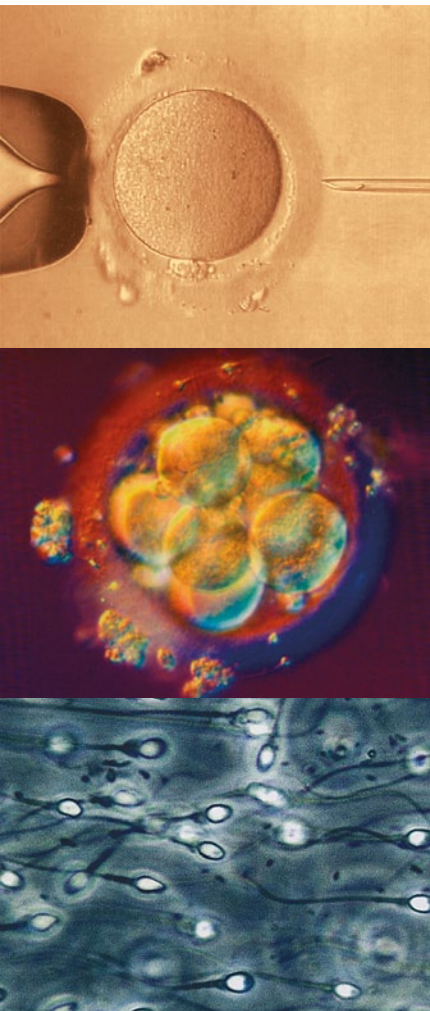


Journal für

Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



**Die nichtinvasive Pränataldiagnostik aus dem
mütterlichen Blut: schrittweiser Einzug in den
klinischen Alltag**

Lapaire O, Hahn S, Holzgreve W, Zimmermann B
J. Reproduktionsmed. Endokrinol 2005; 2 (5), 272-277

www.kup.at/repromedizin

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, DIR, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

Datenschutz:

Ihre Daten unterliegen dem Datenschutzgesetz und werden nicht an Dritte weitergegeben. Die Daten werden vom Verlag ausschließlich für den Versand der PDF-Files des Journals für Pneumologie und eventueller weiterer Informationen das Journal betreffend genutzt.

Lieferung:

Die Lieferung umfasst die jeweils aktuelle Ausgabe des Journals für Pneumologie. Sie werden per E-Mail informiert, durch Klick auf den gesendeten Link erhalten Sie die komplette Ausgabe als PDF (Umfang ca. 5–10 MB). Außerhalb dieses Angebots ist keine Lieferung möglich.

Abbestellen:

Das Gratis-Online-Abonnement kann jederzeit per Mausklick wieder abbestellt werden. In jeder Benachrichtigung finden Sie die Information, wie das Abo abbestellt werden kann.

Das e-Journal **Journal für Pneumologie**

- ✓ steht als PDF-Datei (ca. 5–10 MB) stets internetunabhängig zur Verfügung
- ✓ kann bei geringem Platzaufwand gespeichert werden
- ✓ ist jederzeit abrufbar
- ✓ bietet einen direkten, ortsunabhängigen Zugriff
- ✓ ist funktionsfähig auf Tablets, iPads und den meisten marktüblichen e-Book-Readern
- ✓ ist leicht im Volltext durchsuchbar
- ✓ umfasst neben Texten und Bildern auch eingebettete Videosequenzen.

Die nichtinvasive Pränataldiagnostik aus dem mütterlichen Blut: schrittweiser Einzug in den klinischen Alltag

O. Lapaire, B. Zimmermann, S. Hahn, W. Holzgreve

Die frühzeitige Erkennung chromosomaler Pathologien, neben fetalen Malformationen, ist ein Schwerpunkt der heutigen pränatalen Diagnostik. Mit verschiedenen Techniken kann das Anliegen von Klinikern und Forschern, den Schwangeren eine möglichst risikofreie diagnostische Methode anzubieten, um die Anzahl invasiver Eingriffe (Amniozentese [AC], Chorionzottenbiopsie [CVS]) und die damit verbundenen Komplikationen, wie Abort oder Infektionen, zu verringern, sowie neue Marker für die pränatale Diagnostik zu evaluieren, umgesetzt werden. Bis heute sind die Schwierigkeiten in der Anreicherung fetaler Zellen so groß, daß diese eine routinemäßige Anwendung im klinischen Alltag verhindert haben. Im Gegensatz dazu kann heute die zellfreie DNA im Blut der Schwangeren für eine genaue Beurteilung fetaler genetischer Informationen genutzt werden, welche sich klar von maternalen Sequenzen zum Beispiel im Falle der Rhesus-Genotypisierung unterscheiden. Das Spektrum der pränatalen Diagnostik hat sich kürzlich mit dem Nachweis fetaler RNA im mütterlichen Blut erweitert. Die nachgewiesene fetale RNA ist erstaunlich stabil. Ihr Nachweis könnte zukünftig für ein nichtinvasives fetales Screening auf Aneuploidien und schwangerschaftsassozierte Erkrankungen von Bedeutung sein.

