

Dolaşımdaki Serbest DNA ve Önemi

Free DNA in Circulation and its Importance

Doç.Dr.Sacide PEHLİVAN
Dr.Selahattin AVCI
Uzm.Tuğçe SEVER
Uzm.Ali BAYRAM
Doç.Dr.Sibel OĞUZKAN BALCI

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD.

Gaziantep Tıp Dergisi 2010;16(2):75-80.

Özet

Hücre nekrozu, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) gibi nedenlerden dolayı dolaşıma katılan ve dolaşım sisteminde plazma ya da serum örneklerinin saflaştırılması ile elde edilen, hücre bağımsız, çıplak, çift sarmal yapılı DNA'ya serbest DNA (sdDNA) adı verilmektedir. Yaklaşık olarak 130 yıl önce varlığı savunulmasına rağmen, son 20 yılda önemi daha iyi anlaşılmış ve Hematoloji, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Üroloji, Onkoloji, Cerrahi, Nöroloji gibi tıbbin birçok alanında yoğun çalışmalar yapıldığı örnekler arasında yerini korumaktadır. Bu derlemede; Serbest DNA nedir? Hangi alanlarda daha yoğun çalışılmaktadır? Gelecekte tanı ve tedavide umut vaat eden sonuçlar vermekte midir? gibi soruların cevaplanmaya çalışıldığı literatür bilgileri özetlenmeye çalışıldı.

Anahtar Kelimeler: Serbest DNA, Apoptoz, Nekroz, Genetik tanı.

Abstract

The cell-free, nude and double helix structured DNA, which joins circulation for reasons such as cell necrosis and programmed cell death (apoptosis) and is obtained by the purification of plasma or serum samples in the circulatory system, is called Free DNA (fdDNA). Although it is advocated to have existed approximately 130 years ago, its importance has been understood better for the last 20 years, and it preserves its place among the cases in which intensive studies are made in many fields of medicine such as Hematology, Gynecology and Obstetrics, Urology, Oncology, Surgery and Neurology. In this collection, it will be intended to summarize literature information wherein it is intended to answer questions such as what Free DNA is, in which fields it is studied more intensively and whether it yields promising results in diagnosis and treatment for the future.

Key Words: Cell free DNA, Apoptosis, Necrosis, Genetic diagnosis.

Giriş

Serbest DNA (sdDNA); hücre nekrozu, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) vb nedenlerden dolayı dolaşıma katılan ve dolaşım sisteminde plazma ya da serum örneklerinin saflaştırılması ile elde edilen, hücre bağımsız, çıplak, çift sarmal yapılı DNA'dır (1). Son 20 yıl içinde önemi daha anlaşılabilir olarak sağlık ile ilgili birçok alanda yoğun çalışmalar yapıldığı örnekler arasında yerini korumaktadır (2-6). Erkeklerde bireyin kendine ve herhangi bir enfeksiyon geçirdi ise enfeksiyon etkenine ait DNA ya da DNA'lar saptanabilirken, bayanlarda bunların yanında hamile ise fetusa ait ya da iz halinde de olsa önceki fetuslara ait DNA'nın bulunduğu da saptanmıştır (4). Hamilelik esnasında, anneden izole edilen çıplak DNA'nın yaklaşık olarak %95'i anneye ait iken %5'i fetus'a ait olup serbest fetal DNA (ffdDNA) adını alır. Sağlıklı bir hamilelik geçiren 1ml anne kanında genellikle 1 adet fetal hücre bulunmakla beraber patolojik hamileliklerin çoğunda bu oranın arttığı gösterilmiştir (7,8).

