Trans 2 zlom 30.6.2006 17:11 Stránka 95
proLékaře.cz | 10.11.2026

Neinvazivní prenatální diagnostika z periferní krve matky je prováděna na fragmentované extracelulární fetální DNA o velikosti < 500 bp

Hromadníková I.[1], Žejšková L.[1], Doucha J.[2], Wagenknecht D.[1]
[1]Laboratoř buněčné biologie, Pediatrická klinika, [2]Gynekologicko-porodnická klinika, 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

Souhrn
Nejvýznamnějším zdrojem extracelulárních fetálních nukleových kyselin (DNA a RNA) pro účely neinvazivní prenatální diagnostiky jsou apoptotická tělíska trofoblastu. V této práci jsme se zaměřili na studium fragmentace extracelulární DNA přítomné v mateřské cirkulaci u 6 těhotných žen v 16. týdnu gravidity. Fragmentovaná extracelulární DNA byla separována podle délky jednotlivých fragmentů metodou gelové elektroforézy a v jednotlivých sekcích o molekulové hmotnosti 100–300 bp, 300–500 bp, 500–700 bp, 700–900bp, > 900 bp byla stanovena koncentrace fetální a celkové směsné DNA pomocí PCR v reálném čase s využitím specifických primerů a TaqMan sond pro *SRY* a *GLO* geny. Fetální DNA byla detekována pouze ve fragmentech o molekulové hmotnosti 100–300 bp a 300–500 bp. Největší koncentrace fetální DNA se vyskytovala v sekci o molekulové hmotnosti 100–300 bp, kde dosáhla hodnot 14,8 kopií/ml periferní krve matky (rozpětí 1,56–83,2). V sekci o molekulové hmotnosti 300–500 bp bylo detekováno menší množství fetální DNA o koncentracích 1,53 kopií/ml periferní krve matky (rozpětí 0–10,8). V sekcích o molekulové hmotnosti 500–700 bp, 700–900 bp a > 900 bp nebyla fetální DNA detekována. Fetální DNA byla ve frakci o molekulové hmotnosti 100–300 bp 4,8násobně zkoncentrována (rozpětí 0krát–16,6krát) ve srovnání s fetální DNA přítomnou v neseparované extracelulární DNA, která se po izolaci z mateřské plazmy používá pro detekci paternálních alel u plodu. Pokud se zaměříme na izolaci DNA o velikosti fragmentů 100–300 bp, získáme koncentrovanější ale nikoliv purifikovanou fetální DNA. Obsah fetální DNA v této frakci činil 1,15 % (rozpětí 0,16–8,0) ve srovnání s neseparovanou extracelulární DNA, kde podíl fetální DNA tvořil pouze 0,29 % (rozpětí 0,06–1,78). Z naší studie je zřejmé, že metoda koncentrace fetální DNA pomocí separace fragmentované extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy prostřednictvím gelové elektroforézy není vhodná pro rutinní účely.
Klíčová slova: apoptóza, extracelulární fetální DNA, fragmentace, kvantitativní PCR v reálném čase, mateřská plazma, *SRY* gen, *GLO* gen, trofoblast

Summary
Hromadníková I., Žejšková L., Doucha J., Wagenknecht D.: Non-invasive prenatal diagnosis from maternal peripheral blood is performed on fractionated extracellular fetal DNA with size < 500 bp

