

Wybrane zagadnienia dotyczące badań nad wolnokrążącym materiałem genetycznym płodu w świetle doniesień prezentowanych na IV Środkowo-Wschodnim Europejskim Sympozjum na temat wolnokrążących kwasów nukleinowych w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej

Selected aspects of research concerning free fetal genetic material in the light of reports from “4th Central Eastern European Symposium on free nucleic acids in non-invasive, prenatal diagnosis”

Agnieszka Orzińska

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej
 Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Poszerzająca się wiedza o wolnokrążących kwasach nukleinowych płodu w krwiobiegu kobiety ciężarnej, ich potencjalnym wykorzystaniu w diagnostyce i o postępach technologii umożliwiających badanie tego materiału stała się punktem wyjścia dla zorganizowania spotkań specjalistów z tej dziedziny w ramach Środkowo-Wschodniego Europejskiego Sympozjum na temat wolnokrążących kwasów nukleinowych w nieinwazyjnej diagnostyce prenatalnej (*Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-invasive Prenatal Diagnosis*). W dniach 25–26 maja 2016 roku w chorwackim Splicie odbyło się czwarte spotkanie tej grupy. Kolejne sympozjum planowane jest na 2018 rok w Debreczynie na Węgrzech.

Sympozjum dotyczyło różnych aspektów badania wolnokrążących kwasów nukleinowych płodu w krwiobiegu ciężarnych. Jak wiadomo, początkowo badania pozakomórkowego DNA płodowego w osoczu matki (cff-DNA, *cell free fetal DNA*) skupiały się na badaniach ciężarnych z przeciwciałami do antygenów komórek krwi w celu określenia grupy krwi dziecka i oszacowania ryzyka

wystąpienia konfliktu serologicznego między matką a płodem lub na badaniach ciężarnych Rh-ujemnych bez przeciwciał do śródciażowej kwalifikacji do immunoprofilaktyki anty-D. Jednakże dynamiczny rozwój badań nad tym materiałem w ostatnich latach doprowadził do opracowania licznych badań prenatalnych dotyczących innych aplikacji, takich jak wykrywanie mikrodelekcji, delecji, chorób monogenowych lub sprzężonych z płcią czy aberracji genomowych, w tym z użyciem testów komercyjnych do nieinwazyjnych przesiewowych badań aneuploidii płodu. Część wykładów prezentowanych w ramach czwartego sympozjum dotyczyła aktualnego stanu wdrożenia i wykorzystywania testów wykrywających najbardziej powszechne aneuploidie płodu w laboratoriach diagnostycznych krajów Europy Środkowej i Wschodniej.

Na wykładzie otwierającym profesor Y Lo zaprezentował najnowsze obserwacje dotyczące diagnostyki płodu opartej na cff-DNA. Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, *deoxyribonucleic acid*) krążący w osoczu ciężarnej pochodzi z czterech źródeł — głównie z frakcji neutrofilii oraz frakcji limfocytów,

komórek wątroby i z łożyska. Udział procentowy tych frakcji zmienia się w czasie ciąży na korzyść cff-DNA pochodzącego z komórek łożyska z 10% w pierwszym trymestrze do 40% w trzecim, przy malejącym udziale DNA z wątroby (z 10% do 2%) i neutrofilii (z 60% do 40%). Badacze przedstawili przypadek ciężarnej, u której test DNA z osocza wykazał fałszywie aneuploidię u płodu, która była wynikiem występowania u matki chłoniaka grudkowego (*follicular lymphoma*) z frakcją limfocytów B ze zmienioną liczbą kopii chromosomów. Mierzone w teście DNA osocze pochodziło głównie z frakcji limfocytów obarczonych tą aberracją. Badacze postulowali konieczność wprowadzenia identyfikacji źródła badanego DNA osoczewego (poprzez tzw. *plasma DNA tissue mapping*) dla wykluczenia możliwości uzyskania fałszywych wyników genetycznych płodu. Podobne zmiany w udziałach frakcji wolnokrążącego DNA w osoczu stwierdzono u osób z chorobami autoimmunologicznymi, takimi jak toczeń rumieniowaty układowy (SLE, *systemic lupus erythematosus*) lub u pacjentów z nowotworem wątroby (*hepatocellular carcinoma*).

