

Sodobna uporaba analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini

Contemporary use of cell-free nucleic acids analysis in laboratory medicine

Darko Černe

Povzetek: Zunajcelične nukleinske kisline so nukleinske kisline, ki se nahajajo v plazmi, serumu, pa tudi v drugih bioloških vzorcih zunaj celic. Njihova analiza omogoča neinvaziven vpogled v tkivo oziroma organ, iz katerega zunajcelične nukleinske kisline izhajajo. V prispevku je predstavljena sodobna uporaba kvantitativne in kvalitativne analize zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini. V prvem delu je na primeru pljučnega raka predstavljen kronološki razvoj različnih analitskih pristopov, v drugem pa uporaba na področju neinvazivne prenatalne diagnostike genskih in genomskih sprememb ploda ter bolezni oziroma zapletov v nosečnosti. V zadnjem delu prispevka so navedeni izbrani primeri uporabe na ostalih področjih laboratorijske medicine. Analiza zunajceličnih nukleinskih kislin v laboratorijski medicini pomeni sodobno raziskovalno orodje, zanimiv strokovni izziv ter alternativo oziroma dopolnilo analitiki proteinov.

Ključne besede: *izvencelične nukleinske kisline, analiza, uporaba, laboratorijska medicina*

Abstract: Cell-free nucleic acids are nucleic acids in plasma, serum or in cell-free fraction of various others biological fluids. Their analysis offers noninvasive inspection of the tissue or organ of their origin. The paper reviews contemporary use of quantitative and qualitative analysis of cell-free nucleic acids in laboratory medicine. The first part summarises chronologic development of major analytical approaches to cell-free nucleic acids analysis in the case of medical assessment of lung cancer patients. The second part presents the use of cell-free nucleic acids analysis in noninvasive diagnosis of gene and genome alterations of the fetus and diseases and complications of pregnancy. The last part indicates the prominent examples of its use in the other areas of laboratory medicine. Cell-free nucleic acids analysis in laboratory medicine means a novel research tool, an interesting professional challenge and alternative or supplement to protein analysis.

Key words: *cell-free nucleic acids, analysis, applications, laboratory medicine*

1 Uvod

Zunajcelične nukleinske kisline (zNK in njihove podvrste, kot so zDNA, zRNA, zmRNA itd.) so nukleinske kisline, ki se nahajajo v plazmi, serumu, pa tudi v drugih bioloških vzorcih zunaj celic (urin, likvor, bronhialni izpirek itd.) (1-3). Odkrila sta jih Mandel in Metais leta 1947 (4). Dolgo neopaženo odkritje je ponovno pritegnilo pozornost v sedemdesetih letih, zaradi odkritja zvišanih koncentracij zDNA v plazmi bolnikov s sistemskim eritematoznim lopusom (*systemic lupusom erythematosusom*) in kasneje v serumih rakavih bolnikov, še posebej tistih z napredovano obliko bolezni. Proučevanje zNK se je znova razmahnilo v devetdesetih letih, z razvojem novih analitskih metod za kvalitativno analizo DNA in kasneje metod za analizo mRNA (2).

zNK imajo lastnosti celičnih NK, le da so fragmentirane. Tako na primer je zDNA dvoverižna, nizkomolekularna skupina molekul velikosti od 0,5 do 21kb, strukturno povezanih s histoni v mono- in oligonukleosomi. zNK se v plazmi lahko nahajajo v obliki apoptotičnih telesc, mono- in

oligo-nukleosomov, proste in vezane na plazemske proteine. Koncentracije zNK v telesnih tekočinah so rezultat ravnotežja mehanizmov sproščanja iz celic (fiziološka ali patološka apoptoza, liza, nekroza ali še ne dovolj pojasnjen mehanizem aktivnega izločanja) in mehanizmov odstranjevanja (razgradnja z endonukleazami, odstranjevanje s celicami retikuloendotelnega sistema in makrofagi). Mehanizmi odstranjevanja so zelo učinkoviti (razpolovna doba eksogenih nukleosomov v krvi je le nekaj minut), vendar pa vezava zNK na proteine proces močno upočasni. V plazmi zdravih ljudi sta nivoja koncentracije zDNA do 50 µg/L in zRNA do 250 µg/L, pri bolnikih pa lahko v obeh primerih preseže 3000 µg/L (3).