Apoptotic bodies derived from placental trophoblasts represent the most important source of extracellular fetal nucleic acids (DNA and RNA) for the purpose of non-invasive prenatal diagnosis. In this work we studied the fragmentation of extracellular DNA present in maternal circulation of 6 pregnant women within 16th week of gestation. Extracellular DNA was separated by using agarose gel electrophoresis size-fractionation. Fetal and total circulatory DNA was quantified in individual fractions with an approximate size of 100–300 bp, 300–500 bp, 500–700 bp, 700–900bp, > 900 bp by using real-time PCR, specific primers and TaqMan probes for *SRY* and *GLO* genes. Fetal circulatory DNA was mainly detected in section with a size 100–300 bp with the concentration of 14.8 GE/ml (range 1.56–83.2). Lower amount of fetal circulatory DNA, 1.53 GE /ml (range 0–10.8), was also found in a fraction with a size 300–500 bp. No fetal DNA was detected in fractions with an approximate size of 500–700 bp, 700–900 bp and more than 900 bp. Circulatory DNA extracted from the gel fragment with a molecular size less than 300 bp contained 4.8 x (range 0x–16.6x) enriched fetal DNA when compared with initial unseparated DNA sample, which has been usually used to detect fetal paternally inherited alleles. If we focused on isolation of DNA with a size of 100–300 bp, we could get more concentrated but not purified fetal DNA. The median percentage of foetal derived DNA in this fraction was 1.15 % (range 0.16–8.0). However median percentage of fetal derived DNA in unseparated extracellular DNA was 0.29 % (range 0.06–1.78). Our experience revealed that the usage of enriched size-fractionated fetal DNA is not suitable for routine clinical applications.
Key words: apoptosis, extracellular fetal DNA, fragmentation, real-time PCR, maternal plasma, *SRY* gene, *GLO* gene, trophoblast

Trans. Hemat. dnes, 12, 2006, No. 2, p. 95–99.

Úvod

Neinvazivní prenatální diagnostika (*RHD* a *RHCE* genotypizace plodu, určení pohlaví plodu) je prováděna na extracelulární fetální DNA, která cirkuluje v mateřské periferní krvi během těhotenství (1–13). Nejvýznamnějším zdrojem extracelulárních fetálních nukleových kyselin (DNA a RNA) pro účely neinvazivní prenatální diagnostiky jsou apoptotická tělíska trofoblastu, která se do mateř-

Trans 2 zlom 30.6.2006 17:11 Stránka 96
proLékaře.cz | 10.11.2026

ské cirkulace dostávají spirálními mateřskými arteriemi (14–15).

Za fyziologických podmínek je v placentě udržován optimální počet správně fungujících buněk. Je zajišťována tkáňová homeostáza – rovnováha mezi produkcí nových buněk a zánikem buněk starých, za který je zodpovědná geneticky řízená buněčná smrt (apoptóza). Programově umírající buňka má specifické morfologické a biochemické charakteristiky. Při apoptóze dochází ke smršťování buňky a ke kondenzaci chromatinu jádra následované fragmentací buňky na apoptotická tělíska. Biochemicky již v časné fázi apoptózy dochází k fragmentaci DNA.

Nedávné studie prokázaly, že extracelulární DNA má charakteristické apoptotické rysy. Fragmentace extracelulární DNA byla zachycena metodou gelové elektroforézy jako pravidelné proužky – tzv. žebříčkové fragmenty DNA. Bylo rovněž prokázáno, že cirkulující fetální DNA má menší velikost než cirkulující maternální DNA, které je v mateřské plazmě většina (> 90 %). Několik studií nezávisle na sobě potvrdilo, že cirkulující fetální DNA má velikost maximálně do 500 bp (16–19).

V této studii se zaměřujeme na purifikaci fetální extracelulární DNA přítomné v mateřské plazmě těhotných žen s plodem mužského pohlaví pomocí separace extracelulární DNA na agarózovém gelu podle velikosti jednotlivých fragmentů. Kvantifikujeme množství fetální a celkové extracelulární DNA na základě amplifikace *SRY* a *GLO* genů v jednotlivých frakcích o stejné velikosti DNA fragmentů.

Pacienti a metodika

Celkem bylo testováno 6 těhotných žen v 16. týdnu gravidity. Všechny pacientky daly informovaný souhlas s odběrem periferní krve pro toto vyšetření.

