

Súhlasím so zapožičaním svojej diplomovej práce k študijným účelom a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičiavateľov. Prevzaté údaje je vypožičiavateľ povinný riadne odcitovať.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



**Využitie Real–time PCR pri kvantitatívnej analýze
voľnej fetálnej DNA v krvnom obehu matky**

Miroslava Hančárová

Praha 2007

Vedúci diplomovej práce: Ing. Aleš Hořínek
Doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

Diplomová práca bola vypracovaná samostatne, len s použitím citovanej literatúry a pod vedením vedúceho diplomovej práce.

Miroslava Hančárová

Rada by som poďakovala môjmu školiteľovi ing. Hořínkovi za láskavé vedenie, zaškolenie, trpezlivosť a možnosti, ktoré mi boli poskytnuté.

Ďakujem pani doc. Kohoutovej a pánovi MUDr. Panczakovi za cenné rady pri písaní tejto práce.

Ďakujem dievčatám z Laboratória molekulárnej genetiky za ochotu vždy s úsmevom pomôcť.

Ďakujem Mat'kovi a Jožkovi za pomoc s technickými problémami pri písaní práce, na ktoré som bola prikrátka.

Rada by som taktiež poďakovala rodičom za ich neustálu podporu vo všetkom, optimizmus a cenné rady.

Diplomová práce vznikla v letech 2004 - 2007 v rámci grantu číslo 203/03/1025 poskytnutého Grantovou agentúrou České republiky pod názvem: Využití Real-time PCR při analýze fetální DNA v mateřské plazmě.

Prijatá publikácia v časopise *Fetal Diagnosis and Therapy*: Aleš Hořínek, Marie Korabečná, Aleš Panczak, Zdenka Ulčová Gallová, Kamila Nouzová, Pavel Calda, Miroslava Hančárová (2007): Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics.

Usage of Real-time PCR for quantitative analysis of cell-free fetal DNA in maternal blood circulation

Abstract

The presence of fetal DNA in maternal plasma may represent a source of genetic material which can be obtained non-invasively. We analyzed methodological influences and characterized the concentrations of cell-free fetal DNA (cff DNA) circulating in maternal plasma at different gestational ages in physiological pregnancies. These values were compared with ones from pathological pregnancies.

We investigated 238 independent samples from single male-bearing physiological pregnancies of different gestation age and small number of samples from pathological pregnancies. In other 47 pregnancies, the samples were collected three times during pregnancy (at all trimesters) to evaluate the kinetics of cff DNA. DNA extraction methods were compared: the manual (Roche) with manual (Qiagen) and automated (Roche) with manual (Roche). Cff DNA was amplified using Real-time PCR method and Y-specific sequences SRY and DYS14. The amount of total free-cell DNA circulating in maternal plasma was determined by amplifying of the GAPDH sequence.

The elevation in the concentration of cff DNA during pregnancy with the highest value in the third trimester was observed independently on the DNA extraction method and on the Y-specific amplified sequence. There was also documented the increase of the percentage of fetal DNA in total cell-free DNA in maternal plasma during trimesters of pregnancy (8.3, 10.7 and 23.2 % in average).

We discuss methodological problems and describe statistical parameters of cff DNA concentrations in maternal plasma during pregnancy as the basic information for comparison with pregnancies having a pathological outcome.

Key words:

cell-free fetal DNA, maternal plasma, non – invasive prenatal diagnosis, pregnancy, Y chromosome, Real-time PCR

Kľúčové slová:

voľná fetálna DNA, materská plazma, neinvazívna prenatálna diagnostika, tehotenstvo, Y chromozóm, Real-time PCR

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literárny prehľad.....	11
2.1	Invazívne procedúry prenatalnej diagnostiky.....	11
2.1.1	Konvenčná amniocentéza.....	11
2.1.2	Odber choriových klkov.....	12
2.1.3	Placentálna biopsia (neskorý CVS).....	14
2.1.4	Skorá amniocentéza.....	15
2.1.5	Odber fetálnej krvi (kordocentéza).....	15
2.2	História objavu fetálnej DNA a fetálnych buniek v krvnom obehú matky	18
2.3	Fetálne bunky v krvnom obehú matky.....	20
2.3.1	Fetálne trofoblasty.....	21
2.3.2	Lymfoidné progenitorové bunky.....	21
2.3.3	Fetálne erytroblasty.....	22
2.4	Metódy izolácie fetálnych buniek z krvného obehú matky.....	23
2.4.1	Fluorescenčne aktivované triedenie buniek – FACS.....	23
2.4.2	Magnetická separácia buniek - MACS.....	25
2.5	Voľná fetálna DNA v krvnom obehú matky.....	26
2.5.1	Pôvod voľnej fetálnej DNA.....	27
2.5.2	Genetické markery slúžiace na detekciu fetálnej DNA.....	29
2.5.3	Prítomnosť fetálnej DNA v iných tekutinách ako materskej plazme alebo sére.....	31
2.6	Využitie voľnej fetálnej DNA a fetálnych buniek pri neinvazívnej prenatalnej diagnostike.....	32
2.7	Sledované poruchy spojené s tehotenstvom.....	39
2.7.1	Preeklampsia.....	39
2.7.2	Predčasný pôrod.....	41
2.7.3	Tokolýza.....	42
2.7.4	Gestačný diabetes.....	43
2.8	Fetálna RNA.....	44
3	Ciele diplomovej práce.....	47
4	Materiál a metódy.....	48
4.1	Použitie chemikálie.....	48
4.2	Spotrebný materiál.....	48
4.3	Izolačné kity.....	48
4.4	Použitie prístroje.....	49
4.5	Odber krvi tehotných žien.....	49
4.6	Separácia plazmy.....	50
4.7	Izolácia DNA.....	50
4.7.1	Manuálna izolácia.....	50
4.7.2	Automatická izolácia.....	52
4.8	Preukázanie pohlavia metódou PCR.....	54
4.9	Metóda Real-time PCR.....	54
4.10	Preukázanie pohlavia metódou Real-time PCR.....	63
4.11	Kvantifikácia voľnej fetálnej DNA v materskej plazme metódou real-time PCR.....	65

4.12	Neinvazívna prenatalná diagnostika Rh faktoru plodu metódou Real-time PCR.....	67
4.13	Štatistická analýza.....	67
5	Výsledky	69
5.1	Vzťah medzi množstvom voľnej fetálnej DNA a stupňom tehotenstva u žien s fyziologickým priebehom tehotenstva	69
5.1.1	Kvantifikácia voľnej fetálnej DNA	69
5.1.2	Kvantifikácia celkovej voľnej DNA	71
5.1.3	Percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme	72
5.2	Kinetika kvantity voľnej fetálnej DNA počas troch trimestrov tehotenstva ..	73
5.3	Výber metódy izolácie DNA z plazmy ako faktor množstva izolovanej DNA	74
5.3.1	Porovnanie automatickej izolácie (Roche Diagnostics) a manuálnej izolácie (Roche Diagnostics)	74
5.3.2	Porovnanie manuálnej izolácie (Roche Diagnostics) a manuálnej izolácie (Qiagen).....	78
5.3.3	Porovnanie senzitivít a špecifít Real-time PCR reakcie amplifikujúcej SRY lokus v závislosti na zvolenej izolačnej technike.....	80
5.4	Porovnanie efektivity amplifikácie dvoch najčastejšie používaných detekčných systémov SRY a DYS 14.....	80
5.5	Neinvazívna prenatalná diagnostika Rh faktoru plodu.....	82
5.6	Vzťah medzi množstvom voľnej fetálnej DNA a stupňom tehotenstva u žien s dvojpočetným tehotenstvom a nefyziologickým priebehom tehotenstva ..	83
5.6.1	Dvojpočetné tehotenstvá.....	83
5.6.2	Patologické tehotenstvá	86
6	Diskusia	90
7	Súhrn.....	96
8	Zoznam literatúry	98

1 Úvod

V dnešnej dobe je prenatálna diagnostika chromozomálnych anomálií a monogénnych ochorení založená predovšetkým na invazívnych procedúrach. Všetky tieto procedúry v podstate pozostávajú zo zozbierania vhodných fetálnych vzoriek tkaniva či buniek z placenty, plodu alebo amniovej tekutiny a fetálnej krvi. Hoci sú tieto techniky považované za relatívne bezpečné, nesú so sebou riziko straty plodu v 1 až 2 % prípadov a taktiež riziko infekcie a krvácania pre matku.

Očakávané zastúpenie najčastejších chromozomálnych anomálií u živo narodených detí v populácii je 0,65 %, vrátane trizómie 21. páru s frekvenciou 0,12 % (Surbek a Holzgreve 2001). Z tohto dôvodu by malo byť invazívne testovanie obmedzené len na vybranú populáciu s vysokým rizikom chromozomálnych anomálií, aby sa zredukovalo celkové množstvo chromozomálne normálnych, zdravých plodov stratených zásluhou týchto invazívnych procedúr.

Na odhadnutie zvýšeného rizika chromozomálnych anomálií v individuálnych tehotenstvách bol spočiatku používaný iba vek matky. Viedol k tomu fakt, že riziko vývojovej vady plodu stúpa s vekom matky. Avšak vek samotný je nedostačujúcim kritériom. V 80. a 90. rokoch 20. storočia bol detegovaný vplyv chromozomálne abnormálnych plodov na hladiny určitých hormónov a proteínov cirkulujúcich v materskej plazme. Taktiež bolo popísané ultrazvukové meranie zvýšenej nuchálnej translucencie a jej spojitosť s aneuploidiou. Tento biochemický skrining a v niektorých prípadoch tiež ultrazvukové vyšetrenie nie sú však dostatočne presné. Nevedú k zaručenému potvrdeniu prenatálnej diagnózy a vyžadujú ďalšie potvrdzujúce invazívne testy.

Vzhľadom k možnému riziku potratu pri invazívnej prenatálnej diagnostike a vzhľadom k nepresnosti biochemického skriningu existuje v celom svete záujem o nájdenie a vývoj alternatívnych metód pre zhromaždenie informácií o zdravotnom stave plodu. Objav fetálnych buniek a voľnej fetálnej DNA v materskej plazme a sére poskytuje neinvazívne získaný zdroj fetálneho genetického materiálu vhodného na prenatálnu analýzu. Týmto objavom sa ponúkajú dve možné alternatívne cesty neinvazívnej prenatálnej diagnostiky. Prvou je izolácia a využitie fetálnych buniek z materského krvného obehu, druhou priama analýza fetálnej DNA v materskej plazme. Avšak využitie fetálnych buniek pre rutinnú neinvazívnu prenatálnu diagnostiku brzdí

nutnosť vyvinúť lepšie praktické technológie na ich získanie z materského krvného obehu. V prípade voľnej fetálnej DNA zatiaľ chýbajú spoľahlivé fetálne markery umožňujúce detekciu fetálnej DNA na pozadí materskej.

Jedným z najväčších projektov zameraným na túto problematiku je spoločný projekt 5 amerických a 1 švajčiarskeho pracoviska pod názvom NIFTY (National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study), ktorý inicioval americký inštitút NIH (National Institute of Child Health and Development).

Základnou témou nášho výskumu je zavedenie neinvazívnej prenatálnej diagnostiky pohlavia plodu a stanovenie hladín voľnej fetálnej DNA a celkovej voľnej DNA v plazme tehotných žien. Taktiež je našim cieľom overenie možných kvantitatívnych odchýliek v hladinách voľnej fetálnej DNA v prípadoch rôznych nefyziologických tehotenstiev, ktoré by mohli slúžiť pre neinvazívnu prenatálnu diagnostiku.

2 Literárny prehľad

2.1 Invazívne procedúry prenatalnej diagnostiky

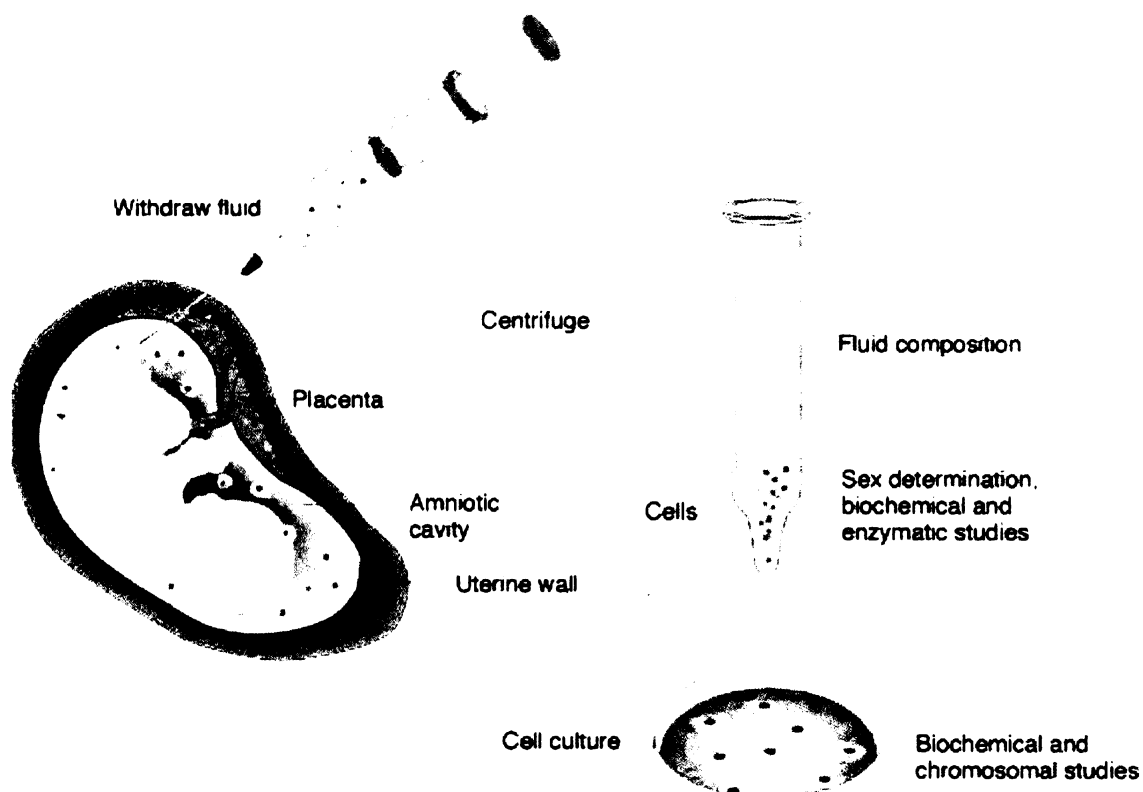
Vďaka biochemickému skríningu a ultrazukovým vyšetreniam je možné oveľa lepšie určiť skupinu tehotných žien so zvýšeným rizikom výskytu vrodenej vývojovej vady plodu. Každá takáto diagnóza však musí byť buď potvrdená alebo vyvrátená niektorou z vhodných invazívnych procedúr. Ide o celú paletu rôznych ultrazukom navádzaných odberových techník na získanie buniek pre fetálnu karyotypizáciu. Patrí sem odber choriových klkov (CVS), skorá amniocentéza, konvenčná amniocentéza, biopsia placenty (neskorý CVS) a odber fetálnej krvi. Tieto metódy sa líšia s ohľadom na gestačný vek, v ktorom sú vykonávané, s ohľadom na nevyhnutnú skúsenosť ich vykonávateľa, s ohľadom na čas, ktorý je potrebný k získaniu výsledkov, a s ohľadom na riziko pre plod. Napríklad CVS sa vykonáva skôr a taktiež poskytuje výsledky skôr než konvenčná amniocentéza. Druh procedúry sa volí v závislosti na individuálnom prípade. Musia sa brať do úvahy hore uvedené faktory, ale aj výška predbežného rizika chromozomálnych anomálií plodu.

2.1.1 Konvenčná amniocentéza

Pred viac než 30 rokmi sa v literatúre objavila prvá zmienka o detekcii chromozomálnych anomálií plodu karyotypizáciou buniek amniovej tekutiny. Spočiatku bola amniová tekutina získavaná tak povediac „na slepo“. V neskorých sedemdesiatych a skorých osemdesiatych rokoch minulého storočia bol odbornej verejnosti predstavený ultrazvuk. Najprv slúžil ako nástroj na detekciu ostrovčekov amniovej tekutiny bez placenty, aby sa presne určila optimálna strana vstupu. Kontinuálne bol vyvinutý ultrazvuk na navádzanie ihly a dodnes sa používa.

Procedúra sa zvyčajne vykonáva medzi 15. a 18. týždňom tehotenstva (Surbek a Holzgreve 2001). Ihla slúžiaca na odber približne 20 ml amniovej tekutiny je vsúvaná cez brušnú stenu pri nepretržitej vizualizácii jej špičky. Používa sa technika „free – hand“ alebo technika s vodiacou ihlou, ktorá je pripojená k ultrazukovému čidlu. Získané fetálne bunky sú kultivované približne 14 dní, po ktorých je stanovovaný karyotyp plodu. Aj napriek ultrazukovému navádzaniu je kedykoľvek možné nechcené zavedenie ihly cez placentu.

Riziko potratu spojené s procedúrou amniocentézy je vyššie približne o 1 % v porovnaní s prípadmi bez procedúry. Dlhodobé štúdie sledujúce novorodencov po amniocentéze neukázali žiadne abnormality okrem zvýšeného rizika hemolytickej poruchy v dôsledku izoimunizácie. Riziko straty plodu sa zvyšuje s počtom vykonaných amniocentéz.



Obr. č 1: Amniocentéza

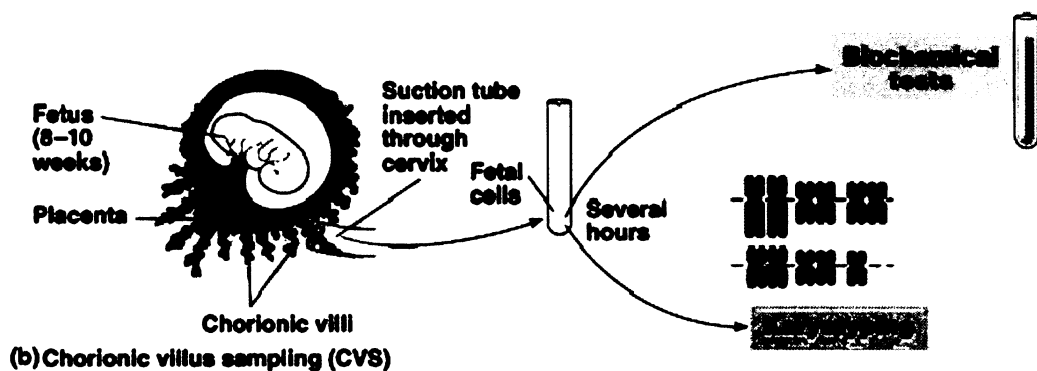
(Zdroj: www.biotechnolog.pl/artykul-199.htm)

2.1.2 Odber choriových klkov

Odber choriových klkov (CVS) bol vyvinutý ako alternatíva amniocentézy. Je vykonávaný počas tehotenstva omnoho skôr, už medzi 11. a 14. týždňom a má výhodu v tom, že je možné získať viac buniek vhodných na analýzu (Surbek a Holzgreve 2001). Preto je možná rýchla karyotypizácia konvenčnými cytogenetickými metódami.

Výsledky testu sú pacientke dostupné skôr, v priebehu 10 – 14 dní, zvyčajne ešte stále v prvom trimestri. Odber choriových klkov môže byť preto akceptovateľnejší než amniocentéza pre ženy podstupujúce invazívne testovanie pre karyotypizáciu plodu, zvlášť pri vysokom riziku chromozomálnych anomálií. S ohľadom na riziko spojené s ukončením tehotenstva pre matku a psychologické dôsledky, skoršia diagnóza sa zdá byť vhodnejšia. Mnohé štúdie taktiež potvrdili, že tehotné ženy uprednostňujú prvotrimestrálny odber choriových klkov v porovnaní s medzitrimestrovou amniocentézou. Riziká spojené s oboma procedúrami sú zhodné. Navyše, choriové klky sú vynikajúcim zdrojom pre analýzu fetálnej DNA, ktorá je potrebná pre prenatálnu diagnostiku porúch jediného génu alebo pre biochemické analýzy, ktoré sú používané na diagnostiku niektorých metabolických porúch kde je známy prislúchajúci genetický defekt.

Rozšírené použitie si našli dve rôzne metódy CVS, transcervikálna a transabdominálna. Typ metódy je použitý v závislosti na polohe placenty a maternice. Avšak v dnešnej dobe je už transcervikálna metóda prekonaná a nepoužíva sa. Pri transabdominálnej metóde je 18 – 20 jednotková ihla vsunutá transabdominálne cez stenu maternice priamo do placenty. Tkanivo placenty je získané nasávaním. Zhodne s amniocentézou môže byť použitá technika „free – hand“ alebo vodiaca ihla pripojená k ultrazvukovému čidlu.



Obr. č.2: Odber choriových klkov

(Zdroj: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/mendel/heredity.htm>)

Pri porovnávaní miery straty plodu medzi CVS a amniocentézou sú výsledky zhodné, u najvyšších hodnôt okolo 1 percenta. Riziko s ohľadom na vykonávaný smer sa zdá byť zhodné pri oboch technikách. Avšak techniky CVS si vyžadujú väčšiu skúsenosť vykonávateľa.

So skorým odberom choriových klkov (pred 11. týždňom tehotenstva) sú spojené rozsiahle priečne abnormality končatín. Typ deformácie je kompatibilný s chronologickým vzorom vývoja končatiny, čo naznačuje, že mechanizmy ako s procedúrou spojená hypoperfúzia alebo embolizácia sa môžu podieľať na patogenézi. Vývoj končatiny je v podstate kompletný v 10. týždni tehotenstva. Je preto nutné, aby CVS nebol vykonávaný pred touto časovou periódou.

Pri porovnávaní, či je vhodnejšie použiť CVS alebo konvenčnú amniocentézu musí byť vzaté do úvahy, že amniová tekutina môže byť použitá na analýzu koncentrácie α – fetoproteínu, ktorá je zvýšená u plodov so *spina bifida*, *encephalocele* alebo *gastroschisis*. *Spina bifida* a *encephalocele* nie je možné zistiť pomocou použitia CVS. Avšak dnes je možné tieto deformácie diagnostikovať v mnohých prípadoch výhradne použitím ultrazvuku s vyššou rozlišovacou schopnosťou, takže nutné použitie práve amniocentézy odpadá. Na druhej strane CVS kladie vyššie nároky na presnosť odberu materiálu, pretože môže poskytnúť falošne negatívne výsledky už pri nepatrnej kontaminácii bunkami matky. Pri tejto kontaminácii môže CVS odhaliť bunky s rôznym karyotypom, tzv. mozaicizmus. Objavuje sa približne v 1 % prípadov. V týchto prípadoch je preto nevyhnutné potvrdiť alebo vylúčiť mozaicizmus plodu detailnejším ultrazvukovým vyšetrením, odberom fetálnej krvi alebo amniocentézou.

2.1.3 Placentálna biopsia (neskorý CVS)

Rýchla karyotypizácia konvenčnými cytogenetickými analýzami z choriových klkov nemusí byť obmedzená len na prvý trimester. Aj keď mitotický index cytotrofoblastov klesá so stúpajúcou dobou tehotenstva, karyotypizácia spojená s kultivačnými technikami je stále výhodná. Hlavným dôvodom pre použitie tejto metódy sú podozrivé ultrazvukové nálezy prislúchajúce chromozomálnym anomáliám. Placentálna biopsia môže byť vykonávaná aj v treťom trimestri, až do konca tehotenstva. Používa sa ako alternatíva k odberu fetálnej krvi a zvyčajne je, v závislosti na pozícii placenty, technicky jednoduchšia.

Biopsia placenty je vykonávaná v transabdominálnom smere rovnakou technikou ako pri odbere choriových klkov. Používa sa 20–ednotková ihla s alebo bez vodiacej ihly. Riziko straty plodu je odhadované okolo 1 % prípadov.

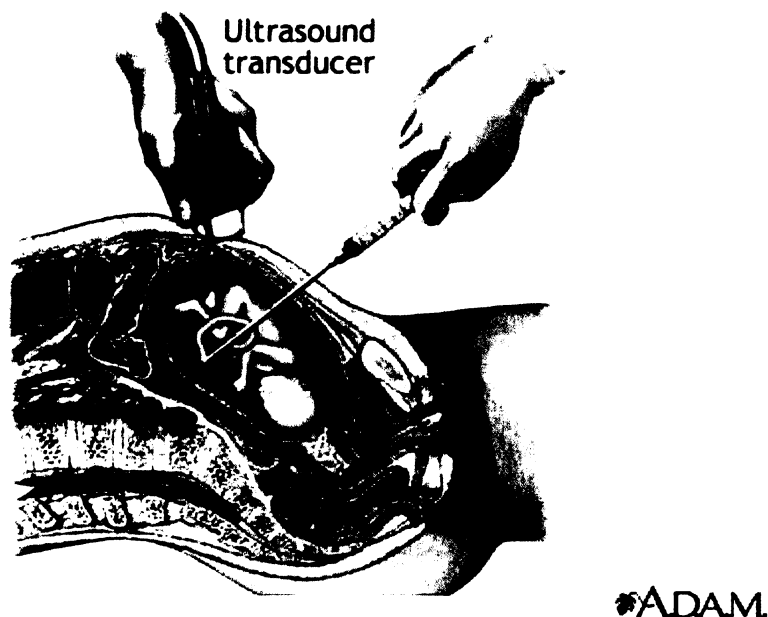
2.1.4 Skorá amniocentéza

V neskorých osemdesiatych rokoch minulého storočia bola predstavená skorá amniocentéza s cieľom poskytnúť nástroj pre skorú karyotypizáciu plodu pred 14. týždňom tehotenstva. Pri tejto procedúre je amniová tekutina získavaná rovnakým spôsobom ako pri konvenčnej amniocentéze, za použitia 20- až 22-jednotkovej ihly. Avšak amniový vak je v tejto gestačnej dobe stále veľmi malý, kvôli čomu bolo vznesených mnoho obáv o možných dôsledkoch odňatia takého množstva amniovej tekutiny, ktoré by bolo potrebné pre vypestovanie úspešnej bunkovej kultúry.

Pri porovnávaní odberu choriových klkov so skorou amniocentézou sa zistil častejší výskyt straty plodu a taktiež konskej nohy (*talipes equinovarus*) u novorodencov po podstúpení skorej amniocentézy. Porovnávacia štúdia skorej a konvenčnej amniocentézy odhalila, že miera straty plodu, unikanie amniovej tekutiny po procedúre ako aj výskyt *talipes equinovarus* je vyššia po skorej amniocentéze (11. - 13. týždeň) v porovnaní s druhotrimestrovou (15. – 17. týždeň) amniocentézou (Surbek a Holzgreve 2001).

2.1.5 Odber fetálnej krvi (kordocentéza)

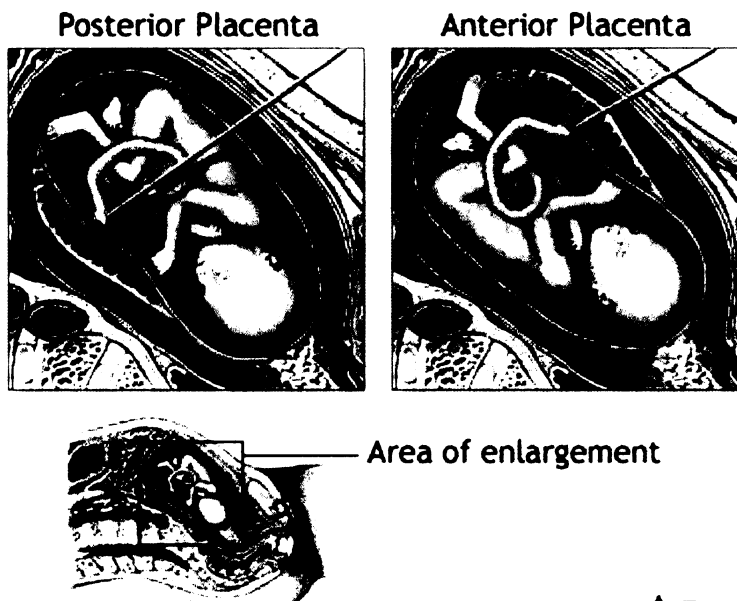
Odber fetálnej krvi sa vykonáva ak konvenčná amniocentéza a odber choriových klkov neposkytujú adekvátne informácie o zdravotnom stave plodu. Pomocou vzorky fetálnej krvi je okrem chromozomálnych anomálií možné diagnostikovať poruchy ako hemofília, anémia, metabolické poruchy, infekcie ako toxoplazmóza alebo rubeola a niektoré prípady štruktúrnych problémov alebo vnútromaternicové rastové obmedzenie. Fetálna krv môže byť taktiež použitá na meranie hladiny krvného kyslíka a testovanie červených krviniek na materské Rh protilátky. V nevyhnutnom prípade môžu byť cez použitú ihlu podávané lieky alebo krvná transfúzia.



Obr. č.3: Odber fetálnej krvi

(Zdroj: www.shands.org/health/pregnancy/stayhealthy/presentations/pubspre3.html)

Procedúra odberu fetálnej krvi je podobná amniocentéze. Za použitia ultrazvukového navádzania je cez brušnú stenu a maternicu vsunutá 20 až 22 jednotková ihla. Zdrojom fetálnej krvi môže byť krvná cieva pupočnej šnúry, zvyčajne v mieste kde vstupuje do placenty a je najmenej mobilná, ale taktiež aj krvná cieva v pečeni alebo srdci. Procedúra môže byť vykonávaná buď transplacentárne alebo transamnioticky, v závislosti na pozícii placenty v maternici a na mieste, v ktorom sa pupočná šnúra napája na placentu. Ak je placenta pripojená k prednej strane maternice (anteriórna placenta), ihla môže byť vsunutá priamo do cievy pupočnej šnúry bez zasahovania do amnionového vaku. Ak je však placenta pripojená k zadnej strane maternice (posteriórna placenta), ihla musí prejsť cez amnionový vak. To môže spôsobiť prípadné krvácanie alebo kŕče.



Obr. č. 4: Dve možné techniky odberu fetálnej krvi v závislosti na polohe placenty
(Zdroj: www.shands.org/health/pregnancy/stayhealthy/presentations/pubspre3.html)

Fetálna krv sa odoberá približne v 20. až 23. týždni, nie však skôr ako v 18. týždni, pretože krvné cievy pupočnej šnúry sú ešte veľmi jemné (Surbek a Holzgreve 2001). Po zákroku musí byť činnosť srdca plodu monitorovaná ešte niekoľko hodín. Riziko odberu fetálnej krvi závisí na dôvode, pre ktorý je zákrok vykonávaný. Pri štruktúrne normálnych plodoch je riziko straty plodu 1 až 2 %. Avšak riziko ostro stúpa ak je odber vykonávaný u rastovo obmedzených alebo abnormálnych plodov.

Do dnešného dňa pretrvávajú invazívne procedúry ako jediná možnosť definitívne diagnostikovať alebo vylúčiť chromozomálne poruchy a genetické anomálie. Aj napriek všetkým snahám zostáva riziko straty plodu okolo 0,5 - 1 % spodnou hranicou nutnou na získanie diagnózy. Práve preto je ohromná snaha o vývoj techník pre neinvazívnu diagnostiku chromozomálnych a genetických anomálií s vysokou presnosťou. Jednou z nádejných možností pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku je využitie fetálnych buniek a voľnej fetálnej DNA v krvnom obehú matky.

2.2 História objavu fetálnej DNA a fetálnych buniek v krvnom obehú matky

Nukleové kyseliny po prvýkrát popisali v ľudskej krvnej plazme v roku 1948 Mandel a Métais; DNA a RNA objavili v plazme normálnych zdravých jedincov ako aj u jedincov s rôznymi chorobami, taktiež v plazme tehotných žien (Lo 2001). To všetko len pár rokov po objavení dedičnej podstaty DNA. Tento objav dokonca predstihol objav Watsona a Cricka o dvojšrubovicovej štruktúre DNA. V tej dobe však nevzbudil žiadny záujem a táto práca o nukleových kyselinách v plazme a sére bola zabudnutá. Výskum cirkulujúcej DNA pokračoval až v roku 1966 s objavením vysokých hladín DNA v sére pacientov so *systemic lupus erythematosus* (SLE) (Anker a Stroun 2001, Lo 2001).

V sedemdesiatych rokoch 20. storočia sa zistilo, že pacienti s rakovinou majú tendenciu k vyšším hladinám cirkulujúcej DNA než pacienti s nemalígnymi ochoreniami. U pacientov s metastázami bolo nájdené významne vyššie množstvo DNA ako u pacientov s lokalizovanou chorobou (Leon 1977), pričom hladina DNA v plazme pacientov po začatí liečby postupne klesá až o 90 %. Množstvo cirkulujúcej DNA je úzko späté s prognózou. Uvažovalo sa o tom, či je cirkulujúca DNA uvoľňovaná z aktivovaných lymfocytov reagujúcim voči chorobe alebo je uvoľňovaná priamo zo samotných nádorových buniek. Pri riešení problému sa využili rozdiely vo vlastnostiach malígných a normálnych buniek. Rok 1989 priniesol zistenie, že plazmatická DNA pacientov s rakovinou zdieľa niektoré biofyzikálne vlastnosti, ako napríklad klesajúcu stabilitu reťazca, s DNA rakovinových buniek a je teda nádorového pôvodu. Tento pôvod bol potvrdený v roku 1994 štúdiou mutácií onkogénov v plazme pacientov s myelodysplastickým syndrómom, akútnou myeloidnou leukémiou a rakovinou pankreasu. Cirkulujúca DNA v plazme pacientov s rakovinou otvára nové možnosti detekcie a monitorovania ochorenia.

Zvýšené hladiny cirkulujúcej nádorovej DNA vzbudili pozornosť a poukázali na možnosť výskytu cirkulujúcej DNA aj pri iných klinických aspektoch. Vlastnosti podobné malígnemu nádoru má rapídne rastúci plod a placenta. Pre svoju podobnosť s nádorom je placenta dokonca niekedy nazývaná „pseudomalígna“. Práve táto podobnosť naznačila, že tak ako môže byť nádorová DNA nájdená v cirkulácii pacientov s rakovinou, môže byť **fetálna DNA** nájdená v krvnej plazme tehotných žien.

Prvá zmienka o prítomnosti **fetálnych buniek**, ktoré prekročili placentálnu bariéru a vstúpili do materskej cirkulácie krvi pochádza už z roku 1893. Nemecký patológ Schmorl objavil fetálne trofoblasty v pľúcach žien, ktoré zomreli na eklampsii (Holzgreve *et al.* 2001). Trofoblasty, avšak cirkulujúce, objavil aj Douglas v roku 1959.

„Moderná éra“ izolácie fetálnych buniek z materskej krvi začala v roku 1969 kedy Walknowska po prvýkrát detekovala fetálne lymfocyty nesúce X a Y chromozómy v periférnej krvi tehotných žien s plodom mužského pohlavia (Bianchi a Lo 2001). V neskorých sedemdesiatych a skorých osemdesiatych rokoch 20. storočia použil Herzenberg a jeho spolupracovníci na detekciu a izoláciu fetálnych buniek v tej dobe novú techniku triedenia buniek s využitím fluorescencie (FACS - fluorescence-activated cell sorting). Presvedčivý dôkaz o existencii fetálnych buniek v materskej krvi prinieslo v roku 1990 použitie molekulárnych metód na detekciu unikátnych amplifikovaných fetálnych DNA sekvencií z bunkových komponentov v krvi tehotných žien. V materskej krvi boli taktiež nájdené fetálne erytroblasty použitím FACS „obohacovacích“ techník, identifikované pomocou sekvencie na Y chromozóme.

Schopnosť získať fetálne jadrové červené krvinky (FNRBCs - fetal nucleated red blood cells) pomocou metódy FACS viedla k myšlienke spojiť túto techniku s fluorescenčnou hybridizáciou *in situ* (FISH) s využitím špecifických chromozomálnych prôb na identifikáciu fetálnych aneuploidií (Bianchi *et al.* 1992). Pomocou FISH boli taktiež identifikované fetálne trofoblasty u XXY plodu.

Ďalšou „obohacovacou“ technikou vhodnou na získanie FNRBCs ako aj trofoblastov sa stala MACS (magnetic-activated cell sorting). Ťažkosti s protilátkami trofoblastov viedli na dlhšiu dobu k zameraniu výskumu na FNRBC.

2.3 Fetálne bunky v krvnom obehu matky

Dlho zaužívané teórie o placente ako nepriepustnej bariére sa zdajú byť nesprávne, čo naznačuje obojsmerný prenos jadrových buniek medzi plodom a materskou krvou počas tehotenstva. Získanie fetálnych buniek z materskej krvi je alternatívnym, sľubným zdrojom fetálneho materiálu pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku.

Fetálne bunky sa v krvnom obehú matky začínajú objavovať už v skorom štádiu tehotenstva, ich množstvo je však premenlivé a závisí na konkrétnom týždni a priebehu tehotenstva. V materskej periférnej krvi sa podarilo objaviť v nízkych koncentráciách fetálne bunky ako trofoblasty, lymfocyty, granulocyty, leukocyty, fetálne jadrové erytroblasty a hemopoetické progenitorové bunky. Väčšina týchto buniek je z materskej krvi odstránená počas niekoľkých týždňov, ale niektoré subpopulácie prežívajú aj niekoľko desiatok rokov.

Perzistujúce fetálne bunky osídľujú materské tkanivá. Jednou z možných hypotéz, z akého dôvodu k tomu dochádza je, že embryo si takýmto spôsobom zabezpečuje ochranu pred imunitným systémom matky. To, že fetálne bunky môžu prežívať a zahniezdiť sa v matkinom tele, môžu čiastočne vysvetľovať vlastnosti imunitného systému. Počas tehotenstva je imunitný systém matky výrazne imunosupresovaný, nerozlišuje ani tak medzi niečím vlastným a cudzím ako medzi bezpečným a nebezpečným. Plod vysiela dostatočne veľké množstvo fetálnych buniek nato, aby neboli imunitným systémom matky rozpoznávané ako cudzie a nebezpečné. Pri presiahnutí určitej hladiny majú však pravdepodobne vplyv na rozvinutie autoimunitných ochorení u matky mechanizmom reakcie štepu proti hostiteľovi. Avšak ak plod vyšle nedostatočné množstvo fetálnych buniek, môže to spôsobiť odhojenie plodu. Nedostatočný mikrochimérizmus je vo viac než 50 % prípadov zodpovedný za odhojenie plodu. Multipotentnosť fetálnych buniek osídľujúcich matkino telo ich predurčuje k regeneračným úlohám v širokom spektre materských tkanív. Je teda možné, že fetálne bunky zahniezdené v nejakom orgáne matky, majú schopnosť „opravovať“ ho, tj. diferencovať sa a nahradiť matkine poškodené bunky. Čím viac tehotenstiev, spontánnych potratov a interupcií má matka za sebou, tým viac klonov fetálnych buniek sa v nej môže nachádzať.