Podsumowując — obok zjawiska zanikającego brata bliźniaka i mozaikowatości łożyska także wariacje liczby kopii (CNVs) w chorobach nowotworowych lub mozaikowatości matki mogą być źródłem fałszywych wyników spotykanych w diagnostyce prenatalnej opartej na DNA wyizolowanym z osocza [1].

Szczególnie ciekawą grupę wykładów stanowiły prezentacje związane z identyfikacją różnych cząsteczek kwasów nukleinowych krążących w krwioobiegu jako biomarkerów wystąpienia chorób okresu ciąży, patologii płodu czy chorób ciężarnej.

Zespół czeski zaprezentował pracę dotyczącą badania poziomu informacyjnego kwasu rybonukleinowego (mRNA, *messenger ribonucleic acid*) białek szoku cieplnego (HSP, *heat shock protein*): Hsp27, Hsp60, Hsp70, Hsp90, HspBP1, wykonaną techniką *real-time PCR* w eluacie kwasów nukleinowych z osocza ponad 100 ciężarnych z grupy z nadciśnieniem indukowanym ciążą, preeklampsją lub hipotrofią wewnątrzmaciczną (IUGR, *intrauterine growth restriction*). Białka HSP regulują homeostazę komórki i w warunkach fizjologicznych mają niskie stężenie, lecz w ciąży ich stężenie wzrasta pod wpływem czynników prozapalnych, stresu oksydacyjnego lub uszkodzenia komórek wątroby. Badacze zaobserwowali istotne statystycznie podwyższenie ekspresji Hsp70 w grupie ciężarnych z preeklampsją i postulowali możliwość zastosowania tego markera jako wskaźnika odpowiedzi na stres w tym stanie patologicznym [2].

Poszukiwanie biomarkerów ułatwiających wczesną diagnostykę prenatalną skupia się w ostatnich latach na badaniach mikro-RNA (miRNA) — krótkich, niekodujących molekuł, które zaangażowane są w regulację ekspresji genów w organizmach eukariotycznych poprzez parowanie do transkryptów mRNA i wpływ na proces ich transkrypcji lub degradacji. Cząsteczki miRNA liczą 18–25 nukleotydów, opisano ponad 2 tys. ich sekwencji, są odporne na działanie rybonukleazy (RNAzy), zamrażanie i zmiany współczynnika pH, a różne typy komórek mają swój specyficzny profil ekspresji 200–600 rodzajów miRNA. Molekuły miRNA pochodzące z łożyska lub komórek płodu wykrywa się także w krwioobiegu matki; kwas ten może posłużyć jako nowy materiał będący wskaźnikiem prognostycznym wystąpienia ciąży patologicznej.

Zespół czeski jako przykład zaprezentował wyniki badań przesiewowych prowadzonych w pierwszym trymestrze w kierunku wykrywania ciąży zagrożonych wystąpieniem nadciśnienia indukowanego ciążą na podstawie profilu kilku miRNA z chromosomu 19 (miR: 516-5p, 517, 518a, 520a, 520h, 525, 526a) specyficznych dla łożyska, a wykrywanych także w krwioobiegu matki. Badacze przebadali techniką *real-time PCR* poziom ekspresji miRNA w osoczu ciężarnych chorych i zdrowych oraz wykazali istotnie podwyższony poziom miRNA, a zwłaszcza miR-520h, którego pozytywna wartość predykcyjna wynosiła 84% przy 7-procentowym poziomie fałszywie pozytywnym [3].