Analiza zNK omogoča neinvaziven vpogled v dogajanje v tkivu oziroma organu, iz katerega zNK izhajajo. Njihova analiza predstavlja alternativo oziroma dopolnilo k analitiki proteinov. Danes se intenzivno proučuje uporaba kvalitativne in kvantitativne analize zNK predvsem v tumorski in prenatalni diagnostiki. Najnovejše strokovne objave pa nakazujejo neizmerne potencialne možnosti nadaljnje uporabe.

Namen prispevka je predstaviti sodobno uporabo kvalitativne in kvantitativne analize zNK v laboratorijski medicini. V prvem delu je na primeru pljučnega raka predstavljen kronološki razvoj različnih analitskih pristopov. V drugem delu je predstavljena sodobna uporaba na področju neinvazivne prenatalne diagnostike genskih in genomskih sprememb ploda ter bolezni oziroma zapletov v nosečnosti. V zadnjem delu prispevka pa so navedeni izbrani primeri uporabe na ostalih področjih laboratorijske medicine.

2 Obravnava bolnika s pljučnim rakom

Pljučni rak je po stopnji smrtnosti med najbolj nevarnimi oblikami raka na svetu. Največji problem predstavlja pomanjkanje klinično uporabnih, učinkovitih, neinvazivnih metod za zgodnje odkrivanje ter presejanje asimptomatskih posameznikov z visokim tveganjem. Kvalitativna in kvantitativna analiza zNK odpira številne nove možnosti neinvazivne, zgodnje presejalne diagnostike bolezni, pridobivanja prognostičnih podatkov in sledenja uspešnosti zdravljenja (5, 6).

Različne pristope k analizi zNK pri obravnavi bolnikov s pljučnim rakom podaja Preglednica 1. Analitski pristopi v danem trenutku so bili povsem odvisni od stopnje razvoja metod v molekularni biologiji, zato ima pregled kronološki značaj. Najstarejši analitski pristop je merjenje koncentracije celotne zDNA v plazmi ali serumu, v katerem imajo bolniki s pljučnim rakom v primerjavi z zdravimi ljudmi zvišane koncentracije zDNA, še posebej pri napredovani bolezni z metastazami (7). Z razvojem kvalitativnih metod v molekularni biologiji je bilo ugotovljeno, da ima zDNA rakavih bolnikov enake spremembe kot DNA v tumorskem tkivu, iz katerega izhaja. Kvalitativna analiza zDNA je pomembno izboljšala diagnostično specifičnost metod, ki je bila najpomembnejši problem predhodnega analitskega pristopa. Med spremembami v zDNA so najprej proučevali mikrosatelitske nestabilnosti in izgubo heterozigotnosti, kasneje pa predvsem mutacije v onkogenih in tumor-supresorskih genih, ki so značilne za tumorsko tkivo (na primer v genu *kras* ali *tp53*). Kadar je mutacija prisotna v tumorskem tkivu, obstaja velika verjetnost njene prisotnosti tudi v zDNA v plazmi. V primeru tumor-supresorskega gena *tp53* je mutacija prisotna v tkivu in odgovarjajoči zDNA v 73,1 %. Zaradi nizke pogostosti posamezne mutacije v tumorskem tkivu je nov diagnostični pristop zajemal analizo več mutacij v zDNA iz plazme istočasno. Tako na primer so v zDNA iz plazme našli vsaj eno od šestih genskih sprememb pri 60,7 % bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom v stadiju I, oziroma v 68,2 %, če upoštevamo le bolnike, ki so vsaj eno od omenjenih sprememb imeli istočasno tudi v tumorskem tkivu (8). Alternativa omenjenemu pristopu je analiza epigenetskih sprememb v zDNA. V zDNA v plazmi so našli hipermetilacijo gena *dap1* pri 39 % bolnikih z nedrobnoceličnim pljučnim rakom, vsaj eno spremembo (hipermetilacijo gena *dap1*, *rassf1* ali *pycard* ali mutacije gena *kras*) pa pri 74,5 % bolnikih oziroma v 82 %, če je bila vsaj ena od omenjenih sprememb istočasno prisotna tudi v tumorskem tkivu (9). Razvoj obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) je omogočil nov analitski pristop. Omogočena je bila analiza tudi različnih podvrst zmRNA. Sprva so določali zmRNA genov izraženih pri mnogih vrstah tumorjev, kasneje pa zmRNA genov s specifičnim izražanjem v primeru pljučnega tumorja. Tako na primer so pri analizi seruma našli zmRNA gena *hnrnpa2b* pri 77,8 % bolnikih s pljučnim rakom in zmRNA