Schlüsselwörter: pränatale Diagnostik, fetale DNA, fetale RNA

Non-invasive Prenatal Diagnosis of the Maternal Blood: Step by Step into Clinical Everyday Life. The detection of fetal aneuploidies and malformations, as early as possible, is the major aim in prenatal diagnosis. The genetic analysis of fetal cells or fetal DNA/RNA for genetic testing, which can be accumulated from the blood of pregnant women, is one of the most challenging topics of prenatal research today. With different methods, the intention to offer risk-free diagnostic tools for pregnant women, in order to reduce the number of invasive interventions (e. g. amniocentesis [AC], chorionic villi sampling [CVS]) and the procedure related risk of abortions, can be converted. Up to now the technical problems of cell enrichment have prevented their routine clinical use. In contrast, cell-free fetal DNA, extracted from maternal plasma can now be used for the identification of fetal genetic dominant traits (e. g. the fetal rhesus status) or inherited polymorphism. The spectrum of prenatal diagnosis has only recently been enlarged by the detection of free fetal RNA. Fetal RNA, enriched from maternal plasma is quite stable and holds promises for advances in the field of prenatal screening and pregnancy associated disorders. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2005; 2 (5): 272–7.**

Key words: prenatal diagnosis, cell-free fetal DNA, fetal RNA

Die heute routinemäßig angebotene pränatale Diagnostik zwecks Ausschluß von fetalen Aneuploidien und Malformationen ist seit den 1970er Jahren in der Klinik etabliert. Aufgrund des Abortrisikos von heute 0,5–1 % lehnen viele Frauen einen invasiven Eingriff ab. Man schätzt, daß 45 Feten/10.000 Frauen in einem standardisierten Screeningprogramm durch einen invasiven Eingriff verloren gehen. Aus diesem Grund suchen Forschungsgruppen weltweit nach neuen, effektiven, risikofreien und verlässlichen Methoden sowie zusätzlichen Markern für ein pränatales Screening und für die pränatale Diagnostik. Grundlage hierfür ist die Gewinnung von fetalem Gewebe aus dem mütterlichen Blut, entweder mit Anreicherung von fetalen Zellen oder zellfreier Desoxyribonukleinsäure (DNA). Kürzlich konnte zudem fetale Ribonukleinsäure (RNA) aus dem mütterlichen Serum extrahiert werden. Die auch heute am häufigsten gebrauchten molekularbiologischen Techniken in der pränatalen Diagnostik sind neben der konventionellen zytogenischen Diagnostik die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Im Jahr 1893 wurde erstmals über das Auftreten von fetalen Zellen in der mütterlichen Zirkulation berichtet [1]. Der deutsche Pathologe Georg Schmorr fand in den Lungenkapillaren schwangerer Frauen, die an einer Präeklampsie verstorben waren, Zellen, die den Synzytiotrophoblastzellen der fetalen Plazenta ähnelten. Vergleichbare Beobachtungen wurden später auch von an-

deren Autoren gemacht [2, 3]. Man hat daraus geschlossen, daß Fragmente des Synzytiotrophoblasten vom Rande der Chorionzotten abreißen können, um dann in den mütterlichen Blutkreislauf eingeschwemmt zu werden. Dieses Phänomen ist jedoch nicht nur von physiologischem Interesse, sondern auch eine Voraussetzung zur nichtinvasiven Pränataldiagnostik. Über Jahrzehnte wurden Versuche unternommen, fetale Zellen aus dem mütterlichen Blut zu isolieren [4–6]. Die geringe Anzahl fetaler Zellen pro Volumeneinheit und das Fehlen spezifischer fetaler Zellmarker limitierten stark die Weiterentwicklung klinischer Methoden und deren Anwendung im klinischen Alltag. Mit der Verfeinerung molekulargenetischer Techniken (z. B. Einsatz von neueren Fluoreszenzfarbstoffen wie SYBR Green I oder der Einsatz von Hydrolysesonden bei der Real-time-PCR) kommen nichtinvasive Methoden in der pränatalen Diagnostik bereits heute zur klinischen Anwendung. Als diagnostisches Instrument können bei der aus dem mütterlichen Blut extrahierten fetalen DNA Abschnitte des fetalen Genoms bestimmt werden, welche nicht im mütterlichen Genom vorkommen (z. B. fetaler Rhesusstatus bei bestimmten Rhesuskonstellationen) [7]. Der Nachweis von fetaler RNA im mütterlichen Blut öffnet der pränatalen Diagnostik zudem neue Möglichkeiten. Der größte Teil der im Blut vorhandenen fetalen RNA scheint von der Plazenta zu stammen. Die zukünftige klinische Anwendung des Nachweises fetaler RNA kann im pränatalen Screening sowie im Nachweis fetaler Aneuploidien und schwangerschaftsassoziierter Erkrankungen liegen.

