy (rozmezí 97,3-1642,2 kopií / ml). To činí zvýšení více než trojnásobné u preeklamptických žen. (42) Zvýšení koncentrace fetální DNA prokázaly i Amanda Cotter a kolektiv. Testovaly vzorky krve 264 žen, které byly průměrně těhotné $15,7 \pm 3,6$ týdnů. Osmdesát osm žen trpělo preeklampií a 176 zdravých žen sloužilo jako kontrolní skupina. Medián koncentrace fetální DNA u zdravých žen byl 28 kopií / ml (rozmezí 0-6300 kopií / ml) a u preeklamptických žen 280 kopií / ml (rozmezí 0-180000 kopií / ml). Fetální DNA nebyla detekována u 5 preeklamptických a 57 zdravých žen. (43)

Naproti tomu výzkum A. Crowleyho a kolektivu ukazuje, že koncentrace volné fetální DNA není před dvacátým týdnem těhotenství zvýšena. Analyzovali vzorky plazmy 16 žen, které později trpěly preeklampií, a 72 zdravých žen jako kontrolu. Medián délky těhotenství byl při odběru 13,5 týdnů u preeklamptických žen a 15 týdnů u zdravých žen. Medián koncentrace SRY genu byl 30,5 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 0-214 genomových ekvivalentů / ml) u preeklamptických žen a 27,5 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 0-1280 genomových ekvivalentů / ml) u zdravých žen. Pro β -aktin byl medián 2025 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 250-9950 genomových ekvivalentů / ml) u preeklamptických žen a 1835 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 26-19500 genomových ekvivalentů / ml) u zdravých žen. Přičemž množství β -aktinu reprezentuje koncentraci celkové extracelulární DNA (fetální i mateřský původ) v mateřské cirkulaci. (44)

Je zajímavé, že volná fetální DNA je vyšší u preeklamptických žen než u žen s FGR (fetal growth restriction). Toto dokazují Akihiko Sekizawa a kolektiv, kteří zkoumali vzorky plazmy. Do jejich studie bylo zahrnuto 9 žen s FGR ve třicátém až třicátém pátém týdnu těhotenství (medián 33 týdnů) a 9 preeklamptických žen ve dvacátém devátém až třicátém šestém týdnu těhotenství (medián 35 týdnů), přičemž 5 preeklamptických žen zároveň trpělo FGR. Jako kontrola sloužila skupina 20 zdravých žen ve dvacátém devátém až třicátém šestém týdnu těhotenství (medián 34,5 týdnů). Všechny ženy nosily plod mužského pohlaví a jako marker fetální DNA byla použita DYS 14 sekvence a jako marker pro určení celkové koncentrace volné DNA byl zvolen β -globin. Je zajímavé, že ženy s FGR měly nižší koncentraci volné fetální DNA, ale vyšší koncentraci celkového množství DNA než zdravé ženy (viz Tabulka 11). (45)

Tabulka 11: Hodnoty koncentrací DYS 14 a β -globinu u zdravých žen a žen s komplikacemi (45)

	DYS 14: medián (rozmezí)	β -globin: medián (rozmezí)
Zdravé ženy	191 (47-462)	1208 215-6480)
Ženy s FGR	141 (37-482)	2088 (398-14146)
Preeklamptické ženy	486 (183-1060)	2590 (1731-20472)

Hodnoty koncentrací jsou uváděny v jednotce genomových ekvivalentů / ml

Kromě zvýšené koncentrace volné DNA se v krvi preeklamptických žen vyskytuje i zvýšené množství erytroblastů. Wolfgang Holzgreve a kolektiv analyzovali vzorky od 8 zdravých žen získaných v době trvání těhotenství 28,8-40,1 týdnů (medián 38,4 týdnů) a od 8 preeklamptických žen v době trvání těhotenství 25,8-40,6 týdnů (medián 38,5 týdnů). Medián počtu fetálních erytroblastů byl 38 buněk (rozmezí 13- 90 buněk) na 200 buněk u preeklamptických žen a 7 buněk (rozmezí 0-20 buněk) na 200 buněk u zdravých žen. (46) Své výzkumy o zvýšeném množství erytroblastů potvrzují Wolfgang Hozgreve a kolektiv ve své novější studii publikované v roce 2001. Vzorky krve pocházely od žen ve druhém trimestru těhotenství, přičemž 15 žen následně onemocnělo preeklampsií a 70 bylo zdravých. Zvýšení erytroblastů bylo prokázáno v množství na 1000 jaderných buněk i v celkovém počtu těchto buněk (viz Tabulka 12). Zkoumané erytrocyty byly fetální i mateřské. (47)

