

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Fragmentační profil volné fetální DNA  
u gravidních žen.**

**Diplomová práce**

**Bc. Jana Blumenthalová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2009**

**Vedoucí práce: Mgr. Radek Vodička, Ph. D.**

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a s použitím zdrojů uvedených v seznamu literatury. V případě obhájení práce s kladným výsledkem souhlasím s tím, aby moje práce byla uložena v knihovně a sloužila ve shodě s mými autorskými právy zájemcům o moji diplomovou práci, protože jsem si vědoma, že tato práce byla vypracována jako součást mých povinností v rámci studijního programu, jehož dílčí výsledky jsou zároveň plněním badatelských cílů ústavu, fakulty a univerzity.

**V Olomouci dne:** .....

**Podpis:** .....

Bc. Jana Blumenthalová

# Souhrn

Objevení volné fetální DNA v krevní plazmě těhotných žen ukázalo novou cestu k neinvazivní prenatalní diagnostice. Fetální DNA se v mateřské plazmě vyskytuje ve formě fragmentů různé délky. Tato DNA má svůj původ pravděpodobně ve vyvíjející se placentě. Fragменты volné fetální DNA jsou celkově menší než molekuly mateřského původu a jejich velikost se pohybuje přibližně v rozmezí od 100 – 700 bp. Fragменты nad 1 kb patří převážně matce. Nukleové kyseliny získané z krevní plazmy lze separovat pomocí gelové elektroforézy. Fragменты požadované velikosti mohou být izolovány a poté amplifikovány pomocí PCR.

V naší práci jsme analyzovali fetální DNA mužského pohlaví izolovanou z krevní plazmy těhotných žen. Pro analýzu fetální DNA jsme zvolili kapilární elektroforézu a sekvence AMELX a AMELY. Pro srovnání výsledků jsme na několik vybraných vzorků použili také real-time PCR pro SRY sekvenci.

Kapilární elektroforéza detekovala fetální DNA ve 40,6 %. Real-time PCR analýza v 72 %, avšak s mnohem větším rozptylem naměřených hodnot. Vztah mezi množstvím fetální DNA v jednotlivých frakcích a týdnem těhotenství nebyl prokázán.

## Summary

The discovery of cell free fetal DNA in blood plasma of pregnant women resulted in a new way of noninvasive prenatal diagnosis. Fetal DNA in maternal plasma is found in the form of fragments of different lengths. This DNA probably originates from the growing placenta. The fragments of cell free fetal DNA are smaller in size than the molecules coming from maternal tissues and their size varies approximately from 100 to 700 bp. Fragments which are larger than 1 kb are predominantly found in the bodies of mothers. Nucleic acids which were extracted from blood plasma can be separated by gel electrophoresis. Those fragments of demanded size can be isolated and then amplified by PCR method.

In this research, we analyzed male-specific fetal DNA which was isolated from blood plasma of pregnant women. In order to analyze fetal DNA, capillary electrophoresis and AMELX and AMELY sequences were used. Moreover, real-time PCR was used for SRY sequence detection in several samples. The results obtained from these two methods were compared.

40.6 % of fetal DNA was detected by capillary electrophoresis. On the other hand, real-time PCR analysis detected 72% of fetal DNA. However, the results of this analysis ranged greatly compared to the results of capillary electrophoresis. The relation between the percentage of fetal DNA and a week of pregnancy was not found.

## **Poděkování:**

Děkuji především svému vedoucímu Mgr. Radku Vodičkovi, Ph.D. a doc. RNDr. Radku Vrtělovi, Ph.D. za odborné rady, ochotu a vstřícný přístup. Také bych chtěla poděkovat laborantkám Mgr. Evě Krejčířkové a Evě Schneiderové, DiS. za poskytnutou pomoc při řešení experimentální části diplomové práce. Děkuji rovněž prof. MUDr. Jiřímu Šantavému, CSc., který mi umožnil vypracovat diplomovou práci na Ústavu lékařské genetiky a fetální medicíny Fakultní nemocnice v Olomouci. Experimentální část diplomové práce mohla být uskutečněna díky grantu IGA MZ ČR NS/9624-3.

# Obsah

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Úvod.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>2</b> | <b>Současný stav řešené problematiky .....</b>                    | <b>9</b>  |
| 2.1      | Nukleové kyseliny v krevní plazmě .....                           | 9         |
| 2.2      | Fetální DNA.....  | 9         |
| 2.1.1    | Mechanismus vzniku nukleových kyselin cirkulujících v plazmě..... | 10        |
| 2.1.2    | Tkáňový původ fetální DNA .....                                   | 13        |
| 2.1.3    | Klinická aplikace .....   | 16        |
| 2.1.4    | Velikost fragmentů .....  | 19        |
| 2.1.5    | Kvantifikace; Diagnostické přístupy .....                         | 21        |
| <b>3</b> | <b>Cíle práce.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>4</b> | <b>Materiál a metodika .....</b>                                  | <b>28</b> |
| 4.1      | Laboratorní vybavení.....   | 28        |
| 4.2      | Soubor vyšetřovaných pacientů.....                                | 29        |
| 4.3      | Metody .....  | 30        |
| 4.3.1    | Izolace DNA z plazmy.....   | 30        |
| 4.3.2    | Měření koncentrace DNA na spektrofotometru .....                  | 31        |
| 4.3.3    | Gelová agarózová elektroforéza .....                              | 31        |
| 4.3.4    | Izolace DNA fragmentů pod UV transluminátorem.....                | 32        |
| 4.3.5    | Izolace DNA z gelu .....  | 33        |
| 4.3.6    | Měření koncentrace DNA ve frakcích na spektrofotometru.....       | 34        |
| 4.3.7    | Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....                          | 34        |
| 4.3.8    | Kvantifikace fragmentů kapilární elektroforézou.....              | 36        |
| 4.3.9    | Kvantifikace vybraných vzorků pomocí real-time PCR.....           | 38        |
| <b>5</b> | <b>Výsledky .....</b>   | <b>39</b> |
| 5.1      | Optimalizace izolace fetální DNA z gelu.....                      | 39        |
| 5.2      | Měření koncentrace celkové DNA spektrofotometrem.....             | 39        |
| 5.3      | Měření koncentrace DNA v jednotlivých frakcích .....              | 40        |
| 5.4      | Gelová elektroforéza.....   | 41        |
| 5.5      | Kvantifikace fragmentů kapilární elektroforézou.....              | 42        |
| 5.6      | Kvantifikace vybraných vzorků pomocí real-time PCR.....           | 50        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>6</b> | <b>Diskuze .....</b>                                  | <b>55</b> |
| 6.1      | Izolace frakcí fetální DNA z gelu.....                | 55        |
| 6.2      | Analýza fetální DNA kapilární elektroforézou .....    | 55        |
| 6.3      | Analýza fetální DNA real-time PCR.....                | 56        |
| 6.4      | Srovnání real-time PCR a kapilární elektroforézy..... | 57        |
| <b>7</b> | <b>Závěr .....</b>                                    | <b>58</b> |
| <b>8</b> | <b>Citovaná literatura .....</b>                      | <b>59</b> |
| <b>9</b> | <b>Seznam použitých zkratk.....</b>                   | <b>68</b> |

# 1 Úvod

Prenatální diagnostika je již tradičně založena na invazivních metodách, jakými jsou amniocentéza (AMC) nebo odběr choriových klků (CVS), při kterých se odebírají buňky plodu pro cytologické, cytogenetické, molekulárně-genetické či biochemické vyšetření. Invazivní metody vždy určitým způsobem zasahují do oblasti dělohy, proto zde hrozí sice malé, avšak významné riziko poškození plodu. V případě 0,5-1 % jedinců, může dojít dokonce potratu. Z tohoto důvodu stojí neinvazivní metody popředí zájmu jak vědců, tak i klinické praxe.

Metody jako ultrasonografie nebo měření markerů v mateřském séru jsou v běžné praxi využívány k primárnímu celoplošnému skríningu vrozených vývojových malformací. Vyšetření zahrnující analýzu fetálních (placentálních) chromozómů se z velké části stále provádí formou invazivní. Několik posledních desetiletí však bylo věnováno výzkumu přítomnosti buněk a nebuněčné DNA fetálního původu v krevním oběhu matky.

Mnoho typů buněk proniká přes placentu a dále cirkulují v mateřském krevním oběhu. Jsou to trofoblasty, jaderné erytrocyty a leukocyty (Schröder *et al*, 1975). Tyto buňky plodu se v krvi matek vyskytují v nízké koncentraci, avšak představují významný zdroj fetálních genů pro prenatální diagnostiku. Obohacování a izolaci těchto buněk pro následnou analýzu byla věnována vysoká pozornost, ale ukázalo se, že většina technik je časově i technicky náročná nebo jinak složitá na realizaci. Tato omezení podnítila hledání alternativních zdrojů genetického materiálu plodu, kterým se nakonec ukázala být krevní plazma a sérum těhotných žen, obsahující nebuněčnou DNA plodu.

Nukleové kyseliny volně cirkulující v lidské krvi byly objeveny již v polovině minulého století. Zasloužili se o to francouzští vědci Mandel a Métais v roce 1948. DNA i RNA našli v plazmě a séru pacientů a také u těhotných žen (Mandel a Métais, 1948). Úspěšná detekce Y chromozomálních sekvencí fetálního původu v mateřské plazmě a séru (Lo *et al*, 1997) nabídla pak nové možnosti neinvazivní prenatální diagnostice.

Snahou vědců v dnešní době je tedy zaměřit se důkladněji na poznání fetální DNA cirkulující v mateřském oběhu a zkvalitnit tak péči o plod i těhotnou ženu. K tomuto účelu slouží i tato práce. Praktická část je zaměřena na analýzu fragmentace volné plazmatické DNA a její kvantifikaci pomocí kapilární elektroforézy a na optimalizaci postupu separace podle velikosti molekul. V části teoretické shrnuje poznatky o volné fetální DNA.



# 1 Současný stav řešené problematiky

## 1.1 Nukleové kyseliny v krevní plazmě

Jak již bylo řečeno dříve, nukleové kyseliny volně cirkulující v lidské krvi byly objeveny už v polovině minulého století Mandelem a Métaisem konkrétně v roce 1948. Tato práce však byla zapomenuta až do roku 1966, kdy se cirkulující DNA dostala do popředí zájmu díky studiu autoimunitního onemocnění systémového lupus erythematosus (SLE) (Tan *et al*, 1966). Na potenciální diagnostický přínos zjištění celkové koncentrace volně cirkulujících nukleových kyselin bylo poprvé poukázáno až koncem sedmdesátých let minulého století. S tímto nálezem přišel Leon *et al* a poukázal na fakt, že v plazmě pacientů s již metastázujícími nádory je množství cirkulující DNA vyšší než u těch s ohraničeným nálezem, a také na to, že množství volné DNA v plazmě klesá po aplikaci radioterapie (Leon *et al*, 1977a). Pozdější výzkumy ukázaly, že zvýšenou hladinu DNA můžeme najít nejen v plazmě nemocných SLE nebo u pacientů s rakovinou, revmatoidní artritidou (Leon *et al*, 1977b), u některých virových onemocnění, jakým je například virová hepatitida B (Hansen *et al*, 1994; Wen *et al*, 1994), u akutního infarktu myokardu (Antonatos *et al*, 2006; Rainer a Lam, 2006) a u dalších onemocnění.

## 2.2 Fetální DNA

V roce 1997 Lo *et al* popsal výskyt fetální DNA v plazmě a séru nastávajících matek na základě detekce Y chromozomální sekvence už po osmi týdnech těhotenství (Lo *et al*, 1997). O rok později ten samý autor podává svědectví o tom, že se množství této DNA zvyšuje s postupujícím těhotenstvím (Lo *et al*, 1998). Honda se svými kolegy studoval měnící se koncentrace fetální DNA v krevním oběhu matek během jednotlivých fází gravidity a zjistil, že první dva trimestry se od sebe koncentrací DNA příliš nelišily, zato ve třetím trimestru zaznamenal znatelný nárůst (Honda *et al*, 2002). Během fyziologických těhotenství se tedy koncentrace DNA cirkulující v mateřské plazmě mění. Za nárůst je zodpovědná DNA vyvíjející se placenty a plodu, která proniká do krevního

oběhu matky. Koncentrace plazmatické DNA matky zůstává konstantní (Birch *et al*, 2005).

Některé práce uvádějí, že změřená fetální DNA může cirkulovat v krvi matky až několik let po porodu. Bianchi *et al* přišla se zjištěním, že mužská DNA je v oběhu detekovatelná i 27 let po porodu potomka mužského pohlaví. Naproti tomu mnoho dalších studií toto tvrzení popírá a naopak dokazují, že DNA plodu je po porodu velmi rychle z mateřského krevního oběhu odbourávána (Lo *et al*, 1999; Honda *et al*, 2002; Lau *et al*, 2002; a další).

Jisté je, že objevení nukleových kyselin plodu v krevní plazmě budoucích rodiček je nález zasluhující si pozornost široké vědecké veřejnosti. Přestože na toto téma již bylo vypracováno poměrně velké množství studií, zůstává ještě mnohé, co je třeba osvětlit. Samotný původ nukleových kyselin plodu v krevní plazmě a séru těhotných žen ani mechanismus jejich vzniku není dodnes zcela objasněn.

### **1.1.1 Mechanismus vzniku nukleových kyselin cirkulujících v plazmě**

Za hlavní mechanismy vzniku plazmatické DNA jsou považovány apoptóza, nekróza a aktivní uvolňování DNA buňkami.

#### **1.1.1.1 Aktivní uvolňování DNA buňkami**

Pro aktivní uvolňování DNA do plazmy svědčí práce Maurice Strouna a jeho kolegů (Stroun *et al*, 2001), kteří ve své studii porovnávali charakter DNA uvolňované do kultivačního média buňkami tkáňových kultur, v nichž byla apoptóza buď stimulována, nebo naopak inhibována. V obou případech se v kondiciovaném médiu objevila DNA typicky fragmentovaná, a to i u kultur, jimž bylo v apoptóze zabráněno.

#### **1.1.1.2 Nekróza**

Přítomnost DNA pocházející z nekrotických buněk prokázala jiná studie (Jahr *et al*, 2001), kdy byly plazmatické nukleové kyseliny pacientů s rakovinou podrobeny gelové elektroforéze spolu s DNA získanou z ovlivněných buněčných kultur. Podle typické fragmentace byla potvrzena přítomnost DNA fragmentů vzniklých

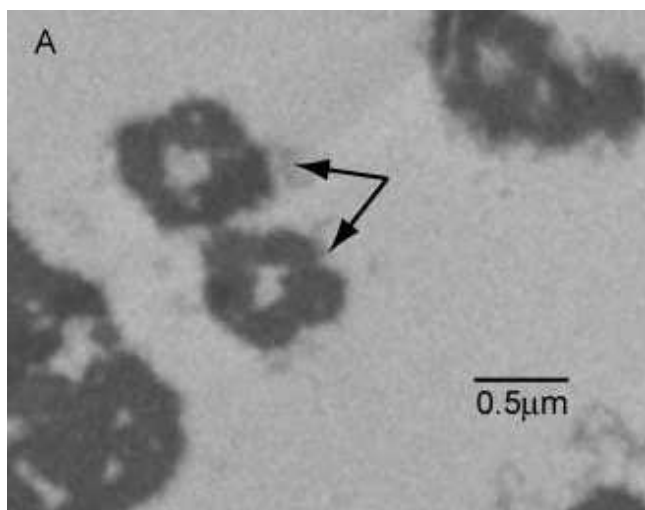
apoptózou, ale byly pozorovány také fragmenty větší než 10 000 bp což je typické pro nekrózu. Proti teorii volné DNA převážně nekrotického původu u pacientů trpících rakovinou však svědčí práce od Leona *et al*, kdy po aplikaci radioterapie na pacienty klesla plazmatická DNA až o 90 % (Leon *et al*, 1977a).

### 1.1.1.3 Apoptóza

Jako nejpravděpodobnější způsob zrodu volné fetální DNA cirkulující v mateřské plazmě se jeví právě apoptóza. Jedná se totiž o nejběžnější typ buněčné smrti (Rudin *et al*, 1997). Jestliže se denně dělí  $10^{11}$ – $10^{12}$  buněk, mělo by být zhruba stejné množství odbouráno kvůli udržení homeostázy. To tedy znamená, že 1-10 g DNA může být u dospělého člověka denně degradováno (Lichtenstein *et al*, 2001). A při takovém množství není překvapující, že některé nukleové kyseliny degradaci uniknou a objeví se v plazmě. Degradace DNA, tedy štípání, není proces náhodný, ale podléhá regulační kontrole. Během těhotenství mohou být kontrolní mechanismy přehlcneny, nebo regulace probíhá jiným způsobem.

Fetální DNA v krevní plazmě (séru) není okamžitě metabolizována, je proto možné předpokládat, že je chráněna uvnitř tzv. apoptických tělísek, nebo je součástí nukleozomů. Halicka *et al* prokázala, že během programované buněčné smrti existuje oddělené sbalení DNA a RNA do různých apoptických tělísek. DNA a RNA nejsou přitom nikdy sbaleny společně (Halicka *et al*, 2000). Bischoff se svými kolegy použili Akridinové oranže k obarvení nukleových kyselin a následnou separaci na průtokovém cytometru za účelem zachycení Akridin oranž-pozitivní nebuněčné frakce. Tato frakce byla dále analyzována pomocí real-time PCR pro kvantifikaci Y-specifické sekvence (DYS1) fetálního původu. Kvantifikaci předcházela mikroskopická analýza odhalující apoptická tělíška obsahující DNA (Obrázek 1). Real-time PCR analýza odhalila podstatné obohacení fetálních sekvencí. Z 2,8 % sekvencí získaných z cytometricky netříděných vzorků stoupla na desetinásobek této hodnoty, čímž badatelé demonstrovali, že tato tělíška obsahují fetální DNA – resp. Y-chromozómové sekvence (Bischoff *et al*, 2004).

**Obrázek 1:** Fotografie apoptických tělísek v peletu mateřské plazmy, provedená pomocí transmisního elektronového mikroskopu.



Převzato z článku: Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005 Jan-Feb; 11(1): 59-67.

Jak již bylo uvedeno výše, vznik volné fetální DNA musíme hledat převážně v apoptóze. Volná DNA v plazmě je štípána nukleázami na fragmenty o specifické velikosti ( $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  dependentní endonukleázy), nebo je degradována. Lo *et al* studoval fluktuace fetální DNA v krevní plazmě nastávajících matek a její kvantifikaci po porodu. Většina ze sledovaných žen (sedm z osmi) měla již 2 hodiny po porodu nedetekovatelnou koncentraci fetální DNA ve své plazmě. Poločas rozpadu nukleových kyselin plodu byl odhadnut na 16,3 minuty (rozmezí u studovaných jedinců bylo 4 – 30 minut). Za předpokladu, že zde nehrají roli některé neočekávané faktory související s porodem, autoři spekulují, že fetální DNA musí být stále uvolňována do mateřského krevního oběhu a to ve velkém množství. Jejich kalkulace na základě studia degradace fetálních sekvencí uvádí, že uvolňování musí probíhat rychlostí průměrně  $2,24 \times 10^4$  kopií/min (Lo *et al*, 1999).

## 1.1.2 Tkáňový původ fetální DNA

Jako nejpravděpodobnější zdroje fetální DNA cirkulující v krvi těhotných žen se jeví nejvíce placenta, pak hematopoetické buňky a v neposlední řadě také plodová voda.

### 1.1.2.1 Placenta - zdroj volné fetální DNA

Hlavním zdrojem genetického materiálu plodu, uvolňovaného do krevního oběhu matky, se ukazuje být placenta (Wataganara *et al*, 2004). Již zmiňovaná práce svědčící pro tuto teorii byla napsána v roce 1999 doktorem Lo a jeho kolegy, kteří pozorovali rychlé odstraňování fetální DNA těsně po porodu. U většiny žen, které se této studii účastnily, bylo množství DNA plodu v jejich krvi nedetekovatelné už dvě hodiny po porodu (Lo *et al*, 1999).