2.3.1 Fetálne trofoblasty

Fetálne trofoblasty sa objavujú už veľmi skoro počas tehotenstva, avšak nie u všetkých žien. Pochádzajú z placenty, odkiaľ sa dostávajú do krvného obehu matky. Trofoblast sa začína tvoriť už niekoľko dní po oplodnení, čo umožňuje skorú detekciu trofoblastov. Od tretieho týždňa sa trofoblasty formujú v placentárne klky. Trofoblast sa skladá z vnútornej vrstvy cytotrofoblastu, ktorá je zložená z jednotlivých buniek a zo silnejšej vrstvy syncytiotrofoblastu. Bunky syncytiotrofoblastu sú po vhodnom spôsobe vizualizácie ľahko detekovateľné v materskej krvi na základe ich špecifickej morfológie. Práve ich mnohoadrovosť spôsobuje ich nevhodnosť pre analýzu. Trofoblasty sa vychytávajú a rýchlo degradujú v pľúcnom krvnom obehu matky. Taktiež sú znevýhodňované ich placentárnym pôvodom. Vyskytuje sa u nich v 1 % chromozomálny mozaicizmus, a tak diagnózy založené na týchto bunkách nemusia vždy odrážať embryonálny karyotyp. Napriek všetkým týmto negatívam majú veľký potenciál pri využití v neinvazívnej prenatalnej diagnostike.

2.3.2 Lymfoidné progenitorové bunky

Lymfoidné progenitorové bunky sú taktiež nevhodné pre prenatalnú diagnostiku, pretože sú schopné po pôrode pretrvávajú v tele matky aj desaťročia (v potvrdenom konkrétnom prípade až 27 rokov) (Bianchi *et al.* 1996) a tak znemožňujú karyotypizáciu plodu z ďalšieho tehotenstva. Tieto perzistujúce bunky osídľujú materské tkanivá a bol potvrdený ich patogenetický efekt na rozvoj autoimunitných chorôb ako sú napríklad reumatoidná artritída alebo systémová skleróza. Dodnes však nie je jasné prečo tieto fetálne bunky perzistujú v telách niektorých žien a vytvárajú tak mikrochimerický stav, zatiaľ čo u iných žien sa nenachádzajú. Mikrochimerické fetálne bunky sú semialelické k materskému imunitnému systému a je možné, že ženy, ktoré majú HLA-kompatibilný plod majú viac perzistujúcich mikrochimerických buniek než v prípade HLA-nekompatibilného plodu. Avšak aj bez uvažovania kompatibility medzi matkou a plodom bolo demonštrované, že niektoré HLA haplotypy sú oveľa silnejšie asociované s mikrochimerizmom spôsobeným fetálnymi bunkami (Khosrotehrani *et al.* 2003).

2.3.3 Fetálne erytroblasty

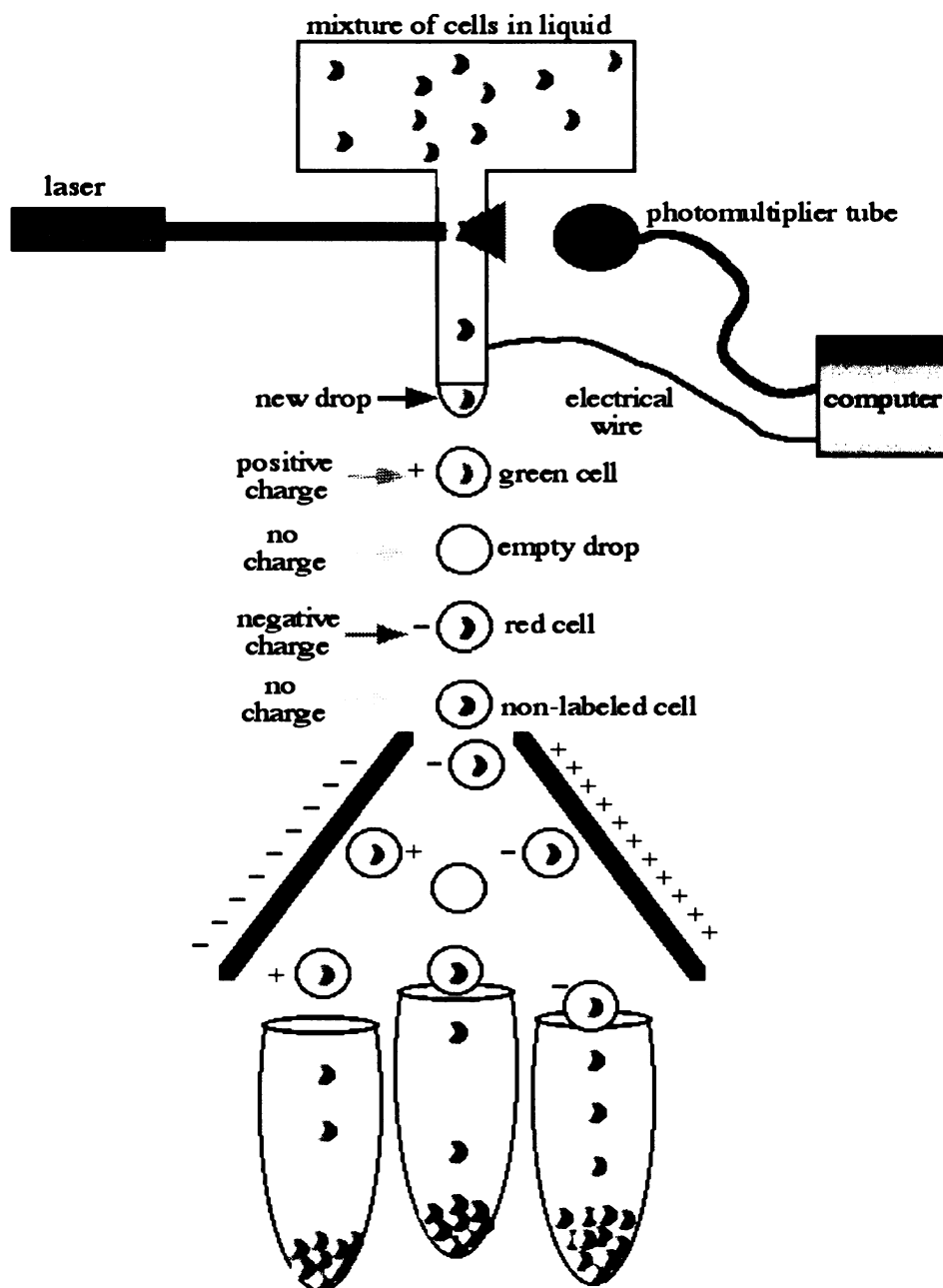
Za hlavného kandidáta na diagnostickú analýzu z fetálnych buniek sú považované fetálne jadrové červené krvinky (FNRBCs). Sú to bunky s kompletným jadrovým genomom. Ďalšou výhodou oproti trofoblastom a lymfocytom okrem jednojadrovosti je ich krátky polčas života a limitovaná replikačná kapacita. V krvi matky sa vyskytujú ešte 3 mesiace po pôrode, neskôr už detegované neboli. Týmto odpadá riziko získania buniek z predchádzajúceho tehotenstva. Do materskej cirkulácie prechádzajú už počas 4. – 5. týždňa gravidity. Majú charakteristický tvar a vyskytujú sa vo všetkých tehotenstvách. U dospelého, zdravého človeka sa normálne vyskytujú v kostnej dreni. Do periférnej krvi sa ich spolu s bezjadrovými erytrocytmi dostane iba malé množstvo, ale sú hojné u časného plodu. Tehotenstvo však kladie na organizmus matky vysoké nároky, zvyšuje sa krvotvorba a do krvi sa dostávajú aj nezrelé erytroblasty. Pri získaní erytroblastov pre karyotypizáciu je nutné zistiť akého sú pôvodu – materského alebo fetálneho, pretože fetálne erytroblasty tvoria iba zlomok z ich celkového množstva. Frekvencia ich výskytu je 1 z 10^6 až 1 z 10^7 materských jadrových buniek (Holzgreve *et al.* 2001). FNRBCs exprimujú niekoľko unikátnych antigénov ako sú transferínový receptor (CD71), erytropoetínový receptor, trombospondinový receptor (CD36), glykoforín A (GYP A; lokus pre krvnú skupinu MN), fetálne pečeneňové povrchové antigény, antigény HLA, ktoré umožňujú získanie buniek z materského krvného obehu. Najpoužívanejším bunkovým povrchovým antigénom na selekciu fetálnych buniek z materskej cirkulácie je transferínový receptor (CD71). Avšak protilátky anti-CD71 sa viažu aj na iné fetálne jadrové bunky a taktiež aj na zrelé bunky. Využitie monoklonálnych protilátok proti epsilon-globinu (embryonálny hemoglobín sa skladá z globinových reťazcov epsilon a zeta) prinieslo sľubné výsledky v identifikácii FNRBCs do 12. týždňa gravidity. Neskôr je možné použiť monoklonálne protilátky proti gama-globinu (fetálny hemoglobín sa skladá z globinových reťazcov alfa a gama).

2.4 Metódy izolácie fetálnych buniek z krvného obehu matky

Objav fetálnej DNA v krvnom obehu matky vnáša nové svetlo do problematiky neinvazívnej prenatalnej diagnostiky. Je snaha o zavedenie metód, ktoré by umožnili amplifikáciu celého fetálneho genómu z niekoľko málo buniek alebo dokonca na báze jednej jedinej fetálnej bunky získanej z maternálneho krvného obehu. Tieto metódy sa však stretávajú s množstvom problémov. Jedným z nich je pomerne zložitý a pracný záchyt fetálnych buniek, ďalším potom veľmi nízka koncentrácia týchto buniek. Jedna takáto fetálna bunka pripadá na 10^6 až 10^7 materských jadrových buniek. Táto nízka frekvencia výskytu neumožňuje detekciu fetálnych alel pomocou senzitívnych molekulárno-genetických metód ako PCR alebo FISH. Jedným z riešení je využitie tzv. „obohacovacích“ metód. Ide o „obohatenie“ fetálnej frakcie využitím špecifických protilátok proti povrchovým antigénom buniek plodu. V súčasnej dobe sú dvoma najviac rozšírenými technológiami na vychytávanie fetálnych buniek z materskej cirkulácie fluorescenčne aktivované triedenie buniek (FACS- fluorescent activated cell sorting) a jeho magnetický ekvivalent, magnetická separácia buniek (MACS - magnetic-activated cell sorting). Obe technológie sú založené na interakcii špecifických monoklonálnych protilátok s cieľovou bunkou. Pri vývoji oboch metód sa vychádzalo z prietokovej cytometrie.

2.4.1 Fluorescenčne aktivované triedenie buniek – FACS

Pri použití metódy FACS sú špecifické monoklonálne protilátky označené fluorescenčným farbivom a naviazané na bunky. Najčastejšie používanými monoklonálnymi protilátkami sú protilátky proti povrchovým bunkovým antigénom CD71 (transferínový receptor), ktoré sú vysoko exprimované na erytroblastoch.



Obr. č.5: Fluorescenčne aktivované triedenie buniek – FACS

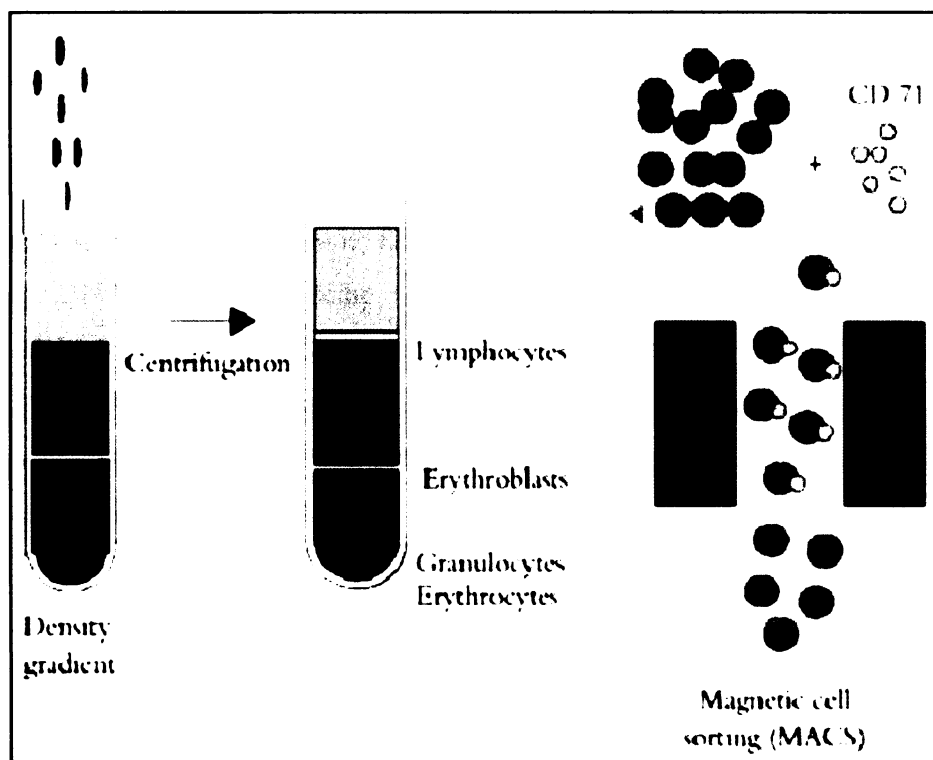
(Zdoj: www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/method/FACS.html)

Bunky v suspenzii sa potom nechajú pretekať úzkou kyvetou malým prúdom. Kyveta sa nechá vibrovať v optimálnej frekvencii, ktorá umožní tvorbu kvapiek udržovaných vo vhodnej vzdialenosti od stien kyvety. Pri prechode kyvetou sú bunky skenované laserom. Laserový lúč excituje použité fluorescenčné farbivo, optické signály sú zachycované u každej častice a podľa týchto signálov sú častice analyzované. Umožňuje to zistiť počet buniek ale taktiež ich veľkosť. Ak od seba chceme rozlíšiť rôzne subpopulácie buniek, ku každej musíme naviazať pre ňu špecifickú monoklonálnu

protilátku s naviazaným rôznym fluorescenčným farbivom. Finálny krok delenia buniek je prevádzaný na základe elektrického náboja. Po prejení kvetou a pri vytváraní finálnej kvapky obsahujúcej danú bunku, sa na základe zistenej fluorescence prideli každej kvapke elektrický náboj. Na základe elektrostatickej príťažlivosti sú potom jednotlivé kvapky vychytávané na elektródach. Kvapkám, ktoré neobsahujú žiadnu bunku, alebo bunku neoznačenú fluorescenčným farbivom nie je pridelený žiadny náboj a sú odstránené do odpadovej nádoby.

2.4.2 Magnetická separácia buniek - MACS

Triedenie buniek pomocou metódy MACS využíva taktiež monoklonálne protilátky, ktoré však nie sú značené fluorescenčne, ale sú konjugované s mikromagnetickými časticami. Separácia takto označených častíc je založená na magnetickom vychytávaní. Nenaviazané bunky sú odstraňované niekoľkými premývacími krokmi.



Obr. č.6: Magnetická separácia buniek – MACS

(Zdoj: www.biotechnolog.pl/artukul-199.htm)

2.5 Voľná fetálna DNA v krvnom obehu matky

Veľmi obmedzené množstvo fetálnych buniek v materskom krvnom obehu a veľmi náročné metódy ich získavania viedli k hľadaniu alternatívneho, neinvazívneho zdroja fetálneho genetického materiálu na účely prenatalnej diagnostiky. S objavením voľnej cirkulujúcej fetálnej DNA v materskej cirkulácii krvi sa výskum vydal aj týmto smerom.

Prvý dôkaz o prítomnosti fetálnej DNA v materskej plazme a sére bol podaný v roku 1997, a to využitím Y sekvencie plodu ako markeru pre fetálnu DNA (Lo *et al.* 1997). Pohlavie dieťaťa na základe detekcie Y chromozómu je možné spoľahlivo určiť už v 5. týždni tehotenstva (Rijnders *et al.* 2003). Myšlienku o možnosti nájdenia fetálnej DNA v materskej plazme podnietil objav tumorovej DNA v krvnom obehu pacientov s rakovinou a podobnosť placenty malígnemu nádoru. Materská plazma ako bezbunečná frakcia bola do tej doby odstraňovaná bez povšimnutia pri hľadaní fetálnych buniek. Analýzou Y sekvencie plodu bola v materskej plazme preukázaná vysoká koncentrácia fetálnej DNA. Tá sa v priemere pohybuje od 3,4 % v skorom štádiu tehotenstva, až po 6,2 % v treťom trimestri z celkovej voľnej DNA v krvnej plazme tehotnej (Lo *et al.* 1998). V prípade materského séra je koncentrácia fetálnej DNA nižšia. Na začiatku tehotenstva to je priemerne približne 0,13 %, ku koncu tehotenstva 1 %. Hlavným rozdielom v koncentráciách fetálnej DNA v materskej plazme a sére je väčšie množstvo materskej DNA tvoriace pozadie v krvnom sére na rozdiel od krvnej plazmy. Koncentrácia voľnej fetálnej DNA v materskej plazme je ďaleko vyššia než v prípade jadrových fetálnych buniek v materskej krvi a rastie s dĺžkou tehotenstva s ostrým nárastom v treťom trimestri, približne 8 týždňov pred pôrodom. Predpokladá sa, že tento ostrý nárast môže byť spojený s fyziologickým procesom asociovaným s nadchádzajúcim pôrodom.

Perzistencia fetálnych jadrových buniek aj po pôrode viedla k štúdiu či je možné pozorovať podobný fenomén aj u voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme či sére. Tieto štúdie preukázali, že fetálna DNA je odstraňovaná z materskej plazmy veľmi rapídne, s polčasom v minútach. Priemerný polčas života bol stanovený na 16,3 min, pričom vo väčšine prípadov kolíše v rozmedzí 4 až 30 minút. Dve hodiny po pôrode už v materskej plazme nebola detegovaná žiadna fetálna DNA (Lo *et al.* 1999). Rýchle odstraňovanie umožňuje analýzu fetálnej DNA z maternálnej plazmy bez možných

komplikácií spôsobených jej perzistenciou z predchádzajúceho tehotenstva. Falošne pozitívne výsledky spôsobené perzistenciou sú teda nepravdepodobné. Odhliadnúc od diagnostického významu tohto pozorovania, tieto dáta taktiež vznášajú otázky s ohľadom na možné orgánové sústavy, ktoré sú zodpovedné za rapídne odstránenie cirkulujúcej fetálnej DNA. Súčasné výsledky naznačujú, že fetálna DNA môže prechádzať glomerulom a následne byť detekovateľná v materskom moči. Obličky tak majú potenciálne veľký význam pri odstraňovaní fetálnej DNA z materskej plazmy.

2.5.1 Pôvod voľnej fetálnej DNA

Kľúčovou otázkou od objavenia cirkulujúcej fetálnej DNA, ktorá zostáva dodnes nezodpovedaná, je tkanivo, z ktorého fetálna DNA pochádza. Aj keď pôvod nie je doložený žiadnou štúdiou, teoreticky sa predpokladá, že hlavným zdrojom genetického materiálu, ktorý sa uvoľňuje do krvného obehu matky je placenta. Súčasné práce taktiež podporujú názor, že ďalšími prispievateľmi fetálnych sekvencií v materskej plazme a sére sú fetálne hemopoetické bunky a fetálno-placentálne membrány (Wataganara a Bianchi 2004). Taktiež však boli navrhnuté ďalšie potenciálne zdroje cirkulujúcej fetálnej DNA. Zahrňujú priamy prenos molekúl DNA cez orgány podstupujúce apoptózu s priamym kontaktom s amniovou tekutinou (ako napríklad fetálne pľúca) alebo priamy prenos molekúl DNA z fetálnych obličiek. Je tiež možné, že táto extracelulárna fetálna DNA pochádza z viac než jedného zdrojového tkaniva. Každá z týchto teórií pôvodu fetálnej DNA má svojich zástancov.

Pre platnosť teórie, že cirkulujúca fetálna DNA pochádza z fetálnych hemopoetických buniek svedčí fakt, že sa v krvnom obehu tehotných žien nachádzajú spoločne. Obrovské množstvo fetálnych buniek v materskej krvnej plazme, od 43 % (Bianchi 2004) až takmer 95 %, podstupuje apoptózu (Kolialexi *et al.* 2004a). Tieto výsledky boli demonštrované na základe TUNEL farbenia (terminal UTP nuclear end labeling). Bunky sú v neskorom apoptotickom štádiu, vykazujúce jadrovú fragmentáciu a/alebo formujú apoptotické telieska. Ostatné bunky vykazujú morfológické znaky skorej apoptózy. Len veľmi malé množstvo buniek podstupuje nekrózu. Tieto poznatky naznačujú, že mnoho fetálnych buniek prekračujúcich fetomaternálne rozhranie ochotne a rýchlo podstupujú programovanú bunkovú smrť a z tohto dôvodu môžu slúžiť ako doručovatelia genetického materiálu do materského krvného obehu. Voľná fetálna DNA môže vznikáť interakciou medzi apoptotickými fetálnymi bunkami a maternálnym

imunitným systémom. Fetálna DNA je takto chránená v apoptotických telieskach alebo naviazaná na nukleozómoch. Taktiež množstvo fetálnych buniek aj voľnej fetálnej DNA je simultánne zvýšené pri určitých komplikáciách tehotenstva ako napríklad preeklampsia alebo trizómia 21. chromozómu. Všetky tieto poznatky vedú k tomu, že hematopoetické bunky môžu prispievať k celkovému poolu fetálnych nukleových kyselín v materskom krvnom obehu. Taktiež sa však objavujú názory, že voľná fetálna DNA z hematopoetických buniek nepochádza. Svedčí o tom fakt, že hoci je množstvo cirkulujúcich fetálnych erytroblastov a aj množstvo voľnej fetálnej DNA zvýšené u tehotných žien trpiacich preeklampiou, nebola stanovená žiadna numerická korelácia medzi týmito dvoma fetálnymi komponentami. Korelácia medzi fetálnymi bunkami a voľnou fetálnou DNA nebola pozorovaná ani u normálnych tehotenstiev. Ak by dezintegrácia fetálnych buniek prispievala *in vivo* k poolu voľnej fetálnej DNA, tak bunkový rozklad *in vitro* závislý na čase, ktorý vzorka strávi v skúmavke pred spracovaním, by taktiež mal podobne viesť k zvýšeniu hladín fetálnej DNA. Táto hypotéza však bola vyvrátená experimentom, ktorý ukázal, že hladina fetálnej DNA v materskej plazme ostáva nezmenená ani po 24 hodinách po odobratí vzorky (Angert *et al.* 2003). Ďalším faktom svedčiacim proti pôvodu fetálnej DNA z intaktných fetálnych buniek je ich množstvo. V materskej krvi sa nachádzajú veľmi zriedkavo a je nepravdepodobné, že by toto malé množstvo fetálnych hematopoetických buniek zabezpečovalo ešte aj obrat voľnej fetálnej DNA v materskej cirkulácii.

Ďalší názor presadzuje za hlavný zdroj voľnej fetálnej DNA placentu. Placenta je logickým zdrojom cirkulujúcej fetálnej DNA vďaka jej veľkosti a bohatému deleniu buniek. Mnoho štúdií ukazuje, že existuje vzťah medzi množstvom fetálnej cirkulujúcej DNA a postupujúcim gestačným vekom. Vierohodným dôkazom, že placenta je prevládajúcim zdrojom je kinetika fetálnej DNA. Voľná fetálna DNA sa z materskej cirkulácie rapídne stráca po pôrode na rozdiel od intaktných fetálnych buniek, ktoré môžu perzistovať v materskej cirkulácii aj roky. Potenciálny mechanizmus odstránenia cirkulujúcej DNA zahrňuje plazmatické nukleázy, ale aj odstraňovanie v pečeni a obličkách. Pri odstraňovaní v obličkách môže plazmatická fetálna DNA prechádzať glomerulárnou bariérou a byť vylučovaná močom. Detekcia a kvantifikácia mRNA transkriptov špecifických pre placentárne hormóny, menovite ľudský placentárny lactogen (hPL) a β podjednotku ľudského choriového gonadotropínu (β -hCG), v materskej plazme taktiež potvrdzuje teóriu trofoblastického pôvodu.

Štruktúra placenty naznačuje, že väčšina fetálnej DNA v materskej plazme pochádza z placentárnych klkov. Placentárnu bariéru totiž tvorí masa syncytiotrofoblastov a steny kapilár v choriových klkoch. Syncytiotrofoblast tvorí bunky plodu a na povrchu jednotlivých klkov vybieha v pupeňovité výbežky s mnohými jadrami. Počas tretieho trimestra sa tieto pupeňovité výbežky uvoľňujú z povrchu klkov a prechádzajú do materského krvného obehu. Ak činí plocha choriových klkov obmývaných materskou krvou 14 m^2 , je možné množstvo materiálu uvoľneného denne zo syncytiotrofoblastov do materskej krvi udávať v gramoch. Táto DNA je však v plazme veľmi rýchlo odbúravaná so spomínaným polčasom života 16,3 minút. K celkovému zvýšeniu koncentrácie voľnej fetálnej DNA môžu prispieť dva dejy: intenzívne „obrusovanie“ syncytiotrofoblastov a nedostatočné odbúravanie voľnej DNA v krvnom obehu.

S veľkou pravdepodobnosťou väčšina voľnej fetálnej DNA v materskej cirkulácii pochádza z placenty s dodatočným príspevom z hematopoetických buniek a možno od samotného plodu skrz priamy transfer. Nech už je zdroj akýkoľvek, k udržovaniu stabilnej hladiny fetálnej DNA v materskej plazme musí byť fetálna DNA kontinuálne uvoľňovaná do materskej cirkulácie. Rôzne kalkulácie uvažujú, že fetálna DNA je uvoľňovaná v priemere v 2.24×10^4 kópiách za minútu.

2.5.2 Genetické markery slúžiace na detekciu fetálnej DNA

Napriek tomu, že množstvo prác považuje kvantifikáciu voľnej fetálnej DNA v materskej plazme za potenciálne užitočný marker slúžiaci na odhadnutie zdravotného stavu plodu a tehotnej ženy, stanovenie voľnej fetálnej DNA je podstatne limitované iba na kvantifikáciu paternálnych sekvencií väčšinou pochádzajúcich z Y chromozómu, pretože fetálna DNA je prítomná na pozadí maternálnej DNA. Maternálne dedené fetálne alely sú všeobecne považované za nerozlíšiteľné od materskej DNA. Detekovať je možné iba gény alebo mutácie, ktoré plod zdedil po otcovi. Využívajú sa paternálne dedené mikrosatelitné polymorfizmy. V maternálnej plazme už bola detegovaná paternálne dedená mutantná alela génu DMPK (dystrophia myotonica protein kinase) a taktiež mutácia v géne pre FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3), ktorá spôsobuje achondropláziu. Schopnosť detegovať fetálne alely líšiace sa od maternálnych iba malým množstvom nukleotidov otvára možnosti využitia fetálnej

DNA v materskej plazme pri veľkom množstve genetických porúch (Bianchi a Lo 2001).

Jednou z možností, ktorá umožňuje aspoň hrubé oddelenie voľnej fetálnej a maternálnej DNA je veľkostná separácia na základe rôznych dĺžok fragmentov DNA. Bolo zistené, že fetálna DNA je omnoho kratšia v porovnaní s materskou a že neprekračuje veľkosť 313 bp. Oproti tomu materská DNA dosahuje dĺžok, ktoré neprekračujú 20 kb (Li *et al.* 2004, Chan *et al.* 2004). Vysvetlením tohto veľkostného rozdielu sa zdá byť pôvod týchto fragmentov – u voľnej fetálnej DNA pravdepodobne hlavne z placenty, u voľnej maternálnej DNA z hemopoetických buniek. Aj táto jednoduchá stratégia, ktorou je veľkostná separácia môže viesť k selektívnemu obohateniu voľnej fetálnej DNA, ktorá potom následne umožňuje jednoduchšiu analýzu paternálne či maternálne dedených polymorfizmov.

Obmedzenie na detekciu paternálne dedených aliel však môže byť prekonané využitím epigenetických rozdielov medzi matkou a plodom (Poon *et al.* 2002). Jedným z najlepšie charakterizovaných epigenetickým procesom je DNA metylácia. Vďaka rozdielnej DNA metylácii u matky a plodu môže byť prekonaný problém odlišenia maternálnych aliel. Poon *et al.* študovali jednonukleotidový polymorfizmus vo vnútri rozdielne metylovaného ľudského lokusu IGF2-H19 a boli schopní demonštrovať, že maternálne dedené fetálne alely môžu byť detekované nezávisle na pozadí maternálnej DNA. V rámci tohto lokusu sú maternálne dedené alely nemetylované, kým paternálne dedené alely sa metylujú. Pretože sa metylačný status líši v závislosti na parentálnom pôvode, táto oblasť sa označuje ako diferenciálne metylovaná oblasť (DMR – differentially methylated region). Na selekciu fetálno-maternálnych párov informatívnych na polymorfizmus vo vnútri diferenciálne metylovanej oblasti bola použitá bisulfidová konverzia a primery špecifické pre metyláciu k rozlíšeniu nemetylovaných maternálne dedených fetálnych aliel od maternálnych aliel, ktoré matka sama zdedila od svojho otca a budú teda metylované. Tento princíp demonštruje, že niektoré limitácie analýzy fetálnej DNA môžu byť prekonané pomocou epigenetického prístupu a môžu potenciálne viesť k vývoju fetálnych DNA markerov v materskej plazme, ktoré sú nezávislé na pohlaví a polymorfizmoch. Epigenetická analýza materskej plazmy má taktiež zrejmy význam u chorôb asociovaných s génovým imprintingom ako napríklad u Prader-Willi syndrómu. Táto stratégia má diagnostický

význam aj u ochorení ako je preeklampsia, u ktorej hrajú imprintované gény pravdepodobne nejakú úlohu.

Pri ďalšom hľadaní univerzálneho fetálneho DNA markeru sa taktiež vychádzalo z rozdielnej metylácie v maternálnom a fetálnom tkanive. Lo (2005) sa u fetálneho tkaniva zameril na placentu ako na pravdepodobne hlavný zdroj fetálnej cirkulujúcej DNA a z maternálneho tkaniva na hematopoetické bunky. Pomocou bisulfátového sekvenovania skúmal rozdielny vzor DNA metylácie u maspínového génu (tumor supresorový gén). Tento gén bol v placente hypometylovaný, pričom u materských krvných buniek bol maspínový gén hypermetylovaný. Pomocou Real-time PCR špecifickej pre metyláciu detegoval placentárnu, hypometylovanú formu maspínového génu vo všetkých troch trimestroch gravidity. Hypometylovaný maspín sa zdá byť prvým univerzálnym markerom fetálnej DNA v materskej plazme.

2.5.3 Prítomnosť fetálnej DNA v iných tekutinách ako materskej plazme alebo sére

Voľná fetálna DNA sa okrem plazmy a séra nachádza aj v iných tekutinách materského tela. Veľké množstvo tejto DNA obsahuje supernatant amniovej tekutiny vyradený po rutinnej fetálnej karyotypizácii. Hladiny fetálnej DNA v amniovej tekutine sú zvýšené približne 100 až 200 krát v porovnaní s hladinami fetálnej DNA nachádzajúcej sa v materskej krvnej plazme. Signifikantné množstvo fetálnej DNA je prítomné v amniovej tekutine dokonca skôr než sa začína tvoriť fetálny moč a stúpa s gestačným vekom. Supernatant amniovej tekutiny, ktorý je zvyčajne vyradzovaný, sa ukazuje byť ďalším, hodnotným zdrojom fetálnych nukleových kyselín. Umožňuje testovanie klinických aplikácií fetálnej DNA jej hybridizáciou s DNA microarray.

Ďalšími tekutinami, v ktorých je prítomná voľná fetálna DNA je peritoneálna tekutina, moč, ale fetálna DNA môže dokonca taktiež prechádzať bariérou medzi krvou a mozgom, ktorá bola pôvodne považovaná za nepermeabilnú, a môže byť detekovaná v cerebrospinálnej tekutine niektorých tehotných žien.

2.6 Využitie voľnej fetálnej DNA a fetálnych buniek pri neinvazívnej prenatalnej diagnostike

Objav fetálnych buniek a voľnej fetálnej DNA v materskej plazme či sére a demonštrácia spoľahlivosti, s akou môžu byť detekovateľné, otvára nové možnosti pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku.

Skorá detekcia fetálnych sekvencií pochádzajúcich z chromozómu Y v materskej plazme má potenciálne využitie pri prenatalnej diagnostike chorôb viazaných na pohlavie. Krvné vzorky sa zbierajú už medzi 5. a 10. týždňom tehotenstva a pohlavie plodu sa preukazuje pomocou modifikovaných metód PCR s využitím Y-chromozomálnych špecifických sekvencií DYS 14 (testes specific protein) a SRY (sex – determining region Y). Najčastejšie používanou metódou na určenie pohlavia dieťaťa a kvantifikáciu fetálnej DNA je Real-time PCR. Celková spoľahlivosť týchto metód presahuje 95 %. U gonozomálne recesívneho ochorenia hemofílie A alebo u autozomálne recesívneho ochorenia deficitu 21-hydroxylázy je veľmi potrebné skoré určenie pohlavia dieťaťa. Plod ženského pohlavia trpiaci na deficit 21-hydroxylázy je ohrozený vytvorením mužských znakov. Ak sa teda v materskej plazme potvrdí absencia sekvencií pochádzajúcich z Y chromozómu, môže sa okamžite začať s terapiou, ktorá umožní narodenie zdravého dieťaťa.

Prvým lokusom nenachádzajúcim sa na Y chromozóme, ktorý pútal pozornosť vedcov, bol RHD gén. D alela tohto génu podmieňuje v kavkazkej populácii pozitívny RhD fenotyp. Ak je plod RhD pozitívny, je tento táto D alela detekovateľná v periférnej krvi RhD negatívnej matky. Pri detekcii sa za cieľovú sekvenciu použilo už množstvo rôznych oblastí RHD génu. Táto metóda je veľmi spoľahlivá (takmer 100 %) už v skorom štádiu tehotenstva a množstvo kliník v západnej Európe, konkrétne British National Blood Service, už v roku 2001 vytvorilo protokol rutínnej prenatalnej diagnostiky pre určenie fetálneho RhD statusu u RhD negatívnych tehotných žien využitím detekcie sekvencie RHD génu v materskej plazme alebo sére (Finning et al. 2004).

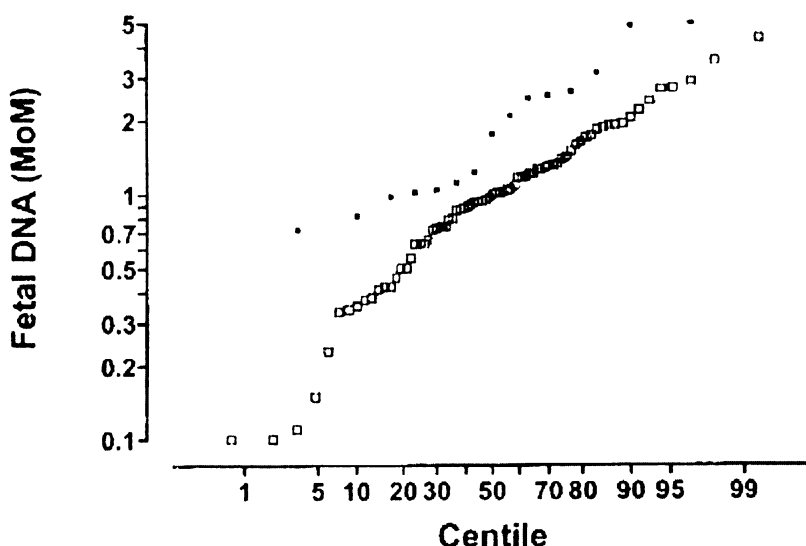
Pre množstvo ďalších porúch spôsobených jediným génom boli vyvinuté metódy založené na PCR umožňujúce ich detekciu z fetálnej DNA v krvnom obehú matky. Medzi tieto poruchy patrí achondroplázia, myotonická dystrofia, kongenitálna adrenálna hyperplázia, beta-thalasémia, cystická fibróza a taktiež Huntingtonova chorea. Taktiež

boli detegované paternálne dedené mikrosatelitné polymorfizmy na chromozómoch 13, 18, 21 a paternálne dedený X – chromozomálny mikrosatelitný polymorfizmus v plazme tehotných žien nesúcich plody ženského pohlavia.

Krátko po zdokumentovaní koncentrácií cirkulujúcej fetálnej DNA v materskej plazme u normálnych tehotenstiev boli študované možné kvantitatívne odchýlky u patológií. Množstvo cirkulujúcej fetálnej DNA tak môže byť určitým diagnostickým faktorom vo vzťahu k neinvazívnej prenatalnej diagnostike plodu. Odlišná, viac či menej zvýšená koncentrácia voľnej fetálnej DNA pomáha odhaľovať tehotenstvá v riziku rôznych s tehotenstvom spojených komplikácií. Tieto odchýlky v koncentrácii fetálnej DNA v materskej plazme už boli pozorované u istých fetálnych chromozomálnych aneuploidií, preeklampsie, predčasného pôrodu, polyhydramnionu, invazívnej placentácie, hyperemesis gravidarum – nadmerného dávenia v tehotenstve, fetomaternálneho krvácania, intrauterinnej rastovej retardácie IUGR, u syndrómov zahrňujúcich hemolýzu a zvýšenie pečenej enzýmov a taktiež u HELLP syndrómu. Avšak mechanizmus, kvôli ktorému vznikajú tieto kvantitatívne odchýlky, nie je ani dnes dostatočne známy.