Eingegangen: 29.08.2005; akzeptiert nach Revision: 14.10.2005

Aus der Universitäts-Frauenklinik Basel

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Wolfgang Holzgreve, Universitäts-Frauenklinik Basel, CH-4031 Basel, Spitalstraße 21; E-Mail: wholzgreve@uhbs.ch

Nichtinvasive klinische Diagnostik mittels fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut

Ein lange erwünschtes Ziel in der pränatalen Diagnostik ist die Reduktion invasiver Eingriffe und deren assoziiert-

tes Abortrisiko mit Hilfe der Isolation fetaler Zellen aus dem mütterlichen Blut. Die Zellen können mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) auf Aneuploidien untersucht werden [8]. Diese Methode erfordert jedoch intakte Zellen und kann nur mit frischen Zellen oder mit Zellen, die in einem speziellen Medium gelagert wurden, durchgeführt werden. Die Hauptschwierigkeit bei der Verwendung fetaler Zellen für die pränatale Diagnostik liegt in der Anreicherung derselben. Durchschnittlich liegen diese in einer Konzentration von 1–6 Zellen pro Milliliter maternalen Blutes vor [9]. Für eine optimale Spezifität einer Untersuchung mit FISH sind 3 oder mehr Zellen erforderlich, was in der Regel eine Anreicherung notwendig macht. Alternativ können fetale Zellen mittels PCR untersucht werden, was andere technische Probleme hervorruft. So kann bisweilen die Amplifikation nur eines Allels eines bestimmten Locus gelingen, was bei heterozygoten Loci falsche Resultate liefert [10, 11]. Diese Schwierigkeit wird mit der unabhängigen Analyse von 4–5 fetalen Zellen mittels sogenannter Single-cell-PCR umgangen [12]. Dies setzt wiederum erneut eine genügende Anzahl fetaler Zellen voraus. Fetale Zellen können schon im ersten Trimenon im Blut der Schwangeren nachgewiesen werden. Bis heute gibt es jedoch keine schnelle, einfache Methode für deren Isolation. Die Anreicherung erfolgt über mehrere Schritte, wobei primär eine Zentrifugation mittels Dichtegradienten erfolgt [13]. Nachfolgend wird eine weitere Anreicherung alternativ mit fluoreszierenden Markern („fluorescent activated cell sorting“ – FACS) [14] oder mit magnetischen Partikeln („magnetic activated cell sorting“ – MACS) [15] erreicht. MACS ist relativ einfach zu erlernen und ermöglicht einen höheren Umsatz von Proben. Zudem besitzt die Methode eine höhere Sensitivität als FACS. Der dritte Schritt beinhaltet entweder eine *In-situ*-Hybridisierung, eine Zellkultur oder eine PCR. Die letztgenannte Technik besitzt einige Vorteile: Sie ist weniger arbeitsintensiv und sensitiver als die *In-situ*-Hybridisierung. Das Zellanreicherungsverfahren über mehrere Schritte erfordert viele Manipulationen, mit welchen eine gewisse Anzahl Zellen zerstört wird und/oder verloren geht. Vereinfachte Methoden wie das automatische Einlesen der Zellen sind erforderlich, um die Zellanreicherung in der klinischen Praxis einzuführen. Daneben wurden Versuche unternommen, fetale Zellen, die aus dem mütterlichen Blut extrahiert wurden, zu kultivieren [16]. Nachfolgende Experimente, welche die anfänglich ermutigenden Resultate zu reproduzieren versuchten, schlugen fehl [17]. Verschiedene fetale Zellpopulationen können aus dem maternalen Blut angereichert werden. CD34⁺-hämopoetische Stammzellen und Zellen des Trophoblasts können dazu verwendet werden. Jede der Zell-Linien hat spezifische Vor- und Nachteile. So können kernhaltige Erythrozyten nicht kultiviert werden. Diese Tatsache erlaubt deswegen keine Analyse in der Metaphase. CD34⁺-Zellen können ferner postpartal im mütterlichen Blut persistieren und sind in einer folgenden Schwangerschaft für eine pränatale Diagnostik nicht geeignet. Des Weiteren sind fetale Zellen nicht konstant im maternalen Blut nachweisbar. Die isolierten Zellen können entweder mittels Zytochemie, „Soret-band-absorption“-Mikroskopie, monoklonalen Antikörpern oder FISH untersucht werden. In einer großen Multicenter-Studie, unterstützt durch das National Institute of Child Health and Development (NICHD), wurden 2744 maternale Proben auf fetale Zellen untersucht [18]. Zellen männlicher Feten wurden in 41,4 % korrekt identifiziert, wenn der Fetus euploid war. Unter den bestätigten Aneuploidien wurden

74,4 % korrekt bestimmt. Aufgrund der Schwierigkeiten in der Zellanreicherung, verbunden mit hohen Kosten und zeitbeanspruchenden Teilschritten, sowie fehlender spezifischer Marker, ließ sich der Einsatz fetaler Zellen jedoch nicht im klinischen Alltag etablieren.