Natomiast zespół węgierski przedstawił pracę dotyczącą identyfikacji miRNA, które związane są z regulowaniem mechanizmów patogenezы preeklampsji — choroby występującej w 3–8% ciąży na świecie. Poprzez badania własne oraz analizę bioinformatyczną dostępnych baz danych dotyczących profili ekspresji miRNA i mRNA łożyska w zdrowych i chorych ciążach badacze opracowali sieć zależności ekspresji miRNA z mRNA dla 52 genów łożyska i 33 rodzajów miRNA oraz zidentyfikowali kilka mechanizmów ich regulacji [4].

W kolejnej prezentacji zespół węgierski omówił badania miRNA w osoczu kobiet ciężarnych noszących płód z wrodzoną chorobą serca (CHD, *congenital heart disease*) w porównaniu do grupy kontrolnej. Analiza ekspresji miRNA techniką ilościowego *real-time PCR* z zastosowaniem dobranej listy 84 genów (w tym 60 ulegających ekspresji w komórkach łożyska), specyficznej dla chorób kardiologicznych, wykazała istotnie podwyższone stężenie miR: let-7c, let 7e, 100, 199a, 423 — zarówno w osoczu ciężarnych, jak i w próbkach komórek serca płodów chorych względem grupy kontrolnej. Wykryto istotną

statystycznie korelację między wiekiem ciąży a wzrastającym stężeniem miRNA w grupie chorej i brak tej tendencji w grupie kontrolnej [5].

Z punktu widzenia rozwoju technologii służącej do badania DNA płodowego — od 1997 roku rozpoczęła się era techniki *real-time PCR*. Jednakże ograniczenia tej metody były punktem wyjścia do rozwoju ery sekwencjonowania następnej generacji (NGS) dominującej od 2011 roku na rynku badań przeglądowych aneuploidalności. Badacze węgierscy wskazali jednakże, że do badań rzadkich chorób monogenowych płodu, takich jak achondroplazja lub cystis fibrosis (1 : 2000), ogromna pojemność, koszty i czas badań technologią NGS są nieuzasadnione i od 2015 roku nadchodzi era cyfrowego PCRu (*digital PCR*), czyli powrotu do odmiany techniki *real-time PCR*, szczególnie przydatnej do badań w niskiej skali w medycynie spersonalizowanej. Technika ta pozwala także na prosty pomiar ilości materiału płodu. Autorzy zaprezentowali schemat protokołu badań cff-DNA, w którym techniką *digital PCR* zliczali odsetek DNA płodu na podstawie pomiaru niestrawionej sekwencji genu *RASSF1A*, i jako minimalny próg frakcji płodowej w badanej próbce, niezbędny dla otrzymania wiarygodnych wyników badań patologii płodu, wyznaczyli 4% [6].

Z kolei ciekawe prace nad opracowaniem mikrotęstów do wykrywania cff-DNA zaprezentował zespół hiszpański. Opracowywane przez nich badanie ma służyć jako test przesiewowy do wykrywania genu *RHD* płodu u kobiet RhD-ujemnych z równoległym potwierdzeniem obecności materiału płodowego w próbce przez wykrycie niestrawionej sekwencji genu *RASSF1A* płodu. W ramach projektu EU/ANGELAB (*A New Genetic Laboratory for non-invasive prenatal diagnosis*) badacze wystandaryzowali urządzenie typu *lab-on-a-chip* do przeprowadzania reakcji trawienia enzymatycznego oraz amplifikacji *real-time PCR* w układzie mikrofluidowym o niskiej objętości reakcji z mrożonymi lub wysuszonymi odczynnikami. Autorzy zoptymalizowali protokół trawienia z zastosowaniem równocześnie trzech enzymów restrykcyjnych i 3,5-godzinnej inkubacji dla 25ul eluatu DNA z osocza oraz reakcję amplifikacji w tripleksie eksonów 5 i 7 genu *RHD* oraz genu *RASSF1A* w 5ul oraz w 9,8 ul eluatu DNA (izolowanego zestawem *Chemagic Viral Nucleic Acids Kit*); z sukcesem zaadaptowali test na format *lab-on-a chip* [7, 8].