vsaj enega od genov *hnrnpa2b* in *erbb2* pri vseh bolnikih (10). Ista raziskovalna skupina je analizirala zmRNA omenjenih genov tudi v bronhialnem izpirku in dosegla podobne uspehe (11). Pri tem je pomembno predvsem spoznanje o možnosti analize zNK tudi v različnih drugih bioloških vzorcih (bronhialni izpirek, urin, likvor, peritonealni izpirek itd.). Nov razvojni korak je omogočila verižna reakcija s polimerazo v realnem času in možnost merjenja koncentracije za pljučni tumor specifičnih zmRNA. Pri bolnikih s pljučnim rakom so na primer izmerili višje plazemske koncentracije zmRNA gena *hnrnpa2b*, kot pri bolnikih z benignimi pljučnimi boleznimi in višje kot pri zdravih preiskovancih (12). Pri standardizaciji plazemske koncentracije zmRNA gena *hnrnpa2b* glede na izražanje gena za β -aktin so bile razlike med bolniki s pljučnim rakom in kontrolno skupino (bolniki z benignimi pljučnimi boleznimi, na primer tuberkulozo, in zdravi) še močnejše izražene (13). S tem je analiza zNK postala v osnovi podobna klasični analizi tumorskih označevalcev. Vzporedno s proučevanjem diagnostične uporabnosti novih analitskih pristopov na trenutni stopnji razvoja biološko-molekularnih analitskih metod se je proučeval tudi njihov prognostičen pomen ter možnosti za boljše spremljanje zdravljenja bolezni. Na primer, na področju farmakogenomike nam analiza zDNA v plazmi omogoča neinvazivno zaznavo bolnikov s pljučnim rakom rezistentnih na različne vrste kemoterapije (14).

3 Prenatalna diagnostika genskih in genomskih sprememb ploda ter bolezni oziroma zapletov v nosečnosti

Analiza zNK ploda v krvi matere (pzNK in njegove podvrste, kot so pzDNA, pzRNA, pzmRNA itd.) predstavlja večji izziv od analize zNK pri rakavih bolnikih. V krvni obtok matere se sprostijo iz apoptotičnih oziroma poškodovanih plodovih celic posteljice, na primer trofoblastov in eritroblastov. Z današnjimi analitskimi metodami jih lahko zaznamo v 4. tednu nosečnosti, zanesljivo pa od 7. tedna dalje (15). Proti koncu nosečnosti je v plazmi matere do 6 % pzDNA od celotne zDNA.

pzNK so specifičen in občutljiv označevalec genskih in genomskih sprememb ter genskega izražanja ploda. V primerjavi s horionsko biopsijo ali amniocentezo omogoča analiza zNK zgodnejšo in predvsem neinvazivno diagnostiko bolezni ploda s prav nič slabšo diagnostično specifičnostjo in občutljivostjo (16). Je tudi obetavnejša od poskusov izolacije in analize intaktnih trofoblastov ali eritroblastov v krvi nosečnice (17). Posebnost pzNK je visoka fragmentiranost, kar v postopkih izolacije kratkoverižnih DNA izkoriščamo za koncentriranje pzDNA v primerjavi s celotno zDNA, žal pa to preprečuje detekcijo obsežnejših genskih sprememb ploda, kot so večje delecije ali vstavitve genov.