Trizómia 21. chromozómu je najbežnejšou chromozomálnou abnormalitou u živo narodených detí, ktorá vedie k mentálnej retardácii. Kvôli tomuto veľkému množstvu takto postihnutých detí je v dnešnej dobe ponúkaný tehotným ženám v druhom trimestri tehotenstva skriningový program založený na meraní hladín 4 sérových proteínov – α -fetoproteínu, ľudského choriového gonadotropínu, nekonjugovaného estriolu a inhibínu A. V mnohých krajinách je považovaný za zlatý štandard prenatalného skriningu. Zavádza sa taktiež skrining prvotrimestrálny. Plody s trizómiou 21. chromozómu identifikujú odlišné koncentrácie týchto markerov v materskom sére. Veľkú úlohu pri identifikácii tehotenstiev v riziku trizómie 21. chromozómu môže taktiež zohrávať voľná fetálna DNA. Použitím Real-time PCR na kvantifikáciu sekvencií špecifických pre chromozóm Y bolo demonštrované 1,7násobné zvýšenie hladín voľnej fetálnej DNA u plodov s Downovým syndrómom v porovnaní so zdravými kontrolami (Lee et al. 2002) (graf č. 1). Bolo by preto možné považovať voľnú fetálnu DNA za ďalší nezávislý sérový marker a používať ho spolu so 4 sérovými proteínmi a ultrazvukovým vyšetrením v skriningovom programe na Downov syndróm. Ak sa na detekciu používa ako neinvazívny marker iba hladina voľnej fetálnej DNA, je dekových 21 % tehotenstiev postihnutých Downovým syndrómom s 5 % hladinou falošne pozitívnych

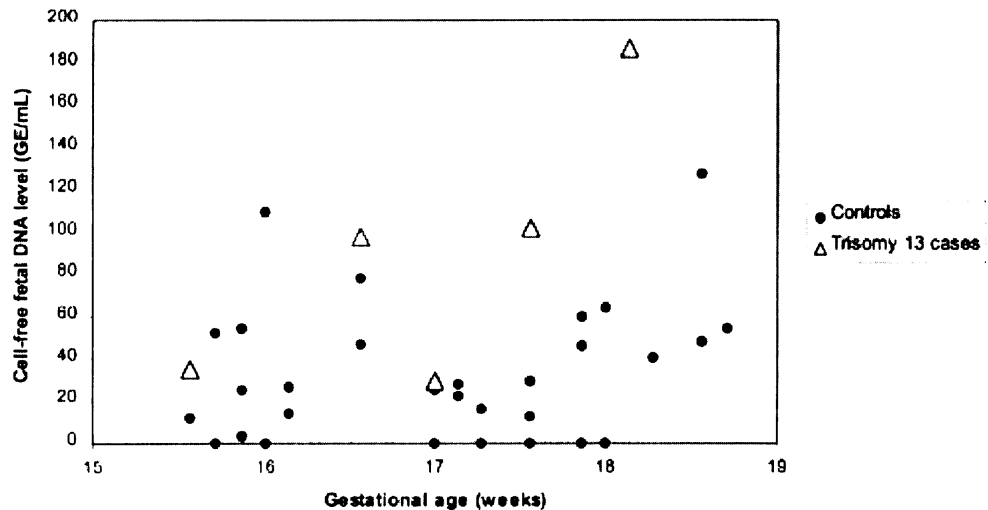
výsledkov. Veľmi podobné výsledky sú dosahované aj v prípade, ak sa na detekciu použije iba samotný α -fetoproteín. Zapojením analýzy voľnej fetálnej DNA do skriningového programu 4 sérových proteínov sa zvýši neinvazívna detekcia aneuploidií na 81 až 86 % s 5 % hladinou falošne pozitívnych výsledkov. Detekcia analýzou voľnej fetálnej DNA je však zatiaľ obmedzená iba na plody mužského pohlavia.



Graf č. 1: Zvýšená koncentrácia voľnej fetálnej DNA v prípadoch Downovho syndrómu (■) v porovnaní so zdravými kontrolami (□)

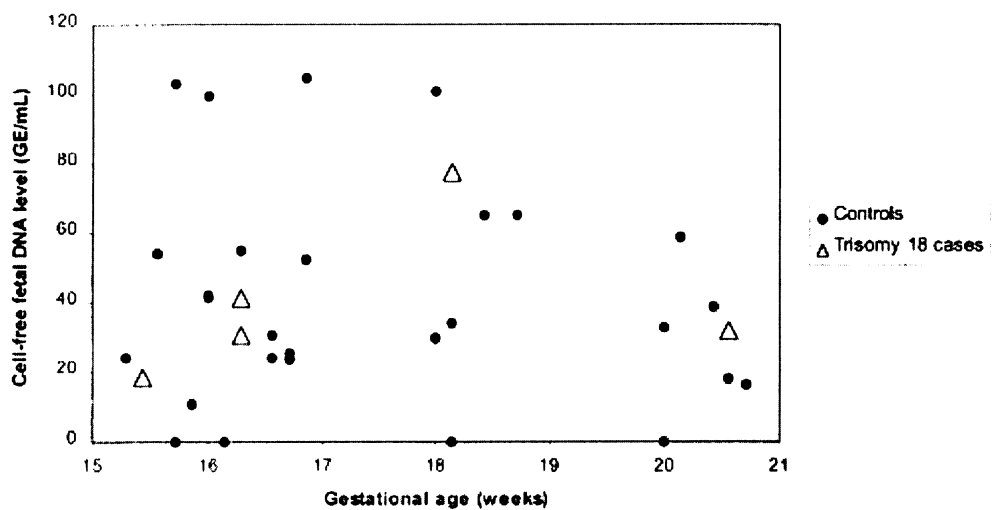
(Zdroj: Farina *et al.* 2003)

Po tom, čo bolo viacerými štúdiami potvrdené zvýšenie hladiny voľnej fetálnej DNA u trizómie 21. chromozómu a jej stanovovanie ako potenciálneho diagnostického markeru, sa následný výskum zameril na štúdium prípadov trizómie chromozómov 18 a 13 – druhej a tretej najbežnejšej fetálnej autozomálnej aneuploídie. V prípade trizómie 13. chromozómu bolo pozorované 2,4násobné zvýšenie hladiny voľnej fetálnej DNA v porovnaní s kontrolnou skupinou tehotných žien so zdravými plodmi (Watanagana *et al.* 2003) (graf č. 2).



Graf č. 2: Hladiny voľnej fetálnej DNA v prípadoch trizómie 13. chromozómou a zdravých kontrol (Zdroj: Wataganara *et al.* 2003)

Na druhej strane, u trizómie 18. chromozómu nebolo pozorované žiadne signifikantné zvýšenie (Wataganara *et al.* 2003) (graf č. 3). Keďže v prípade trizómie 13. chromozómového páru neexistujú žiadne informatívne markery na odhalenie tejto poruchy, signifikantné zvýšenie voľnej fetálnej DNA sa ponúka na možné využitie ako neinvazívny skriningový marker. U trizómie 18. chromozómu je skriningový program využívajúci tri sérové proteíny – (α -fetoproteín, ľudský choriálny gonadotropín a nekonjugovaný estriol) vysoko efektívny s detekciou až 70 % a s menej než 0,5 % hladinou falošne pozitívnych výsledkov.



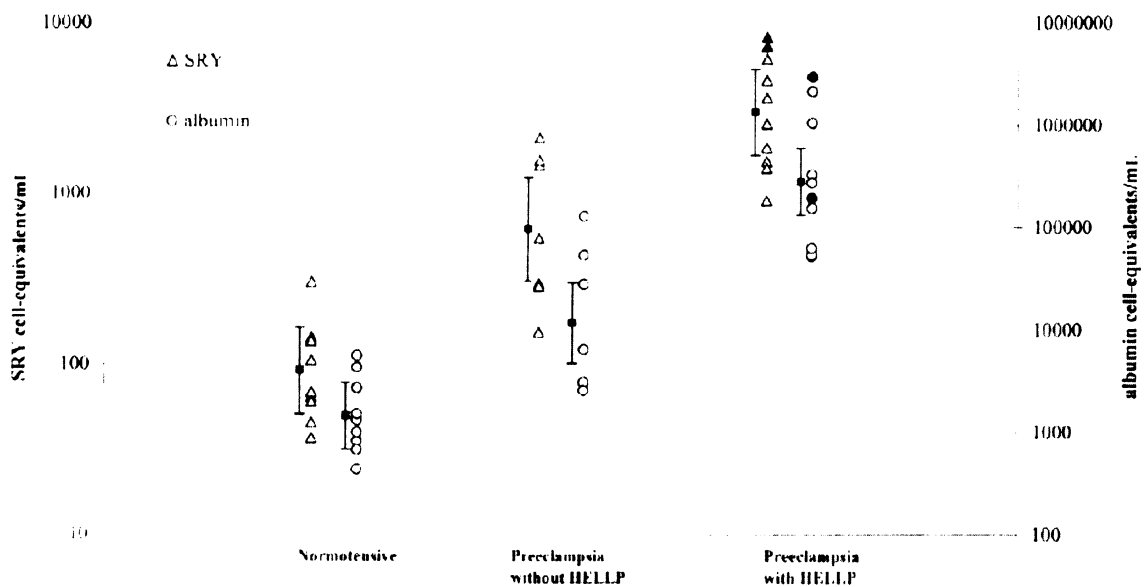
Graf č.3: Hladiny voľnej fetálnej DNA v prípadoch trizómie 18. chromozómu a zdravých kontrol (Zdroj: Wataganara *et al.* 2003)

Jedným z možných vysvetlení zvýšených hladín voľnej fetálnej DNA u tehotenstiev s aneuploídiou plodu je ich patológia placenty. V aneuploidných placentách sa vyskytuje viac nezrelých trofoblastových klkov a taktiež krvácanie klkov je častejšie, čo môže uľahčiť fetomaternálny prenos nukleových kyselín. U trizómií 13. a 21. chromozómu sa vyskytujú väčšie placenty a s väčšou pravdepodobnosťou aj hypervaskulárne nezrelé klky v porovnaní s prípadmi trizómie 18. chromozómu. Menšie placenty s menším množstvom ciev pripadajúcich na jeden klk u trizómií 18. chromozómu môžu znižovať plochu vhodnú na fetomaternálny prenos, čo vedie k normálnym hladinám voľnej fetálnej DNA.

Existuje vysoká pravdepodobnosť, že náhly nárast koncentrácie voľnej fetálnej DNA v materskom obehú pred koncom tehotenstva, môže byť v priamej súvislosti s nástupom pôrodnej fázy. Preto hľadanie vzťahu medzi množstvom voľnej fetálnej DNA a ochoreniami ovplyvňujúcimi dobu pôrodu (resp. jeho predčasnosť), je dnes veľmi aktuálne. Hypotéza, že v prípade predčasného pôrodu sa môže objaviť dramatický nárast hladiny voľnej fetálnej DNA, ako na konci normálneho tehotenstva bola úspešne potvrdená (Hoesli et al. 2002). Ukázalo sa, že v rovnakom gestačnom týždni, obsahovala plazma žien s predčasným pôrodom vyššie hladiny fetálnej DNA, než v prípade kontrolného súboru tehotných žien s normálnym termínom pôrodu. Na rozdiel od voľnej fetálnej DNA sa u tehotenstiev s predčasným pôrodom nepozorovalo žiadne zvýšenie prenosu fetálnych buniek. Aj keď placenta netvorí nepriepustnú bariéru, silné fyziologické tlaky, ktoré sa vyskytujú počas kontrakcií, nevedú k zvýšenému prítoku fetálnych buniek do materskej periférnej krvi (Hoesli et al. 2002). Zmena v prenose fetálnych buniek teda nemá predvídateľnú hodnotu v určení tehotenstva s rizikom predčasného pôrodu, zvýšené hladiny voľnej fetálnej DNA však áno. Zvýšené hladiny fetálnej DNA v materskej periférnej krvi bez zvýšeného fetomaternálneho prenosu buniek môžu znamenať, že niektorý stupeň zvýšenej bunkovej apoptózy, alebo nekrózy v placente môže spúšťať predčasné pôrodné bolesti a následný predčasný pôrod.

Ďalším veľmi častým ochorením spojeným s tehotenstvom je preeklampsia. Preeklampsia (PRE) je multiorgánová porucha špecifická pre tretí trimester tehotenstva, ktorej najtypickejšími znakmi sú hypertenzia, proteinúria a edémy spolu s ďalšími sprievodnými javmi v závislosti na závažnosti fenotypového prejavu. Toto ochorenie poškodzuje a smrteľne ohrozuje tehotnú ženu a plod. Incidencia preeklampsie je medzi 5

– 15 % .U žien s preeklampiou bola preukázaná zvýšená plazmatická hladina fetálnych buniek (Hoesli *et al.* 2002) a taktiež 5násobné zvýšenie koncentrácie voľnej fetálnej DNA (Farina *et al.* 2004c) u žien, u ktorých sa už rozvinuli príznaky ochorenia (graf č. 4). Avšak asymptomatické ženy, u ktorých sa eventuálne rozvinie preeklampsia, majú tiež vyššie hladiny voľnej fetálnej DNA než by boli očakávané normálne. Zvýšenie koncentrácie voľnej fetálnej DNA tak predchádza rozvoju príznakov ochorenia. Zdá sa, že rozsah zvýšenia súvisí s klinickými príznakmi – čím väčšie zvýšenie, tým horší priebeh ochorenia. Môže tak prerásť až do HELLP syndrómu, vzácnej, ale veľmi závažnej formy preeklampsie.



Graf č. 4: Koncentrácia voľnej fetálnej DNA a totálnej DNA v materskej plazme u normálnych a preeklamptických tehotenstiev s alebo bez HELLP syndrómu

(Zdroj: Swinkels *et al.* 2002)

U žien, u ktorých sa eventuálne rozvinie preeklampsia bolo pozorované dvojfázové zvýšenie koncentrácie voľnej fetálnej DNA. Prvá fáza nastáva v 13. až 17. týždni tehotenstva alebo aj skôr, druhá 3 týždne pred rozvinutím symptómov. Toto dvojfázové zvýšenie koncentrácie voľnej fetálnej DNA umožňuje jej meranie a tým možné použitie v skríningu preeklampsie a indikácie nastávajúceho ochorenia. Aj keď príčina zvýšenia hladiny voľnej fetálnej DNA v prípade preeklampsie nie je jasná, predpokladá sa, že sa natom podieľa kombinácia zvýšeného uvoľňovania z abnormálnej placenty a redukované odstraňovanie voľnej fetálnej DNA kvôli poškodeniu pečene

a obličiek neskôr v procese ochorenia. Prvá fáza zvýšenia hladiny voľnej fetálnej DNA je tak pravdepodobne spôsobená placentárnou nekrozou alebo apoptózou vyvolanou oxidatívnym stresom v placente, druhá nepatrnou dysfunkciou orgánov matky, ktorá vedie k poškodeniu uvoľňovania fetálnej DNA. Lau *et al.* (2002) porovnal popôrodný stupeň odstraňovania fetálnej DNA u preeklamptických a normálnych tehotenstiev. Priemerný polčas života voľnej fetálnej DNA u preeklamptických tehotenstiev – 114 minút bol signifikantne predĺžený v porovnaní s priemerným polčasom 28 minút u normálnych tehotenstiev. Taktiež u žiadnej ženy, u ktorej sa rozvinula preeklampsia, sa z krvnej plazmy neodstránila fetálna DNA ani 6 hodín po pôrode.

Pri možnej diagnostike preeklampsie pomocou voľnej fetálnej DNA a fetálnych buniek však nemožno využiť žiadneho vzťahu medzi týmito dvoma fenoménmi. Medzi normálnymi ani preeklamptickými tehotenstvami nebola preukázaná žiadna signifikantná korelácia medzi koncentráciou voľnej fetálnej DNA a množstvom fetálnych buniek v krvnej plazme matky. Tieto dva deje tak pravdepodobne nastávajú nezávisle na sebe. Avšak je možné, že v istých prípadoch ako je napríklad preeklampsia, spája zvýšené uvoľňovanie voľnej fetálnej DNA a tiež zvýšený prenos fetálnych buniek do materskej periférie poškodenie placenty.

Zvýšené množstvo fetálnych buniek bolo okrem preeklampsie pozorované taktiež v prípadoch plodu s rastovou retardáciou, polyhydramnionom a taktiež trizómiou 21. chromozómu. Diagnostika založená na fetálnych bunkách má veľkú výhodu hlavne pri detekcii aneuploidií. Umožňuje na tej istej fetálnej bunke previesť FISH a zároveň PCR. Avšak nevýhody kvôli ich nízkemu množstvu, nevyhnutným separačným technikám a perzistencie niektorých typov buniek po pôrode dávajú prednosť diagnostike založenej na voľnej fetálnej DNA. Oproti fetálnym bunkám sa jej v krvnom obehu matky nachádza oveľa väčšie množstvo. Techniky práce s voľnou fetálnou DNA sú relatívne rýchle a hlavne reprodukovateľné, vždy odrážajú práve prebiehajúce tehotenstvo. Vzorky môžu byť zmrazené a archivované. Jedinou nevýhodou je zatiaľ obmedzenie na fetálne pohlavie a polymorfizmy pri detekcii, keďže využitie epigenetických rozdielov medzi matkou a plodom ešte nie je preskúmané v dostatočnej miere.

2.7 Sledované poruchy spojené s tehotenstvom

V rámci riešenia grantu sme sa venovali neinvazívnej prenatalnej diagnostike viacerých porúch spojených s tehotenstvom založenej na kvantifikácii voľnej fetálnej DNA u týchto tehotenstiev a porovnávaním jej množstva s množstvom zisteným u fyziologických tehotenstiev. Medzi tieto ochorenia patrí preeklampsia, predčasný pôrod, dlhodobá tokolýza a gestačný diabetes.

2.7.1 Preeklampsia

Je to porucha tretieho trimestra tehotenstva, ktorá sa prejavuje symptómami svedčiacimi o funkčných zmenách v oblasti ciev a obličiek – hypertenziou, proteinúriou a edémom. Preto bol tento syndróm označovaný ako EPH gestóza (E = edém, P = proteinurie, H = hypertenzia). Dnes sa už tento názov nepoužíva a prechádza sa k označeniu preeklampsia. Gestózou sa označuje ochorenie tehotnej ženy vyvolané poruchou adaptácie organizmu na prítomnosť a potreby plodu.

Preeklampsia sa prejavuje hypertenziou vzniknutou v druhej polovici tehotenstva, doprevádzanou proteinúriou. Edém je príznakom preeklampsie vtedy, ak pretrváva na dolných končatinách po nočnom pokoji alebo ak postihuje brucho a tvár.

Na tieto symptómy môžu nadväzovať vegetatívne poruchy: bolesti hlavy, nevoľnosť, nauzea, zvracanie, bolesti v nadbrušku, nepokoj či zaujatosť, poruchy videnia (nejasné videnie, zúženie zorného poľa, skotomy) – takýto stav je označovaný ako preeklampsia. Ten obvykle predchádza, nie však nutne, do záchvatu krčvov – eklampsie.

Preeklampsia sa môže vyvinúť u ženy do tej doby zdravej, potom sa označuje ako esenciálna. Ak sa vyvinie u tehotnej, ktorá už pred tehotenstvom trpela hypertonicou chorobou, nefropatiou, pyelonefritídou, diabetom alebo hepatopatiou, označuje sa ako symptomatická. Symptomatická preeklampsia sa vyskytuje u 50 % žien s preeklampiou.

Neskorá gestóza sa vyskytuje u 5 – 8 % tehotných žien, eklampsia asi u 0,1 %. Frekvencia kolíše regionálne. Esenciálnou formou sú postihnuté prevažne primigravidy, hlavne staršie, ženy s mnohopočetným tehotenstvom a hydramnionom. Symptomatická neskorá gestóza je častejšia u viacrodičiek.

Tehotné s príznakmi preeklampsie sú považované za rizikové. Častejšie sa u nich vyskytuje predčasné odlúčenie lôžka, diseminovaná intravaskulárna koagulácia – DIC. Ťažké formy môžu zanechať trvalé následky. Ťažká preeklampsia ovplyvní vývoj plodu, ktorý býva hypotrofický.

Etiopatogenézia preeklampsie nie je dodnes jasná. Preukázaný je generalizovaný spasmus v oblasti kapilárneho a prekapilárneho riečišťa, ktorý má za následok funkčné, prípadne patologické zmeny v orgánových systémoch citlivých na poruchy výživy a výmenu krvných plynov. Patrí k nim centrálny nervový systém, obličky, pečeň, sietnica ale aj placenta. V dôsledku toho je postihnutý aj placentárny obeh a tiež plod. Hypoxia má za následok poškodenie parenchymatóznych orgánov tehotnej, v obličkách sú histologicky preukazované zmeny na glomeruloch a edém kľučiek, v pečeni drobné i väčšie nekrózy a tromby v kapilárach.

Eklampsia je záchvat tonicko – klonických kŕčov s následným komatóznym stavom. Obyčajne sa dostaví u žien po predchádzajúcich alarmujúcich symptómoch preeklampsie, ale aj bez nich, úplne neočakávane. Je to závažný a nebezpečný stav pre matku aj plod. Častejšie kŕče prepuknú na konci tehotenstva (35%) a počas pôrodu (40 %), menej často až po pôrode (25 %). Eklamptický záchvat sa rozvíja typickým spôsobom:

Úvodná fáza začína nepokojom, záchvevmi svalstva tváre a stratou vedomia. Očné bulby rotujú a nakoniec sa ustália na jednej strane, kam sa tiež stočí hlava. Horné končatiny sa chvejú. Tento stav trvá asi pól minúty a tehotná potom upadá do tonických kŕčov.

Fáza tonických kŕčov sa prejavuje stuhnutím svalstva celého tela. Dýchanie ustane, hlava je zvrátená dozadu, trup vypnutý do oblúka, dolné končatiny sú vystreté, paže zaujímajú „boxerské postavenie“, ruky sú zat’até v päst’. Tvár je kŕčovito stiahnutá, čeľuste sú zovreté a medzi zubami často uviazne zahryznutý jazyk. Žena nedýcha. Tvár je cyanotická, žily na krku preplnené krvou. Táto fáza je krátka a prechádza do fázy klonických kŕčov.

Fáza tonicko – klonických kŕčov je uvedená klonickými záškľbmi tvároveho svalstva s prudkými pohybmi hlavy na strany a dozadu. Z úst vyteká pena, žena začne chrčivo dýchať, ale stále je cyanotická, cyanóza sa šíri na krk, trup a končatiny. Trup je vypnutý do oblúku, predlaktia sa zmietaivo pohybujú pred hrudníkom, dolné končatiny

sú v pokoji, napäté alebo sa len mierne chvejú. Záchvat trvá asi minútu, intenzita krčov sa znižuje a po hlbokom vdychu postihnutá prejde do komatózneho stavu.

Eklamptická kóma je stav hlbokého bezvedomia, bez motorickej aktivity, niekedy len s občasnými, nekoordinovanými pohybmi alebo záchvevmi. Zreničky sú rozšírené, nereagujú. Reflexy nie sú výbavné, dýchanie je chrčivé. Kóma trvá obyčajne hodinu, môže byť aj dlhšia. Žena sa prebúda dezorientovaná a s amnéziou.

Eklamptická kóma býva prerušovaná novými záchvatmi. Ich počet je rôzny, niekedy zostane pri jednom záchvate, častejšie však bývajú dva až tri. Udáva sa, že počet záchvatov určuje prognózu. Vzácnjšie sa záchvaty dostávajú v rýchlom slede alebo jeden nadväzuje priamo na druhý. Je to nebezpečný *status eclampticus*.

Záchvat býva niekedy vyprovokovaný vyšetovacími alebo liečebnými postupmi (meraním krvného tlaku, vpichom pri injekciách, cievkovaním, pôrodnickým vyšetrením).

Boli popísané prípady, kedy tehotná žena alebo rodička upadá do komatózneho stavu bez záchvatov krčov – *eclampsia sine eclampsia*. Laboratórne je u týchto prípadov zisťované ťažké poškodenie pečene s bilirubinémiou. Sú to vzácne, ale prognosticky nepriaznivé formy.

Plod trpí poruchami v placentárnom obehú (spazmy uterinných a placentárnych ciev, nekrózy placentárneho tkaniva) a ťažkou hypoxiou pri záchvate, kedy tonický krč postihne aj maternicu. Často sa predčasne odlučuje placenta.

Smrť pri eklampsii môže nastať vo fáze tonických krčov udusením, pri opakujúcich sa záchvatoch srdčným zlyhaním, v dlhej kóme na pneumóniu, na pľúcný alebo mozgový edém, či mozgové krvácanie.

2.7.2 Predčasný pôrod

Predčasný pôrod znamená ukončenie tehotenstva pred 38. týždňom, čiže do dokončeného 37. týždňa gravidity. Závažnosť predčasných pôrodov spočíva vo vyššej perinatálnej a neonatálnej mortalite aj morbidite predčasne narodených detí (detská mozgová obrna, retardácia motorického a psychického vývoja, poruchy zmyslov, drobné neurologické odchýlky, epilepsia). Vyskytuje sa s frekvenciou 5 až 12 % a najčastejšie začína predčasným odtokom plodovej vody. Príčiny predčasného pôrodu je možné rozdeliť na pôrodnické, všeobecne medicínske a socioekonomické.

Pôrodnice príčiny spočívajú v nepriaznivej pôrodnickej anamnéze, väčším rozopätím maternicovej dutiny, v maternicových anomáliách, kedy dochádza k spontánnemu začiatku predčasného pôrodu. V iných prípadoch musí byť tehotenstvo ukončené pri závažných pôrodnických komplikáciách, napríklad pri abrupcii placenty, preeklampsii. Ďalšími možnými podnetmi k rozvoju predčasného pôrodu sú predchádzajúci predčasný pôrod, krátky interval od predchádzajúcej gravidity, viacpočetné tehotenstvo, polyhydramnion alebo oligohydramnion.

Všeobecne medicínske príčiny vyplývajú zo závažných chorôb matky (srdcové vady, urogenitálne infekcie, choroby obličiek, hypertenzia, diabetes, závažná anémia) a jej celkového zdravotného stavu. Taktiež má nato vplyv traumatizácia matky, podvýživa či obezita, fajčenie a požívanie alkoholu a drog.

Veľkou časťou sa podieľajú faktory socioekonomické, ktorých dôležitosť tkvie i v tom, že nie sú ovplyvniteľné pôrodnickou starostlivosťou. Patrí medzi ne vek matky (pod 17 a nad 30 rokov), neúplná rodina, nízky socioekonomický štatút, nedostatočné vzdelanie, nedostatočná prenatálna starostlivosť, nepriaznivé životné prostredie. Uvedené rizikové znaky majú rôznu váhu vplyvu na rozvoj predčasného pôrodu. Boli vypracované rôzne skórovacie systémy, ktoré sú závislé na charaktere jednotlivých oblastí alebo štátov. V mnohých prípadoch však zostáva príčina spontánného predčasného pôrodu neznáma.

2.7.3 Tokolýza

Tokolýza je základnou liečbou predčasného pôrodu a akútnej hypoxie počas pôrodu. Pri objavení sa vyvolávajúcich faktorov predčasnej pôrodnej činnosti je len v 25 % prípadoch možnosť zahájiť tokolytickú liečbu, v 75 % je nutné predčasné ukončenie tehotenstva. Tokolytická terapia musí spĺňať podmienky bezpečnosti z hľadiska matky aj plodu, dobrej tolerancie a účinnosti.

Tokolytiká sú liečivé prípravky, ktoré zastavujú alebo zmierňujú maternicovú činnosť. Napriek tomu, že sú široko používané a často znamenajú úspech v odvrátení predčasného pôrodu, ideálne tokolytikum zatiaľ neexistuje a kontroverzné názory sa týkajú nielen vhodného tehotenského veku a indikácie, ale aj typu podaného lieku a dĺžky podávania. Tokolýza je opodstatnená medzi 24. a 32. týždňom tehotenstva, kedy každý týždeň vnútramaternicového života naviac signifikantne zvyšuje percento

prežitia plodu. Pred 24. týždňom je nutné rozhodovať individuálne, pred 20. týždňom sa tokolýza nedoporučuje.

Najčastejšie používanými tokolytikami sú β_2 -sympatomimetika, magnézium sulfát, antagonisti syntézy prostaglandínov, blokátory kalciových kanálov, antagonisti oxytocínu, gestagény, donory oxidy dusnatého, inhibítory fosfodiesterázy a ethylalkohol.

2.7.4 Gestačný diabetes

Gestačný diabetes – tehotenská cukrovka je porucha látkovej výmeny cukrov, ktorá je diagnostikovaná prvýkrát v tehotenstve. Postihuje približne 5 % tehotných žien. V mnohých prípadoch sa jedná o formu diabetu, ktorá sa vyskytuje iba v tehotenstve, po pôrode zmizne t.j. že ženy neochoreli diabetom pred ani po skončení tehotenstva. V niektorých prípadoch však býva dosiaľ neobjavený diabetes 2. typu diagnostikovaný ako gestačný alebo začiatok diabetu 1. typu spadá práve do obdobia tehotenstva, preto je nevyhnutné všetky ženy s gestačným diabetom monitorovať aj po tehotenstve.

Pri gestačnom diabete pankreas, ktorý normálne zásobuje organizmus postačujúcou dávkou inzulínu, nedokáže v tehotenstve počas druhého a hlavne tretieho trimestra vytvoriť potrebné vysoké množstvo inzulínu. Pokiaľ je hladina cukru v krvi u tehotných žien dlhšiu dobu príliš vysoká, môže byť príčinou komplikácií pre matku aj plod. Navyše môže nepriaznivo pôsobiť aj prípadná obezita matky spojená so zníženou citlivosťou buniek k inzulínu. Hyperglykémia u matky spôsobí zvýšenú tvorbu inzulínu u plodu, ktorú je možné zaregistrovať už od desiateho týždňa vývoja plodu. Inzulín ako bielkovinová makromolekulová látka neprestupuje cez placentu do krvného obehu matky. Za nadmerným vychytávaním glukózy z krvi plodu sa skrývajú nadmerné anabolické procesy, pri ktorých sa vytvára tuk. Výsledkom je makrozómia plodu, pri ktorej môže mať novorodenec namiesto fyziologických 3500 g viac než 4000 g. V prípade makrozómie je pri pôrode ohrozená matka aj dieťa. Pôrod je obyčajne nutné previesť cisárskym rezom. U plodu môže drasticky zvýšená produkcia inzulínu vyvolať poškodenie pankreatických beta buniek alebo sa u neho do budúcnosti zvyšuje riziko vzniku diabetu. Navyše sa u novorodencov po pôrode objavujú ťažké hypoglykémie a súčasne bol pozorovaný výskyt hypokalcémie, hyperbilirubinémie a polycythémie.

Pri ľahších formách gestačného diabetu niekedy stačí iba kvalitná diéta pozostávajúca z obmedzenia jednoduchých a ľahko vstrebateľných sacharidov, akými sú

predovšetkým repný cukor, sladkosti a biele pečivo. Pri vážnejších formách je nutné injekčné podávanie inzulínu.

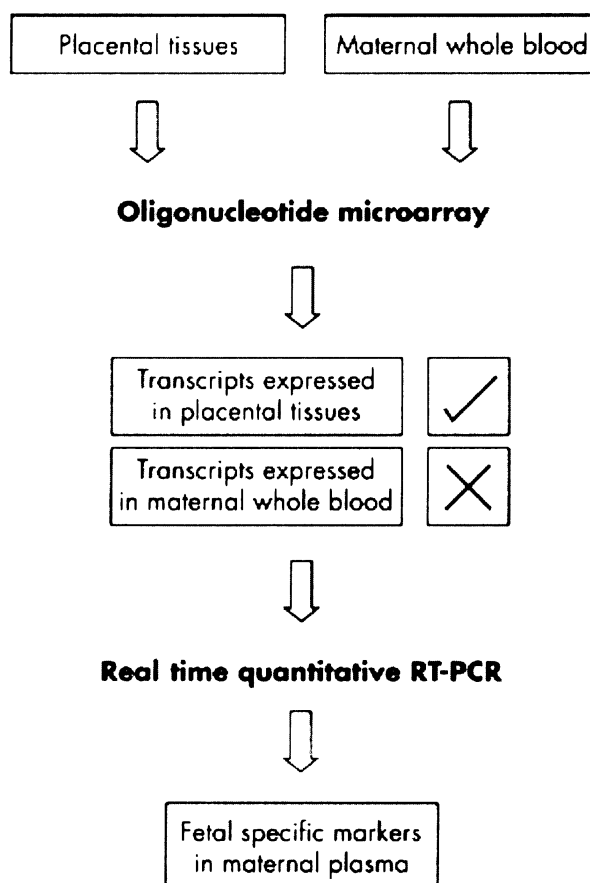
2.8 Fetálna RNA

Úspech pri detekcii voľnej cirkulujúcej fetálnej DNA v materskej plazme nabádal k zameraniu sa na hľadanie ďalšej fetálnej nukleovej kyseliny, fetálnej RNA. Obdobne ako pri DNA k tomu viedol objav cirkulujúcej tumorovej RNA v krvnom obehú pacientov s rakovinou. Tento fenomén bol nakoniec demonštrovaný v roku 2000 (Poon *et al.*) a po následných experimentoch sa za hlavný zdroj fetálnej RNA považuje placenta. Cirkulujúca RNA je prekvapujúco stabilná, pravdepodobne vďaka asociácii s materskými partikulami. Analýza fetálnej RNA v materskej plazme, napríklad v kombinácii s microarray-mi, významne zvyšuje množstvo markerov, ktoré môžu byť použité pri prenatalnom monitorovaní.

Placentárny pôvod tejto RNA umožňuje detegovať mRNA transkripty exprimované z placenty ako ľudský placentárny lactogén (hPL), β podjednotku ľudského choriového gonadotropínu (β hCG) a kortikotropín uvoľňujúci hormón (CRH). K sledovaniu hladín týchto cirkulujúcich mRNA transkriptov sa používa najmä kvantitatívna RT-PCR. Špecifickosť týchto mRNA transkriptov pre tehotenstvo bola demonštrovaná ich rapidným odstránením z materskej plazmy po pôrode (Tsui *et al.* 2004). V 70 % skúmaných prípadov nebolo možné detegovať hPL mRNA už dve hodiny po pôrode. 24 hodín po pôrode už tieto transkripty neboli zaznamenané v žiadnom prípade. Pomocou kvantitatívnej RT-PCR bolo zistené, že hladina hPL mRNA počas tehotenstva v krvnej plazme stúpa, hladina β hCG mRNA naopak klesá. Tieto výsledky odzrkadľujú hladiny týchto plazmatických proteínov. β hCG je proteín široko využívaný pre skriningové testy na Downov syndróm. Jeho zvýšené hladiny v prvom trimestri sú spojené s týmto defektom. Taktiež hladina β hCG sa zdá byť vyššia pri tehotenstvách s plodom ženského pohlavia. Abnormálna génová expresia, signifikantne zvýšená, je pravdepodobne spojená s placentárnymi patológiami, nielen s Downovým syndrómom, ale aj s rôznymi gynekologickými ochoreniami vrátane preeklampsie (Leung *et al.* 2001, Ng *et al.* 2003) a taktiež aj predčasného pôrodu (Zhong *et al.* 2005).

Okamžite po cisárskom reze nebola v pupočníkovej krvi zistená žiadna hPL mRNA čo vedie k predstave, že placentárna mRNA sa nedostáva do fetálnej cirkulácie. Tento výsledok kontrastuje s objavom materských buniek a DNA v pupočníkovej krvi.

Detekcia mRNA transkriptov v maternálnej plazme ponúka nové prístupy vo vývoji markerov nukleových kyselín špecifických pre plod, ktoré sú nezávislé na pohlaví a polymorfizmoch, a preto vhodné pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku u všetkých tehotenstiev (Ferguson–Smith 2003, Tsui 2004). Pri systematickej identifikácii týchto placentárnych mRNA transkriptov špecifických pre tehotenstvo v materskej plazme sa používajú vzorky placentárneho tkaniva a vzorky materskej krvi, ktoré sa analyzujú pomocou oligonukleotidových micro-arrays. Transkripty s relatívne zvýšenou expresiou v placentárnom tkanive oproti krvným vzorkám sú selektované a ich detekovateľnosť v materskej plazme a špecifickosť pre tehotenstvo sú ohodnotené prostredníctvom kvantitatívnej RT-PCR.



Obr.č. 7: Vývoj špecifických fetálnych markerov v maternálnej plazme
(Zdroj: Tsui *et al.* 2004)

Na základe týchto oligonukleotidových micro-arrays je možné systematicky identifikovať obrovské množstvo placentárne exprimovaných transkriptov a tým vyselektovať potenciálne špecifické fetálne markery slúžiace na detekciu v materskej plazme.

3 Ciele diplomovej práce

- Zavedenie neinvazívnej detekcie pohlavia plodu z materskej plazmy metódou Real-time PCR.
- Zavedenie kvantifikácie voľnej fetálnej DNA v materskej plazme.
- Zavedenie neinvazívnej prenatalnej diagnostiky Rh faktoru plodu.
- Zistenie vzťahu medzi množstvom fetálnej DNA a gestačným týždňom u žien s normálnym fyziologickým priebehom tehotenstva.
- Zistenie závislosti medzi množstvom voľnej fetálnej DNA v priebehu tehotenstva, a to v prípadoch včasného a predčasného pôrodu.
- Overenie prítomnosti vyššieho množstva voľnej fetálnej DNA u žien s prejavom preeklampsie.
- Zistenie vzťahu medzi množstvom fetálnej DNA a gestačným týždňom u žien v ďalších prípadoch nefyziologických tehotenstiev.
- Porovnanie efektivity rôznych metodických postupov izolácie zmiešanej vzorky fetálnej a maternálnej DNA.