Příprava plazmy

Plazma byla připravena z 10 ml nesrážlivé periferní krve (EDTA) nejpozději 24 hodin po odběru (centrifugace 1200 g 10 min.). Poté byla plazma znovu centrifugována a skladována při -80 °C až do dalšího zpracování. Abychom minimalizovali riziko kontaminace vzorků, prováděli jsme veškeré zpracování biologického materiálu v laminárním boxu II. třídy a pro pipetování jsme používali aerosol rezistentní špičky.

Izolace DNA z mateřské plazmy pomocí QIAamp DSP Virus kitu

DNA byla extrahována z 1 ml mateřské plazmy za použití QIAamp DSP Virus kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle modifikovaného protokolu výrobce. Snížené množství QIAGEN Proteázy (20 µl) bylo použito k rozštěpení proteinů. Odstranění reziduálních solí a proteinů bylo provedeno vakuovým systémem (QIAvac 24 Plus, Qiagen, Hilden, Germany) a bylo rovněž použito snížené množství promývacích pufrů (600 µl AW1, 750 µl AW2, 750 µl ethanol). DNA byla eluována 40 µl AVE pufru.

Separace extracelulární DNA podle velikosti pomocí gelové elektroforézy

Veškerá celková extracelulární DNA izolovaná z 1 ml mateřské plazmy byla separována na 1% agarózovém gelu (Serva, Heidelberg, Germany) obsahujícím ethidium bromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) při 90 V (6,2 V/cm) po dobu 20–25 minut na přístroji Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Ke každému vzorku DNA bylo před separací přidáno 5 µl markeru molekulové hmotnosti (100 bp DNA Ladder, Fermentas, Burlington, Canada) a 4 µl barviva Orange Loading Dye Solution (Fermentas, Burlington, Canada). Každá dráha extracelulární DNA separované podle délky jednotlivých fragmentů byla rozřezána sterilním skalpelem do 5 sekcí podle markeru molekulové hmotnosti (100–300 bp, 300–500 bp, 500–700 bp, 700–900 bp, > 900 bp) po umístění gelu na UV transiluminátor (Ultra-Lum, Claremont, CA, USA).

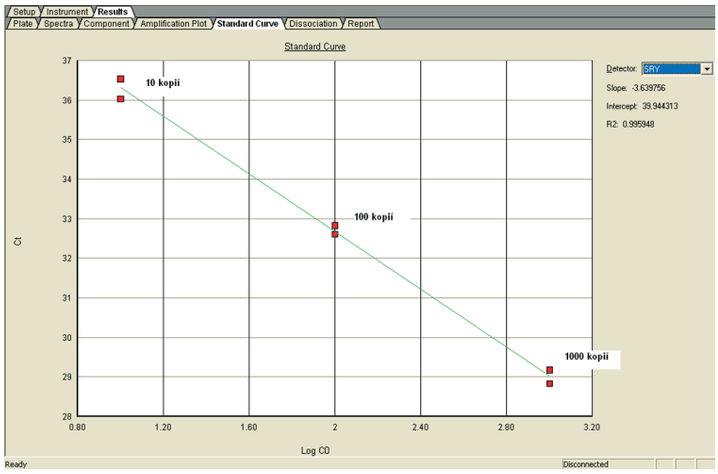
Extrakce jednotlivých fragmentů extracelulární DNA z gelu

Extracelulární DNA byla extrahována z jednotlivých sekcí pomocí komerčního extrakčního kitu (QIAEX II Gel Extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) dle manuálu výrobce. DNA byla eluována 45 µl roztoku o nízké iontové síle (pH 7,5). Abychom minimalizovali riziko kontaminace vzorků, prováděli jsme dekontaminaci elektroforetického zařízení DNA dekontaminačním sprejem (DNA Remover, Minerva Biolabs, Berlin, Germany), pro každou elektroforézu jsme používali čerstvé pufry a zároveň jsme prováděli analýzu na sekci gelu bez templátu (blank). Potenciální riziko kontaminace jsme rovněž ověřili analýzou plazmy matky s plodem ženského pohlaví. Ve všech případech byl výsledek amplifikace *SRY* genu negativní.