Serbest DNA'nın Tarihiçesi

Dolaşımda serbest DNA'nın varlığı 60 yıl önce Mandel ve Metaisin tarafından gösterilmesine karşın, ilk kez 1893 yılında Alman Araştırmacı Schmorl tarafından Eklemside-plasental orijinli ve çok nükleuslu hücrelerin varlığı ile kayıtlarda yer almıştır (9). 1908 yılında Mechnikov fagositozu göstererek Nobel ödülünü kazanması, 1964 yılında nekrozun tanımlanması ve 1966'da otoimmün hastalıklardan biri olan Sistemik Lupus Eritematus (SLE)'da hastaların serumunda gösterilmesi izlemiştir (10). Kanseri hastalarda da serbest DNA'nın belirlenmesi ve tümörlerle ilgili genetik değişikliklerinde bu DNA örneklerinde gösterilebilmesi önemini daha da artmasına yardımcı olmuştur (2-5,11). 1997 yılında anneye ait plazma örneklerinde fetusa ait DNA varlığının gösterilmesi, hamilelikte patolojik farklılıkların ayırt edilmesine yardımcı faktör olarak kullanılabileceğini göstermiştir (8,12).

Doç.Dr. Sacide PEHLİVAN, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Adres: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı. Şehitkamil/GAZİANTEP
Gsm: 0532 523 18 35 **Faks:** 0342 360 16 17 **E-mail:** psacide@hotmail.com, spehlivan@gantep.edu.tr

Geliş Tarihi: 01.04.2010 **Kabul Tarihi:** 29.04.2010

Farklı hastalık gruplarında yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar serbest DNA yardımıyla hastalıkların biyolojisini anlamamıza, klinik tanı ve hastalık prognozunun izlenmesinde yardımcı rolünün bulunabileceğini göstermiştir (1-13).

Serbest DNA kaynakları nelerdir veya neler olabilir?

Yapılan bir çok çalışmada serbest DNA'nın kökeni olarak hücrelerde gerçekleşen apoptoz yada nekroz olayları olduğu üzerinde durulmuş olsa da dolaşımdaki serbest DNA'nın çoğunluğunun apoptoz sonucu ortaya çıktığını düşünmek biraz güçtür (14,15).

Hücreler neden ölür?

Sorununun yanıtını bulmak önemlidir. En önemli olabilecek ilk neden; organizma için gereksinimi olmayan hücrelerin ortadan kaldırılmasıdır. Gelişim sırasında dokunun yapısal şeklinin sağlanması ve yaşam süresince dokunun aynı büyüklük ve şekilde kalması ile gelişim sırasında ve yetişkin dönemde hücre sayısının sabit tutulması ancak bu şekilde sağlanabilir. İkinci neden olarak ise; organizmadaki hasarlanmış hücrelerin uzaklaştırılma zorunluluğu (virus infekte hücreler, DNA hasarı) gösterilebilir. Tablo 1'de farklı hücre ölüm tiplerinin özellikleri yer almaktadır (16).

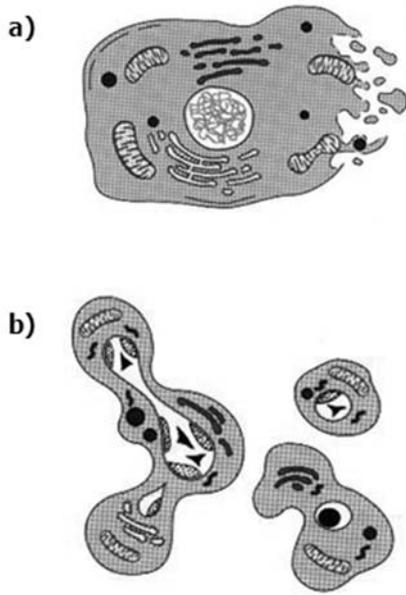
Apoptozis, hücre ölümünü başlatacak özel intihar sinyallerini içeren fizyolojik bir süreçtir. Genetik olarak düzenlenir. Embriyogenez, yaşlanma ve hastalıklar gibi biyolojik süreçlerde rol alır. İstenmeyen, hasarlı ya da bozulmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan bir fizyolojik ölüm çeşididir. Nekroz ise hücre hasara karşı oluşan patolojik bir yanıt olarak tanımlanabilir. Apoptoz ile nekroz oluşumu arasında önemli farklılıklar vardır (16). Bu farklılıklar;