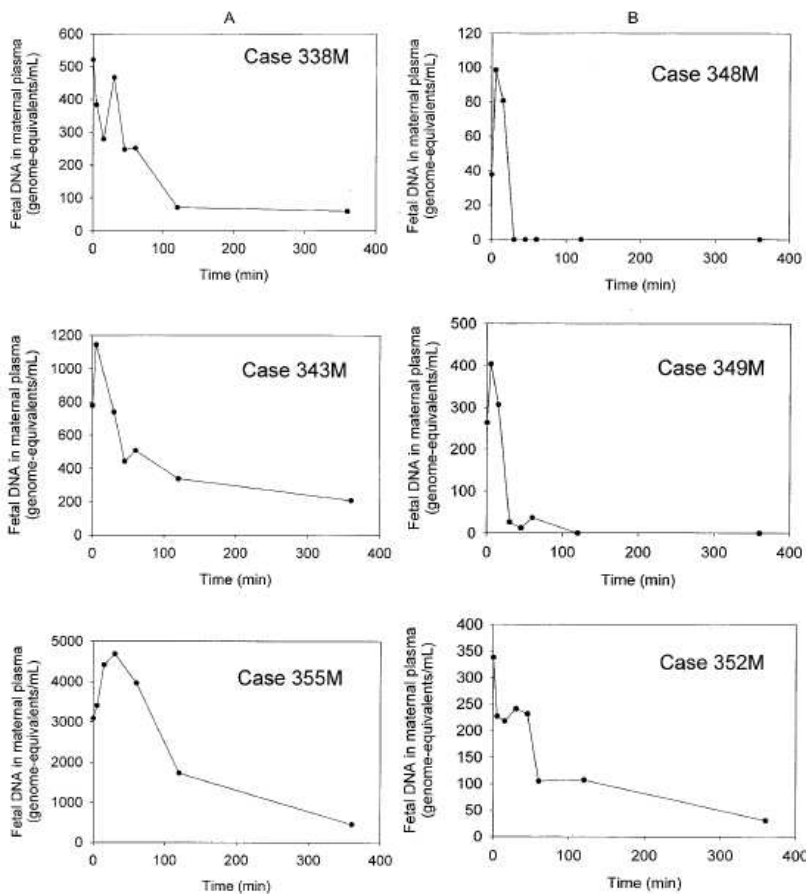
Tabulka 12: Množství erytroblastů u preeklamptických a zdravých žen. (47)

	Zdravé ženy	Preeklamptické ženy
Počet žen	72	15
Doba těhotenství při odběru vzorku průměr (rozmezí)	21 týdnů (14,3 – 24,3 týdnů)	22,9 týdnů (17,0 – 29,0 týdnů)
Erytroblasty na 1000 jaderných buněk: průměr (rozmezí)	0,8 (0,0 – 11,0)	4,3 (0,0 – 17,0)
Celkový počet erytroblastů: průměr (rozmezí)	928,96 (0,0 – 14400,0)	6 041,7 (0,0 – 27000,0)

Zvýšené množství erytroblastů v krvi žen, které následně onemocněly preeklampsií ukazuje i Davari Tanha a kolektiv. Ty měly ve vzorcích větší průměrný počet erytroblastů ($2,46 \pm 1,23$) než ženy zdravé ($0,44 \pm 0,55$). Všechny ženy byly v době odběru krve v devatenáctém až dvacátém šestém týdnu těhotenství a všechny nosily jedno dítě. Počet preeklamptických žen byl 50 a zdravých 549. (48)

Zvýšené množství fetální DNA může být vysvětleno zhoršeným odstraňováním této DNA z mateřské cirkulace. Tai-Wah Lau a kolektiv zkoumali odstraňování fetální DNA z mateřské

plazmy u vzorků získaných od 7 preeklamptických a 10 zdravých žen, které nosily plod mužského pohlaví. Vzorky byly odebrány před porodem a pak v následných 6 hodinách po porodu. Medián koncentrace fetální DNA byl 521 genomových ekvivalentů / ml (IQR 311-914 genomových ekvivalentů / ml, rozmezí 274-3089 genomových ekvivalentů / ml) u preeklamptických žen a 227 genomových ekvivalentů / ml (IQR 148-338 genomových ekvivalentů / ml, rozmezí 38-468 genomových ekvivalentů / ml) u zdravých žen. Šest hodin po porodu byl medián koncentrace fetální DNA u preeklamptických žen také vyšší než u žen zdravých. Hodnota u preeklamptických žen byla 208 genomových ekvivalentů / ml (IQR 74-405 genomových ekvivalentů / ml, rozmezí 60-779 genomových ekvivalentů / ml) a u zdravých žen 0 genomových ekvivalentů / ml (IQR 0-12 genomových ekvivalentů / ml, rozmezí 0-111 genomových ekvivalentů / ml). Průběžné klesání hodnot koncentrací (viz Obrázek 5). (49)



Obrázek 5: Odstraňování fetální DNA z mateřské plazmy, osa x zobrazuje čas po porodu (min) a osa y koncentraci fetální DNA v plazmě matky (genomový ekvivalent / ml). Sloupec A představuje preeklamptické ženy a sloupec B zdravé ženy. (49)

Dalším markerem pro predikaci preeklampsie by mohla být koncentrace mRNA CRH hormonu (Corticotropin-releasing hormone), která je u preeklamptických žen zvýšená. To ukázali Enders Ng a kolektiv. Zkoumali vzorky plazmy 10 zdravých žen, jejichž medián délky těhotenství byl 38 týdnů (IQR 37,3-38,3 týdnů), a 12 preeklamptických žen, u kterých byl medián délky těhotenství 37 týdnů (IQR 36,6-38,9 týdnů). Medián koncentrace mRNA u preeklamptických žen byl 1070 kopií / ml (IQR 535-1468 kopií / ml) a u zdravých žen 102 kopií / ml (IQR 51-158 kopií / ml). To činí 10,5krát vyšší koncentraci u preeklamptických žen. Jako důkaz, že mRNA je opravdu fetálního původu, bylo zkoumáno její odstraňování u 4 žen po císařském řezu poté, co byla detekována v plazmě všech těchto žen před porodem. Dvě hodiny po porodu již u žádné z nich detekována nebyla. (50)

