

A vérplazma összes szabad DNS, valamint szabad magzati DNS mennyisége praeclampsiával szövődött és szövődménymentes terhességek esetében

LÁZÁR LEVENTE DR. ■ NAGY BÁLINT DR. ■ MOLVAREC ATTILA DR.
RIGÓ JÁNOS JR. DR.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

A plazmában keringő szabad DNS minőségi és mennyiségi vizsgálata mint a praeclampsiás diagnosztika lehetséges eszköze egy évtizedes múltat tekint vissza. Az általunk végzett vizsgálat célja az összes szabad DNS, valamint szabad magzati DNS mennyiségének vizsgálata volt szövődménymentes, illetve praeclampsiával szövődött terhességek esetén. *Módszerek:* A vizsgálatot retrospektív módon végeztük. Klinikánkon megjelent és kezelés alatt álló 67 praeclampsiával szövődött, illetve 70 szövődménymentes terhességet viselő várandós nőtől gyűjtöttünk vérplazmát. A keringő összes szabad DNS és szabad magzati DNS meghatározását valós idejű polimeráz láncreakcióval (real-time PCR) végeztük. *Eredmények:* A plazma szabad DNS, valamint a szabad magzati DNS mennyisége egyaránt szignifikánsan magasabb volt praeclampsiás terhesek esetében (medián: 0,0114 vs. 0,0325 és 0,001 E-3 vs. 0,086 E-3 ng/μl; P <0,001). Az összes szabad DNS, valamint a szabad magzati DNS mennyisége között, illetve a testtömegindex között nem találtunk szignifikáns összefüggést. *Következtetés:* A praeclampsia hátterében feltételezett kórfolyamatok, a placentáció zavara, endothel- és hepatocellularis károsodás nagy valószínűséggel egyaránt befolyásolja az összes szabad DNS mennyiségének emelkedését. A szabad magzati DNS mennyiségének emelkedése a trophoblastinvázió zavarának mutatójaként lehetséges markerként jön szóba a praeclampsia korai diagnosztizálásában.

Kulcsszavak: praeclampsia, szabad DNS, szabad magzati DNS, testtömegindex

Quantity of total cell free and cell free fetal DNA in pregnancies with no complications and with preeclampsia

Several researches focused on the factors which could influence the quantity of cell free DNA in case of normal and pathological pregnancies. The aim of our study was to evaluate the quantity of total cell free and cell free fetal DNA in case of normal pregnancies and preeclampsia. *Study design:* Plasma samples were obtained from 67 preeclamptic and 70 normotensive pregnant women. The quantity of total cell free DNA and cell free fetal DNA was measured using real-time polymerase chain reaction. *Results:* We confirmed that circulating total free and fetal DNA levels are significantly elevated in pregnancies complicated by preeclampsia (median: 0.0114 vs. 0.0325 and 0.001E-3 vs. 0.086E-3 ng/μl; P <0.001). The quantity of total plasma-free DNA did not correlate with the body mass index. *Conclusion:* The releases of both free fetal and maternal DNA were found to be affected in preeclampsia. Hepatocellular necrosis seems to be responsible - at least partly - for increased circulating total DNA levels in preeclampsia, and the abnormal trophoblast invasion could be responsible for increased trophoblast destruction and elevation of cell free fetal DNA level.

Keywords: total cell free DNA, cell free fetal DNA, preeclampsia, body mass index

(Beérkezett: 2009. november 21.; elfogadva: 2010. január 12.)