Mikrochimerismus im maternalen Gewebe: ein Ausblick

Die Entdeckung der Persistenz fetaler Zellen im maternalen Gewebe (fetaler Mikrochimerismus) hat das Spektrum der Forschung fetaler Zellen stark erweitert [19]. Fetaler Mikrochimerismus ist definiert als Persistenz fetaler Zellen im maternalen Gewebe ohne nachweisbare „Graft-versus-host“-Reaktion (oder maternale Immunantwort gegen die fetalen Zellen) [20]. Hypothetisch wird eine Verbindung zu Autoimmunprozessen angenommen, die bei Frauen weit häufiger als bei Männern auftreten. Nelson postulierte, daß einige Autoimmunerkrankungen, welche vorwiegend bei Frauen vorkommen und klinische sowie pathologische Ähnlichkeiten mit einer „Graft-versus-host“-Reaktion haben, mit fetalem Mikrochimerismus assoziiert sind [21]. Fetaler Mikrochimerismus ist ein häufiges Phänomen, wenn auch aufgrund der geringen Zellzahl schwierig nachzuweisen. Fetale Zellen konnten in gesunden Patientinnen sowie in entzündlichen oder neoplastischen Veränderungen, wie Zervixkarzinom, Hepatitis C und Schilddrüsenadenom, gefunden werden. Die fetalen Zellen, auch „pregnancy-associated progenitor cells“ (PAPCs) genannt, haben ähnliche Eigenschaften wie adulte Stammzellen, sind diesen jedoch nicht gleichzusetzen. Ihr Ursprungsgewebe ist heute noch unklar. Aborte oder Abruptiones erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Mikrochimerismus, wahrscheinlich aufgrund eines vermehrten Übertrittes fetaler Zellen in den maternalen Kreislauf, während die Anzahl der Schwangerschaften keinen signifikanten Einfluß auf das Phänomen des Mikrochimerismus hat [22]. Im Gegensatz dazu spielt der Zeitrahmen nach der Geburt eine Rolle. Fetale Zellen sind seltener bei Frauen mit sehr jungen Kindern detektierbar [23]. Fetaler Mikrochimerismus eröffnet ein neues Forschungsgebiet: Es ist ein häufiges Phänomen, das nach jeder Schwangerschaft auftreten kann und mögliche klinische wie therapeutische Konsequenzen hat.

Nichtinvasive pränatale Diagnostik mit freier fetaler DNA

Dennis Lo und Mitarbeiter veröffentlichten 1997 die erste Arbeit, welche die erfolgreiche Extraktion von fetaler DNA aus dem maternalen Plasma und Serum beschreibt [24]. Sie konnten mit der Bestimmung des Y-Chromosoms männlicher Feten demonstrieren, daß fetale DNA im mütterlichen Blut in einer viel höheren Konzentration vorhanden ist als fetale Zellen. Mittels quantitativer Real-time-PCR konnten hohe mittlere Konzentrationen an fetaler DNA (bis zu 6,2 % der totalen DNA) in der frühen und späten Schwangerschaft nachgewiesen werden [25]. Die Konzentrationen im Plasma erreichen 25,4 Genome equivalents (Geq)/ml (3,3–69,4) in der Frühschwangerschaft und 292 Geq/ml (76,9–769) in der Spätschwangerschaft. Der zuverlässige Nachweis von Y-chromosomalen Markern konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich reproduziert werden [26]. Die frühe Bestimmung des fetalen Geschlechts ist zudem hilfreich für die

pränatale Beratung bei Erkrankungen, welche an das Geschlechtschromosom gebunden sind [27].

Zellfreie fetale DNA – Identifikation von Komplikationen in der Schwangerschaft

Kurz nach der ersten Publikation des Nachweises fetaler DNA im mütterlichen Blut wurde nach möglichen quantitativen Abweichungen des fetalen DNA-Spiegels bei schwangerschaftsassozierten Erkrankungen gesucht. Es wurde angenommen, daß fetale DNA als Marker des feto-maternalen Systems dienen könnte. Erhöhte fetale DNA-Konzentrationen wurden bei verschiedenen schwangerschaftsassozierten Pathologien festgestellt. Die am besten studierte ist die Präeklampsie [28]. Nach unserer ursprünglichen Beobachtung einer erhöhten Zahl fetaler Zellen bei Präeklampsie [6] konnten Lo et al. zeigen, daß die mittlere Konzentration fetaler DNA bei Präeklampsie um das 5fache erhöht war. Andere Gruppen bestätigten erfolgreich diesen Befund [29, 30]. Die erhöhten Konzentrationen fetaler DNA kommen bei präeklampsischen Patientinnen zum Teil aufgrund verminderter renaler Clearance zustande [31]. Eine andere Hypothese beinhaltet eine Verletzung der plazentaren Barriere sowie einen erhöhten (plazentaren) Zelluntergang. Levine konnte zeigen, daß fetale DNA-Werte bei Präeklampsie zweiphasig erhöht im maternalen Serum vorkommen: zwischen der 17. und der 28. Schwangerschaftswoche und nachfolgend in der 29.–41. Schwangerschaftswoche. Somit kann ein erhöhter Serumspiegel bereits vor einer klinisch manifesten Präeklampsie nachgewiesen werden [32]. Neben erhöhten Serumspiegeln bei Präeklampsie fanden sich ebenfalls quantitative Veränderungen bei *Hyperemesis gravidarum* [33], Frühgeburtsbestrebungen [34] und Aneuploidien.

Zellfreie fetale DNA und Aneuploidien

Lo und Mitarbeiter wiesen mittels Real-time-PCR eine 2fache Erhöhung fetaler DNA-Werte bei Trisomie 21 nach, verglichen mit euploiden Feten [35]. Weitere Studien bestätigten diese Beobachtungen, obwohl eine Erhöhung bei Trisomie 21, nicht aber bei Trisomie 18, nachgewiesen werden konnte [36]. Dies läßt vermuten, daß ein unterschiedliches Wachstumsverhalten des Fetus oder plazentare Veränderungen eine Rolle spielen. Nicht alle Arbeitsgruppen konnten jedoch erhöhte fetale DNA-Werte im maternalen Blut finden: So fanden Hromadnikova und Mitarbeiter keine Änderung der mittleren fetalen DNA-Konzentrationen oder Veränderungen der fetalen/maternalen Ratio bei Trisomie 21 [37]. Watanaga hingegen fand erhöhte fetale DNA-Serumwerte bei Trisomie 13, nicht aber bei Trisomie 18 [38]. Aufgrund der quantitativen Veränderungen stellt die fetale DNA einen wertvollen Marker bei diversen schwangerschaftsassozierten Erkrankungen dar, mit dem mögliche Hochrisikoschwangerschaften frühzeitig erkannt werden können.