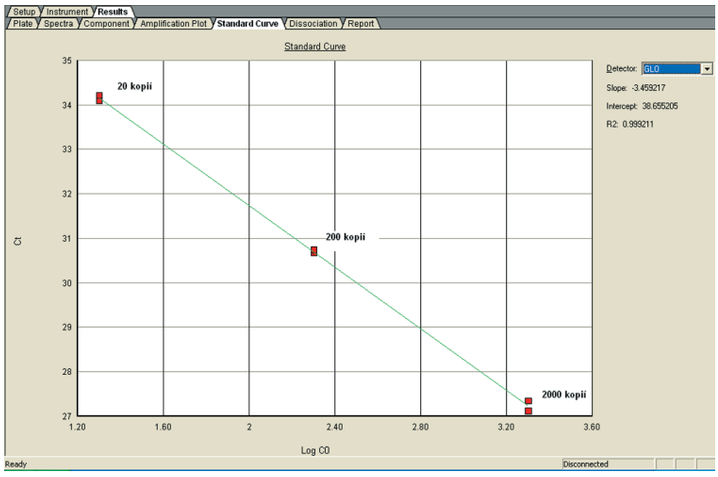
Kvantifikace fetální a celkové extracelulární DNA v jednotlivých frakcích pomocí PCR v reálném čase

Analýza byla provedena na ABI PRISM 7300 sekvenčním detekčním systému (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey, USA). PCR reakční směs (celkový objem 50 µl) obsahovala TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey, USA), optimalizované primery (300 nM pro *SRY a GLO*), TaqMan sondu (200 nM pro *SRY* a *GLO*) a 18 µl templátu. Podmínky PCR reakce byly nastaveny podle manuálu výrobce; dále 50 cyklů při 95 °C 15s (denaturace DNA) a 60 °C 1 min. (anealing a syntéza DNA). Každý fragment separované extracelulární DNA extrahovaný z gelu byl analyzován v duplikátu (1 jamka amplifikace *SRY* genu a 1 jamka amplifikace *GLO* genu) v 8jamkových stripech. Kvantifikace SRY a GLO genu na celkové neseparované extracelulární DNA byla provedena na DNA přítomné v mateřské plazmě z jiné izolace. Pozitivní výsledek byl hodnocen jako detekce fluores-

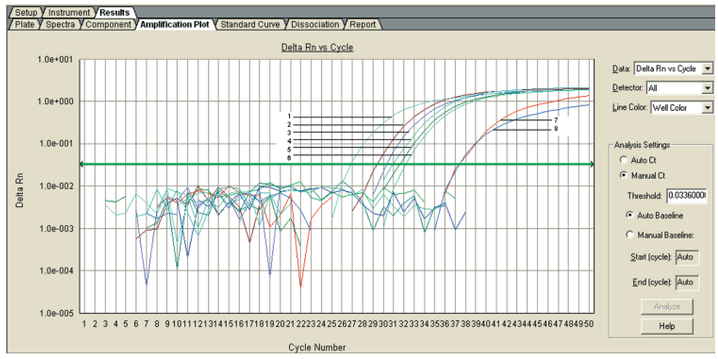
Trans 2 zlom 30.6.2006 17:11 Stránka 97
proLékaře.cz | 10.11.2026



Obr. 1. Standardní titrační křivka logaritmické závislosti prahového cyklu Ct na známé koncentraci templátu v iniciální reakční směsi pro *SRY* gen – kvantifikace fetální DNA přítomné v celkové extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve.



Obr. 2. Standardní titrační křivka logaritmické závislosti prahového cyklu Ct na známé koncentraci templátu v iniciální reakční směsi pro *GLO* gen – kvantifikace celkové extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve.