Az anyai és magzati perinatalis morbiditás és mortalitás tekintetében a praeclampsia világszerte az egyik vezető okként szerepel [1, 2]. A praeclampsia jellemzője a magas vérnyomás és fehérjevizelés megjelenése a terhesség középidejében, azokban a várandósokban, akik addig nem szenvedtek magasvérnyomás-betegségben. A praeclampsia pontos oka nem ismert [2], ugyanakkor számos tényező, többek között a trophoblastinvázió, a spirális artériák kialakulásának zavara járul hozzá a placentáció kóros folyamatához, amely végső soron az uteroplacentaris keringés károsodásához és ezáltal a betegség kialakulásához vezet [3]. A praeclampsia kialakulásában számos anyai tényező is szerepet játszik, mint az anyai túlsúly, vesebetegség, anyai életkor, a családban szereplő vérnyomásbetegség, valamint a korábbi terhességben előforduló praeclampsia. A praeclampsia okának feltárása a terhesspatológiai kutatások központi kérdése. Az elmúlt tíz évben számos olyan vizsgálat látott napvilágot, amelynek célja a terhesség során az anyai keringésben fellelhető szabad DNS és ezen belül a szabad magzati DNS mennyiségi és minőségi jellemzőinek vizsgálata [4, 5]. Tekintettel arra, hogy praeclampsiaiban a placentáció zavarát feltételezzük, kézenfekvőnek tűnik az anyai keringésbe kerülő trophoblasteredetű szabad magzati DNS vizsgálata. Ugyanakkor a szabad magzati DNS mellett a praeclampsiaiban megjelenő májenzim-emelkedések hepatocellularis és endothelkárosodást, ezáltal vélhetően a májból és endothelsejtekből a keringésbe kerülő szabad anyai DNS mennyiségének változását is valószínűsítik. Az általunk végzett vizsgálat célja az anyai vérplazmában fellelhető összes szabad DNS és szabad magzati DNS mennyiségének vizsgálata volt, az anyai testtömegindex függvényében normotoniás és praeclampsias várandósok esetében.

Anyagok és módszerek

A vizsgálatot retrospektív módon végeztük. Hatvanhét praeclampsias terhes nőtől gyűjtöttünk plazmamintát, amelyeket a feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A praeclampsia definíciójaként a terhesség 20. hete után jelentkező magas vérnyomást ($\text{RR} \geq 140/90\text{ Hgmm}$) és fehérjevizelést ($\geq 300\text{ mg}/24\text{ h}$) fogadtuk el. Kontrollcsoportként hetven normotoniás várandós nőtől gyűjtöttünk plazmamintát. Minden vizsgált terhesség szinguláris volt. A praeclampsias csoportban 36, míg a kontrollcsoportban 25 fűmagzatot viselő várandós nő szerepelt.

A minták felhasználását és azok vizsgálatát a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásügyi Bizottsága engedélyezte. A vizsgálatok a Helsinki Nyilatkozat szabályainak megfelelően történtek.

DNS-izolálás és valós idejű polimeráz láncreakció (real-time PCR)

A vérminták gyűjtése steril EDTA-s csőbe történt, a plazma elválasztását 3000 g-on történő centrifugálással vé-

geztük. A DNS izolálása 400 μL plazmamennyiségből történt High Pure PCR Template Preparation kit segítségével (Roche-diagnosztikák, Mannheim, Németország), a gyártó által meghatározott protokoll szerint. A vizsgálatokat szigorú, a sterilitás szabályainak megfelelő körülmények között végeztük. Minden izolálási eljárás során negatív mintákkal egészítettük ki a mintasort. A DNS eluálása 50 μL elúciós pufferrel történt. A valós idejű polimeráz láncreakcióhoz (realtime PCR) 1 μL DNS-t használtunk.

A PCR-reakciót SYBR-green módszerrel végeztük Lightcycler 1.0 rendszer segítségével (Roche-diagnosztikák, Mannheim, Németország). A plazmában keringő magzati DNS kimutatásához az Y-kromozómán elhelyezkedő SRY-régióra tervezett primer párokat használtuk: forward, 5'-ggc aac gtc cag gat aga gtg a-3', reverse 5'-tgc tga tct ctg agt ttc gca tt-3'. Az összes szabad DNS-tartalom meghatározása a globin gén segítségével történt: forward 5'-aca caa ctg tgt tca cta gc-3', reverse 5'-caa ctt cat cca cgt tca cc-3'. A PCR-reakciót 10 μL végtérfigatban végeztük, amelynek összetétele: 1 μL DNS, 2,5 pmol/L mindkét primerből, 2 μL DNA Master SYBR Green I mix (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I kit: Taq polymerase, dNTP, MgCl_2), 6 μL nukleázmentes víz. A DNS-mennyiség meghatározásához a globin gén hígítási sorából képzett belső referenciagörbét használtuk.

