

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Katedra antropologie a genetiky člověka



Bc. Barbora Veselá

Výběr vhodných INDEL polymorfismů na X chromozomu pro detekci fetální frakce
volné cirkulující DNA u těhotenství s plodem ženského pohlaví

Selection of appropriate INDEL polymorphisms on the X chromosome to detect the
fetal fraction of free circulating DNA in pregnancies with female fetuses

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2018

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Marie Korabečné, Ph.D. za nejlepší odborné vedení, za ochotu, trpělivost a za cenné rady a užitečné připomínky. Jsem ráda, že jsem mohla spolupracovat s tak inspirující osobou. Další velké díky patří Mgr. Ivetě Svobodové a MUDr. Evě Pazourkové. Poděkování také patří všem, kteří mě podporovali.

Abstrakt

Analýza volně cirkulující fetální DNA (cell-free fetal DNA - cffDNA) přítomné v prostředí mateřské plazmy se v posledních letech stala důležitou součástí neinvazivní prenatalní diagnostiky. Detekce sekvencí Y chromozomů ve volné cirkulující DNA (cfDNA) indikuje přítomnost mužského plodu; nepřítomnost Y chromozomálního signálu potvrzuje ženské pohlaví. Cílem práce je potvrdit užitečnost inserčních-delečních polymorfismů (INDEL) při určení ženského pohlaví plodu pomocí analýzy cffDNA metodou Digital Droplet PCR (ddPCR).

V diplomové práci byly vybrány na základě studia databázi X chromozomální polymorfismy typu INDEL s vhodnou frekvencí alel tak, aby toto vyšetření umožnilo určení přítomnosti paternálního X chromozomu v cffDNA a tak vedlo k potvrzení ženského pohlaví plodu pozitivním amplifikačním signálem a k rychlému určení velikosti fetální frakce cirkulující DNA.

Molekulární genetické vyšetření těchto polymorfismů bylo zavedeno metodou ddPCR. Byla provedena populační studie ověřující využitelnost navržených polymorfismů s ohledem na účely neinvazivní prenatalní diagnostiky. Pomocí ddPCR jsme prozkoumali X chromozomální polymorfismy typu INDEL: rs2307932, rs16397, rs16637, rs3048996, rs16680. Pro získání údajů o populaci jsme provedli testy z buklálních stěrů 50 nepříbuzných žen. Pro všechny polymorfismy typu INDEL jsme testovali výkon ddPCR v 20%, 10%, 5% a 2,5% směsích homozygotek pro deleční a inserční formy. Vyšetřili jsme plazmy 13 těhotných žen s absencí Y chromozomálního signálu v cffDNA. Výsledkem testování byla malá frakce (reprezentující otcovskou X vázanou alelu na mateřském pozadí) ve všech umělých směsích. Pozitivním amplifikačním signálem jsme potvrdili přítomnost otcovského X chromozomu u 12 z 13 těhotných žen (citlivost 92,31%).

Námi zavedený přístup umožňuje potvrzení ženského pohlaví plodu pozitivním amplifikačním signálem v rámci neinvazivní prenatalní diagnostiky založené na analýze cfDNA v plazmě těhotných.

Klíčová slova: INDEL polymorfismy, volná fetální DNA, pohlaví dítěte, Digital Droplet PCR

Abstract

The analysis of cell-free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma became an important component of non-invasive prenatal diagnostics in recent years. Detection of Y chromosome sequences in free circulating DNA (cfDNA) indicates the presence of a male fetus; the absence of the Y-chromosomal signal confirms the female gender. The aim of this work is to confirm the utility of insertion-deletion polymorphisms (INDEL) for determination of the female sex of the fetus using the analysis of cffDNA by Digital Droplet PCR (ddPCR).

In the thesis, X chromosomal INDEL polymorphisms with a suitable allelic frequencies were selected from databases to allow the determination of the presence of the paternal X chromosome in cffDNA and to lead to the confirmation of the female sex of the fetus by a positive amplification signal and to rapid determination of the fetal fraction size of the circulating DNA.

Molecular genetic examination of these polymorphisms was established using ddPCR method. A population study was carried out to verify the utility of the proposed polymorphisms with regard to non-invasive prenatal diagnosis. We examined X chromosomal INDEL polymorphisms: rs2307932, rs16397, rs16637, rs3048996, rs16680 using the ddPCR methodology. In order to obtain population data, we performed tests from the buccal swabs of 50 unrelated women. For all INDEL polymorphisms, we tested the performance of ddPCR in 20%, 10%, 5% and 2.5% mixtures of homozygotes for deletion and insertion forms. We investigated the plasma of 13 pregnant women with the absence of Y chromosomal signal in cffDNA. Testing resulted in a small fraction (representing the paternal X-linked allele on maternal background) in all artificial mixtures. We confirmed the presence of the paternal X chromosome in 12 of 13 pregnant women (92.31% sensitivity) by a positive amplification signal.

Our established approach allows to confirm female fetus by a positive amplification signal in non-invasive prenatal diagnosis based on cfDNA analysis of pregnant women.

Key words: INDEL polymorphisms, cell-free fetal DNA, sex determination , Digital Droplet PCR

Obsah

Seznam použitých zkratk	5
1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1 Prenatální diagnostika	10
2.1.1 Úkoly prenatální diagnostiky	10
2.1.2 Historie prenatální diagnostiky	10
2.1.3 Přehled metod prenatální diagnostiky	11
2.2 Choroby pohlavně vázané	17
2.3 Určení pohlaví	21
2.3.1 Určení pohlaví podle přítomnosti Y chromozomu	22
2.4 Volně cirkulující DNA	25
2.5 INDEL polymorfismy	32
3. Cíl práce	35
4. Materiál a metody	36
4.1 Digital droplet PCR	36
4.1.1 TaqMan analýza	39
4.1.2 Postup ddPCR	40
4.2 Vybrané INDEL polymorfismy	42
4.3 Optimalizace metody ddPCR pro vybrané INDEL polymorfismy	43
4.4 Vyšetření X chromozomálních polymorfismů typu INDEL v bukálních stěrech pro získání údajů o populaci	44
4.4.1 Vyšetřované vzorky	44
4.4.2 Metoda	44
4.5 Testování citlivosti ddPCR pro směsi 20%, 10%, 5% a 2,5% jednoho homozygota na pozadí opačné varianty	45
4.5.1 Vyšetřované vzorky	45
4.5.2 Metoda	45
4.6 Otestování plazmatické cfDNA těhotných žen	47
4.6.1 Vyšetřované vzorky	47
4.6.2 Metoda	47
5. Výsledky	51
5.1 Optimalizace metody ddPCR pro vybrané INDEL	51

5.2	Vyšetření X chromozomálních polymorfismů typu INDEL v bukálních stěrech pro získání údajů o populaci	52
5.3	Testování citlivosti ddPCR pro směsi 20%, 10%, 5% a 2,5% jednoho homozygota na pozadí opačné varianty	56
5.4	Otestování plazmatické cfDNA těhotných žen.....	59
6.	Diskuze	66
7.	Závěr.....	70
8.	Seznam citované literatury	71

Seznam použitých zkratk

AFP - alfa-fetoprotein

AMC - amniocentéza

cfDNA - cell-free DNA – volná cirkulující DNA

cffDNA - cell-free fetal DNA – volná fetální cirkulující DNA

CVS - odběr vzorků choriových klků

ddDNA - digital droplet DNA

EDTA - ethylen-diamin tetraoctová kyselina

hCG - lidský chorion-gonadotropin

INDEL - inserční-deleční

MPS - masivní paralelní sekvenování

Mt - mutantní alela

PAPP-A - pregnancy-associated plasma protein A – specifický těhotenský protein A

PCR - polymerázová řetězová reakce

qPCR - kvantitativní polymerázová řetězová reakce

SNP - single nucleotide polymorphisms – jednonukleotidový polymorfismus

STR - short tandem repeat

Wt - wild type alela

μ E3 - nekonjugovaný estriol

1. Úvod

Prenatální diagnostika zahrnuje několik lékařských odvětví a je důležitým zdrojem informací nejen o morfologii a stáří plodu, ale také o jeho případném abnormálním vývoji způsobeném vrozenými vývojovými vadami či chromozomálními aberacemi. Dnešní výzkum se snaží zdokonalovat nové postupy a přístupy tak, aby byly přesné a šetrné jak pro matku, tak pro plod. Invazivní metody prenatální diagnostiky jsou velmi spolehlivé, ale zároveň rizikové. Zájem je tedy zaměřen na neinvazivní metody a na jejich zavedení do běžné praxe.

