บทความฟื้นวิชา

ดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่และการประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมีย

สุพรรณ ฟู่เจริญ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ธาลัสซีเมียเป็นโรคโลหิตจางกรรมพันธุ์ที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากมีผู้ที่เป็นพาหะสูงถึงร้อยละ 30-40 ของประชากร จึงมีอัตราเสี่ยงของคู่สมรสที่จะมีโอกาสมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงสูง แนวทางการควบคุมและป้องกันโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่ดำเนินการในประเทศไทยขณะนี้ ดำเนินการพร้อมกันในสองแนวทาง คือ การให้การรักษาผู้ป่วยโรคธาลัสซีเมียที่เป็นอยู่แล้วให้ดีที่สุด กับการป้องกันไม่ให้มีผู้ที่เป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงเกิดขึ้นมาใหม่ เพื่อลดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาซึ่งต้องสูญเสียงบประมาณเป็นจำนวนมาก การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ในคู่สมรสที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรง จึงเป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งของการดำเนินงาน ซึ่งโรคธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่ถูกกำหนดไว้มี 3 โรค คือ โรคทารกบวมน้ำฮีโมโกลบินบาร์ทส (Hb Bart's hydrops fetalis) โรคโฮโมไซกัสเบตาธาลัสซีเมีย (Homozygous β-thalassemia) และโรคเบตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี (β-thalassemia/Hb E)[1,2]

โดยทั่วไปการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ดำเนินการอยู่ในปัจจุบันในหลายหน่วยงานของประเทศไทย ทำได้โดยการนำเซลล์หรือชิ้นเนื้อของทารกในครรภ์ที่ได้จากการเจาะเก็บน้ำคร่ำ (amniocentesis), เจาะชิ้นเนื้อรก (chorionic villus sampling) หรือเจาะเลือดจากสายสะดือทารกในครรภ์ (cordocentesis) มาเป็นตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและใช้เป็นหลักในการให้บริการได้ผลดีในหลายแห่งจนถึงปัจจุบัน[3-6] แม้ว่าการตรวจแบบ invasive นี้จะมีความปลอดภัยและใช้กันแพร่หลายมากขึ้น แต่ก็ยังมีข้อจำกัดหลายประการทั้งในด้านความยุ่งยากในการทำหัตถการทางสูติศาสตร์และโอกาสของการเกิดภาวะแทรกซ้อนหลังทำหัตถการ เช่น ภาวะน้ำคร่ำรั่ว การติดเชื้อ การแท้งบุตรและคลอดก่อนกำหนด เป็นต้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายทั้งต่อมารดาและทารกในครรภ์ ความยุ่งยากของการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ซับซ้อน ตลอดจนปัญหาการปนเปื้อนของเนื้อเยื่อแม่ในตัวอย่างทารก เป็นต้น จึงได้มีความพยายามศึกษาหาแนวทางการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่ไม่กระทบต่อทารกโดยตรงแบบ non-invasive ขึ้น การนำเอาเซลล์ทารก (fetal cell) หรือดีเอ็นเอทารก (cell free fetal DNA) ที่มีอยู่ในกระแสเลือดแม่มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยจึงได้รับการศึกษาและพัฒนามากขึ้นในปัจจุบัน[7]

การศึกษาเซลล์ทารกในเลือดแม่

จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีในการแยกเซลล์ทำให้สามารถแยกเซลล์ของทารก (fetal cell) ซึ่งปนเปื้อนในกระแสเลือดของแม่ออกมาได้ เซลล์ทารกในครรภ์ที่ปะปนอยู่ในเลือดแม่มีทั้งชนิด trophoblast, เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) และเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (fetal nucleated red blood cells) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากจำนวนเซลล์ทารกในเลือดแม่มีอยู่จำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ของแม่ โดยมีอยู่เพียงประมาณ 1 ใน 10^5 ถึง 10^9 ของเซลล์แม่เท่านั้น และขึ้นอยู่กับอายุครรภ์[8,9] ทำให้วิธีการแยกเซลล์ทารกให้บริสุทธิ์มีความยุ่งยาก ราคาแพง และเป็นอุปสรรคสำคัญในการประยุกต์ใช้ในงานประจำวัน นอกจากนี้ยังมีรายงานตรวจพบเซลล์ของทารกในเลือดแม่ได้ภายหลังจากคลอดแล้วเป็นระยะเวลานานถึง 5 ปี ทำให้มีผลต่อการตรวจวินิจฉัยสำหรับการตั้งครรภ์ครั้งต่อไป อย่างไรก็ตามมีตัวอย่างที่สามารถนำวิธีนี้มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ได้หลาย