4 Materiál a metódy

4.1 Použité chemikálie

- agaróza, Promega Corporation, Španielsko
- elektroforetický pufr 5x TBE
- EtBr 1 %, Fluka Escence, USA
- marker 100 bp DNA, Fermentas
- bromfenolová modrá
- 96 % etanol
- izopropanol

4.2 Spotrebný materiál

- rukavice Kimberly – Clark SAFESKIN* LPE, Kimberly – Clark N.V., Belgicko
- špičky ep T.I.P.S. filter, Eppendorf, Nemecko
- skúmavky 1,5 ml, 2 ml, 15 ml NUNC, Eppendorf, Nemecko
- odberové skúmavky s EDTA, Vacutainer, Dialab, Rakúsko
- 96 jamkové plato MicroAmp™ Optical 96 – Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Singapore
- krycí film Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems, USA

4.3 Izolačné kity

Manuálna izolácia DNA:

- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Nemecko)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemecko)

Automatická izolácia DNA:

- MagNA Pure LC DNA Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics GmbH, Nemecko)
- MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics GmbH, Nemecko)

Real-time PCR:

- TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)
- DNA štandard - Human male 10 ng/ul, Promega Corporation, Španielsko

4.4 Použité prístroje

- centrifúga Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- centrifúga Jouan MR 1812, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
- centrifúga MiniSpin, Eppendorf, Nemecko
- ohrievacia platnička Dry Bath Incubator, Major Science, Taiwan
- vortex Vortex Mixer ZX Classic, Velp Scientifica, Európa
- PCR cyklér MyCycler™ thermal cycler, BIO-RAD, USA
- elektroforetická vaňa Submarine Gel System, Model EC340 Maxicell® primo, Thermo Electron, USA
- elektroforetický zdroj Power Pac Basic, BIO – RAD, USA
- UV transluminátor TFX – 20.M, Vilber Lourmat, Francúzsko
- Digitálna kamera Kodak Digital Science DCHO, USA
- elektronická pipeta Eppendorf Research Pro, Eppendorf AG, Nemecko
- izolačná stanica MagNA Pure LC systém, Roche Diagnostics GmbH, Nemecko
- detekčný systém ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Singapore

4.5 Odber krvi tehotných žien

Na výskume sa zúčastnili ženy navštevujúce počas tehotenstva Gynekologicko – pôrodnícku kliniku 1. lekárskej fakulty Karlovej univerzity a Všeobecnej fakultnej nemocnice v Prahe, súkromnú gynekologickú kliniku Gyncentrum v Prahe a Gynekologicko – pôrodnícku kliniku lekárskej fakulty Karlovej univerzity v Plzni. Všetky ženy podpísali informovaný súhlas. Gestačný vek plodov bol určovaný pomocou ultrazvuku a pohlavie dieťaťa bolo následne overené po pôrode. Do výskumu boli zahrnuté jedine tehotenstvá s plodom mužského pohlavia. Zúčastnilo sa 238 tehotných žien v rôznych trimestroch tehotenstva – v prvom trimestri (9. – 11. týždeň tehotenstva) 81 žien, v druhom trimestri (19. – 21. týždeň tehotenstva) 71 žien a v treťom trimestri (29. – 32. týždeň tehotenstva) 86 tehotných žien. Taktiež u 50 tehotných žien boli odobraté vzorky krvi vo všetkých troch trimestroch. Odbery boli prevádzané v termínoch biochemického a ultrazvukového skríningu.

Od tehotných žien bolo odobratých 8 ml periférnej krvi do protizrážanlivého prípravku EDTA. Vzorky boli spracované do 24 hodín a po túto dobu boli skladované v chladničke pri 8 °C.

4.6 Separácia plazmy

Z periférnej krvi bola v sterilnej 15 ml polypropylénovej skúmavke separovaná plazma pomocou centrifugácie vo výkyvnom rotore pri 1 600 otáčkach a 10 °C po dobu 10 minút. Supernatant bol opatrne premiestnený do čistej polypropylénovej skúmavky typu Falcon a následne rozpipetovaný do sterilných 1,5 ml skúmaviek typu Eppendorf. Takto rozdelená plazma sa ďalej centrifugovala vo výkyvnom rotore pri 14 000 otáčkach a 10 °C po dobu 10 minút. Pelet vzniknutý pri centrifugácii obsahuje reziduálne intaktné bunky a bunkové zvyšky. Supernatant bol rozdelený po 1 ml do viacerých 1,5 ml skúmaviek typu Eppendorf. Všetky vzorky boli do ďalšieho spracovania uskladnené pri – 25 °C. V deň spracovania plazmy sa vzorky nechali pomaly rozmraziť.

4.7 Izolácia DNA

Izolácia fetálnej DNA je sprevádzaná súbežnou izoláciou genómovej DNA matky. Je preto nevyhnutné dostatočne oddeliť intaktné jadrové bunky matky opakovanou centrifugáciou pri vysokých otáčkach. Zaisťuje sa tým zastúpenie materskej DNA v izolovanej zmesi DNA v čo najnižšom pomere. Fetálna DNA sa v materskej krvi vyskytuje prevažne ako voľná fragmentovaná DNA o veľkosti najčastejšie do 100 párov bazí. Výber izolačnej metódy preto musí zohľadňovať tento fenomén.

4.7.1 Manuálna izolácia

Manuálna izolácia je založená na absorpcii izolovanej DNA na nosiči, odstránení nečistôt a elúcii DNA z nosiča elučným pufrom s nízkou iónovou silou. Za týmto účelom boli vybrané a vyskúšané 2 izolačné kity:

- a) QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)

Izolácia DNA bola prevádzaná zo 600 µl plazmy. Vzhľadom k tomu, že izolačné postupy sú navrhnuté na objem 200 µl vstupného biologického materiálu, bolo nutné proporcionálne zvýšiť jednotlivé objemy izolačných pufrov a Proteinázy K. Po

pomalom rozmrznutí bolo 600 μ l plazmy premiestnených do 2 ml skúmavky. K tejto plazme bolo pridaných 60 μ l Proteinázy K a 600 μ l AL lyzačného pufru a zmes bola následne vortexovaná po dobu 15 sekúnd a inkubovaná po dobu 10 minút pri 56 °C na ohrievacej platničke. Po krátkej centrifugácii na odstránenie kvapiek z vnútornej strany viečka skúmavky bolo k zmesi pridaných 600 μ l 96 % etanolu. Vzorky boli opäť vortexované po dobu 15 sekúnd a krátko centrifugované. 600 μ l vzniknutej zmesi bolo premiestnených do QIAamp centrifugačných kolóniek a následne centrifugované pri 8 000 otáčkach po dobu 1 minúty. Proces bol opakovaný až kým cez kolónky QIAamp neprešiel celý objem vzniknutej zmesi, pričom pred každým centrifugačným krokom bola vymenená zberná skúmavka s filtrátom. Do QIAamp kolónky bolo pridaných 500 μ l premývacieho AW1 pufru a vzorky boli centrifugované pri 8 000 otáčkach po dobu 1 minúty s následnou výmenou skúmavky s filtrátom. Po tejto centrifugácii bolo pridaných 500 μ l premývacieho AW2 pufru a vzorky boli centrifugované pri 14 000 otáčkach po dobu 3 minút s následnou výmenou skúmavky s filtrátom. Pre úplné odstránenie premývacieho pufru boli vzorky centrifugované pri 14 000 otáčkach po dobu 1 minúty. QIAamp centrifugačné kolónky boli premiestnené do 1,5 ml skúmaviek typu Eppendorf a k vzorkám bolo pridaných 200 μ l elučného AE pufru. Následne boli inkubované pri izbovej teplote po dobu 1 minúty a elúcia DNA prebiehala pri centrifugácii pri 8 000 otáčkach po dobu 1 minúty.

b) High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics)

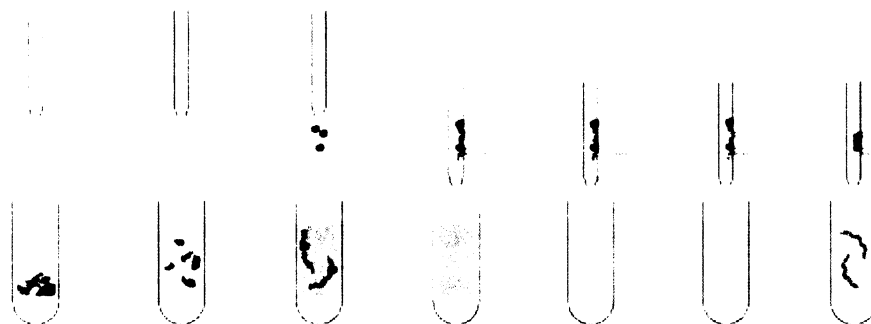
Izolácia DNA bola prevádzaná taktiež zo 600 μ l plazmy. Tak ako u predchádzajúceho izolačného kitu sú izolačné postupy navrhnuté na objem 200 μ l vstupného biologického materiálu, preto bolo nutné proporcionálne zvýšiť jednotlivé objemy izolačných pufov a Proteinázy K. Po pomalom rozmrznutí boli vzorky plazmy centrifugované pri 16 000 otáčkach po dobu 5 minút a 600 μ l plazmy bolo premiestnených do 2 ml skúmavky. Po pridaní 600 μ l viažuceho pufru a 60 μ l Proteinázy K boli vzorky premiešané a inkubované po dobu 10 minút pri 72 °C na ohrievacej platničke. Počas inkubácie boli niekoľkokrát premiešané. Po ukončení inkubácie bolo pridaných 300 μ l izopropanolu a vzorky boli dôkladne premiešané. 600 μ l z každej vzniknutej zmesi bolo premiestnených do skúmaviek obsahujúcich silica filter so sklenenými vláknami pre zachytenie DNA a následne centrifugované pri 8 000 otáčkach po dobu 1 minúty. Proces bol opakovaný až kým cez skúmavky so silica filtrom neprešiel celý objem vzniknutej zmesi, pričom pred každým centrifugačným

krokom bola vymenená zberná skúmavka s filtrátom. Následne bolo pridaných 500 μ l pufru odstraňujúceho inhibítory a vzorky boli centrifugované pri 8 000 otáčkach po dobu 1 minúty s následnou výmenou skúmavky s filtrátom. Na odstránenie nečistôt sa 2x použilo 500 μ l premývacieho pufru, pričom po každom pridaní nasledovala centrifugácia pri 8 000 otáčkach po dobu 1 minúty a výmena skúmavky s filtrátom. Pre úplné odstránenie premývacieho pufru boli všetky vzorky centrifugované pri 13 000 otáčkach po dobu 15 sekúnd. Skúmavky so silica filtrom boli premiestnené do 1,5 ml skúmaviek typu Eppendorf a inkubované pri 70 °C na ohrievacej platničke po dobu 10 minút. Po tejto dobe bolo k vzorkám pridaných 50 μ l elučného pufru a inkubácia pokračovala ešte 1 minútu. DNA sa eluovala počas centrifugácie pri 8 000 otáčkach po dobu 1 minúty do skúmavky typu Eppendorf. Izolovaná DNA bola skladovaná pri 4 °C ak mala PCR reakcia prebehnúť maximálne do 1 týždňa. Pre dlhšie skladovanie bola zamrazená pri – 20 °C.

Nevýhodou manuálnej izolácie je nebezpečenstvo kontaminácie cudzorodou DNA (napr. Y sekvencie v prípade obsluhy mužského pohlavia), časová náročnosť pri izolácii väčšieho počtu vzoriek a nereprodukovateľnosť výtťažkov izolácie. Aby sa čo najviac predišlo kontaminácii, všetky kroky spracúvania vzoriek a izolácie DNA boli vykonávané osobami ženského pohlavia. Taktiež počas všetkých týchto krokov a aj následnej PCR reakcii boli na pipetovanie používané aerosol – rezistentné špičky typu ep T.I.P.S., Eppendorf.

4.7.2 Automatická izolácia

Automatická izolácia na izolačnej stanici je založená na absorpcii izolovanej DNA na magnetických časticich, ich separácii, odstránení nečistôt a spätnom transporte do elučného pufru (obr. č. 8). Výhodou je úplne automatický proces bez nebezpečenstva kontaminácie vzoriek, rýchlosť, reprodukovateľnosť a možnosť izolácie z veľkého objemu plazmy (až 1 ml) s výslednou DNA zakoncentrovanou do minimálneho objemu elučného pufru.



Obr. č. 8: Automatická izolácia na izolačnej stanici

(Zdroj: <http://www.biocompare.com/technicalarticle/852/>)

Na izoláciu bola využitá izolačná stanica firmy Roche - MagNA Pure LC systém s kapacitou 32 izolácií a použité boli tieto izolačné kity:

MagNA Pure LC DNA Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics)

Kit je určený pre izoláciu genómovej DNA z veľkých objemov vzorky (až 1 ml), predovšetkým krvi a bunkových kultúr, a jej zakoncentrovanie do minimálneho objemu 200 μ l. Aj keď existujú v odbornej literatúre informácie o úspešnom využití tohto kitu pre účely izolácie fetálnej DNA z plazmy a jej následnej kvantifikácii (Huang *et al.*, 2005), v našich podmienkach sme nedošli k rovnakým záverom ako autori. Príčinou boli veľmi nízke výsledné hodnoty stanovovanej fetálnej DNA z takto izolovaných vzoriek plazmy, a to v radoch desiatín genómových ekvivalentov (výsledky nie sú uvádzané). Ako nepoužiteľný bol preto kit z ďalších analýz vyradený. Nevieme, čo bolo príčinou takto rozdielnych výsledkov, ale jednou z uvažovaných možností môže byť aj rozdielna citlivosť prístrojov na Real-time PCR, resp. ich optických systémov.

MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics)

Kit je určený pre izoláciu voľných nukleových kyselín až z 1 ml séra či plazmy. Svojou charakteristikou je priamo predurčený pre stanovovanie voľnej fetálnej DNA v plazme, aj keď podľa informácií z odbornej literatúry (Chiu *et al.*, 2005) nie je tento kit pre stanovovanie SRY sekvencií plodu najvhodnejší – nielen pre nízku koncentráciu výslednej izolovanej fetálnej DNA vo vzorkách, ale aj pre malú úspešnosť následnej PCR reakcie. Tieto výsledky sa však v našich experimentoch vôbec nepotvrdili, naopak, tento izolačný postup bol nami vyhodnotený ako najoptimálnejšia varianta zo všetkých použitých metodík.

4.8 Preukázanie pohlavia metódou PCR

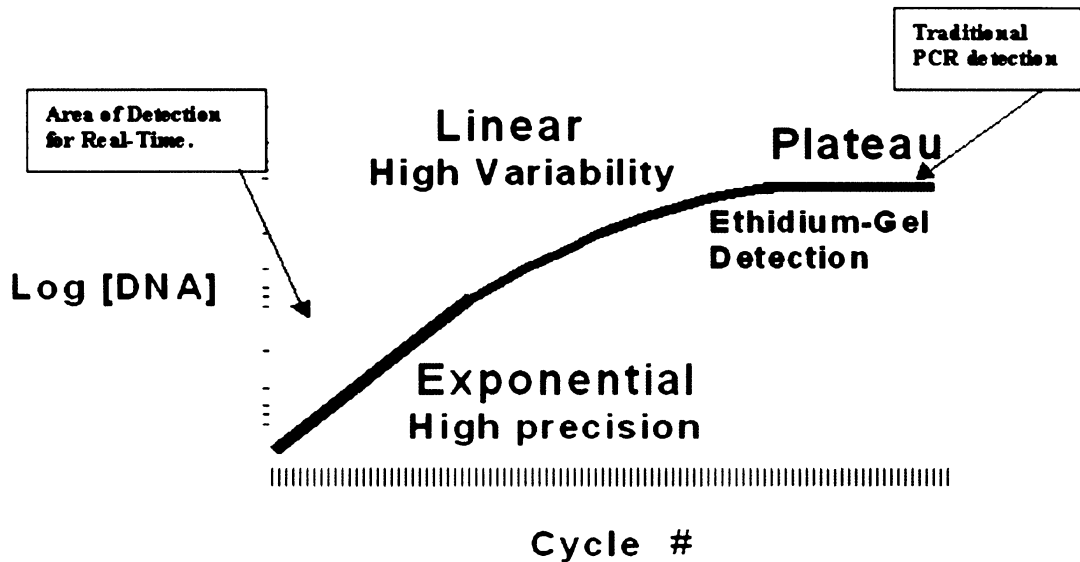
Úspešne sme zaviedli PCR s primermi komplementárnymi na SRY lokus Y chromozómu. Systém vyhovel potrebám klasickej PCR reakcie pri dostatočnom množstve vstupujúcej DNA, ale nebol citlivý pre mikrokvantá stanovovaného materiálu na úrovni jednotiek až desiatok genómových ekvivalentov, a to predovšetkým v ranných štádiách tehotenstva. Toto usporiadanie navyiac nedovoľuje ani presnú kvantifikáciu, pretože je založené na subjektívnom nepresnom porovnaní intenzity signálu PCR produktu so štandardom v agarózovom či polyakrylamidovom gele. Preto bolo od tohto postupu upustené a bol nahradený metódou Real-time PCR.

4.9 Metóda Real-time PCR

V posledných pár rokoch bola predstavená nová metóda PCR kvantifikácie. Ide o Real-time PCR, reakciu, ktorá umožňuje sledovať proces PCR, zvyšovanie sa množstva DNA tak, ako sa postupne amplifikuje, čiže v reálnom čase. Real-time PCR systém je založený na detekcii a kvantifikácii fluorescenčnej značky. Signál stúpa v priamej úmere k množstvu PCR produktu v reakcii. Zaznamenávaním množstva fluorescenčnej emisie v každom cykle je možné monitorovať PCR reakciu počas exponenciálnej fáze, kde prvé významné zvýšenie množstva PCR produktu koreluje s počiatočným množstvom cieľového templátu. Čím vyššie je počiatočné množstvo kópií nukleových kyselín, tým skôr je pozorované významné zvýšenie fluorescencie. Významné zvýšenie fluorescencie nad hodnotu pozadia merané počas 3 – 15 cyklov umožňuje detekciu akumulovaného PCR produktu.

Oproti klasickej PCR, kde sa detekcia prevádza pomocou agarózového gelu až po ukončení reakcie vo fáze plató, je výhodou možnosť detekcie akumulovaného produktu už v prvej, exponenciálnej fáze reakcie (obr. č.: 9). V tejto fáze sa presným zdvojením produkt amplifikuje v každom cykle. Efektivita reakcie je 100 %. Reakcia je veľmi špecifická a precízna. V ďalšej lineárnej fáze sa reakcia spomaľuje, komponenty reakcie sa spotrebúvajú a produkty začínajú postupne degradovať. V poslednej fáze plató sa reakcia zastavuje, nevytvárajú sa žiadne produkty a po dlhšom státi produkty postupne degradujú. Aj keď vzorky vstupujú do PCR reakcie s rovnakým množstvom templátovej DNA, vo fáze plató sa môže ich množstvo javiť ako rozdielne. Práve preto je oveľa precíznejšie previesť meranie počas exponenciálnej fáze. Vývoj Real-time kvantitatívnej PCR eliminoval variabilitu, ktorá bola tradične spájaná

s kvantitatívnou PCR, čo umožňuje rutinnú a spoľahlivú kvantifikáciu PCR produktov. Tento prístroj teda poskytuje vedeckým pracovníkom možnosť vykonávať veľmi citlivé, precízne a reprodukovateľné merania hladín génovej expresie.



Obr. č. 9: PCR fáze v logaritmickom meradle.

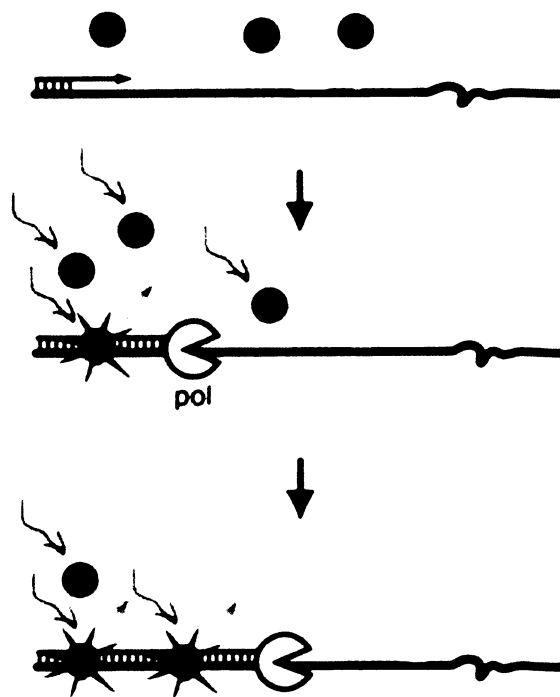
(Zdroj: http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtqpcr_vs_tradqpcr.pdf)

Real-time PCR systém je založený na detekcii a kvantifikácii fluorescenčnej značky. Podľa molekuly použitej na detekciu môžeme Real-time PCR techniky rozdeliť do dvoch kategórií:

- nešpecifická detekcia založená na použití značiek viažucich sa na DNA
- špecifická detekcia založená na použití špecifických sond

Nešpecifická detekcia, ktorá je lacnejšou alternatívou, využíva väzbu značky na dvojreťazcovú DNA. Produkt amplifikácie sa kvantifikuje využitím sekvenčne nešpecifického interkalačného činidla – SYBR-green či ethidium bromid. (obr. č. 10) Tieto interkalačné činidlá sa na jednoreťazcovú DNA neviažu. SYBR-green je fluorescenčné farbivo, ktoré sa špecificky viaže do malého žliabku dsDNA. Nenaviazané v roztoku fluoreskuje veľmi málo, avšak po naviazaní na dsDNA poskytuje silný fluorescenčný signál. Nevýhody Real-time PCR založenej na SYBR-green zahrňujú nároky na obsahlu optimalizáciu. Okrem toho nešpecifická amplifikácia vyžaduje overovanie postupu pre identifikáciu amplikonov. Ďalším kontrolovateľným

problémom je vytváranie silnejšieho signálu dlhšími amplikonmi, čo môže v kombinácii s ďalšími faktormi spôsobiť saturáciu CCD kamery. SYBR-green sa využíva pri singleplexových reakciách.



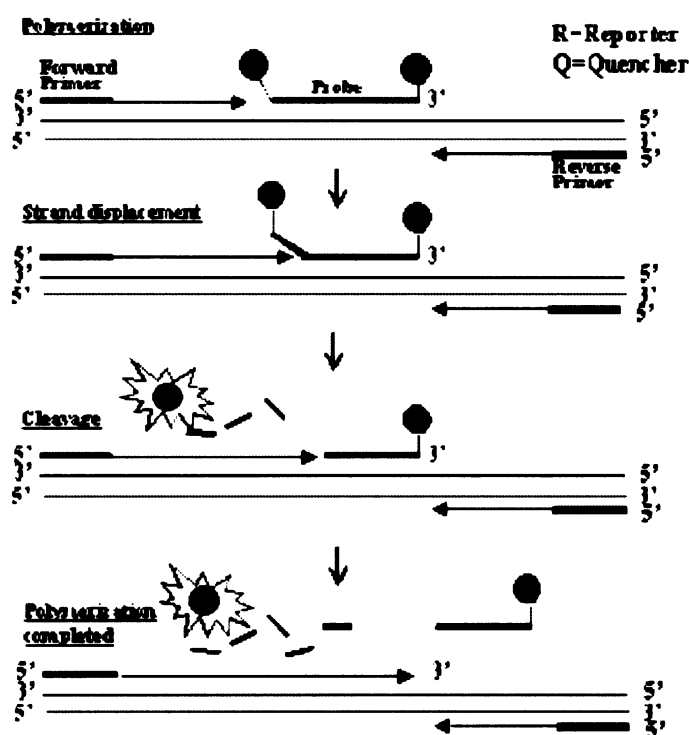
Obr. č. 10: Real-time PCR s použitím SYBR-green
(Zdroj: www.au.poznan.pl/~mschmidt/realpisuar.htm)

Špecifická detekcia je založená na niekoľkých druhoch oligonukleotidových sond:

- TaqMan[®] sondy
- TaqMan[®] MGB sondy
- Molekulárne signály
- Scorpions[®] primery

TaqMan[®] sondy (obr. č. 11) sú oligonukleotidy dlhšie ako primery (20 – 30 báz dlhé s T_m hodnotou o 10°C vyššou), ktoré obsahujú fluorescenčnú značku zvyčajne na 5' konci a zhášač (zvyčajne TAMRA) na 3' konci. Po ožiarení excitovaná fluorescenčná značka prenesie energiu na blízku molekulu zhášača namiesto toho, aby fluoreskovala (nazýva sa to FRET = Försterov či fluorescenčný rezonančný prenos energie). Takže

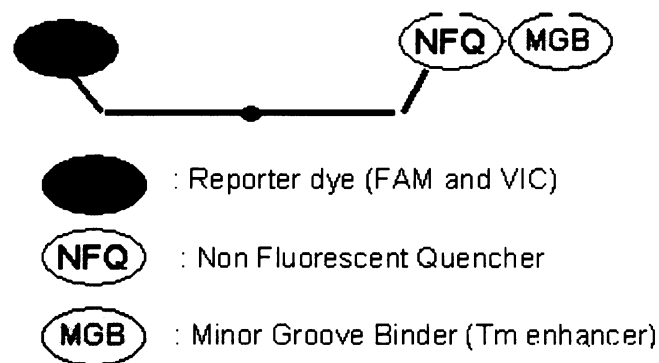
blízke susedstvo reportéra a zhášača zabraňuje vyžiareniu akejkoľvek fluorescence kým je sonda intaktná. TaqMan[®] sondy sú nadizajnované tak, aby sa viazali do vnútornej oblasti PCR produktu medzi oba primery. Keď polymeráza replikuje templát, na ktorom je naviazaná sonda, jej 5' exonukleázová aktivita postupne sondu odbúrava. Týmto sa ukončuje aktivita zhášača a reportérova značka začína emitovať fluorescenčné žiarenie, ktoré sa zvyšuje v každom cykle priamo úmerne k miere odbúravania sondy. Akumulácia PCR produktov je detegovaná monitorovaním stúpajúcej fluorescence reportérovej značky. TaqMan[®] systém využíva všeobecné parametre termálnych cyklérov a podmienky PCR reakcie. Pretože odbúravanie nastáva iba v prípade, že sonda hybridizuje s cieľovou sekvenciou, detegovaná fluorescencia pochádza iba zo špecifickej amplifikácie. Proces hybridizácie a odbúravania sondy nezasahuje do exponenciálnej akumulácie produktu. Jedným zo špecifických požiadaviek na sondu obsahujúcu fluorofor je, že na svojom 5' konci nesmie obsahovať bázu G. Guanin susediaci s reportérovou značkou zhasína reportérovú fluorescenciu dokonca aj po odbúraní sondy. Dobre navrhnuté TaqMan[®] sondy vyžadujú veľmi málo optimalizácie.



Obr. č. 11: Real-time PCR s použitím TaqMan[®] sondy

(Zdroj: www.rikshospitalet.no/view/readavdi.asp?nPubID=1804)

TaqMan[®] MGB sondy (obr. č. 12) sú taktiež dvojito značené. Na 5' konci obsahujú fluorescenčnú značku (FAM, VIC, TET alebo NED) a na 3' konci nefluorescenčný zhášač. Použitie nefluorescenčne značeného zhášača vedie k výraznému zníženiu pozadia fluorescenčného signálu. Fluorescencia reportérovej značky môže byť meraná s väčšou precíznosťou. MGB, naviazané na nefluorescenčnom zhášači, je malá molekula viažuca sa do malého žliabku dvojreťazcovej DNA a dodáva sonde značnú stabilitu, zvyšuje teplotu topenia (T_m) sondy počas amplifikácie a umožňuje tak použitie kratších sond.

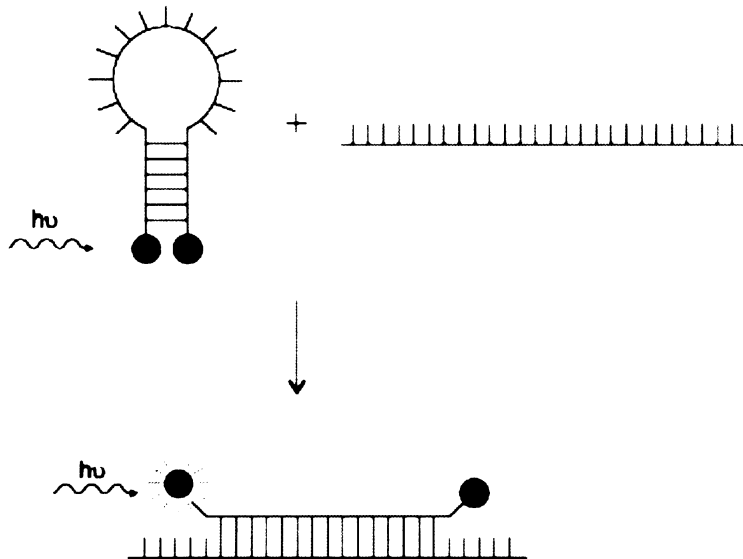


Obr. č. 12: TaqMan[®] MGB sonda

(Zdroj: <http://www.genecore.com/taqman.asp>)

Molekulárne signály (molecular beacons) (obr. č. 13) taktiež obsahujú fluorescenčnú (FAM, TAMRA, TET, ROX) a zhášajúcu značku (DABCYL) na každom z koncov. Sú to veľmi špecifické sondy, ktorých stredná časť (15 – 30 nukleotidov) je komplementárna k detegovanej sekvencii DNA a okrajové, 6 nukleotidov dlhé úseky sú komplementárne navzájom. Ak je sonda pripojená ku komplementárnej DNA, reportérová značka je oddelená od zhášača, fluorofor svieti. Voľné v roztoku vytvárajú vlásenkovú štruktúru, v ktorej sa dostanú zhášač a fluorofor do tesnej blízkosti a to má za následok, že fluorescencia je zhášaná, dochádza k FRET. Voľná sonda nesvieti. Molekulárne signály zostávajú počas PCR intaktné, každý ďalší cyklus reakcie sa musia na cieľovú sekvenciu znovu naviazať, aby došlo k emisii fluorescencie. Táto emisia fluorescencie je v priamom vzťahu s množstvom dostupného PCR produktu. Všetky Real-time PCR špecifické postupy umožňujú detekciu viacerých DNA sekvencií naraz, a to navrhnutím každej sondy / molekulárneho signálu so spektrálne unikátnym párom

fluoroforu a zhášača. Pri mnohonásobnej reakcii (multiplex) môžu byť cieľové sekvencie a endogénne kontroly amplifikované v jedinej skúmavke.

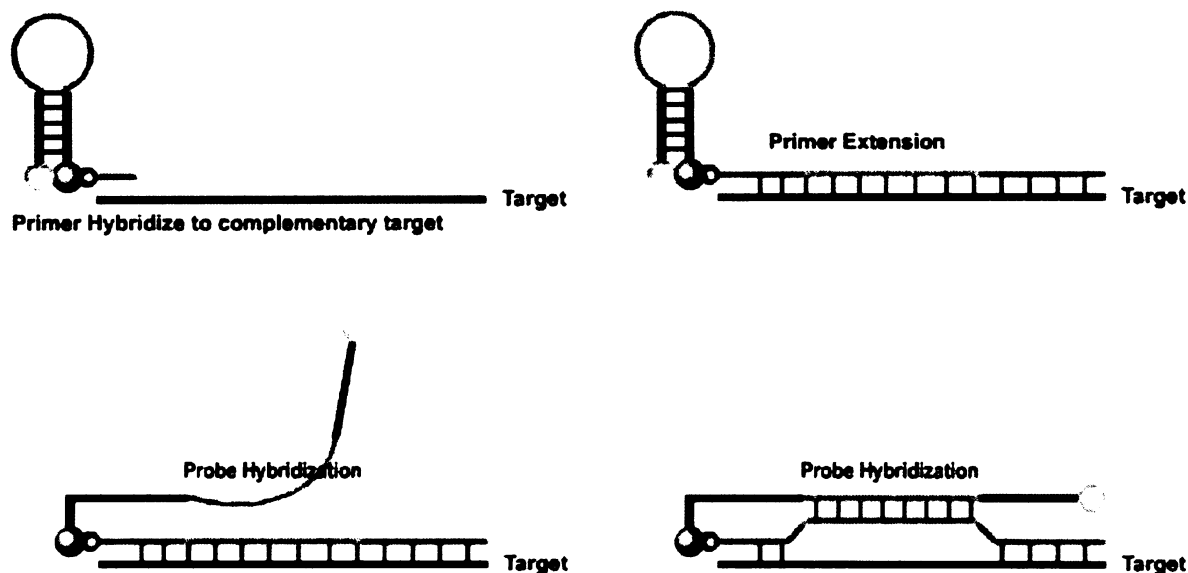


Obr. č. 13: Real-time PCR s použitím molekulárných signálov

(Zdroj: www.clinical-virology.org/pages/cvn/vir_all/cvn_gp_how.html)

Scorpions® primery (obr. č. 14) obsahujú na svojom 5' konci naviazanú sondu. Táto sonda má vzájomne komplementárnu sekvenciu vytvárajúcu v nehybridizovanom stave vlásenku, ktorá obsahuje na jednom konci zhášač a na druhom fluorofor. V neprítomnosti cieľovej sekvencie zhášač takmer úplne absorbuje fluorescenciu emitovanú fluoroforom. Počas PCR reakcie v prítomnosti cieľovej sekvencie sa od seba fluorofor a zhášač oddelia, čo vedie k zvyšovaniu emitovanej fluorescencie, ktorá môže byť detegovaná a meraná. Sekvencia primeru je na jeho 5' konci modifikovaná. Na začiatku vlásenky obsahuje blokátor PCR reakcie. V počiatočných cykloch reakcie primer hybridizuje k cieľovej sekvencii a vďaka polymeráze dochádza k predlžovaniu reťazca. Po prvom ukončenom predlžovaní primeru sa novo nasynthesized cieľová sekvencia pripojí k sonde. V priebehu denaturácie a anílingu druhého cyklu sonda a cieľová sekvencia stále hybridizujú. Vedie to k oddeleniu fluoroforu a zhášača a spôsobuje emisiu. Scorpions® primery môžu byť použité k identifikácii bodových mutácií použitím viacerých sond v jednej reakcii. U Scorpions® primerov je sonda fyzicky spojená s primerom, čo znamená, že reakcia, ktorá generuje signál je založená

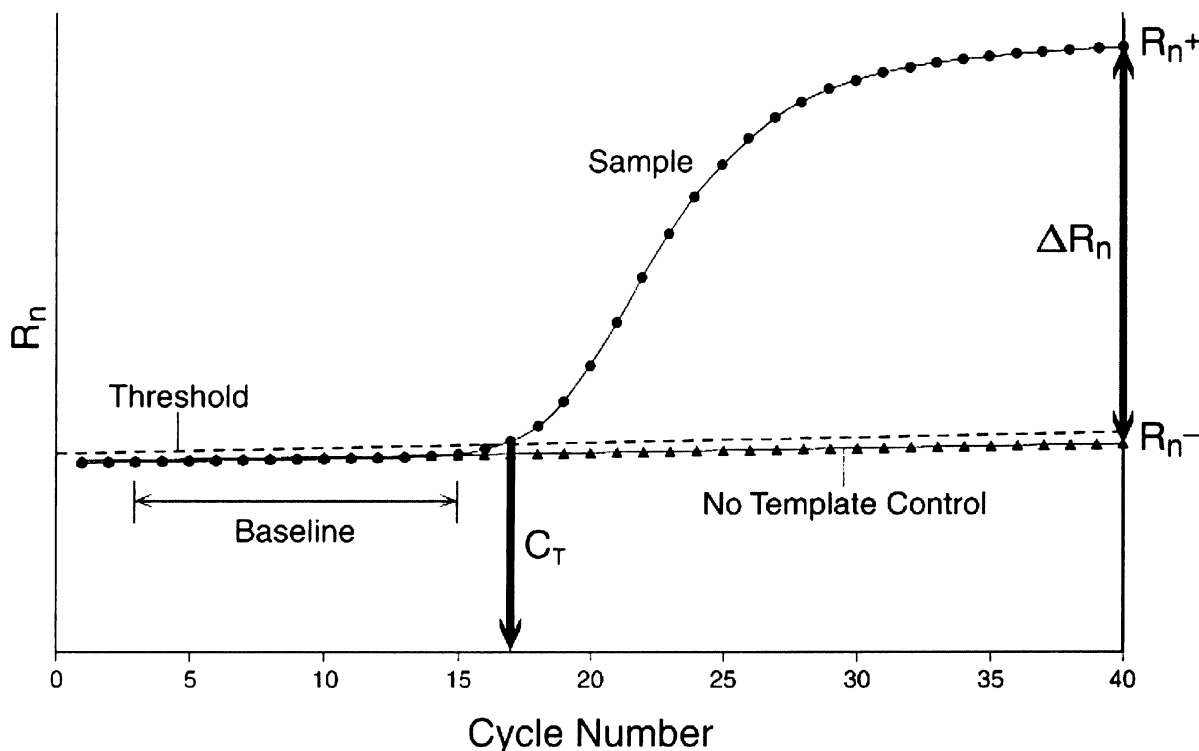
len na jedinej molekule. Práve v tomto kontrastuje s technológiami TaqMan® či molekulárnymi signálmi, ktoré sú založené na dvoch molekulách.



Obr. č. 14: Real-time PCR s použitím Scorpions® primerov
(Zdroj: www.premierbiosoft.com/tech_notes/Scorpion.html)

Priebeh Real-time PCR reakcie zaznamenáva amplifikačný graf na obr. č. 15 . Vyjadruje vzťah medzi fluorescenčným signálom a počtom cyklov. Pri typickej reakcii sa PCR produkt vytvára exponenciálne, graf má sigmoidálny tvar. V počiatočných cykloch reakcie je zaznamenané len veľmi malé množstvo fluorescence, ktoré je označované ako základná hodnota (baseline). Zvýšenie fluorescence nad základnú hodnotu indikuje detekciu akumulovaného PCR produktu. Fixný fluorescenčný prah je položený signifikantne nad základnú čiaru vo fáze exponenciálneho rastu (ktorá vyzerá lineárna v logaritmicknej transformácii) a môže byť menená obsluhou. V neskorých cykloch sú substráty reakcie vyčerpané, PCR produkt sa už nezdvouje a krivka sa začína vyrovnávať. Miesto na krivke, v ktorom začína množstvo fluorescence rapídne lineárne stúpať, zvyčajne niekoľko štandardných odchyliet od základnej hodnoty, je nazývané ako prahový cyklus (threshold cycle) či hodnota Ct. Tento parameter Ct je definovaný aj ako číslo cyklu, v ktorom fluorescencia presiahla fixný fluorescenčný prah. Hodnota Ct vypovedá o množstve špecifickej templátovej DNA, ktorá bola vložená do reakcie na začiatku. Čím väčšie je počiatočné množstvo genómovej DNA,

tým skôr je naakumulovaný produkt v PCR reakcii detegovaný a tým je hodnota C_t nižšia. Niektoré softwary umožňujú determináciu prahového cyklu C_t pomocou matematickej analýzy rastovej krivky. Umožňuje to lepšiu reprodukovateľnosť jednotlivých sérií meraní. Hodnota C_t vyššia ako 40 vypovedá o tom, že amplifikácia neprebehla, a preto táto hodnota nemôže byť zahrnutá k výpočtom.