13. Predikce IUGR

IUGR je zkratka pro intrauterine growth restriction a označuje stav, kdy plod plně nedosahuje svého růstového potenciálu. Je spojován s perinatální morbiditou a mortalitou a zvýšeným rizikem ischemických srdečních chorob, zvýšeného tlaku a diabetem typu 2 v dlouhodobém hledisku. (44) Případné riziko IUGR u těhotných by bylo možno detekovat na základě vyšší koncentrace volné fetální DNA v krvi matky.

Ženy pro výzkum Elisabetty Caramelli a kolektivu byly vybrány na základě výsledku vyšetření Dopplerovou metodou. Všech 24 vybraných žen nosilo jeden plod mužské pohlaví a u všech žen byla zkoumána plazma. Osm žen mělo UADA (uterine abnormal Doppler anomalies) a 16 žen bylo v pořádku (vzorky 2 žen z této skupiny byly vyloučeny, protože měly předčasný porod). Medián délky těhotenství všech žen byl 29 týdnů (rozmezí 20-35 týdnů). Pět žen s UADA během nebo následně po Dopplerově testu trpělo IUGR. Koncentrace volné fetální DNA u žen s IUGR je vyšší než u žen bez UADA a s UADA, ale bez IUGR (viz Tabulka 13). (51)

Tabulka 13: Koncentrace fetální DNA u zdravých žen a žen s komplikacemi. (51)

	Počet žen	Medián (genomových ekvivalentů / ml)	Rozmezí (genomových ekvivalentů / ml)
Bez UADA	14	122	5 – 356
S UADA, bez IUGR	3	99	74 – 220
S UADA, s IUGR	5	264	136 – 387

Výzkum A. Crowleyho a kolektivu ukazuje, že koncentrace volné fetální DNA u žen, kde byl později prokázán IUGR není před dvacátým týdnem těhotenství zvýšen. Analyzovaly vzorky plazmy 36 žen, které později trpěly IUGR, a 72 zdravých žen jako kontrolu. Mediánní doba těhotenství byla při odběru 15 týdnů. Medián koncentrace SRY genu byl 28 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 0-1010 genomových ekvivalentů / ml) u žen s IUGR a 27,5 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 0-1280 genomových ekvivalentů / ml) u zdravých žen. Medián koncentrace β -aktinu byl 3975 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 310-52500 genomových ekvivalentů / ml) u žen s IUGR a 1835 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 26-19500 genomových ekvivalentů / ml) u zdravých žen. Přičemž množství β -aktinu reprezentuje celkovou extracelulární DNA v mateřské cirkulaci (44)

Predikovat IUGR nebude pravděpodobně možné na základě koncentrace erytroblastů v krvi matky, protože např. studie Wolfganga Holzgeva a kolektivu žádné takové zvýšení neukázala. Vzorky krve pocházely od žen ve druhém trimestru těhotenství, přičemž 10 žen následně trpělo IUGR a 70 žen bylo zdravých. Zvýšení erytroblastů nebylo prokázáno v množství na 1000 jaderných buněk ani v celkovém počtu těchto buněk. Byly dokonce získány nižší hodnoty u žen s IUGR než u zdravých žen (viz Tabulka 14). Zkoumané erytrocyty byly fetální i mateřské. (47)

Tabulka 14: Množství erytroblastů u zdravých žen a žen s IUGR. (47)

	Zdravé ženy	Ženy s IUGR
Počet žen	72	10
Doba těhotenství při odběru vzorku průměr (rozmezí)	21 týdnů (14,3 – 24,3 týdnů)	22,5 týdnů (16,0 – 29,0 týdnů)
Erytroblasty na 1000 jaderných buněk: průměr (rozmezí)	0,8 (0,0 – 11,0)	0,4 (0,0 – 1,0)
Celkový počet erytroblastů: průměr (rozmezí)	928,96 (0,0 – 14400,0)	355,6 (0,0 – 1400,0)

Zvýšení fetálních erytroblastů v krvi ukazuje výzkum Raghada Al-Mulftiho a kolektivu, avšak do jedné skupiny zahrnuli ženy s IUGR a/nebo preeklampií, takže jejich výsledek není průkazný pro zvýšené množství fetálních erytroblastů v krvi matky při následném IUGR. Dvacet osm žen, jejichž medián délky těhotenství byl 24 týdnů (rozmezí 22-26 týdnů), bylo zařazeno do tohoto výzkumu na základě výsledku Dopplerova ultrazvuku. Zvýšené množství fetálních erytroblastů bylo u žen s IUGR a/nebo preeklampií a zároveň měly abnormální výsledek Dopplerova testu. Ženy s abnormálním výsledkem, ale bez IUGR nebo preeklampií

neměly hodnoty zvýšeny. Počty erytroblastů byly stanoveny morfologickou a imunochemickou detekcí (viz Tabulka 15). (52)