Nalezení mRNA transkriptů specifických pro placentální hormony, konkrétně lidský placentální laktogen (hPL) a  $\beta$ -podjednotku lidského choriového gonadotropinu ( $\beta$ -hCG) v mateřské plazmě, také svědčí o placentálním původu fetální DNA (Ng *et al*, 2003).

Sekizawa *et al* srovnával relativní koncentrace fetální DNA v krevní plazmě matek v průběhu těhotenství a mateřské DNA v umbilikální (pupečnickové) plazmě. Medián naměřených hodnot koncentrace fetální DNA v mateřské plazmě byl 14,3 % (rozmezí hodnot od 2,3–60 %), a medián koncentrace mateřské DNA v umbilikální plazmě (z pupečnickové krve) byl 0,9 % (rozpětí: 0,2–8,4 %). Z naměřených hodnot vyplývá, že množství DNA plodu cirkulující v mateřské plazmě je podstatně vyšší než množství DNA mateřského původu, které se nachází v pupečnickové krvi (Sekizawa *et al*, 2003). Tato data ukazují, že výměna genetického materiálu mezi matkou a plodem je nerovnoměrná, větší podíl představuje fetální DNA pravděpodobně právě díky placentě.

Volná fetální DNA byla v mateřské plazmě prokázána ještě dříve, než je feto-maternální cirkulace vůbec vytvořena (Bianchi 2004). Tento nález podporuje hypotézu, že tato DNA je trofoblastického původu. Původ fetální DNA v placentě dokazuje také studie vedená Alberrym, která analyzuje vzorky získané od pacientek

s aembryotickým těhotenstvím – embryo zemře v raných fázích těhotenství, ale stále dochází k rozvoji trofoblastu. Gen DYS14 na Y chromozómu byl analyzován v krevní plazmě žen postižených touto chorobou a také u žen zdravých. Žádný významný rozdíl mezi naměřenými koncentracemi nebyl zaznamenán (Alberry *et al*, 2007). Tyto poznatky zásadně přispívají k potvrzování teorie, že volná fetální DNA v krevním oběhu těhotných žen je převážně trofoblastického (placentálního) původu.

### **1.1.2.2 Hematopoetické buňky – zdroj volné fetální DNA**

Jiným zdrojem nukleových kyselin plodu mohou být hematopoetické buňky. Fetální buňky a fetální DNA se vyskytují společně v krevním oběhu těhotných žen. Jak již bylo řečeno dříve, buňky plodu jsou v krvi matky zastoupeny velmi řídko, Bianchi spolu se svým týmem detekovala v krvi zdravých žen přibližně 1 fetální buňku na 1 mililitr mateřské krve. Fetální příspěvek se zvýšil pouze v případě aneuploidních těhotenství (Bianchi, 2004). Celkový podíl fetální DNA je téměř 1000 krát vyšší v plazmě než v buněčné složce periferní krve matky (Ariga *et al*, 2001; Lo *et al*, 1998).

Jaderné erytrocyty plodu mohou být identifikovány již v pátém týdnu těhotenství (metoda MACS-magnetic activated cell sorting) (Ganshirt *et al*, 1994), ačkoliv se jejich koncentrace v průběhu těhotenství mění (Bianchi *et al*, 1997). Někteří autoři uvádí, že koncentrace jaderných erytrocytů může s postupujícím těhotenstvím růst (Ganshirt *et al*, 1994; Xiaoyan *et al*, 2004), výsledky jiných prací naproti tomu ukazují, že koncentrace těchto buněk naopak v průběhu druhého trimestru klesá a v některých případech jsou erytroblasty dokonce nedetekovatelné (Ariga *et al*, 2001; Lim *et al*, 2001).

Sekizawa *et al* použil TUNEL test (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) pro zjištění množství buněk v krevním oběhu, které jsou v apoptóze. Tato metoda je založena na značení DNA fragmentů pomocí terminální deoxynukleotidyl-transferázy, která se specificky váže k jejich 3'-OH konci, a následné syntéze polydeoxynukleotidu. Zjistil, že téměř 43 % z těchto hematopoetických buněk v mateřském krevním oběhu podstupuje apoptózu (Sekizawa *et al*, 2000). Hristoskova se svým týmem pozorovala obdobné výsledky při analýze pupečnickové krve, v jejich práci bylo téměř 60 % erytroblastů TUNEL pozitivních (Hristoskova *et al*, 2001). Apoptické fetální buňky

v detekovatelné koncentraci byly objeveny v plazmě těhotných žen také týmem Van Wijka (2000).

Tyto práce naznačují, že mnoho fetálních buněk překonávajících feto-maternální rozhraní podstupuje programovanou buněčnou smrt a mohou být tedy původcem genetického materiálu v krevním oběhu matky. Tuto teorii také podporují zvýšené hodnoty fetálních buněk i volné DNA při nejrůznějších komplikacích, jmenovitě se jedná například o preeklampsii (volná DNA se zvyšuje až pětikrát – Lo *et al*, 1999a) či fetální trizomii 21 (Bianchi *et al*, 1997, Lo *et al*, 1999b). V krevní plazmě těhotných žen byla nalezena také mRNA pro fetální  $\gamma$ -globin, detekovaná Wataganarou *et al* u všech vyšetřovaných gravidních žen, který je typickým markerem erythroidních buněk plodu (Wataganara *et al*, 2004).

### **1.1.2.3 Plodová voda – zdroj volné fetální DNA**

Velké množství fetální DNA bylo nalezeno také v plodové vodě (Bianchi *et al*, 2001), která může být dalším zdrojem genetického materiálu plodu. Tato hypotéza předpokládá prostou difúzi kratších molekul DNA z plodové vody přes placentu nebo membrány do krevního oběhu matky. Hodnoty DNA plodu nalezené v plodové vodě byly přibližně 100 až 200 krát vyšší než hodnoty zjištěné v krevní plazmě matek (Bianchi *et al*, 2001). Byla zjištěna pozoruhodná rozdílnost mezi velikostmi jednotlivých DNA fragmentů a výzkum také ukázal, že jednotlivé části DNA izolované z amnionové tekutiny zastupují celý genom plodu. Důvodem této různorodosti je pravděpodobně fakt, že tato DNA pochází z různých fetálních tkání, neboť s plodovou vodou se dostávají do kontaktu plíce, ledviny, kůže a gastrointestinální systém plodu (Lapaire *et al*, 2007).

### 1.1.3 Klinická aplikace

Vyšetření volné DNA plodu získané z periferní krve matky zažívá masivní rozvoj. Analýza chromozomálních poruch ovšem stále zůstává tvrdým oříškem, hlavně z důvodu vysokého pozadí ve formě mateřské DNA. Fetální DNA tvoří necelých 10 % z celkově zjištěného množství volné DNA v plazmě (Lo *et al*, 1998). Proto se vědci zaměřili na hledání variability mezi alelami mateřskými a těmi náležejícími plodu.

Nejlépe zvládnutou technikou je vyšetření Y-specifických sekvencí plodu, kterých se ženě nedostává, proto jsou snadno detekovatelné a amplifikovatelné z krevní plazmy i séra budoucích matek. Klinická aplikace tohoto přístupu spočívá ve zjištění plodů mužského pohlaví v případech, kdy hrozí riziko genetické choroby vázané na X-chromozóm. Honda *et al* ve své práci navrhoval, že zjištění pohlaví plodu pomocí DNA analýzy z krevní plazmy těhotných žen by mohlo předcházet rozhodnutí, zda je nutné přistupovat k testování invazivnímu. Použitím konvenční PCR prokázal 100% citlivost při určení plodů mužského pohlaví v sedmém týdnu těhotenství. Stejně citlivosti dosáhl také u plodů nacházejících se v pátém týdnu prenatalního vývoje, ale s použitím real-time PCR (Honda *et al*, 2002).

Podobnost mezi dramaticky rostoucí koncentrací volné fetální DNA v krevním oběhu žen s postupujícím těhotenstvím a zvýšenou koncentrací volné DNA u pacientů trpících některou z rakovinných forem, nabízí otázku, zda abnormálně zvýšená koncentrace volné fetální DNA může být indikátorem rozvoje patologických těhotenství. V průběhu těhotenství se může objevit velké množství nejrůznějších komplikací, a jak uvádí současný výzkum, u mnohých byla prokázána zvýšená hladina fetální DNA.

Velký důraz se klade na zjištění rozdílů mezi koncentracemi volné fetální DNA u fyziologických těhotenství a graviditami s aneuploidními plody. Jak již bylo uvedeno výše, aneuploidie plodu jsou jednou z hlavních příčin rozvoje neinvazivní prenatalní diagnostiky. Doposud byly zjišťovány amniocentézou, při které hrozí riziko poškození plodu, nebo pomocí vyšetření klků choria.



### 1.1.3.1 Aneuploidie

Úkol porovnat hodnoty koncentrací fetální DNA u fyziologických a aneuploidních těhotenství na sebe vzal doktor Lo se svými kolegy. Měřili koncentrace volné fetální DNA z krve těhotných žen nacházejících se ve druhém trimestru. V této práci se spojují výsledky ze dvou pracovišť – z Hong Kongu a Bostonu. Bostonské výsledky naměřených koncentrací plodů postižených trizomií 21. chromozómu byly průměrně 46,0 GE/ml (GE - ekvivalent genomu) a koncentrace DNA u euploidních plodů mužského pohlaví (kontrola) 23,3 GE/ml. Výsledky z druhého pracoviště byly zhruba srovnatelné a uvádí průměrnou koncentraci u plodů s trizomií 48,2 GE/ml a u kontrol 16,3 GE/ml. Tato studie tedy prokázala dvojnásobný nárůst genetického materiálu v krevní plazmě těhotných žen s aneuploidními plody oproti fyziologickým těhotenstvím (Lo *et al.*, 1999b).

Ke stejnému závěru došla také vědecká skupina ze Švýcarska, která se taktéž zabývala porovnáváním koncentrací volné fetální DNA u normálních a aneuploidních těhotenství. Skupina pracovala s plody s trizomiemi 21., 18. a 13. chromozómu. Průměrná koncentrace DNA plodů s trizomií 21 byla 185,8 GE/ml což byl také přibližně dvojnásobek naměřené hodnoty u fyziologických těhotenství (81,9 GE/ml). U ostatních abnormálních těhotenství nebylo zvýšení prokazatelné (Zhong *et al.*, 2000). Nárůst volné fetální DNA u plodů s trizomií 21. chromozómu potvrdil také Bauer se svým týmem. Medián naměřené koncentrace fetální DNA byl 8 GE/ml, u těhotenství s trizomií 21 naměřili 141 a 879 GE/ml. V této práci byl tedy zaznamenán až dvoutřetinový nárůst cirkulující DNA plodů s trizomií (Bauer *et al.*, 2006).

Jiné práce zabývající se tímto tématem však nepotvrdily výrazné zvýšení fetální DNA při trizomii 21. chromozómu. Například Ohashi *et al.* pracoval s plody v 15.–17. týdnu prenatalního vývoje a v porovnání s fyziologickým těhotenstvím byla průměrná koncentrace fetální DNA v krevní plazmě matek plodů s trizomií 21 dokonce ještě mírně nižší (Ohashi *et al.*, 2001). Obdobné výsledky také přednesla studie vedená vědci z Nizozemí. Významný nárůst koncentrace volné fetální DNA u těhotenství s trizomií 21. chromozómu nebyl prokázán, avšak celková koncentrace cirkulující DNA v maternálním oběhu byla vyšší než u fyziologických těhotenství (Spencer *et al.*, 2003).

### 1.1.3.2 Další příčiny zvýšené koncentrace fetální DNA

Abnormálně vysoké koncentrace volné fetální DNA v krevní plazmě matek byla pozorována také u některých dalších komplikací, jakými jsou preeklampsie (Swinkels *et al*, 2002; Smid 2001), předčasný porod (Leung *et al*, 1998), feto-maternální krvácení, polyhydramnion či invazivní placentace (Tong a Lo, 2006).

Zvýšená hladina nukleových kyselin plodu v krevním oběhu matek může být tedy dobrým indikátorem pro monitorování fyziologických i patologických podmínek vývoje plodu a zdravotního stavu matky. Mechanismus, jakým se zvyšuje koncentrace volné fetální DNA v mateřské plazmě, není ještě zcela objasněn. Některé práce hovoří, že například za zvýšením koncentrace plazmatické DNA před předčasným spontánním porodem může být narušení placentální bariéry (Leung *et al*, 1998). Ingargiola naproti tomu uvádí, že během normálního porodu v řádném termínu ke zvýšení fetálního DNA v plazmě matky nedochází a také porodní kontrakce na něj nemají vliv (Ingargiola *et al*, 2003).

### 1.1.3.3 Možné aplikace analýzy NK plodu

Analýza fetální DNA cirkulující v oběhu matky může být užitečným nástrojem klinické praxe v mnoha ohledech. Touto metodou lze určit pohlaví plodu (Y-specifické sekvence), jeho Rh faktor, a s využitím kvantifikace také již zmíněné aneuploidie. Některé práce představují využití cirkulující DNA plodu ke zjištění dalších genetických abnormalit, jakými jsou dědičné poruchy autozomálně dominantní – myotonická distrofie (Amicucci *et al*, 2000), Huntingtonova choroba (Gonzalez-Gonzalez *et al*, 2003); nebo genové mutace jako například achondroplasia (Saito *et al*, 2000). Také je možno zjistit některé choroby autozomálně recesivní, například cystickou fibrózu (Gonzalez-Gonzalez *et al*, 2002), nebo  $\beta$ -talasemii (Chiu *et al*, 2002). Ačkoliv zde existuje spousta mutací, vyšetření se zakládá převážně na kontrole paternálně získaných genových sekvencí. Nejčastějším cílem neinvazivní prenatalní diagnostiky jsou však stále aneuploidie a z nich především Downův syndrom (trisomie 21. chromozómu).

### 1.1.4 Velikost fragmentů

Je třeba položit ještě mnoho důležitých otázek týkajících se charakteristiky volné fetální DNA cirkulující v krevním oběhu těhotných žen. Jednou z takovýchto otázek je bezpochyby zjištění velikostního rozložení a kvantity DNA plodu v mateřské plazmě.

První prací zaměřenou na odhalení délky fragmentů cirkulující nebuněčné fetální DNA byla studie provedená roku 2004 Chanem a jeho kolegy. Tato práce se zabývala velikostním rozložením fetální a mateřské DNA v krevní plazmě těhotných žen. Analýza proběhla pomocí kvantitativní PCR zaměřené na dva konkrétní geny: na leptin a SRY. Leptin je umístěn na chromozómu 7 a je přítomný ve všech lidských buňkách, SRY gen je lokaloizován na chromozómu Y. Protože jen 6,3 % z celkové DNA vyskytující se v krevním řečišti během třetího trimestru patří plodu (Lo *et al*, 1998), byla pomocí genu leptinu charakterizována DNA mateřského původu, SRY pak charakterizovala přítomnost plodů mužského pohlaví.

Chan *et al* přišel se zjištěním, že v koncentracích fragmentů menších než 200 bp nebyl mezi těhotnými a netěhotnými ženami významnější rozdíl, avšak ve fragmentech větších byl rozdíl již patrný. U těhotných žen byly fragmenty delší než u žen, které těhotné nebyly. Další výzkum těchto vědců odhalil, že fetální fragmenty jsou obecně menší (medián 99 % zjištěných molekul byl menší než 313 bp) než fragmenty DNA mateřského původu. Data získaná touto studií naznačují, že když žena otěhotní, jsou dvě pozorované možnosti vystihující změny plazmatické DNA – velikostní rozložení celkové plazmatické DNA, převážně mateřského původu, se posune směrem k delším fragmentům; a fetální DNA, jejíž fragmenty jsou kratší než ty mateřské, se stane detekovatelnou (Chan *et al*, 2004).

K obdobným výsledkům došel také tým vědců z univerzity v Japonsku v roce 2005. Jejich výsledky prozrazují, že 60 % fetální DNA získané z periferní krve 20 těhotných pacientek bylo fragmentováno na části o délce  $\leq 100$  bp. Přínosem této práce bylo také zjištění, že plazmatická DNA je stabilní i po více než 4 letech kryoprezervace při  $-20$  °C (Koide *et al*, 2005).

Další významnou studií zabývající se fragmentací fetální DNA je bezpochyby práce z roku 2004 publikovaná vědci ze Švýcarské univerzity v Basileji, která navazuje na práci Chana *et al* (2004) a vychází z toho, že DNA fragmenty náležící plodu jsou menší než ty původu mateřského. Pro potvrzení apoptického původu fragmentů celkové plazmatické DNA a jejich vizualizaci byl použit Southern blot, sondy pro detekci Alu sekvence, a značení digoxigeninem. Výsledek byl pak zachycen na rentgenový film. Při této analýze zachytili dokonce fragmenty delší než 10 kb a některé dokonce větší než 23 kb. Li *et al* pak do procesu samotné izolace zapojuje gelovou elektroforézu pro zjištění délek fetálních DNA fragmentů a jejich separaci. Se svým týmem poté rozdělil takto separovanou DNA na šest částí obsahujících fragmenty odlišné velikosti (podle velikostního markru HindIII), v rozsahu od 0,09 kb až po 23 kb. Po izolaci z gelu a následné real time PCR došli k výsledkům, že velikost fragmentů fetální DNA je ve většině případů menší než 0,3 kb a fragmenty pocházející od matky mají velikost přibližně 1 kb (Li *et al*, 2004).

Tímto tématem se zabývala také Hromadníková *et al*, která kvantifikovala fetální a celkovou DNA v plazmě těhotných žen po velikostní separaci na gelové elektroforéze. Ke studii použila vzorky od 11 těhotných žen, nesoucích mužského potomka, nacházejících se právě v šestnáctém týdnu těhotenství. Ve svých výsledcích došla k závěru, že 0,32 % z celkové hodnoty změřené plazmatické DNA je fetálního původu. DNA plodu byla detekována převážně v sekcích 100–300 bp (rozdělení pomocí gelové elektroforézy) a to v koncentracích okolo 14,3 GE/ml. Ve frakci 300–500 bp už to bylo jen přibližně 4,9 GE/ml. Závěrem této práce je, že fragmenty fetální DNA cirkulující v krevní plazmě těhotných žen se vyskytují ve velikostech od 100 bp po 500 bp, čímž fakticky potvrzuje předchozí práce (Hromadnikova *et al*, 2006).

### 1.1.5 Kvantifikace; Diagnostické přístupy

Výchozí práce zabývající se volnou fetální DNA cirkulující v plazmě používaly konvenční polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Touto metodou bylo určováno především pohlaví plodu. Pozdější představení real-time PCR umožnilo detekci a kvantifikaci volné fetální DNA, a to s vyšší senzitivitou i specifitou.

První práci zabývající se kvantifikací fetální DNA cirkulující v mateřské plazmě vypracoval bezpochyby doktor Lo *et al* v roce 1998. Pomocí real-time kvantitativní PCR pro gen SRY zjistil, že v časných fázích těhotenství je průměrně 4,3 % z celkové plazmatické DNA fetálního původu. V pozdějších měsících gravidity se podíl fetální složky zvyšuje, a pohybuje se okolo 6,2 %. V časném těhotenství naměřil koncentrace fetálního DNA v rozsahu od 0,014 % až po 0,54 % v séru, v krevní plazmě byly naměřené hodnoty o něco vyšší (0,39–11,9 %). V pozdějších fázích těhotenství bylo rozpětí naměřených koncentrací v krevní plazmě 2,33–11,4 % a 0,032–3,97 % v séru. Celkové koncentrace volné fetální DNA v krevní plazmě a séru těhotných žen si jsou navzájem podobné. Hlavní rozdíl mezi analýzou fetální DNA z plazmy nebo séra těhotných žen spočívá v přítomnosti vyššího pozadí (tvořeného maternální DNA uvolněné ze sraženiny), které je přítomno v krevním séru.