Obr. č. 15: Amplifikačný graf Real-time PCR reakcie

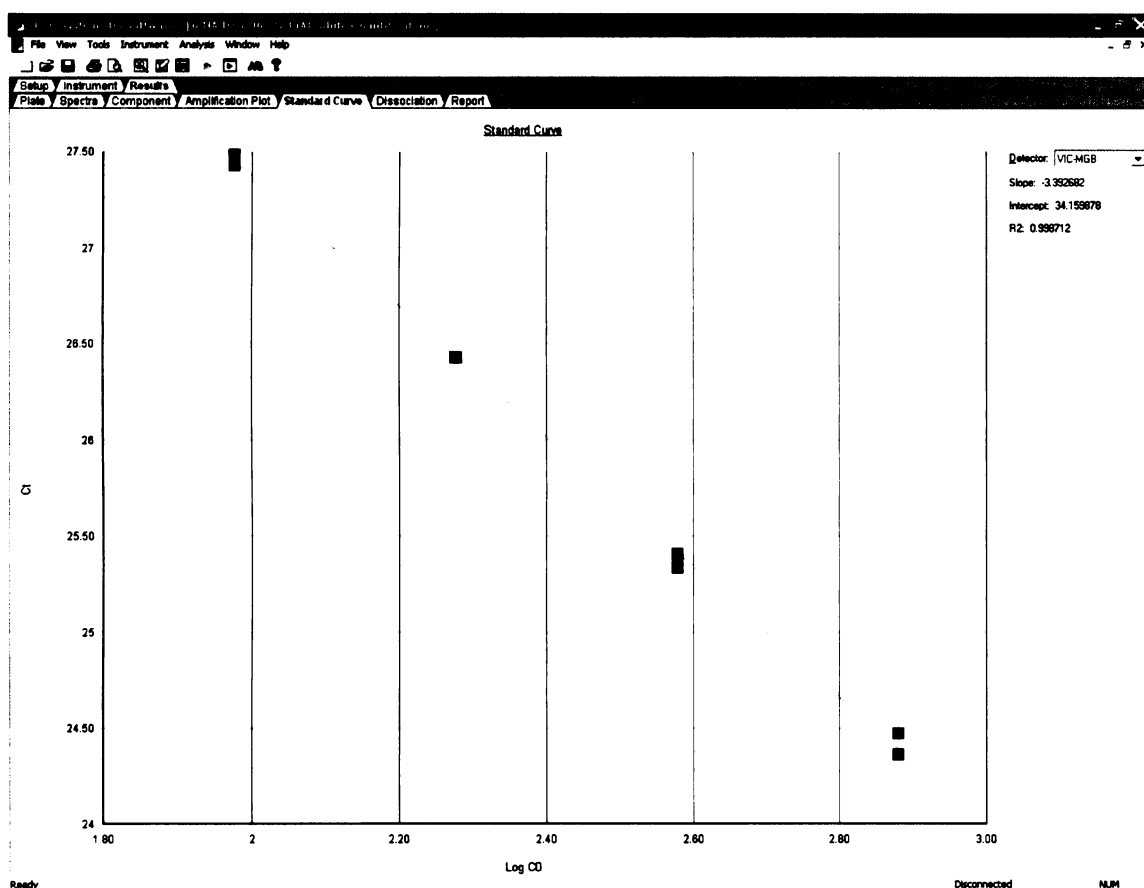
(Zdroj: <http://dna-9.int-med.uiowa.edu/realtime.htm>)

Jednou z možností kvantifikácie PCR produktu je využitie štandardnej krivky (obr. č. 16). Vzniká ako závislosť parametra C_t a koncentrácií sady štandardov v logaritmickej transformácii. Kvantifikácia množstva cieľových sekvencií v neznámych vzorkách je dosiahnutá meraním C_t hodnoty a použitím štandardnej krivky k určeniu počiatočného množstva kópií. Celý proces výpočtu hodnôt C_t , zostrojenie štandardnej krivky a určenia množstva cieľových sekvencií v neznámych vzorkách je vykonávaný softwarom prístroja.

Smernica štandardnej krivky v lineárnej fáze v logaritmickej transformácii odráža efektivitu amplifikácie. Efektivita reakcie (E) môže byť získaná zo vzťahu:

$$E = 10^{-1/\text{smernica}} - 1$$

Efektivita PCR reakcie by mala byť v rozmedzí 90 – 100 % ($-3,6 > \text{smernica} > -3,1$). Na efektivitu PCR reakcie môže vplývať množstvo premenných. K týmto faktorom patrí taktiež dĺžka amplikonu, sekundárna štruktúra a kvalita primerov. Hoci platné dáta môžu byť získané aj keď nespádajú do rozmedzia efektivity, Real-time PCR musí byť ďalej optimalizovaná alebo musia byť navrhnuté alternatívne amplikony. Aby mohla byť smernica krivky indikátorom reálnej amplifikácie musí obsahovať inflexný bod. Je to bod na rastovej krivke, v ktorom začína lineárna fáza v logaritmickej meradle. Taktiež reprezentuje najväčšiu mieru zmeny pozdĺž rastovej krivky.



Obr. č. 16: Ukážka štandardnej krivky pre Real-time PCR obsahujúcej 4 štandardy o rôznych koncentráciách

Existujú rôzne postupy kvantifikácie množstva templátu:

1. Metóda štandardnej krivky pre absolútnu kvantifikáciu: Absolútna kvantifikácia určuje počet kópií cieľovej sekvencie, ktorá vstúpila do reakcie, porovnaním PCR signálu so štandardnou krivkou. Prvým krokom je zosťrojenie

štandardnej krivky z DNA o známej koncentrácii. Táto krivka je následne použitá ako porovnávací štandard pre odhadnutie neznámeho množstva cieľovej sekvencie.

2. Metóda štandardnej krivky pre relatívnu kvantifikáciu: Pri tejto metóde je kvantita vyjadrovaná relatívne k jednej zo skúmaných vzoriek nazývanej kalibrátor, či referenčný gén. Pre všetky skúmané vzorky je cieľové množstvo odvodené zo štandardnej krivky a predelené množstvom kalibrátora. Kalibrátor sa stáva 1x násobkom vzorky a všetky ďalšie množstvá sú vyjadrené ako $n -$ násobok. Kalibrátor má zvyčajne hladinu expície úplne na základnej hodnote a musí byť dostupný vo väčšom množstve, aby mohol byť zahrnutý v každej sérii pokusu. Meranie tohto referenčného génu slúži na normalizáciu expície cieľového génu. Zvyčajne to je tzv. housekeeping gén, ktorého expresia sa považuje za konštantne stabilnú. Najčastejšie používanými sú β -aktín, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH), ribozomálna RNA alebo iné RNA.

3. Metóda porovnávania Ct pre relatívnu kvantifikáciu: Táto metóda nevyužíva známe množstvo štandardu ale porovnáva relatívne množstvo cieľovej sekvencie s vybranou hodnotou referencie a výsledok je daný ako relatívny k hodnote referencie. Aby bolo porovnanie na základe Ct platné, musí byť efektivita amplifikácie cieľovej sekvencie a efektivita amplifikácie referenčného génu približne rovnaká.

4.10 Preukázanie pohlavia metódou Real-time PCR

Analýza bola prevádzaná na prístroji ABI PRISM 7 000 (Applied Biosystems) v objeme 25 μ l s využitím 12,5 μ l TaqMan Universal PCR Master Mixu (Applied Biosystems) s Uracil DNA N-glykozylázou (AmpErase UNG) ako prevenciou kontaminácie. Reakcia prebiehala s 5 μ l izolovanej DNA – zmes maternálnej a fetálnej DNA, sadou príslušných primerov (výsledná koncentrácia 300 nM) a fluorescenčne značenou (FAMTM, VICTM) TaqMan či MGB sondou (200 nM). PCR reakcia bola pripravovaná na chladenom stojančeku. Všetky komponenty reakcie sa nechali pomaly rozmraziť, pred použitím sa krátko zvortexovali a zcentrifugovali.

Pre detekciu pohlavia boli použité lokusy SRY a DYS 14 lokalizované na Y chromozóme, pričom oblasť DYS 14 je charakterizovaná aj ako tzv. „multi-copy gene“ s minoritnou komplementaritou aj k iným sekvenciám než výhradne k Y chromozómu. Sekvencie primerov boli zvolené podľa autorov Zimmermann *et al.* 2005:

SRY forward: 5`-TCC TCA AAA GAA ACC GTG CAT-3`

SRY reverse: 5`-AGA TTA ATG GTT GCT AAG GAC TGG AT-3`

SRY MGB sonda: 5`-(FAMTM) TCC CCA CAA CCT CTT-3`

DYS14 forward: 5`-GGG CCA ATG TTG TAT CCT TCT C-3`

DYS14 reverse: 5`-GCC CAT CGG TCA CTT ACA CTT C-3`

DYS14 MGB sonda: 5`-(VICTM) TCT AGT GGA GAG GTG CTC-3`

Reakčná zmes pre detekciu lokusu SRY:

SRY MGB sonda	1 µl
SRY forward primer	0,75 µl
SRY reverse primer	0,75 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µl
voda bez RNáz	5 µl
izolovaná DNA	5 µl

Reakčná zmes pre detekciu lokusu DYS 14:

DYS14 MGB sonda	1 µl
DYS14 forward primer	2,25 µl
DYS14 reverse primer	2,25 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µl
voda bez RNáz	2 µl
izolovaná DNA	5 µl

Real-time PCR prebiehala v dĺžke 45 cyklov s počiatočnou 2 minútovou inkubáciou pri 50 °C (aktivácia UNG a následná deštrukcia prípadného Real-time PCR produktu z predchádzajúcej reakcie), s následnou 10 minútovou denaturáciou pri 95 °C a s jednotlivými cyklami pozostávajúcimi z 15 sekúnd pri 95 °C a 1 minúty pri 60 °C. Všetky vzorky boli analyzované v triplikátoch a na reakčnej 96 jamkovej doske bola prítomná aj „non-template“ negatívna kontrola bez izolovanej DNA. Prítomnosť Y sekvencie (mužského pohlavia plodu) bola stanovená na základe existencie amplifikačnej krivky pretínajúcej líniu „threshold“ v oblasti logaritmickej fáze.

4.11 Kvantifikácia voľnej fetálnej DNA v materskej plazme metódou real–time PCR

Kvantifikácia DNA metódou Real–time PCR je založená na porovnávaní amplifikačnej krivky vzorky s neznámou koncentráciou s amplifikačnou krivkou známeho hmotnostného štandardu, resp. porovnávaním Ct (treshold cycle) štandardnej krivky vytvorenej postupným riedením štandardu o definovanej koncentrácii s Ct amplifikačnej krivky stanovovanej vzorky. Kvantifikácia voľnej fetálnej DNA plne vychádza z metódy preukázania pohlavia metódou Real–time PCR, avšak s prídavnou amplifikáciou štandardnej krivky a s následným odčítaním voľnej fetálnej DNA v stanovovanej vzorke.

Okrem detekcie SRY a DYS 14 sekvencií bola zavedená aj kvantifikácia celkového obsahu fetálnej a materskej DNA v plazme za pomoci sekvencií housekeeping génu pre glycerinaldehyd–3–fostát dehydrogenázu (GAPDH) lokalizovanom na nepohlavnom chromozóme číslo 12. Normalizácia pomocou housekeeping génu využíva skutočnosti, že hladina housekeeping génov je v rôznych bunkách a za rôznych fyziologických podmienok konštantne stabilná. Tento fakt sa využíva ku korekcii individuálnych odchýlok vzniknutých pri pipetovaní, riedení či meraní koncentrácie vzorky medzi jednotlivými meraniami. Výsledná relatívna koncentrácia je vyjadrovaná ako pomer špecifického génu (SRY, DYS 14) a referenčného génu GAPDH.

Sekvencie primerov a TaqMan próby boli zvolené podľa autorov Johnson *et. al* 2004:

GAPDH forward: 5`-CCCCACACACATGCACTTACC-3`

GAPDH reverse: 5`-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3`

GAPDH TaqMan[®] sonda: 5`-(VICTM)AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC
AAC TTG GC (TAMRA)-3`

Reakčná zmes pre detekciu lokusu GAPDH:

GAPDH TaqMan [®] sonda	1,25 µl
GAPDH forward primer	0,75 µl
GAPDH reverse primer	0,75 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µl

voda bez RNáz	4,75 μ l
izolovaná DNA	5 μ l

Základným predpokladom pre správnu kvantifikáciu fetálnej DNA je tvorba dostatočne presnej štandardnej krivky, ktorej obsah by sa mal v optimálnom prípade kryť s oblasťou kvantifikácie neznámej vzorky. Na druhej strane však, v prípade, kedy sa množstvo DNA v neznámej vzorke pohybuje v oblasti jednotiek genómových ekvivalentov, nie je úplne vhodné tvoriť v tejto oblasti štandardnú krivku, pretože jej presnosť nemusí dosahovať požadovaných kvalít, predovšetkým z dôvodov stochastického efektu pri pipetovaní nariadených vzoriek štandardov.

V našom prípade sa ako optimálny ukázal byť postup tvorby štandardnej krivky vychádzajúci zo 4 koncentračných bodov riedených vždy 2x, a to 5 ng, 2,5 ng, 1,25 ng a 0,63 ng = 758, 379, 190 a 95 genómových ekvivalentov / ml. Množstvo DNA v ng sme previedli do genómových ekvivalentov pomocou vzťahu 1 genómový ekvivalent = 6,6 pg fetálnej DNA. Kvalita štandardnej krivky bola posudzovaná na základe porovnávania optimálnych hodnôt účinnosti reakcie (smernica = -3,4) a presnosti pipetovania štandardnej krivky (regresný koeficient $R^2 = 0,99$) s dosiahnutými charakteristikami u každej reakcie. Spôsob tvorby štandardnej krivky by mal byť po celú dobu trvania experimentu rovnaký, aby bolo možné kedykoľvek porovnať výsledky kvantifikačných experimentov u jednotlivých vyšetovaných súborov v čase.

Na prípravu štandardnej krivky bola použitá mužská kontrolná DNA od firmy Promega s koncentráciou 10 ng / μ l. Tento hmotnostný štandard bol po dodaní rozmrazený, rozpipetovaný po 5 μ l do mikroskúmaviek typu Eppendorf a opäť zamrazený pri - 20 °C. Bezprostredne pred Real-time PCR bola vzorka rozmrazená, nariadená na požadovanú koncentráciu a naraz spotrebovaná. Výhodou tohto postupu je reprodukovateľnosť výsledkov, pretože koncentrácia štandardu je vždy rovnaká (jeden dodávateľ) a nie je ovplyvnená prípadnou degradáciou v závislosti na dobe skladovania nariadených štandardov v rozmrazenom stave, či nepresnom zmeraní koncentrácie zásobnej štandardnej DNA na spektrofotometre.

4.12 Neinvazívna prenatalná diagnostika Rh faktoru plodu metódou Real-time PCR

Stanovenie Rh⁺ a Rh⁻ faktoru je založené na detekcii špecifických sekvencií RhD génu, resp. stanovení prítomnosti (Rh⁺), či neprítomnosti – delécie (Rh⁻) úseku tohto génu.

Stanovenie Rh faktoru plodu technikou Real-time PCR bolo prevádzané s obdobným usporiadaním reakcie ako pri stanovovaní pohlavia plodu. Izolácia fetálnej DNA bola prevedená manuálne s použitím QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) z objemu 600 µl plazmy. Systém sady primerov a fluorescenčne značenej TaqMan[®] sondy (VICTM) bol prevzatý z odbornej literatúry podľa autorov Zhong *et al.* 2001:

Rhesus D forward: 5'-CCT CTC ACT GTT GCC TGC ATT -3'

Rhesus D reverse: 5'-AGT GCC TGC GCG AAC ATT -3'

Rhesus D sonda: 5' (VIC) TAC GTG AGA AAC GCT CAT GAC AGC AAA
GTC T (TAMRA)- 3'

Reakčná zmes pre detekciu lokusu Rhesus D:

Rhesus D TaqMan [®] sonda	2 µl
Rhesus D forward primer	0,75 µl
Rhesus D reverse primer	0,75 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µl
voda bez RNáz	4 µl
izolovaná DNA	5 µl

4.13 Štatistická analýza

Databáza všetkých anonymizovaných jedincov a vzoriek bola vedená v MS Access, kontingenčné tabuľky boli ďalej spracúvané v MS Excel. Štatistická analýza bola prevedená použitím softwarového balíka S.A.S./STAT verzia 8.02 (S.A.S. Institute, Inc., NC), programu STATISTICA verzia 5.1. (StatSoft Inc, OK) a štatistických funkcií programu MS Excel.

Pre merané parametre v jednotlivých skupinách a podskupinách boli vypočítané základné štatistické údaje (priemer, smerodatná odchýlka, stredná chyba priemeru,

minimum, maximum, rozpätie, medián, 10., 25., 75., 90. percentil). Vývoj skúmaných parametrov v čase (medzi danými trimestrami) bol skúmaný vzhľadom k rozloženiu týchto premenných použitím ANOVA. Následné analýzy boli prevedené použitím znamienkového párového poradového testu. Pre zistenie závislosti skúmaných znakov, vzhľadom k negausovskému rozloženiu týchto premenných, bol použitý Spearmanov koeficient korelácie. Podielne zastúpenie fetálnej DNA v celkovej DNA bolo štatisticky vyšetrené taktiež Studentovým *t*-testom.

Vybrané štatistické údaje boli spracované graficky pomocou programu MS Excel.

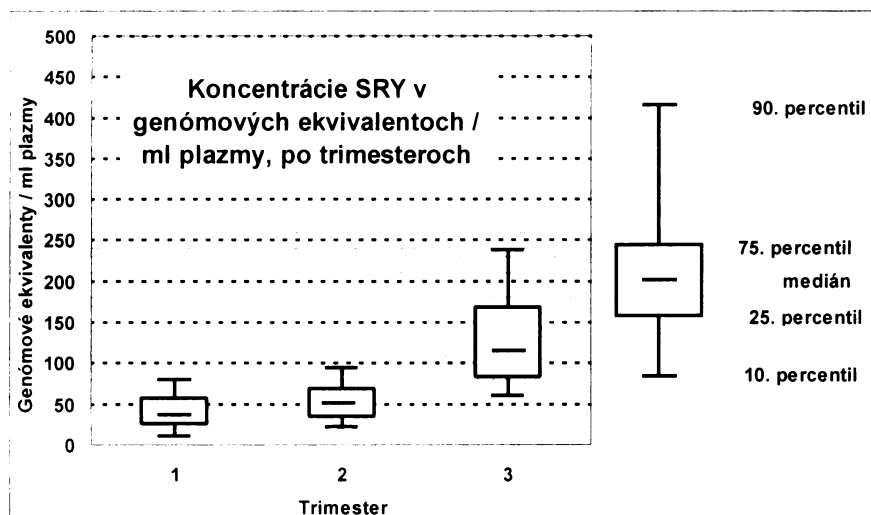
5 Výsledky

5.1 Vzťah medzi množstvom voľnej fetálnej DNA a stupňom tehotenstva u žien s fyziologickým priebehom tehotenstva

V prvej časti práce sme analyzovali 238 nezávislých vzoriek DNA tehotných žien s jedným plodom mužského pohlavia, a to v prvom (81 vzoriek), v druhom (71 vzoriek) a v treťom trimestri (86 vzoriek). Vo všetkých prípadoch bolo mužské pohlavie dieťaťa potvrdené po pôrode. Zo vzoriek separovanej plazmy bola v tejto časti práce DNA izolovaná automaticky za použitia kitu MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics). Pomocou Real-time PCR reakcie boli amplifikované a kvantifikované lokusy SRY a GAPDH. Pomocou lokusu SRY tak bola kvantifikovaná voľná fetálna DNA, pomocou lokusu GAPDH bol zároveň stanovený celkový obsah fetálnej a maternálnej voľnej DNA v jednotlivých trimestroch tehotenstva. Následne bol spočítaný percentuálny obsah voľnej fetálnej DNA v celkovej voľnej DNA v plazme v jednotlivých trimestroch.

5.1.1 Kvantifikácia voľnej fetálnej DNA

Množstvo voľnej fetálnej DNA v plazme počas tehotenstva rastie, s najvyšším nárastom medzi 2. a 3. trimestrom (graf č. 5). V prvom trimestri bola nameraná priemerná hladina voľnej fetálnej DNA 41,6 genómových ekvivalentov (GE)/ml plazmy, v druhom trimestri 55,9 GE/ml a v treťom trimestri 137,8 GE/ml plazmy (tab. č. 1). Výsledky boli štatisticky testované (Friedman ANOVA, znamienkový poradový test) a boli štatisticky vysoko signifikantné (P hlboko pod 0,00001, resp. 0,0008). Bola potvrdená existencia vzťahu medzi hodnotami SRY medzi jednotlivými trimestrami. Testom Spermanovej poradovej korelácie bola navyše preukázaná štatistická významnosť medzi zmenami hladín SRY v jednotlivých trimestroch, a to predovšetkým medzi 1. a 3. trimestrom ($P < 0,0082$) a medzi 2. a 3. trimestrom ($P < 0,0002$). Hraničná štatistická významnosť bola preukázaná medzi 1. a 2. trimestrom ($P < 0,03$).



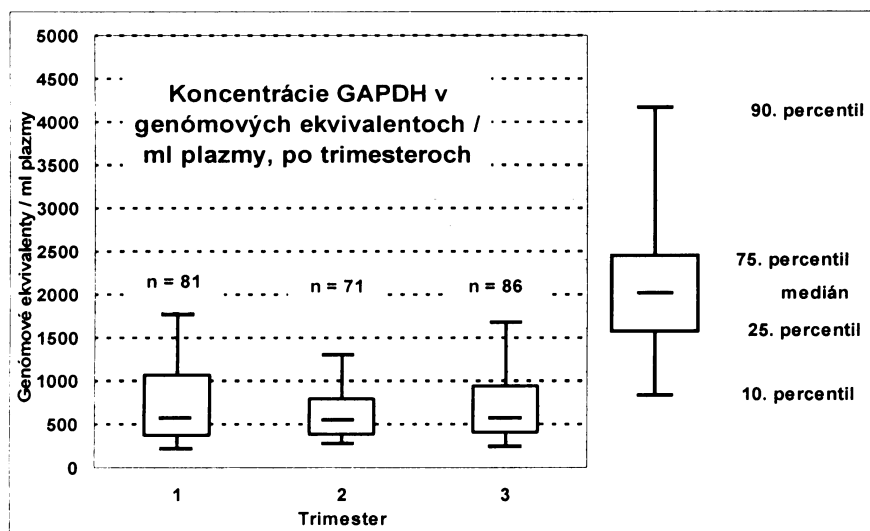
Graf č. 5: Priebeh hladín voľnej fetálnej DNA v jednotlivých trimestroch tehotenstva u 238 vzoriek plazmy tehotných žien vyjadrený pomocou koncentrácie lokusu SRY v genómových ekvivalentoch/ml plazmy

	SRY		
	Trimester		
	1	2	3
počet vzoriek	81	71	86
priemer	41,55	55,86	137,76
štandardná odchýlka	26,87	29,98	91,91
S.E.M.	2,83	3,39	9,38
rozpätie	151,07	145,8	666
maximum	151,1	145,8	693,8
minimum	0,03	0	27,8
medián	35,95	52,95	115,27
10. percentil	11,66	23,24	60,19
25. percentil	24,85	33,4	82,3
75. percentil	56,94	69,53	168,79
90. percentil	80,22	92,66	237,5

Tab. č. 1: Hodnoty voľnej fetálnej DNA v jednotlivých trimestroch tehotenstva u 238 vzoriek plazmy tehotných žien vyjadrený pomocou koncentrácie lokusu SRY v genómových ekvivalentoch/ml plazmy

5.1.2 Kvantifikácia celkovej voľnej DNA

Priemerné množstvo celkovej izolovanej voľnej DNA z plazmy je v priebehu tehotenstva konštantné (graf č. 6). V prvom trimestri bola nameraná priemerná hladina celkovej voľnej DNA 859,2 GE/ml plazmy, v druhom trimestri 958,0 GE/ml a v treťom trimestri 992,7 GE/ml plazmy (tab. č. 2). Štatistická významnosť medzi zmenami hladín GAPDH v jednotlivých trimestroch nebola preukázaná ($P < 0,75$).



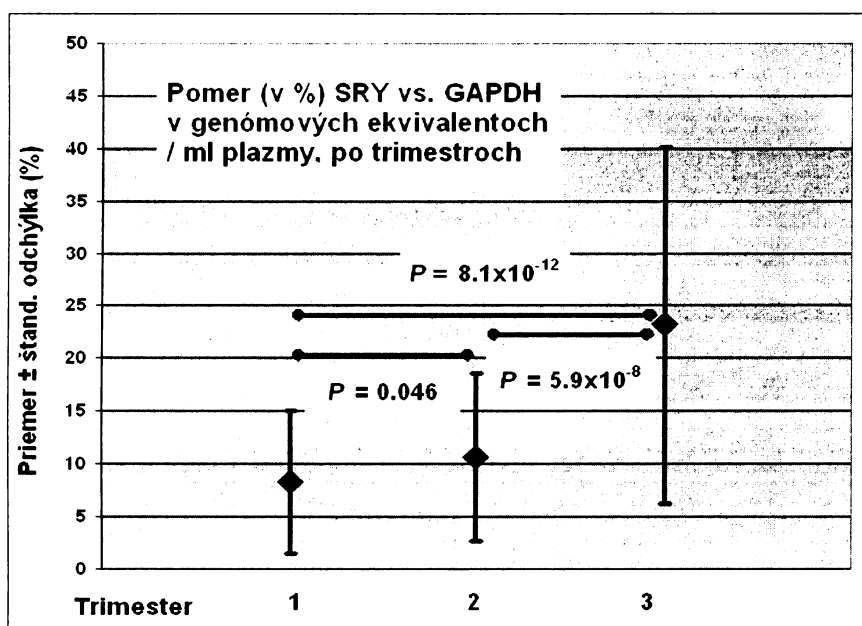
Graf č. 6: Množstvo celkovej voľnej DNA stanovovanej pomocou lokusu GAPDH v jednotlivých trimestroch tehotenstva v GE/ml

	GAPDH – automatická izolácia kit Roche		
	Trimester		
	1	2	3
počet vzoriek	81	71	86
priemer	859,25	957,97	992,68
štandardná odchýlka	818,69	2429,94	1522,43
S.E.M	90,97	288,38	164,17
rozpätie	5322,67	20843,88	12097,64
maximum	5351,38	20965,48	12311,90
minimum	28,71	121,60	214,26
medián	582,26	568,70	573,52
10. percentil	247,38	306,90	264,61
25. percentil	364,50	378,82	392,67
75. percentil	1072,00	794,50	943,83
90. percentil	1754,80	1304,32	1660,50

Tab. č. 2: Hodnoty celkovej voľnej DNA v jednotlivých trimestroch tehotenstva u 238 vzoriek plazmy tehotných žien vyjadrený pomocou koncentrácie lokusu GAPDH v genómových ekvivalenoch/ml plazmy

5.1.3 Percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme

Na základe výpočtu pomeru dvojíc hodnôt systémov SRY a GAPDH v GE/ml plazmy bolo stanovené percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v celkovej voľnej DNA vo všetkých troch trimestroch (graf č. 7). V prvom trimestri percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v celkovej voľnej DNA dosahovalo v priemere 8,2 %, v druhom trimestri 10,7 % a v treťom trimestri tehotenstva 23,2 %.

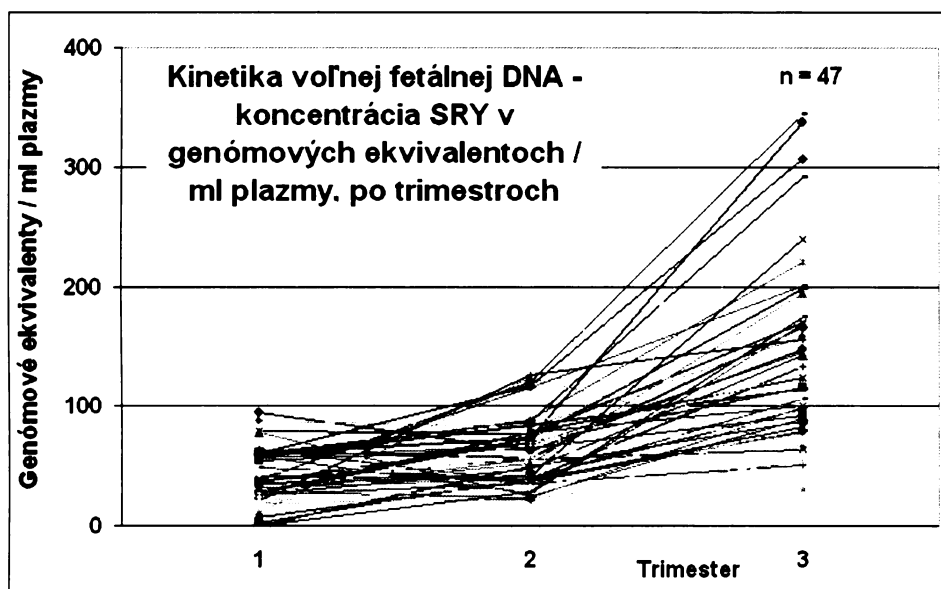


Graf č. 7: Percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme v jednotlivých trimestroch

Percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v celkovej voľnej DNA počas tehotenstva rastie, pričom k štatisticky významnému zvýšeniu dochádza predovšetkým medzi 2. a 3. trimestrom tehotenstva (t -test, $P = 5,9 \times 10^{-8}$) a medzi 1. a 3. trimestrom tehotenstva ($P = 8,1 \times 10^{-12}$). Taktiež ďalšie štatistické testy (Friedman ANOVA) svedčili v prospech prijatia alternatívnej hypotézy o rozdielne hodnôt medzi trimestrami ($P < 0,00001$, resp. hlboko pod 0,0001).

5.2 Kinetika kvantity voľnej fetálnej DNA počas troch trimestrov tehotenstva

V ďalšej časti práce bolo analyzovaných 47 gravidít s odbermi vo všetkých troch trimestroch. Zo vzoriek separovanej plazmy bola DNA izolovaná automaticky za použitia kitu MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics). Pomocou Real-time PCR reakcie boli aj v tomto prípade amplifikované a kvantifikované lokusy SRY a GAPDH. Bola sledovaná kinetika kvantity voľnej fetálnej DNA počas troch trimestrov tehotenstva a výsledky porovnané s prvým súborom obsahujúcim 238 vzoriek (graf č. 8).



Graf č. 8: Kinetika kvantity voľnej fetálnej DNA v priebehu troch trimestrov tehotenstva v 47 vzorkách plaziem tehotných žien v GE/ml

Vo všetkých prípadoch boli najvyššie hladiny voľnej fetálnej DNA pozorované v treťom trimestri tehotenstva. U niektorých vzoriek z druhého trimestra sme zaznamenali nižšie hodnoty ako v trimestri prvom. Priebeh kriviek kvantity celkovej voľnej DNA sa u tejto skupiny 47 vzoriek taktiež zhodoval s priebehom v prvom súbore 238 vzoriek z fyziologických tehotenstiev.

5.3 Výber metódy izolácie DNA z plazmy ako faktor množstva izolovanej DNA

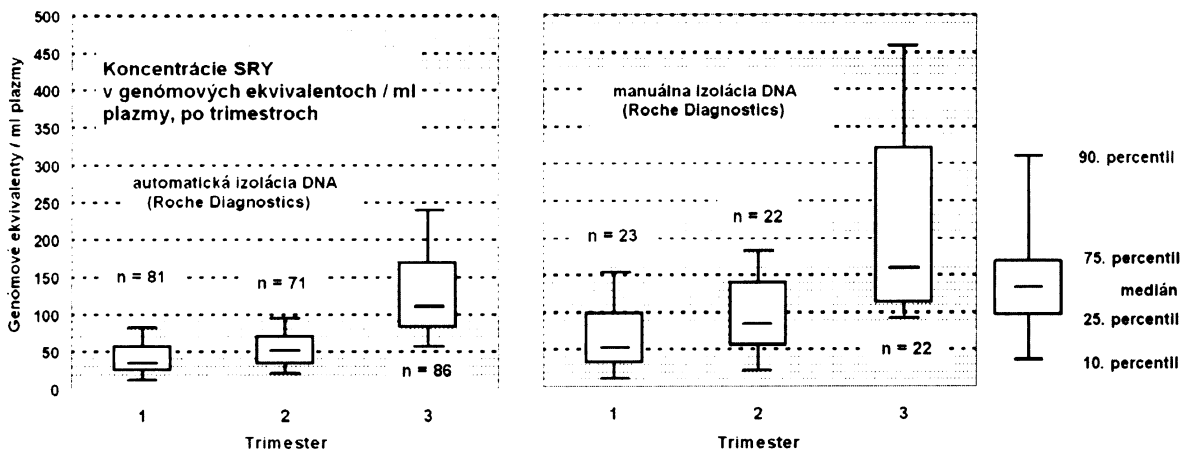
Základným predpokladom pre správne a presné stanovenie hladiny voľných nukleových kyselín v plazme je vhodne zvolená metóda izolácie. Vzhľadom k tomu, že sa pre izoláciu voľnej DNA z plazmy vo svete používa niekoľko rôznych základných postupov a výsledky uverejnené v odborných publikáciách preto nie sú úplne porovnateľné, bolo našim cieľom pokúsiť sa porovnať vybrané izolačné metodiky a dať odpoveď na otázku, nakoľko je možné publikované dáta navzájom porovnávať a ktorá z izolácií je najoptimálnejšia pri detekcii celkovej a fetálnej DNA v materskej krvi.

Porovnávali sme automatickú izoláciu s využitím kitu MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics) s manuálnou izoláciou s využitím kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics). Taktiež sme navzájom porovnávali manuálne izolácie s využitím dvoch rôznych kitov - High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics) a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen).

5.3.1 Porovnávanie automatickej izolácie (Roche Diagnostics) a manuálnej izolácie (Roche Diagnostics)

Pre porovnanie sme využili 238 vzoriek z fyziologických tehotenstiev izolovaných automatickou izolačnou stanicou v prvej časti práce a 67 vzoriek z fyziologických tehotenstiev, ktoré boli izolované manuálne pomocou izolačného kitu od firmy Roche Diagnostics. Pomocou Real-time PCR reakcie boli aj u vzoriek DNA izolovaných manuálne amplifikované a kvantifikované lokusy SRY pre stanovenie hladín voľnej fetálnej DNA a GAPDH pre stanovenie hladín celkovej voľnej DNA.

Pri použití oboch druhov izolácie DNA bol zaznamenaný signifikantný nárast voľnej fetálnej DNA so stúpajúcou dĺžkou tehotenstva. Pri použití automatickej izolácie bolo priemerné množstvo voľnej fetálnej DNA v prvom trimestri 41,6 GE/ml plazmy, v druhom trimestri 55,9 GE/ml a v treťom trimestri 137,8 GE/ml plazmy (graf č. 9A, tab. č. 3). Použitím manuálnej izolácie bolo priemerné množstvo voľnej fetálnej DNA v prvom trimestri 70,74 GE /ml plazmy, v druhom trimestri 97,75 GE/ml a v treťom trimestri 248,55 GE/ml plazmy (graf č. 9B, tab. č. 3). Pri štatistickom analyzovaní rozdielnosti oboch metodických prístupov sa pri porovnávaní odpovedajúcich trimestrov nenašiel žiadny štatisticky signifikantný rozdiel.



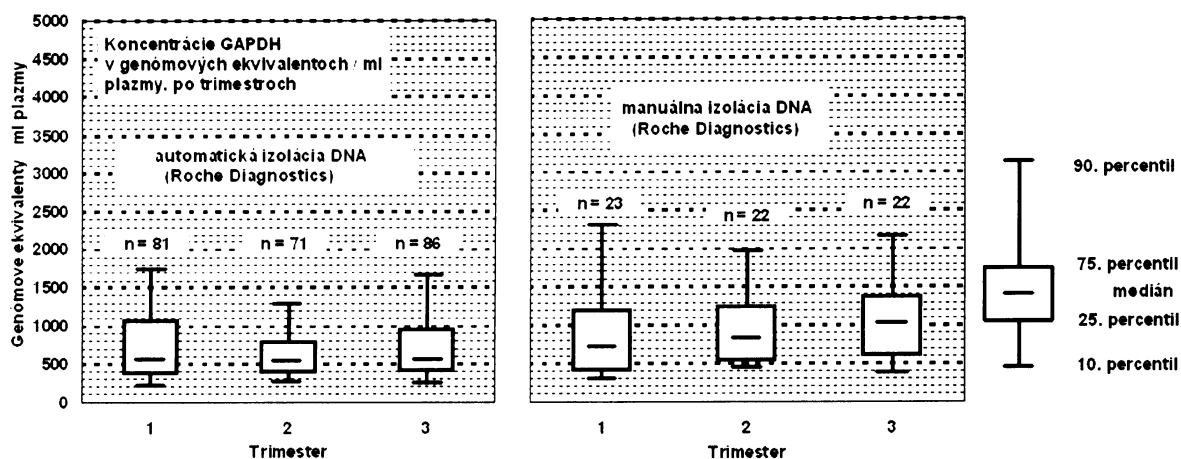
Graf č. 9: Porovnanie množstva voľnej fetálnej DNA stanovovanej pomocou lokusu SRY v jednotlivých trimestroch tehotenstva v GE/ml izolovanej automatickou izoláciou (A) so vzorkami izolovanými manuálnou izoláciou (Roche) (B)

	SRY - automatická izolácia			SRY – manuálna izolácia kit Roche		
	Trimester			Trimester		
	1	2	3	1	2	3
počet vzoriek	90	79	96	23	22	22
priemer	41,55	55,86	137,76	70,74	97,75	248,55
štandardná odchýlka	26,87	29,98	91,91	51,95	60,49	206,2
S.E.M	2,83	3,39	9,38	10,6	12,61	43
rozpätie	151,07	145,8	666	197	221,34	913
maximum	151,1	145,8	693,8	197	232,5	975,75
minimum	0,03	0	27,8	0	11,16	62,75
medián	35,95	52,95	115,27	54,81	82	154
10. percentil	11,66	23,24	60,19	13,2	25,8	96,68
25. percentil	24,85	33,4	82,3	32,84	55,44	112,06
75. percentil	56,94	69,53	168,79	98,84	140,13	321,06
90. percentil	80,22	92,66	237,5	148,88	182,75	458,48

Tab. č. 3: Porovnanie množstva voľnej fetálnej DNA stanovovanej pomocou lokusu SRY v jednotlivých trimestroch tehotenstva v GE/ml izolovanej automatickou izoláciou so vzorkami izolovanými manuálnou izoláciou pomocou kitu Roche

Hladina celkovej voľnej DNA sa s postupujúcou dobou tehotenstva nezvyšuje pri použití automatickej a taktiež ani u manuálnej izolačnej metódy. Rozdielne hodnoty medzi trimestrami u oboch metód nie sú štatisticky významné. U automatickej izolácie bola v prvom trimestri nameraná priemerná hladina celkovej voľnej DNA 859,2 GE/ml plazmy, v druhom trimestri 958,0 GE/ml a v treťom trimestri 992,7 GE/ml plazmy (graf č. 10A, tab. č. 4). Pri použití manuálnej izolácie bolo priemerné množstvo

celkovej voľnej DNA v prvom trimestri 1105,0 GE/ml plazmy, v druhom trimestri 1079,8 GE/ml a v treťom trimestri 2161,9 GE/ml plazmy (graf č. 10B, tab. č. 4). Pri štatistickom analyzovaní rozdielnosti oboch metodických prístupov sa pri porovnávaní prvých ($P = 0,26$) a taktiež druhých trimestrov ($P = 0,87$) nenašiel štatisticky významný rozdiel. Pri porovnávaní tretích trimestrov ($P = 0,046$) bol výsledok na hranici štatistickej významnosti.