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 4 ธันวาคม 2551 ได้ให้ตีพิมพ์เมื่อ 11 ธันวาคม 2551

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณ ฟู่เจริญ
ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

D:\Zoom\Zoom\Journal\59(4)\Blood.p65

โรครวมทั้งโรคธาลัสซีเมียด้วยแล้ว[10,11]

การตรวจพบดีเอ็นเอทารกในพลาสมาหญิงตั้งครรภ์

มีหลักฐานบ่งชี้ว่าดีเอ็นเอสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้อย่างอิสระทั้งในผู้ป่วยและในคนปกติ แต่ยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดแสดงถึงแหล่งที่มาของดีเอ็นเอเหล่านี้ มีเพียงข้อสันนิษฐานว่าอาจมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte หรือ เซลล์เม็ดเลือดแดงตัวอ่อน (nucleated red cells) อื่นๆ และมีรายงานพบว่าผู้ป่วยมะเร็งมีปริมาณดีเอ็นเอในพลาสมาสูงกว่าคนปกติหลายเท่าและเชื่อว่าน่าจะเป็นผลมาจากการแตกสลายของ nucleated blood cells หรือ tumor cells ทำให้เกิดการปลดปล่อยดีเอ็นเออกมา หรืออาจเกิดจากกลไก apoptosis[12] หรือกลไกอื่นที่มากระตุ้นการเกิด tumor necrosis และปริมาณดีเอ็นเอที่พบ จะพบในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่อมีการลุกลามของโรคมากขึ้น และเมื่อทำการรักษาด้วยการฉายรังสี พบว่าระดับดีเอ็นเอในพลาสมาจะลดลงสัมพันธ์กับการพยากรณ์ของโรค จึงสามารถใช้ติดตามผลการรักษาและบ่งบอกถึงการลุกลามของโรคในผู้ป่วยมะเร็งได้[13] ปริมาณดีเอ็นเอในการแสเลือดจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งปอด มะเร็งตับอ่อน มะเร็งเม็ดเลือดขาวและมะเร็งเต้านม[14-18] เป็นต้น

สำหรับการนำมาใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์นั้น Lo และคณะ เป็นกลุ่มแรกที่ตรวจพบดีเอ็นเอทารกในพลาสมาและซีรัมของหญิงตั้งครรภ์ในปี ค.ศ. 1997[19] โดยใช้ผลการตรวจหาดีเอ็นเอที่จำเพาะกับโครโมโซม Y (sex-determining region Y: SRY) จากพลาสมาและซีรัมมารดาที่มีทารกในครรภ์เป็นเพศชายเป็นตัวบ่งชี้และตรวจไม่พบหากทารกในครรภ์เป็นเพศหญิง การตรวจขณะนั้นใช้วิธีง่ายๆ โดยนำพลาสมาและซีรัมไปต้มที่ 99°ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากพลาสมาและซีรัมที่สกัดได้ เพียง 10 ไมโครลิตรในการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ ก็สามารถให้ผลการตรวจได้อย่างถูกต้องและสามารถใช้ในการทำนายเพศทารกได้ นับจากนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจให้ดีและมีความไวมากขึ้น เช่น การตรวจด้วยเทคนิค Real-time quantitative PCR[20] หรือ การตรวจด้วยยีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่ SRY เป็นต้น[21,22] นอกจากนี้เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมาและซีรัมทำได้ง่ายขึ้นโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป ทำให้เพิ่มความไวในการตรวจทำนายเพศทารกได้สูงถึงร้อยละ 100 ในบางรายงาน การศึกษาเพิ่มเติมของ Lo และคณะ[23] พบว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของทารกได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 7 ของการตั้งครรภ์ และพบในปริมาณที่สูงขึ้นเมื่ออายุครรภ์มากขึ้น การตรวจดีเอ็นเอที่จำเพาะกับทารกเพศชายในพลาสมาหญิงตั้งครรภ์ นำไปสู่การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์ที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่มีการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์แบบ X-linked recessive หรือใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากการถ่ายทอดยีนผิดปกติมาจากบิดา เช่น Rh factor[24], myotonic dystrophy[25] และ Congenital adrenal hyperplasia[26] เป็นต้น ต่อมามีการศึกษาพบว่าปริมาณดีเอ็นเอทารกในพลาสมาหญิงตั้งครรภ์จะมีปริมาณสูงขึ้นมากกว่าปกติในรายที่มีความผิดปกติต่างๆของการตั้งครรภ์[27] สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งที่เป็นผลให้มีการนำเอาเทคนิคการตรวจดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ไปใช้อย่างกว้างขวาง คือ การที่ดีเอ็นเอทารกจะเริ่มถูกกำจัดออกจากเลือดแม่อย่างรวดเร็วภายหลังคลอดเพียงไม่กี่นาทีและตรวจไม่พบเลยภายหลังคลอดแล้ว 2 ชั่วโมง[23] ทำให้ไม่ไปรบกวนต่อการใช้ในการวินิจฉัยในการตั้งครรภ์ครั้งต่อไป