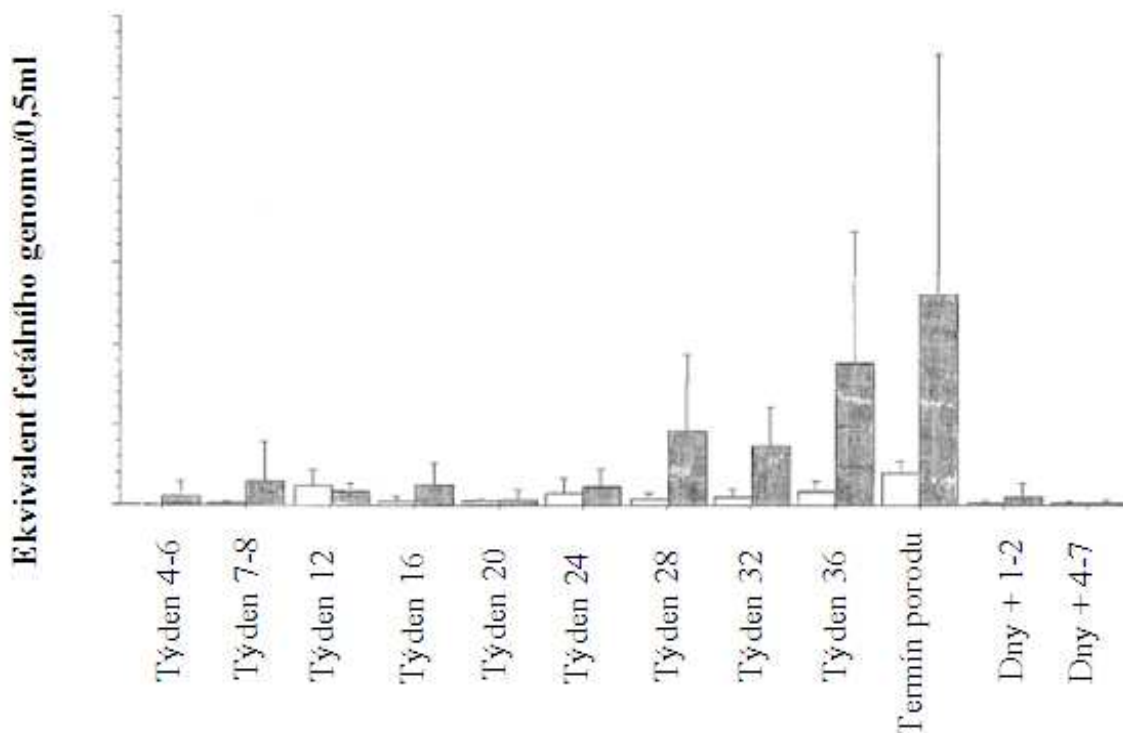
Stejnou metodu použil také Zhong se svým týmem, když porovnával množství fetální DNA v normálních případech těhotenství a množství DNA, které je v krevním oběhu žen nesoucích aneuploidní plody. Výsledkem jejich studie bylo zjištění, že u trisomií 13, 18 a 21 je fetální DNA oproti normálním těhotenstvím zvýšená (Zhong *et al*, 2000).

Srovnatelnou koncentraci, jakou naměřil ve svém výzkumu Lo *et al*, zjistil v roce 2001 také Wei se svými kolegy. Použil k tomu kvantitativní PCR a fetální marker SRY a jako referenční gen pro zjištění citlivosti metody si vybral  $\beta$ -aktin. Zjištěné koncentrace fetální DNA v této práci se pohybovaly v rozmezí od 1,28 % do 47,7 % (Wei *et al*, 2001).

Množství fetální DNA v jednotlivých fázích těhotenství určoval tým vědců vedený Arigou. V prvním trimestru byli schopni pomocí kvantitativní PCR detekovat přítomnost volné fetální DNA u 59 % sledovaných žen. Mezi pátým a osmým týdnem těhotenství už byla volná DNA plodu detekována ve všech případech těhotenství. Mezi sedmým až šestnáctým týdnem prenatalního vývoje plodu bylo možné přibližně u dvou

třetin sledovaných těhotenství pozorovat zvýšení koncentrace fetální DNA, ačkoliv toto zvýšení nebylo stabilní (obrázek 2). Ve své práci pozorovali také zvýšení DNA plodu v buněčné frakci avšak oproti množství volné DNA je toto množství téměř zanedbatelné (Ariga *et al*, 2001).

**Obrázek 2:** Grafické srovnání koncentrací volné fetální DNA (černá) a buněčné DNA plodu (bílá) cirkulující v krevním oběhu matek v průběhu těhotenství.



*Upraveno podle článku: Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Transfusion Med. 2001 Dec; 41: 1524-1530(7).*

První komplexnější studie zabývající se určením pohlaví plodu byla publikována v roce 2001 Sekizawou a jeho kolegy. Pro analýzu použili soubor čítající 302 vzorků DNA izolovaných z krevní plazmy těhotných žen. 143 z těchto vzorků obsahovalo DNA plodů mužského pohlaví. Určení pohlaví provedli za pomoci kvantitativní real-time PCR a primerů pro DYS-14 sekvenci. Citlivost metody při určování mužského pohlaví dosahovala 97,2 % (Sekizawa *et al*, 2001).

Nedávná studie, která kromě jiného také potvrdila zvyšující se koncentraci fetální DNA v krevní plazmě těhotných žen, přišla s objevem, že se tak neděje lineárně. Druhým cílem bylo určit referenční rozhraní koncentrací volné fetální DNA pro fyziologická a abnormální těhotenství. Pro kvantifikaci byla použita real-time PCR pro DYS14 gen. U abnormálních těhotenství byly koncentrace fetální DNA obecně vyšší než u těhotenství fyziologických (Alberry *et al*, 2009).

Konvenční PCR pro určení pohlaví plodu a real-time PCR pro kvantifikaci použil Honda *et al* roku 2002. Konvenční PCR pro DYS14 sekvenci měla 95% úspěšnost identifikace mužského potomka. Po dosažení sedmého týdne těhotenství byla záchytnost 100%. Při určení pohlaví pomocí real-time PCR pro SRY sekvenci bylo určení mužského pohlaví plodu 100% i u vzorků, u kterých ji standardní PCR neprokázala. Určil také teoretický limit minimální koncentrace fetální DNA (respektive koncentraci SRY genu) nutnou pro spolehlivou analýzu, kterou stanovil na 5,38 kopií/ml (Honda *et al*, 2002).

Porovnáním citlivosti detekce a kvantifikací genů DYS14 a SRY se zabýval Zimmermann *et al*. Potvrdil, že použitím genu DYS14 se metoda stanovení pohlaví stane citlivější i při malém obsahu DNA v plazmě a výtěžnost se při kvantifikaci zvýší přibližně desetkrát (Zimmermann *et al*, 2006).

Real-time kvantitativní PCR pro SRY gen a fluorescenční multiplex QF PCR STR lokusů se pokusili srovnat Bauer a jeho kolegové. Pomocí real-time PCR zjistili, že kvantita celkové a fetální DNA navzájem souvisejí. U fyziologických těhotenství naměřili medián koncentrace celkové DNA 483 GE/ml a medián fetální DNA byl 8 GE/ml. Ve srovnání s fluorescenční multiplex PCR nebyly však tyto výsledky v korelaci. Žádný z výsledků také průkazně nekoreloval s těhotenským věkem (Bauer *et al*, 2006).

Rozpoznání a přesná kvantifikace fetální DNA jsou pro diagnostické účely rozhodující. Při vyšetření DNA plodu se některé stávající protokoly zaměřují pouze na PCR detekci Y-specifických sekvencí, jakými jsou geny SRY, DYS14, nebo TSPY. Systém kvantifikace využívající Y sekvence plodu je dostatečně citlivý, aby dokázal zachytit DNA ekvivalent z jediné cílové buňky, bohužel je aplikovatelný pouze na těhotenství očekávající narození mužského potomka. Přítomnost negativního signálu ve výsledcích však nemusí vždy znamenat, že daný vzorek pochází od plodu ženského

pohlaví. Může se také jednat o chybu v experimentu, která pak vede k negativním výsledkům. Při určování pohlaví potomka je proto lepší mít PCR produkt, který neleží pouze na Y chromosomu, kvůli kontrole správného průběhu reakce. Takovým genem může být například amelogenin, který má svůj lokus na obou chromozómech – na X i Y, mezi nimiž se odlišuje délkou PCR produktů (Sullivan *et al*, 1993), nebo také vysoce variabilní STR sekvence, které je možno nalézt na gonozómech i autozómech.

### 1.1.5.1 Výhody použití STR lokusů

Metodika aplikace polymerázové řetězové reakce (PCR) pro stanovení pohlaví plodu z krevní plazmy těhotných žen a kvantifikace fetální DNA u žen čekajících mužského potomka je již tedy poměrně dobře zpracovaná a také spolehlivá. Vyšetření plodů ženského pohlaví vyžaduje vyvinutí nových PCR systémů, které jsou schopny detekovat autozomální polymorfni lokusy. Pro tento účel může být vhodná například PCR amplifikace vysoce polymorfních krátkých tandemových repetitiv (STR). Díky vysoké variabilitě STR sekvencí, je většina z lidí pro tyto markery heterozygotní. PCR tedy přinese dva produkty, každý zděděný po jednom z rodičů (Pertl *et al*, 2000).

S nápadem využít STR sekvence pro jednoznačnou identifikaci ženského pohlaví plodu přišli již v roce 1999 vědci z Číny. V této studii bylo 25 žen v různém stupni těhotenství podrobena odebrání periferní krve, ze které se po získání plazmy izolovala volná fetální DNA. Pro zjištění pohlaví byly využity STR sekvence s lokusem na X-chromozómu, který byl paternálního původu. Tímto způsobem spolehlivě určili pohlaví u 71 % plodů v průběhu prvního trimestru těhotenství a v průběhu druhého trimestru bylo určení pohlaví úspěšné již v 80 % případů (Tang *et al*, 1999). Tito vědci také předpověděli využití STR sekvencí na autozómech v neinvazivní prenatalní diagnostice nepodléhající zjištění mužského pohlaví.

Vyvinutí studie, která bude analyzovat fetální DNA právě bez závislosti na pohlaví, si stanovili za cíl vědci z Bostonu. Použitím devíti různých STR sekvencí a multiplex fluorescenční PCR demonstrovali, že fetální DNA v mateřské plazmě může být detekována pomocí alel specifických pro daný plod, které jsou paternálně zděděné. Tyto alely byly detekovány v 84 %. Markery D21S11 a D21S1411 vyšly z analýzy jako



nejvíce informativní a senzitivní, a autorka uvádí, že spolu s amelogeninem X a Y by byly vhodné pro široké spektrum klinických aplikací (Pertl *et al*, 2000).

Porovnáním fyziologických a patologických těhotenství na základě rozdílů v koncentraci fetální DNA bez závislosti na pohlaví se zabýval doktor Vodička se svými kolegy. Bylo vyšetřeno 258 žen s fyziologickým těhotenstvím a 17 vzorků, u kterých byl potvrzen Downův syndrom. Analyzovali 3 STR sekvence (D21S1435, D21S1446 a PentaD (pD)) a také amelogenin X a Y. Analyzované STR sekvence byly identifikovány v 74 % studovaných vzorků, pomocí kvantitativní fluorescenční PCR. Kvantifikací krátkých tandemových repetitivních i amelogeninových sekvencí prokázali zvýšení koncentrace fetální DNA v průběhu těhotenství. Toutéž analýzou také zjistili, že v případě vývoje plodu s trizomií 21 je množství cirkulující DNA plodu v krevní plazmě těhotných žen vyšší, než u kontrol (Vodicka *et al*, 2008).

#### **1.1.5.2 Kvantifikace volné cirkulující DNA kapilární elektroforézou**

Práce Zhanga *et al* poprvé využívá ke kvantifikaci volné DNA z krevního séra a plazmy zónovou kapilární elektroforézu. Porovnává množství cirkulující DNA u zdravých jednotlivců a pacientů trpících různými formami rakoviny prostaty. Průměrná hodnota koncentrace cirkulující DNA, kterou naměřili u zdravých jedinců, byla 82 ng/ml, u pacientů s rakovinou byla tato koncentrace řádově stokrát vyšší. Měření koncentrací kapilární elektroforézou se ukázalo být vhodným postupem pro kvantifikaci volné DNA, vykazovalo vysokou citlivost (detekční limit byl 0,5 ng/ml) a snadnou reprodukovatelnost (Zhang *et al*, 2004).

V roce 2008 byla kapilární elektroforéza použita pro zjištění Rh faktoru plodu u Rh negativních těhotných žen. Tato práce představuje novou neinvazivní metodu vyšetření volné fetální DNA z plazmy těhotných žen. Samotné kapilární elektroforéze předcházela PCR s primery pro geny RHD (exon 10) a STR, specifické pro Y-chromozóm. Studie se účastnilo 13 Rh negativních žen (D-) ve 12. až 39. týdnu těhotenství. U 12 z nich byl na kapilární elektroforéze detekován pozitivní pík, v jednom vzorku detekován nebyl. Výsledky získané kapilární elektroforézou byly v této studii ještě ověřeny po porodu pomocí sérologických testů, kterými bylo prokázáno, že ve 12 případech se jednalo o RHD pozitivní potomky a v případě vzorku mateřské plazmy

ve kterém nebyl RHD detekován, bylo prokázáno D-. Metoda dokázala detekovat již 1% D+ příměs v D- plazmě. (Kimura *et al*, 2008).

Kapilární elektroforéza byla také použita k detekci jednonukleotidových rozdílů mezi fetální a mateřskou DNA. Vzorky plazmatické DNA byly získány z periferní krve 25 těhotných žen a 13 vzorků bylo odebráno z krve pupečnickové (kontrola). Porovnávání jednonukleotidových polymorfizmů byl podroben gen ESR1 c 454–397T > C. U žen s alelami v homozygotním stavu TT/CC byly hledány alely opačného typu (C nebo T), tedy paternálně zděděné alely plodu. Z umbilikální plazmy pak byly získány genotypy plodů (kontrola). K namnožení příslušných sekvencí byla použita kombinace PCR/LDR (Ligase Detection Reaction). Výsledky zjištěné PCR/LDR/kapilární elektroforézou se shodovaly s výsledky genotypizace z plazmy z pupečnickové krve (Yi *et al*, 2009).

Použití kapilární elektroforézy ke zjištění pohlaví plodu z plazmatické DNA matky předvedl tým doktora Vodičky v roce 2008 ve fakultní nemocnici v Olomouci. K vyšetření bylo použito 475 vzorků DNA izolovaných z maternální plazmy periferní krve žen v různých týdnech gravidity (rozmezí 4.–37. týden). K nalezení Y-chromozómové sekvence použili AMELX/Y a TSPY sekvence (Obr. 3). Bylo zjištěno že 253 z uvedených vzorků plazmatické DNA obsahuje plod mužského pohlaví a u zbylých vzorků (222) jde o pohlaví ženské. V případě mužského pohlaví byla prokázána neshoda jen v 7,15 % případů a u plodů pohlaví ženského 4,05 %. Bylo také prokázáno, že metodika je schopná rozlišit na základě hodnocení genotypových směsí i 1% příměs Y-chromozomálních sekvencí. Kapilární elektroforéza je tedy vhodná k vyšetření volné fetální DNA izolované z krevní plazmy těhotných žen (Vodička *et al*, 2008).

**Obrázek 3:** Výstup z kapilární elektroforézy. Průkaz fetální DNA v lokusu AMELY; představuje PCR produkt DNA izolované z plazmy, kdy plod je mužského pohlaví (lokusy AMELY a TSPY jsou označeny modrou šipkou).



Převzato z článku: Vodička R, Vrtěl R, Schneiderová E, Vrbická D, Procházka M, Dhailalah I, Šantavá A, Šantavý J. Neinvasivní detekce gonozomálních DNA sekvencí v plazmě gravidních žen s využitím kapilární elektroforézy. *Čes Gynecol* 2008; 73(3): 150-153.

## 2 Cíle práce

### 1. Teoretická část:

- Vypracovat literární rešerši, shrnout poznatky týkající se dané problematiky.
- Shromáždění dostupných literárních zdrojů.

### 2. Praktická část:

- Optimalizovat separaci DNA fragmentů podle velikosti molekul a jejich izolaci.
- Pokusit se kvantifikovat fragmenty fetální DNA z jednotlivých velikostních frakcí pomocí kapilární elektroforézy.
- Kvantifikovat vybrané vzorky pomocí real-time PCR a porovnat výsledky s daty získanými kapilární elektroforézou.
- Experimentální zpracování přiděleného souboru pacientů.
- Vyhodnocení experimentální práce, hodnocení účinnosti použitých metod a porovnání s údaji v literatuře.

## 3 Materiál a metodika

### 3.1 Laboratorní vybavení

- analytická váha: BBC 32, BOECO Germany
- centrifugy: FORCE 1418, Labnet (max. 14 000 rpm)  
IEC Multi RF, Thermo IEC (max. 4000 rpm)  
Janetzki S70 (max. 6 000 RPM)  
MPW-310, Mechanika Precyzyjna Warszawa  
Spectrafuge 7M, Labnet (max. 10 000 RPM)
- centrifuga – třepačka: Combi-Spin, BIOSAN EAST PORT (2 400 rpm)
- elektroforetická komora: SUB-CELL®, BIORAD
- horkovzdušný sterilizátor: HS 122 A, ZPA Dukla Prešov
- kapilární elektroforéza: ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser, AB Applied Biosystéme
- lednice: Zanussi
- mikrovlnná trouba: Elektrolux
- mrazáky: Elektrolux (-26 °C)  
PMA 315 BL (-18 °C)  
Zanussi (-18 °C)
- pipety: Gilsom-Pipetman (1000 µl)  
Labmate (10 µl, 20 µl, 200 µl)  
DISCOVERY (10 µl, 200 µl)
- spektrofotometr: Life Science UV/Vis Spectrophotometer DU® 530,  
BECKMAN COULTERTM
- termocykler: Gradient Cyler, DNA Engine, PTC-200 Peltier Thermal  
Cycler, MJ Research Inc.
- termostat: TV51 Laboratorní přístroje Praha
- vodní lázeň: BM 302, NÜVE SANAYI MALZEMELERI IMALAT VE  
TICARET A.S.
- transluminátor: TRANSILLUMINATOR UPV
- zdroj napětí: Major Science MP-2000P
- digitální fotoaparát: Samsung
- jednorázové skalpely: DAHLHAUSEN

## 3.2 Soubor vyšetřovaných pacientů

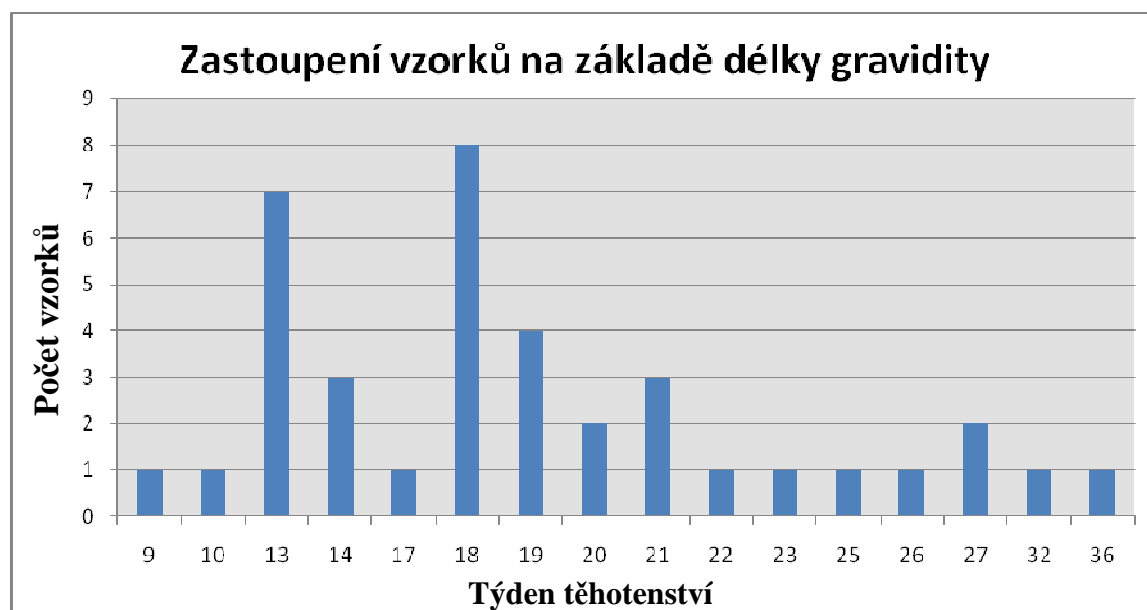
Analýza fragmentace fetální DNA byla provedena na souboru pacientů našeho oddělení (Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN Olomouc). Vyšetřovaný soubor tvořily vzorky plazmy izolované z krve těhotných žen, u kterých byl zjištěn plod mužského pohlaví pomocí: 1. detekce gonozomů z plodové vody nebo choriových klků, 2. kontrolním ultrazvukovým vyšetřením, 3. telefonickým dotazem po porodu.