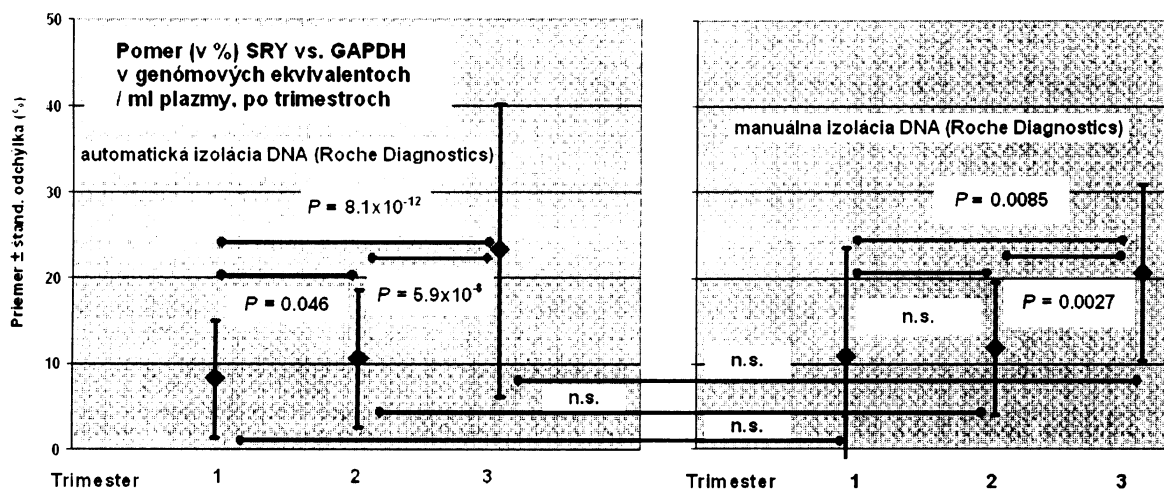
Graf č. 10: Porovnanie množstva celkovej voľnej DNA stanovovanej pomocou lokusu GAPDH v jednotlivých trimestroch tehotenstva v GE/ml izolovanej automatickou izoláciou (A) so vzorkami izolovanými manuálnou izoláciou (Roche) (B)

	GAPDH – automatická izolácia kit Roche			GAPDH – manuálna izolácia kit Roche		
	Trimester			Trimester		
	1	2	3	1	2	3
počet vzoriek	81	71	86	23	22	22
priemer	859,25	957,97	992,68	1104,97	1079,82	2161,86
štandardná odchýlka	818,69	2429,94	1522,43	1174,74	825,22	4387,92
S.E.M	90,97	288,38	164,17	244,95	175,94	935,51
rozpätie	5322,67	20843,88	12097,64	5021,28	3761,63	21120,13
maximum	5351,38	20965,48	12311,90	5025,75	3988,63	21442,25
minimum	28,71	121,60	214,26	4,48	227,00	322,13
medián	582,26	568,70	573,52	776,75	865,63	1061,94
10. percentil	247,38	306,90	264,61	325,18	447,40	419,39
25. percentil	364,50	378,82	392,67	413,13	519,06	603,84
75. percentil	1072,00	794,50	943,83	1202,44	1240,53	1371,31
90. percentil	1754,80	1304,32	1660,50	2269,35	1975,46	2174,96

Tab. č. 4: Porovnanie množstva celkovej voľnej DNA stanovovanej pomocou lokusu GAPDH v jednotlivých trimestroch tehotenstva v GE/ml izolovanej automatickou izoláciou so vzorkami izolovanými manuálnou izoláciou pomocou kitu Roche

Aj napriek tomu, že porovnávanie spôsobu izolácie DNA nie je založené na úplne rovnako veľkých vyšetrovaných súboroch (265: 67), je možné konštatovať, že množstvo izolovanej celkovej voľnej aj fetálnej DNA je v prípade manuálnej izolácie vyššie, a to hlavne v treťom trimestri tehotenstva. Dôvodom môže byť odlišné určenie jednotlivých izolačných kitov. Kit pre automatickú izoláciu je predurčený predovšetkým pre izoláciu voľných nukleových kyselín (vírusových) v plazme, a ako taký bude pravdepodobne lepšie slúžiť pre izoláciu malých fragmentov nukleových kyselín. Kit pre manuálnu izoláciu je určený pre izoláciu genómovej DNA z krvi a telových tekutín a pravdepodobne s vyššou účinnosťou zachytáva väčšie fragmenty, ktoré by zrejme neboli izolované v prípade automatickej izolácie.

Pre každú z dvojíc hodnôt SRY a GAPDH bolo následne vypočítané priemerné percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme (graf č. 11).



Graf č. 11: Porovnanie percentuálneho zastúpenia voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme v jednotlivých trimestroch izolovanej automatickou izoláciou (A) so vzorkami izolovanými manuálnou izoláciou (Roche) (B)

Pri použití automatickej izolácie bolo percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme v prvom trimestri 8,2 %, v druhom trimestri 10,7 % a v treťom trimestri tehotenstva 23,2 %. U manuálnej izolácie boli hodnoty v prvom trimestri 10,8 %, v druhom trimestri 10,8 % v treťom trimestri tehotenstva 20,6 %. Nezávisle na type použitej izolácie bol zaznamenaný jednoznačný nárast

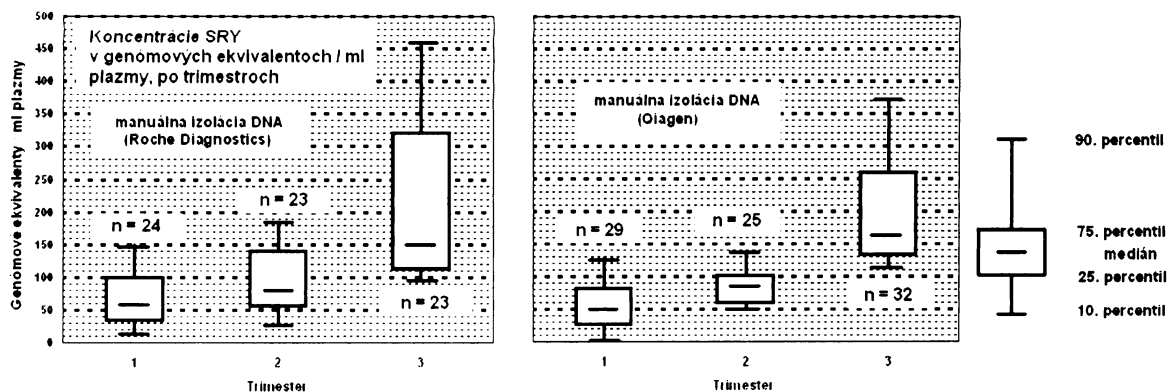
percentuálneho zastúpenia voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme, hlavne v treťom trimestri tehotenstva. U automatickej izolácie dochádza k štatisticky významnému zvýšeniu predovšetkým medzi druhým a tretím trimestrom ($P = 5,9 \times 10^{-8}$) a následne aj medzi prvým a tretím trimestrom ($P = 8,1 \times 10^{-12}$). U manuálnej izolácie je rozdiel viditeľný predovšetkým medzi prvým a tretím trimestrom ($P = 0,0085$) a medzi druhým a tretím ($P = 0,0027$) trimestrom tehotenstva. Na základe štatistickej analýzy (Studentov t -test) neboli preukázané žiadne rozdiely medzi skupinami automatickej a manuálnej izolácie.

Oba typy izolácie sú vhodné pre detekciu pohlavia plodu a taktiež pre kvantifikáciu voľnej fetálnej aj celkovej voľnej DNA. Manuálna izolácia však všeobecne poskytuje vyššie kvantily DNA, fetálnej aj celkovej, pričom pomerné zastúpenie voľnej fetálnej DNA vo vzorkách maternálnej plazmy zostáva približne rovnaké ako u izolácie automatickej.

5.3.2 Porovnávanie manuálnej izolácie (Roche Diagnostics) a manuálnej izolácie (Qiagen)

Pre porovnanie sme využili 67 vzoriek DNA z fyziologických tehotenstiev izolovaných manuálnou izoláciou s využitím izolačného kitu od firmy Roche Diagnostics a 86 vzoriek DNA z fyziologických tehotenstiev izolovaných manuálnou izoláciou s využitím izolačného kitu od firmy Qiagen. Pomocou Real-time PCR reakcie boli u všetkých vzoriek amplifikované a kvantifikované lokusy SRY a GAPDH.

V prípade manuálnej izolácie s využitím kitu od firmy Roche Diagnostics bolo priemerné množstvo voľnej fetálnej DNA v prvom trimestri 70,74 GE/ml plazmy, v druhom trimestri 97,8 GE/ml a v treťom trimestri 248,6 GE/ml plazmy (graf č. 12A, tab. č.5). U manuálnej izolácie s využitím kitu od firmy Qiagen bolo priemerné množstvo voľnej fetálnej DNA v prvom trimestri 58,2 GE/ml plazmy, v druhom trimestri 90,3 GE/ml a v treťom trimestri 205,9 GE/ml plazmy (graf č. 12B, tab. č.5). Pri porovnávaní získaných dát v týchto veľkostne obdobných súboroch v každom z trimestrov tehotenstva neboli nájdené medzi oboma manuálnymi izoláciami štatisticky významné rozdiely.



Graf č. 12: Porovnanie množstva voľnej fetálnej DNA v jednotlivých trimestroch tehotenstva v GE/ml plazmy izolovanej manuálnou izoláciou (Roche Diagnostics) a manuálnou izoláciou (Qiagen)

	SRY – manuálna izolácia kit Roche			SRY – manuálna izolácia kitQiagen		
	Trimester			Trimester		
	1	2	3	1	2	3
počet vzoriek	23	22	22	29	25	32
priemer	70,74	97,75	248,55	58.18	90,28	205.91
štandardná odchýlka	51,95	60,49	206,20	46.14	40,50	102.46
S.E.M.	10,60	12,61	43,00	39211,00	8,10	39404,00
rozpätie	197,00	221,34	913,00	165.96	182,02	404.28
maximum	197,00	232,50	975,75	166.32	210,77	456.33
minimum	0,00	11,16	62,75	0.36	28,75	52.05
medián	54,81	82,00	154,00	54.75	87,49	168.83
10. percentil	13,20	25,80	96,68	2,97	51,25	114,17
25. percentil	32,84	55,44	112,06	24,69	58,66	131,25
75. percentil	98,84	140,13	321,06	82,43	101,88	260,33
90. percentil	148,88	182,75	458,48	127,66	132,60	368,50

Tab. č. 5: Porovnanie množstva voľnej fetálnej DNA v jednotlivých trimestroch tehotenstva v GE/ml plazmy izolovanej manuálnou izoláciou pomocou kitu Roche a manuálnou izoláciou pomocou kitu Qiagen

Oba manuálne izolačné kity sú pri našom používaní rovnocenné, a to ako z hľadiska výťažkov izolácie, tak nárokov na čistotu izolovanej voľnej fetálnej DNA, či účinnosti Real-time PCR reakcie amplifikujúcej SRY lokus.

5.3.3 Porovnanie senzitivít a špecifít Real–time PCR reakcie amplifikujúcej SRY lokus v závislosti na zvolenej izolačnej technike

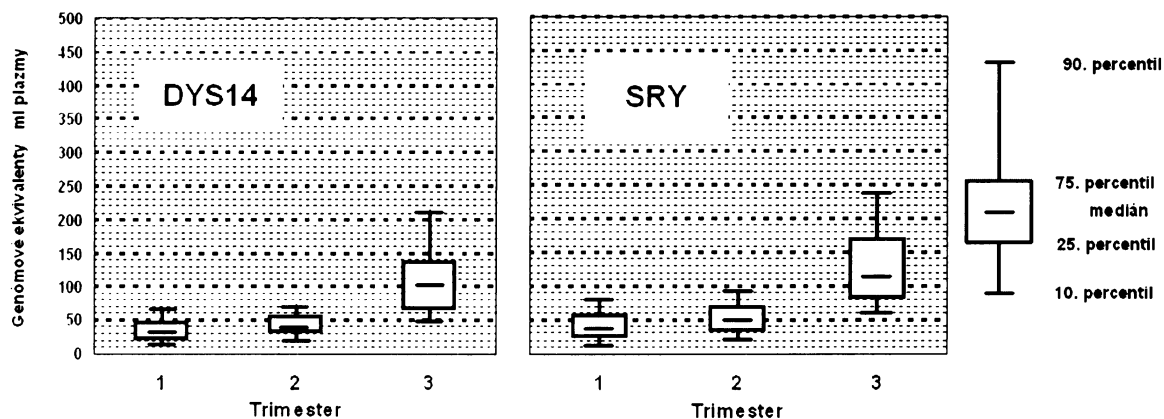
Jedným zo základných parametrov úspešnosti detekcie pohlavia a kvantifikácie voľnej fetálnej DNA sú údaje o senzitivite a špecifite Real–time PCR reakcie. Pokúsili sme sa porovnať úspešnosť detekcie plodu mužského pohlavia (senzitivita) a správneho určenia plodu ženského pohlavia (špecifita) v troch nami používaných typoch izolácie – automatickej (Roche Diagnostics), manuálnej (Roche Diagnostics) a manuálnej (Qiagen).

U automatickej izolácie (Roche Diagnostics) bola v priebehu trimestrov tehotenstva priemerná senzitivita 99,6 % a špecifita 100 %. V prípade manuálnej izolácie (Roche Diagnostics) bola v priebehu trimestrov tehotenstva dosiahnutá priemerná senzitivita aj špecifita 100 %. U manuálnej izolácie (Qiagen) bola dosiahnutá priemerná senzitivita 96,5 % a priemerná špecifita 97,4 % a zdá sa, že týmito hodnotami nedosahuje úroveň ostatných izolácií.

5.4 Porovnanie efektivity amplifikácie dvoch najčastejšie používaných detekčných systémov SRY a DYS 14

Porovnanie efektivity amplifikácie dvoch najčastejšie používaných detekčných systémov SRY a DYS 14 sme previedli na súbore 238 vzoriek z fyziologických tehotenstiev. DNA bola izolovaná automatickou metódou (Roche Diagnostics).

Štatistické spracovanie hodnôt získaných pre detekčný systém DYS 14 prinieslo veľmi podobné výsledky ako u detekčného systému SRY. Zvýšenie hladín voľnej fetálnej DNA v priebehu tehotenstva, hlavne v treťom trimestri bolo štatisticky veľmi signifikantné (graf č. 13, tab. č.6). Hodnoty získané u detekčného systému SRY sa zdajú byť trochu vyššie ako pri použití detekčného systému DYS 14, ale žiadne štatistické rozdiely medzi týmito detekčnými systémami neboli zistené.



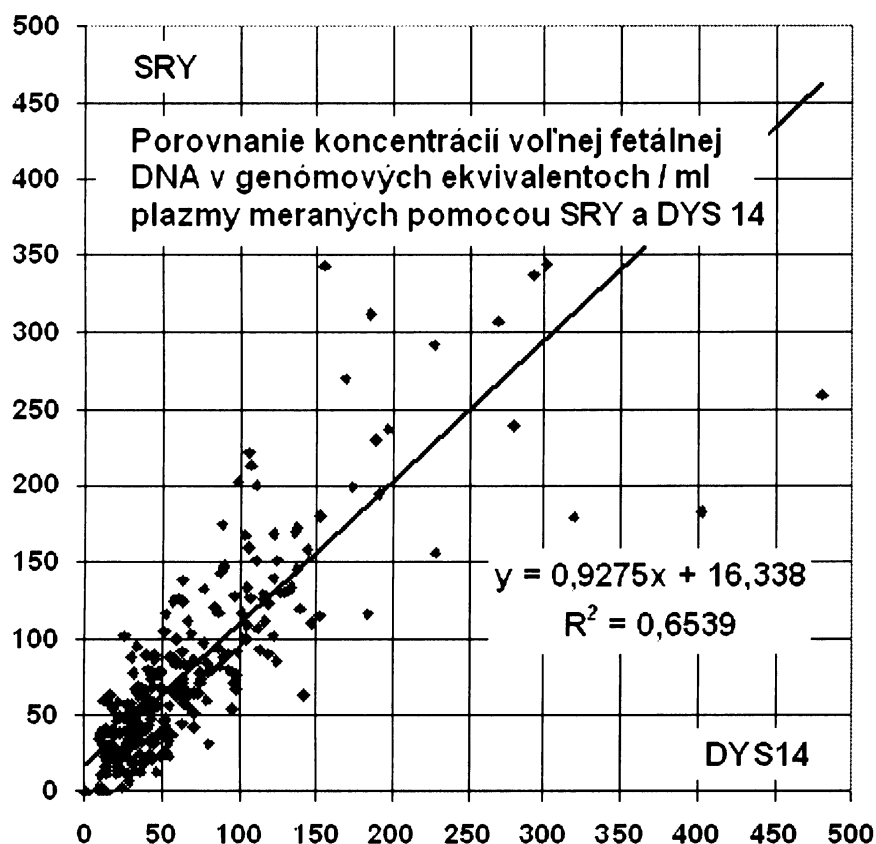
Graf č. 13: Porovnanie hladín voľnej fetálnej DNA v GE/ml plazmy u fyziologických tehotenstiev získaných pomocou diagnostiky sekvencií SRY a DYS 14

	SRY			DYS14		
	Trimester			Trimester		
	1	2	3	1	2	3
počet vzoriek	81	71	86	81	71	86
priemer	41,55	56	138	36,9	44,58	119,74
štandardná odchýlka	26,87	30	91,9	23,7	22,77	80,6
S.E.M.	2,83	3,4	9,38	2,5	2,56	8,23
rozpätie	151,07	146	666	115	141,1	467
maximum	151,1	146	694	124	141,81	480,5
minimum	0,03	0	27,8	9,39	0,7	13,5
medián	35,95	53	115	30	39,38	101,7
10. percentil	11,66	23	60,2	13,8	21,64	50,23
25. percentil	24,85	33	82,3	20,9	30,74	66,75
75. percentil	56,94	70	169	45	56	137,15
90. percentil	80,22	93	238	66,4	71,16	212,46

Tab. č. 6: Porovnanie množstva voľnej fetálnej DNA v jednotlivých trimestroch tehotenstva v GE/ml plazmy získaných pomocou diagnostiky sekvencií SRY a DYS 14

Hodnoty získané oboma detekčnými systémami boli taktiež podrobené regresnej analýze (graf č. 14). Ich vzájomný vzťah veľmi dobre odpovedá lineárnej regresii so sklonom priamky takmer rovným 1 (0,93). Koeficient determinácie R^2 , ktorý je ukazovateľom toho, nakoľko spoľahlivo vysvetľuje rovnica získaná regresnou

analýzou vzťahy medzi premennými, má hodnotu $R^2 = 0,654$. Ukazuje sa, že medzi výsledkami získanými oboma metodickými prístupmi je dobrá korelácia.



Graf č. 14: Porovnanie efektivity amplifikácie detekčných systémov SRY a DYS 14 – regresná funkcia

5.5 Neinvazívna prenatálna diagnostika Rh faktoru plodu

Neinvazívna prenatálna diagnostika Rh faktoru plodu bola prevedená len na obmedzenom malom množstve vzoriek materskej krvi. Základom bolo zdokonalenie metodického postupu, ktorý v našich podmienkach dosahoval optimum, to znamená, dosiahli sme 100 % senzitivitu aj špecificitu. Správnosť našich výsledkov bola vždy overená určením Rh faktoru dieťaťa po narodení. Hoci nie je súbor veľký, metóda sa zdá byť pripravená pre klinickú diagnostickú prax. Väčší súbor vzoriek materskej krvi v budúcnosti prinesie nielen možnosť štatistickej analýzy, ale aj nové skúsenosti a možno aj modifikácie metódy.

5.6 Vzťah medzi množstvom voľnej fetálnej DNA a stupňom tehotenstva u žien s dvojpočetným tehotenstvom a nefyziologickým priebehom tehotenstva

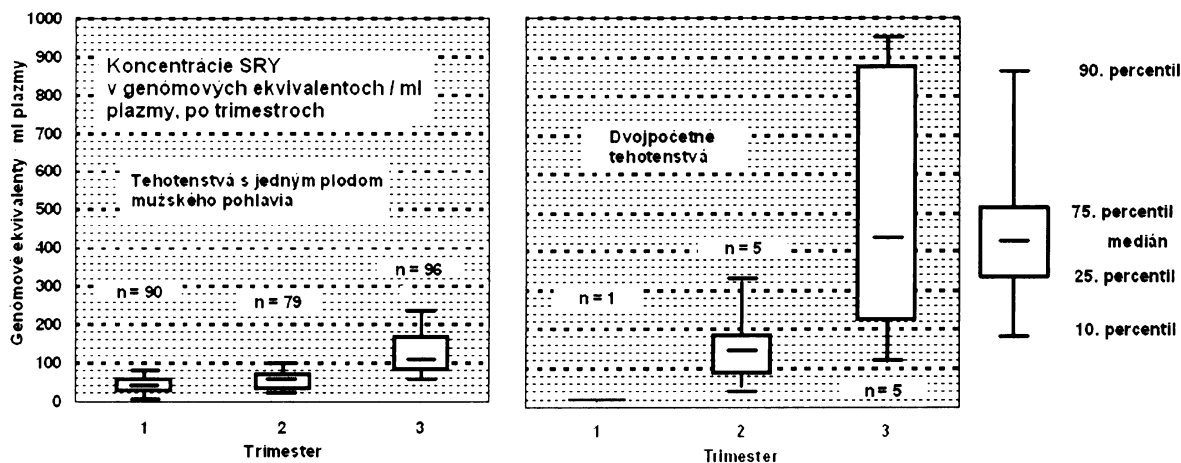
Stanovenie hladín voľnej fetálnej DNA a celkovej voľnej DNA v plazme tehotných žien s fyziologickým priebehom tehotenstva bolo základom pre následné porovnávanie s hodnotami hladín získaných u dvojpočetných tehotenstiev a tehotenstiev s nefyziologickým prípadne patologickým priebehom tehotenstva. Vzhľadom ku komplikovanému získavaniu vzoriek materskej krvi od týchto tehotných žien (nízka frekvencia výskytu, chýbajúce jednoznačné potvrdenie patológií, prípadne neanalyzovateľné vzorky s plodmi ženského pohlavia) bol do štúdie zaradený menší počet gravidít. Vyšetrované súbory boli natoľko málo početné, že neumožňovali vykonať štatistickú analýzu s plne hodnotiteľnými výsledkami, a preto štatistická analýza nebola vykonaná. U všetkých vzoriek z dvojpočetných a nefyziologických tehotenstiev bola taktiež v systéme SRY prevedená kvantifikácia voľnej fetálnej DNA izolovanej zo vzoriek plazmy automatickou metódou (Roche Diagnostics). Pomocou housekeeping génu GAPDH bol stanovený aj celkový obsah voľnej DNA vo vzorkách. Pomerom SRY/GAPDH bolo následne vypočítané percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme.

5.6.1 Dvojpočetné tehotenstvá

Do štúdie boli zahrnuté dve tehotenstvá s dvoma plodmi mužského pohlavia (MM), tri tehotenstvá s jedným plodom ženského a druhým plodom mužského pohlavia (MF) a taktiež jedno tehotenstvo s oboma plodmi ženského pohlavia (FF). Posledné spomínané tehotenstvo s dvoma plodmi ženského pohlavia bolo však zaradené iba do časti štúdie kvantifikujúcej celkovú voľnú DNA, sekvencie DNA plodu ženského pohlavia nie sme totiž schopní odlíšiť od genómového pozadia matky.

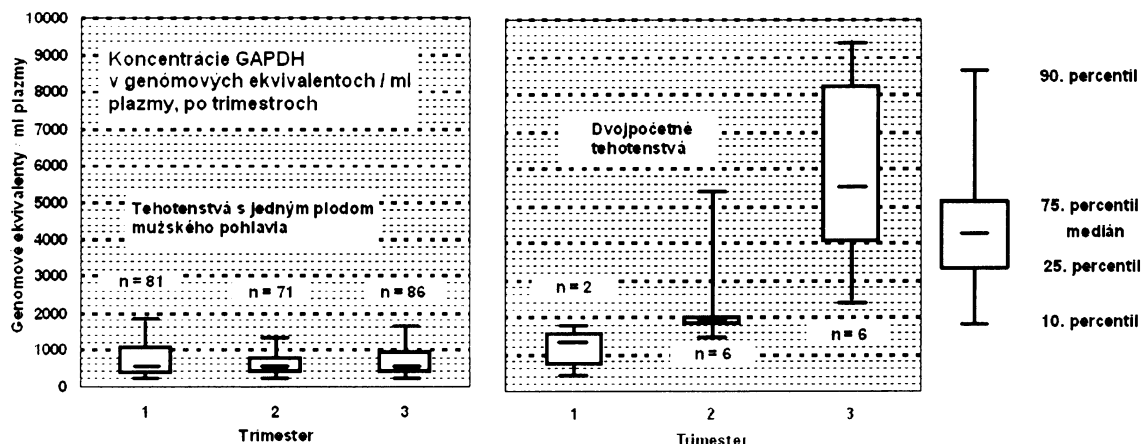
Kvantifikácia voľnej fetálnej DNA pomocou lokusu SRY bola vykonaná na 1 vzorke z prvého trimestra, 5 vzorkách z druhého trimestra a na 5 vzorkách z tretieho trimestra tehotenstva. Priemerná hodnota plazmatických hladín voľnej fetálnej DNA u dvojčiat je v porovnaní s hladinami u fyziologických tehotenstiev zvýšená (graf č. 15). V druhom trimestri dosahuje hodnotu 175,7 GE/ml, u fyziologických tehotenstiev to bolo 55,9 GE/ml. Výrazné zvýšenie hodnôt u dvojpočetných tehotenstiev je možné sledovať predovšetkým v treťom trimestri tehotenstva kedy priemerná hladina dosahuje

až 517,8 GE/ml v porovnaní s 137,8 GE/ml u fyziologických tehotenstiev. Hodnoty limitného počtu vzoriek nie sú pravdepodobne ovplyvnené pohlavím plodov.



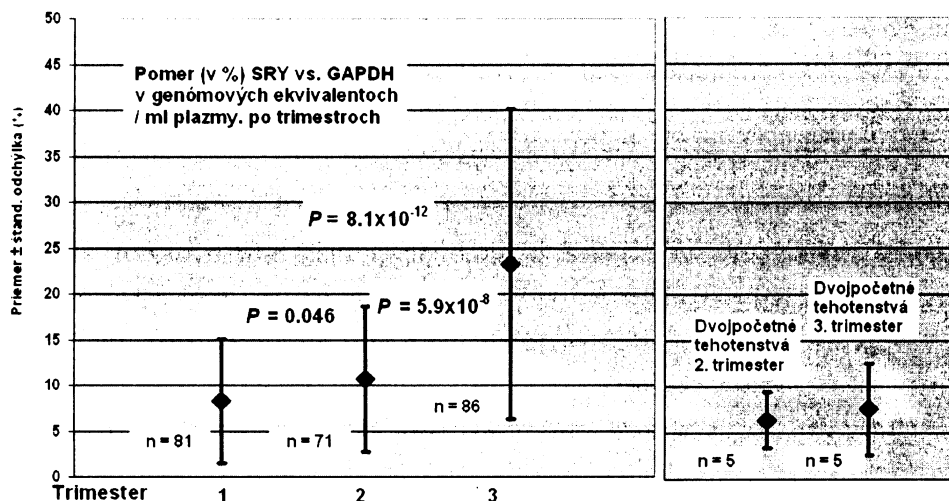
Graf č. 15: Hladiny voľnej fetálnej DNA v GE/ml u dvojpočetných tehotenstiev a porovnanie získaných hodnôt s hodnotami z fyziologických tehotenstiev

Stanovenie celkového obsahu voľnej DNA, tj. fetálnej aj maternálnej, pomocou lokusu GAPDH bola vykonané na 2 vzorkách z prvého trimestra, 6 z druhého a 6 z tretieho trimestra tehotenstva. Priemerný obsah celkovej voľnej DNA u dvojpočetných tehotenstiev je v porovnaní s hladinami v skupine fyziologických tehotenstiev zvýšený (graf č. 16). V druhom trimestri dosahuje hodnoty 2947,6 GE/ml oproti hodnote 957,9 GE/ml u fyziologických tehotenstiev. Zvýšenie hodnôt u dvojpočetných tehotenstiev je viditeľné predovšetkým v treťom trimestri kedy dosahuje 5809,7 GE/ml v porovnaní s 992,7 GE/ml u fyziologických tehotenstiev. Na tomto zvýšení sa z najväčšej časti podieľa zvýšený obsah maternálnej DNA. Tento nález by, mimo iného, mohol súvisieť s väčšími rozmermi placenty u dvojpočetných gravidít a s väčším uvoľňovaním placentárnych buniek do maternálneho krvného obehu s ich následnou degradáciou a uvoľňovaním voľnej maternálnej DNA do krvi tehotnej ženy.



Graf č. 16: Hladiny celkovej voľnej DNA meranej pomocou lokusu GAPDH v GE/ml u dvojpočetných tehotenstiev a porovnanie získaných hodnôt s hodnotami z fyziologických tehotenstiev

Na základe výpočtu pomeru dvojíc hodnôt systémov SRY a GAPDH (v GE/ml) bolo stanovené priemerné percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme (graf č. 17). Priemerná hodnota plazmatickej koncentrácie voľnej fetálnej DNA u dvojpočetných tehotenstiev je pri porovnávaní 5 vzoriek v druhom trimestri a 5 vzoriek v treťom trimestri tehotenstva s hodnotami v skupine fyziologických tehotenstiev znížená. V druhom trimestri dosahuje u dvojpočetných tehotenstiev 6,4 %, pričom u fyziologických tehotenstiev to bolo 10,7 %. K zníženiu hodnôt však dochádza predovšetkým v treťom trimestri. U dvojpočetných tehotenstiev bola vypočítaná hodnota 7,6 %, u fyziologických tehotenstiev 23,2 %. Tieto zistenia podporujú tézu o zvýšenom uvoľňovaní maternálnej DNA do krvného obehu v priebehu tehotenstva, a to predovšetkým v treťom trimestri kedy sú plody už veľké a placenta dosahuje väčších rozmerov než pri fyziologických jednopločných tehotenstvách.



Graf č. 17: Percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme u dvojpočetných tehotenstiev a porovnanie získaných hodnôt s hodnotami z fyziologických tehotenstiev v odpovedajúcich trimestroch tehotenstva

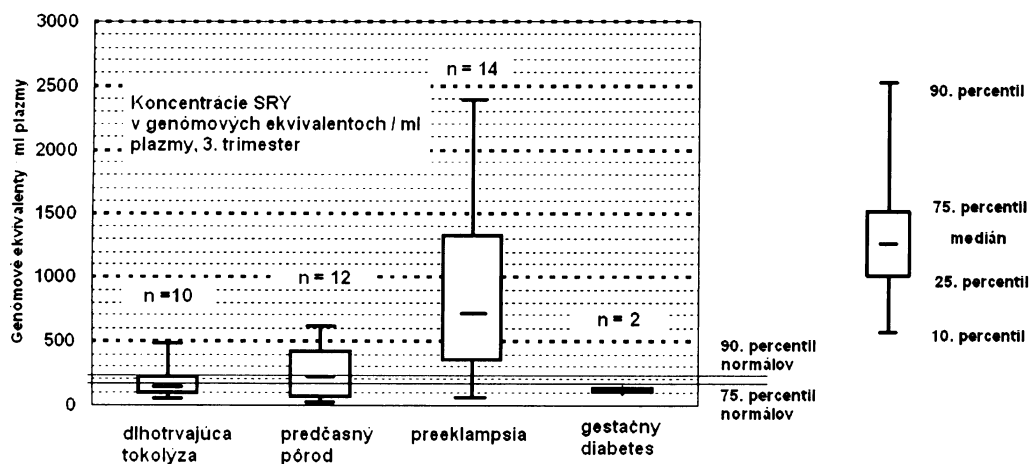
Preukázali sme, že množstvo celkovej aj voľnej fetálnej DNA sa u dvojpočetných tehotenstiev zvyšuje s dĺžkou tehotenstva a je v porovnaní s hladinami DNA u fyziologických tehotenstiev zvýšená, a to predovšetkým v treťom trimestri. Tieto hodnoty pravdepodobne nie sú ovplyvnené pohlavím plodu. Priemerná hodnota plazmatickej koncentrácie voľnej fetálnej DNA je v porovnaní so skupinou fyziologických jednopločetných tehotenstiev znížená, a to ako v druhom, tak predovšetkým v treťom trimestri tehotenstva. Toto zníženie je dôsledkom zvýšeného obsahu maternálnej DNA v plazme vznikajúcim pravdepodobne kontinuálnym uvoľňovaním maternálnych buniek do krvného obehu.

5.6.2 Patologické tehotenstvá

Z patologických tehotenstiev boli do štúdie zahrnuté predčasné pôrody, dlhodobá tokolýza, preeklampsia, gestačný diabetes a taktiež trizómie - Edwardsov syndróm, Downov syndróm a Klinefelterov syndróm. V prípade patológií boli všetky vzorky materskej krvi získané v druhom a predovšetkým v treťom trimestri tehotenstva. U predčasných pôrodov sme analyzovali dve vzorky z druhého trimestra a 12 z tretieho, v prípade preeklampsie to bolo 14 vzoriek z tretieho trimestra, u dlhobohkej tokolýzy dve vzorky z druhého trimestra a 10 vzoriek z tretieho trimestra a v prípade gestačného diabetu dve vzorky z tretieho trimestra. V prípade aneuploidií sme získali vzorky

výhradne z tretieho trimestra, a to dve v prípade Edwardsovho syndrómu, 4 s Downovým syndrómom a jednu s Klinefelterovým syndrómom.

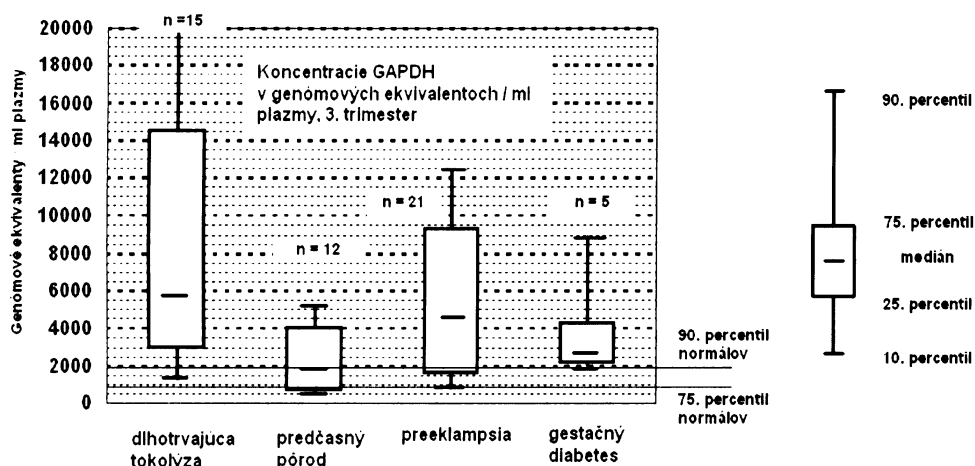
U všetkých vzoriek patologických tehotenstiev bola kvantifikovaná voľná fetálna DNA pomocou lokusu SRY a hodnoty získané v treťom trimestri boli porovnávané s treťotrimestrálnymi hodnotami zo súboru fyziologických tehotenstiev (graf č. 18). Priemerná hodnota plazmatických hladín voľnej fetálnej DNA v treťom trimestri u fyziologických tehotenstiev je 137,8 GE/ml plazmy. Hodnoty u dlhotrvajúcej tokolýzy a predčasného pôrodu sú zvýšené, 212,2 GE/ml resp. 268,9 GE/ml, avšak tieto rozdiely nie sú štatisticky významné. Naopak u tehotných žien s preeklampsiou bolo zaznamenané štatisticky významné zvýšenie hladín voľnej fetálnej DNA až na priemerné hodnoty 1031,7 GE/ml. U vzoriek gestačného diabetu s priemernými treťotrimestrálnymi hodnotami 113,7 GE/ml nebol zistený žiadny štatisticky významný rozdiel oproti vzorkám z fyziologických tehotenstiev. Vzorky z tehotenstiev s aneuploidiami – Edwardsov syndróm, Downov syndróm a Klinefelterov syndróm – nevykazovali žiadne významné rozdiely oproti kontrolnému súboru fyziologických tehotenstiev.