Tabulka 15: Množství erytroblastů u zdravých žen a žen s komplikacemi. (52)

	Abnormální Dopplerův test		Kontrolní skupina
	IUGR/ preeklampsie	Zdravé ženy	
Počet žen	10	8	10
morfologicky			
Počet erytroblastů	13,5 (3 – 33)	5 (2 – 17)	4 (0 – 14)
Celkový počet jaderných buněk	206 (102 – 702)	208 (112 – 825)	507 (192 – 835)
imunochemicky			
Počet erytroblastů	12,5 (2 – 30)	4 (1 – 15)	3 (0 – 16)
Celkový počet jaderných buněk	208 (100 – 700)	285 (118 – 800)	503 (198 – 824)

Hodnoty počtu buněk jsou uváděny jako medián a v závorce je rozmezí.

Na konci této kapitoly uvádím studii Maddaleny Smid a kolektivu zaměřenou na množství fetální DNA v plazmě matek, které trpí různými placentálními abnormalitami během těhotenství. Jako kontrola sloužily vzorky 78 zdravých žen, jejichž mediánní hodnoty koncentrace fetální DNA kromě druhého trimestru rostly (viz Tabulka 16).

Tabulka 16: Koncentrace fetální DNA v mateřské plazmě zdravých žen během těhotenství a po porodu. (53)

	První trimestr	Druhý trimestr	Třetí trimestr	Doba porodu
Počet vzorků	13	21	38	6
Medián koncentrace	20,7	13,4	23,6	74,8
Rozmezí koncentrace	0-89,9	0-149,7	0-138,3	26,6-164,1

Hodnoty koncentrací jsou uváděny v jednotce genomových ekvivalentů / ml

Ženy trpící placentálními abnormalitami vykazaly mnohem vyšší koncentrace fetální DNA v plazmě (viz Tabulka 17). (53)

Tabulka 17: Koncentrace fetální DNA u žen s různými komplikacemi. (53)

abnormalita	Počet vzorků	Koncentrace fetální DNA	
		Medián	Rozmezí
Preeklampsie	10	332,9	59-615
Preeklampsie + IUGR	7	146,8	96-859
IUGR	3	308,1	169-519
Hypertenze + IUGR	4	142,4	34-473
HELLP + IUGR	2	249,7	105-349

Hodnoty koncentrací jsou uváděny v jednotce genomových ekvivalentů / ml

14. Predikce předčasného porodu

Pro predikci předčasného porodu by mohla být využita vyšší koncentrace fetální DNA v krvi matky. Tuto skutečnost dokazují Tse N. Leung a kolektiv, kteří zkoumali plazmu žen, s podezřením na předčasný porod. Do výzkumu bylo zařazeno 20 žen, které porodily mezi dvacátým šestým a třicátým čtvrtým týdnem těhotenství (medián 31,5 týdnů), přičemž nejdelší doba mezi odběrem krve a porodem byla 8 dní. Kontrolní skupinu tvořilo 20 žen, které porodily v řádném termínu. Medián doby těhotenství při odběru u zdravých žen byl 31,2 týdnů. Jako marker pro kvantifikaci fetální DNA byl zvolen SRY gen, který byl detekován v plazmě všech žen, nosící plod mužského pohlaví a v plazmě žádné ženy, která nosila plod ženského pohlaví. Chlapce nosilo 17 kontrolních žen a 13 žen s předčasným porodem, to znamená, že u těchto žen byla stanovena koncentrace fetální DNA. Medián koncentrace fetální DNA v plazmě zdravých žen byl 65,8 kopií / ml (IQR 44,3-143,3 kopií / ml). U 8 žen ze skupiny s předčasným porodem byla nasazena tokolytická léčba, avšak u všech byla neúspěšná. Medián koncentrace fetální DNA v plazmě žen s předčasným porodem byl 124,8 kopií / ml (IQR 67,8-568,2 kopií / ml). Dále byly zkoumány vzorky 12 žen, u kterých bylo riziko předčasného porodu mezi dvacátým čtvrtým a třicátým třetím týdnem těhotenství (medián 30,3 týdnů), avšak nasazená tokolytická léčba úspěšně oddálila porod až do doby přirozeného termínu. Medián koncentrace fetální DNA v plazmě těchto žen byl 46,3 kopií / ml (IQR 8,8-79,4 kopií / ml), kdežto u žen s neúspěšnou tokolytickou léčbou byl 119,3 kopií / ml (IQR 78,8-439,1 kopií / ml). (54)

Zvýšenou koncentraci fetálních nukleových kyselin, konkrétně mRNA CRH hormonu (Corticotropin-releasing hormone), zaznamenali i Xiao Zhong a kolektiv. Analyzovali plazmu 35 žen s rizikem předčasného porodu a 15 zdravých žen. Všechny vzorky krve byly odebrány v devatenáctém až třicátém třetím týdnu těhotenství (medián 26 týdnů). Jedenáct žen porodilo předčasně a u 24 žen byl porod oddálen do řádného termínu díky tokolytické léčbě. Medián koncentrace mRNA u žen s rizikem předčasného porodu byl 81 kopií / ml (rozmezí 11-6285 kopií / ml) a u zdravých žen 38 kopií / ml (rozmezí 17-147 kopií / ml). Medián koncentrace mRNA u žen, které porodily předčasně, byl 100 kopií / ml (rozmezí 19-743 kopií / ml) a u žen s oddáleným porodem 66 kopií / ml (rozmezí 11-6285 kopií / ml). Čtyři ženy s oddáleným porodem měly velice vysoké množství mRNA, v rozmezí 1392-6265 kopií / ml). (55)