Mnoho vědeckých výzkumných skupin se v posledních letech snaží zaměřit na vývoj neinvazivních metod založených na analýze cfDNA kolující v periferní krvi matky.

U těhotenství s rizikem X recesivně vázaných chorob jako je například hemofilie, Duchenaova muskulární dystrofie a další je důležité včasné určení pohlaví.

V současné době se pomocí analýzy cfDNA provádí určení pohlaví tak, že se detekuje přítomnost sekvencí lokalizovaných na Y chromozomu v DNA izolované z plazmy těhotné. Pokud tyto fetální sekvence nejsou nalezeny, je pohlaví plodu určeno jako ženské. Cílem mé práce bylo vypracování takové metodiky, která by vedla k určení ženského pohlaví plodu na základě pozitivního amplifikačního signálu.

Inspirací byl výzkum Yee Ho et al., při němž bylo pro tento účel využito analýzy INDEL polymorfismů a vyšetření cfDNA metodou kvantitativní polymerázové řetězové reakce - real-time PCR (qPCR). My jsme zvolili jinou metodu - metodu ddPCR pro její schopnost poskytnout výsledky rovněž u směsných vzorků s malou koncentrací minoritní složky, jelikož cfDNA se v plazmě těhotných vyskytuje v nízké koncentraci na vysokém pozadí mateřské cfDNA

2. Literární přehled

2.1 Prenatální diagnostika

Prenatální diagnostika je soubor vyšetřovacích metod a postupů využívaných pro vyšetření a diagnostiku nenarozeného dítěte. Cílem těchto vyšetření je stanovit případnou přítomnost vrozených vývojových vad plodu v průběhu gravidity, mezi které patří geneticky podmíněné choroby a chromozomální aberace. Prenatální diagnostika se snaží odhalit co největší množství vrozených vad, které jsou neslučitelné se životem, případně jejich léčba není možná nebo je velice obtížná, umožňuje rodičům se informovaně rozhodnout, zda je vhodné ukončit těhotenství. (Webb et al., 2012)

2.1.1 Úkoly prenatální diagnostiky

Úkolem prenatální diagnostiky je včasné stanovení patologických stavů dosud nenarozeného dítěte. Na základě diagnózy je úkolem co nejlépe informovat rodiče o stavu plodu a najít co nejvhodnější postup. Důležitá je spolupráce s ostatními odborníky zejména genetiky, neonatologů, dětskými chirurgy, ortopedy apod. V některých případech (zejména u závažných vrozených vad) může prenatální diagnostika vyústit v ukončení gravidity dle stávajících platných právních předpisů. (Hájek et al., 2000)

V případě závažného poškození plodu lze ženě uměle přerušit těhotenství ze zdravotních důvodů s jejím souhlasem nebo z jejího podnětu, jestliže je ohrožen její život, zdraví, zdravý vývoj plodu nebo jestliže jde o geneticky vadný vývoj plodu. (Zákon č.66/1986 Sb)

2.1.2 Historie prenatální diagnostiky

Do počátku 20. století existovalo jen velmi málo možností, jak pozorovat vývoj plodu. Stav plodu se dal odhadovat jen dle jeho pohybů, velikosti břicha, poslechu ozev stetoskopem. Od počátku 20. století bylo možné plod rentgenovat, ale naštěstí byla nebezpečnost této techniky odhalena. (Hammer-Jacobsen, 1959)

Díky velkému technickému rozvoji a pokroku ve vědě bylo možné od 70. let 20. století rutinní zavedení nových přístrojů - sonografu (ultrazvukový zobrazovací přístroj) a kardiokografu, přístroje registrujícího okamžitou srdeční frekvenci, kontrakce děložní a pohyby plodu. Došlo také k rozvoji genetiky, která se stala významnou oblastí prenatální diagnostiky.

Od 60. let 20. století se začala z genetických důvodů praktikovat amniocentéza (AMC). Díky této metodě proběhl výzkum (Steele a Roy Breg, 1966), který potvrdil přítomnost buněk, které jsou původem z plodu a nalézají se v plodové vodě. Tímto autoři potvrdili možnost chromozomové analýzy buněk z amnionové tekutiny a dali tak základ prenatalní diagnostice genetických poruch.

V druhé polovině 80. let 20. století se rozšířil obor neinvazivní prenatalní diagnostiky a díky studiím Bogart et al. 1987 a Wald et al. 1988 došlo k testování biochemických markerů, hormonů a jim podobných látek. Stanovením jejich hladin lze ukázat na rizika vrozených vývojových vad plodu.

Díky dalším vědeckým pokrokům se prokázalo, že fetální buňky a cfDNA mohou být izolovány z periferní krve těhotných žen neinvazivním způsobem a mohou být použity pro studium fetální DNA. (Bianchi et al., 1990; Chueh a Golbus, 1993; Simpson a Elias, 1994; Lo, 1996; Lo et al., 1997)

Tento objev se stal základem pro neinvazivní prenatalní diagnostiku až do současnosti, kdy dochází k vývoji co nejdokonalejších, nejpřesnějších a nejrychlejších metod založených na technice masivního paralelního sekvenování (MPS) volné DNA z plazmy těhotných. (Chiu et al., 2008; Hartwig et al., 2017; Le Conte et al., 2017)

2.1.3 Přehled metod prenatalní diagnostiky

V současnosti máme k dispozici širokou škálu prenatalních vyšetření, která pokrývají období celého těhotenství. Z hlediska plodu je můžeme dělit na neinvazivní (vyšetření z krve matky, ultrazvukové vyšetření) a invazivní (ultrazvukem asistované metody, embryo- a fetoskopie). Celosvětově je silná motivace ke hledání postupů, které by nebyly invazivní a podaly žádanou informaci o plodu již v nejranějších stádiích těhotenství či ihned po vzniku vady. Dosud nezbytné invazivní metody musí splňovat podmínku vysoké bezpečnosti pro matku i plod. Jednotlivé neinvazivní i invazivní metody prenatalní diagnostiky se liší mírou rizika pro plod a spolehlivostí výsledku. Zatím neexistuje jediná univerzálně použitelná metoda prenatalní diagnostiky, ale jednotlivé postupy se navzájem vhodně doplňují. (Calda, 2003)

2.1.3.1 Neinvazivní metody

Mezi neinvazivní metody se řadí metody nezatěžující zdraví matky a plodu. Tyto postupy se snaží být jednoduché a bezpečné s co nejmenším rizikem pro matku. Především se jedná o biochemický screening a ultrazvukové vyšetření. Jde pouze o

screeningové metody, což znamená, že se hledají jedinci s rizikem výskytu vrozené vývojové vady.

Jako biochemické markery při screeningu vrozených vývojových vad slouží látky produkované fetoplacentární jednotkou. U těhotenství nesoucích plod s některou z chromozomálních aberací jsou jejich hladiny odlišné od těhotenství se zdravým plodem, látky nejsou přímo asociované s konkrétními chromozomy, pouze s fenotypem. Díky těmto zjištěním proběhly v druhé polovině 80. let jednoduché krevní testy, které tak dokázaly identifikovat riziková těhotenství. (Wald et al., 1988)

Od konce 80. let se v kombinaci s věkem matky používaly různé markery mateřského séra, zejména alfa-fetoprotein (AFP), lidský chorion-gonadotropin (hCG) a nekonjugovaný estriol (μE3) k průkazu Downova syndromu. (Haddow et al., 1992; Spencer et al., 1992; Simpson et al., 1995)

O deset let později byla v druhém trimestru vyvinuta biochemie mateřského séra a podrobná ultrasonografická vyšetření, která umožnila identifikovat riziková těhotenství. V devadesátých letech se prenatální screening přesunul do prvního trimestru, kde byl kombinován věk matky a hladiny látek beta-hCG a PAPP-A (pregnancy – associated plasma protein A – specifický těhotenský protein A). (Spencer et al., 1999; Gorduza et al., 2018)

V současnosti se provádí biochemický screening v I. a v II. trimestru. Biochemický screening v I. trimestru (11. – 13. gestační týden) se provádí z krevního séra matky. Sledují se parametry β -hCG, PAPP-A, věk matky a tělesná hmotnost matky. Výsledky hodnotí počítačový program, který stanoví rizika vrozených chromozomových aberací. Falešná pozitivita testu je 5%, nižší než u biochemického screeningu II. trimestru.