Vzorky DNA získané z plazmy těhotných žen byly sbírány po několik let a uchovávány v  $-20^{\circ}\text{C}$  v mrazácích. Do analýzy byly zahrnuty vzorky z let 2003, 2004, 2005 a 2006. DNA byla izolovaná z plazmy žen v různém stupni gravidity v rozmezí 4. - 37. týdne.

Jako pozitivní kontroly byly do vyšetření zařazeny vzorky izolované DNA z krevní plazmy 8 mužů.

Do studie bylo zapojeno celkem 96 těhotných žen. Všechny vzorky byly odebrány a vyšetřeny po informovaném souhlasu schváleném etickou komisí FN Olomouc. Jednotlivé počty vzorků vzhledem k délce gravidity jsou znázorněny v grafu (znázorněny jsou jen vzorky, které prošly analýzou v kapilární elektroforéze jako pozitivní na fetální DNA alespoň v jedné velikostní frakci – tj. 39 vzorků).

**Graf 1:** Zastoupení vzorků izolované DNA z krevní plazmy těhotných žen na základě týdne gravidity.



## 3.3 Metody

### 3.3.1 Izolace DNA z plazmy

Plazma byla získána dvojnásobnou centrifugací plné krve. První centrifugace probíhala po 10 min při 1500 RPM a poté 20 min při 2500 RPM. Vzorky byly poté zamrazeny do dalšího zpracování při  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Z takto získané krevní plazmy byla pomocí kitu QiaAmp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (Qiagene) izolována DNA.

- 1) K jednomu mililitru plazmy přidat 1000  $\mu\text{l}$  AL lyzačního pufru a 100  $\mu\text{l}$  proteinázy K. Výslednou směs promíchat na vortexu a dále inkubovat při teplotě  $56^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minut.
- 2) Po skončení inkubace ke vzorku přidat 1000  $\mu\text{l}$  etanolu (96% - 100%), opět promíchat pomocí vortexu.
- 3) Vzorek následně přenést na kolonku (max 700  $\mu\text{l}$ ) a centrifugovat při 8000 otáčkách po dobu jedné minuty. Eluát vylít a postup opakovat tolikrát, než kolonkou projde veškerý materiál.
- 4) Po průchodu celkového množství vzorku do kolonky přidat 500  $\mu\text{l}$  AW1 promývacího pufru a kolonku opět centrifugovat (8000 otáček po 1 min) a eluát vyhodit.
- 5) Do kolonky poté přidat 500  $\mu\text{l}$  promývacího pufru AW2 a vzorek centrifugovat 3 minuty při 13 000 otáčkách. Eluát opět vylít.
- 6) Pro odstranění stop pufrů prázdnou kolonku znovu centrifugovat po 1 minutu při 13 000 otáčkách.
- 7) Kolonku přemístit do čisté označené eppendorfky a na membránu kolonky nanést 60  $\mu\text{l}$  elučního AE pufru. Kolonku dále inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby opět centrifugovat při 13 000 otáčkách po jednu minutu. Protečený eluát již nevyhazovat.
- 8) Na membránku kolonky napipetovat dalších 40  $\mu\text{l}$  AE pufru a opakovat postup z předchozího kroku (inkubace 5 min, centrifugace při 13 000 otáčkách po 1 min).
- 9) Celkově získaný eluát o množství přibližně 100  $\mu\text{l}$  byl pečlivě uzavřen v eppendorfce a uskladněn při  $-20^{\circ}\text{C}$  v mrazáku.

### 3.3.2 Měření koncentrace DNA na spektrofotometru

U vzorků byla následně měřena koncentrace DNA pomocí UV spektrofotometru Beckman Coulter DU 530, na základě stanovení absorbance při vlnové délce 260 nm ( $A_{260}$ ).

### 3.3.3 Gelová agarózová elektroforéza

Princip metody je založený na rozdílné pohyblivosti DNA molekul v agarózovém gelu. Molekuly DNA jsou záporně nabitě a tak se působením stejnosměrného elektrického pole pohybují směrem od katody k anodě. DNA fragmenty různé délky mají v elektrickém poli různou pohyblivost, větší fragmenty se pohybují pomaleji než fragmenty menší. Gelové elektroforézy se většinou užívá k separaci molekul nukleových kyselin o velikosti 0,1 – 50 kb.

K vizualizaci separované DNA se používá interkalační fluorescenční barvivo ethidium bromid (EtBr), které po ozáření ultrafialovým světlem červenooranžově fluoreskuje. Pro separaci fragmentů deoxyribonukleotidové kyseliny byl použit 1% agarózový gel s ethidium bromidem (5  $\mu$ l 10 mg/ml EtBr na 100 ml gelu) a TBE pufrem.

Obsah volné DNA v krevní plazmě je nízký, proto bylo pro optimální výnos potřeba do jamek v gelu pipetovat alespoň 20  $\mu$ l izolované DNA. N3234L od firmy BioLabs® Inc. byl použit jako velikostní standard (Obr. 4). Samotná elektroforetická separace probíhala při 85 V 70 - 80 min.

#### **TBE pufr:**

|         |                                |
|---------|--------------------------------|
| 27 g    | Tris-(hydroxymetyl)-aminometan |
| 13,75 g | Kyselina boritá                |
| 1,86 g  | EDTA                           |
| 5 l     | Destilovaná voda               |

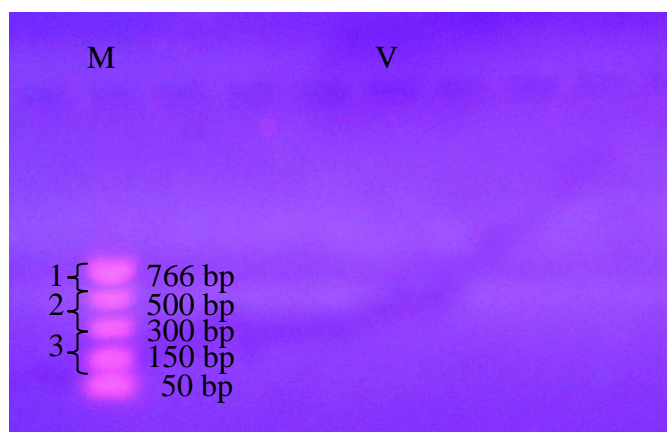
### 3.3.4 Izolace DNA fragmentů pod UV transluminátorem

Pro vizualizaci a následnou izolaci DNA z gelu byl použit UV transluminátor: TRANSILLUMINATOR UPV. Nutno použít ochranné pomůcky (štít) na ochranu očí.

Po přenesení gelu pod UV transluminátor, z něj byly pomocí skalpelu a fluorescenčního pravítka, vyřezány fragmenty příslušného vzorku podle velikostního standardu. Z každého vzorku plazmatické DNA podrobeného velikostní separaci, byly na základě srovnání s velikostním markerem, z gelu vyřezány tři proužky obsahující fragmenty o délce: 150-300 bp, 300-500 bp a 500-760 bp. Každý proužek gelu byl vložen do pečlivě označené zkumavky, ve které byl dále zpracováván, nebo do druhého dne uskladněn v lednici.

Kvůli malému množství DNA obsažené v plazmě však vzorky nesvítí, fluoreskuje pouze velikostní standard (Obr. 3), podle nějž byla DNA z gelu vyřezána.

**Obrázek 4:** Fotografie gelu pod UV transluminátorem před izolací separovaných DNA fragmentů. Viditelný je pouze velikostní standard N3234L (M), fluorescence tři jamky vzdáleného vzorku 54FP/03 (V) již nelze zaznamenat. Naznačeny jsou také velikosti jednotlivých fragmentů a způsob jejich vyřezání.





### 3.3.5 Izolace DNA z gelu

Proužky gelu byly zváženy na analytické váze a jejich hmotnost zaznamenána. Pro izolaci DNA fragmentů z gelu byly testovány kity od firmy Qiagene a od SIGMY.

#### **Použité kity:**

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagene) a GenElute Agarose Spin Columns od SIGMY.

#### • QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagene)

1. Zvážit vyřezaný proužek gelu a přidat k němu tři objemy roztoku usnadňujícího rozpuštění gelu (př.: váha proužku 100 mg → přidat 300  $\mu$ l roztoku). Vše pak 10 min inkubovat při teplotě 50°C a průběžně vortexovat.
2. Po rozpuštění gelu přidat do zkumavky 1 objem izopropanolu.
3. Roztok přelít do kolonky a centrifugovat 1 min při 13 000 otáčkách, eluát vyhodit.
4. Po vlití eluátu do kolonky přidat 700  $\mu$ l pufru který odstraní zbytky agarózy, centrifugovat 1 min a eluát opět vyhodit.
5. Přidat 500  $\mu$ l promývacího pufru a opět centrifugovat 1 min, při 13 000 otáčkách, eluát opět vyhodit a prázdnou zkumavku dále centrifugovat 1 min (odstranění etanolu).
6. Kolonku umístit do čisté zkumavky. Do středu kolonky přidat 50  $\mu$ l elučního pufru, 1 min inkubovat a poté centrifugovat 1 min (13 000 rpg).

• GenElute Agarose Spin Columns (SIGMY)

V tomto případě je izolace DNA z gelu založena na prosté centrifugaci gelu v kolonce.

1. Kolonku připravíme 100  $\mu$ l vody (PCR čistota) nebo 1x TE pufr, centrifugovat 5-10 sekund na 13 000 otáček a eluát poté vyhodit.
2. Gelový proužek nejprve zvážit (kolonka spolehlivě izoluje DNA z proužků gelu o maximální hmotnosti 200 mg), poté sterilním skalpelem rozsekat na co nejmenší části a přenést do kolonky.
3. Centrifugovat 10 min na 13 000 rpm. DNA je již obsažená v eluátu.

### 3.3.6 Měření koncentrace DNA ve frakcích na spektrofotometru

U vzorků z jednotlivých velikostních frakcí byla měřena koncentrace DNA pomocí UV spektrofotometru Beckman Coulter DU 530, na základě stanovení absorbance při vlnové délce 260 nm ( $A_{260}$ ).

Koncentrace DNA vyplývá z Lambert-Beerova zákona:

$$A_{260} = c \times \epsilon \times d$$

Kde  $c$  je koncentrace DNA,  $\epsilon$  je molární extinkční (absorpční) koeficient a  $d$  je tloušťka kyvety.

### 3.3.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Technika PCR slouží k amplifikaci určitého úseku DNA *in vitro*. Reakční směs by měla obsahovat templát (nukleová kyselina), dva oligonukleotidové primery (hybridizují s protichůdnými vlákny DNA, od jejichž 3'-konců je zahájena syntéza komplementárních řetězců), termostabilní enzym DNA polymerázu (katalyzuje syntézu komplementárního vlákna), deoxyribonukleozidtrifosfáty (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), hořčnaté ionty (zajišťují aktivitu DNA polymerázy) a stabilizující pufr (udržuje prostředí reakce).

Syntéza nových DNA řetězců probíhá opakovaně v cyklech, ve kterých se pravidelně střídají tři kroky: denaturace dvouřetězcových molekul DNA (95°C), annealing - nasednutí primerů na rozvolněná vlákna DNA (30-65 °C) a syntéza nových komplementárních řetězců DNA (extension) od jeho 3'-konce prostřednictvím DNA polymerázy (65-75°C).

### 3.3.7.1 PCR reakce s kitem

Polymerázová řetězová reakce byla provedena s použitím kitu Top-Bio, Combi PPP Master Mix (0,01% Tween 20, 75 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8, 20 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 μmol/l dATP, 200 μmol/l dTTP, 200 μmol/l dCTP, 200 μmol/l dGTP, 2,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 50 U/ml Taq Purple polymeráza, stabilizátory, monoklonální protilátka anti-Taq (19 nmol/l), aditiva), PCR vody, DNA a směsi primerů (Amelogenin X a Y).

**Tabulka 1:** Primerové lokusy a jejich specifikace.

| Lokus    | Cytogenetická lokalizace | Sekvence<br>(1. forward, 2. reverse)                        | Modifikace                 | Velikost fragmentu       |
|----------|--------------------------|---|----------------------------|--------------------------|
| AMEL X/Y | Xp22.31-q22.1<br>Yp11.2  | 5'-ccctgggctctgtaaagaa-3'<br>5'-atcagagcttaaactgggaagctg-3' | 6-FAM<br>(phosphoramidite) | 103 bp (X)<br>109 bp (Y) |

**Tabulka 2:** Množství reagensů použitých na 1 vzorek.

| Pro jeden vzorek                               |       |
|--|-------|
| PCR voda (Top-Bio)                             | 4 μl  |
| Combi PPP Master Mix (Top-Bio)                 | 25 μl |
| Primer mix (Amel X/Y o koncentraci 10 pmol/μl) | 1 μl  |
| DNA  | 20 μl |

### Podmínky amplifikace:

PCR reakce byla prováděna v termocyleru MJ Research, Inc. Amplifikace vzorků probíhala za následujících podmínek:

**Tabulka 3:** Podmínky PCR amplifikace

| Fáze PCR                       | teplota | čas        |
|--------------------------------|---------|------------|
| 1. Úvodní denaturace           | 94°C    | 10 min     |
| 2. Denaturace                  | 94°C    | 1 min      |
| 3. Annealing                   | 59°C    | 1 min 30 s |
| 4. Elongace                    | 72°C    | 2 min      |
| 5. Krok 2 až 4 opakován 40krát |         |            |
| 6. Finální extenze             | 72°C    | 7 min      |

### 3.3.8 Kvantifikace fragmentů kapilární elektroforézou

Automatický genetický analyzátor ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) je založen na principu kapilární elektroforézy fluorescenčně značených DNA fragmentů. Jednotlivé DNA fragmenty jsou elektroforézou v kapiláře rozděleny na základě rozdílů v náboji a postupně detekovány laserovým detektorem.

Při fragmentační analýze jsou DNA fragmenty připraveny PCR reakcí s primery, kdy jeden primer z páru je fluorescenčně značený. V průběhu běhu pak mohou být současně analyzovány různé fragmenty za předpokladu, že se navzájem liší svou délkou, nebo jsou označeny různými fluorescenčními barvami. Spolu s každým vzorkem běží interní délkový standard (TAMRA), který umožní přesnou kvantifikaci jednotlivých fragmentů.

Fragmentační analýza probíhala na analyzátoru ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) s délkou kapiláry 47 cm, průměrem 50 μm a byla naplněná gelem POP4™ (Applied Biosystems).

### **Směs pro elektroforetické dělení:**

|                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| PCR produkt                         | 1 $\mu$ l   |
| Velikostní standard TAMRA           | 0,5 $\mu$ l |
| Hi Di formamid (Applied Biosystems) | 10 $\mu$ l  |

Celá směs byla pak 3-4 min denaturována při 95 °C na termocykleru Gradient Cyclor, DNA Engine a poté ihned zchlazena na ledu a aplikována do kapiláry, nebo umístěna do mrazáku s teplotou -20 °C.

### **Podmínky elektroforézy:**

|                        |   |
|------------------------|---|
| Nasátí vzorku:         | 3 kV – 15 kV po dobu 5 s – 15 s           |
| Vlastní elektroforéza: | 25 min při teplotě 60 °C při napětí 15 kV |

### **Odečet výsledků**

Ke snímání a digitalizaci hrubých dat fluorescence byl používán software ABI PRISM 310 Data Collection. K vlastní analýze snímaných dat byl využíván software GeneScan Analysis 3.1.2 (Applied Biosystems). Ke kvantitativním analýzám byl použit parametr RFU (relativní fluorescenční jednotka) vyjádřený výškou píku.

Analyzována byla množství DNA ve frakcích 150-300 bp, 300-500 bp a 500-760 bp. Množství DNA jsme vztáhli k podílu hodnot (AMEL X/AMEL Y). Nižší výsledný podíl znamenal větší množství fetální DNA – resp. AMELY.

### 3.3.9 Kvantifikace vybraných vzorků pomocí real-time PCR

#### Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification kit (Applied Biosystems):

Pomocí Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification kitu (Applied Biosystems) bylo změřeno množství DNA plodu mužského pohlaví izolované z plazmy matky u vybraných vzorků.

Měření bylo stanoveno na základě TaqMan technologie (real-time PCR). Quantifiler Primer Mix obsahuje směs primerů a sond, které amplifikují gen SRY. Sonda, která specificky rozpoznává sekvenci genu SRY, je označena fluoroforem FAM a sonda pro vnitřní PCR kontrolu fluoroforem JOE. Porovnávána byla množství DNA v celkové plazmě a ve frakcích 150-300 bp, 300-500 bp a 500-760 bp. Množství DNA jsme vztáhli k rozdílu Ct hodnot (Ct(FAM)-Ct(JOE)).

#### Reakční směs (28 µl)

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Quantifiler Y Human Male Primer Mix | 10,5 µl |
| Quantifiler PCR Reaction Mix        | 12,5 µl |
| DNA                                 | 5 µl    |

**Tabulka 4:** Reakční podmínky

| Jednotlivé kroky | teplota                       | čas    |
|------------------|-------------------------------|--------|
| krok 1           | 95 °C                         | 10 min |
| krok 2           | 95 °C                         | 15 s   |
| krok 3           | 60 °C                         | 1 min  |
| krok 4           | Krok 1-3 opakovat po 60 cyklů |        |

## 5 Výsledky

### 5.1 Optimalizace izolace fetální DNA z gelu

Oběma kity, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagene) a GenElute Agarose Spin Columns (SIGMA), bylo nejprve izolováno po 10 vzorcích a podle výsledků získaných kapilární elektroforézou byl vybrán kit, který byl na izolaci DNA dále používán.