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่กับการวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมีย

ในปี ค.ศ. 2002 กลุ่มวิจัยของ Lo และคณะ[28] เป็นกลุ่มแรกที่ได้รายงานว่า สามารถให้การตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมียที่เป็นชนิด Homozygous β-thalassemia ได้อย่างถูกต้อง โดยการตรวจยีนธาลัสซีเมียของทารกชนิด $\beta^{41/42}$ mutation (-TCTT) ที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อในพลาสมาของแม่ซึ่งเป็นพาหะ β-thalassemia ชนิดอื่น โดยใช้เทคนิค Real-time quantitative PCR การตรวจพบหรือไม่พบมิวเตชั่นของพ่อในพลาสมาแม่ ใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการตัดสินใจว่าจะต้องทำการตรวจแบบ invasive ต่อไปหรือไม่ หากตรวจไม่พบยีน $\beta^{41/42}$mutation ในพลาสมา ก็แสดงว่าทารกในครรภ์ไม่ได้รับยีนผิดปกตินี้มาจากพ่อ จึงไม่จำเป็นต้องตรวจแบบ invasive ต่อไป แต่เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวยังมีความไวค่อนข้างต่ำ กลุ่มนักวิจัยเดียวกันจึงได้พัฒนาเทคนิคการตรวจให้มีความไวมากขึ้นโดยนำเอาเทคนิค Single allele base extension / Mass spectrophotometry มาช่วยในการตรวจวิเคราะห์ ทำให้ได้ผลการตรวจที่มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น[29] นอกจากนี้ยังมีรายงานจากนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ ที่ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทารกในพลาสมาของแม่โดยการแยกเอาเฉพาะดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กซึ่งส่วนใหญ่เป็นของทารกออกจากดีเอ็นเอของแม่ที่มักมีขนาดใหญ่

กว่าออกจากกันเสียก่อนด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วจึงนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค peptide nucleic acid clamp (PNA clamp) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มความไวในการตรวจได้มากขึ้น[30]

สำหรับการประยุกต์ใช้ในประเทศไทยยังถือเป็นเรื่องใหม่และมีการศึกษาวิจัยกันค่อนข้างน้อย กลุ่มวิจัยโรคธาลัสซีเมีย ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้เริ่มทำการศึกษาไปที่การพัฒนาวิธีการตรวจหายีนธาลัสซีเมียชนิดรุนแรงที่พบบ่อยในประเทศไทย เช่น Hb E ก่อน เนื่องจากโรคธาลัสซีเมียที่สำคัญและพบบ่อยของไทย คือ เบตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี การตรวจยีนฮีโมโกลบินอีเพียงอย่างเดียวจะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคเบตาธาลัสซีเมีย/ฮีโมโกลบินอี ของทารกได้ถึงร้อยละ 50 ในการศึกษา จะเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอในพลาสมาของหญิงตั้งครรภ์ที่มีความเสี่ยงที่จะมีบุตรเป็นโรค จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจหา X และ Y-specific sequences เพื่อเป็นการยืนยันว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอออกมาจากพลาสมาได้จริง โดยใช้วิธี conventional PCR ผลการตรวจจึงสามารถใช้ในการทำนายเพศทารกในครรภ์ได้ด้วย จากการศึกษาพบว่าการตรวจทำนายเพศทารกในครรภ์จากการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในพลาสมาแม่นี้ทำได้ง่ายและให้ผลการตรวจที่ค่อนข้างดีมีค่าความไวและความจำเพาะสูงในทุกระยะของการตั้งครรภ์[31,32] จากนั้นจึงค่อยนำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปตรวจหายีนธาลัสซีเมียที่ต้องการด้วยวิธี PCR ที่เกี่ยวข้องต่อไปซึ่งมีหลายวิธี เช่น ถ้าเป็นยีน Hb E ได้ใช้เทคนิค nested PCR / restriction fragment length polymorphism ด้วยเอนไซม์ Mnl I[33] ผลการตรวจด้วยวิธีดังกล่าว จะสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการทำ invasive ได้ในรายที่คู่สมรสมีความเสี่ยงที่จะให้กำเนิดทารกที่จะเป็นโรค β-thalassemia/Hb E เมื่อแม่เป็นพาหะ β-thalassemia พ่อเป็นพาหะ Hb E ในกรณีที่ตรวจไม่พบยีน Hb E ในพลาสมาแม่ การตรวจแบบ invasive อาจไม่จำเป็น เนื่องจากทารกในครรภ์ไม่มีความเสี่ยงที่จะเป็นโรค β-thalassemia /Hb E เป็นต้น ส่วนการตรวจหายีนบีตาธาลัสซีเมียนั้น ได้ใช้วิธีตรวจวัดปริมาณ specific DNA fragment ที่จำเพาะต่อยีนเบตาธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค real time allele specific PCR[34] นอกจากนี้ได้พัฒนาเทคนิค quantitative real time PCR สำหรับตรวจ α°-thalassemia ในพลาสมาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยภาวะ Hb Bart's hydrops fetalis ซึ่งจำเป็นต้องวัดปริมาณ α°-thalassemia specific sequence ประกอบการวินิจฉัย[35] อย่างไรก็ตามยังอยู่ในระหว่างทำการศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลเพิ่มเติมเปรียบเทียบกับการตรวจวินิจฉัยแบบ invasive ในงานประจำวัน เทคนิคดังกล่าวยังไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการตรวจให้บริการจริงแต่อย่างใด ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการตรวจหาดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการในปัจจุบันและแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่จะนำไปใช้ได้อย่างแพร่หลายได้ต่อไป