Obr. 3. Porovnání fetální a celkové extracelulární DNA před separací a po separaci pomocí gelové elektroforézy podle velikosti jednotlivých fragmentů u pacientky č. 1395: křivka č. 1 – celková neseparovaná DNA; č. 2 – celková DNA u frakce 100–300 bp; č. 3 – celková DNA u frakce 300–500 bp; č. 4 – celková DNA u frakce 500–700; č. 5 celková DNA u frakce > 900 bp; č. 6 – celková DNA u frakce 700–900 bp; č. 7 – fetální DNA u frakce 100–300 bp; č. 8 – fetální DNA v neseparované DNA.

cenčního signálu v jamce před 40. cyklem (Ct < 40). Množství fetální a celkové DNA v jednotlivých frakcích bylo určeno ze standardní titrační křivky logaritmické závislosti prahového cyklu Ct na známé koncentraci templátu (počet kopií/jamka) (obr. 1 a 2). Ze směrnic standardní křivky (-3,64 pro SRY gen a -3,46 pro GLO gen) je zřejmé, že účinnost amplifikace

[Eff = $10^{(-1/\text{směrnice})} - 1$]

dosáhla 88,2 % pro SRY gen a 94,5 % pro GLO gen. Počet kopií DNA v 1 ml mateřské plazmy byl vypočítán dle následujícího vzorce:

[Množství DNA po extrakci (ml)/ Množství templátu v PCR reakci (ml)] x [Počet kopií v PCR reakci/Objem plazmy pro DNA extrakci (ml)].

Sekvence jednotlivých primerů a TaqMan sond byly již publikovány v předchozích článcích (1–13).

Výsledky

V 1 ml mateřské plazmy těhotných žen v 16. týdnu gravidity bylo detekováno 4567,7 (rozpětí 3227,2–5863,3) kopií celkové extracelulární DNA a 13,3 (rozpětí 2,8–57,6) kopií fetální DNA. Fetální DNA je tedy zastoupena v celkové extracelulární DNA přítomné v mateřské plazmě pouze 0,29 % (0,06–1,78).

Fragmentovaná extracelulární DNA byla dále separována podle délky jednotlivých fragmentů metodou gelové elektroforézy a v jednotlivých sekcích o molekulové hmotnosti 100–300 bp, 300–500 bp, 500–700 bp, 700–900 bp, > 900 bp byla stanovena koncentrace fetální a celkové směsné DNA (tab. 1).

Fetální DNA byla detekována pouze ve fragmentech o molekulové hmotnosti 100–300 bp a 300–500 bp. Největší koncentrace fetální DNA se vyskytovala v sekci o molekulové hmotnosti 100–300 bp, kde dosáhla hodnot 14,8 kopií/ml periferní krve matky (rozpětí 1,56–83,2). V sekci o molekulové hmotnosti 300–500 bp bylo detekováno menší množství fetální DNA o koncentracích 1,53 kopií/ml periferní krve matky (rozpětí 0–10,8). V sekcích o molekulové hmotnosti 500–700 bp, 700–900 bp a > 900 bp nebyla fetální DNA detekována.

Fetální DNA byla ve frakci o molekulové hmotnosti 100–300 bp 4,8násobně zkoncentrována (rozpětí 0x–16,6x) ve srovnání s fetální DNA přítomnou v neseparované extrace-

Trans 2 zlom 30.6.2006 17:11 Stránka 98
proLékaře.cz | 10.11.2026

Tab. 1. Kvantifikace fetální a celkové DNA (počet kopií/ml mateřské plazmy) v jednotlivých frakcích po separaci extracelurální DNA na agarózovém gelu podle velikosti jednotlivých fragmentů.