**Tabulka 5:** Průměrná koncentrace fetální DNA v jednotlivých frakcích vybraných vzorků. Srovnání dvou kitů.

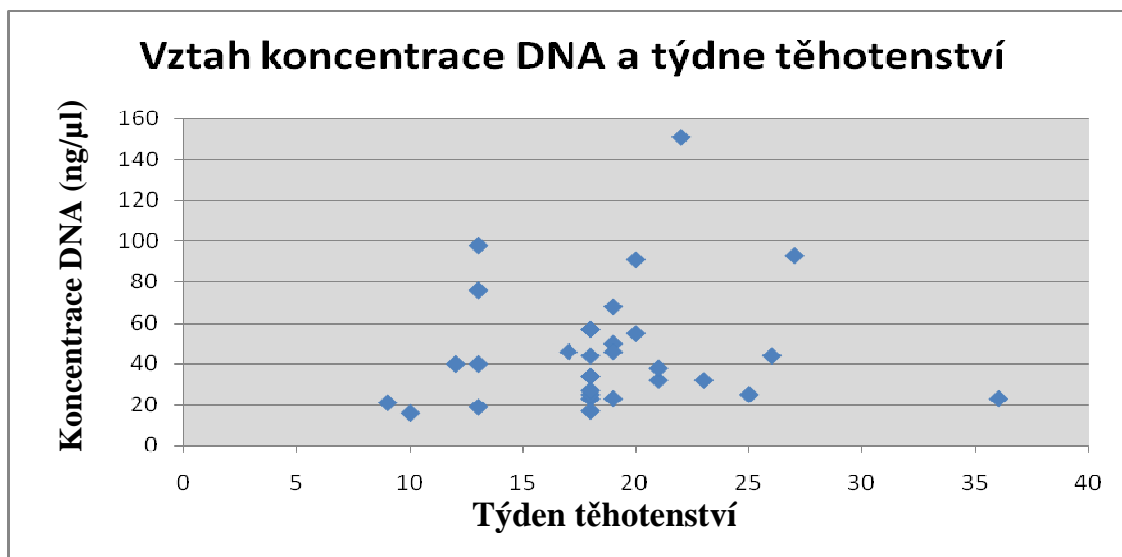
| Kit           | frakce 150-300 | frakce 300-500 | frakce 500-760 |
|---------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>SIGMA</b>  | 2,563          | 2,025          | 1,865          |
| <b>QIAGEN</b> | 2,811          | 2,331          | 2,163          |

Výsledky získané izolací oběma kity byly srovnatelné. V rámci homogenity výsledků, byl dále používán pouze kit od firmy SIGMA - GenElute Agarose Spin Columns. Tento kit byl zvolen, protože izolace tímto kitem je jednodušší na provedení.

### 5.2 Měření koncentrace celkové DNA spektrofotometrem

Měření koncentrace celkové DNA izolované z krevní plazmy jsme provedli UV spektrofotometrem Beckman Coulter DU 530. Naměřená data vztažená k týdnu těhotenství jsou zobrazena v následujícím grafu. Naměřené hodnoty vykazovaly vysokou heterogenitu a vztah mezi množstvím DNA a týdnem těhotenství nebyl prokázán.

**Graf 2:** Vztah mezi množstvím naměřené DNA a týdnem těhotenství.

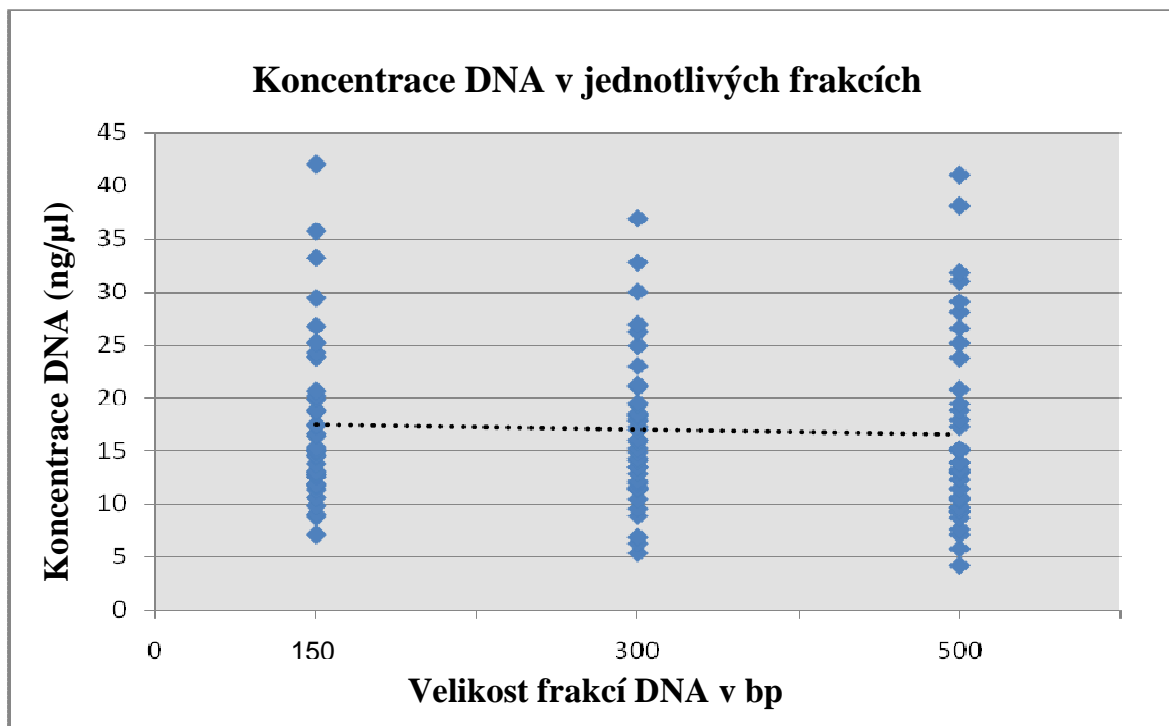


### 5.3 Měření koncentrace DNA v jednotlivých frakcích

Měření koncentrace DNA izolované z jednotlivých velikostních frakcí jsme provedli také UV spektrofotometrem Beckman Coulter DU 530. Medián naměřených koncentrací ve frakci 150-300 bp je 15,02 ng/μl, pro frakci 300-500 bp je medián 16,08 ng/μl a pro frakci 500-760 bp je 13,3 ng/μl. Množství DNA naměřené spektrofotometrem v jednotlivých frakcích je znázorněno v následujícím grafu (Graf 3).



**Graf 3:** Koncentrace DNA naměřené v jednotlivých frakcích pomocí spektrofotometru.



## 5.4 Gelová elektroforéza

Kontrolní gelová elektroforéza byla prováděna u vybraných a zakoncentrovaných vzorků DNA z plazmy. Na gelu se tyto produkty ukazovaly v podobě tzv. „smíru“. M-velikostní standard, 1,2,3,4,5,6,7,8,9 – vybrané vzorky, K- kontrola (voda + primery).



## 5.5 Kvantifikace fragmentů kapilární elektroforézou

Kvantifikace fragmentů kapilární elektroforézou probíhala na automatickém analyzátoru ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Gonozomální sekvence byly optimalizovány a posuzovány s využitím lokusů v genech AMELX, AMELY. Velikosti molekul byly zvoleny: AMELX 103 bp, AMELY 109 bp.

Na základě separace fragmentů kapilární elektroforézou jsme odhalili dva fragmenty odpovídající PCR produktu. V rámci našeho souboru vzorků se vyskytují oba fragmenty společně (testovali jsme DNA z krevní plazmy těhotných žen s plody mužského pohlaví), přičemž delší z nich – o velikosti 109 párů bazí (AMELX), se obvykle vyskytoval ve větším množství.

Celkem bylo analyzováno 96 vzorků, z toho každý obsahoval tři velikostní frakce (150-300 bp, 300-500 bp, 500-760 bp). U 39 vzorků analyzovaných kapilární elektroforézou byly sekvence AMELX a AMELY společně detekovány alespoň v jedné velikostní frakci. Účinnost této metody při analýze fragmentace fetální DNA izolované z maternální plazmy byla 40,6 %. Mužské pohlaví bylo potvrzeno ve všech těchto vzorcích. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 6.

**Tabulka 6:** Hodnoty fluorescence DNA změřené kapilární elektroforézou, výsledky jsou uvedeny v RFU (relativní jednotka fluorescence).

| Číslo vzorku | Týden těhotenství | frakce 150-300 | frakce 300-500 | frakce 500-760 |
|--------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1FP/03       | 20                | X = 16 864     | X = 14 657     | X = 7 377      |
|              |                   | Y = 10 474     | Y = 47 766     | Y = -----      |
| 17FP/03      | 18                | X = 6 452      | X = 1 351      | X = 1 330      |
|              |                   | Y = 995        | Y = 510        | Y = 487        |
| 22FP/03      | 21                | X = 47 375     | X = 12 744     | X = 22 773     |
|              |                   | Y = 10 251     | Y = -----      | Y = 6 956      |
| 54FP/03      | 18                | X = 18 986     | X = 18 812     | X = 4 969      |
|              |                   | Y = 381        | Y = 4 974      | Y = 2 142      |
| 35FP/04      | 19                | X = 16 147     | X = 19 877     | X = 14 553     |
|              |                   | Y = 2 370      | Y = 2 679      | Y = 4 515      |
| 43FP/04      | 19                | X = 5 686      | X = -----      | X = 60         |
|              |                   | Y = 4 641      | Y = -----      | Y = -----      |
| 75FP/04      | 18                | X = 33 203     | X = 38 041     | X = -----      |
|              |                   | Y = 26         | Y = 3 213      | Y = 19         |

| Číslo vzorku | Týden těhotenství | frakce 150-300 | frakce 300-500 | frakce 500-760 |
|--------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| 89FP/04      | 22                | X = 16 329     | X = 13 773     | X = -----      |
|              |                   | Y = 168        | Y = 95         | Y = -----      |
| 95FP/04      | 18                | X = 7 945      | X = 4 692      | X = -----      |
|              |                   | Y = 3 226      | Y = 7 624      | Y = -----      |
| 140FP/04     | 17                | X = 7 956      | X = 6 202      | X = 4 131      |
|              |                   | Y = 3 646      | Y = 4 842      | Y = 5 849      |
| 150FP/04     | 12                | X = 5 905      | X = 6 961      | X = -----      |
|              |                   | Y = 8 219      | Y = 7 701      | Y = -----      |
| 184FP/04     | 19                | X = -----      | X = -----      | X = 6 630      |
|              |                   | Y = -----      | Y = -----      | Y = 6 885      |
| 195FP/04     | 18                | X = 6 783      | X = 8 440      | X = -----      |
|              |                   | Y = 5 176      | Y = 3 901      | Y = -----      |
| 7FP/05       | 18                | X = 9 000      | X = 34 076     | X = -----      |
|              |                   | Y = 2 830      | Y = 5 124      | Y = -----      |
| 12FP/05      | 18                | X = -----      | X = 3 601      | X = -----      |
|              |                   | Y = -----      | Y = 3 774      | Y = -----      |
| 19FP/05      | 23                | X = 1 994      | X = 110        | X = 1 568      |
|              |                   | Y = 558        | Y = 107        | Y = 1 394      |
| 30FP/05      | 26                | X = 1 565      | X = 773        | X = 1 050      |
|              |                   | Y = 726        | Y = 216        | Y = 574        |
| 43FP/05      | 20                | X = 15 333     | X = 13 767     | X = 9 759      |
|              |                   | Y = 9 960      | Y = 8 571      | Y = 5 910      |
| 49FP/05      | 19                | X = 14 001     | X = 10 557     | X = 8 823      |
|              |                   | Y = 8 874      | Y = 6 657      | Y = 5 364      |
| 53FP/05      | 18                | X = 13 617     | X = 4 329      | X = 3 585      |
|              |                   | Y = 8 721      | Y = 2 580      | Y = 2 217      |
| 75FP/05      | 36                | X = 10 710     | X = 5 676      | X = 5 733      |
|              |                   | Y = 6 579      | Y = 3 372      | Y = 3 333      |
| 86FP/05      | 13                | X = 860        | X = 194        | X = 646        |
|              |                   | Y = 769        | Y = 168        | Y = 484        |
| 108FP/05     | 10                | X = 3 227      | X = 1 345      | X = 849        |
|              |                   | Y = 2 207      | Y = 951        | Y = 599        |
| 126FP/05     | 25                | X = 153        | X = 374        | X = 513        |
|              |                   | Y = 123        | Y = 290        | Y = 380        |
| 132FP/05     | 21                | X = 2 703      | X = 968        | X = 1 530      |
|              |                   | Y = 1 683      | Y = 678        | Y = 1 020      |
| 137FP/05     | 21                | X = 922        | X = -----      | X = 5 087      |
|              |                   | Y = 746        | Y = -----      | Y = 5 760      |
| 148FP/05     | 14                | X = 659        | X = 2 451      | X = 5 789      |
|              |                   | Y = 542        | Y = 1 752      | Y = 3 774      |
| 165FP/05     | 9                 | X = 3 647      | X = 791        | X = 1 224      |
|              |                   | Y = 2 601      | Y = 536        | Y = 867        |

| Číslo vzorku | Týden těhotenství | frakce 150-300 | frakce 300-500 | frakce 500-760 |
|--------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| 185FP/05     | 27                | X = 770        | X = 1 497      | X = 5 057      |
|              |                   | Y = 554        | Y = 1 039      | Y = 3 387      |
| 195FP/05     | 18                | X = 6 784      | X = 8 441      | X = 969        |
|              |                   | Y = 1 836      | Y = 205        | Y = 1 220      |
| 7FP/06       | 27                | X = -----      | X = 2 295      | X = 2 354      |
|              |                   | Y = -----      | Y = 4 055      | Y = 1 433      |
| 35FP/06      | 13                | X = 16 147     | X = 19 877     | X = 14 553     |
|              |                   | Y = 2 370      | Y = 2 679      | Y = 4 515      |
| 146FP/06     | 13                | X = 264        | X = 47         | X = -----      |
|              |                   | Y = 137        | Y = 22         | Y = -----      |
| 164FP/06     | 13                | X = -----      | X = -----      | X = 290        |
|              |                   | Y = -----      | Y = -----      | Y = 161        |
| 250FP/06     | 13                | X = -----      | X = 6 203      | X = -----      |
|              |                   | Y = -----      | Y = 4 718      | Y = -----      |
| 285FP/06     | 13                | X = 3 336      | X = 6 209      | X = 12 684     |
|              |                   | Y = -----      | Y = 4 720      | Y = 3 624      |
| 313FP/06     | 13                | X = -----      | X = 6 477      | X = -----      |
|              |                   | Y = -----      | Y = 3 137      | Y = -----      |
| 316FP/06     | 13                | X = 6528       | X = -----      | X = -----      |
|              |                   | Y = 4738       | Y = -----      | Y = -----      |
| 331FP/06     | 13                | X = -----      | X = 6209       | X = -----      |
|              |                   | Y = -----      | Y = 4720       | Y = -----      |

Pro srovnání bylo kapilární elektroforézou analyzováno také osm vzorků mužské DNA zpracované stejným způsobem z krevní plazmy. Zjištěná data jsou uvedena v následující tabulce. V Grafu 4 jsou uvedeny podíly fluorescencí AMELX/AMELY v jednotlivých frakcích DNA izolované z krevní plazmy mužů. Z grafu vyplývá, že ve frakci o velikosti 500-760 bp je Y-specifické DNA nejméně.

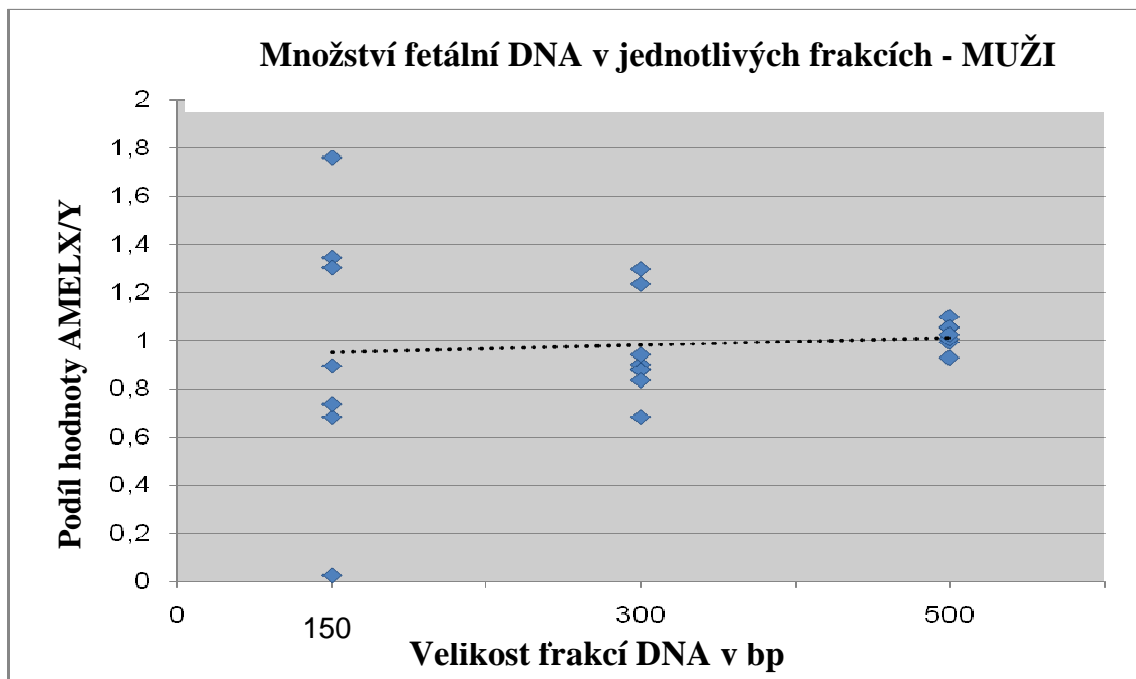
**Tabulka 7:** Hodnoty fluorescence mužské DNA změřené kapilární elektroforézou, výsledky jsou uvedeny v RFU (relativní jednotka fluorescence).

| Číslo vzorku | frakce 150-300 | frakce 300-500 | frakce 500-760 |
|--------------|----------------|----------------|----------------|
| 312FP/06     | X = 11 331     | X = 12 333     | X = 16 449     |
|              | Y = 16 623     | Y = 14 043     | Y = 15 606     |
| 318FP/06     | X = 4 709      | X = 13 923     | X = 8 421      |
|              | Y = -----      | Y = 16 677     | Y = -----      |
| 332FP/06     | X = 2 976      | X = 10 560     | X = 13 005     |
|              | Y = 4 047      | Y = 12 033     | Y = 14 001     |
| 340FP/06     | X = 19 836     | X = 20 886     | X = 21 957     |
|              | Y = 22 170     | Y = 16 908     | Y = 21 420     |
| 343FP/06     | X = 10 863     | X = 8 895      | X = 17 166     |
|              | Y = 8 340      | Y = 9 453      | Y = 15 621     |
| 346FP/06     | X = 115        | X = 9 792      | X = 13 770     |
|              | Y = 4 610      | Y = 10 863     | Y = 13 670     |
| 359FP/06     | X = 12 981     | X = 6 888      | X = 9 543      |
|              | Y = 7 380      | Y = 10 103     | Y = 9 609      |
| 362FP/06     | X = 10 944     | X = 14 637     | X = 13 944     |
|              | Y = 8 148      | Y = 11 289     | Y = 13 239     |

**Tabulka 8:** Průměrné množství naměřené fetální DNA u mužů (podíl AMELX/AMELY) ve sledovaných frakcích a zjištěná směrodatná odchylka.