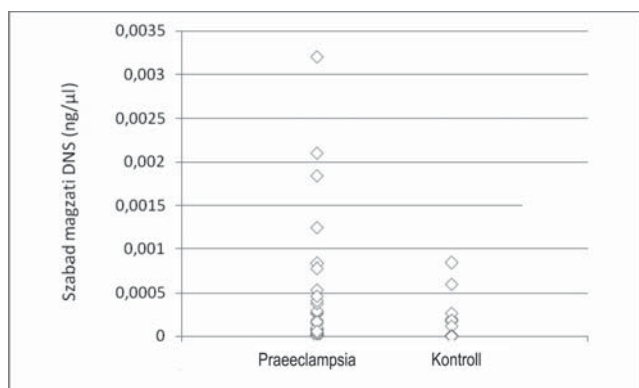
Az egyes PCR-reakciók során azonos hőmérsékleti profilokat használtunk, minden mérés esetén negatív kontrollt illesztettünk a mért esetek mellé. A PCR-reakció 40 cikusból állt, amelyek a következők voltak: 8 perc $95\text{ }^{\circ}\text{C}$; 5 s $95\text{ }^{\circ}\text{C}$; 10 s $60\text{ }^{\circ}\text{C}$; 15 s $72\text{ }^{\circ}\text{C}$; hűtés $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig.

Adatelemzés

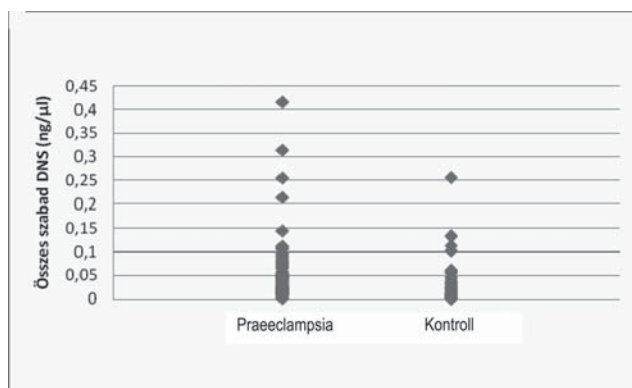
Az adatelemzés során Shapiro–Wilk's W, Mann–Whitney U, Pearson χ^2 -teszteket használtunk. Statisztikai elemzéshez a Statistica (7.1; Statsoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, Amerikai Egyesült Államok) és Statistical Package for the Social Sciences (version 15.0 for Windows; SPSS, Inc., Chicago, Illinois, Amerikai Egyesült Államok) programokat használtuk. A szignifikancia meghatározásánál $p < 0,05$ értékkel számoltunk.

Eredmények

Retrospektív vizsgálatunk során 67 praeclampsias [medián terhességi kor vérvételkor 37,5 (30–41) hét], valamint 70 normotoniás várandóstól gyűjtöttünk plazmamintát [medián terhességi kor vérvételkor 36 (29–39) hét]. A praeclampsias csoport medián testtömegindexe 30,0 (20,6–38,3) kg/m^2 , a normotenzív csoportban 25,9 (19,0–42,0) kg/m^2 -nek adódott. A fűmagzatot viselő praeclampsias terhesek esetében a szabad magzati DNS mennyisége 0,086 E-3 $\text{ng}/\mu\text{L}$, a normotenzív várandós nők esetében 0,001 E-3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ volt (1. ábra).