IČP	celková extracelulární DNA	frakce 100-300 bp počet kopií/ml plazmy	frakce 300-500 bp počet kopií/ml plazmy	frakce 500-700 bp počet kopií/ml plazmy	frakce 700-900 bp počet kopií/ml plazmy	frakce 900 - bp počet kopií/ml plazmy
1395	**SRY: 11,8** GLO: 5863,3 **0,2 %**	**SRY**: **13,1** GLO:1261,0 **1 %**	SRY: 0 GLO: 672,9 0 %	SRY: 0 GLO: 423,2 0 %	SRY: 0 GLO: 191,3 0 %	SRY: 0 GLO: 281,4 0 %
1047	**SRY: 2,8** GLO: 4785,3 **0,06 %**	**SRY: 14,4** GLO:1455,2 **1 %**	**SRY: 1,95** GLO: 47,.8 **0,4 %**	SRY: 0 GLO: 246,9 0 %	SRY: 0 GLO: 122,04 0 %	SRY: 0 GLO: 110,8 0 %
1098	**SRY: 4,9** GLO: 4891,3 **0,1 %**	**SRY: 15,3** GLO:1210,5 **1,3 %**	**SRY: 1,1** GLO: 733,0 **0,15 %**	SRY: 0 GLO: 336,5 0 %	SRY: 0 GLO: 101,6 0 %	SRY: 0 GLO: 190,1 0 %
1115	**SRY: 17,4** GLO: 4530,1 **0,38 %**	**SRY: 1,56** GLO: 949,9 **0,16 %**	**SRY: 1,06** GLO: 635,8 **0,17 %**	SRY: 0 GLO: 246,0 0 %	SRY: 0 GLO: 197,6 0 %	SRY: 0 GLO: 93,8 0 %
1319	**SRY: 57,55** GLO: 3227,2 **1,78 %**	**SRY: 83,2** GLO: 1045 **8,0 %**	**SRY: 10,8** GLO: 344 **3,14 %**	SRY: 0 GLO: 179,6 0 %	SRY: 0 GLO: 90,25 0 %	SRY: 0 GLO: 164,4 0 %
1522	**SRY: 14,8** GLO: 3356,1 **0,4 %**	**SRY**: **15,2** GLO: 934,6 **1,6 %**	**SRY: 4,9** GLO: 496,8 **1 %**	**SRY: 2,5** GLO: 217,2 **1,2 %**	SRY: 0 GLO: 134,9 0 %	SRY: 0 GLO: 237,5 0 %
SRY Rozpětí Medián	**2,8 – 57,55 13,3**	**1,56 – 83,2 14,8**	**0 – 10,8 1,53**	**0 – 2,5 0**	**0 0**	**0 0**
GLO Rozpětí Medián	**3227,2 – 5863,3 4567,7**	**934,6 – 1455,2 1127,8**	**344,0 – 733,0 566,3**	**179,6 – 423,2 246,5**	**90,3 – 197,6 128,5**	**93,8 – 281,4 177,3**
% fetální DNA Rozpětí Medián	**0,06 – 1,78 0,29**	**0,16 – 8,0 1,15**	**0 – 3,14 0,29**	**0 – 1,2 0**	**0 0**	**0 0**

lulární DNA, která se po izolaci z mateřské plazmy používá pro detekci paternálních alel u plodu. Podíl fetální DNA ve frakci o molekulové hmotnosti 100–300 bp dosáhl 1,15 % (rozpětí 0,16–8,0).

Z výsledků amplifikace *GLO* genu jsme zjistili, že nejvíce fragmentované extracelulární DNA se vyskytovalo ve fragmentech o molekulové hmotnosti 100–300 bp (medián 1127,8 kopií/ ml, rozpětí 934,6–1455,2) a 300–500 bp (medián 566,3 kopií/ ml, rozpětí 344,0–733,0).

Diskuse

V této práci jsme se zaměřili na studium fragmentace extracelulární DNA přítomné v mateřské cirkulaci, jež se využívá pro neinvazivní detekci paternálních alel *SRY*, *RHD* a *RHCE* genů u plodu v případě rizika X-vázaných chorob či hemolytického onemocnění plodu.