Biochemický screening v II. trimestru je založen na tzv. tripple testu (16. - 18. gestační týden), který je také prováděn z krevního séra matky a sleduje hodnoty AFP, hCG a μE3 . Počítačový program vypočítá individuální rizika vrozené vývojové vady. Falešná pozitivita testu je 10-30%. V případě pozitivního výsledku je doporučeno vyšetření metodou invazivní prenatální diagnostiky.

Trendem se stalo kombinování těchto biochemických screeningů s dalšími neinvazivními metodami. Nejvíce používaný v praxi je kombinovaný screening, je spojením biochemického screeningu I. trimestru s ultrazvukovým vyšetřením v I. trimestru. Tento postup je výhodný, dochází k vysokému záchytu patologií a k rychlému získání výsledku. (Hájek et al., 2000)

Klinicky užitečný ultrazvuk je k dispozici přibližně 30 let. Během uplynulých 20 let se zlepšila technologie a dostupnost vybavení a využilo se ultrazvuku jako nedílné součásti klinické péče v těhotenství. Sonografického vyšetření se používá například k detekci placenty, hodnocení gestačního věku, identifikaci počtu a polohy plodů, dokumentaci plodu, hodnocení objemu plodové vody a biofyzikálnímu hodnocení plodu. Ultrazvuk byl také použit k vyhodnocení dělohy, děložního čípku a anatomie plodu a byl nástrojem pro identifikaci malformací již ve 12. týdnu gestace. Všechny tyto informace jsou všeobecně uznávány jako složky kompletního porodnického vyšetření ultrazvukem. (Simpson et al., 1995)

Vyšetření plodu v děloze pomocí ultrazvuku je jedním z nejdůležitějších faktorů při screeningu vrozených vývojových vad. Ultrazvuk v diagnostice fetálních genetických syndromů slouží jako screeningový nástroj k identifikaci fetálních, placentárních a amniotických abnormalit. Je také nezbytný pro identifikaci strukturálních malformací plodu a je nedílnou součástí screeningu plodu, zejména při definování gestačního věku spojeného se sérovými markery. Pro definitivní diagnózu je často potřebná aplikace invazivní metody (odběr vzorku choriových klků nebo plodové vody pro genetické vyšetření) prováděné pod ultrazvukovým vedením. Současné důkazy podporují využití ultrazvuku v prvním trimestru jako screeningového nástroje pro vybrané genetické syndromy. Ultrazvuk druhého trimestru poskytuje nejvíce informací o abnormalitách plodu. Je důležité použít metodické rutiny při provádění a vyhodnocování anatomického průzkumu, aby bylo zajištěno kompletní posouzení anatomie plodu. Ultrazvuk v prvním trimestru se zaměřuje především na měření nuchální translucence při hodnocení rizika Downova syndromu, ultrazvuk druhého trimestru však může identifikovat mnohem specifičtější vady, které se řídí odlišným vzorem pro každý genetický syndrom. Ultrazvuk v třetím trimestru může být také použit jako doplněk anatomického průzkumu druhého trimestru, aby sledoval vývoj zjištěných abnormalit plodu. Ultrazvuk třetího trimestru jako screeningový nástroj pro fetální genetické syndromy má však omezenou užitečnost. (Conner et al., 2014)

Další metodou neinvazivní diagnostiky je analýza DNA plodu. Prenatální diagnóza vyžaduje získání embryonálních nebo fetálních buněk použitím invazivních metod, jako je odběr vzorků choriových klků (CVS) nebo AMC. Všechny tyto metody přinášejí malé riziko spontánních potratů, porodnického krvácení a poškození plodu. Fetální buňky se používají pro cytogenetickou nebo molekulární diagnostiku. Díky výzkumu z roku 1997 došlo k objevu přítomnosti cfDNA v plazmě matky. (Lo et al.,

1997) Kvůli velmi jednoduchému neinvazivnímu odběru vzorků pro molekulární diagnostiku (vzorek krve těhotné) se tato metoda stala v posledních letech velmi vyhledávaným tématem pro další výzkumy. Například studie Lo et al. 1998 ukazují, že cfDNA může být detekována v mateřském séru již v 7. týdnu těhotenství a že se zvyšuje její koncentrace v průběhu těhotenství. V Tabulce 1 jsou shrnuté metody, techniky a klinická dostupnost při testování cfDNA v současné klinické praxi. Tato data naznačují, že fetální DNA je snadno detekována v mateřské plazmě a séru a je tak cenným zdrojem materiálu pro neinvazivní prenatalní diagnózu.

Tabulka 1 - Klinická aplikace cfDNA v mateřské plazmě (Hui a Ferres, 2014) – technika MPS – sekvenování genomu, technika SNPs – hledání jedno nukleotidových polymorfismů

Test	Techniky	Klinická dostupnost
Běžné chromozomální aneuploidie (13, 18, 21, X a Y)	MPS, SNPs	Na celém světě
Pohlavně vázané choroby	PCR	Evropa
Nekompatibilita Rhesus D	PCR	Evropa
Dědičná monogenní choroba	MPS, PCR	Pouze výzkum
Další strukturní abnormality	MPS, SNPs	Dostupnost limitovaná

2.1.3.2 Invazivní metody

Hlavním účelem invazivních vyšetření je získat vzorek tkáně plodu pro vyšetření karyotypu či pro molekulárně genetické vyšetření. Cílem je vyloučit u plodu chromozomální aberace či geneticky podmíněné choroby. Vzhledem k určitému riziku spojeného s jejich provedením jsou tyto metody nabízeny pouze na základě předem provedených vyšetření, která prokážou určitá rizika vrozené vývojové vady.

Invazivní diagnostika je nabízena ženám s vyšším rizikem chromozomálních aberací založeném na věku matky, zvýšeném riziku kvůli předchozím komplikacím nebo předem existujícím podmínkám – chromozomálním aberacím či mutacím u rodičů nebo v předchozích těhotenstvích, kvůli prenatalní detekci malformací plodu, jiných abnormálních ultrazvukových nálezů nebo kvůli biochemickým screeningovým testům. (Monni et al., 2014)

Díky ultrazvukové diagnostice, která zaujímá dominantní postavení v prenatalní péči, se rozvinuly ultrazvukem asistované metody, z nichž nejběžnější jsou AMC, CVS

a punkce pupečníku, které patří k hlavním metodám invazivní prenatalní diagnostiky. (Calda, 2003)

AMC je odběr vzorku plodové vody jehlou přes stěnu břišní pod kontrolou ultrazvukem. Obvykle se provádí mezi 16. a 18. týdnem gravidity. Umožňuje vyšetření buněk plodové vody a její biochemické vyšetření. CVS se dělá dříve než AMC, a to zhruba mezi 10. a 13. gestačním týdnem. CVS se provádí speciální jehlou pod ultrazvukovou kontrolou. Výhodou CVS je možnost časnější diagnostiky, kultivace buněk choria je rychlejší - buňky trofoblastu mají vysokou mitotickou aktivitu oproti amniocytům získaných AMC, které se kultivují pomaleji. Kordocentéza neboli odběr pupečnickové vody je další invazivní metodou. Vyšetření lze provádět od 18. gestačního týdne. Punkce pupečníku a odběr fetální krve z pupečnickové vény se provádí speciální jehlou pod ultrazvukovou kontrolou. Získané krevní elementy lze opět užít k vyšetření karyotypu plodu či pro molekulárně genetické vyšetření. Karyotypizace je velmi rychlá a výsledky jsou k dispozici během 48–72 hodin. (Calda et al., 2010)

Při kordocentéze může být dosaženo vysokého procenta čisté fetální krve. Tato technika byla ve Francii široce používána k posuzování specifické infekce plodu při těhotenstvích ohrožených toxoplazmózou a zarděnkami. Rovněž byla použita k posuzování rovnováhy acidobazických a imunizačních stavů plodu, ke zvládnutí idiopatické trombocytopenie a k provádění farmakologických studií. (Hunter, 1988)