1. ábra | A szabad magzati DNS mennyisége praeclampsias és normotóniás várandósokban median 0,086 E-3 ng/μl, illetve 0,001 E-3 ng/μl



2. ábra | Az összes szabad DNS mennyisége praeclampsias és normotóniás esetekben medián 0,0325 ng/μl, illetve 0,0114 ng/μl

Az összes szabad DNS mennyisége praeclampsias terhes nők esetében 0,0325 ng/μl, szövődmenymentes terhes nők esetében 0,0114 ng/μl (2. ábra). A praeclampsias terhesek esetében mind a szabad magzati, mind pedig az összes szabad DNS mennyisége szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a szövődmenymentes terhességet viselő várandós nőknél, $P < 0,001$. A szabad magzati DNS mennyisége nem mutatott összefüggést az összes szabad DNS mennyiségével. Hasonlóképpen nem találtunk szignifikáns összefüggést a testtömegindex és a DNS mennyisége között sem.

Megbeszélés

Leon és munkatársai 1977-ben radioimmunassay-vel végzett vizsgálatuk eredményeként tumoros beteg és egészséges kontroll esetében elsőként számoltak be a szabad DNS jelenlétéről a perifériás vérben, megjegyezvén, hogy a szabad DNS mennyisége ezen betegeknél eltér az egészséges kontrolloknál mért mennyiségétől [6, 7]. Mindamelllett, hogy a szabad DNS jelenléte egészséges és különböző betegségekben szenvedő személyek esetében nyilvánvaló, a folyamat, ahogyan a DNS a keringésbe kerül, mind ez idáig nem tisztázott. Az anyai vérben keringő szabad magzati DNS kimutatására és a kutatások eredményének közzétételére elsőként 1997-ben került sor [8]. Ez a vizsgálati eredmény lendületet adott a szabad magzati DNS további vizsgálatához [9, 10]. A szövődmenymentes terhességet viselő várandós nők esetében a szabad magzati DNS mennyisége az irodalmi adatok alapján számos tényező függvénye. A terhesség második trimeszterében az anyai testsúly, illetve a szabad magzati DNS mennyisége összefüggésében fordított arányosságot figyeltek meg. Ennek hátterében a növekvő vérvolumen és a szabad DNS dilúcióját feltételezték. Ugyanezen tanulmány során az anyai életkor, a dohányzás és etnikai hovatartozás tekintetében nem találtak eltérést [11]. A méhlepény 3D ultrahang segítségével mért térfogata és a szabad magzati DNS mennyisége között, a várakozásokkal ellentétben, nem fedezhető fel

összefüggés [12]. A szövődmenymentes terhességgel kapcsolatos kutatásokkal párhuzamosan egyre bővülnek ismereteink a szabad magzati DNS és a kóros terhesség összefüggéseinek tekintetében is.

A magas vérnyomással szövődött terhességi kórképek, terhességi hipertónia, praeclampsia, HELLP-szindróma kialakulásának pontos kórfolyamata jelenleg ismeretlen. A betegségek fokozatos megismerése során azonban egyre inkább bizonyosságot nyert a méhlepény, a placentáció központi szerepe a betegség és következményeinek kialakulásában [13, 14, 15, 16]. Figyelembe véve a praeclampsia kialakulásában szerepet játszó kockázati tényezőket, valamint a praeclampsiaival szövődött terhesség során észlelhető laboratóriumi eltéréseket, megválaszolásra várt az a kérdés, hogy a praeclampsiaival szövődött terhesség esetén a szabad magzati DNS mennyisége milyen összefüggést mutat a hajlamosító tényezőkkel és közülük is a testtömegindex, illetve a várandós plazmájában keringő összes szabad DNS-sel. Vizsgálatunk során, az irodalmi adatokkal egybehangzóan, az összes szabad DNS és a szabad magzati DNS mennyiségét egyaránt emelkedettnek találtuk praeclampsiaival szövődött terhesség esetén. Ugyanakkor ezek az adatok, annak ellenére, hogy szignifikáns eltérés mutatkozott a két csoport között, nem mutattak összefüggést a testtömegindex vonatkozásában. Hasonlóképpen, az összes DNS, valamint a magzati eredetű DNS plazmaszintje között sem találtunk szignifikáns összefüggést. Ennek hátterében a hepatocellularis és endothelkárosodás eltérő mértéke állhat, amelynek következtében az anyai vérplazmába kerülő szabad DNS emeli a praeclampsias csoportban mért DNS mennyiségét. A szabad magzati DNS mennyiségének változása döntő mértékben trophoblasteredetű, ezért mennyiségének változása nagy valószínűséggel a placentáció zavarával hozható összefüggésbe. Figyelembe véve a vérplazma mennyiségének változását, az eltérő mértékű endothel- és hepatocellularis károsodás mértékét, az összefüggések felderítése további vizsgálatok végzését teszi szükségessé.