1. Yol açan nedenler açısından önemlidir. Nekroz; iske mi, hipertermi, hipoksi, litik viral infeksiyon, yüksek konsantrasyonda toksisite ve şiddetli oksidatif stres tarafından meydana gelirken, apoptozise; büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, kanser ilaçları, teratojenler, radyasyon, yüksek doz Gluko-kortikoid kullanımı, fas ya da Tümör Nekroz Faktör-1 reseptörlerinin aktivasyonu ve sitotoksik T lenfositler neden olabilmektedir.

2. Morfolojik özellikler açısından farklılıkları bulunur. Nekrozda; hücre hasara patolojik yanıt vardır. Hücre şişmesi, mitokondriyal hasar, plazma membranı parçalanır, hücre içeriği dışarıya çıkar ve genel inflamatör yanıt oluşur. Apoptozisde; intihar sinyallerine fizyolojik yanıt vardır. Kromatin kondenzasyonu (DNA kırıkları), hücre büzüşme, blebbing ve fagositoz meydana gelir (Şekil 1 a ve b) (17).

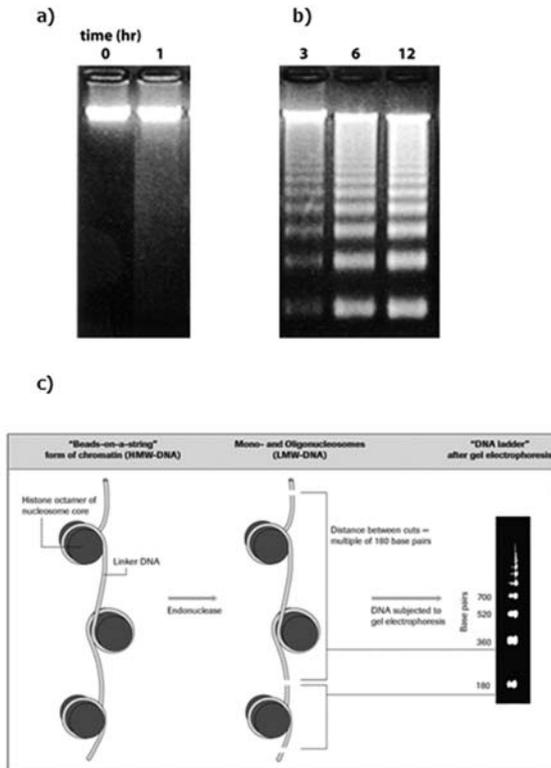
Tablo 1. Farklı hücre ölüm tiplerinin özellikleri (16).

Hücre Ölüm Tipi	Morfolojik Değişiklikler			Biyokimyasal Özellikler
	Nukleus	Membran	Sitoplazma	
Apoptozis	Kromatin kondensasyonu, DNA ladder	Blebbing	Apoptotik cisimler	Kaspaz bağımlı
Otofaji	Kısmi kromatin kondensasyonu, DNA ladder yok	Blebbing	Otofajik vakuollerin artışı	Kaspaza bağımlı değil; Lizozomal aktivite artışı
Mitotik katastrof (felaket)	Mikronukleus oluşumu; nuklear fragmantasyon	-	-	Kaspaza bağımlı değil (erken safhada); anormal CDK1/siklin b aktivasyonu
Nekroz	Nuklear DNA'nın tesadüfi yığılımı ve yıkımı	Şişme; kırılma	Vakuolleşme artışı; organel yıkımı; mitokondriyal şişme	-
Yaşlanma	Belirgin heterokromatik yapı		Yassılaşıma ve granulasyon	SA-β-gal aktivitesi



Şekil 1. Nekroz (a) ve apoptozun (b) hücresel görünümü (17).