Primere zgodnje neinvazivne prenatalne diagnostike vrojenih in prirojenih bolezni ter genskega svetovanja z analizo pzNK navaja Preglednica 2. Mnogi laboratoriji za molekularno diagnostiko imajo utečeno rutinsko določanje plodovega spola. Dokaz nukleotidnih sekvenc kromosoma Y v plazmi matere pomeni moški spol ploda in odsotnost nukleotidnih sekvenc ženski. Zgodnja diagnostika plodovega spola se uporablja za izključitev dedovanja na kromosom X vezanih recesivnih bolezni (hemofilija, mišična distrofija Duchenne,

adrenoleukodistrofija itd.), ki jih je vseh skupaj približno 5 na 10000 rojstev. Dokaz ženskega spola bolezen izključuje in zmanjša potrebo po invazivni prenatalni diagnostiki za 50 % (18). V primeru suma na kongenitalno adrenalno hiperplazijo zgodnja določitev plodovega moškega spola prepreči ali zmanjša nepotrebno zdravljenje s steroidi, ki se uporablja za preprečitev virilizacije pri ženskem plodu (19). Z novim diagnostičnim pristopom lahko zanesljivo določimo spol v primeru nenormalnega razvoja zunanjih spolnih organov, ko je ultrazvočna preiskava neuporabna. Analiza pzDNA omogoča relativno enostavno diagnostiko monogenskih prirojenih bolezni, ki se dedujejo avtosomno dominantno (Huntingtonova bolezen, ahondroplazija, miotonična distrofija), vendar le v primeru, če je bolezen prisotna pri očetu in materi bolezni nima. V primeru prisotnosti bolezni tudi pri materi pa je obvezna uporaba invazivnih diagnostičnih postopkov. Diagnostika avtosomnih recesivnih monogenskih bolezni s pomočjo analize pzDNA je močno omejena in sicer le na izključevanje dedovanja sicer redkih kombiniranih heterozigotnih oblik bolezni. Dokaz odsotnosti okvarjenega očetovega alela pri plodu, ki pa pri materi ne sme biti prisoten, pomeni odsotnost kombinirane heterozigotne oblike bolezni in izključuje potrebo po invazivni prenatalni diagnostiki v primeru bolezni kot so: cistična fibroza, β -talasemija, mnoge hemoglobinske variante – z izjemo hemoglobina S, kongenitalna adrenalna hiperplazija, pa tudi klasična oblika galaktozemije. S takšnim presejalnim pristopom lahko zmanjšamo potrebo po invazivni diagnostiki za 50 % (20). Analiza pzNK veliko obeta v diagnostiki aneuploidij. Kmalu bodo dosegljivi tudi prvi komercialno dostopni diagnostični testi (21). Diagnostika v tem primeru temelji na določitvi količinskega razmerja obeh alelov pri heterozigotnem polimorfizmu posameznega nukleotida (SNP). Predpogoj je analiza izključno genetskega materiala plodu in ne matere. Analiziran gen mora biti na kromosomu proučevane aneuploidije (v primeru diagnostike Downovega sindroma na kromosomu 21). Primer je kvantitativna analiza heterozigotnih SNP-ov v pmRNA gena *plac4* (gen se nahaja na 21. kromosomu, izražanje gena pa poteka le v posteljici in je odraz genskih lastnosti ploda).