Dále je nutné uvést, že přítomnost erytroblastů v krvi žen s předčasným porodem zvýšená není. To dokázaly Irene Hoesli a kolektiv. Byly získány vzorky krve 47 žen s předčasnými kontrakcemi a 47 zdravých žen, přičemž všechny byly ve dvacátém až třicátém čtvrtém týdnu

těhotenství. Počet erytroblastů nebyl zvýšen u 16 žen, které porodily předčasně, ani u 31 žen, které měly předčasné kontrakce, ale porodily v řádném termínu (viz Tabulka 18). (56)

Tabulka 18: Množství erytroblastů u zdravých žen a žen s předčasným porodem. (56)

	Předčasné kontrakce		
	Předčasný porod	Porod v termínu	Kontrolní skupina
Počet erytroblastů: medián (rozmezí)	2 (0-24)	1 (0-74)	2 (0-29)

15. Predikce trizomie 21

Downův syndrom je možné s vysokou jistotou predikovat na základě přítomnosti fetální DNA v krvi matky. Pro to hovoří studie Dennise Lo a kolektivu. Vzorky plazmy pro analýzu pocházely z Bostonu a Hong Kongu. Bostonské vzorky pocházely od 7 žen s mužským plodem s trizomií 21; 19 s euploidním mužským plodem a 13 s ženským plodem. Vzorky z Hong Kongu pocházely od 6 žen s mužským plodem s trizomií 21, 18 s euploidním mužským plodem a 10 s ženským plodem. Bostonské vzorky byly získány v průměrné době těhotenství 17,3 týdnů (rozmezí 12-21 týdnů) u žen s plody s trizomií 21 a 17,1 týdnů (rozmezí 12-21 týdnů) u žen s euploidními plody. Hong kongské vzorky byly získány v průměrné době těhotenství 18 týdnů (rozmezí 16-21 týdnů) u žen s plody s trizomií 21 a 17,2 týdnů (rozmezí 16-21 týdnů) u žen s euploidními plody. Jako marker pro kvantifikaci fetální DNA byly použity SRY sekvence odvozené od chromozomu Y, které nebyly detekovány v žádné plazmě od ženy s plodem ženského pohlaví. Medián koncentrace fetální DNA u plodů s trizomií 21 byl 46,0 genomových ekvivalentů / ml (Boston) a 48,2 genomových ekvivalentů / ml (Hong Kong). Pro vzorky s euploidními mužskými plody byly mediány 23,3 genomových ekvivalentů / ml (Boston) a 16,3 genomových ekvivalentů / ml (Hong Kong). (57) Zvýšení potvrzují i Diana Bianchi a kolektiv, jež použily DNA z fetálních buněk. Jako marker byla vybrána specifická sekvence dlouhého raménka Y chromozomu. Ze 199 zdravých žen nosilo 90 mužský plod a 109 ženský plod. Průměrná hodnota ekvivalentů mužské fetální buněčné DNA u vzorků žen se zdravým mužským plodem byla 19 (rozmezí 0-91). Je zajímavé, že Y chromozomální sekvence byly nacházeny i v některých vzorcích žen se zdravým plodem ženského pohlaví. Osmnáct vzorků bylo získáno od žen, které nosily mužský plod s Downovým syndromem. Průměrná hodnota ekvivalentů mužské buněčné DNA u těchto vzorků byla 110 (rozmezí 0,1-650). (58)

Antoni Farina a kolektiv použili mateřské sérum získané ve druhém trimestru těhotenství žen, přičemž 15 žen nosilo plod mužského pohlaví s Downovým syndromem a 5 žen nosilo zdravý mužský plod. Medián koncentrace volné fetální DNA byl u plodů s Downovým syndromem 1,7krát vyšší než u zdravých plodů. (59)

Zvýšenou koncentraci fetální DNA u Downova syndromu vyvrací studie Ilony Hromadníkové a kolektivu. Zkoumaly vzorky plazmy od 21 žen s jedním zdravým plodem (odběr mezi patnáctým a devatenáctým týdnem těhotenství) a 16 žen, jejichž plod byl postižen trizomií 21 (odběr mezi sedmnáctým a dvacátým druhým týdnem těhotenství). Jako markery byly použity SRY gen a gen β -globinu. SRY gen nebyl detekován u žádného těhotenství s ženským pohlavím plodu a u 22 ze 24 těhotenství s mužským pohlavím plodu byla detekce úspěšná. Medián koncentrace fetální DNA u 11 těhotných žen s mužským plodem postiženým trizomií 21 byl 23,3 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 0-58,5 genomových ekvivalentů / ml) a 24,5 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 0-47,5 genomových ekvivalentů / ml) u 13 žen s euploidním mužským plodem. Medián koncentrace celkové DNA byl u 21 žen s euploidním plodem 7330 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 1300-36750 genomových ekvivalentů / ml) a u 16 žen s trizomickým plodem 10615 genomových ekvivalentů / ml (rozmezí 615-65000 genomových ekvivalentů / ml). (60)

16. Závěr

Prenatální neinvazivní diagnostika se stává součástí rutinní péče o těhotné ženy. Tento její vstup do klinické praxe je důležitý krok vpřed v péči o těhotné, protože nepředstavuje žádné riziko pro matku ani dítě ve srovnání s tradičními invazivními metodami. Právě míra rizika určitého vyšetření často ovlivňuje rozhodnutí ženy, zda dané vyšetření podstoupí nebo ne.