3. Biyokimyasal özellikler açısından önemli farklılıklar gösterirler. Nekrozda; İyon dengesi bozukluğu olur, ATP gerekmez ve DNA rastgele parçalanır (Jel elektroforezinde smear). Apoptozisde; kontrollü bir mekanizma rol alır, ATP gerektirir ve DNA kırıkları (jel elektroforezinde ladder) meydana gelir. Şekil 2'de apoptoz ve nekroz oluşumu sonucunda meydana gelen DNA parçalanması yer almaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Nekroz oluşumu, apoptoz oluşumu ve oluşum mekanizması sonucundaki DNA'nın agaroz jel elektroforezdeki görünümü. a) Nekroz, b) Apoptoz, c) Apoptozun şematik gösterimi (17).

Apoptoz sonucunda görülen DNA degradasyonunda kromozal DNA 50-300 kb uzunluğunda parçalara ayrılmakta ve daha sonrasında 180-200 bp'lık daha ufak parçalara bölünmektedir. Ayrıca radyoterapi kemoterapi ya da diğer kanser tedavilerinin hedefi kanserli hücrelerde apoptozu indüklemektir. Tedavi sonrasında serbest DNA düzeylerinde gözlenen düşüş serbest DNA kökeni hakkında nekrozun daha önemli olduğu hipotezini destekler niteliktedir. Ayrıca lenfositlerin kültür ortamlarına çift sarmal DNA saldıkları da gözlenmiştir. Şu halde serbest DNA'nın birçok farklı kökene sahip olduğunu fakat en önemli kaynağın nekroz olduğunu bunu daha sonra ciddi miktarlarda apoptoz mekanizması ve hücrelerden direkt serbest DNA salınması ile gerçekleştiğini belirtebiliriz (16).

Serbest DNA nasıl elde edilir?

sDNA çalışmalarında, alınan kan örneğinin hangi koşullarda saklanacağı ve hangi protokol için kullanılacağı mutlaka önceden belirlenmeli ve gerekli koşullar sağlanmalıdır. sDNA serumda hücreden bağımsız olarak bulunduğundan, hücreyi parçalama, lipid ve proteinleri uzaklaştırma gibi işlemlere gereksinim duyulmadan direkt olarak plazma ya da serumdan DNA elde edilmektedir. Dolayısıyla klasik izolasyon yöntemlerinin kullanımına ihtiyaç yoktur (18,19).

Plazmadan sDNA izolasyonunda, olgudan alınan kan örneği steril EDTA'lı tüplere aktararak en fazla 2 saat içerisinde plazma ayrıştırılmalıdır. Ayrıştırma işlemine kadar oda ısısında (18-22°C) bekletilen kan örneklerinden plazma ayırmak için iki basamaklı santrifüj uygulanır (800 g 10 dk, 1600 g 10 dk). Lökosit kaynaklı DNA'ların karışmasını önlemek bakımından kan alındıktan sonraki bekleme süresi ve iki aşamalı santrifüj işlemi önemlidir. Elde edilen plazma örneklerinden sDNA eldesi mümkünse hemen yapılmalı ya da -80 °C'de muhafaza edilmelidir (5). sDNA eldesi için viral DNA izolasyon kiti (Hohaus S) ile periferik kandan DNA eldesi için kullanılan kitlerin yanı sıra triton X-100'ün kullanıldığı fenol-kloroform-izoamilalkol (THP) izolasyon protokolü de kullanılabilir (1,5).

İzole edilen sDNA'nın kaynağını saptamada; erkek fetal DNA için Y kromozomuna özgül oligonükleotidler ile PCR analizi yapılır ya da dolaşımdaki DNA'ya katılan maternal plazma örneklerinin tespiti için globin genine ait oligonükleotidler ile analizler yapılabilir (4,15). Metilasyon özelliklerine bakılarak sDNA'nın kanser hücresi kökenli olup olmadığı saptanabilir (1,2,20). sDNA çalışmalarında en önemli problem lökosit kaynaklı DNA'ların yol açtığı yalancı pozitif sonuçların oluşmasıdır. Bu nedenle kontaminasyondan korunmaya önem verilmelidir (2,5,7).