Količinsko razmerje heterozigotnih SNP-ov 1:2 je dokaz Downovega sindroma, razmerje 1:1 pa pomeni, da sta kromosoma 21 dva, kar sindrom izključuje (22). Najnovejše instrumentalne tehnike (digitalna verižna reakcija s polimerazo, določanje zaporedja s kvantifikacijo števila oligonukleotidov) pa omogoča odkrivanje že najmanjših spremenjenih količinskih kromosomskih razmerij in sicer brez zahteve po heterozigotnosti SNP-a in/ali ločbe pzNK od zNK matere (23, 24).

Druga možnost prenatalne uporabe analize pzNK je neinvazivna diagnostika bolezni in zapletov v nosečnosti ter prognozična sklepanja in ocenjevanje uspešnosti zdravljenja (primeri navaja drugi del Preglednice 2). Mnogi laboratoriji za molekularno diagnostiko imajo utečeno rutinsko določanje RhD statusa ploda. Dokaz nukleotidnih zaporedij gena za RhD v plazmi RhD negativne matere opozarja na neskladnost v RhD med plodom in materjo (pojavi se v 10 % nosečnostih) in na potrebo po ustrezni imunoprofilaksi za preprečitev hemolitične bolezni ploda; po drugi strani dokazana odsotnost njeno potrebo izključuje. Nov diagnostičen pristop zmanjša nepotrebno uporabo imunoprofilakse za 40 % (25). Drug primer uporabe je diagnostika in spremljanje motenj v rasti in razvoju posteljice, med katerimi je najpomembnejša preeklampsija (pojavi se v 5-10 % nosečnostih). Koncentracija pzDNA v plazmi nosečnice poraste za 2 do 3-krat že pred pojavom preeklampsije in je v času bolezni zvišana 2 do 14-krat (26). Kljub temu pa je zaradi velike biološke variabilnosti koncentracije pzDNA v plazmi matere in vpliva mnogih dejavnikov (teža matere, rasa itd.) uporaba omenjenega pristopa v presejalne namene pri asimptomatskih nosečnicah vprašljiva. Kvantifikacija pzmRNA gena za γ globin v plazmi matere je lahko dokaz in ocena obsega feto-maternalne krvavitve.

Najpogosteje uporabljena instrumentalna tehnika na področju analize pzNK je verižna reakcija s polimerazo v realnem času, zaradi enostavne dostopnosti, preiskušene dobre specifičnosti in občutljivosti ter možnosti analize večjih serij. Z določenimi spremembami le ta metoda omogoča tudi določanje metiliranih zNK. Hiter razvoj instrumentalnih tehnik ter uvajanje dosežkov elektronike in

Preglednica 1: Različni pristopi k analizi zunajceličnih nukleinskih kislin (zNK in podvrst, kot so zDNA, zRNA, zmRNA itd.) pri obravnavi bolnikov s pljučnim rakom.

Table 1: Major analytical approaches to cell-free nucleic acids analysis (zNK and their subpopulations, such as zDNA, zRNA, zmRNA itd.) in medical assessment of lung cancer patients.

Analitski pristop	Primeri	Dodatna pojasnila
Kvantitativna analiza zNK v plazmi ali serumu	Celotna zDNA (tudi celotna zRNA)	Dobra občutljivost, slaba specifičnost
Kvalitativna analiza zDNA	Mikrosatelitske nestabilnosti, izguba heterozigotnosti, mutacije v onkogenih in tumor-supresorskih genih	Visoka specifičnost; zaradi slabe občutljivosti analiziramo več mutacij istočasno
Analiza epigenetskih sprememb v zDNA (hipermetilacija nukleotidov)	V promotorju gena <i>cdkn2a</i> , v kodirajočem delu gena <i>dapk1</i> itd.	Visoka specifičnost; zaradi slabe občutljivosti analiziramo več sprememb in mutacij istočasno
RT-PCR in semikvantitativna analiza podvrst zmRNA v plazmi ali serumu	Geni <i>erbb2</i> , <i>magea2</i> , <i>hnrnpa2b</i> , <i>uchl1</i> , za telomerazni enoti itd.	Iskanje genov s specifičnim izražanjem v pljučnem tumorju
Analiza različnih drugih bioloških vzorcev	Urin, bronhialni izpirek itd.	Pomembno spoznanje o možnosti analize zNK tudi v drugih bioloških vzorcih
Verižna reakcija s polimerazo v realnem času in kvantitativna analiza podvrst zmRNA v različnih bioloških vzorcih	Gen <i>hnrnpa2b</i>	Analitski pristop podoben kot pri klasičnih biokemičnih tumorskih označevalcih