Ve své práci jsem ukázala, že specifita a senzitivita neinvazivní diagnostiky je dostatečně vysoká na to, aby predikovala komplikace v těhotenství nebo určovala vlastní genotyp plodu. Není pochyb o tom, že v budoucnosti bude možno pomocí tohoto způsobu diagnostiky predikovat s dostatečnou jistotou další těhotenské komplikace a aberantní genotyp plodu.

Tato práce by v rámci diplomové práce mohla být rozšířena o vlastní výzkum autorky na poli prenatální neinvazivní diagnostiky v České republice.

17. Seznam literatury

1. Diana W. Bianchi (2000) Fetomaternal cell trafficking: A new cause of disease? *American Journal of Medical Genetics* 91: 22-28
2. Akihiko Sekizawa, Yuditiya Purwosunu, Ryu Matsuoka, Keiko Koide, Shiho Okazaki, Antonio Farina, Hiroshi Saito, Takashi Okai (2007) Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* Vol.33, No. 6: 747-764
3. Yu-Kwan Tong, Y.M. Dennis Lo (2006) Review: Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clinica Chimica Acta* 363: 187-196
4. R. Swaminathan, Asif N. Butt (2006) Circulating nucleic acids in plasma and serum. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1075: 1-9
5. Y.M. Dennis Lo, Noemi Corbetta, Paul F. Chamberlein, Vik Rai, Ian L. Sargent, Christopher W.G. Redman (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, August 16: 485-487
6. Tuangsit Wataganara, Diana W. Bianchi (2004) Fetal cell-free acids in the maternal circulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1022: 90-99
7. Leo L.M. Poon, Tse N. Leung, Tze T. Lau, Y.M. Dennis Lo (2000) Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 46, No. 11: 1832-1834
8. Stephen S.C. Chim, Tristan K.F. Shing, Emily C.W. Hung, Tak-yeung Leung, Tze-kin Lau, Rossa W.K. Chiu, Y.M. Dennis Lo (2008) Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 54:3: 482-490
9. Masaru Shinya, Aikou Okamoto, Harihuko Sago, Misato Saito, Yoshiaki Akiyama, Michihiro Kitagawa, Tadao Tanaka (2004) Analysis of fetal DNA from maternal peripheral blood by lectin polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Congenital Anomalies* 44: 142-146

10. Diana W. Bianchi (1995) Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. *The journal of pediatrics* Vol. 127, No. 6: 847-856
11. Barbara Pertl, Diana W. Bianchi (1999) Review: First trimester prenatal diagnosis: Fetal cells in the maternal circulation. *Seminars in Perinatology* Vol. 23, No. 5: 393-402
12. Leopard A. Herzenberg, Diana W. Bianchi, Jim Schröder, Howard M. Cann, Michael Iverson (1979) Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescence-activated cell sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 76, No. 3: 1453-1455
13. M. Kirsch-Volders, E. Lissens-Van Assche, C. Susanne (1980) Increase in the amount of fetal lymphocytes in maternal blood during pregnancy. *Journal of Medical Genetics* 17: 267-272
14. Diana W. Bianchi, Gretchen K. Zickwolf, Gary J. Weil, Shelley Sylvester, Mary Ann DeMaria (1996) Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc. Natl. Acad. USA Sci. USA* Vol. 93: 705-708
15. Diana W. Bianchi, Alan F. Flint, Mary Frances Pizzimenti, Joan H.M. Knoll, Samuel A. Latt (1990) Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 87: 3279-3283*
16. Pao-Lin Kuo (1998) Frequencies of fetal nucleated red blood cells in maternal blood during different stages of gestation. *Fetal Diag. Ther.* 13: 375-379
17. Pao-Lin Kuo, How-Ran Guo (1999) Nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* Vol. 94, No. 3: 464-468
18. Y.M. Dennis Lo, Marks S.C. Tein, Tze K. Lau, Christopher J. Haines, Tse N. Leung, Priscilla M.K. Poon, James S. Wainscoat, Philip J. Johnson, Allan M.Z. Chang, N. Magnus Hjelm (1998) Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 768-775