Serbest DNA çalışmalarının en yoğun yapıldığı hastalıklar

Literatüre baktığımızda serbest DNA konusunda 30.000'nin üzerinde yayının bulunduğu ve bu yayınların %80'inin son 10 yılda yapılmış olduğunu görmekteyiz.

Gebe kadınların plazmasında bulunan serbest fetal nükleik asitler prenatal tanı üzerinde önemli bir etki yaratarak Noninvasive pretanal tanının önünü açmıştır (4,7,21,22). Maternal dolaşımda bulunan hücre dışı serbest fetal DNA'nın ve dolayısıyla da RhD geninin tespit edilmesi bebeğin Rh durumunun non invaziv bir metodla tespitini mümkün kılmakta, Rh uygunsuzluğu olan gebelere bebek Rh durumu ortaya konarak gerekiyorsa anti-D uygulaması yapılması sağlanabilecektir (23). Preeklamsi, tekrarlayan düşükler gibi patolojik hastalarda çıplak DNA miktarındaki artışın endotelial fonksiyon bozukluğunun temel nedeni olabileceği kanıtlanamamakta beraber inflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin hücresel membranda ve DNA'da hasara neden olabileceği açıklanmıştır. Bunu kanıtlayan ve desteklemeyen çalışmalarda literatürde hızla artmaktadır (8,12,15,24,25).

Over kanserleri ile serbest DNA düzeyleri ilişkisini araştıran çalışma sonucunda; epitelyal overyan kanserlerde operasyon öncesi dönemde serbest DNA düzeylerinde ciddi bir artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca hastalığın mortalite hızı ile ilgili önemli fikirler vermektedir (26). Endometriyal kanserde serbest DNA, p53 antikoru ve KRAS gen mutasyonları arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada; tip 1 endometrial kanserlerde KRAS gen mutasyonu ve p53 antikoru düzeylerinin ikili testi, tip II endometriyal kanserlerde ise p53 antikoru düzeyleri ve serbest DNA ikili testinin hastalıkların erken tanınmasında fayda sağlayacağı saptanmıştır (3). Prostat kanserinde metastatik yayılım ve serbest DNA oranları ilişkisinin araştırıldığı çalışmada; hastalarda saptanan serbest DNA düzeylerinin şayet lenf nodu ya da uzak doku metastazı varsa ciddi oranlarda artış gösterdiği saptanmıştır (27). Kolorektal kanserlerin erken teşhisinde serbest DNA düzeyleri ve karsino embriyonik antijen (CEA) arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışma sonucu; özellikle de CEA düzeyleri ile birlikte ikili bir test olarak kullanıldığında serbest DNA düzeylerinin erken teşhiste önemli bir rol oynadığını göstermiştir (2). Otoimmün hastalıklardan Multipl Skleroz (MS) ve SLE'de yapılan çalışmalarda serbest DNA bazlı biyomarkerlerin gelecek çalışmalarda yangısal hastalıklara ve diğer nörolojik rahatsızlıklara sahip hastalarda kullanılabilir olduğu ortaya konmuştur (10,28). Kardiyo vasküler hastalıkların en önemlilerinden olan akut pulmoner embolide (APT) serbest DNA oranları ilişkisini konu alan araştırmalarda; hem köpekler hem de insanla yapılan çalışmalarda plazma serbest DNA konsantrasyonlarındaki artışın APT'nin ciddiyeti ile orantılı olduğu gösterilmiş ve APT sonrasında saptanan plazma serbest DNA konsantrasyonlarındaki artışın en muhtemel kaynağı pıhtılar olarak gösterilmiştir (29).

Hamile ve hamile olmayan bayanlarda vücut kitle indeksi ve serbest DNA oranları üzerine yapılan bir çalışma sonucunda, serbest DNA düzeyleri ve vücut kitle indeksi arasında bir ilişki gözlenmemiştir (4).