Graf č. 18: Hladiny voľnej fetálnej DNA u patologických tehotenstiev a ich porovnanie s fyziologickými tehotenstvami vrátane vyznačených línií 75 % a 90 % percentilu hodnôt fyziologických tehotenstiev

Celkový obsah voľnej DNA pomocou lokusu GAPDH bol stanovený u všetkých vzoriek patologických tehotenstiev a výsledky získané v tretích trimestroch boli

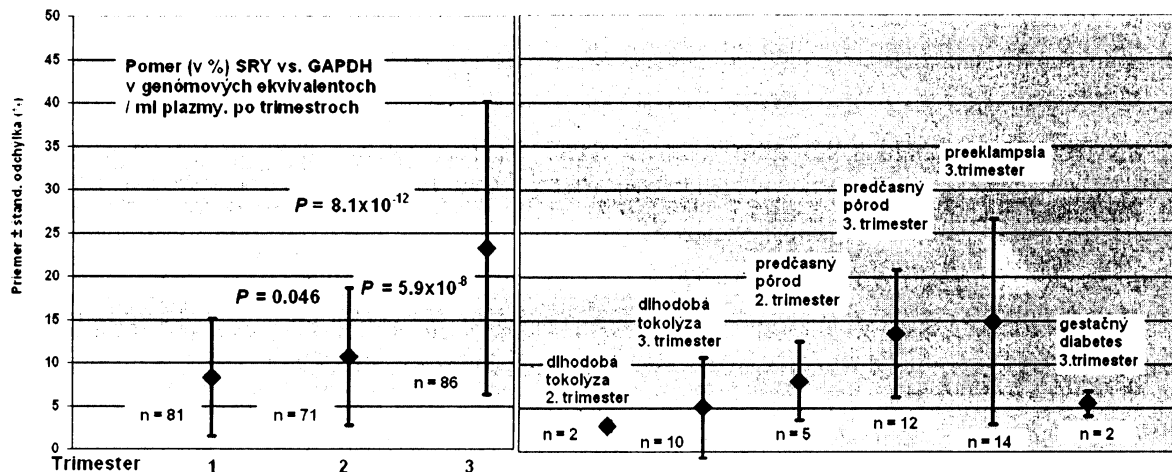
porovnávané s hodnotami z fyziologických tehotenstiev. Oproti priemernej tret'otrimestrovej hodnote 992,7 GE/ml u fyziologických tehotenstiev boli v tretích trimestroch u vzoriek jednotlivých typov patologických tehotenstiev zaznamenané štatisticky signifikantne zvýšené priemerné hladiny celkovej voľnej DNA u tehotenstiev s predčasným pôrodom – 2382,5 GE/ml, gestačným diabetom – 4511,5 GE/ml ale predovšetkým u tehotenstiev s dlhodobou tokolýzou – 10787,7 GE/ml a s preeklampsiou – 7679,0 GE/ml plazmy (graf č. 19). U týchto patológií, avšak s výnimkou gestačného diabetu, by toto zvýšenie mohlo súvisieť s hroziacim predčasným pôrodom (*abortus imminens*), kedy pravdepodobne dochádza k zvýšenému uvoľňovaniu buniek placenty do materskej krvi.



Graf č. 19: Hladiny celkovej voľnej DNA u patologických tehotenstiev a ich porovnanie s fyziologickými tehotenstvami vrátane vyznačených línií 75 % a 90 % percentilu hodnôt fyziologických tehotenstiev

Tak ako v predchádzajúcich prípadoch, aj u vzoriek z patologických tehotenstiev bolo na základe výpočtu pomeru dvojíc hodnôt systémov SRY a GAPDH v GE/ml plazmy stanovené percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v celkovej voľnej DNA vo všetkých dostupných trimestroch (graf č. 20). Oproti priemerným hodnotám plazmatickej koncentrácie voľnej fetálnej DNA u fyziologických tehotenstiev v druhom trimestri – 10,7 % a v treťom trimestri – 23,2 % sú tieto hodnoty u patologických tehotenstiev všeobecne nižšie. U tokolýzy dosahuje priemerná hodnota plazmatickej koncentrácie voľnej fetálnej DNA v druhom trimestri 3 % a v treťom trimestri 5,1 %, u predčasného pôrodu v druhom trimestri 8,1 % a v treťom trimestri 13,5 %, u preeklampsie v druhom trimestri 10,1 % a v treťom trimestri 13,5 %, u gestačného diabetu v druhom trimestri 10,1 % a v treťom trimestri 13,5 %.

u preeklampsie v treťom trimestri 14,9 % a u gestačného diabetu v treťom trimestri dosahuje hodnôt 5,5 %. Toto zníženie, rovnako ako u dvojpočetných tehotenstiev, je dôsledkom zvýšeného obsahu maternálnej DNA v plazme ako následok patologických javov u týchto tehotenstiev.



Graf č. 20: Percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme u patologických tehotenstiev a porovnanie získaných hodnôt s hodnotami z fyziologických tehotenstiev v odpovedajúcich trimestroch tehotenstva

Priemerná hodnota celkovej voľnej DNA a voľnej fetálnej DNA v plazme je všeobecne u patologických tehotenstiev v treťom trimestri zvýšená. Nárast voľnej fetálnej DNA je výrazný predovšetkým u preeklampsii, zatiaľ čo hodnoty u gestačného diabetu nevykazujú oproti kontrolnému súboru fyziologických tehotenstiev žiadne rozdiely. U všetkých typov patológií však dochádza k preukázanému zvýšeniu celkovej voľnej DNA v maternálnej plazme, predovšetkým u dlhotrvajúcej tokolyzy a preeklampsie. V dôsledku tohto zvýšenia je percentuálny obsah voľnej fetálnej DNA u všetkých patológií výrazne nižší než u fyziologických tehotenstiev. Chromozomálne aneuploídie všeobecne nevykazujú žiadne rozdiely oproti skupine fyziologických tehotenstiev.

Zdá sa, že nielen množstvo voľnej fetálnej DNA, ale aj hladiny celkovej voľnej DNA v plazme by mohli byť tým sľubným markerom pre zisťovanie patologických tehotenstiev. Na rozdiel od stanovovania voľnej fetálnej DNA by meranie hladín celkovej voľnej DNA umožnilo aj diagnostiku tehotenstiev s plodom ženského pohlavia, ktoré doposiaľ nebolo možné analyzovať.

6 Diskusia

Od momentu prvej zmienky v odbornej literatúre o identifikácii voľnej fetálnej DNA v materskej plazme (Lo *et al.* 1997) stúpa vo svete veľký záujem o vyvinutie bezpečných a spoľahlivých prístupov neinvazívnej prenatalnej diagnostiky založenej na tomto fenoméne, ktoré by umožňovali monitorovanie komplikácií spojených s tehotenstvom a taktiež diagnostiku genetických ochorení plodu. Avšak pred možnou klinickou aplikáciou prístupov založených na voľnej fetálnej DNA sú nutné rozsiahle vedomosti o fyziológii voľnej fetálnej DNA uvoľňovanej do materskej plazmy. Za týmto účelom je potrebné vyšetrit' veľké množstvo vzoriek a stanoviť koncentrácie voľnej fetálnej DNA v rôznych štádiách tehotenstva, ktoré by mohli slúžiť ako referenčné dáta.

V rámci našej práce sme zaviedli neinvazívnu prenatalnu diagnostiku pohlavia plodu založenú na amplifikácii Y-špecifických chromozómových sekvencií pomocou Real-time PCR reakcie. Analyzovali sme 238 nezávislých vzoriek DNA tehotných žien s jedným plodom mužského pohlavia v rôznych štádiách tehotenstva. Zmiešané vzorky fetálnej a maternálnej DNA boli izolované automaticky s využitím MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics).

Naše dáta potvrdili, že prienik voľnej fetálnej DNA do materskej plazmy je veľmi skorý fenomén. Voľnú fetálnu DNA sme detegovali od 9. týždňa tehotenstva so 100 % senzitivitou. Voľná fetálna DNA bola v priebehu tehotenstva najskoršie detegovaná už po 5 týždňoch a 2 dňoch tehotenstva po *in vitro* fertilizácii, avšak iba s 50 % úspešnosťou. 100 % senzitivita bola dosiahnutá až pri detekcii vzoriek z 9. týždňa tehotenstva (Rijnders *et al.* 2003). V našom prípade boli vzorky materskej krvi odoberané v rámci odberu krvi na biochemické trimestrálne skriningy, takže sme nemali možnosť analyzovať vzorky zo skoršieho štádia tehotenstva.

Pomocou metódy Real-time PCR boli amplifikované a kvantifikované lokusy SRY a GAPDH. Pomocou lokusu SRY tak bola kvantifikovaná voľná fetálna DNA, pomocou lokusu GAPDH bol zároveň stanovený celkový obsah fetálnej a maternálnej voľnej DNA v jednotlivých trimestroch tehotenstva. Zistili sme, že množstvo voľnej fetálnej DNA v plazme počas tehotenstva rastie, s najvyšším nárastom medzi 2. a 3. trimestrom, čo je v zhode s publikovanou literatúrou (Lo *et al.* 1998). Hladiny celkovej voľnej DNA zostávajú v priebehu tehotenstva konštantné, medzi hodnotami získanými

v jednotlivých trimestroch neboli nájdené štatisticky signifikantné rozdiely. Pri použití tejto automatickej izolácie DNA bola v prvom trimestri nameraná priemerná hladina voľnej fetálnej DNA 41,6 genómových ekvivalentov (GE)/ml plazmy (medián 35,95 GE/ml), v druhom trimestri 55,9 GE/ml (medián 52,95 GE/ml) a v treťom trimestri 137,8 GE/ml plazmy (medián 115,27 GE/ml). V prípade celkovej voľnej DNA bola nameraná priemerná hladina v prvom trimestri 859,2 GE/ml plazmy, v druhom trimestri 958,0 GE/ml a v treťom trimestri 992,7 GE/ml plazmy. Približne konštantné hladiny celkovej voľnej DNA môžu svedčiť o existencii nejakého homeostatického mechanizmu, ktorý by tieto hladiny udržiaval. Chiu *et al.* (2005) však s použitím tohto automatického izolačného kitu dosiahli u vzoriek z druhého trimestra pri kvantifikácii voľnej fetálnej DNA hodnotu mediánu len 4 GE/ml plazmy a senzitivitu dosahujúcu len 67 %. Rozdielna výsledná hodnota môže byť spôsobená nižším vstupujúcim množstvom plazmy do izolačného postupu (800 μ l oproti nami použitom 1 ml plazmy), odlišnou tvorbou kalibračných kriviek, ale taktiež aj iným typom použitého prístroja pre Real-time PCR či iných prístrojov. Na hodnoty voľnej fetálnej DNA a taktiež celkovej voľnej DNA môže mať pravdepodobne vplyv aj etnický pôvod a životné podmienky tehotných žien (Zhong *et al.* 2004).

Taktiež bolo stanovené percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v celkovej voľnej DNA vo všetkých troch trimestroch. V prvom trimestri dosahovalo 8,2 %, v druhom trimestri 10,7 % a v treťom trimestri tehotenstva 23,2 %. Takto vysoké percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA môže s vysokou pravdepodobnosťou potvrdzovať jej placentárny pôvod. Koncentrácia voľnej fetálnej DNA publikovaná v odbornej literatúre (Lo *et al.* 1998) je oproti našim výsledkom nižšia a dosahuje priemerných hodnôt od 3,4 % v skorom štádiu tehotenstva, až po 6,2 % v treťom trimestri z celkovej voľnej DNA v krvnej plazme tehotnej. Rozdiely môžu byť spôsobené rozdielnymi metodickými prístupmi ale i rozdielnou citlivosťou prístrojov na Real-time PCR, resp. ich optických systémov. Čím väčšie množstvo voľnej fetálnej DNA je možné zo miešanej vzorky celkovej voľnej DNA amplifikovať, tým môžu byť poskytnuté presnejšie základy pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku založenú na kvantifikácii voľnej fetálnej DNA. Zdá sa teda, že v našej práci je kvantifikácia voľnej fetálnej DNA u fyziologických tehotenstiev dostatočne zvládnutá a získané dáta môžu spoľahlivo slúžiť na porovnanie možných kvantitatívnych odchýlok vyskytujúcich sa u nefyziologických tehotenstiev.

Získané dáta je však len veľmi ťažko možné porovnávať s údajmi publikovanými v odborných článkoch, pretože vo väčšine neboli získavané rovnakými metodickými postupmi. Zdá sa, že najväčší vplyv na množstvo amplifikovanej DNA má spôsob jej izolácie. Naším cieľom bolo pokúsiť sa porovnať vybrané izolačné metodiky a dať odpoveď na otázku, nakoľko je možné publikované výsledky porovnať, a ktorá z izolácií je najoptimálnejšia pre detekciu voľnej fetálnej a celkovej voľnej DNA v materskej plazme.

V odbornej literatúre je najčastejšie používaným spôsobom izolácie zmiešanej vzorky fetálnej a maternálnej DNA manuálna izolácia s využitím izolačného kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). V našich podmienkach však tento izolačný kit nedosahoval z pomedzi manuálnych kitov najväčšiu výťažnosť. Pri využití tohto kitu bolo priemerné množstvo voľnej fetálnej DNA v prvom trimestri 58,2 GE/ml plazmy (medián 54,75 GE/ml), v druhom trimestri 90,3 GE/ml (medián 87,49 GE/ml) a v treťom trimestri 205,9 GE/ml plazmy (medián 168,83 GE/ml). Johnson *et al.* (2004) sa zaoberali kvantifikáciou voľnej fetálnej DNA pomocou lokusu SRY v 5 rôznych nezávislých centrách. Vo všetkých kvantifikovali rovnaké vzorky z druhého trimestra tehotenstva za použitia zhodných metodických postupov s využitím manuálneho izolačného kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Priemerné množstvo voľnej fetálnej DNA v druhom trimestri, ktoré sa im podarilo amplifikovať bolo 51 až 228 GE/ml plazmy. Rozdiely v senzitivite medzi rôznymi centrami úzko súviseli s množstvom amplifikovanej voľnej fetálnej DNA (centrum, ktoré získalo len 51 GE/ml dosahovalo senzitivitu iba 43 %). Tieto dáta naznačujú, že proces izolácie DNA je najpravdepodobnejší faktor ovplyvňujúci výsledky, pretože v každom z centier bol použitý rovnaký prístroj pre Real-time PCR reakciu. Pri použití rozdielnych koncentrácií sond a primerov nebol zaznamenaný štatisticky významný rozdiel v množstve naamplifikovanej DNA. Taktiež Chiu *et al.* (2005) kvantifikovali voľnú fetálnu DNA pomocou lokusu SRY a s využitím manuálneho izolačného kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Koncentrácia druhotrimestrálnych vzoriek maternálnej plazmy dosahovala medián 40 GE/ml plazmy. Výsledky našej práce teda spadajú do rozmedzia už publikovaných hodnôt. Mohli však byť výrazne ovplyvnené tým, že sme s týmto QIAamp DNA Blood Mini Kitom pracovali v prvom roku riešenia grantu. Ďalšie rozdiely v rámci publikovaných výsledkov môžu byť dané taktiež izoláciou DNA z rôzneho množstva plazmy. Výrobcom odporúčané množstvo vstupujúcej

plazmy u tohto izolačného kitu je 200 μ l. Avšak proporcionálne vyššie výt'ažky sú získavané už pri 400 μ l plazmy (Galbiati *et al.* 2005). Pri nami využívanými 600 μ l vstupujúcej plazmy a 800 μ l vstupujúcej plazmy využívanými u oboch spomínaných publikácií boli publikované len nepatrne vyššie výt'ažky ako u 400 μ l vstupujúcej plazmy. Môže to byť vysvetlené presýtením kolónky, nadbytkom viažucej sa a eluovanej DNA z kolónky. Toto presýtenie vedie k príliš nízkemu odhadu pri určovaní koncentrácie voľnej fetálnej DNA v materskej plazme.

Ďalšou možnosťou izolácie zmiešanej vzorky fetálnej a maternálnej DNA je manuálna izolácia s využitím izolačného kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics). V našich podmienkach sme dosiahli u voľnej fetálnej DNA priemerné hladiny v prvom trimestri 70,74 GE/ml plazmy (medián 54,81 GE/ml), v druhom trimestri 97,8 GE/ml (medián 82 GE/ml) a v treťom trimestri 248,6 GE/ml plazmy (medián 154 GE/ml). Pri porovnávaní týchto priemerných hodnôt s hodnotami získanými izolačným kitom od firmy Qiagen sa zdá, že tento kit poskytuje o trochu vyššie výt'ažky. Môže to však byť spôsobené väčším rozmedzím, v ktorom sa nachádzali hodnoty získané pri použití izolačného kitu od firmy Roche Diagnostics. Pri štatistickom porovnávaní získaných dát v každom z trimestrov tehotenstva neboli nájdené medzi oboma manuálnymi izoláciami štatisticky významné rozdiely. Oba manuálne izolačné kity sú teda pri našom používaní rovnocenné, a to ako z hľadiska výt'ažkov izolácie, tak nárokov na čistotu izolovanej voľnej fetálnej DNA, či účinnosti Real-time PCR reakcie amplifikujúcej SRY lokus.

V práci sme taktiež porovnali automatický a manuálny spôsob izolácie DNA. Využili sme nato už vyššie spomínané izolačné kity: High Pure PCR Template Preparation Kit pre manuálnu izoláciu a MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit – Large Volume pre automatickú izoláciu, oba od rovnakého výrobcu Roche Diagnostics. Z už uvádzaných výsledkov je zrejmé, že manuálna izolácia všeobecne poskytuje vyššie kvantily DNA, fetálnej aj celkovej, avšak štatisticky významné rozdiely medzi izoláciou na prístroji a manuálnou preukázané neboli. Pomerné zastúpenie voľnej fetálnej DNA vo vzorkách maternálnej plazmy zostáva u manuálnej izolácie približne rovnaké ako u izolácie automatickej. Oba typy izolácie sú v našich podmienkach vhodné pre detekciu pohlavia plodu a taktiež pre kvantifikáciu voľnej fetálnej aj celkovej voľnej DNA. Aj napriek nižšiemu výt'ažkom pri automatickej izolácii je výhodou tohto typu izolácie reprodukovateľnosť výsledkov, výrazne znížené riziko

kontaminácie vzoriek, možnosť izolácie z veľkého objemu plazmy a v neposlednom rade omnoho menšia časová náročnosť v porovnaní s manuálnymi izoláciami DNA. Na základe uspokojivých výsledkov kvantifikácie a spomínaných výhod tohto metodického postupu sme automatickú izoláciu s použitím MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation kit – Large Volume (Roche Diagnostics) vyhodnotili ako najoptimálnejší spôsob izolácie zmiešanej vzorky voľnej fetálnej a celkovej voľnej DNA.

Okrem spôsobu izolácie DNA môže mať vplyv na výsledné množstvo amplifikovanej DNA aj použitie rôzneho detekčného systému v Real-time PCR reakcii. V našej práci sme porovnali 2 najčastejšie používané detekčné systémy pri určovaní pohlavia plodu, a to lokusy SRY a DYS 14 na Y chromozóme. Hodnoty získané u detekčného systému SRY sa zdajú byť trochu vyššie ako pri použití detekčného systému DYS 14, ale žiadne štatistické rozdiely medzi týmito detekčnými systémami neboli zistené. Vyššie priemerné hodnoty u detekčného systému SRY môžu však byť spôsobené len väčším rozmedzím, v ktorom sa získané hodnoty nachádzajú. V systéme DYS 14 boli získané výsledky súrodejšie, oproti systému SRY sa tu vyskytovalo oveľa menej odľahlých hodnôt. Oba tieto detekčné systémy poskytujú prakticky rovnaké výsledky a použitie jedného či druhého v publikovanej literatúre umožňuje porovnávať získané výsledky s minimálnym ohľadom na použitie detekčného systému.

Vzorky DNA izolované automatickou metódou v rôznych gestačných týždňoch fyziologických tehotenstiev sme využili pre porovnanie so vzorkami získanými z tehotenstiev nefyziologických. U dvojpočetných tehotenstiev rastie v priebehu tehotenstva ako voľná fetálna, tak aj celková voľná DNA, táto však s väčšou dynamikou a dosahuje vyšších hodnôt než u fyziologických jednopčetných tehotenstvách. Tieto vysoké hodnoty celkovej voľnej DNA môžu súvisieť s väčšími rozmermi placenty u dvojpočetných gravidít a s väčším uvoľňovaním placentárnych buniek do maternálneho krvného obehu s ich následnou degradáciou a uvoľňovaním voľnej maternálnej DNA do krvi tehotnej ženy. Percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v plazme je nízke. Hodnoty voľnej fetálnej a celkovej voľnej DNA pravdepodobne nie sú ovplyvnené pohlavím plodu, čo je v zhode s publikovanou literatúrou (Smid *et al.* 2003). Avšak, aby bolo možné zo získaných dát vyvodit' nejaké konkrétnejšie závery, bolo by vhodné v budúcnosti analyzovať ďalšie vzorky plaziem z dvojpočetných tehotenstiev a získať tak súbor vzoriek, na ktorom by sa dala previesť štatistická analýza s plne hodnotiteľnými výsledkami.

U patologických tehotenstiev má kinetika voľnej fetálnej aj celkovej voľnej DNA často dramatický priebeh. Absolútne hladiny sú u niektorých patológií značne vyššie než u dvojpočetných gravidít, resp. u fyziologických tehotenstiev. Priemerné množstvo voľnej fetálnej DNA je u tehotenstiev s rozvojom preeklampsie 2x vyššie než u dvojpočetných tehotenstiev a 10x vyššie než u fyziologických tehotenstiev. V odbornej literatúre sa najčastejšie uvádza 5násobné zvýšenie voľnej fetálnej DNA v porovnaní s fyziologickými tehotenstvami (Farina *et al.* 2004c). Obsah celkovej voľnej DNA je u preeklampsií 1,3x vyšší než u dvojpočetných tehotenstiev a 7,7x vyšší než u fyziologických tehotenstiev. Percentuálny obsah voľnej fetálnej DNA v plazme je preto nízky. Výrazný nárast voľnej fetálnej DNA u predčasných pôrodov uvádzaný v odbornej literatúre (Hoesli *et al.* 2002) sa nepotvrdil, hodnoty nevykazovali štatisticky významné rozdiely oproti hodnotám u fyziologických tehotenstiev.

Zvýšenie hladiny celkovej voľnej DNA sme zaznamenali taktiež u dlhodobej tokolýzy, a to 2násobné oproti hladinám u dvojpočetných tehotenstiev a 10násobné oproti fyziologickým tehotenstvám. U gestačného diabetu je zvýšenie hladiny celkovej voľnej DNA oproti fyziologickým tehotenstvám 4,5násobné, u predčasných pôrodov 2,4násobné.

Chromozómové aneuploídie všeobecne nevykazujú v našich podmienkach žiadne rozdiely oproti skupine fyziologických tehotenstiev. Názory na problematiku chromozómových aneuploídií sa však v odbornej literatúre rôznia, hlavne čo sa týka trizómie 21. chromozómu. Niektoré publikácie (Hromadníková *et al.* 2002, Spencer *et al.* 2003) uvádzajú, že medzi množstvom voľnej fetálnej DNA u tehotenstiev s plodmi s trizómiou 21. chromozómu a fyziologickými tehotenstvami nie je žiadny štatisticky významný rozdiel. Iné práce (Lee *et al.* 2002) uvádzajú až 1,7násobné zvýšenie voľnej fetálnej DNA oproti hodnotám získaným z fyziologických tehotenstiev.

Naše výsledky ukazujú, že u niektorých patologických tehotenstiev je možné detegovať vysoké hladiny voľnej fetálnej a celkovej voľnej DNA v plazme v priebehu tretieho, resp. druhého trimestra tehotenstva. Kvantifikácia voľnej fetálnej DNA a prekvapivo aj celkovej voľnej DNA by mohla slúžiť ako určitý diagnostický marker pre vyhľadávanie patologických tehotenstiev a v budúcnosti by mohla byť využitá vo forme skríningu pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku stavu plodu, a to nielen plodu mužského ale aj ženského pohlavia.

7 Súhrn

- Úspešne sme zaviedli neinvazívnu prenatalnú diagnostiku pohlavia plodu založenú na amplifikácii Y – špecifických sekvencií pomocou Real – time PCR reakcie.
- Podarilo sa nám kvantifikovať voľnú fetálnu DNA a celkovú voľnú DNA v rôznych gestačných týždňoch fyziologického tehotenstva. Zistili sme, že množstvo voľnej fetálnej DNA v plazme počas tehotenstva rastie, s najvyšším nárastom medzi 2. a 3. trimestrom, zatiaľ čo hladiny celkovej voľnej DNA zostávajú v priebehu tehotenstva konštantné. Stanovili sme percentuálne zastúpenie voľnej fetálnej DNA v celkovej voľnej DNA, ktoré sa v priebehu tehotenstva zvyšuje od prvotrimestrálnych 8,2 % až po 23,2 % v treťom trimestri.
- Za účelom umožniť porovnanie výsledkov v odbornej literatúre, ktoré boli získané rôznymi metodickými postupmi, sme navzájom porovnávali 3 rôzne DNA izolačné metódy. V našich rukách všetky tri izolačné kity dosahovali obdobných výsledkov. Najväčšiu výťažnosť má manuálny kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics).
- Porovnali sme efektivity amplifikácie dvoch najčastejšie používaných detekčných systémov SRY a DYS 14 na určenie pohlavia metódou Real – time PCR. Žiadne štatistické rozdiely medzi týmito detekčnými systémami neboli zistené.
- Dáta o kinetike voľnej fetálnej a celkovej voľnej DNA v priebehu fyziologických tehotenstiev sme využili ako referenčné pri porovnaní s hodnotami fetálnej a celkovej voľnej DNA v priebehu nefyziologických tehotenstiev. Priemerná hodnota plazmatických hladín voľnej fetálnej DNA u dvojpočetných tehotenstiev a u tehotenstiev s rozvojom preeklampsie je v porovnaní s hladinami u fyziologických tehotenstiev zvýšená. U predčasného pôrodu, dlhodobej tokolýzy, gestačného diabetu a aneuploídií sme nezaznamenali žiadne signifikantné zvýšenie hladín voľnej fetálnej DNA.

U všetkých typov patológií, mimo aneuploídií, však dochádza k preukázanému zvýšeniu celkovej voľnej DNA v maternálnej plazme, predovšetkým u dlhotrvajúcej tokolýzy a preeklampsie. Zdá sa, že nielen množstvo voľnej fetálnej DNA ale aj hladiny celkovej voľnej DNA v plazme by mohli byť sľubným markerom pre zisťovanie patologických tehotenstiev.

- Úspešne sme zaviedli neinvazívnu prenatalnú diagnostiku Rh faktoru plodu pomocou Real – time PCR reakcie.

8 Zoznam literatúry

Angert, R.M., Le Shane, E.S., Lo, Y.M.D., Chan, L.Y.S., Delli – Bovi, L.C., Bianchi, D.W. (2003): Fetal cell – free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection : Analysis of first – and third – trimester samples. *Clin. Chem.* 49: 195 – 198.

Anker, P., Stroun, M., (2001): Circulating DNA in plasma or serum. In: Hahn, S., Holzgreve, W. (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium. 11 th fetal Cell Workshop, Karger, Basel, 1 – 7.*

Ariga, H., Ohto, H., Bush, M.P., Imamura, S., Watson, R., Reed, W., Lee, T.H. (2001): Kinetics of fetal cellular and cell – free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy : implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 41: 1524 – 1530.

Bayes-Genis, A., Bellosillo, B., de La Calle, O., Salido, M., Roura, S., Solé Ristol, F., Soler, C., Martinez, M., Espinet, B., Serrano, S., Bayes de Luna, A., Cinca, J. (2005): Identification of male cardiomyocytes of extracardiac origin in the hearts of women with male progeny: male fetal cell microchimerism of the heart. *J Heart Lung Transplant* 24: 2179 – 2183.

Bianchi, D.W., Mahr, A., Zickwolf, G.K. (1992) Citované podľa Jackson, L. (2003): Fetal cells and DNA in maternal blood. *Prenat. Diagn.* 23: 837 – 846.

Bianchi, D.W., Zickwolf, G.K., Weil, G.J., Sylvester, S., De Maria, M.A. (1996): Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 705 – 708.

Bianchi, D.W., Lo, Y.M.D. (2001): Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking. *Ann. NY Acad. Sci.* 945 : 119 – 131.

Bianchi, D.W. (2004): Circulating fetal DNA : Its origin and diagnostic potencial – A review. *Placenta, Supplement A, Trophoblast research* 18: S93 – S101.

Bischoff, F.Z., Lewis, D.E., Simpson, J.L. (2005): Cell – free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Human Reproduction Update* 11: 59 – 67.

Chan, K.C.A., Zhang, J., hui, A.B.Y., Wong, N., Lau, T.K., Leung, T.N., Lo, K-W., Huang, D.W.S., Lo, Y.M.D. (2004): Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 50: 88 – 92.

Chan, L.Y.S., Leung, T.N., Chan, K.C.A., Tai, H.L., Lau, T.K., Wong, E.M.C., Lo, Y.M.D. (2003): Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *Clin. Chem.* 49: 678 – 680.

Chim, S.S.C., Tong, Y.K., Chiu, R.W.K., Lau, T.K., Leung, T.N., Chan, L.Y.S., Oudejans, C.B.M., Ding, Ch., Lo, Y.M.D. (2005): Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. *PNAS* 102: 14753 – 14758.

Chiu, R.W.K., Lo, D.Y.M. (2004): Recent developments in fetal DNA in maternal plasma. *Ann. NY Acad. Sci.* 1022: 100 – 104.

Chiu, R.W.K., Lui, W., El-Sheikhah, A., Chan, A.T.C., Lau, T.K., Nicolaides, K.H., Lo, D.Y.M. (2005): Comparison of protocols for extracting circulating DNA and RNA from maternal plasma. *Clin. Chem.* 51: 2209 – 2210.

Costa, J-M., Benachi, A., Gautier, E., Jouannic, J-M., Ernault, P., Dumez, Y. (2001): First – trimester fetal sex determination in maternal serum using Real–time PCR. *Prenat. Diagn.* 21: 1070 – 1074.

Cremonesi, L. (2001): Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in preeclamptic pregnancies. In: Hahn, S., Holzgreve, W. (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium. 11th fetal Cell Workshop, Karger, Basel*, 104 – 110.

Farina, A., Caramelli, E., Concu, M., Sekizawa, A., Ruggeri, R., Bovicelli, L., Rizzo, N., Carinci, P. (2002): Testing normality of fetal DNA concentration in maternal plasma at 10 – 12 completed weeks gestation: a preliminary approach to a new marker for genetic screening. *Prenat. Diagn.* 22: 148 – 152.

Farina, A., Le Shane, E.S., Lambert–Messerlian, G.M., Canick, J.A., Lee, T., Neveux, L.M., Palomaki, G.E., Bianchi, D.W. (2003): Evaluation of cell – free fetal DNA as a second–trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clin. Chem.* 49: 239 – 242.

Farina, A., Sekizawa, A., Iwasaki, M., Matsuoka, R., Ichizuka, K., Okai, T. (2004a): Total cell – free DNA (β -globin gene) distribution in maternal plasma at the second trimester: a new prospective for preeclampsia screening. *Prenat. Diagn.* 24: 722 – 726.

Farina, A., Sekizawa, A., Rizzo, N., Concu, M., Banzola, I., Carinci, P., Simonazzi, G., Okai, T. (2004b): Cell – free fetal DNA (SRY locus) concentration in maternal plasma is directly correlated to the time elapsed from the onset of preeclampsia to the collection of blood. *Prenat. Diagn.* 24: 293 – 297.

Farina, A., Sekizawa, A., Sugito, Y., Iwasaki, M., Jimbo, M., Saito, H., Okai, T. (2004c): Fetal DNA in maternal plasma as a screening variable for preeclampsia. A preliminary nonparametric analysis of detection rate in low – risk nonsymptomatic patients. *Prenat. Diagn.* 24: 83 – 86.

Ferguson – Smith, M.A. (2003): Placental mRNA in maternal plasma: prospects for fetal screening. *PNAS* 100: 4360 – 4362.

Finning, K., Martin, P., Daniels, G. (2004): A clinical service in the UK to predict Fetal Rh (Rhesus) D Blood group using free fetal DNA in maternal plasma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022: 119 – 123.

Fleischhacker, M. (2005): Biology of circulating mRNA – still more questions than answers. In : *Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum* : London, September 4 – 6, 2005 *Clin. Chem.* 51: 1 – 2.

Gingeras, T.R., Higuchi, R., Kricka, L.J., Lo, Y.M.D., Wittwer, C.T. (2005): Fifty years of molecular (DNA/RNA) diagnostics. *Clin. Chem.* 51: 661 – 671.

Guetta, E. (2001): Fetal cells in maternal blood at Sheba medical center, Israel : Analysis of tree cell types during the three trimesters of pregnancy. In: Hahn, S., Holzgreve, W., (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium. 11 th fetal Cell Workshop, Karger, Basel, 37 – 40.*

Hahn, S. (2001): Free fetal DNA in maternal plasma and serum : diagnostic and clinical implications. In: Hahn, S., Holzgreve, W., (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium. 11 th fetal Cell Workshop, Karger, Basel, 97 – 103.*

Hahn, S. (2005): Circulating fetal DNA : is it all a question of size and mass? In : *Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum : London, September 4 – 6, 2005 Clin. Chem.* 51: 3.

Hoesli, I., Danek, M., Lin, D., Li, Y., Hahn, S., Holzgreve, W. (2002): Circulating erythroblasts in maternal blood are not elevated before onset of preterm labor. *Obstetrics & Gynecology* 100: 992 – 996.

Hohmann, H. (2001): How to enrich and analyze fetal cells from maternal blood : 5 – years experience with PCR, FISH and cultivation. In: Hahn, S., Holzgreve, W. (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium. 11th fetal Cell Workshop, Karger, Basel, 47 – 55.*

Holzgreve, W. (2001): Fetal cells in maternal blood: An overview of the Basel experience. In: Hahn, S., Holzgreve, W. (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium. 11th fetal Cell Workshop, Karger, Basel, 28 – 36.*

Hořínek, A., Korábečná, M., Ulcová – Gallová, Z., Calda, P., Nouzová, K., Visková, H. (2005): Quantification of cell – free fetal DNA in the maternal circulation and its

correlation with clinical outcome of pregnancy. In: *Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum*: London, September 4 – 6, 2005 *Clin. Chem.* 51: 20.

Hromadníková, I. (2001): Fetal nucleated red blood cells in maternal blood during pregnancy: first czech experience. In: Hahn, S., Holzgreve, W. (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium*. 11th fetal Cell Workshop, Karger, Basel, 63 – 73.

Hromadníková, I., Houbová, B., Hridelová, D., Voslárová, S., Calda, P., Nekolářová, K., Kofer, J., Stejskal, D., Doucha, J., Cinek, O., Vavřivec, J. (2002): Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2: 4.

Hromadníková, I., Houbová, B., Hridelová, D., Voslárová, S., Kofer, J., Komrska, V., Habart, D. (2003): Replicate Real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non – invasive fetal sex determination. *Prenat. Diagn.* 23: 235 – 238.

Hu, Y., Zheng, M., Xu, Z., Wang, X., Cui, H. (2004): Quantitative Real-time PCR technique for rapid prenatal diagnosis of Down syndrome. *Prenat. Diagn.* 24: 704 – 707.

Huang, D.J., Zimmermann, B.G., Holzgreve, W., Hahn, S. (2005): Use of an automated method improves the yield and quality of cell-free fetal DNA extracted from maternal plasma. *Clin. Chem.* 51: 2419 – 2420.

Ingargiola, I., Vaerman, J-L., Debieve, F., Palgen, G., Verellen-Dumoulin, Ch., Hubinont, C. (2003): Free fetal DNA concentration in maternal plasma during normal labour at term. *Prenat. Diagn.* 23: 1077 – 1082.

Jackson, L. (2003): Fetal cells and DNA in maternal blood. *Prenat. Diagn.* 23: 837 – 846.

Johnson, K.L., Dukes, K.A., Vidaver, J., Le Shane, E.S., Ramirez, I., Weber, W.D., Bischoff, F.Z., Hahn, S., Sharma, A., Dang, D.X., Hire, L.M., Bianchi, D.W., Simpson, J.L., Holzgreve, W., Elias, S., Klinger, K. (2004): Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by Real – Time PCR. *Clin. Chem.* 50: 1 – 6.

Khosrotehrani, K., Johnson, K.L., Lau, J., Dupuy, A., Cha, D.H., Bianchi, D.W. (2003): The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism. *Arthritis & Rheumatism* 48: 3237 – 3241.

Kolialexi, A., Tsangaris, G.T., Antsaklis, A., Mavrou, A. (2004a): Fetal cells in maternal plasma are found in a late state of apoptosis. *Prenat. Diagn.* 24: 719 – 721.

Kolialexi, A., Tsangaris, G.T., Antsaklis, A., Mavrou, A. (2004b): Rapid clearance of fetal cells from maternal circulation after delivery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022: 113 – 118.

Lau, T.W., Leung, T.N., Chan, L.Y.S., Lau, T.K., Chan, K.C.A., Tam, W.H., Lo, Y.M.D. (2002): Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin. Chem.* 48: 2141 – 2146.

Lee, T.L., Le Shane, E.S., Messerlian, G.M., Canick, J.A., Farina, A., Heber, W.W. (2002): Down syndrome and cell – free fetal DNA in archived maternal serum. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187: 1217 – 1221.

Leon S.A., et al. (1977). Citované podľa Lo, Y.M.D. (2001): Circulating nucleic acids in plasma and serum : an overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 945: 1 – 7.

Leung, T.N., Zhang, J., Lau, T.K., Chan, L.Y., Lo, Y.M.D. (2001): Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin. Chem.* 47 : 137 – 139.

Li, Y., Zimmerman, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., Hahn, S. (2004): Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin. Chem.* 50: 1002 – 1011.

Lo, Y.M.D., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., et al. (1997): Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350: 485 – 487.

Lo, Y.M.D., Tein, M.S., Lau, T.K., Haines, C.J., Leung, T.N., Poon, P.M., et al. (1998): Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum : implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 768 – 775.

Lo, Y.M.D. (2000): Fetal DNA in maternal plasma : Biology and diagnostic applications. *Clin. Chem.* 46: 1903 – 1906.

Lo, Y.M.D. (2001): Circulating nucleic acids in plasma and serum : an overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 945: 1 – 7.

Lo, Y.M.D. (2005a): Development of universal fetal DNA markers. In: *Circulating Nucleic Acids in Plasma / Serum*: London, September 4 – 6, 2005 *Clin. Chem.* 51: 3.

Lo, Y.M.D. (2005b): Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53: 293 – 296.

Ng, E.K.O., Leung, T.N., Tsui, B.Y., Lau, T.K., Panesar, N.S., Chiu, R.W.K., Lo, Y.M.D. (2003): The concentration of circulating corticotropin – releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin. Chem.* 49: 727 – 731.

Poon, L.L.M., Leung, T.N., Lau, T.K., Lo, Y.M.D. (2000): Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 46: 1832 – 1834.

Poon, L.L.M., Leung, T.N., Lau, T.K., Chow, K.C.K., Lo, Y.M.D. (2002): Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem.* 48: 35 – 41.