Velkou nevýhodou invazivních prenatalních metod je možnost potratu, zapříčiněného právě provedeným vyšetřením. Pro příklad uvádím několik studií, které hodnotily procentuální výskyt ztráty plodu. Ve studii z Dánska byla shrnuta data od více než 60 000 těhotenství s jedním plodem, které podstoupily AMC nebo CVS v období od roku 1996 - 2006. Postprocedurální ztráty plodu byly 1,4% u AMC a 1,9% u CVS před 24. týdnem těhotenství. Rozdíly mezi ztrátami po AMC a CVS lze vysvětlit rozdílem ve věku gestace a v době procedur. (Tabor et al., 2009)

V další studii z Ameriky bylo provedeno 9 886 CVS a 30 893 AMC potvrzujících normální karyotyp plodu v období 1983 - 2003. Celkové ztráty těhotenství byly 3,12% u CVS a 0,83% u AMC ($P < 0,001$). Při vyšetření v pětiletých intervalech docházelo k významnému poklesu ztrát u CVS a nezanedbatelnému snížení potratovosti v důsledku AMC v průběhu času. Přestože ztráta těhotenství po CVS během celého studovaného období 1998 až 2003 byla vyšší než u AMC, nebyl nalezen rozdíl mezi oběma postupy, poměr ztrát po CVS versus AMC byl 1,03. (Caughey, 2006)

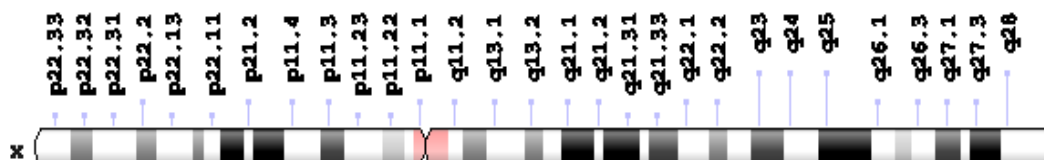
Poslední z uvedených studií byla provedena napříč různými databázemi prováděných výzkumů zabývajících se AMC a CVS. Pro tuto studii byly vybrány studie provedené v období od roku 2000 – 2014. Výsledkem je vážené souhrnné riziko potratů po invazivních postupech, 324 ztrát u 42 716 žen, které podstoupily AMC a 207 ztrát u 8899 žen, které podstoupily CVS. Riziko spontánního potratu do 24. týdnů u žen, které prodělaly AMC a CVS, bylo 0,81% (95% CI, 0,58–1,08%) a 2,18% (95% CI, 1,61–2,82%). (Akolekar et al., 2014)

2.2 Choroby pohlavně vázané

Chromozomy X a Y, které určují pohlaví, jsou distribuovány mezi ženy a muže nerovnoměrně, muži mají pouze jeden X chromozom, ale ženy dva. Vzhledem k X chromozomálním genům, muži jsou hemizygotní, protože mají pouze jeden X chromozom, ale ženy mohou být pro každou alelu hetero- i homozygotní.

X chromozom má délku přibližně 155 Mbp, obsahuje 1 098 genů, hustota genů na X chromozomu je tedy 7,1 genu na Mbp. Tato hustota je nejmenší mezi všemi chromozomy. Nicméně chromozom X obsahuje největší známý gen v lidském genomu, dystrofin v Xp21.1, který je dlouhý 2,220,223 bp a mutace v něm jsou spojené s dědičnými onemocněními. Určité geny jsou lokalizované v tzv. pseudoautozomálních úsecích chromozomu X. Jedná se o dva úseky – PAR 1 (větší úsek) na konci krátkého raménka p a PAR 2 (menší úsek) na konci dlouhého raménka q. Na Obrázku 1 je zobrazen diagram X chromozomu ukazující jeho poměrnou velikost a typické pruhování, které je charakteristickým vzorem tmavých a světlých pásů, které se objevuje, když je chromozom natráven trypsinem a obarven Giemsovým barvivem (tzv. G-pruhování) a poté je prohlížen pod mikroskopem. Tyto pruhy se používají také k popisu polohy genů na každém chromozomu. (Ross et al., 2005)

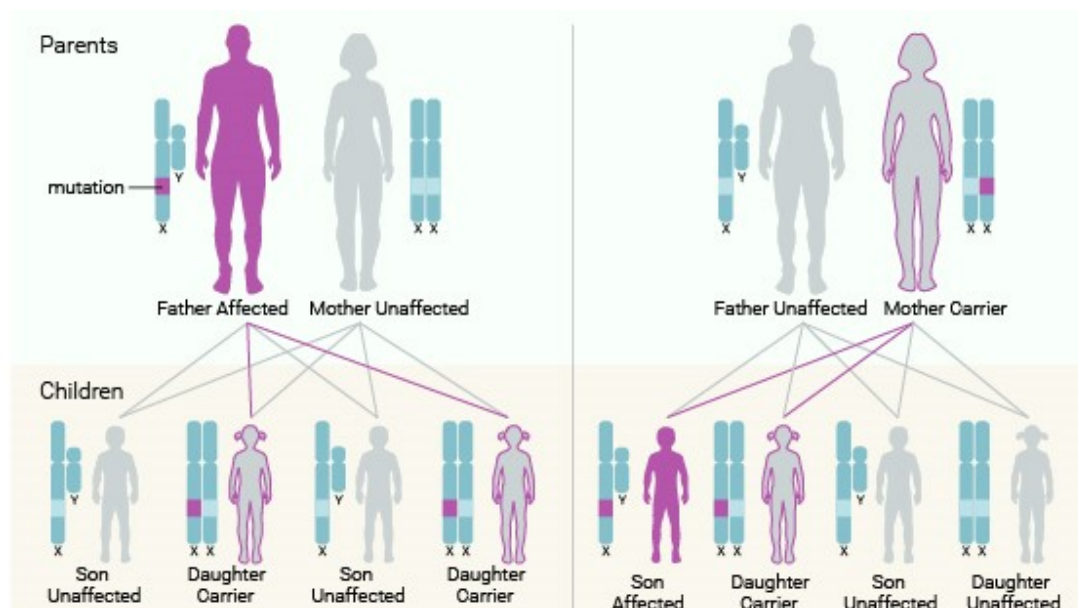
Obrázek 1 - Idiogram X chromozomu (<https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/X#idiogram>)



Dědičnost X vázaných recesivních fenotypů probíhá podle dobře definovaného a rozpoznatelného schématu, X vázaná mutace je v typickém případě fenotypově exprimována u všech mužů, kteří jí zdělili a u žen, které jsou pro mutaci homozygotní. Proto jsou X vázané recesivní choroby omezeny pouze na mužské pohlaví. Tedy všichni synové postiženého dostanou od otce Y chromozom a od matky X a jsou nepostiženi, dcery však dostanou paternální X chromozom s poškozenou alelou a všechny se stanou přenašečkami. Pokud je mutovaný gen přítomný jak u matky, tak u otce, tak je možnost, že i dcera bude postižena. Gen odpovědný za postižení je přenášen z postiženého muže přes všechny jeho dcery, gen není nikdy přenesen z otce na syna (viz Obrázek 2). U mužů jsou geny pro X vázané nemoci vystaveny selekci, pro některá postižení je selekce kompletní pro jiná neúplná. To, zda je selekce úplná či není, závisí na

reprodukční zdatnosti genotypu. Pokud jsou pacienti postiženi závažnou X vázanou chorobou, nemohou se rozmnožovat a selekce je tedy úplná. Mutantní alela, kterou nesou, se z populace ztratí. Jelikož se incidence nemoci v populaci nemění, musí proto mutantní alely být kontinuálně nahrazovány novými mutacemi. Nové mutace tvoří významnou část z izolovaných případů mnoha vázaných X dědičných chorob.