Farklı organizmaların oluşturduğu enfeksiyonların daha hızlı belirlenebilmesi, örneğin; insan plazmasında serbest şistosoma DNA'sı tayini ile şistosomiyasis tanısı konulması üzerine yapılan araştırma sonucunda; serbest parazit DNA'sı tayininin hastalığın en erken dönemlerinde dahi diğer tüm tanı testlerinden daha hızlı ve doğru şekilde tanı koyduğunu göstermiştir (6) Yoğun bakımda tedavi gören hastalardan izole edilen plazma DNA konsantrasyonundaki artışın mortalite ve sepsisle ilişkili olduğu bildirilmiştir (30).

Gelecekte serbest DNA sağlık alanında işe yarayabilir mi?

Serbest DNA; başta kanser, kadın hastalıkları ve doğum olmak üzere hemen hemen tüm alanlarında büyük önem arz edeceği düşünülmektedir. Serbest DNA tayininin daha ucuz ve hızlı metodlarla yaygınlaşması sonucu, hastalıktan ziyade hastaların retrospektif anamnezlerinin tayininde, genetikçilere uçsuz bucaksız imkanlar sağlayabilecektir. Dolaşımdaki serbest DNA'nın kantitatif analizi yönteminin uygulanabilir hale gelmesiyle birçok kanser türünde daha hızlı tanı konması ve tedavinin yönlendirilmesinde yardımcı olabilecektir. Ayrıca birçok kanser türü için de tarama testi olarak kullanılabilir. Serbest DNA hastalıkların tanı, tedavi ve tedavi sonrasında yapılacak çalışmalar için kullanılabilir. Örneklerin karşılaştırılmasında; operasyon öncesinde ve sonrasında oluşabilecek farklılıkları karşılaştırmak ve saptamak için ayrıca normal ve hasta örneklerini karşılaştırmak için kullanılabilir. Bunun yanında özellikle prenatal hatta antenatal dönemlerdeki genetik danışmanlık konusunda; hem anneye hemde fetal stres oluşturmadan doğru ve kesin tanıları konulması imkanı doğacak, obstetrik genetik danışmanlık konusunda yeni çağ açabilecektir.

Tüm bunların yanında şayet yeterli hassaslıkta ve süratte kalitatif ölçümler yapabilecek ve de en önemli giderek bir ticarethaneye dönüşen sağlık sektöründe "costeffective" olabilecek kitler geliştirilebildiği takdirde kanser ve yabancı organizmaların (parazit, virüs, bakteri) neden olduğu hastalıkların tayini, prognostik değerlendirilmesi ve mortalite risklerinin saptanmasında yine çok önemli faydalar sağlayabilecektir. Ayrıca bir başka kullanım alanı da kriminal dedektifler, adli ve transplantasyon patolojisi olabilecektir.

Sonuç olarak, serbest DNA çalışmaları günlük hayatımıza tamamı ile entegre oluncaya kadar merccek altında tutulması, itina ile üzerinde durulup geliştirilmesi gereken; modern tıpta tıpkı mikroskobun, penisilinlin ya da insan gen haritasının çıkartılması kadar önemli çığırar açabilecek bir analiz yöntemi olarak kullanılabilir.