Reischig, J., Hořínek, A., Korabečná, M., Křížková, V. (2005): Plod „opravuje“ matčino tělo. *Vesmír* 84: 265 – 268.

Rijnders, R.J.P., Van Der Luijt, R.B., Peters, E.D.J., Goeree, J.K., Van Der Schoot, C.E., Ploos Van Amstel, J.K., Christiaens, G.C.M.L. (2003): Earliest gestational age for fetal sexing in cell – free maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 23: 1042 – 1044.

Smid, M., Galbiati, S., Vassallo, A., Gambini, D., Ferrari, A., Restagno, G., Viora, E., Pagliano, M., Calza, S., Ferrari, M., Cremonesi, L. (2003): Fetal DNA in maternal plasma in twin pregnancies. *Clin. Chem.* 49: 1526 – 1528.

Spencer, K., de Kok, J.B., Swinkels, D.W. (2003): Increased total cell – free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21. *Prenat. Diagn.* 23: 580 – 583.

Surbek, D.V., Holzgreve, W. (2001): Why do we need noninvasive prenatal diagnostic procedures? In: Hahn, S., Holzgreve, W. (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood. New Developments for a New Millenium. 11th fetal Cell Workshop*, Karger, Basel, 21 – 27.

Taback, B., Hoon, D.S.B. (2004): Circulating nucleic acids and proteomics of plasma/serum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022: 1 – 8.

Tjoa, M.L., Oudejans, C.B.M., van Vugt, J.M.G., Blankenstein, M.A., van Wijk, I.J. (2004): Markers for presymptomatic prediction of preclampsia and intrauterine growth restriction. *Hypertension in pregnancy* 23: 171 – 189.

Tsui, B.Y., Chim S.S.C., Chiu, R.W.K., Lau, T.K., Ng, E.K.O., Leung, T.N., Chan, K.C.A., Lo, Y.M.D. (2004): Systematic micro – array based identification of placental mRNA in maternal plasma : towards non – invasive prenatal gene expression profiling. *J. Med. Genet.* 41: 461 – 467.

Walknowska, J. et.al. (1969). Citované podľa Bianchi, D.W., Lo, Y.M.D. (2001): Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking. *Ann. NY Acad.* 946: 119 – 131.

Wataganara, T., Le Shane, Farina, A., Messerlian, G.M., Lee, T., Canick, J.A., Bianchi, D.W. (2003): Maternal serum cell – free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum. Genet.* 112: 204 – 208.

Wataganara, T., Bianchi, D.W. (2004a): Fetal cell-free nucleic acid in the maternal circulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022: 90 -99.

Wataganara, T., Le Shane, E.S., Chen, A.Y., Borgatta, L., Peter, I., Johnson, K.L., Bianchi, D.W. (2004b): Plasma γ -globin gene expression suggests that fetal hematopoietic cells contribute to the pool of circulating cell-free fetal nucleic acids during pregnancy. *Clin. Chem.* 50: 689 – 693.

Wataganara, T., Le Shane, E.S., Chen, A.Y., Sullivan, L.M., Peter, I., Borgatta, L., Johnson, K.L., Bianchi, D.W. (2004c): Circulating cell-free fetal nucleic acid analysis may be a novel marker of fetomaternal hemorrhage after elective first-trimester termination of pregnancy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022: 129 – 134.

van Wijk, I.J. (2001): Circulating trophoblast cells in maternal peripheral blood. In: Hahn, S., Holzgreve, W. (Eds.): *Fetal Cells and Fetal DNA in Maternal Blood*. New Developments for a New Millenium. 11th fetal Cell Workshop, Karger, Basel, 111 – 119.

Zhong, X.Y., Bürk, M.R., Troeger, C., Jackson, L.R., Holzgreve, W., Hahn, S. (2000a): Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat. Diagn.* 20: 795 – 798.

Zhong, X.Y., Bürk, M.R., Troeger, C., Kang, A., Holzgreve, W., Hahn, S. (2000b): Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. *Obstetrics & Gynecology* 96: 991 – 995.

Zhong, X.Y., Holzgreve, W., Hahn, S. (2001): Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Med Wkly* 131(05):70-74.

Zhong, X.Y., Wang, Y., Chen, S., Pan, X., Zhu, N., Hahn, C., Huppertz, B., Holzgreve, W., Hahn, S., Labu, Pubuzhuoma, Gesangzhuogab, Ouzhuwangmu (2004): Circulating fetal DNA in maternal plasma is increased in pregnancies at high altitude and is further enhanced by preeclampsia. *Clin. Chem.* 50: 2403-2405.

Zhong, X.Y., Gebhardt, S., Hillermann, R., Tofa, K.C., Holzgreve, W., Hahn, S. (2005a): Circulatory nucleosome, an apoptotic biomarker in pre – eclampsia. In : *Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum* : London, September 4 – 6, 2005 *Clin. Chem.* 51: 5.

Zhong, X.Y., Holzgreve, W., Hoesli, I., Hahn, S. (2005b): Circulatory Corticotropin-releasing hormone mRNA concentrations are increased in women with preterm delivery but not in those who respond to tocolytic treatment. *Clin. Chem.* 51: 635 – 636.

Zimmermann, B., Holzgreve, W., Wenzel, F., Hahn, S. (2002): Novel Real-time PCR test for trisomy 21. *Clin. Chem.* 48: 362 – 363.

Zimmermann, B., El-Sheikhah, A., Nicolaidis, K., Holzgreve, W., Hahn, S. (2005): Optimized Real-Time Quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin. Chem* 51: 1598 – 1604.

Zwinger, A., et al. (2004): *Porodnictví*. Galén, Praha. Karolinum, Praha.

Fetal Diagnosis and Therapy

Ms. No. 200609009

Title: Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics

Dear Dr. Horinek,

Thank you for submitting a revised version of your manuscript to Fetal Diagnosis and Therapy. On behalf of the Editor-in-Chief, Prof. Wolfgang Holzgreve, I am pleased to inform you that it has now been accepted for publication and accordingly has been forwarded to the production department. The galley proofs will be sent to you for correction in due course and your interesting manuscript will appear in one of the next issues of the journal.

We hope you will continue to submit work from your group to Fetal Diagnosis and Therapy in the future.

Sincerely yours,

Karin Tschopp

S. KARGER AG, BASEL

Editorial Office

Fetal Diagnosis and Therapy

fdt@karger.ch

Fax: +41 61 306 1434

Tel: +41 61 306 1359

Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics

Ales Horinek¹, Marie Korabecna², Ales Panczak³, Zdenka Ulcova Gallova⁴, Kamila Nouzova⁵, Pavel Calda⁶, Miroslava Hancarova⁷

¹ 3rd Medical Department, 1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University, Prague, ² Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, ³ Institute of Biology and Medical Genetics, 1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University, Prague, ⁴ Clinic of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, ⁵ Gyncentrum, Prague, ⁶Department of Gynaecology and Obstetrics, 1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Charles University, Prague, ⁷ Faculty of Natural Sciences, Charles University, Prague

Corresponding author: M.K., Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Karlovarská 48, 301 66 Pilsen, Czech Republic, e- mail: marie.korabecna@lfp.cuni.cz, phone: +420 603 177 178, +420 377 593 262, fax:+420 377 593 149

Key words

cell-free fetal DNA – maternal plasma – non-invasive diagnosis – pregnancy – real-time PCR

Short title: Free-cell fetal Short title: Free-cell fetal DNA in maternal plasma during pregnancy

Abstract

Objective: To analyze methodological influences and characterize the concentrations of cell-free fetal DNA (cffDNA) circulating in maternal plasma at different gestational ages in physiological pregnancies. *Methods:* We investigated 238 independent samples from single male-bearing pregnancies of different gestation age. In the other 50 pregnancies, the samples were collected three times during pregnancy (at all trimesters) to evaluate the kinetics of cffDNA. The manual and automated DNA extraction methods (Roche) were compared. cff DNA was amplified using real-time PCR method and Y-specific sequences SRY and DYS14. Total free-cell DNA circulating in maternal plasma was determined by use of the GADPH sequence. *Results:* The elevation in the concentration of cffDNA during pregnancy with the highest value in the third trimester was observed independently on the DNA extraction method and on the Y-specific amplified sequence. The same is documented for the percentage of fetal DNA in total cell-free DNA in maternal plasma. It increases also in successive trimesters (8.3, 10.7 and 23.2 %). *Conclusions:* We discuss methodological problems and describe statistical parameters of cffDNA concentrations in maternal plasma during pregnancy as the basic information for comparison with pregnancies having a pathological outcome.

Introduction

Fetal cells circulating in maternal blood are very rare ($1/10^7 - 1/10^8$ maternal nucleated cells [1]) and prenatal diagnostic procedures based on their isolations are limited by this fact. The cell-free fetal DNA (cffDNA) in the plasma of pregnant women has been discovered by Lo [2] and evaluated as more abundant source of fetal genetic material. It has been referred that it accounts to 3-6% of total DNA circulating in plasma of pregnant women [3]. According to recent suggestions, this DNA is derived from trophoblast and later from placenta [4-8] by apoptosis; cffDNA circulates associated with nucleosomes probably in the form of apoptotic bodies [9]. The post-partum clearance is rapid [10]. Qualitative analysis of this circulating DNA has been used for prenatal diagnosis in early pregnancy. 100% sensitivity in fetal gender determination using real-time PCR and amplification of Y-chromosome specific sequences in the fifth week of pregnancy has been achieved by Honda et al.[11]. The detection of single gene mutation in cffDNA in maternal plasma allowed prenatal diagnosis in fetuses with achondroplasia [12], myotonic dystrophy [13], congenital adrenal hyperplasia [14], beta-thalassaemia [15], cystic fibrosis [16], and Huntington disease [17]. The cffDNA may be routinely used for genotyping of fetal RhD status [18].

Quantitative aberrations in concentration of cell-free circulating fetal DNA has been observed in pregnancies with trisomy 21 [19], in twin pregnancies [20], and in pregnancies with various placental pathologies. Elevated values of total cffDNA in maternal plasma were described in connection with trisomy 13, but not with trisomy 18 [21]. Other studies could not detect elevated concentrations in any one pregnancy with aneuploid fetus [22]. Elevated concentrations of circulating fetal DNA seem to be associated with some pregnancy related disorders such as preeclampsia [8, 23, 24], preterm labour [25], invasive placentation [7], intrauterine growth retardation [26, 27], polyhydramnion [28], and ectopic pregnancy [29]. Fluctuations of concentrations of cffDNA in maternal circulation comparable with pathological increase were described in normal physiological pregnancies [30, 31]. The medians of control samples used as reference value in various above mentioned studies are dissimilar. They are listed in table 1. There is a broad variability, the values (given in genomic equivalents of SRY per milliliter of plasma) being normal in one study will be probably judged as elevated in another study with statistic significance.

Since few studies have monitored concentrations of fetal DNA in maternal plasma across all three trimesters and existing studies [32, 33] do not examine the same women in different trimesters, we organized this study. The study was divided in two parts: In the first one, we used 238 independent samples from pregnant women of different gestation age to compare two isolation methods (manual and automatic) and the amplification efficiency on two different Y-chromosomal loci (SRY and DYS14) to select the appropriate methodological approach. In the second part of our study, we followed 50 pregnant women bearing male fetuses consecutively in each trimester using automated method for DNA extraction and SRY amplification. We bring statistical analysis of cffDNA concentrations in maternal plasma during pregnancy; statistical parameters will serve as the base for evaluation of effects of different pathological conditions on the concentration changes of this potential marker.

Methods

Pregnant women attending Clinic of Obstetrics and Gynecology, Charles University, the 1st Faculty of Medicine, and General Teaching Hospital in Prague, a private clinic of gynecology Gyncentrum in Prague, and Clinic of Obstetrics and Gynecology, Charles University, Faculty of Medicine in Pilsen were recruited for this study. Informed consent, as approved by the local ethical committee, was obtained from each woman. The gestation age was confirmed by the ultrasound examination and the fetal sex at delivery, only male bearing pregnancies were selected for this study.

We enrolled 238 pregnant women in the first (9-11 week of gestation, 81 participants), second (19-21 week of gestation, 71 participants) and third trimesters (29-32 week of gestation, 86 participants). For the “prospective study” determining sequentially values in all three trimesters in a woman, 68 pregnant women have been asked to participate, but only in 50 of them we have succeeded in obtaining or investigating all three samples. In all the clinical departments the common standardized protocol for sample collecting, short-time storage, immediate transport, and processing in the lab has been used.

For one examination, 8 ml of blood was taken from each participant into EDTA tube. Sample processing began within 24 hours after blood collection. During this period samples were stored in a refrigerator at 8 °C. Plasma was prepared by centrifugation at 1600g for 10 min (Jouan BR4i) in a sterile 15ml polypropylene tube. The upper plasma

fraction was carefully transferred into a clean polypropylene (Falcon) tube and then it was divided into several Eppendorf tubes in order to be recentrifuged at 14 000 g for 10 min to pellet all residual intact cells and remaining cellular debris. The supernatants were collected into several fresh 1.5 ml Eppendorf tubes (1000µl). The samples were stored at -25°C until further processing. On the day of analysis the plasma was slowly thawed.

DNA was extracted from 1000µl of plasma either automatically using the Roche MagNA PureTM Total Nucleic Acids Isolation Kit – Large Volume (Roche Diagnostic) on the MagNa Pure LC Instrument (Roche Diagnostic) according to the manufacturer's protocol or manually with Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostic) according to manufacturer's recommendations. The extracted DNA was eluted in 50µl of elution buffer. 5µl was used as a template for the PCR reaction. The isolated DNA samples have been processed during 2 days after the isolation.

Strict precautions against contamination were taken; all steps during sample processing and DNA extraction were performed only by female assistants. The use of aerosol-resistant tips (ep T.I.P.S., Eppendorf) throughout all steps from a sample processing to a PCR one was obvious.

Real-time quantitative PCR analysis was performed using the PE Applied Biosystems 7000 Sequence Detector with the 5' nuclease assay. Extracted DNA was analyzed on the SRY, DYS14 and GAPDH loci. The SRY and DYS14 sequences were used for quantification of cffDNA, and GAPDH sequence for determination of total cell-free (maternal and fetal), cfDNA. Reactions were performed in a 25µl volume using 12,5µl of the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) with uracil DNA N-glycosylase (AmpErase UNG) (1x final concentration) and 5µl of extracted DNA. Primers (Applied Biosystems) and MGB (TaqMan) probes (Applied Biosystems) labeled with FAMTM and VICTM were used at final concentrations of 300 and 200nM, respectively according to recent publications [34-35] with sequences as follows:

SRY forward: 5'-TCC TCA AAA GAA ACC GTG CAT-3', SRY reverse: 5'-AGA TTA ATG GTT GCT AAG GAC TGG AT-3', SRY probe: 5'-(FAM)TCC CCA CAA CCT CTT-3', GAPDH forward: 5'-CCCCACACACATGCACTTACC-3', GAPDH reverse: 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3', GAPDH probe: 5'-(VIC)AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC AAC TTG GC (TAMRA)-3'. DYS14 forward: 5'-GGG CCA ATG TTG TAT CCT TCT C-3', DYS14 reverse: 5'-GCC CAT CGG TCA CTT ACA CTT C-3', DYS14 probe: 5'-(VIC)TCT AGT GGA GAG GTG CTC-3'

PCR was performed for 45 cycles with 2min incubation at 50°C, followed with initial denaturation at 95°C for 10 min and RT-PCR cycles of 95°C for 15s and 60°C for 1min. All samples were run in triplicates; non-template controls were included in each experiment.

A human male control DNA 10ng/μl (Promega) was used to prepare calibration curves. The original stock DNA was divided into 5μl aliquots that were stored at -20°C until further processing. For each run, one 5μl aliquot of stock DNA was thawed, 10x in molecular biology grade water, and then serially 2x diluted to construct a four-point calibration curve in the range of 5 - 0.63ng (*i.e.* 758 – 95GE/ml). Amounts of DNA in ng were converted to genome-equivalents (GE) by use of a conversion factor of 6.6 pg of DNA per cell.

The database was hold in MS Access. For statistical analysis, the programs MS Excell, STATISTICA release 5.1 and S.A.S. (Statistical Analysis Software) release 8.02 were used.

Results

In the first part of this study, we analyzed 238 independent samples from pregnant women with single male fetuses. In all cases, the male sex of the childr has been confirmed at birth. Each plasma sample was divided in technical aliquots, and DNA extraction was performed using both methods. The amplifications on SRY and GAPDH loci provided the higher values in manually isolated samples (Figure 1A, 1B).

Statistical analysis revealed a significant raise in cffDNA levels with increasing gestation age using both DNA extraction methods. The differences in cffDNA concentrations between trimesters are statistically significant (Friedman ANOVA, $p < 10^{-4}$, Kendall Coefficient of Concordance = 0.7732 for whole set). The percentage of fetal cfDNA in total maternal cfDNA increases also significantly (Friedman ANOVA, $p < 10^{-5}$), but the trend to increment is not so strong (Kendall Coefficient of Concordance = 0.3894 for whole set). For the automated method, mean percentages in the 1st, 2nd, and 3rd trimester were 8.2, 10.7, and 23.2, respectively, medians of these percentages were 6.5, 9.0, and 19.7. The differences between the third trimester value and the values in the 1st and the 2nd trimesters are highly significant (Figure 1E and 1F).

The levels of total cfDNA (measured using real-time amplification of GADPH sequence) do not tend to be elevated with increasing gestational age. The differences

between trimesters are not statistically significant (Friedman ANOVA, $p < 0.75$, Kendall Coefficient of Concordance = 0.0068). There are no statistically significant differences between the individual trimesters independently on the method used for DNA extraction. Nevertheless, the concentrations for the manual method tend to be higher than for automated method (Figure 1C and 1D), the differences between the “automated” and “manual” methods for each trimester are not statistically significant.

The samples isolated using the automat were used for comparison of amplification efficiency on Y-chromosomal loci-SRY and DYS14. The results are summarized in Figure 2. The values obtained in SRY assay are, in general, little bit stronger than by using DYS14 (Figure 2A and 2B), but there are no statistical differences between the use of SRY and DYS14 assays (Figure 2C).

According to above described results, we decided to use further the automated DNA extraction providing sufficient laboratory comfort, and amplify the SRY locus because of leading to somewhat higher values of cffDNA concentrations.

In the second part of our study, 50 patients were sampled in each trimester of their pregnancy, DNA was extracted using automated method and Real-Time PCR reactions were performed to amplify SRY and GAPDH sequences. In all these single male fetus pregnancies, the highest values of cffDNA were obtained in the third trimester. For some 2nd trimester samples we have obtained values even lower than in the 1st semester (Figure 3). We involved and statistically treated all pairs of data available in both parts of our study, to make the statistical analysis of the increments in cffDNA concentrations during pregnancy more robust. Spearman correlation coefficients for comparisons between trimesters are given in Table 3.

Discussion

Recently, an increasing interest has been raised toward the detection of elevated concentrations of cffDNA as a marker for prediction of pathological states in late pregnancy. The physiology of release of cfDNA into circulation and mechanisms that influence its clearance are still poor understood. As in other quantitative traits, we can suppose the multifactorial inheritance. Under such circumstances, any clinical application is dependent on an excellent knowledge of statistical parameters in healthy controls. Our data may serve as reference values obtained from physiological pregnancies. Our results confirm the increase in cffDNA in maternal plasma with

gestational age in agreement with other studies [32, 33]. The differences in values of statistical parameters between our study and both above cited studies and studies cited in table 1 may be explained by methodological differences in the methods used for DNA isolations [36] and for real-time PCR (generation of calibration curves, number of multiplicates in reactions, type of equipment used) [33,34]. The possible sources of methodological differences are well documented in the first part of our study. It is possible to compare only values based on the same DNA extraction method and the same amplification protocols, therefore the absolute values reported by different research group are hardly comparable. Differences in values of concentrations of both cfDNA and cffDNA may be influenced also by ethnical origin and life conditions of patients. The only study focused on this phenomenon [37].

According to an existing study [33], we describe relatively constant levels of total cfDNA in maternal plasma without statistically significant changes during pregnancy. Such data may implicate the existence of general homeostatic mechanism which determines the level of total cfDNA in plasma. The trend to increment in percentage of fetal cfDNA in total maternal cfDNA toward the end of pregnancy was statistically significant in our study. We found relatively high values for successive trimesters: 8.3, 10.7 and 23.2%. Such a finding is in good agreement with the supposed placental origin of cffDNA.

In conclusion, we analyzed the methodological influences they can affect the correct determination of cffDNA concentrations and proposed the highly effective laboratory approach. We produced data obtained on large sample of normal pregnancies to provide the theoretical basis for evaluation of meaning of cffDNA quantification in maternal plasma as a marker for prediction of clinical complications of pregnancy.

Acknowledgements

The work was supported by the grant no. 203/03/1025 of the Grant Agency of the Czech Republic.

References

- 1 Bianchi DW: Current knowledge about fetal blood cells in the maternal circulation. *J Perinat Med* 1998;26:175-185.
- 2 Lo YM, Corberra N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350:485-487.

- 3 Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; **62**:768-75.
- 4 Bianchi DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta* 2004; Suppl A:S93-S101.
- 5 Illanes S, Avent N, Soothill PW. Cell-free fetal DNA in maternal plasma: an important advance to link fetal genetics to obstetric ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;25:317-322.
- 6 Smid M, Vassallo A, Lagona F, Valsecchi L, Maniscalco L, Danti L, Lojacono A, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in pathological conditions associated with placental abnormalities. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:132-137.
- 7 Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J, Okai T.: Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002;48:353-354.
- 8 Zhong XY, Holzgreve W, Gebhardt S, Hillermann R, Tofa KC, Gupta AK, Huppertz B, Hahn S: Minimal alteration in the ratio of circulatory fetal DNA to fetal corticotropin-releasing hormone mRNA level in preeclampsia. *Fetal Diagn Ther* 2006;21:246-249.
- 9 Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL: Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure: *Hum Reprod Update* 2005;11:59-67.
- 10 Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM: Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-224.
- 11 Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K: Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002;110:75-79.
- 12 Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T: Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000;356:1170.
- 13 Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B: Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000;46:301-302.
- 14 Chiu RW, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YM: Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. *Clin Chem* 2002;48:778-780.

- 15 Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM: Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet* 2002;360:998-1000.
- 16 Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Gallardo E, Ayuso C, Ramos C: Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002;22:946-948.
- 17 Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C: Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 2003;23:232-234.
- 18 Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Kulovany E, Vlk R: Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther* 2005;20:275-280.
- 19 Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW: Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999;45:1747-1751.
- 20 Smid M, Galbiati S, Vassallo A, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Pagliano M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L: Fetal DNA in maternal plasma in twin pregnancies. *Clin Chem* 2003;49:1526-1528, 2003.
- 21 Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S: Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 2000;10:795-798.
- 22 Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Calda P, Nekolarova K, Kofer J, Stejskal D, Doucha J, Cinek O, Vavriec J: Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth* 2002;2:4-8.
- 23 Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW: Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999;45:184-188.
- 24 Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, Hahn S: Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:414-419.
- 25 Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM: Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998;352:1904-1905.

- 26 Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T, Farina A: Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:480-484.
- 27 Caramelli E, Rizzo N, Concu M, Simonazzi G, Carinci P, Bondavalli C, Bovicelli L, Farina A: Cell-free fetal DNA concentration in plasma of patients with abnormal uterine artery Doppler waveform and intrauterine growth restriction--a pilot study. *Prenat Diagn* 2003;23:367-371.
- 28 Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S: High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report. *Prenat Dian* 2000;20:838-841.
- 29 Lazar L, Nagy B, Ban Z, Nagy GR, Papp Z: Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clin Chem* 2006;52:1599-601. Epub 2006 Jun 1.
- 30 Hahn S, Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W. Both maternal and fetal cell-free DNA in plasma fluctuate. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945:141-144.
- 31 Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S: Fluctuation of maternal and fetal free extracellular circulatory DNA in maternal plasma. *bstet Gynecol* 2000;96:991-996.
- 32 Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L: Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005;117:243-248.
- 33 Birch L, English CA, O'Donoghue K, BarigyeO, Fisk NM, Keer JT: Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005;51:312-320.
- 34 Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaidis K, Holzgreve W, Hahn S: Optimized Real-Time Quantitative PCR Measurement of Male Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clin Chem* 2005;51:1598-1604.
- 35 Johnson K, Dukes K, Vidaver J, LeShane E, Ramirez I, Weber W, Bischoff F, Hahn S, Sharma A, Dang D, Hire L, Bianchi D, Simpson S, Holzgreve W, Elias S, Klinger K: Interlaboratory Comparison of Fetal Male DNA Detection from Common Maternal Plasma Samples by Real-Time PCR. *Clin. Chem* 2004;50:516-521.
- 36 Huang D, Bernhard G, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S: Use of an Automated Method Improves the Yield and Quality of Cell-Free Fetal DNA Extracted from Maternal Plasma. *Clin Chem* 2005;51:2419-2420.

- 37 Zhong XY, Wang Y, Chen S, Pan X, Zhu N, Hahn C, Huppertz B, Holzgreve W, Hahn S, Labu, Pubuzhuoma, Gesangzhuogab, Ouzhuwangmu: Circulating fetal DNA in maternal plasma is increased in pregnancies at high altitude and is further enhanced by preeclampsia. *Clin Chem* 2004;50:2403-2405.
- 38 Tong YK, Lo YM: Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids
Clin Chim Acta 363: 187-196, 2006.
- 39 Lau TW, Leung TN, Chan LY, Lau TK, Chan KC, Tam WH, Lo YM: Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin Chem*. 48: 2141-2146, 2002.

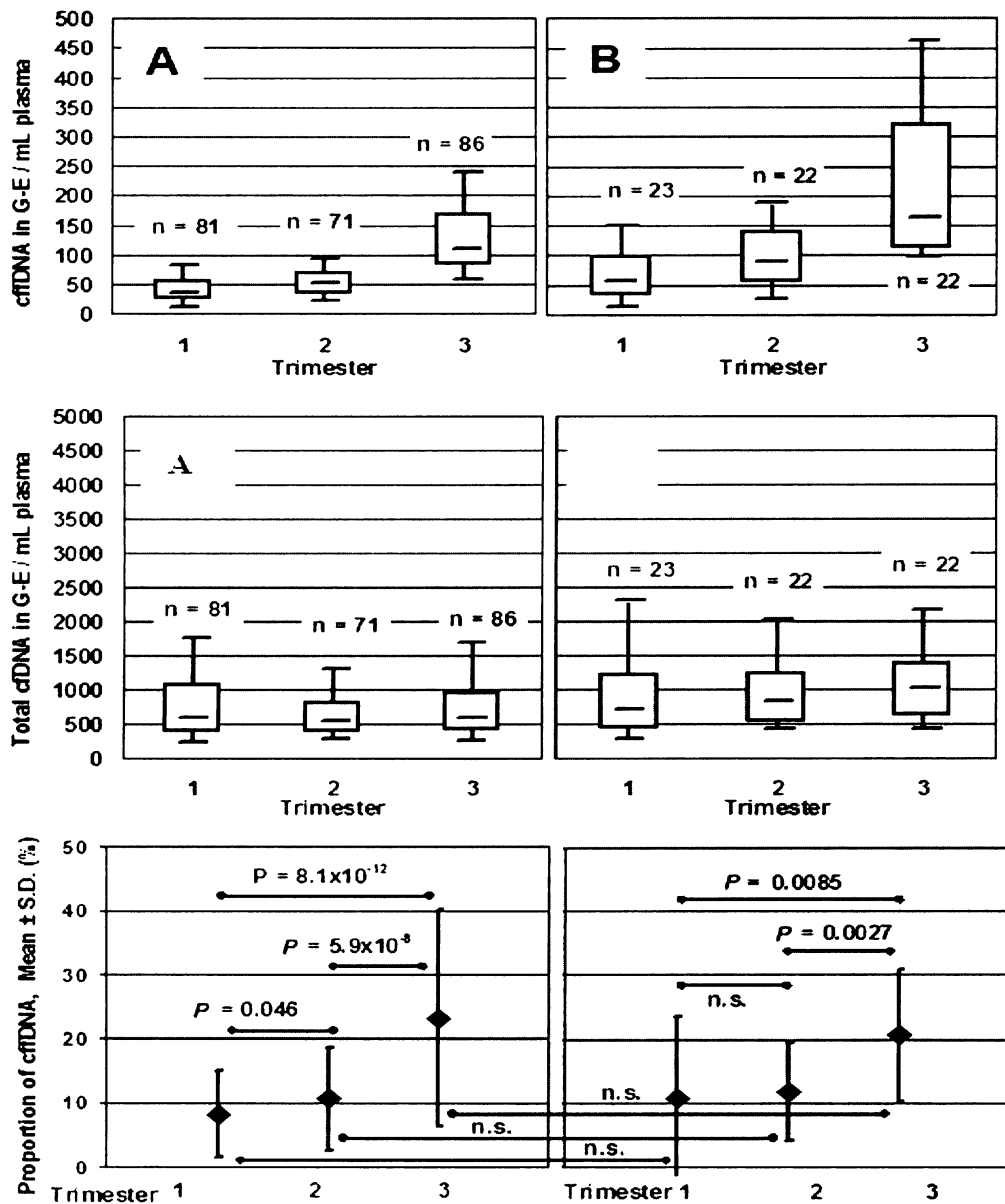


Figure 1. Concentrations of cfDNA (A and B) and total cfDNA in maternal plasma (C and D), and percentage of fetal DNA in total cfDNA in maternal plasma by trimester (E and F) - In the left column (A, C, E) the results of the automated DNA extraction are documented, the right column (B, D, F) shows the results of manual isolation.

A-D - Box and whiskers plots (in genome equivalents/ml of plasma) show the median represented by the midline, 25th and 75th percentiles by lower and upper limits of the box, respectively, and the 10th and 90th percentiles marked by the lower and upper whiskers.

E and F - Plotted means (in %) ± standard deviation; statistical probabilities demonstrated by horizontal bars.

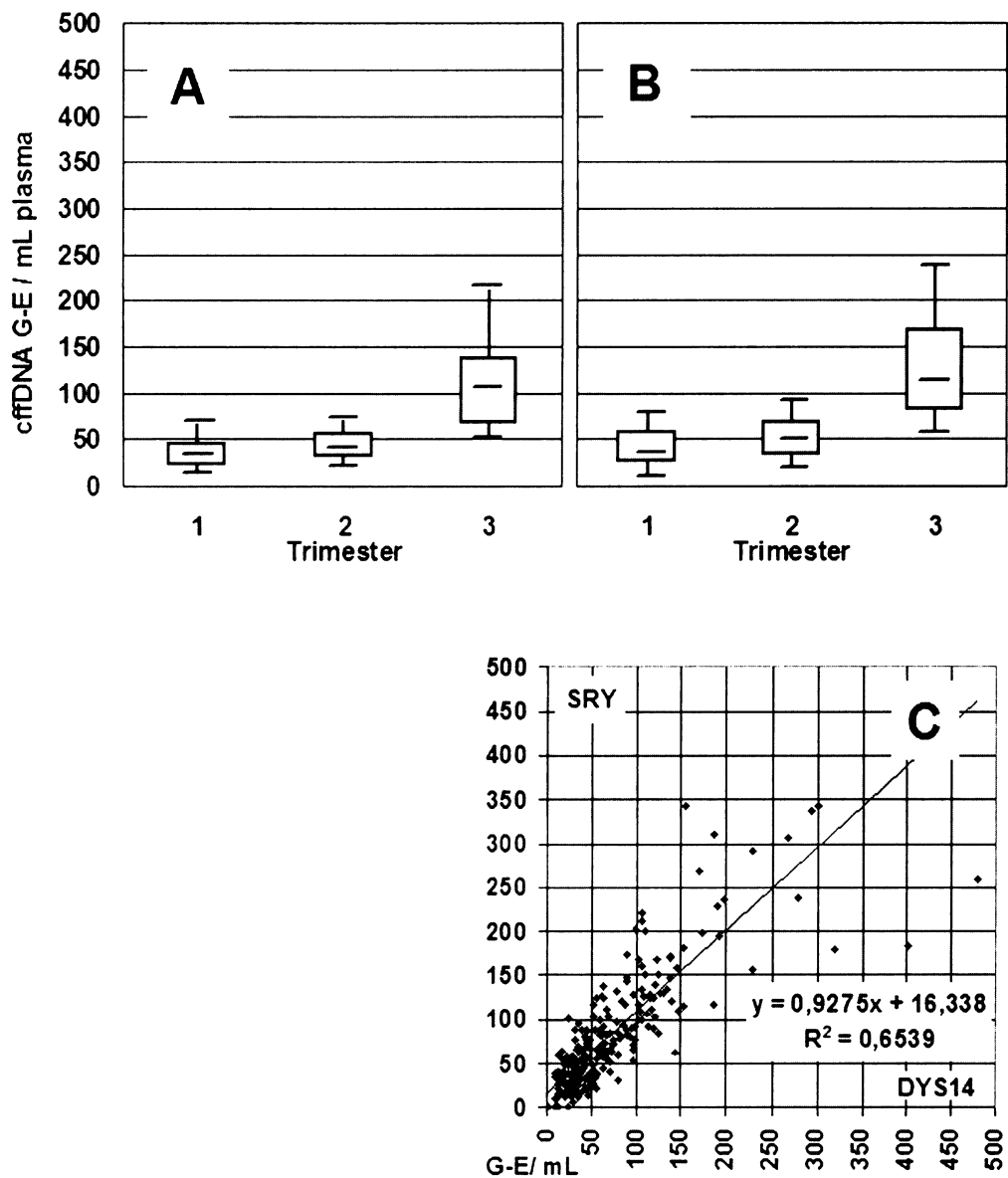


Figure 2: Quantification of cfDNA in maternal plasma using Real-Time PCR on DYS14 (A) and SRY (B) locus and correlation between the two approaches (C).

A and B- Box and whiskers plots show the median represented by the midline, 25th and 75th percentiles by lower and upper limits of the box, respectively, and the 10th and 90th percentiles marked by the lower and upper whiskers.

C – Dot plot comparing the pair of values for each individual sample; the equation of linear regression and coefficient of correlation R are imported in.

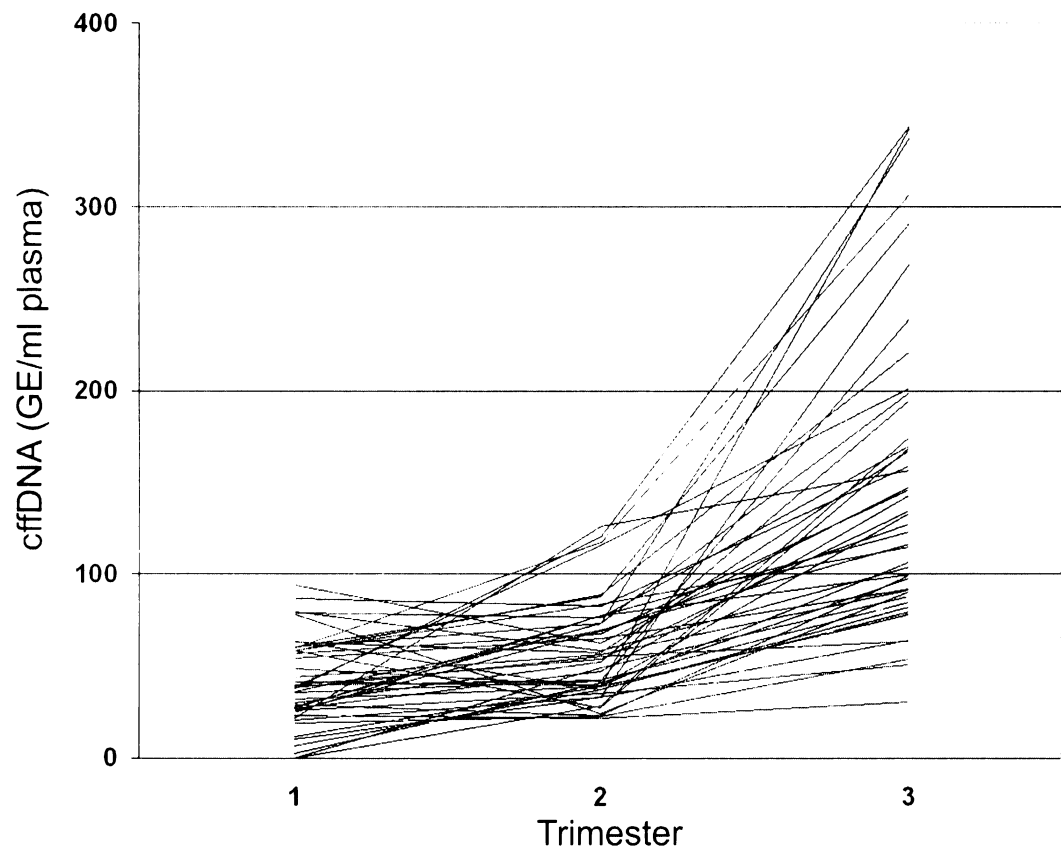


Figure 3. Concentration of cffDNA in 50 pregnant women where all three trimester samples were investigated (values plotted vs trimesters).

Pathology	Controls Median (number of samples)	Affected Median (number of samples)	Trimester	Reference
Trisomy 21				
	24,5 (13)	23,3 (11)	2	[22]
Boston samples	23,3 (19)	46,0 (7)	2	[23]
Hong Kong samples	16,3 (18)	48,2(6)	2	[23]
	83,1 (29)	185,6 (15)	2	[21]
Trisomy 18	83,1 (29)	95,9 (6)	2	[21]
Trisomy 13	83,1 (29)	213,2 (3)	2	[21]
Preeclampsia				
	22,0 (33)	41,9 (18)	2	[25]
	332,8 (46)	1599,1 (39)	3	[24]
	227 (10)	521 (7)	3	[39]
	191 (20)	486 (9)	3	[26]
Han Chinese at sea level	22,5 (19)	-	3	[37]
Han Chinese in Lhasa	90 (21)	810 (15)	3	[37]
Tibetans in Lhasa	76,5 (27)	859,5(11)	3	[37]
Fetal growth restriction	191 (20)	141 (9)	3	[26]
Polyhydramnion	404 (14)	749 (1)	3	[28]

Table 1. Concentration of plasmatic cffDNA in GE/ml in pregnancies with healthy (controls) and affected fetuses (according to Tong *et al* [38], modified and completed).

Analyte	Comparison between trimesters	Number of repeatedly examined patients	Spearman Correlation Coefficient	P value
	1 and 2	60	0.274	0.034
cffDNA	2 and 3	61	0.465	0.0002
	1 and 3	63	0.330	0.008

Table 2. Comparison between trimesters using the data from repeatedly examined women (all pairs of data available in both parts of our study involved and treated).