Obrázek 2 - Schéma představující systém recesivně gonozomální dědičnosti, vlevo je zobrazení situace, kdy muž je postižený a žena zdravá. Vpravo je způsob přenosu recesivního onemocnění pokud žena je přenašečka a muž je zdravý (<https://ghr.nlm.nih.gov/primer/inheritance/inheritancepatterns>)



X vázaná choroba s dominantním projevem je obvykle exprimována heterozygoty, všechny dcery postižených mužů jsou postižené a žádný z jejich synů postižen není. Ženy mají dva X chromozomy, proto každé dítě postižené ženy má 50% možnost, že bude nemocné stejně jako u autozomální dědičnosti. X vázané dominantní choroby jsou častější u žen než u mužů. Fenotypový projev nemoci je u heterozygotek mírnější. Některé genetické defekty u mužů s X dominantní nemocí jsou letální ještě před narozením. (Thompson et al., 2004)

V současné době jsou vybrané genetické choroby, které mají X vázanou dědičnost, a jejich výskyt se zkoumá při prenatální diagnostice. Těmito nemocemi je hemofilie, Duchennova a Beckerova svalová dystrofie, syndrom fragilního X chromozomu, adrenoleukodystrofie, X vázaná těžká imunodeficience, retinitis pigmentosa, Alportův syndrom, X vázaný hydrocefalus, anhidrotická ektodermální dysplasie, Hunterův

syndrom, Menkesův syndrom a Lesch-Nyhanův syndrom. (Costa et al., 2002a). Pro přehled uvádím jen některé příklady těchto nemocí a jejich příznaky.

Hemofilie je geneticky podmíněné onemocnění projevující se poruchou srážlivosti krve. Hemofilie se navenek projevuje chorobnou krvácivostí a krevními výrony do svalů či kloubů, hlavně do kolenou, ramen, loktů, zápěstí a kotníků. Vyznačuje se omezenou schopností organismu zastavit krvácení a velkou bolestí v kloubech. Po sledování dalších rodokmenů rodin postižených touto nemocí bylo potvrzeno, že se jedná o gonosomálně recesivní onemocnění. Nejčastější formy hemofilie jsou hemofilie typu A a typu B. Tyto formy se liší tím, že v krvi je nedostatek nebo absence různých typů faktorů srážlivosti. U hemofilie A jde o faktor VIII a u hemofilie B o faktor IX koagulační kaskády. V léčebném procesu se injekční aplikací podají koncentráty faktorů srážlivosti, které chybějí v krvi nemocného jedince. (Thompson et al., 2004)

Duchennova muskulární dystrofie je vrozené dědičné onemocnění charakterizované ztrátou aktivní svalové hmoty. Jedná se o X vázanou recesivní chorobu a vyskytuje se s četností 1:3 300 narozených chlapců. Dystrofie je zapříčiněna mutací genu, který má na starost tvorbu specifické strukturální bílkoviny, která se nazývá dystrofin. Je to strukturální protein nezbytný pro udržení integrity svalové membrány. Váže aktinový cytoskelet k extracelulární matrix a podílí se na uspořádání synaptického spojení. Gen pro dystrofin je lokalizován na krátkém raménku chromozomu X. Příčinou nemoci je úplné ukončení tvorby dystrofinu. Mírnější formu nemoci představuje tzv. Beckerova muskulární dystrofie, kde je dystrofin sice tvořen v malém množství, ale je poškozený. Celkový nástup a projev Beckerovy dystrofie je mírnější oproti Duchennově muskulární atrofii. (Thompson et al., 2004) Průběh nemoci a výskyt v rodokmenu byl podrobně zaznamenán v práci Carpenter, 1909. Chlapec se narodí bez příznaků a jeho vývoj probíhá po několik prvních měsíců naprosto normálně. Později nastupují první příznaky, projevuje se nedostatek dystrofinu a odumírající svalová vlákna nahrazuje vazivo. Jedinci začínají mít problémy s chůzí, se vstáváním, oblékáním, jezením, chozením do schodů. Mezi osmým a dvanáctým rokem jsou upoutáni k invalidnímu vozíku. Jeden z dalších symptomů je obtížné dýchání, dané postižením dýchacích svalů. (Carpenter, 1909) Dochází nejdříve k postižení dolního pletence a poté horního. Kromě kosterních svalů se postižení týká i svalu srdečního. Toto onemocnění je pro muže letální, ženy přenašečky ve většině případů nemají žádné symptomy. Díky dnešním molekulárním technikám v prenatalní diagnostice je určení této nemoci u plodu díky

možnosti nalézt delece, duplikace i bodové mutace v genu pro dystrofin přesné. (Falzarano et al., 2015)

Syndrom fragilního X chromozomu je jednou z nejčastějších příčin genetického mentálního postižení a postihuje hlavně muže. Tato choroba je nejčastější formou středně těžké mentální retardace. Název této nemoci se vztahuje k cytogenetickému markeru na X chromozomu v oblasti Xq27.3, kde se nachází fragilní místo. Příčinou tohoto syndromu je dynamická mutace v genu FMR1, který je lokalizován v této oblasti. Jde o masivní expanzi tripletové repetice CGG bází. (Verkerk et al., 1991) Syndrom byl poprvé popsán v roce 1991 a díky provedenému výzkumu byla potvrzena X vázaná dědičnost (není recesivní, ale dominantní s neúplnou penetrancí). Míra projevů je závislá na rozsahu poškození genu. Je zde široká škála fenotypů, které v těžkých případech končí úplnou mentální retardací. Hlavními příznaky jsou porucha pozornosti, impulzivita, náladovost, hyperaktivita, porucha řeči, velmi omezená slovní zásoba, špatná krátkodobá paměť a různé poruchy učení. Děti mají obtíže s vytvářením osobních kontaktů, rychle se rozruší, jsou citlivé na pocity druhých. Postižení nemají výrazné fyziologické symptomy. Mají normální průměrnou délku života. (Martin a Bell, 1943) Diagnóza syndromu fragilního X se provádí pomocí přímé detekce repetice CCG v genu analýzou DNA.

X vázaná adrenoleukodystrofie je recesivně dědičná porucha lipidového metabolismu projevující se selháním kůry nadledvin. Onemocnění se začíná projevovat v různém věku v závislosti na klinické formě onemocnění. Mezi symptomy patří poruchy krátkodobé paměti, intelektu, chování. Postupně se rozvíjí i sensorické poruchy vedoucí ke slepotě a hluchotě. Rozvíjí se i motorické problémy, které vedou ke kvadruplegii. Průkazné je zvýšené množství mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem v séru a kožních fibroblastech. (Powers a Schaumburg, 1974)

2.3 Určení pohlaví

Definování pohlaví plodu je pro některé rodiče velmi zásadní. Pokud je těhotná žena heterozygotní nositelkou X vázané poruchy, je zjištění pohlaví dítěte velmi důležité. Díky včasnému určení pohlaví plodu je možné snížit počet invazivních výkonů o polovinu. Pokud je v rodině výskyt některého z těchto onemocnění, je určení pohlaví plodu prvním krokem prenatální diagnostiky.

Na konci 20. století po zavedení ultrazvuku do klinické praxe proběhlo několik studií, které hledaly správný postup a správné markery pro určení pohlaví. Výsledky sonografie byly porovnávány s karyotypem získaným při AMC. Pro určení mužského pohlaví byla potřebná vizualizace fetálního penisu a šourku. U ženského pohlaví při identifikaci bylo potřeba vizualizovat dvou nebo čtyř paralelních linií reprezentujících labiální záhyby a klitoris. Celková spolehlivost určení pohlaví plodu touto metodou se pohybuje mezi 97 - 99% u těhotenství v druhém trimestru. Chyby v diagnóze se vyskytovaly častěji při hodnocení ženského pohlaví, plod byl určen jako ženský i když měl mužský pohlavní chromozom. Při vizualizaci ultrazvukem je snazší rozpoznat mužské zevní pohlavní orgány. (Dunne a Cunat, 1982; Harrington et al., 1996; Meagher a Davison, 1996) Tyto studie navrhly možnost, že pokud se zkombinuje příčný i sagitální pohled na perineum plodu, mohlo by se předejít chybným diagnózám. Těchto předpokladů se využilo pro další studie, které měly jako jeden z dalších cílů stanovit pohlaví plodu pomocí ultrazvuku již v prvním trimestru. V těchto pracích došlo k objevu existence odlišné orientace pohlavního orgánu v polovině sagitální roviny vztahujícího se k pohlaví. (Emerson et al., 1989) Na základě tohoto objevu byla genitální oblast vyšetřena trojrozměrnou sonografií ve středové rovině a pohlaví plodu bylo určeno jako mužské, pokud byl úhel genitálního tuberkulu k vodorovné čáře přes lumbosakrální povrch kůže větší než 30°. Pohlaví plodu bylo ženské, pokud úhel genitálního tuberkulu byl paralelní nebo konvergentní (méně než 30°) k horizontální lince (viz Obrázek 3). Přesnost stanovení pohlaví se zvýšila s gestací, po 13. týdnu se úspěšnost blíží k 100%. Výsledky těchto prací naznačují, že konečné rozhodnutí o invazivním testování sexuálně podmíněných stavů by mělo být provedeno až ve 13. týdnu těhotenství. (Benoit, 1999; Efrat et al., 1999; Whitlow et al., 1999; Lev-Toaff et al., 2000; Chi et al., 2006; Hsiao et al., 2008; Youssef et al., 2011)