Kaynaklar

1. Xue X, Teare MD, Hoken I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta*. 2009;404:100-4.
2. Flamini E, Mercatali L, Nanni O, Calistri D, Nunziatini R, et al. Free DNA and Carcinoembryonic Antigen Serum Levels: An Important Combination for Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:6985-8.
3. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A, Kowalczyk O, Niklinska W, et al. Circulating free DNA, p53 antibody and mutations of KRAS gene in endometrial cancer. *Inter J Cancer*. 2009 Dec 3 (Baskıda).
4. Lapaire O, Volgmann T, Gril S, Hösli I, Zametti-Dallenbach R, et al. Significant Correlation Between Maternal Body Mass Index at Delivery and in the Second Trimester, and Second Trimester Circulating Total Cell-free DNA Levels. *Reprod Sci*. 2009;16:274-9.
5. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, Mansueto G, Vannata B, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol*. 2009;20:1408-13.
6. Wichmann D, Panning M, Quack T, Kramme S, Burchard GD, et al. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma; *PLoS Neglected Tropic Dis*. 2009;3:1-9.
7. Litton C, Stone J, Eddleman K and Lee MJ. Noninvasive prenatal diagnosis: past, present, and future. *Mount Sinai J Med*. 2009;76:521-8.
8. Lazar L, Rigojr J, Nagy B, Balogh K, Mako V. Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia. *BMC Med Genet*. 2009;10:1-6.
9. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'Homme. *CR Acad Sci Paris*. 1948;22:241-3.
10. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1966;45:1732-40.
11. Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18:65-73.
12. Gang F, Guorong L, An Z, Anne GP, Christian G, Jacques T. Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum. *J Urology*. 2009;35:10-16.
13. Lui YYN, Woo KS, Wang AYM, Yeung CK, Li PKT, et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem*. 2003;3:495-6.
14. Hiep HM, Kerman K, Endo T, Saito M, and Tamiya E. Nanostructured biochip for label-free and real-time optical detection of polymerase chain reaction. *Analytica Chimica Acta*. 2010;661:111-6.
15. Avent ND, Madgett TE, Maddocks DG, and Soothill PW. Cell-free fetal DNA in the maternal serum and plasma: current and evolving applications. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009;21:175-9.
16. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/s-Apoptoz.ppt#323>
17. www.chembio.uoguelph.ca ve [http://images.google.com.tr/images? cell-free+DNA](http://images.google.com.tr/images?cell-free+DNA)
18. Huang DJ, Mergenthaler-Gatfield S, Hahn S, Holzgreve W, Zhong XY. Isolation of cell-free DNA from maternal plasma using manual and automated systems. *Method Mol Biol*. 2008;444:203-8.
19. Szpechcinski A, Struniawski R, Zaleska J, Chabowski M, Orłowski T, et al. Molecular diagnostics of alpha-1-antitrypsin deficiency in clinical practice. *J Physiol Pharmacol*. 2008;6:675-81.
20. Liggett T, Melnikov A, Yi GI, Replogle C, Brand R, et al. Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis. *Cancer*. 2010;49:1674-80.
21. Lo YMD, Chiu RWK. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nature Rev Genet*. 2007;8:71-7.
22. Makrydimas G, Gerovassili A, Sotiridias A, Kavvadias A, Nicolaides KH. Cell-free fetal DNA in celomic fluid. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008;32:592-7.
23. Hromadnikova I, Vesela K, Doucha J, Nekovarova K, Duskova D, et al. Non-invasive determination of fetal c and E allele of RHCE gene via real-time PCR testing of extracellular DNA extracted from maternal plasma samples using QIAamp DSP virus kit. *Turkish-german Gynecol Assoc*. 2007;8:140-5.

- 24.Zhong XY, Steinborn A, Sohn C, Holzgreve W, Hahn S. High levels of circulatory erythroblasts and cell-free DNA prior to intrauterine fetal death. *Prenat Diagn.* 2006;26:1271-3.
- 25.Reddy A, Zhong XY, Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W, et al. The effect of labour and placental separation on the shedding of syncytiotrophoblast microparticles, cell-free DNA and mRNA in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta.* 2008;29:942-9.
- 26.Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D, Han L, et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer.* 2010;17(In press).
- 27.Jung K, Stephan C, Lewandowski M, Klotzek S, Jung M. Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. *Cancer.* 2004;205:173-80.
- 28.Liggett T, Melnikov A, Tilwalli S, Yi Q, Chen H. Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing–remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2010;290:16-21.
- 29.Uzuelli JA, Dias-Junior AC, Izidoro-Toledo TC. Circulating cell-free DNA levels in plasma increase with severity in experimental acute pulmonary thromboembolism. *Clin Chim Acta.* 2009;409:112-6.
- 30.Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett D. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Critical Care.* 2006;10:1-7.