Irodalom

- [1] *Witlin, A. G., Sibai, B. M.*: Hypertension in pregnancy: current concepts of preeclampsia. *Annu. Rev. Med.*, 1997, 48, 115–127.
- [2] *Dekker, G. A., Sibai, B. M.*: Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, 179, 1359–1375.
- [3] *Lim, K. H., Zhou, Y., Janatpour, M. és mtsai*: Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am. J. Pathol.*, 1997, 151, 1809–1818.
- [4] *Zhong, X. Y., Laiyuori, H., Livingston, J. C. és mtsai*: Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2001, 184, 414–419.
- [5] *Holzgreve, W., Hahn, S.*: Novel molecular biological approaches for the diagnosis of preeclampsia. *Clin. Chem.*, 1999, 45, 451–452.
- [6] *Leon, S. A., Green, A., Yaros, M. J. és mtsai*: Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J. Immunol. Methods*, 1975, 9, 157–164.
- [7] *Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. és mtsai*: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.*, 1977, 37, 646–650.
- [8] *Wataganara, T., Metzzenbauer, M., Peter, I. és mtsai*: Placental volume, as measured by 3-dimensional sonography and levels of maternal plasma cell-free fetal DNA. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2005, 193, 496–500.
- [9] *Lázár, L., Nagy, B., Bán, Z. és mtsai*: Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clin. Chem.*, 2006, 52, 1599–1601.
- [10] *Lázár L., Bán Z., Szakács O. és mtsai*: Szabad magzati DNS kimutatása a magzati Y-kromoszóma igazolásával anyai vérplazmából. *Orv. Hetil.*, 2003, 144, 2405–2409.
- [11] *Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F. és mtsai*: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997, 350, 485–487.
- [12] *Wataganara, T., Peter, I., Messerlian, G. M. és mtsai*: Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels. *Obstet. Gynecol.*, 2004, 104, 545–550.
- [13] *Sibai, B., Dekker, G., Kupferminc, M.*: Pre-eclampsia. *Lancet*, 2005, 365, 785–799.
- [14] *Smid, M., Vassallo, A., Lagona, F. és mtsai*: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma in pathological conditions associated with placental abnormalities. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 2001, 945, 132–137.
- [15] *Lo, Y. M., Leung, T. N., Tein, M. S. és mtsai*: Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin. Chem.*, 1999, 45, 184–188.
- [16] *Swinkels, D. W., de Kok, J. B., Hendriks, J. C. és mtsai*: 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, 650–653.

(Lázár Levente dr.,
Budapest, Baross u. 27., 1088
e-mail: lazar_levente@hotmail.com)

 **Aldara**[®]
5% krém
imikimod

a krém, amely ott stimulálja
az immunrendszert,
ahol szükség van rá!