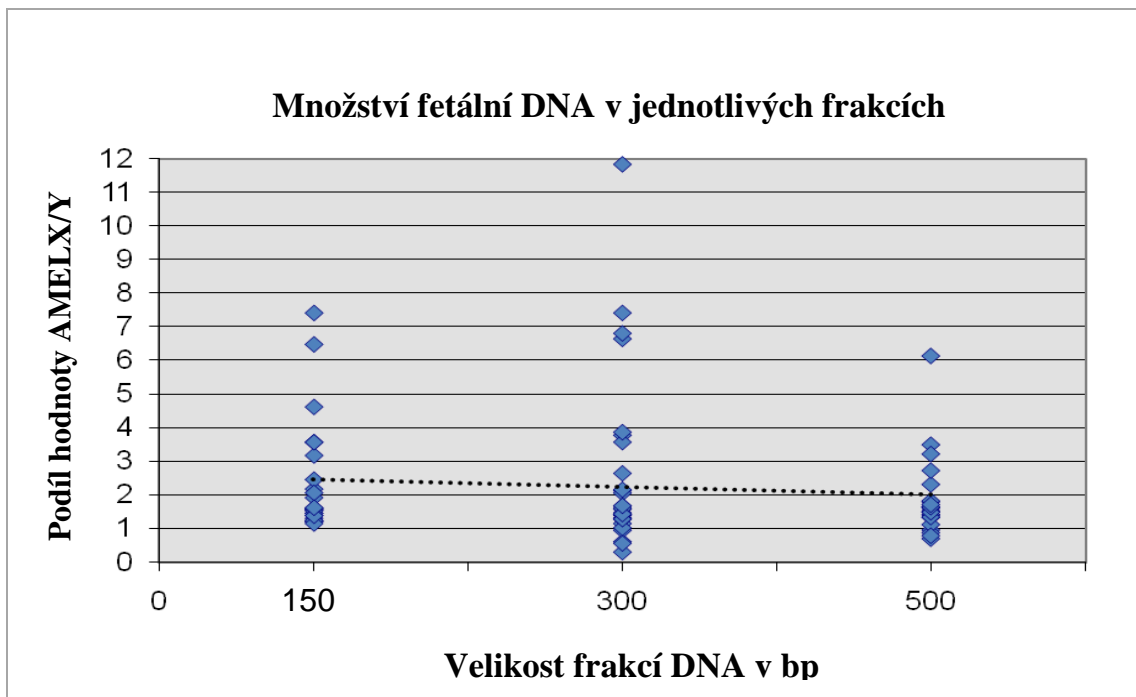
| funkce              | frakce 150-300 | frakce 300-500 | frakce 500-760 |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|
| Průměr              | 0,963          | 0,956          | 1,023          |
| Směrodatná odchylka | 0,564          | 0,207          | 0,054          |

**Graf 4:** Množství mužské DNA změřené kapilární elektroforézou v jednotlivých velikostních frakcích. Množství DNA je uvedeno, jako poměr AMELX/AMELY.



Následující grafy zobrazují vztah mezi týdnem gravidity a množstvím fetální DNA v krevní plazmě těhotných žen.

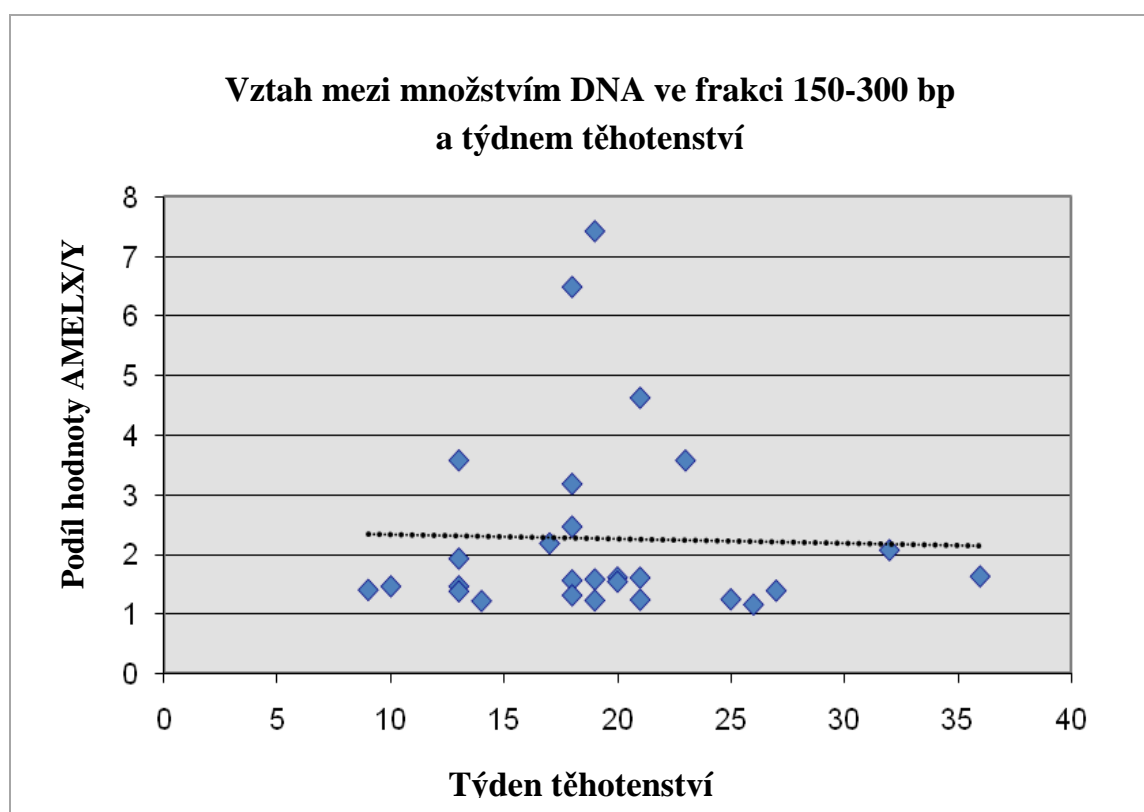
**Graf 5:** Množství fetální DNA změřené kapilární elektroforézou v jednotlivých velikostních frakcích. Množství DNA je uvedeno, jako poměr AMELX/AMELY.



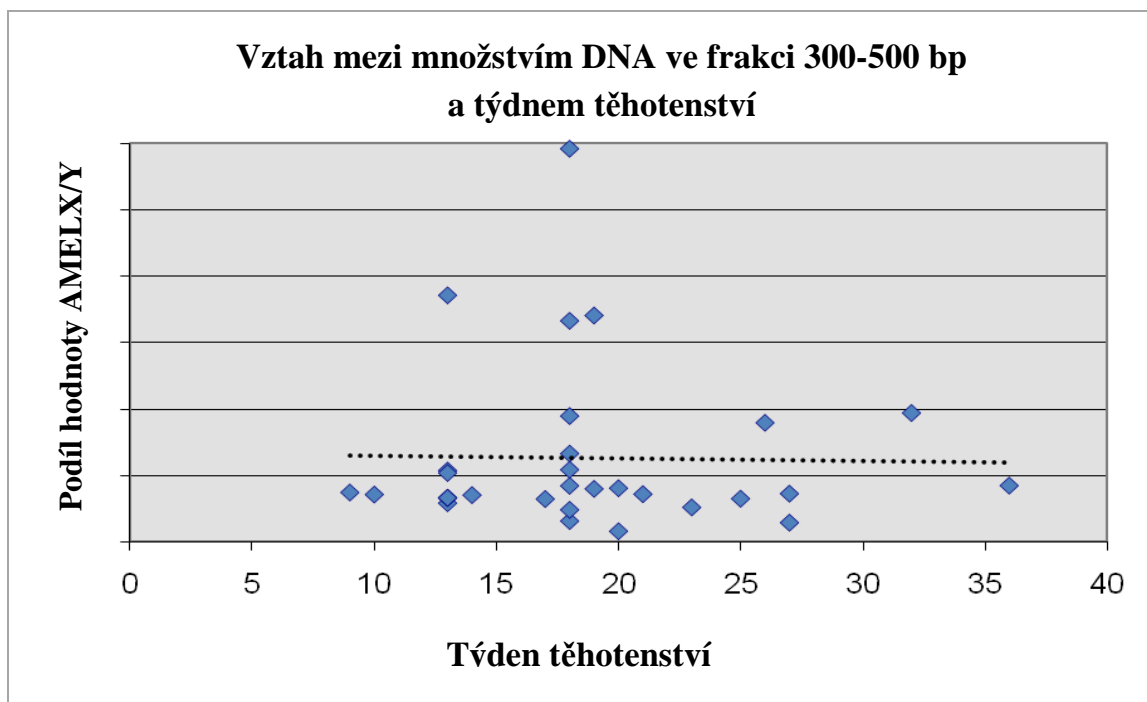
**Tabulka 9:** Průměrné množství naměřené fetální DNA (podíl AMELX/AMELY) ve sledovaných frakcích a zjištěná směrodatná odchylka.

| funkce              | frakce 150- 300 | frakce 300-500 | frakce 500-760 |
|---------------------|-----------------|----------------|----------------|
| Průměr              | 2,313           | 2,550          | 1,847          |
| Směrodatná odchylka | 1,629           | 2,527          | 1,144          |

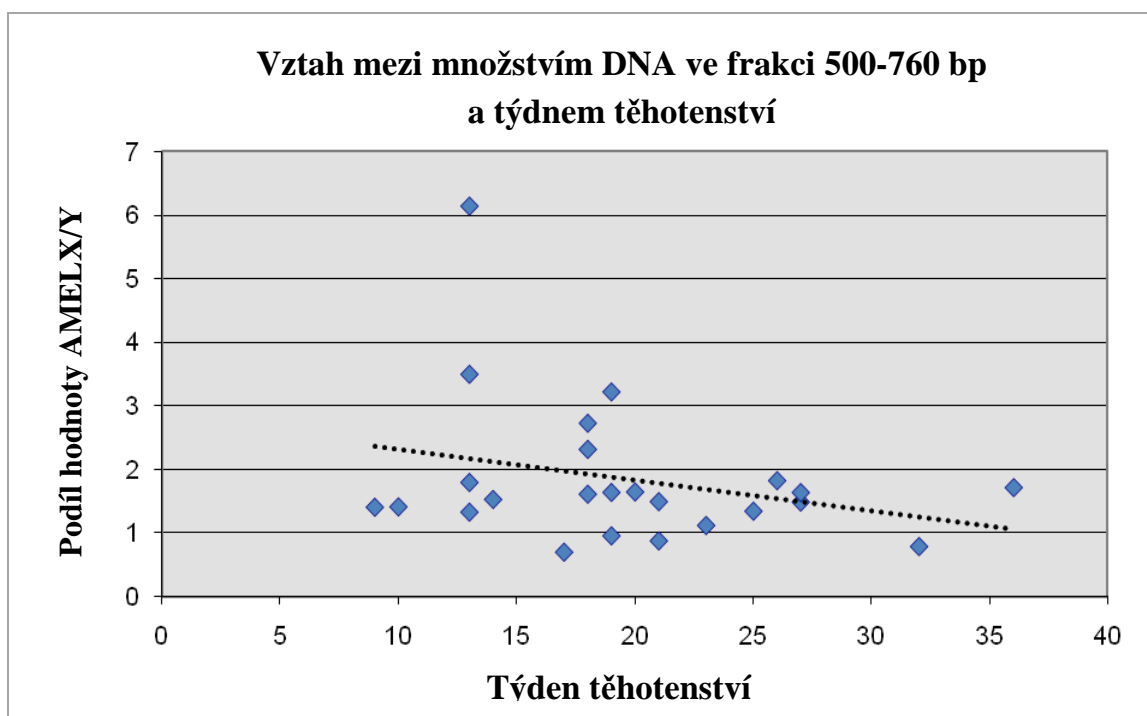
**Graf 6:** Množství fetální DNA změřené kapilární elektroforézou ve frakci o velikosti 150-300 bp. Množství DNA je uvedeno jako poměr AMELX/AMELY.



**Graf 7:** Množství fetální DNA změřené kapilární elektroforézou ve frakci o velikosti 300-500 bp. Množství DNA je uvedeno jako poměr AMELX/AMELY.

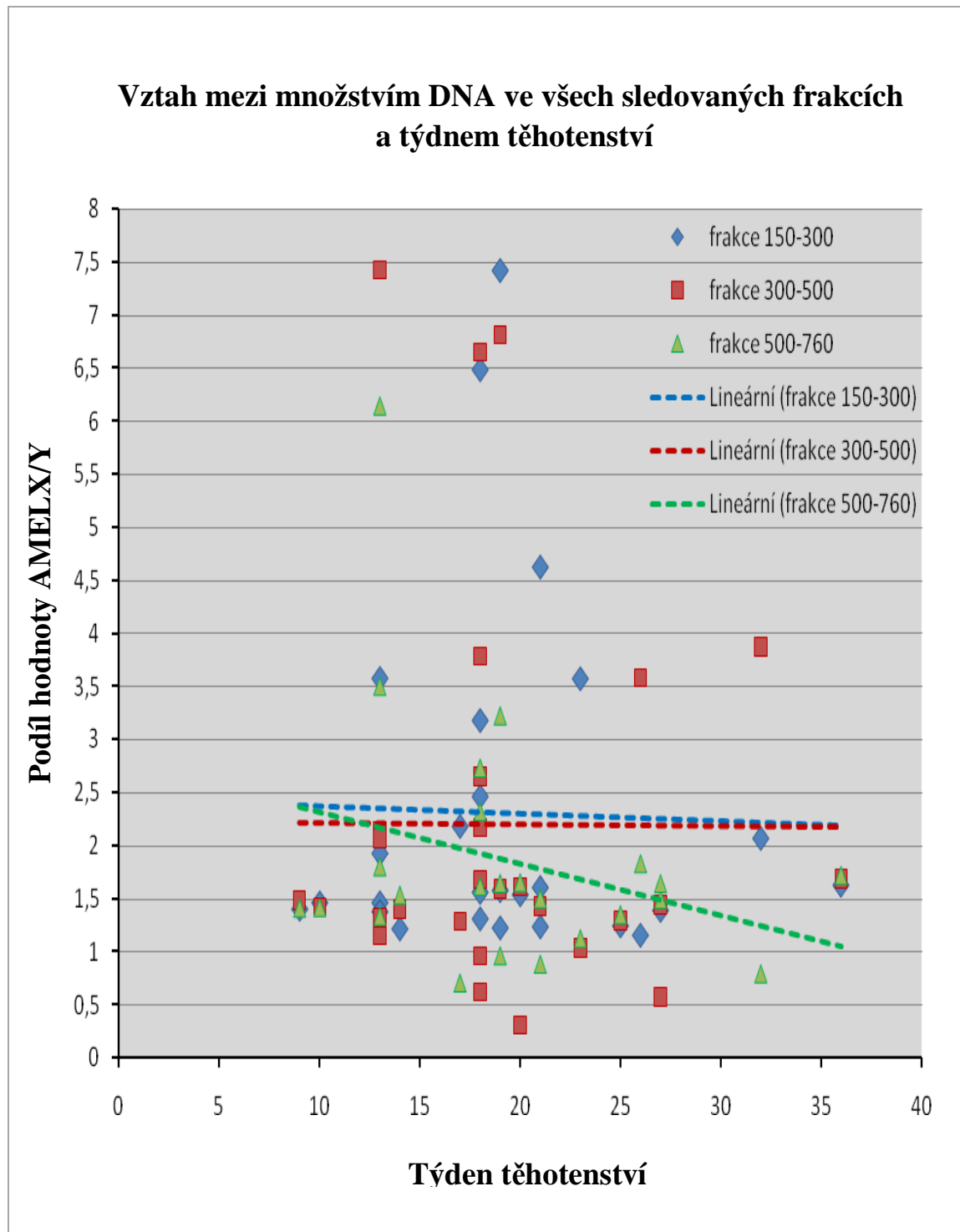


**Graf 8:** Množství fetální DNA změřené kapilární elektroforézou ve frakci o velikosti 500-760 bp. Množství DNA je uvedeno jako poměr AMELX/AMELY.





**Graf 9:** Množství fetální DNA změřené kapilární elektroforézou ve všech sledovaných velikostních frakcích. Množství DNA je uvedeno, jako poměr AMELX/AMELY.



## 5.6 Kvantifikace vybraných vzorků pomocí real-time PCR

Pomocí Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification kitu (Applied Biosystems) jsme měřili množství DNA plodu mužského pohlaví izolované z mateřské plazmy. Měření bylo stanoveno na základě TaqMan technologie (real-time PCR) srovnáním vnitřního standardu – sonda značená fluoroforem JOE a sondou, která specificky rozpoznává sekvenci genu SRY, označenou fluoroforem FAM.

Vzorky analyzované touto metodou a zjištěné hodnoty diferencí jsou uvedeny v tabulce 7. Graf 10 ukazuje množství fetální DNA změřené real-time PCR v jednotlivých velikostních frakcích. Grafy 11, 12 a 13 ukazují množství DNA ve velikostních frakcích ve vztahu k týdnu těhotenství a graf 14 zobrazuje množství fetální DNA v jednotlivých frakcích a množství celkové DNA izolované z krevní plazmy.

**Tabulka 10:** Množství fetální DNA, data získaná real-time PCR analýzou.

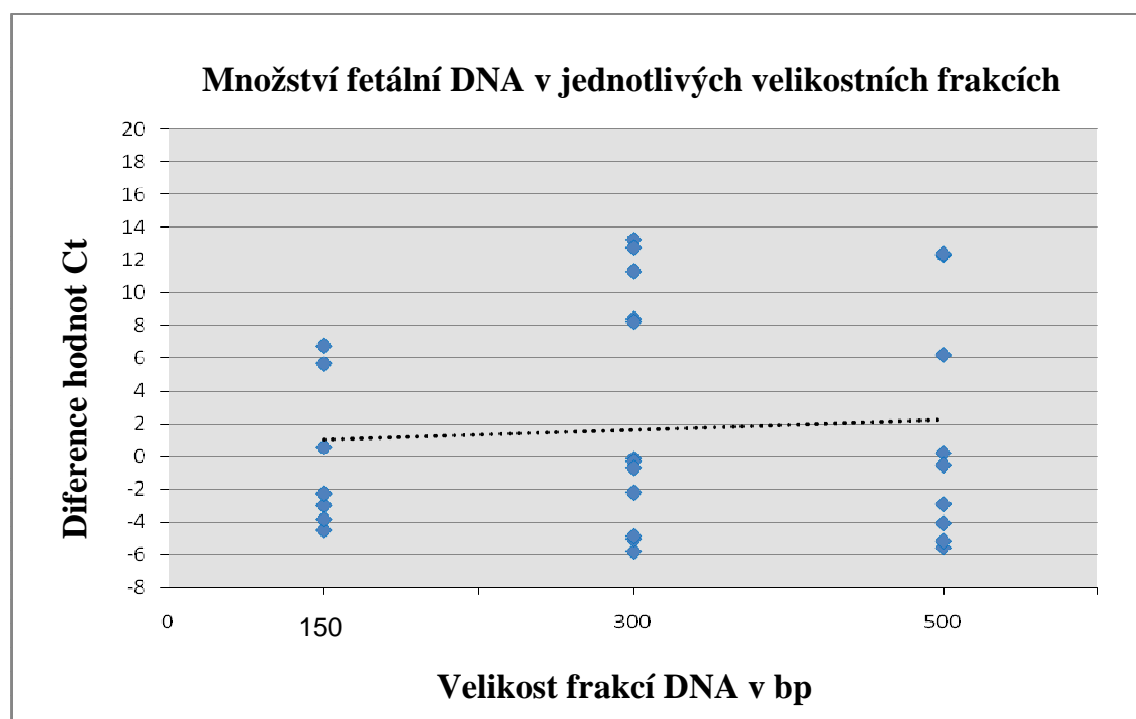
| Evidenční č. pacienta | Diference Ct ve frakci 150-300 bp | Diference Ct ve frakci 300-500 bp | Diference Ct ve frakci 500-760 bp | Diference Ct v celkové plazmě | Týden těhotenství |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| 1FP/03                | 5,66                              | ----                              | ----                              | 7,06                          | 20                |
| 17FP/03               | ----                              | 13,2                              | ----                              | 9,91                          | 18                |
| 35FP/04               | ----                              | ----                              | ----                              | 18,39                         | 19                |
| 15FP/04               | ----                              | ----                              | ----                              | 8,89                          | 12                |
| 195FP/04              | ----                              | ----                              | ----                              | 7,33                          | 18                |
| 7FP/05                | ----                              | ----                              | ----                              | 6,73                          | 18                |
| 43FP/05               | ----                              | ----                              | ----                              | 7,02                          | 20                |
| 49FP/05               | ----                              | ----                              | 12,77                             | 5,81                          | 19                |
| 53FP/05               | ----                              | ----                              | 12,35                             | 9,11                          | 18                |
| 75FP/05               | ----                              | ----                              | 6,19                              | 5,7                           | 36                |
| 165FP/05              | -2,98                             | -2,2                              | -2,9                              | 9,05                          | 9                 |
| 18FP/04               | ----                              | ----                              | ----                              | 8,44                          | 32                |
| 86FP/05               | ----                              | -0,13                             | 0,21                              | 9,05                          | 13                |
| 126FP/05              | -2,26                             | -0,3                              | -0,52                             | 4,88                          | 25                |
| 30FP/05               | 6,74                              | 8,21                              | ----                              | 10,54                         | 26                |
| 132FP/05              | 0,57                              | -0,69                             | ----                              | 8,78                          | 21                |
| 108FP/05              | -4,49                             | -5,02                             | -4,06                             | 6,01                          | 10                |
| 185FP/05              | -3,82                             | -4,85                             | -5,15                             | 6,89                          | 27                |
| 148FP/05              | ----                              | -5,8                              | ----                              | ----                          | 14                |
| 95FP/04               | ----                              | 11,27                             | ----                              | ----                          | 18                |
| 140FP/04              | ----                              | 12,73                             | ----                              | ----                          | 17                |
| 150FP/04              | ----                              | 8,37                              | ----                              | ----                          | 12                |

**Tabulka 11:** Průměrné množství naměřené fetální DNA (podíl AMELX/AMELY) ve sledovaných frakcích a v celkové plazmě a zjištěná směrodatná odchylka.