19. Barbara Pertl, Akihiko Sekizawa, Osamu Samura, Irmgard Orescovic, Peter T. Rahaim, Diana W. Bianchi (2000) Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 106: 45-49
20. K.C. Allen Chan, Jun Zhang, Angela B.Y. Hui, Nathalie Wong, Tze K. Lau, Tse N. Leung, Kwok-Wai Lo, Dolly W.S.Huang, Y.M. Dennis Lo (2004) Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 50:1: 88-92
21. Y.M. Dennis Lo, Jun Zhang, Tse N. Leung, Tze K. Lau, Allan M.Z. Chang, N. Magnus Hjelm (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 218-224
22. Y.M. Dennis Lo, Elena S.F. Lo, Neale Watson, Lisa Noakes, Ian L. Sargent, Baskaran Thilaganathan, James S. Wainscoat (1996) Two-way cell traffic between mother and fetus: biological and clinical implications. *Blood* Vol 88, No 11: 4390-4395
23. Y.M. Dennis Lo, Tze K. Lau, Lisa Y.S. Chan, Tse N. Leung, Allan M.Z. Chang (2000) Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clinical Chemistry* 46:9: 1301-1309
24. Hiroshi Honda, Norio Miharuru, Yoko Ohashi, Osamu Samura, Masayuki Kinutani, Tetsuaki Hara, Koso Ohama (2002) Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 110: 75-79
25. Jean-Marc Costa, Alexandra Benachi, Evelyne Gautier, Jean-Marie Jouannic, Pauline Renault, Yves Dumez (2001) First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Dian* 21: 1070-1074
26. Hiroshi Honda, Norio Miharuru, Yoko Ohashi, Koso Ohama (2001) Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clinical Chemistry* 47:1: 41-46

27. Akihiko Sekizawa, Tetsuro Kondo, Mariko Iwasaki, Akira Watanabe, Masatoshi Jimbo, Hiroshi Saito, Takashi Okai (2001) Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 47, No. 10: 1856-1858
28. Ilona Hromadnikova, Bela Houbova, Dana Hridelova, Sona Voslarova, Josef Kofer, Vladimir Komrska, David Habart (2003) Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Dian* 23: 235-238
29. Elena Picchiassi, Giuliana Coata, Alessia Fanetti, Michela Centra, Luana Pennacchi, Gian Carlo Di Renzo (2008) The best approach for early prediction of fetal gender by using free fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 28: 525-530
30. Lindy Durrant, Katherine McDowall, Rachel Holmes, David Liu (1996) Non-invasive prenatal diagnosis by isolation of both trophoblasts and fetal nucleated red blood cells from the peripheral blood of pregnant women. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* Vol. 133: 219-222
31. L.G. Durrant, W.L. Martin, K.M. McDowall, D.T.Y. Liu (1996) Isolation of fetal trophoblasts and nucleated erythrocytes from the peripheral blood of pregnant women for prenatal diagnosis of fetal aneuploides. *Early Human Development* 47: S79-S83
32. Y.M. Dennis Lo, N. Magnus Hjelm, Carrie Fidler, Ian L. Sargent, Michael M. Murphy, Paul F. Chamberlain, Priscilla M.K. Poon, Christopher W.G. Redman, James S. Wainscoat (1998) Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *The New England Journal of Medicine* Vol. 339, No. 24: 1734-1738
33. Frederik Banch Clausen, Grethe Risum Krog, Klaus Rieneck, Leif Kofoed Nielsen, Rasmus Lundquist, Kirstin Finning, Ebbe Dickmeiss, Morten Hedegaard, Morten Hanefeld Dziegiel (2005) Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenat Diagn* 25:1040-1044

34. Machiko Kimura, Chiaki Sato, Masaaki Hara, Osamu Ishihara, Keni Ikebuchi (2008) Noninvasive fetal RhD genotyping by maternal plasma with capillary electrophoresis. *Transfusion* Vol. 48: 1156-1163
35. Jean-Marc Costa, Yves Giovannardi, Pauline Erenault, Laurence Lohmann, Valérie Nataf, Najua El Halali, Evelyne Gautier (2002) Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *British Journal of Hematology* 119: 255-260
36. Evelyne Gautier, Alexandra Benachi, Yves Giovannardi, Pauline Erenault, Martine Olivi, Thierry Gaillon, Jean-Marc Costa (2005) Fetal RhD genotyping by maternal serum analysis: A two-year experience. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 192: 666-669
37. Akihiko Sekizawa, Osamu Samura, Dong Kai Zhen, Vincent Falco, Diana W. Bianchi (1999) Fetal cell recycling: Diagnosis of gender and RhD genotype in the same fetal cell retrieved from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 181, No. 5, Part 1: 1237-1242
38. J.M. Roberts, D.W. Cooper (2001) Review: Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *The Lancet* Vol. 357, January 6: 53-56
39. N. Leung, Jun Zhang, Tze K. Lau, Lisa Y.S. Chan, Y.M. Dennis Lo (2001) Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clinical Chemistry* 47, No. 1: 137-139
40. Medhat S. Alberry, Deborah G. Maddocks, Medhat A. Hadi, Helmi Metawi, Linda P. Hunt, Sherif A. Abdel-Fattah, Neil D. Avent, Peter W. Soothill (2009) Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. *Am J Obstet Gynecol*: 98.e1-98e6
41. Y.M. Dennis Lo, Tse N. Leung, Mark S.C. Tein, Ian L. Sargent, Jun Zhang, Tze K. Lau, Christopher J. Haines, Christopher W.G. Redman (1999) Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clinical Chemistry* 45:2: 184-188