elektrotehnike v laboratorijsko medicino pa omogoča uvedbo povsem novih analitskih metod, na primer analizo produktov po verižni reakciji s polimerazo z masno spektroskopijo, digitalno verižno reakcijo s polimerazo in določanje nukleotidnega zaporedja z možnostjo vzporedne kvantifikacije oligonukleotidov. Njihova zanesljivost mora biti še potrjena, po drugi strani pa je njihova zahtevnost zaenkrat še neprimerna za množičnejšo uporabo.

Glede na objavljene rezultate je diagnostična zanesljivost analize pzNK zelo dobra. Spol je mogoče v prvem trimesečju pravilno določiti v 99,4 % nosečnosti (27), še več, vsi laboratoriji za molekularno diagnostiko v Veliki Britaniji so v obdobju enega leta pravilno določili spol v 97,6 % nosečnosti (18). Downov sindrom je mogoče diagnosticirati z občutljivostjo 90,0 % in specifičnostjo 96,5 % (22), kar je mnogo bolje od vseh dosedanjih neinvazivnih pristopov. Najpogostejši vzrok lažno pozitivnih rezultatov je sindrom izginjajočega dvojčka in sicer v primeru, da je njegova genetska zasnova drugačna od močnejšega zarodka. Sindrom in s tem možnost lažno pozitivnega rezultata lahko

izključimo z ultrazvočno preiskavo. V primeru dokazane prisotnosti sindroma je interpretacija rezultata nezanesljiva do 7. tedna nosečnosti, ko dvojček običajno popolnoma izgine. V primeru določanja spola takšen problem nastane pri 0,5 % nosečnosti (18). Mnogo resnejši so lažno negativni rezultati analize, ki so najpogosteje posledica premajhne količine ali preslabe kakovosti izoliranih pzNK. Analitski problem je možno rešiti z vzporednim določanjem dodatnih nukleotidnih zaporedij ploda, ki niso predmet zdravniške obravnave (univerzalni označevalec ploda). Dokaz njihove prisotnosti v izolatu pomeni zadostno količino kakovostnih pzNK primernih za zanesljivo analizo. Novejša analitna pristopa sta določanje epigenetsko spremenjenih nukleotidnih zaporedij ploda, na primer metiliranih nukleotidnih zaporedij v promotorju gena *rassf1* (pri odraslih so omenjene sekvence nemetilirane) (28) ali plodove oziroma posteljlične zmRNA tistih genov, ki pri materi niso izraženi (29). Predvsem slednji pristop veliko obeta, zaradi možnosti uporabe enostavnih in zanesljivih analitskih tehnik.

Preglednica 2: Področja uporabe analize zunajceličnih nukleinskih kislin ploda (pzNK in podvrst, kot so pzDNA, pzRNA in pzmRNA itd.) v krvi matere.

Table 2: Field of interests for fetal cell-free nucleic acids analysis (pzNK and their subpopulations, such as pzDNA, pzRNA in pzmRNA itd.) in the blood of pregnant woman.