Die Konzentrationen fetaler DNA korrelieren ebenfalls mit dem Gestationsalter [25]. Niedrige Konzentrationen können schon im ersten Trimester nachgewiesen werden. Diese steigen im zweiten und dritten Trimester stark an. Nach der 32. Schwangerschaftswoche kommt es zu einem starken Anstieg, wahrscheinlich durch eine durchlässigere Plazentaschranke [39].

Detektierung von fetalen, paternal vererbten Allelen im mütterlichen Plasma

Initiale Studien charakterisierten fetale DNA im mütterlichen Kreislauf, indem Sequenzen des Y-Chromosoms mit PCR nachgewiesen wurden.

Aufgrund der maternalen DNA, welche die Untersuchungsbedingungen einschränkten, konzentrierte man sich auf Allele, welche nicht im mütterlichen Genom vorkamen (z. B. Vererbung eines paternalen dominanten Allels). Das bekannteste Beispiel ist die pränatale Bestimmung des fetalen Rhesusstatus. Etwa 15 % der kaukasischen Frauen sind in einer Schwangerschaft gefährdet, eine schwere intrauterine Anämie zu entwickeln, meist aufgrund einer Rhesusinkompatibilität. Analog der Amplifizierung spezifischer Sequenzen des Y-Chromosoms wird bei einer Rhesuskonstellation der fetale Rhesusstatus mittels zellfreier fetaler DNA-Proben bestimmt [40, 41]. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit wurde die Bestimmung des fetalen Rhesusstatus vom „British National Blood Service“ als Routineangebot eingeführt [42]. Die Einführung der Rhesusbestimmung stellt somit die erste Routinemethode dar, welche auf nichtinvasiv gewonnener fetaler DNA basiert.

Nach Separierung der fetalen DNA wurden monogene Erkrankungen, wie myotone Dystrophie [43], Achondroplasie [44], zystische Fibrose [45] und kongenitale Nebennierenhyperplasie [46] diagnostiziert. Eine kürzlich aus unserem Labor veröffentlichte Arbeit zeigte, daß fetale DNA von mütterlicher DNA aufgrund der Größenunterschiede getrennt werden kann [47]. Die Mehrheit fetaler DNA im mütterlichen Blut hat eine Größe von < 300 Basenpaaren, wogegen die maternale DNA eine Größe von > 500–1000 Basenpaaren aufweist. Der Größenunterschied könnte durch einen unterschiedlichen Ursprungsort erklärt werden: Fetale DNA hat ihren Ursprung in der Plazenta und/oder im Fetus, wogegen maternale DNA ihren Ursprung vorwiegend im hämatopoietischen System hat [48]. Die Möglichkeit, fetale DNA mittels Größenunterschieden von der maternalen zu trennen, erleichtert die Untersuchung von paternal vererbten Punktmutationen. Unserer Arbeitsgruppe gelang der zuverlässige Nachweis von 4 paternal vererbten β -Globin-Mutationen [49]. Die Detektionsraten waren 86 %, 100 %, 100 % und 81 %. Nur ein falsch positives Resultat wurde bei einer der vier Punktmutationen notiert. Die Ergebnisse zeigen, daß der Nachweis einer Punktmutation des fetalen Genoms mit nichtinvasiv gewonnener DNA möglich ist und so in Zukunft invasive Verfahren mit ihrem assoziierten Risiko vermindert werden könnten. Die Massenspektrometrie erlaubt den Nachweis spezifischer Allele, inklusive Punktmutationen und Differenzen einzelner Nukleotide (single-nucleotide polymorphism) [50].

Nichtinvasive pränatale Diagnostik mit freier fetaler DNA mittels „array based comparative genomic hybridisation“ (CGH)

Das bekannteste Beispiel einer genetischen Imbalance ist die Trisomie 21. Relativ kleine Deletionen des Genoms oder Duplikationen können jedoch ebenfalls einen klinischen Phänotyp aufweisen. Beispiele sind das Di-George-Syndrom (22q11.21), das Prader-Willi-Syndrom (15q12)

oder das Wolf-Hirschhorn-Syndrom (4p16.3). Oft sind die sogenannten subtelomeren Regionen eines Chromosoms betroffen, wobei die Veränderungen häufig so klein sind (< 5 Mega Basen), daß sie mit einer klassischen Chromosomendarstellung nicht erfaßt werden können. Diese Veränderungen können heute mit einer sogenannten „array based comparative genomic hybridisation“ (CGH) erkannt werden [51], wobei die CGH mittels klonierten Fragmenten des Genoms in einem stark verkleinerten Format („arrayed“) auf einem Chip vorgenommen wird [52, 53]. Array based comparative genomic hybridisation wurde schnell die Methode der Wahl, um das gesamte Genom auf Imbalancen zu überprüfen. Dabei werden die unterschiedlich markierten DNA-Proben (Patient und Kontrolle) zusammen hybridisiert. Der große Vorteil dieser Technik liegt in der automatisierten Evaluation des gesamten Genoms.