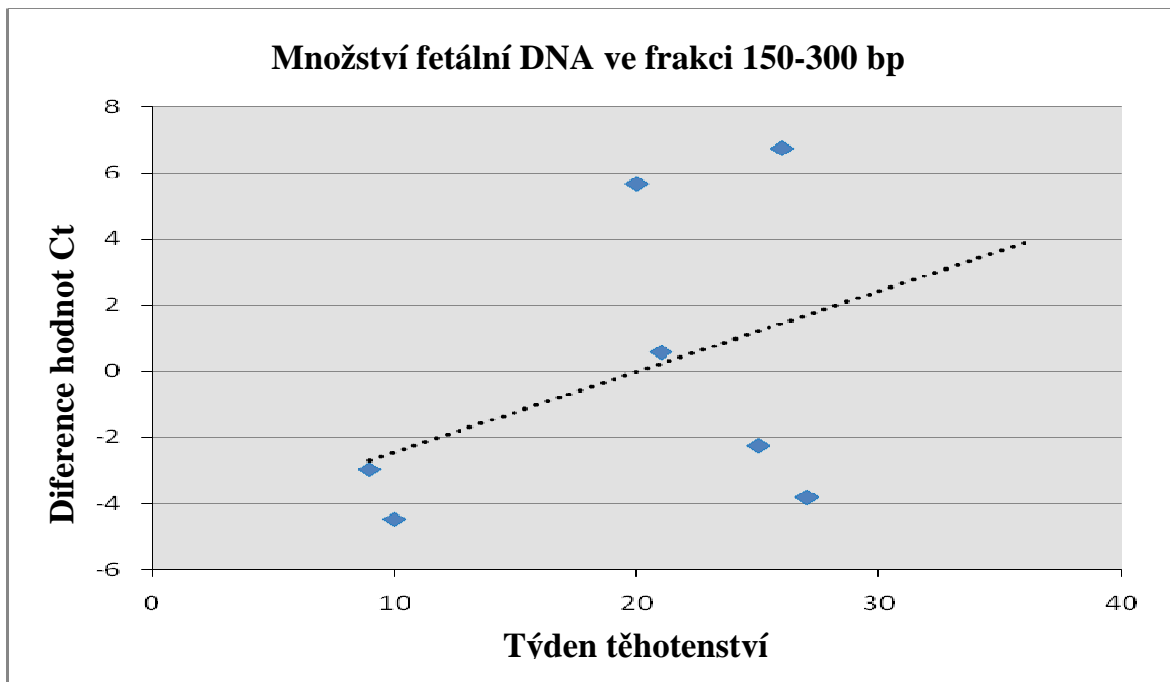
| funkce              | frakce 150-300 | frakce 300-500 | frakce 500-760 | celková plazma |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Průměr              | 1,963          | 2,361          | 7,539          | 19,706         |
| Směrodatná odchylka | 4,591          | 7,309          | 7,182          | 2,973          |

Real-time PCR analýza celkové fetální DNA izolované z krevní plazmy gravidních žen, byla podle získaných údajů (tabulka 7) účinná v 82 %. Při měření množství DNA v jednotlivých velikostních frakcích byla účinnost metody 72 %. Z níže uvedených grafů je možno vyvodit, že ve frakci obsahující DNA fragmenty o velikosti v rozmezí 500–760 bp je množství fetálních nukleových kyselin o něco menší než v ostatních dvou frakcích. Když srovnáme množství DNA v jednotlivých frakcích s celkovou DNA podle grafu 14, zjistíme, že celková DNA také obsahuje méně fetálních nukleových kyselin. Graf 15 ukazuje vztah týdne těhotenství a množství DNA z celkové plazmy. Graf 16 zobrazuje vztah mezi týdnem těhotenství a množstvím DNA ve všech sledovaných frakcích.

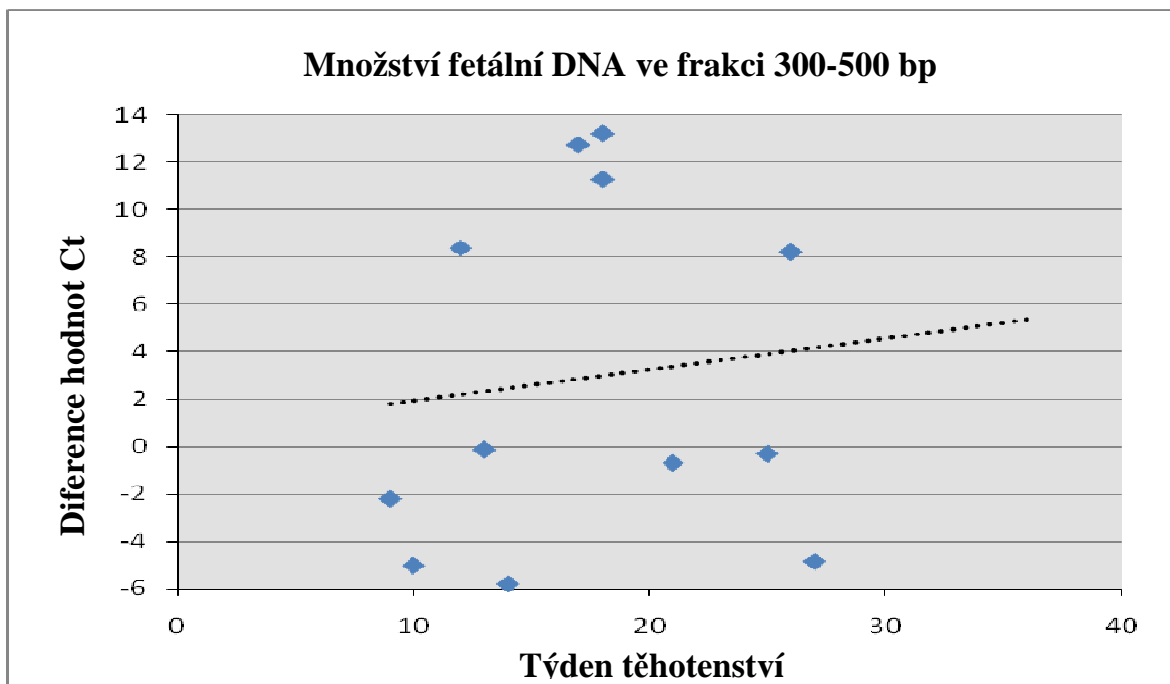
**Graf 10:** Množství fetální DNA změřené real-time PCR v jednotlivých velikostních frakcích. Množství DNA je vztaženo k rozdílu Ct hodnot (Ct(FAM)-Ct(JOE)).



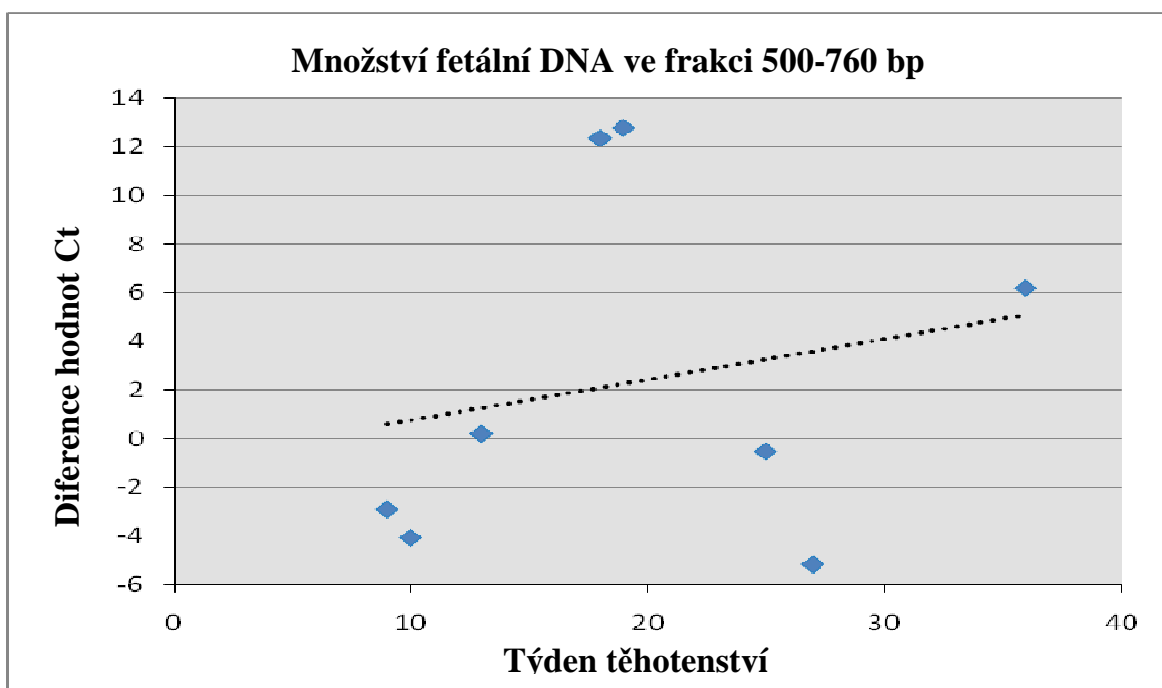
**Graf 11:** Množství fetální DNA změřené pomocí real-time PCR ve frakci o velikosti 150-300 bp. Množství DNA je vztaženo k rozdílu Ct hodnot ( $Ct(FAM) - Ct(JOE)$ ).



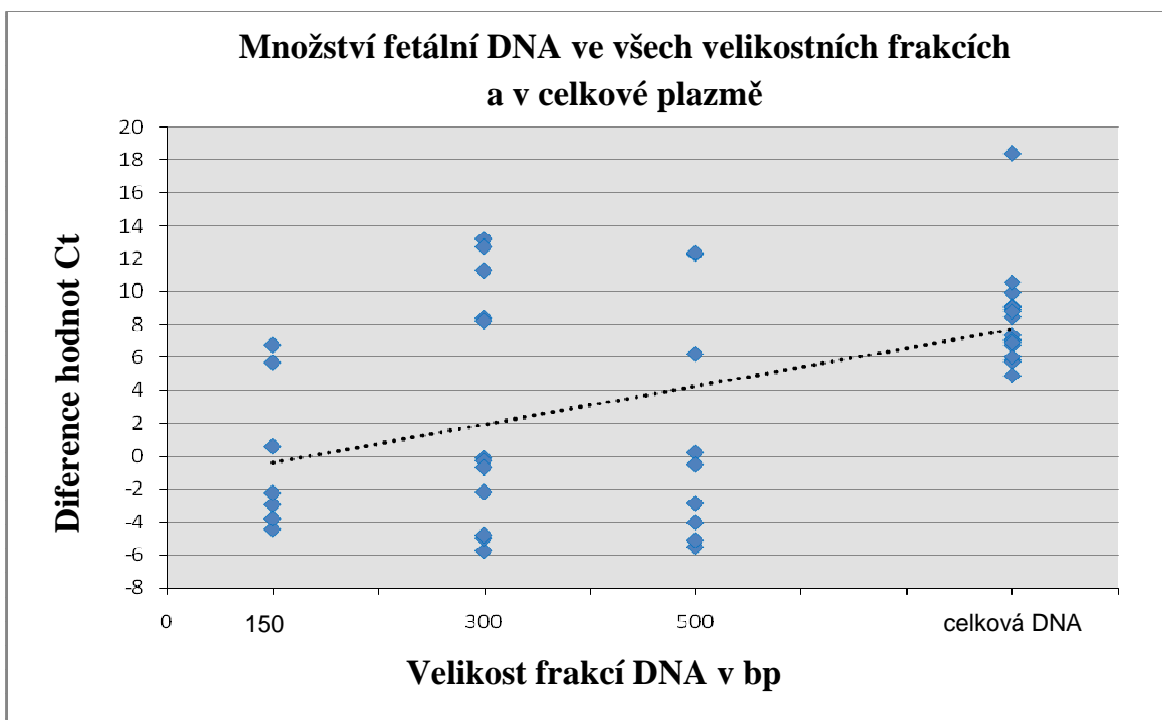
**Graf 12:** Množství fetální DNA změřené pomocí real-time PCR ve frakci o velikosti 300-500 bp. Množství DNA je vztaženo k rozdílu Ct hodnot ( $Ct(FAM) - Ct(JOE)$ ).



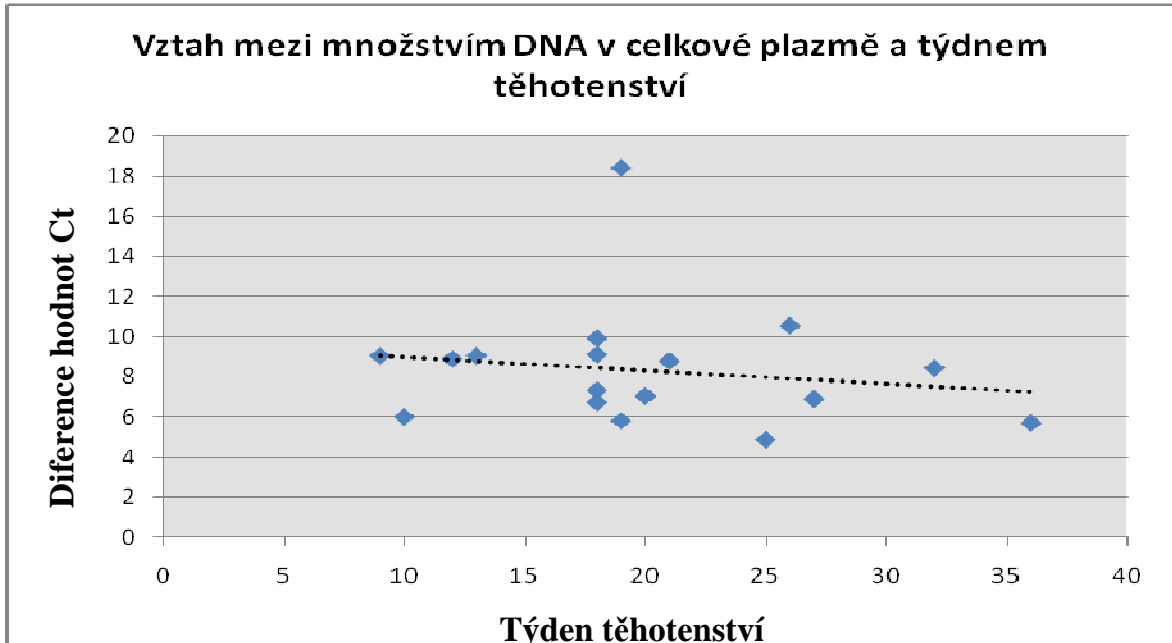
**Graf 13:** Množství fetální DNA změřené pomocí real-time PCR ve frakci o velikosti 300-500 bp. Množství DNA je vztaženo k rozdílu Ct hodnot (Ct(FAM)-Ct(JOE)).



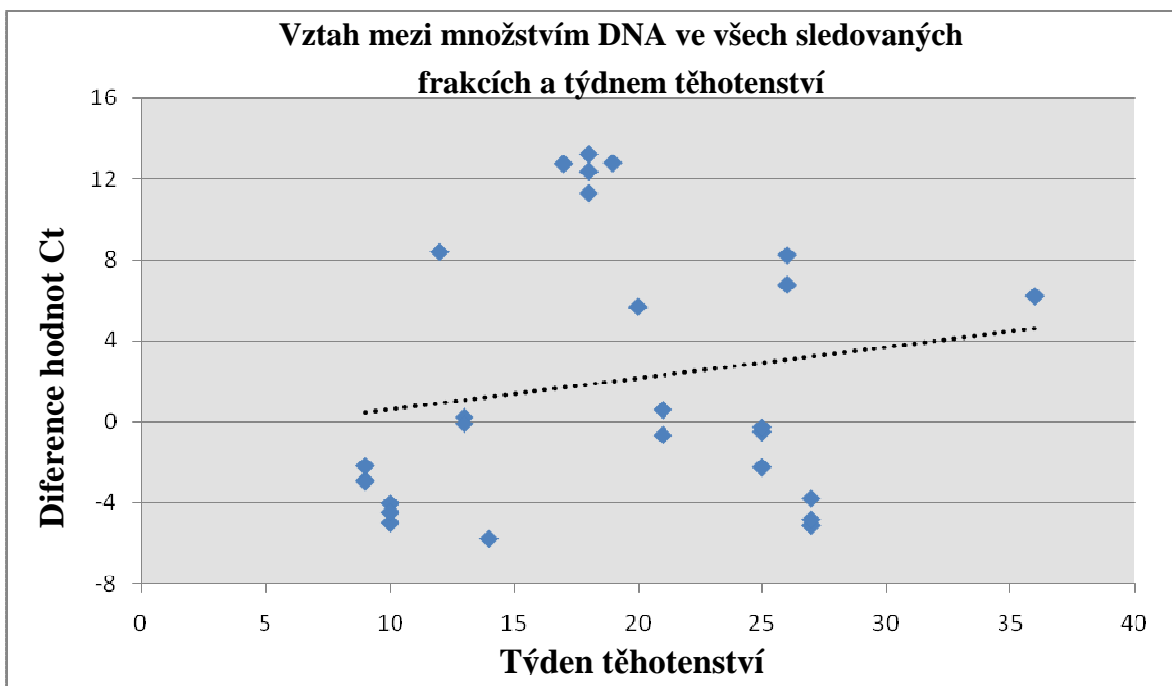
**Graf 14:** Množství fetální DNA změřené pomocí real-time PCR ve všech velikostních frakcích a v celkové plazmě. Množství DNA je vztaženo k rozdílu Ct hodnot (Ct(FAM)-Ct(JOE)).



**Graf 15:** Vztah mezi množstvím DNA změřeným pomocí real-time PCR v celkové plazmě a týdnem těhotenství. Množství DNA je vztaženo k rozdílu Ct hodnot (Ct(FAM)-Ct(JOE)).