Výsledky této pilotní studie potvrdily nedávné zjištění, že cirkulující fetální DNA má velikost maximálně do 500 bp (16–19). Fetální DNA jsme detekovali převážně v sekci o molekulové hmotnosti 100–300 bp. Fetální DNA jsme detekovali ve velmi nízkých koncentracích i v sekci o molekulové hmotnosti 300–500 bp.

Z naší pilotní studie je zřejmé, že pokud se zaměříme na izolaci DNA o velikosti fragmentů 100–300 bp, získáme koncentrovanější ale nikoliv purifikovanou fetální DNA. Obsah fetální DNA v této frakci činí 1,15 % (rozpětí 0,16–8,0) ve srovnání s neseparovanou extracelulární DNA, kde podíl fetální DNA tvořil pouze 0,29 % (rozpětí 0,06–1,78). Z naší studie je rovněž zřejmé, že metoda koncentrace fetální DNA pomocí separace fragmentované extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy prostřednictvím gelové elektroforézy není vhodná pro rutinní účely. Tento postup je velmi pracný a v průběhu zpracování může dojít ke kontaminaci biologického materiálu.

Přesto byl tento postup použit některými autory k neinvazivní detekci paternálně zděděných alel u plodu pro některé běžně se vyskytující bodové mutace u β-talasémie (IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110 a kodón 39) (19). Tento postup byl rovněž použit k neinvazivní detekci patologické alely vyskytující se u achondroplázie – k detekci bodové mutace v FGFR 3 genu kódující receptor pro fibroblastový růstový faktor (G-A substituce na 1138 pozici) (16).

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory MSM 0021620806 a MZO 00064203.

Literatura

1. **Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, et al.** Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998; 339: 1734–1738.
2. **Legler TJ, Lynen R, Maas JH, et al.** Prediction of fetal RhD and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time poly-

Trans 2 zlom 30.6.2006 17:11 Stránka 99
proLékaře.cz | 10.11.2026

merase chain reaction. Transfus Apheresis Sci 2002; 27: 217–223.
3. **Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Sargent JL.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997; 350: 485–487.
4. **Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, et al.** Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum. Implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998; 62: 768–775.
5. **Hromadnikova I, Vesela K, Benesova B, et al.** Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping from maternal plasma in alloimmunized pregnancies. Prenat Diagn 2005 Oct 17; (Epub ahead of print).
6. **Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, et al.** Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. Fetal Diagn Ther 2005; 20: 275–280.
7. **Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Vlk R.** Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in Rh D negative pregnancies. J Histochem Cytochem 2005; 53: 301–305.
8. **Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, et al.** Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. Prenat Diagn 2003; 23: 235–238.
9. **Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, et al.** Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. BMC Pregnancy and Childbirth 2002; 2: 4.
10. **Hromadníková I, Vechetová L, Veselá K, et al.** Neinvazivní RHD genotypizace plodu na DNA izolované z periferní krve RhD negativních těhotných žen. Transfuze a hematologie dnes 2003; 4: 151–158.
11. **Hromadníková I, Benešová B, Vechetová L, et al.** Neinvazivní RHD, RHC a RHE genotypizace plodu z periferní krve RhD negativních těhotných žen. Transfuze a hematologie dnes 2004; 1: 13–17.
12. **Hromadníková I, Doucha J, Benešová B, Veselá K, Rožňáková E, Hakenová A.** Neinvazivní RHc genotypizace plodu z periferní krve těhotných žen. Transfuze a hematologie dnes 2005; 1: 14–16.
13. **Hromadníková I, Veselá K, Benešová B, et al.** První zkušenosti s neinvazivní RH genotypizací plodu z periferní krve u aloimunizovaných těhotenství. Transfuze a hematologie dnes 2005; 1: 17–20.
14. **Lo YM, Chiu RW.** The biology and diagnostic applications of plasma RNA. Ann N Y Acad Sci. 2004; 1022: 135–9.
15. **Ng EK, Tsui NB, Lau TK, et al.** mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 4748–53.
16. **Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S.** Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma—case report. Prenat Diagn. 2004; 24: 896–898.
17. **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: 1002–1011.
18. **Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al.** Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem. 2004; 50: 88–92.
19. **Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S.** Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. JAMA. 2005; 293: 843–849.