Nichtinvasives pränatales Screening mit fetaler DNA

Im Focus der aktuellen Forschung liegt die fetale DNA auch in Hinblick auf ihren Nutzen als potentieller Serummarker im zweiten und dritten Trimenon, besonders bei chromosomalen Abberationen und schwangerschafts-assoziierten Erkrankungen. Die quantitative Bestimmung fetaler DNA könnte die Sensitivität der bestehenden Screening-Tests erhöhen, was die Rate invasiver Eingriffe reduzieren würde. Farina evaluierte den Nutzen freier fetaler DNA als Marker für M. Down im zweiten Trimester [54]. Die mittlere DNA-Serumkonzentration war bei Feten mit Trisomie 21 um das 1,7fache erhöht, verglichen mit der Kontrollgruppe. Fetale DNA alleine wies eine Detektionsrate von 21 % auf (bei einer Falschpositiv-Rate von 5 %). Kombiniert mit den Serummarkern PAPP-A, α -Fetoprotein, β -HCG und Estriol wies fetale DNA eine Sensitivität von 86 % (bei einer Falschpositiv-Rate von 5 %) auf. Die definitive Wertigkeit fetaler DNA bei M. Down muß in größeren Studien sowie einheitlichen Nachweismethoden und Techniken bestimmt werden. Um fetale DNA als Screeninginstrument zu benutzen, ist eine geschlechtsunspezifische Bestimmung erforderlich. Obwohl einige Sequenzen untersucht werden müssen, um eine klare Unterscheidung zwischen fetaler und mütterlicher DNA machen zu können, wird diese Technik in Zukunft doch wohl in der Klinik einsetzbar sein. Aktuell besteht die Schwierigkeit in der Generierung genauer Daten, dies aufgrund der niedrigen Anzahl fetaler Sequenzen im mütterlichen Plasma, sodaß die Proben, welche durch eine PCR amplifiziert werden, nahe an der Detektionsgrenze liegen.

Nichtinvasive pränatale Diagnostik und Screening mit freier fetaler RNA aus dem mütterlichen Plasma

Einen neuen Bereich in der pränatalen Diagnostik stellt die Bestimmung freier fetaler RNA, extrahiert aus dem mütterlichen Plasma, dar. Die Bestimmung fetaler RNA erlaubt eine geschlechtsunspezifische Diagnostik fetaler und maternaler Pathologien [55]. Der Nachweis fetaler RNA ist in bezug auf die übliche Instabilität des Moleküls erstaunlich [56]. Tsui et al. demonstrierten, daß endogene RNA-Moleküle im Plasma, im Gegensatz zur extrahierten und gereinigten RNA, sehr stabil ist [57]. Es konnte zudem gezeigt werden, daß endogene Plasma-RNA-

Moleküle mit subzellulären Partikeln assoziiert sind, die die RNA vor einem Abbau schützen [58]. Nicht nur fetale DNA, sondern auch fetale RNA (z. B. mRNA des Corticotropin-releasing-Hormon – CRH) kommt in erhöhten Konzentrationen bei Schwangeren mit Präeklampsie vor [59]. Erhöhte Werte der mRNA der β -Untereinheit des HCGs konnten bei Schwangeren mit aneuploiden Feten gemessen werden [60]. Die Meßbarkeit fetaler RNA gibt nun die Möglichkeit, die Expression bestimmter Gene zu erforschen, analog der heute schon in der Onkologie benutzten RNA-Marker [61]. Tsui und Mitarbeiter zeigten kürzlich, daß mittels Microarray-Technik plazentare mRNA schnell und relativ einfach nachgewiesen werden kann [62]. Unsere Arbeitsgruppe aus Basel konnte zudem zeigen, daß die mittlere Konzentration fetaler mRNA des CRH bei Patientinnen mit einer Frühgeburt erhöht ist, während sich die mittleren Konzentrationen bei Frauen mit vorzeitigen Kontraktionen nicht signifikant von denjenigen der Kontrollgruppe unterschieden [63].

Technische Aspekte

Seit dem erstmaligen Nachweis fetaler Nukleinsäuren haben viele Laboratorien weltweit nach neuen diagnostischen Anwendungsmöglichkeiten und immer differenzierteren Nachweismethoden gesucht. Seit längerem wurden Unterschiede in der Zentrifugation und deren Auswirkungen diskutiert [64, 65]. Andere Faktoren, wie unterschiedliche Primer und Probes (z. B. unterschiedliche Hydrolysesonden, entweder mit Tetramethyl-6-carboxyrhodamin [TAMRA] oder „minor groove binder [MGB] probes“ mit einem nichtfluoreszierenden Quencher) [66] oder unterschiedliche Extraktionsmethoden [67] machen Vergleiche zwischen den einzelnen Laboratorien schwierig. Eine Studie analysierte die Ergebnisse von Extraktionen fetaler DNA aus mütterlichen Proben, welche in verschiedenen Laboratorien mit einheitlichen, standardisierten Nachweismethoden verarbeitet wurden [68]. Obwohl alle beteiligten Zentren fetale männliche DNA aus den Proben extrahieren konnten, zeigten sich große Unterschiede in der Sensitivität (31–97 %) und Spezifität (93–100 %). Neue Methoden, welche die Ausbeute an fetaler DNA zu erhöhen vermögen, wie der Zusatz von Formaldehyd [69], müssen kritisch von mehreren Laboratorien geprüft werden, bevor sie im Alltag eingesetzt werden können [70].