Področje uporabe	Primeri	Dodatna pojasnila
<i>Zgodnja neinvazivna prenatalna diagnostika vrojenih in prirojenih bolezni ter gensko svetovanje</i>		
Določanje spola	Izključitev dedovanja na kromosom X vezanih recesivnih bolezni Optimizacija zdravljenja	Hemofilija, mišična distrofija Duchenne, adrenoleukodistrofija Kongenitalna adrenalna hiperplazija
	Nenormalen razvoj zunanjih spolnih organov	Ultrazvočna preiskava neuporabna
Avtosomne dominantne monogenske bolezni	Diagnostika/izključitev dedovanja (le če je bolezen prisotna pri očetu in mati bolezni nima)	Huntingtonova bolezen, ahondroplazija, miotonična distrofija
Avtosomne recesivne monogenske bolezni	Izključitev dedovanja kombiniranih heterozigotnih oblik bolezni (odsotnost okvarjenega očetovega alela pri plodu, ki pa pri materi ne sme biti prisoten)	Cistična fibroza, β -talasemija, mnoge hemoglobinske variante, kongenitalna adrenalna hiperplazija, klasična oblika galaktozemije
Aneuploidije	Diagnostika/izključitev	Downov sindrom, trisomija 18, trisomija 13
<i>Neinvazivna diagnostika bolezni in zapletov v nosečnosti, prognostična sklepanja in spremljanje zdravljenja</i>		
Določanje RhD statusa	Optimizacija preprečevanja zapletov v primeru neskladnosti v RhD	Zmanjšana nepotrebna imunoprofilaksa za 40 %
Motnje v rasti in razvoju posteljice	Diagnostika, spremljanje	Preeklampsija
pzmRNA gena za γ -globin	Dokaz in ocena obsega feto-maternalne krvavitve	Vprašljiva uporaba v presejalne namene
Analiza drugih pzmRNA	Spremljanje rasti in razvoja ploda, zgodnja diagnostika zapletov in spremljanje zdravljenja	Še neraziskano področje, ki veliko obeta

4 Izbrani primeri uporabe na ostalih področjih laboratorijske medicine

Analiza zNK omogoča diagnostiko in spremljanje mnogih bolezni. Plazemska koncentracije zmRNA gena za albumin ima boljšo diagnostično občutljivost za poškodbo hepatocitov kot plazemska koncentracija katalitične aktivnosti alanin-aminotransferaze (30). Pri bolnikih z opekljami so bile plazemske koncentracije zmRNA genov specifično izraženih v endotelijskih celicah premosorazmerne opečeni površini (31). Zvišane koncentracije zDNA gena za β -globin so našli v plazmi bolnikov z akutnim koronarnim sindromom (32), travmatskimi poškodbami (33) ali možgansko kapjo (34). V vseh treh primerih so visoke koncentracije napovedovale pogostejše hospitalne zaplete. Merjenje koncentracije zDNA genov moškega spolnega kromosoma pri ženskah prejemnicah organov ali tkiv moškega darovalca omogoča zaznavo in spremljanje zavrnitve presadka (35). Analiza zNK nam omogoča študijo etiologije bolezni in proučevanje novih načinov zdravljenja. Na primer, apoptotična razgradnja zDNA v plazmi bolnikov s sladkorno boleznijo nakazuje, da je zvečana koncentracija katalitične aktivnosti γ -glutamil-transferaze v plazmi posledica zvečane apoptoze celic (36). Z merjenjem koncentracije zDNA v peritonealnem izlivu, kot biokemičnem označevalcu celične smrti, lahko *in vivo* proučujemo biokompatibilnost različnih peritonealnih dializnih raztopin (37).

5 Zaključek

Kvantitativna in kvalitativna analiza zNK odpira številne nove možnosti neinvazivne, zgodnje presejalne diagnostike bolezni, pridobivanja prognostičnih podatkov in sledenja uspešnosti zdravljenja. Analiza zNK v laboratorijski medicini pomeni sodobno raziskovalno orodje, zanimiv strokovni izziv ter alternativo oziroma dopolnilo analitiki proteinov.