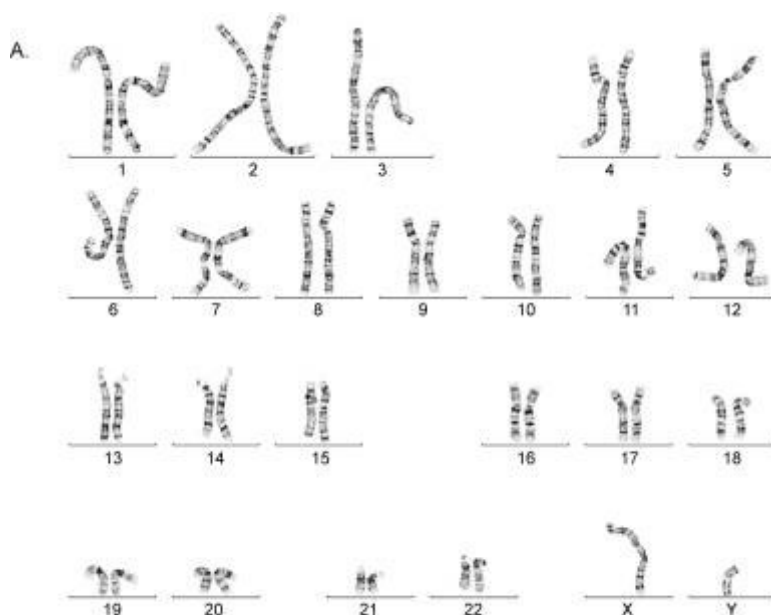
Obrázek 3 – Ultrasonografické zobrazení třech řezů plodu - muž (a) a žena (b) s vypočtenými pohlavními úhly 67,5 ° a 17,4 ° ve střední - sagitální rovině - na obrázcích v levém horním rohu, bílá tečka potvrzuje pozici genitálního tuberkulu (Youssef et al., 2011)



2.3.1 Určení pohlaví podle přítomnosti Y chromozomu

V 60. letech 20. století došlo k potvrzení, že amniotická tekutina obsahuje fetální buňky (Steele a Roy Breg, 1966), na tento objev navazovaly další studie, které kultivovaly fetální buňky a analyzovaly fetální chromozomy. Optimální čas pro AMC je mezi 14. - 20. týdnem těhotenství, kdy byla odebrána amniotická tekutina a následně byly buňky kultivovány pro karyotypizaci. Karyotypy se připravují za použití standardizovaných postupů barvení, které odhalují charakteristické strukturní rysy každého chromozomu. Karyotypy jsou připraveny z mitotických chromozomů, které byly zastaveny v metafázi ve své nejkondenzovanější konformaci. Mitózy jsou zastaveny v metafázi přidáním kolchicinu, který inhibuje činnost mitotického vřeténka. Buňky se dále ošetřují hypotonickým roztokem, který způsobí jejich prasknutí a uvolnění mitotických figur. Následuje fixace, nakapání suspenze na podložní mikroskopické sklíčko a aplikace některé ze speciálních cytogenetických barvicích procedur. Chromozomy jsou hodnoceny mikroskopicky a je sestaven karyotyp (viz Obrázek 4). (Nelson a Emery, 1970; Hsu et al., 1973; Niermeijer et al., 1976)

Obrázek 4 – Zobrazení karyotypu zdravého muže (Levy et al., 2007)

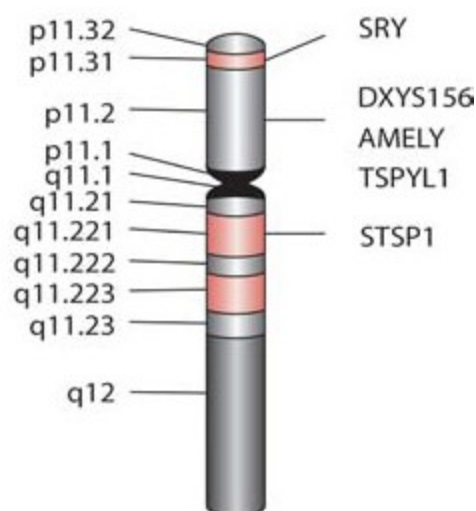


Velký vliv na určování pohlaví v prenatalní diagnostice měl objev cfDNA v krvi matky. (Lo et al., 1997) Tento objev byl velkou nadějí pro neinvazivní prenatalní diagnostiku. Mnoho výzkumných zařízení se zabývalo tímto námětem, snahou bylo najít co nejlepší, nejjednodušší, nejspolehlivější a nejlevnější postup pro zavedení této metody do klinické praxe. Všechny dosud provedené studie použily pro identifikaci pohlaví zjištění přítomnosti mužského pohlavního chromozomu Y. Standardní postup byl ve většině případů následující: mateřská periferní krev (10 - 20 ml) byla odebrána do antikoagulačních zkumavek s ethylen-diamin tetraoctovou kyselinou (EDTA). Vzorky byly převedeny do speciálních laboratoří, kde došlo ke zpracování v průběhu 24-48 hodin. Plazma byla oddělena od žilní krve dvojitým odstředováním, dále byla extrahována a skladována při -20°C. Volná DNA byla extrahována pomocí standardních postupů. Takto byla získaná volná DNA připravena pro další analýzu metodou PCR. (Hill et al., 2011) Pro identifikaci Y chromozomálních sekvencí ve volné DNA byly ve většině studií vybrány sekvence *SRY* nebo *DYS14* na Y chromozomu (viz Obrázek 5). Tyto geny jsou nezbytné pro vývoj mužských pohlavních orgánů při vývoji embrya. (Arnemann et al., 1987; Berta et al., 1990) Nebyl identifikován veliký rozdíl mezi použitím těchto sekvencí, co se týče spolehlivosti či specifčnosti metody. Pro testování, zda volná DNA obsahuje fetální Y chromozom, byly zvoleny metody qPCR a konvenční PCR. Zlepšený výkon je prokazatelně lepší s metodou qPCR a s pozdějším

gestačním stářím těhotenství. Příčinou těchto výsledků je zvyšující se koncentrace cfDNA během těhotenství. Testování může být spolehlivě provedeno mezi 7. a 12. týdnem těhotenství, dříve než pomocí sonografie. U žen, které jsou přenašečkami X vázaného recesivního onemocnění, je stanovení pohlaví před třináctým týdnem rozhodující pro indikaci invazivního testování v případě plodu mužského pohlaví. Protože tento test je neinvazivní a vysoce přesný a rychlý, může být použit jako cenný první krok v klinických situacích. Nevýhodou mateřského krevního testování je potřeba ověření přítomnosti fetální frakce cfDNA tak, aby nedošlo k vydání falešně negativních výsledků - v tomto případě chybnému určení ženského pohlaví plodu. Jiné potenciální nevýhody jsou, že testování volné DNA není zpravidla k dispozici v místě péče o těhotnou.