Zespół badaczy ze Słowacji zaprezentował standaryzację protokołu wykrywania genu *RHD* płodu u kobiet RhD-ujemnych w pierwszym i drugim trymestrze ciąży z 50 ul DNA izolowanego z osocza zestawem QIAamp DSP Virus Kit (Qia-

gen) przez amplifikację eksonów 7 i 10 genu *RHD* techniką *real-time PCR* oraz genów kontrolnych hemoglobiny *HBB* i *SRY* z chromosomu Y. Badacze uzyskali 100% specyficzności i czułości reakcji dla grupy 65 próbek osocza [9].

Na sympozjum zaprezentowano pracę zespołu z Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej (IHIT) podsumowującą 15 lat nieinwazyjnych badań antygenów komórek erytrocytarnych i płytkowych płodu z cff-DNA wyizolowanego z osocza kobiet ciężarnych prowadzonych w IHIT, a także przedstawiono wyniki najnowszych badań u ciężarnych z niezgodnościami serologicznymi dotyczącymi antygenów płytkowych prowadzonych techniką sekwencjonowania następnej generacji.

Podsumowując, prace zaprezentowane w ramach sympozjum poszerzają nasze spojrzenie na bogactwo cząsteczek kwasów nukleinowych wolnokrążących w krwioobieg ciężarnej i pozwalają przypuszczać, że w przyszłości materiał ten będzie szeroko wykorzystywany we wczesnej diagnostyce prenatalnej czynników predykcyjnych chorób okresu ciąży lub patologii płodu, w tym także tych o podłożu immunologicznym.

Piśmiennictwo

1. Sun K, Jiang P, Chan KC, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(40): E5503–E5512, doi: [10.1073/pnas.1508736112](https://doi.org/10.1073/pnas.1508736112), indexed in Pubmed: [26392541](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26392541/).
2. Hromadnikova I, Dvorakova L, Kotlabova K, et al. Circulating heat shock protein mRNA profile in gestational hypertension, pre-eclampsia & foetal growth restriction. *Indian J Med Res*. 2016; 144(2): 229–237, doi: [10.4103/0971-5916.195037](https://doi.org/10.4103/0971-5916.195037), indexed in Pubmed: [27934802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27934802/).
3. Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, et al. First trimester screening of circulating C19MC microRNAs and the evaluation of their potential to predict the onset of preeclampsia and IUGR. *PLoS One*. 2017; 12(2): e0171756, doi: [10.1371/journal.pone.0171756](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171756), indexed in Pubmed: [28182660](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28182660/).
4. Biró O, Nagy B, Rigó J. Identifying miRNA regulatory mechanisms in preeclampsia by systems biology approaches. *Hypertens Pregnancy*. 2017; 36(1): 90–99, doi: [10.1080/10641955.2016.1239736](https://doi.org/10.1080/10641955.2016.1239736), indexed in Pubmed: [27835046](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27835046/).
5. Biró O, Cobellis G, Rigó J, Jr, Nagy B. Let-7c miRNA, a new circulating biomarker of congenital heart disease. *Paediatr Croat*. 2016; 60(Suppl. 2): 36.
6. Nagy N, Szell M. Non-invasive screening alternatives for rare monogenic diseases. *Paediatr Croat*. 2016; 60(Suppl. 2): 10.
7. Rodriguez-Martinez A, Diez E, Achalandabaso E, et al. Optimised digestion protocol for RASSF1A detection as fetal marker in cfDNA. *Paediatr Croat*. 2016; 60(Suppl. 2): 38.
8. Rodriguez-Martinez A, Diez E, Achalandabaso E, et al. Good performance of freeze dried reagents for the detection of circulating free fetal DNA in lab-on-chip devices. *Paediatr Croat*. 2016; 60(Suppl. 2): 39.
9. Lasabova Z, Svecova I, Loderer D, et al. Our experience with non-invasive prenatal testing. *Paediatr Croat*. 2016; 60(Suppl. 2): 11.