6 Literatura

1. Dovč-Drnovšek T, Emeršič B, Rožman P et al. Optimization of purification of human cell-free mRNA from plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1137: 125-129.
2. Lukač-Bajalo J, Černe D. Klinični pomen zunajcelične DNK. In: Kržišnik C, Batellino T. *Pediatrična pulmologija. Izbrana poglavja iz pediatrije* 17. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo, 2005: 65-84.
3. Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY et al. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and disease. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004; 23: 879-883.
4. Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *CR Acad Sci Paris* 1948; 142: 241-243.
5. Pathak AK, Bhutani M, Kumar S et al. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem* 2006; 52: 1833-1842.
6. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 2005; 49: 1-12.
7. Sozzi G, Conte D, Mariani L et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 4675-4678.
8. Andriani F, Conte D, Mastrangelo T et al. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer* 2004; 108: 91-96.
9. Ramirez JL, Sarries C, de Castro PL et al. Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients. *Cancer Lett* 2003; 193: 207-216.
10. Fleischhacker M, Beinert T, Ermitsch M et al. Detection of amplifiable messenger RNA in the serum of patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 945: 179-188.
11. Engel E, Schmidt B, Carstensen T et al. Detection of tumor-specific mRNA in cell-free bronchial lavage supernatant in patients with lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1022: 140-146.
12. Sueoka E, Sueoka N, Iwanaga K et al. Detection of plasma hnRNP B1 mRNA, a new cancer biomarker, in lung cancer patients by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Lung Cancer* 2005; 48: 77-83.
13. Kim JM, Hwang SH, Song EJ et al. Comparative Quantification of Plasma hnRNP B1 mRNA in Non-small Cell Lung Cancer Patients by Real-time PCR. *Korean J Lab Med* 2009; 29: 249-255.
14. Pathak AK, Bhutani M, Kumar S et al. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem* 2006; 52: 1833-1842.
15. Birch L, English CA, O'Donoghue K et al. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005; 51: 312-320.
16. Mujezinovic F, Alfirevic Z. Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2007; 110: 687-694.
17. Hahn S, Zhong XY, Holzgreve W. Recent progress in non-invasive prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 57-62.
18. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 139-151.
19. Bartha JL, Finning K, Soothill PW. Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 1135-1136.
20. Norbury G, Norbury CJ. Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we? *Semin Fetal Neonatal Med* 2008; 13: 76-83.
21. <http://www.sequenom.com/>, dostopno: avgust, 2009.
22. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW et al. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007; 13: 218-223.
23. Lo YM, Lun FM, Chan KC et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13116-13121.
24. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 16266-16271.
25. Van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J et al. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006; 13: 53-57.
26. Hahn S, Huppertz B, Holzgreve W. Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation? *Placenta* 2005; 26: 515-526.
27. Galbiati S, Smid M, Gambini D et al. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005; 117: 243-248.
28. Chan KC, Ding C, Gerovassili A et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of non-invasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 2006; 52: 2211-2218.
29. Tsui NB, Dennis Lo YM. Placental RNA in maternal plasma: toward noninvasive fetal gene expression profiling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 96-102.
30. Kudo Y, Ochi T, Shimada H et al. Utility of plasma circulating mRNA as a marker to detect hepatic injury. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 993-995.
31. Fox A, Gal S, Fisher N et al. Quantification of circulating cell-free plasma DNA and endothelial gene RNA in patients with burns and relation to acute thermal injury. *Burns* 2008; 34: 809-816.
32. Rainer TH, Lam NY, Man CY et al. Plasma beta-globin DNA as a prognostic marker in chest pain patients. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 110-113.
33. Lam NY, Rainer TH, Chan LY et al. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem* 2003; 49: 1286-1291.
34. Rainer TH, Wong LK, Lam W et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003; 49: 562-569.
35. Lui YY, Woo KS, Wang AY et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem* 2003; 49: 495-496.
36. Langford MP, Redens TB, Harris NR et al. Plasma levels of cell-free apoptotic DNA ladders and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in diabetic children. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 1160-1169.
37. Pajek J, Kveder R, Guček A et al. Cell-free DNA in the peritoneal effluents of peritoneal dialysis solutions. *Ther Apher Dial* 2010 14:20-26.