Ausblick

Der Nachweis fetaler DNA und RNA im Blut der Schwangeren eröffnete neue Möglichkeiten im Gebiet der nicht-invasiven pränatalen Diagnostik. Erstaunliche Fortschritte wurden in den vergangenen 8 Jahren erzielt. Das wachsende Verständnis vom biologischen Verhalten und den klinischen Möglichkeiten der fetalen Nukleinsäuren im maternalen Plasma bringt uns dem Ziel näher, nicht-invasive diagnostische Marker für ein fetales Screening und für eine zuverlässige Diagnostik im klinischen Alltag zu entwickeln.

Danksagung

Die Arbeit wurde durch den Schweizer Nationalfonds unterstützt (PBBSB-108590).

Literatur:

- Schmorl G. Pathologisch-anatomische Untersuchungen über Puerperale Eklampsie. Verlag FCW Vogel, Leipzig, 1893.
- Douglas OW, Thomas L, Carr M. Trophoblast in the circulating blood during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1959; 78: 960.
- Thomas L, Douglas OW, Carr M: The continual migration of syncytial tropho-blasts from the fetal placenta into the maternal circulation. *Trans Assoc Am Phys* 1959; 72: 140.
- Walknowska J, Conte FA, Grumbach M. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet* 1969; 1: 1119–22.
- Schroder J. Transplacental passage of blood cells. *J Med Genet* 1975; 12: 230–42.
- Holzgreve W, Ghezzi F, Di Naro E, Ganshirt D, Maymon E, Hahn S. Disturbed fetomaternal cell traffic in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1998; 91: 669–72.
- Holzgreve W, Hahn S. Prenatal diagnosis using fetal cells and free fetal DNA in maternal blood. *Clin Perinatol* 2001; 28: 353–65.
- Hahn S, Sant R, Holzgreve W. Fetal cells in maternal blood: current and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 515–21.
- Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, Bronsard M, Masse J, Forest JC, Drouin R. Quantification of fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. *Clin Genet* 2001; 60: 145–50.
- Hahn S, Gavin AM, Di Naro E, Holzgreve W. Allele drop-out can occur in alleles differing by a single nucleotide and is not alleviated by preamplification or minor template increments. *Genet Test* 1998; 2: 351–5.
- Hahn S, Kiefer V, Brombacher V, Troeger C, Holzgreve W. Fetal cells in maternal blood: an update from Basel. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 85: 101–4.
- Garvin AM, Holzgreve W, Hahn S. Highly accurate analysis of heterozygote loci by single cell PCR. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3468–72.
- Oosterwijk JC, Mesker WE, Ouwerkerk MC. Fetal cell detection in maternal blood: a study of 236 samples using erythroblasts morphology. DAB and HbF staining, and FISH analysis. *Cytometry* 1998; 32: 178–85.
- Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantification of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 822–9.
- Gaenshirt AD, Burschy M, Garritsen HS, Helmer L, Miny P, Horst J, Schneider HP, Holzgreve W. Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means to prenatal diagnosis from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1350–6.
- Tutschek B, Reinhard J, Kogler G, Wernet P, Niederacher D. Clonal culture of fetal cells from maternal blood. *Lancet* 2000; 356: 1736–7.
- Zimmermann B, Holzgreve W, Zhong XY, Hahn S. Inability to clonally expand fetal progenitors from maternal blood. *Fetal Diagn Ther* 2001; 17: 97–100.
- Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, Dukes KA, Sullivan LM, Klinger KW, Bischoff FZ, Hahn S, Johnson KL, Lewis D, Wappner RJ, De la Cruz F. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. *Prenat Diagn* 2002; 22: 609–15.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 705–8.
- Liégois A, Escourrou J, Ouvre E, Charreire J. Microchimerism: a stable state of low-ratio proliferation of allogenic bone marrow. *Transplant Proc* 1977; 9: 273–6.
- Nelson JL. Maternal-fetal immunology and autoimmune disease: is some autoimmune disease auto-alloimmune or allo-autoimmune? *Arthritis Rheum* 1996; 39: 191–4.
- Khosrotehrani K, Johnson KL, Lau J, Dupuy A, Cha DH, Bianchi DW. The influence of fetal loss on the presence of fetal cell microchimerism. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3237–41.
- Filho MA, Pavarino-Bertelli EC, Alvarenga MP, Fernandes IM, Toledo RA, Tajara EH, Savoldi-Barbosa M, Goldman GH, Goloni-Bertollo EM. Systemic lupus erythematosus and microchimerism in autoimmunity. *Transplant Proc* 2002; 34: 2951–2.
- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–7.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768–75.
- Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn* 2001; 21: 1070–4.
- Costa JM, Benachi A, Gautier E. New strategy for prenatal diagnosis in X-linked disorders. *New Engl J Med* 2002; 346: 1502.
- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent L, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 1999; 45: 184–8.
- Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, Hahn S. 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: 414–9.
- Swinkels DW, De Kok JB, Hendriks JC, Wiegerienck E, Zusterzeel PL, Steegers EA. 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: 650–3.
- Lau TW, Leung TN, Chan LY, Lau TK, Chan KC, Tam WH, Lo YM. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin Chem* 2002; 48: 2141–6.
- Levine RJ, Qian C, Leshane ES, Yu KF, England LJ, Schisterman EF, Wataganara T, Romero R, Bianchi DW. Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 707–13.
- Sugito Y, Sekizawa A, Farina A, Yukimoto Y, Saito H, Iwasaki M. Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma. *Clin Chem* 2003; 49: 1667–9.
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as marker for preterm labour. *Lancet* 1998; 352: 1904–5.
- Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999; 45: 1747–51.
- Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Jackson LR, Holzgreve W, Hahn S. Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. *Prenat Diagn* 2000; 20: 795–8.
- Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Calda P, Nekolarova P, Kofer J, Stejskal D, Doucha J, Cinek O, Vavriec J. Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy Childbirth* 2002; 2: 4.
- Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick JA, Bianchi DW. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13, but not trisomy 18. *Hum Genet* 2003; 112: 204–8.
- Bianchi DW. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92: 103–8.
- Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC, Von dem Borne AE, Van der Schoot CE. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998; 352: 1196.
- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG* 2000; 107: 766–9.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079–85.
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46: 301–2.
- Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaiharu T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 2000; 356: 1170.
- Gonzalez-Gonzalez MC, Garcia-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Galardo E, Ayuso C, Ramos C. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 2002; 22: 946–8.