- Aktinikus keratózis
- Superficialis basalsejtes karcinoma
- Condyloma acuminatum



RÖVIDÍTETT ALKALMAZÁSI ELŐÍRÁS

Aldara[™] 5% krém

Hatóanyag: 12,5 mg imikimod 250 mg krém (5%), tasakonként. **Javallat:** az imikimod krém felnőtt betegekben az alábbi kórképek helyi kezelésére javasolt: Aktinikus keratózis (AK) (nem hyperkeratosos, nem hypertrophiás, arcon, hajas fejbőrön, ép immunrendszerű betegeken, ha egyéb helyi kezelés ellenjavallt vagy kevésbé alkalmas); Superficialis basalsejtes karcinómák (sBCCs) (kis kiterjedésű); Condyloma acuminatum (külső nemiszerveken és a végbélnyíláson). **Adagolás:** AK: az imikimod krémet 4-8 hétig, hetente 3 alkalommal kell felvinni a kezelendő területre, és mintegy 8 órán keresztül – jellemzően az alvási időszak alatt – a bőrön kell hagyni. *Condyloma acuminatum:* az imikimod krémet max. 16 hétig, hetente 3 alkalommal kell felvinni a kezelendő területre, és mintegy 6-10 órán keresztül – jellemzően az alvási időszak alatt – a bőrön kell hagyni. *sBCCs:* az imikimod krémet 6 hétig, hetente 5 alkalommal kell felvinni a kezelendő területre, és mintegy 8 órán keresztül – jellemzően az alvási időszak alatt – a bőrön kell hagyni. **Az alkalmazás módja:** az imikimod krém felvitele előtt a kezelendő területet nyílt szappanos vízzel meg kell mosni, majd alaposan meg kell szárítani. Megfelelő mennyiségű krémet kell felvinni úgy, hogy a kezelendő területet megfelelően fedje, beleértve a daganat körüli 1 cm-es bőrfelületet is. A krémet a kezelt felületre a teljes felszívódásig kell bedörzsölni. Az imikimod krémet lefekvés előtt kell felvinni a kezelendő területre, és a bőrön kell hagyni, mintegy 6-10 órán keresztül. Ezalatt a tusolást és fürdést kerülni kell. Ezt követően az imikimod krémet feltétlenül el kell távolítani kímélő szappanos vízzel. A már egyszer felbontott tasakot nem szabad újra felhasználni. A krém alkalmazása előtt és után alaposan kezdet kell mosni kímélő szappanos vízzel. Az imikimod krém tumorra gyakorolt hatását ellenőrizni kell 12 héttel a kezelés befejezését követően. Ha a daganat a kezelésre nem reagál megfelelően, akkor más terápiát kell alkalmazni. **Ellenjavallatok:** imikimoddal vagy a krém bármely segédanyagával szemben ismert túlérzékenység. **Nemkívánatos hatások:** a leggyakoribb jelzett mellékhatások az imikimod kezeléshez valószínűleg, vagy lehetséges módon kapcsolható helyi reakciók voltak (fertőzés, viszketés, fájdalom, égő érzés, irritáció a kezelés helyén). **Figyelmeztetés:** az imikimod krém használata nem ajánlott, amíg az előzőleg alkalmazott gyógyszeres, vagy sebészi kezelést követően a bőr meg nem gyógyult. Imikimod krémmel történő kezeléskor szoros fedőkötés alkalmazása nem javasolt. Terhes nőnek való felírásnál körültekintően kell eljárni. Valószínűleg, hogy a kezelésnek bármilyen hatása lenne a gépjárművezetéshez és a gépek üzemeltetéséhez szükséges képességekre. **Forg. eng. szám:** EU/1/98/080/001. **Kiadhatóság:** kizárólag orvosi rendelvényhez kötött gyógyszer (V). **Tértési díj:** 17 981 Ft (NT). • ALD20100416 • Lezárás dátuma: 2010. 04. 16.

Felírás előtt kérjük, tanulmányozza a részletes alkalmazási előírást!

További információ: MEDA Pharma Hungary Kft.
1139 Budapest, Váci út 91. • Tel.: (1) 236-3410
E-mail: info@meda.hu • www.meda.hu • www.meda.se

MEDA