Celá řada studií potvrdila, že jde o jednoduchý, velmi spolehlivý test proveditelný již v prvním trimestru těhotenství. Provedení tohoto testu umožňuje snížení počtu invazivních procedur indikovaných přenašečkám X vázaných recesivních chorob. (Sekizawa et al., 2001; Xiao Yan Zhong et al., 2001; Costa et al., 2001, 2002a; Bartha et al., 2003; Hromadnikova et al., 2003; Rijnders et al., 2003; Santacroce et al., 2006; Chi et al., 2006; Boon et al., 2007; Devaney et al., 2011; Hill et al., 2011; Wright et al., 2012; Bianchi et al., 2015; Yee Ho et al., 2015)

Obrázek 5 - Y chromozom - vpravo jsou markery, které se používají při určování pohlaví, marker *DYS14* je lokalizovaný uvnitř genu *TSPYL1* (Butler a Li, 2014)



2.4 Volně cirkulující DNA

CfDNA je typ mimobuněčné DNA, která se nalézá v krevním oběhu v plazmě ve formě fragmentů. Sekvenační analýzou plazmatické cfDNA zdravých jedinců bylo zjištěno, že se jedná o dvouřetězcovou molekulu s výrazným zastoupením CG párů. 5' konec molekul byl bohatý na cytosin, zatímco 3' na guanin. Zastoupení těchto bází je důležité pro stabilitu cfDNA v plazmě. Hladiny DNA v normálních plazmatických vzorcích jsou poměrně nízké 3,6 až 5,0 ng/ml. Průměrné hodnoty jejich délky byly 176 bp. Obsah GC párů v cfDNA byl 53,7%. (Suzuki et al., 2008)

Roku 1948 Mandel a Mentais poprvé popsali přítomnost volně cirkulující DNA v lidské krvi. Následujících několik let nebyla tomuto tématu věnována větší pozornost. Vše se změnilo roku 1966, kdy byla provedena chemická analýza DNA u pacientů se systémovým lupus erythematoses a byla nalezena cfDNA v krevním séru. (Tan et al., 1966)

Díky tomuto objevu se cfDNA stala předmětem dalšího zkoumání. Steinman se ve své studii zaměřil na přítomnost cfDNA v plazmě a séru zdravých lidí. S použitím 4 různých metod detekoval cfDNA v séru, ale nikoliv v plazmě. Jeho předpokladem tedy bylo, že výskyt cfDNA v plazmě zdravých dospělých jedinců je patologický jev. (Steinman a Ginman, 1975) Tento závěr byl však později vyvrácen s použitím nových citlivějších metod. (Wu et al., 2002; Suzuki et al., 2008)

V roce 1977 se zaměřil výzkum na přítomnost cfDNA u onkologicky nemocných pacientů. Byla vyvinuta radioimunoanalýza pro určení množství cfDNA v séru. Experimentální data ukázala, že vyšší koncentrace cfDNA se nachází v séru pacientů s rakovinou, v porovnání s normálními kontrolami. Nebyla zjištěna žádná korelace mezi hladinami DNA a velikostí nebo umístěním primárního nádoru. Významně vyšší hladiny DNA se však nacházely v séru pacientů s metastatickým onemocněním ve srovnání s pacienty, u kterých nedošlo k metastázám. Po radioterapii hladiny poklesly. Obecně platí, že pokles koncentrace DNA v séru koreluje se zlepšeným klinickým stavem, jako je snížení velikosti nádoru a snížení bolesti. (Leon et al., 1977)

V publikovaných studiích je také diskutován původ cfDNA. Dle publikovaných dat jsou zvažovány 3 možné zdroje, ze kterých cfDNA může pocházet. První možností je apoptóza. (Suzuki et al., 2008) Druhou možností původu cfDNA je uvolnění z nádorových buněk po buněčné nekróze (Li et al., 2003; Freitas et al., 2010) a třetí

možností je spontánní uvolňování cfDNA z buněk do krevního oběhu. (Stroun et al., 2001)

V současné době je publikováno mnoho prací, které se zabývají studiem cfDNA. Tyto výzkumy se zaměřují hlavně na diagnostiku nádorových onemocnění a prenatální diagnostiku.

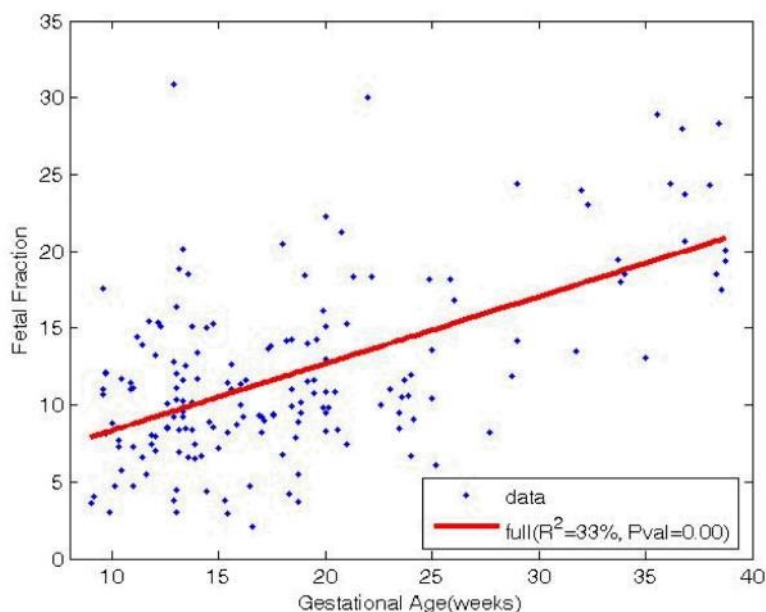
Obor prenatální diagnostiky byl velmi ovlivněn v roce 1997. V tomto roce byla zjištěna přítomnost fetální DNA v mateřské plazmě. Impulzem pro analýzu fetální DNA z krve matky byly dříve provedené práce a zjištění přítomnosti cfDNA v plazmě a séru pacientů s rakovinou. Byla použita metoda rychlého varu k extrakci DNA z plazmy a séra. DNA z plazmy a séra poté prošla citlivým testem, při něm došlo k detekci cirkulující mužské fetální DNA u žen, které nesou plod mužského pohlaví. Y chromozomální sekvence byly detekovány u 24 (80%) z 30 vzorků mateřské plazmy a u 21 (70%) z 30 vzorků mateřského séra od žen nesoucích plody mužského pohlaví. (Lo et al., 1997) Objev cffDNA umožnil nový pohled na fyziologii matky a plodu, může změnit budoucí prenatální přístupy. Cílem výzkumů, které se zabývají cffDNA je poskytnout snadné, přístupné a bezpečné prostředky pro prenatální diagnostiku. Existence cffDNA, která byla dosud neznámá, může být potenciálně užitečným zdrojem fetálního genetického materiálu, který lze získat jednoduše skrze sběr vzorků periferní krve matky. Vzhledem k tomu, že nepředstavuje žádné riziko pro plod, zjištění cffDNA přidalo nový rozměr hledání neinvazivních metod pro prenatální diagnostiku. (Chiu a Lo, 2002)

Pro zjištění, zda je cffDNA přítomna v dostatečném množství v mateřské plazmě pro rutinní detekci a zda v průběhu těhotenství dochází ke změnám v její koncentraci, byly aplikovány metody založené na qPCR. Byl vyvinut systém využívající TaqMan technologie k posuzování koncentrace cffDNA pomocí kvantifikace genu specifického pro chromozom Y. Tato metoda se ukázala jako dostatečně citlivá. V jedné z prvních studií bylo prokázáno, že cffDNA je přítomna v dostatečných koncentracích v plazmě matky (dosáhla v počátečním těhotenství v průměru 25,4 GE/ml a v pozdním těhotenství 292,2 GE/ml). Tyto koncentrace odpovídají 3,4% a 6,2% k celkové plazmatické DNA v časném a pozdním těhotenství. (Lo et al., 1998b) Stoupající koncentrace cffDNA během těhotenství potvrdily i další studie jako Costa et al. 2001, Chan et al. 2003 a Horinek et al. 2008 - viz Tabulka 2 a Obrázek 6.