42. Xiao Yan Zhong, Wolfgang Holzgreve, Sinuhe Hahn (2002) The levels of circulatory cell free fetal DNA in maternal plasma are elevated prior to the onset of preeclampsia. *Hypertension in pregnancy* 21(1): 77-83
43. Amanda M. Cotter, Cara M. Martin, John J. O'Leary, Sean F. Daly (2004) Increased fetal DNA in the maternal circulation in early pregnancy is associated with increased risk of preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 191: 515-520
44. A. Crowley, C. Martin, P. Fitzpatrick, O. Sheils, C. O'Herlihy, J. J. O'Leary B.M. Byrne (2007) Free fetal DNA is not increased before 20 weeks in intrauterine growth restriction or pre-eclampsia. *Prenatal Diagnosis* 27: 174-179
45. Akihiko Sekizawa, Masatoshi Jimbo, Hiroshi Saito, Mariko Iwasaki, Ryu Matsuoka, Takashi Okai, Antonio Farina (2003) Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J. Obstet. Gynecol.* Vol. 188, No. 2: 480-484
46. Wolfgang Holzgreve, Fabio Ghezzi, Edoardo Di Naro, Dorothee Gänshirt, Eli Maymon, Sinuhe Hahn (1998) Disturbed feto-maternal cell traffic in preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology* Vol. 91, No. 5, Part 1: 669-672
47. Wolfgang Holzgreve, Jim Chun Li, Andrea Steinborn, Thoma Külz, Christof Sohn, Markus Hodel, Sinuhe Hahn (2001) Elevation in erythroblast count in maternal blood before the onset of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* Vol. 184, No. 2: 165-168
48. Davari Tanha F., Mohammed Pour J., Kaveh M, Shariat M. (2008) Prediction of preeclampsia with elevation in erythroblast count in maternal blood. *Shiraz E-Medical Journal* Vol. 3, No. 3
49. Tai-Wah Lau, Tse N. Leung, Lisa Y.S. Chan, Tze K. Lau, K.C. Allen Chan, Wing H. Tam, Y.M. Dennis Lo (2002) Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clinical Chemistry* 48:12: 2141-2146
50. Enders K.O. Ng, Tse N. Leung, Nancy B.Y. Tsui, Tze K. Lau, Nirmal S. Panesar, Rossa W.K. Chiu, Y.M. Dennis Lo (2003) The concentration of circulating Corticotropin-releasing

hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clinical Chemistry* 49:5: 727-731

51. Elisabetta Caramelli, Nicola Rizzo, Manuela Concu, Giuliana Simonazzi, Paolo Carinci, Corrado Bondavalli, Luciano Bovicelli, Antonio Farina (2003) Cell-free fetal DNA concentration in plasma of patients with abnormal uterine artery Doppler waveform and intrauterine growth restriction – a pilot study. *Prenat Diagn* 23:367-371

52. Raghad Al-Mufti, Henry Hambley, Gerard Albaiges, Christoph Lees, Kypros H. Nicolaides (2000) Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop preeclampsia. *Human Reproduction* Vol. 15, No. 7: 1624-1628

53. Maddalena Smid, Antonia Vassallo, Fiorenza Lagona, Luca Valsecchi, Lucia Maniscalco, Luana Danti, Andrea Lojacono, Augusto Ferrari, Maurizio Ferrari, Laura Cremones (2001) Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in pathological conditions associated with placental abnormalities. *Annals New York Academy of Science* August 30: 132-137

54. Tse N. Leung, Jun Zhang, Tze K. Lau, N. Magnus Hjelm, Y.M. Dennis Lo (1998) Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* Vol. 352, December 12: 1904-1905

55. Xiao Yan Zhong, Wolfgang Holzgreve, Irene Hoesli, Sinuhe Hahn (2005) Circulatory Corticotropin-releasing hormone mRNA concentrations are increased in women with preterm delivery but not in those who respond to tocolytic treatment. *Clinical Chemistry* 51, No. 3: 635-636

56. Irene Hoesli, Milan Danek, Dexin Lin, Ying Li, Sinuhe Hahn, Wolfgang Holzgreve (2002) Circulating erythroblasts in maternal blood are not elevated before onset of preterm labor. *Obstetrics and Gynecology* Vol. 100, No. 5, Part 1: 992-996

57. Y.M. Dennis Lo, Tze K. Lau, Jun Zhang, Tse N. Leung, Allan M.Z. Chang, N. Magnus Hjelm, R. Sarah Elmes, Diana W. Bianchi (1999) Increased fetal DNA concentrations in the

plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clinical Chemistry* 45:10: 1747-1751

58. Diana W. Bianchi, John M. Williams, Lisa M. Sullivan, Frederick W. Hanson, Katherine W. Klinger, Antony P. Shuber (1997) PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 822-829

59. Antonio Farina, Erik S. LeShane, Geralyn M. Lambert-Messerlian, Jacob A. Canick, Thomas Lee, Louis M. Neveux, Glenn E. Palomaki, Diana W. Bianchi (2003) Evaluation of cell-free DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clinical Chemistry* 49:2: 239-242

60. Ilona Hromadnikova, Bela Houbova, Dana Hridelova, Sona Voslarova, Pavel Calda, Katerina Nekolarova, Josef Kofer, David Stejskal, Jindrich Doucha, Ondrej Cinek, Jan Vavrinec (2002) Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2:4