Doc. RNDr. Ilona Hromadníková, PhD.
Laboratoř buněčné biologie
Pediatrická klinika, 2. LF UK a FN Motol Praha
V úvalu 84
150 06 Praha 5
email: ilona.hromadnikova@lfmotol.cuni.cz

Zasláno do redakce: 7. 3. 2006
Přijato: 10. 4. 2006

CD10⁻ pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL)

Beate Gleissner, Nicola Goekbuget, et al. for the GMALL Study Group

Imunofenotypizace a molekulárně genetická analýza dovolují adaptovat terapii akutní lymfoblastické leukemie (ALL) dle prognostických kritérií. Jedna z prognosticky špatné podskupiny ALL u dospělých vycházející z prekurzorů B lymfocytů je charakterizována translokacemi postihujícími MLL gen (mixed lineage leukemia gene) na chromozomu 11q23. Tyto translokace se vyskytují přibližně u 3 % až 6 % všech ALL u dospělých a korelují s mladším věkem, s vyšší leukocytózou a s CD19⁺/CD10⁻ /cy IgM⁻ imunofenotypem (pro-B ALL) spoluexprimujícím myeloidní marker. Nedávné studie ukázaly, že translokace na chromozomu 11q23 přicházejí až u 8 % T-ALL, které charakterizoval špatný klinický výsledek.

V této práci představuje německá pracovní skupina pro dospělé ALL (German Multicentric Trials for Adult ALL) jinou vysokorizikovou skupinu s častými translokacemi MLL genu postihující 82 % (46 a 56) odlišného CD19⁺/CD10⁻ /cy IgM⁺ pre-B ALL podtypu. Imunofenotypizace odhalila CD10 negativitu u 70 ze 2408 případů celého souboru ALL vycházejících z B linie, třebaže ostatní kriteria odpovídala klasifikaci pre-B ALL (např. pozitivita cytoplazmatického imunoglobulinu). Tyto blasty vykazovaly vysokou expresi myeloidního antigenu (60% CD65 pozitivita) a reagovaly s protilátkou 7.1 v 95 % případů. MLL-AF fúzní transkripty nebo přestavba 11q23/MLL nebo obojí byly prokázány u 46 z 56 vzorků. I když 83 % nemocných dosáhlo kompletní remisi, trvání remise zůstávalo velmi nízké: 141 dní pro skupinu s pozitivní přestavbou MLL a 245 dní u nemocných bez přestavby MLL CD10⁻ pre-B ALL. Pravděpodobnost celkového přežití 3 roky po diagnóze byla 0,34 ± 20 SE u pacientů bez MLL přestavby proti 0,12 ± 0,06 SE s pozitivní přestavbou.

CD10⁻ cy IgM⁺ pre-B ALL identifikuje odlišnou imunofenotypickou jednotku vycházející z částečně diferencované prekurzorové B linie s intracytoplazmatickou imunoglobulinovou expresí. Rozlišení tohoto podtypu je důležité, protože byl pozorován v 17 % všech pre-B ALL vzorků a je charakterizován vysokou prevalencí MLL-AF 4 fúzních transkriptů. I když údaje v práci neanalyzují různé terapeutické volby, je uveden názor, že transplantace kmenových buněk v první remisi by mohla zlepšit výsledky. Na druhé straně bylo přežití u malé podskupinky CD10⁻ cy IgM⁺ pre-B⁺ ALL s negativní MLL přestavbou v rámci léčebných výsledků dosažených u standardního rizika ALL u dospělých. Další molekulárně genetická analýza by mohla přispět k objasnění povahy CD10⁻ pre-B ALL ve srovnání a jinými akutními leukemiemi s pozitivní přestavbou MLL genu.