46. Rijnders RJ, Van der Schoot CE, Bossers B, De Vroede MA, Christiaens GC. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* 2001; 98: 374–8.
47. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 2004; 50: 1002–11.
48. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 2002; 48: 421–7.
49. Ying L, 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 fetal DNA in maternal plasma. *JAMA* 2005; 293: 843–9.
50. Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10762–7.
51. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, Pinkel D. Comparative genomic hybridisation for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1994; 258: 818–21.
52. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, Van Cleef B, Van Ravenswaaij CM, Brunner HG, Smeets D, Van Kessel AG. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridisation. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1269–76.
53. Vissers LE, De Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, Van der Vliet W, Huys EH, Van der Burgt I, De Jong PJ, Brunner HG, Van Kessel AG, Schoenmakers EF, Veltman JA. Array-based comparative genomic hybridisation for the genome-wide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1261–70.
54. Farina A, LeShane ES, Lambert-Messerlian GM, Canick JA, Lee T, Neveux LM. Valuation of fetal cell free DNA as a second-trimester marker of Down syndrome pregnancy. *Clin Chem* 2003; 49: 239–42.
55. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000; 46: 1832–34.
56. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YMD. M-RNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4748–53.
57. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002; 48: 1647–53.
58. Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem* 2002; 48: 1212–7.
59. Ng EK, Leung TN, Tsui NB, Lau TK, Panesar NS, Chiu RW, Lo YM. The concentration of circulating corticotrophin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin Chem* 2003; 49: 727–31.
60. Ng EK, El Sheikhah A, Chiu RW, Chan KC, Hogg M, Bindra R, Leung TN, Lau TK, Nicolaidis KH, Lo YM. Evaluation of human chorionic gonadotropin beta-subunit m-rna concentrations in maternal serum in aneuploid fetuses: a feasibility study. *Clin Chem* 2004; 50: 1055–7.
61. Hasselmann DO, Rapp G, Rossler M, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Detection of tumour-associated circulating mRNA in serum, plasma and blood cells from patients with disseminated malignant melanoma. *Oncol Rep* 2001; 8: 115–8.
62. Tsui NB, Chim SS, Chiu RW, Lau TK, Ng EK, Leung TN, Tong YK, Chan KC, Lo YM. Systematic micro-array-based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. *J Med Genet* 2004; 41: 461–7.
63. Zhong XY, Holzgreve W, Hoesli I, Hahn S. Circulatory corticotropin-releasing hormone mRNA concentrations are increased in women with preterm delivery but not in those who respond to tocolytic treatment. *Clin Chem* 2005; 51: 635–6.
64. Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM. Effects of blood processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem* 2001; 47: 1607–13.
65. Lo YM, Poon LL. The ins and outs of fetal DNA in maternal plasma. *Lancet* 2003; 361: 193–4.
66. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 2001; 47: 41–6.
67. Costa JM, Ernault P. Automated assay for fetal DNA analysis in maternal serum. *Clin Chem* 2002; 48: 679–80.
68. Johnson KL, Dukes KA, Vidaver J, LeShane ES, Ramirez I, Weber WD, Bischoff FZ, Hahn S, Sharma A, Dang DX, Hire LM, Bianchi DW, Simpson JL, Holzgreve W, Elias S, Klinger KW. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. *Clin Chem* 2004; 50: 516–21.
69. Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damerwood M, Cronin M, Chou V, Mohr M. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* 2004; 291: 1114–9.
70. Chinnapapagari SK, Holzgreve W, Lapaire O, Zimmermann B, Hahn S. Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. *Clin Chem* 2005; 51: 652–5.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

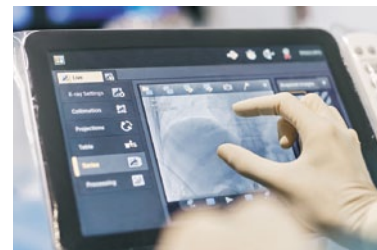
[Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)