นับจากที่ได้มีรายงานการตรวจพบดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่ ได้มีการพัฒนาและนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคต่างๆ มากมาย circulating cell-free DNA ในพลาสมา ยังเป็นแหล่งข้อมูลพันธุกรรมแหล่งใหม่สำหรับการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์แบบ non-invasive ซึ่งทำให้สามารถลดหรือหลีกเลี่ยงการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์แบบ invasive ลงได้และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคที่ต้องทำการตรวจเซลล์ลูกในเลือดแม่แล้ว เห็นได้ชัดเจนว่า การตรวจหาดีเอ็นเอทารกในพลาสมาแม่เป็นเทคนิคการตรวจที่ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นขั้นตอนในการปฏิบัติก็ไม่ยุ่งยาก แต่สิ่งสำคัญที่ต้องระลึกถึงเสมอคือ ดีเอ็นเอทารกในครรภ์ที่จะทำการตรวจนั้น มีปริมาณไม่มากนักและปะปนอยู่กับดีเอ็นเอของแม่ที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก การจะนำไปใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์จึงมีข้อจำกัดค่อนข้างมากและอาจใช้ได้ผลดีเฉพาะกับการวิเคราะห์ DNA sequence ในส่วนที่ทารกได้รับมาจากพ่อ (paternal mutation) เท่านั้น การศึกษาพัฒนา marker อื่นๆ เช่น ลักษณะของ DNA polymorphism ที่แตกต่างกันระหว่างพ่อและแม่แล้วนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้แทน เพื่อเพิ่มทางเลือกในการตรวจวินิจฉัยเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้สามารถประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางขึ้นในอนาคต ดังตัวอย่างผลการศึกษาการใช้ประโยชน์จากการตรวจวิเคราะห์ DNA polymorphism ที่สัมพันธ์กับยีนเบตาธาลัสซีเมีย ที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในพลาสมาแม่และสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมียที่มีการศึกษาไว้เมื่อเร็วๆ นี้[36]

เอกสารอ้างอิง

1. Fucharoen S, Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. Hemoglobin 1987;11:65-88.
2. Fucharoen S, Winichagoon P, Thonglairoam V, et al. Prenatal diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathies in Thailand:

D:\Zoom\Zoom\Journal\59(4)\Blood.p65

experience from 100 pregnancies. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991;22:16-29.
3. ถวัลย์วงค์ รัตนสิริ. การวินิจฉัยทารกในครรภ์โรคธาลัสซีเมีย: เทคนิคทางสูติศาสตร์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 2538;5:71-9.
4. Winichagoon P, Fucharoen S, Kanokpongsakdi S, Fukumaki Y. Detection of α-thalassemia 1 (Southeast Asian type) and its application for prenatal diagnosis. Clin Genet 1995;47:318-20.
5. Siriratmanawong N, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Ratanasiri T, Fucharoen S. Simultaneous PCR detection of β-thalassemia and α-thalassemia 1 (SEA type) in prenatal diagnosis of complex thalassemia syndrome. Clin Biochem 2001;34:377-80.
6. Sanguansermsri T, Thanaratanakorn P, Steger HF, et al. Prenatal diagnosis of hemoglobin Bart's hydrops fetalis by HPLC analysis of hemoglobin in fetal blood samples. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2001;32:180-5.
7. Holzgreve W, Hahn S. Prenatal diagnosis using fetal cells and free fetal DNA in maternal blood. Clin Perinatol 2001;28:353-65.
8. Bianchi DW. Prenatal diagnosis by analysis of fetal cells in maternal blood. J Pediatr 1995; 127: 847-56.
9. Schroder J, Tiilikainen A, dela Chapelle A. Fetal leukocytes in the maternal circulation after delivery. Transplantation 1974; 17:346-54.
10. Mavrou A, Kolialexi A, Antsaklis A, Krikos X, Koratzis A, Metaxotou C. Detection of fetal NRBCs in maternal blood of pregnant carriers of β-thalassemia using anti-γ and anti-ε monoclonal antibodies. Ann NY Acad Sci 2001;995:153-5.
11. Winichagoon P, Sithongdee S, Kanokpongsakdi S, Tantisirin P, Bernini LF, Fucharoen S. Noninvasive prenatal diagnosis for hemoglobin Bart's hydrops fetalis. Int J Hematol 2005;81: 396-9.
12. Kolialexi A, Tsangaria GT, Antasaklis A, et al. Apoptosis in maternal peripheral blood during pregnancy. Fetal Diagn Ther 2001;16:32-7.
13. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 1977;37:646-50.
14. Boddy JL, Gal S, Malone PR, Harris AL, Waincoat JS. Prospective study of quantitative of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. Clin Cancer Res 2005;11:1394-9.
15. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, et al. Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in non-small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. J Clin Oncol 2004; 22: 4157-64
16. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorensen GD. Cell free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. Pancrease 1998;17:89-97.
17. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT. Cell free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. Clin Chim Acta 2002;321:77-87.
18. Zhong XY, Ladewig A, Schmid S, Wight E, Hahn S, Holzgreve W. Elevated level of cell free plasma DNA is associated with breast cancer. Arch Gynaecol Obstet 2007;276:327-31.
19. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997;350:485-7.
20. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. Hum Genet 2002; 110:75-9.
21. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Ohashi K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. Clin Chem 2001;47:41-6.
22. Facinelli C, Battafarano S, Neri C, et al. First trimester fetal sex prediction by deoxyribonucleic acid analysis of maternal peripheral blood. Am J Obstet Gynecol 1999,181:675-80.
23. Lo YMD, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998;62:768-75.
24. Lo YMD, Hjelm M, Fidler C, et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998;10:174-8.
25. Amicucci P, Gennarelli M, Novel G, et al. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. Clin Chem 2000;46:301-2.
26. Chiu RWK, Lau TK, Cheug PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YMD. Noninvasice prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study. Clin Chem 2002;48:778-80.
27. Shimada K, Murakami K, Shozo M, Segawa T, Sumitani H, Inoue M. Sex-determining region Y levels in maternal plasma: evaluation in abnormal pregnancy. J Obstet Gynecol Res 2004; 30:148-54.
28. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, et al. Prenatal exclusion of β-thalassemia major by examination of maternal plasma. Lancet 2002;360:998-1000.
29. Ding C, Chiu RW, Lau TK, et al. MS analysis of single nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to noninvasive prenatal diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA

2004;101:10762-7.

30. Li Y, Di Naro E, Vitucci A, Zimmermann B, Holzgreve W, Hahn S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for β-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. JAMA 2005;293:843-9.
31. Tungwiwat W, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Non-invasive fetal sex determination using a conventional nested PCR analysis of fetal DNA in maternal plasma. Clin Chim Acta 2003;334:173-7.
32. Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K. Accuracy of fetal gender detection using a conventional nested PCR assay of maternal plasma in daily practice. Aust NZ J Obstet Gyn 2008; 48: 501-4.
33. Fucharoen G, Tungwiwat W, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Prenatal detection of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma. Prenat Diagn 2003;23:393-6.
34. Tungwiwat W, Fucharoen G, Fucharoen S, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Sae-ung N. Application of maternal plasma DNA analysis for noninvasive prenatal diagnosis of Hb E-β-thalassemia. Trans Res 2007;150:319-25.
35. Tungwiwat W, Fucharoen S, Fucharoen G, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K. Development and application of a real time quantitative PCR for detection of fetal α°-thalassemia from maternal plasma. Ann NY Acad Sci 2006;1075:103-7.
36. Lazaros L, Hatzi E, Bouba I, et al. Non-invasive first trimester detection of paternal beta-globin gene mutations and polymorphisms as predictors of thalassemia risk at chorionic villous sampling. Eur J Obstet Gynecol 2008;140:17-20.