**Graf 16:** Vztah mezi množstvím DNA změřeným pomocí real-time PCR ve všech sledovaných frakcích a týdnem těhotenství. Množství DNA je vztaženo k rozdílu Ct hodnot (Ct(FAM)-Ct(JOE)).



## 6 Diskuze

### 6.1 Izolace frakcí fetální DNA z gelu

Pro izolaci DNA z krevní plazmy jsme použili kit QiaAmp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (Qiagene) a po rozdělení izolované DNA pomocí gelové elektroforézy jsme testovali dva různé postupy izolace DNA fragmentů z gelu. Použili jsme kity: QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagene) a GenElute Agarose Spin Columns od SIGMY. Výsledky obou zmiňovaných postupů byly srovnatelné, ale extrakce pomocí GenElute Gel Extraction Kit od SIGMY byla technicky méně náročná, proto byl tento postup vybrán.

Fetální DNA nebyla ve vzorcích pomocí kapilární elektroforézy vždy prokázána. Může to být způsobeno nedostatečnou koncentrací DNA izolované z plazmy. Při zvýšení množství vzorku izolované DNA vpravené do jamek gelu by mohla být izolace DNA z gelu účinnější.

Pro izolaci byly vybrány fragmenty v rozmezí velikostí od 150 bp po 760 bp, toto rozmezí bylo rozděleno na tři části. První frakce obsahovala fragmenty velikosti 150-300 bp, druhá 300-500 bp a třetí frakce 500-700 bp. Podle publikovaných prací je podíl fetální DNA největší ve frakcích velikosti 150 bp až 500 bp. Fragmenty nad 1 kb jsou již ve valné většině mateřského původu (Li *et al*, 2004; Zhong *et al*, 2000).

### 6.2 Analýza fetální DNA kapilární elektroforézou

Kapilární elektroforéza je velmi citlivá metoda, detekční limit koncentrace DNA určený Zhangem *et al* (2004) je 0,5 ng/ml. Vodička *et al* uvádí (2008), že tato metodika je schopná rozlišit už 1% příměs Y-chromozomálních sekvencí. Účinnost metody v našem provedení byla 40,6 %. Vodička *et al* ve své práci vykazuje 92,85% detekovatelnost v případech zachycení AMELY. Nižší účinnost mohla být v našem případě způsobena nízkou koncentrací fetální DNA v plazmě a jednotlivých frakcích. Ke zvýšení účinnosti metody by mohlo přispět izolovávání DNA z většího množství plazmy a takto získanou DNA více koncentrovat a aplikovat do jamek v gelu větší množství.

Hodnoty fetální DNA izolované z krevní plazmy těhotných žen, které byly naměřeny kapilární elektroforézou, měly velký rozptyl narozdíl od hodnot DNA naměřených u mužů. Y-specifické sekvence izolované z krevní plazmy mužů měly největší směrodatnou odchylku ve frakci 150–300 bp a to 0,564. Směrodatná odchylka zjištěná u hodnot DNA z krevní plazmy gravidních žen (frakce 300–500 bp) byla téměř 4,5krát větší než u mužů. Tyto výsledky však mohou být způsobeny značnou heterogenitou vzorků a jejich nestejným rozptřením v jednotlivých týdnech těhotenství a také samotnou analýzou, při které v některých analyzovaných frakcích nebyla DNA vůbec zachycena.

Navzájem se množství Y-specifické DNA v jednotlivých velikostních frakcích výrazně neliší u vzorků izolovaných z krevní plazmy těhotných žen, ani u vzorků izolovaných z krevní plazmy mužů. Jen ve frakci 500–760 bp je množství této DNA u mužů nepatrně nižší.

Detekce fetální DNA byla úspěšná až od devátého týdne těhotenství. Podle grafů 6, 7 a 8 se množství fetální DNA v krevní plazmě gravidních žen s postupujícím těhotenstvím mírně zvyšuje. Wataganara spolu s kolegy (2004) došli ke stejným závěrům, totiž že se fetální DNA v krevní plazmě gravidních žen s týdnem těhotenství zvyšuje. Určili také, že zvýšení je přibližně o 4,2 ekvivalenty genomu týdně. Fetální DNA detekovali již v 32. dnu těhotenství, avšak pomocí real-time PCR a DYS1 sekvence.

### **6.3 Analýza fetální DNA real-time PCR**

Nejčastěji používaným postupem při analýze fetálních DNA fragmentů je v současné době real-time PCR (Alberry *et al*, 2009; Ariga *et al*, 2001; Lo *et al*, 1998; a další). Detekční limit této metody byl popsán Hondou *et al* (2002), který jej stanovil na 5,38 kopií/ml. My jsme pomocí real-time PCR kvantifikovali SRY gen plodu.

Data získaná touto metodou měla značný rozptyl, ve frakci o velikosti 300-500 bp byla zjištěna směrodatná odchylka dokonce 7,31. Množství fetální DNA naměřená touto hodnotou byla ve sledovaných frakcích přibližně stejná, jen ve frakci 500-760 bp byly hodnoty o něco nižší. Podle grafů 11, 12, 13 a 16 množství fetální DNA s postupujícím týdnem těhotenství mírně klesá. Tyto výsledky mohou být způsobeny malým množstvím



testovaných vzorků, jejich značnou heterogenitou a nedostatečným pokrytím všech týdnů těhotenství.

Při sledování vztahu DNA z celkové plazmy a týdne těhotenství, množství fetální DNA s přibývajícím týdnem opět roste (graf 15). Naším závěrem je, že výsledky získané pomocí real-time PCR, nemají dostatečnou vypovídací hodnotu kvůli nízkému množství analyzovaných vzorků, a že hodnoty získané touto metodou nekorelují s týdnem těhotenství. K podobným závěrům došly také některé publikované práce (Bauer *et al*, 2006), jiné studie ale přichází s přesně opačnými závěry (Lo *et al*, 1998).

## **6.4 Srovnání real-time PCR a kapilární elektroforézy**

Fetální DNA lze analyzovat kapilární elektroforézou a také pomocí real-time PCR. Žádná z metod neprokázala jistě vztah mezi týdnem těhotenství a množstvím volné fetální DNA v krevní plazmě. Pomocí obou těchto metod byla fetální DNA detekována ve všech sledovaných frakcích. Obě kvantitativní analýzy vzorků našeho souboru vykazovaly velkou heterogenitu a variabilitu, která je v souladu s publikovanými pracemi (Farina *et al*, 2002).

## 7 Závěr

Objevení volné fetální DNA v krevní plazmě těhotných žen ukázalo novou cestu k neinvazivní prenatalní diagnostice. Fetální DNA se v mateřské plazmě vyskytuje ve formě fragmentů různé délky. Optimalizace izolace a kvantifikace těchto fragmentů je pro prenatalní diagnostiku zásadní, protože zvládnutí této metodiky by mohlo významně přispět k ústupu od invazivních metod vyšetření plodu (Hahn *et al*, 2002).

Volná fetální DNA byla z krevní plazmy izolovaná pomocí QiaAmp® DNA Blood Mini Kitu (Qiagene). Po rozdělení molekul DNA na gelové elektroforéze podle velikosti byl pro izolaci fetální DNA z gelu vybrán kit GenElute Agarose Spin Columns od SIGMY.

Analýzu fragmentů fetální DNA jsme provedli pomocí kapilární elektroforézy a pro porovnání také pomocí real-time PCR. Obě metody vykazovaly vysoký rozptyl naměřených dat a žádná z nich s jistotou neprokázala, že množství DNA koreluje s týdnem těhotenství.

Celkem bylo z 96 izolovaných vzorků posuzováno 39 plazmatických DNA od gravidních žen očekávajících potomka mužského pohlaví. Pohlaví bylo ověřeno pomocí: 1. detekce gonozomů z plodové vody nebo choriových klků, 2. kontrolním ultrazvukovým vyšetřením, 3. telefonickým dotazem po porodu.

Kapilární elektroforéza detekovala fetální DNA izolovanou z jednotlivých velikostních frakcí ve 40,6 %. Real-time PCR analýza v 72 %, avšak s mnohem větším rozptylem naměřených hodnot.

Kapilární elektroforéza je pro analýzu fetální DNA vhodná, neboť může rozlišit pohlaví plodu a současně kvantifikovat STR lokusy. Ke zvýšení účinnosti kvantifikace by mohlo přispět izolování DNA z většího množství plazmy (alespoň 15 ml) a takto získanou DNA více koncentrovat a aplikovat do jamek v gelu větší množství (více než 30  $\mu$ l).

Minimalizace jakékoliv kontaminace je dalším významným bodem zkvalitnění analýzy volné fetální DNA. V naší práci jsme jednotlivé kroky (izolace DNA z plazmy, gelová elektroforéza, PCR) prováděli v oddělených laboratořích. Pro zabezpečení spolehlivé izolace lze použít například některé z automatických přístrojů.

## 8 Citovaná literatura

1. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007 May; 27(5): 415-8.
2. Alberry MS, Maddocks DG, Hadi MA, Metawi H, Hunt LP, Abdel-Fattah SA, Avent ND, Soothill PW. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and pregnancies with placental dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* 2009 Jan; 200(1): 98.e1-6.
3. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000 Feb; 46(2): 301-2.
4. Antonatos D, Patsilidakos S, Spanodimos S, Korkonikitas P, Tsigas D. Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 278-81.
5. Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion Med* 2001 Dec; 41: 1524-1530(7).
6. Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, LeShane E, Johnson KL, Peter I, Bianchi DW, Pertl B. A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 2006; 26: 831-36.
7. Bianchi DW, LeShane ES, Cowan JM. Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid. *Clin Chem* 2001 Oct; 47(10): 1867-9.

8. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997 Oct; 61(4): 822-9.
9. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 January 23; 93(2): 705-8.
10. Bianchi DW. Fetomaternal cell traffic, pregnancy-associated progenitor cells, and autoimmune disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2004 Dec; 18(6): 959-75.
11. Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, 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: 312-20.
12. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005 Jan-Feb; 11(1): 59-67.
13. Farina A, Caramelli E, Concu M, Sekizawa A, Ruggeri R, Bovicelli L, Rizzo N, Carinci P. 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* 2002; 22(2): 148-52.
14. Ganshirt D, Garritsen H, Miny P, Holzgreve W. Fetal cells in maternal circulation throughout gestation (letter; comment). *Lancet* 1994; 343:1038-9.
15. González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, Lorda-Sánchez I, Díaz-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: 946-8.

16. Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Ramos C. Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent-PCR. *Neurology* 2003; 60: 1214-5.
17. Hahn S, Holzgreve W. Prenatal diagnosis using fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: what is currently feasible? *Clin Obstet Gynecol* 2002 Sep; 45(3): 649-56.
18. Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000 Nov 1; 260(2): 248-56.
19. Hansen KK, Ricksten A, Hofmann B, Norrild B, Olofsson S, Mathiesen L. Detection of cytomegalovirus DNA in serum correlates with clinical cytomegalovirus retinitis in AIDS. *J Infect Dis* 1994 Nov; 170(5): 1271-4.
20. 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 Jan; 110(1): 75-9.
21. Hristoskova S, Holzgreve W, Hahn S. More than one-half of the erythroblasts in the fetal circulation and cord blood are TUNEL positive. *Clin Chem.* 2001 Oct; 47(10): 1870-1.
22. Hromadnikova I, Zejskova L, Doucha J, Cohl D. Quantification of fetal and total circulatory DNA in maternal plasma samples before and after size fractionation by agarose gel electrophoresis. *DNA Cell Biol* 2006 Nov; 25(11): 635-40.
23. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW and Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004; 50: 88–92.

24. 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.
25. Ingargiola I, Vaerman J, Debieve1 F, Palgen G, Verellen-Dumoulin C, Hubinont C. Free fetal DNA concentration in maternal plasma during normal labour at term. *Prenat Diagn* 2003; 23: 1077–82.
26. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantification and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659–65.
27. Kimura M, Sato C, Hara M, Ishihara O, Ikebuchi K. Noninvasive fetal RHD genotyping by maternal plasma with capillary electrophoresis. *Transfusion* 2008 Jun; 48(6): 1156-63.
28. Koide K, Sekizawa A, Iwasaki M, Matsuoka R, Honma S, Farina A, Saito H, Okai T. Fragmentation of cell-free fetal DNA in plasma and urine of pregnant women. *Prenat Diagn* 2005; 25: 604–7.
29. Lapaire O, Bianchi DW, Peter I, O'Brien B, Stroh H, Cowan JM, Tantravahi U, Johnson KL. Cell-free fetal DNA in amniotic fluid: unique fragmentation signatures in euploid and aneuploid fetuses. *Clin Chem* 2007 Mar; 53(3): 405-11.
30. 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* 2002 Dec; 48(12): 2141-6.
31. Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA. Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol* 1977; 4(2):139-43.
32. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37: 646–650, 1977.

33. Leung T, Zhang J, Lau T. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clin Chem* 2001; 47: 137–39.
34. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 12: 1904–1905.
35. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of Circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 2004; 50(6): 1002-11.
36. Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001 Sep; 945: 239-49.
37. Lim TH, Tan AS, Goh VH. Relationship between gestational age and frequency of fetal trophoblasts and nucleated erythrocytes in maternal peripheral blood. *Prenat Diagn.* 2001 Jan; 21(1):14-21.
38. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485-87.
39. 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* 1999b Oct; 45(10): 1747-51.
40. 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* 1999a Feb; 45(2): 184-8.
41. Lo YM, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768–77.

42. 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: 218–24.
43. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme. *C R Acad Sci Paris* 1948; 142: 241–3.
44. Medearis AL, Hensleigh PA, Parks DR, Herzenberg LA. Detection of fetal erythrocytes in maternal blood post partum with the fluorescence activated cell sorter. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 290-95.
45. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YM. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Apr 15; 100(8): 4748-53.
46. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies. *Hum Genet* 2001; 108: 123–7.
47. Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* 2000; 106(1): 45-9.
48. Rainer TH, Lam NYL. Circulating nucleic acids and critical illness. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 271–77.
49. Rudin CM and Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 1997; 48: 267–81.
50. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000 Sep 30; 356(9236): 1170.



51. Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H, Okai T. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem*. 2001 Oct; 47(10): 1856-8.
52. Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Farina A, Bianchi DW. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn* 2000; 20(11): 886 - 889.
53. Sekizawa A, Yokokawa K, Sugito Y, Iwasaki M, Yukimoto Y, Ichizuka K, Saito H, Okai T. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta. *Hum Genet*. 2003 Sep; 113(4): 307-10.
54. Schröder J. Transplacental passage of blood cells. *J Med Genet*. 1975 Sep; 12(3): 230-42.
55. 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 Sep; 945: 132-7.
56. Spencer K, de Kok JB, Swinkels DW. Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21. *Prenat Diagn* 2003; 23: 580-3.
57. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 139-42.
58. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993; 15: 636-41.
59. Swinkels DW, de Kok JB, Hendriks JC, Wiegerinck E, Zusterzeel PL, Steegers EA. Hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count (HELLP) syndrome as a complication of preeclampsia in pregnant women increases the

- amount of cell-free fetal and maternal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem* 2002; 48: 650–3.
60. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1966 Nov; 45(11): 1732-40.
61. Tang NL, Leung TN, Zhang J, Lau TK, Lo YM. Detection of fetal-derived paternally inherited X-chromosome polymorphisms in maternal plasma. *Clin Chem* 1999 Nov; 45(11): 2033-5.
62. Tong YK, Lo YM. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta* 2006; 363: 187–96.
63. Van Wijk IJ, de Hoon AC, Jurhawan R, Tjoa ML, Griffioen S, Mulders MA, van Vugt JM, Oudejans CB. Detection of apoptotic fetal cells in plasma of pregnant women. *Clin Chem* 2000; 46: 729-31.
64. Vodicka R, Vrtel R, Dusek L, Prochazka M, Schneiderova E, Vrbicka D, Krejcirikova E, Dhaifalah I, Santava A, Santavy J. Refined fluorescent STR quantification of cell-free fetal DNA during pregnancy in physiological and Down syndrome fetuses. *Prenat Diagn* 2008 May; 28(5): 425-33.
65. Vodička R, Vrtěl R, Schneiderová E, Vrbická D, Procházka M, Dhaifalah I, Šantavá A, Šantavý J. Neinvazivní detekce gonozomálních DNA sekvencí v plazmě gravidních žen s využitím kapilární elektroforézy. *Čes Gynek* 2008; 73(3): 150-3.
66. Wataganara T, Bianchi DW. Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation: new clinical applications. *Ann N Y Acad Sci* 2004 Jun; 1022: 90-9.
67. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, Johnson KL. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril*. 2004 Mar; 81(3): 638-44.

68. Wataganara T, LeShane ES, Chen AY, Borgatta L, Peter I, Johnson KL, Bianchi DW. Plasma gamma-globin gene expression suggests that fetal hematopoietic cells contribute to the pool of circulating cell-free fetal nucleic acids during pregnancy. *Clin Chem* 2004 Apr; 50(4): 689-93.
69. Wei C, Saller DN, Sutherland JW. Detection and Quantification by Homogeneous PCR of Cell-free Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clin Chem* 2001 Feb; 47(2): 336-8.
70. Wen LT, Henneberger M, Nguyen N, McPherson RA. Quantitation of hepatitis B virus DNA in serum by ammonium sulfate precipitation and molecular hybridization. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 44-50.
71. Xiaoyan X, Hanping C. Fetal nucleated red blood cells in maternal peripheral blood and gestational age. *Int J Gynaecol Obstet* 2004 Nov; 87(2): 143-4.
72. Yi P, Chen Z, Zhao Y, Guo J, Fu H, Zhou Y, Yu L, Li L. PCR/LDR/capillary electrophoresis for detection of single-nucleotide differences between fetal and maternal DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2009 Mar; 29(3): 217-22.
73. Zhang P, Ren JC, Shen ZJ. A Novel Method for Quantification of Circulating DNA in Serum by Capillary Zone Electrophoresis. *Chin Chem Lett* 2004; 15(9): 1091-4.
74. 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; 20: 795-798.
75. Zimmermann G, Holzgreve W, Avent N, Hahn S. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 347-9.

## 9 Seznam použitých zkratek

AMC – amniocentéza

AMELX (AMX) – Lokus na chromozomu X kódující protein amelogenin (amelogenin, X-linked)

AMELY (AMY) – Lokus na chromozomu Y kódující protein amelogenin (amelogenin, Y-linked)

bp – base pair – pár bází

Ct – jednotka zastupující v real-time PCR difrenci hodnot fluorescencí sond FAM – JOE

CVS – vyšetření choriových klků

DNA – deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina

dUTP – 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (TUNEL test)

DYS – zkratka z: DNA Y-chromosome, Segment – polymorfní oblast na Y chromozómu

EDTA – ethylenediamine tetraacetic acid – kyselina ethylendiamintetraoctová

EtBr – ethidium bromid – ethidium bromid

GE – Genom Equialent – ekvivalent genomu, jednotka hodnocení množství fetální DNA (uváděna ve vztahu k 1 mililitru – GE/ml)

PCR – polymerase chain reaction - polymerázová řetězová reakce

RFU – relativní jednotka fluoresvence

RNA – ribonucleic acid – mediátorová ribonukleová kyselina

rpm – round per minute - otáček za minutu

SLE – systémový lupus erythrematosus

SRY – Region determinující pohlaví na chromozomu Y (sex-determining regions on the Y chromosome)

STR – Short Tandem Repeat – krátké tandemové repetice (polymorfní oblasti)

TdT – terminální deoxynukleotidyl-transferáza (TUNEL test)

TRIS – tris(hydroxymethyl)methylamine – tris(hydroxymethyl)aminomethan

TSPY – Protein specifický pro varlata, vázaný na Y (testis-specific protein, Y-encoded)

TUNEL – TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling – test na prokázání apoptózy