Tabulka 2 - Úrovně cfDNA (*SRY*) v plazmě matky v různých gestačních stářích. Čísla v závorce ukazují, kolik těhotenství bylo analyzováno; GE/ml = počet genomických ekvivalentů v 1ml mateřské plazmy (Costa et al. 2001)

Statistické parametry	První trimestr (221) GE/ml	Druhý trimestr (677) GE/ml	Třetí trimestr (121) GE/ml	Celé těhotenství (1019) GE/ml
Průměr	23,1	32,4	77,7	35,8
Medián	9,1	16,6	51,8	16,6

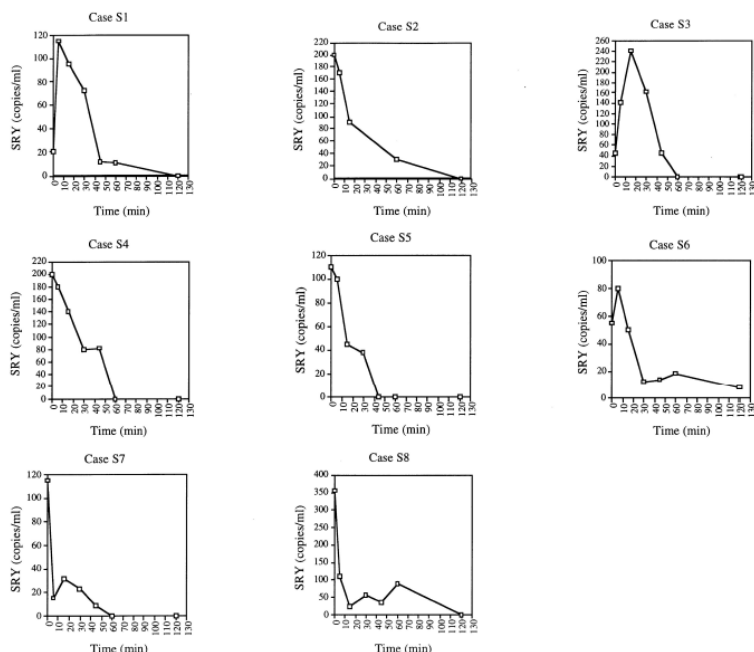
Obrázek 6 – Stoupající koncentrace cfDNA v plazmě matky během těhotenství, na ose Y je procentuálně vyjádřená fetální frakce cfDNA, na ose X je zobrazen týden těhotenství (Zimmermann et al., 2012)



Provedené studie rovněž dokázaly, že cfDNA může být detekována v mateřském séru již v 7. týdnu těhotenství. (Lo et al., 1998b; Costa et al., 2001)

Dalším velmi důležitým parametrem pro rutinní detekci je clearance cfDNA. Studie, která se touto problematikou zabývala, využila kvantitativní analýzu sekvencí genu *SRY* v mateřské plazmě u těhotenství nesoucích mužské plody. Průměrný poločas rozpadu cfDNA po porodu byl 16,3 minuty (rozsah 4-30 min) - viz Obrázek 7. Rychlá clearance cfDNA naznačuje, že analýza plazmatické cfDNA může být méně náchylná k falešně pozitivním výsledkům. (Lo et al., 1999c; Ariga et al., 2001) Falešně pozitivní výsledky mohou být potenciálně zaznamenány u analýzy fetálních buněk v mateřské krvi, které mohou v organismu matky přetrvávat z předchozích těhotenství. (Bianchi et al., 1996)

Obrázek 7 - Výsledek testování přítomnosti cfDNA v plazmě těhotných žen a jejího přetrvávání po porodu u osmi případů. Na ose Y je zobrazený počet kopií *SRY* genu na ml a na ose X je čas, kdy byla odebirána krev a testována na přítomnost cfDNA. Čas nula je těsně před porodem (Lo et al., 1999c)



Jedním z dalších parametrů cfDNA a cffDNA je jejich velikost a původ. Volná DNA v plazmě je reprezentována převážně krátkými fragmenty DNA. Fragmenty DNA v plazmě těhotných žen jsou významně delší než v plazmě netěhotných žen a molekuly DNA pocházející z matky jsou delší než ty, které jsou odvozeny od plodu. (Chan, 2004) Vypracování metody dovolující délkovou separaci fetálních fragmentů z celkové cfDNA obsažené v mateřské plazmě by usnadnilo rychlou detekci genetických determinant paternálního původu. Za využití mikrosatelitních markerů specifických pro chromozom 21 bylo zjištěno, že cffDNA má průměrnou délku <math><0,3\text{ kb}</math>, zatímco mateřské fragmenty cfDNA byly v průměru delší než 1 kb. (Li et al., 2004) CffDNA je do krevního oběhu matky uvolňována z povrchu trofoblastu ve formě jeho apoptotických fragmentů. (Sekizawa et al., 2002, 2003; Guibert et al., 2003)

V souvislosti s charakterizací cffDNA následovaly další výzkumy, které se soustředily na využití analýzy cffDNA v prenatalní diagnostice. Hlavními řešenými tématy byly zejména: aplikace při RhD genotypování, diagnostika v případě paternálně přenosné autosomálně dominantní choroby v rodině, kvantitativní abnormality cffDNA v plazmě matky v návaznosti na patologický průběh těhotenství (např. preeklampsie) a určení pohlaví plodu u přenašeček X vázaných recesivních chorob.

CffDNA se nachází v mateřské plazmě na pozadí mateřské DNA, proto hledání dalších potenciálních aplikací cffDNA se zaměřuje na detekci otcovských alel, které se

liší od mateřského genotypu. Schopnost přesně a neinvazivně určit RhD status plodu je potřebná pro prenatální terapii u RhD negativních žen, jejichž plod je heterozygotní pro *RHD*. Použitím kvantitativní PCR amplifikace *RHD* došlo ke genotypizaci plodového *RHD* analýzou DNA extrahované z plazmatických vzorků těhotných žen. V počátcích byly výsledky studií zabývajících se tímto tématem shodné s výsledky sérologické analýzy pouze při použití mateřské plazmy z druhého trimestru těhotenství. (Lo et al., 1998a)

Díky metodologickému pokroku došlo ke zvýšení citlivosti i specifity. V dalších studiích byla provedena analýza vzorků mateřské krve v gestačním věku prvního trimestru. Výsledky z těchto experimentálních studií byly srovnávány s výsledky dosaženými z analýzy provedené na materiálu získaném invazivním postupem. Citlivost metody založené na plazmatické PCR byla vysoká, přičemž oba možné fetální genotypy byly správně stanoveny téměř ve všech vyšetřovaných případech. Díky snadnosti a rychlosti, s jakou lze provádět metodu založenou na PCR, se stala vhodnou metodou pro analýzu *RHD* genů. (Zhong et al., 2000; Xiao Yan Zhong et al., 2001; Costa et al., 2002b; Hromadnikova et al., 2005; Minon et al., 2008)

K prenatální diagnostice v případě autosomálně dominantních chorob v rodinách je stále zapotřebí použití invazivních postupů jako je například AMC. Díky přítomnosti cfDNA v plazmě matky by se dalo těmto invazivním metodám předejít a i v případě autosomálně dominantní choroby děděné v rodině paternálně provést prenatální diagnostiku neinvazivně. Huntingtonova choroba je velmi často předmětem prenatální diagnostiky. V proběhlé studii došlo k úspěšné diagnostice s neinvazivním postupem u plodu v 13. týdnu těhotenství s použitím fetální DNA z mateřské plazmy kvantitativní fluorescenční metodou PCR. (González-González et al., 2003) Jiná studie použila PCR amplifikaci mutace *Q890X* a následnou restrikční analýzu PCR produktu pro získání diagnostického výsledku týkajícího se cystické fibrózy. Došlo k detekci paternální mutace v mateřské plazmě. (González-González et al., 2002) Achondroplasie je jednou z dalších autosomálně dominantních chorob, u kterých byl proveden neinvazivní postup určení přítomnosti mutace u plodu. Achondroplasie je nejčastější forma trpaslictví u člověka způsobená bodovou mutací v jediném genu. Použitím PCR a restrikčních fragmentů bylo možné detekovat mutaci v plazmě ženy, která nesla plod podezřelý z achondroplasie. (Saito et al., 2000) Objev cfDNA v mateřské plazmě poskytl alternativní a neinvazivní přístup k prenatální diagnostice také v případě talasémie. Pro detekci mutace kodonu globinového genu v cfDNA byly pro tento výzkum navrženy

specifické primery a fluorescenční sondy a test byl aplikován na osm plodů ohrožených touto nemocí. Fetální genotyp byl zcela shodný s konvenční analýzou, talasémie byla neinvazivně vyloučena ve dvou těhotenstvích. (Lo et al., 2002)

Další studie se zabývaly kvantitativními abnormalitami cffDNA v plazmě matky. Cílem studií bylo zjistit, zda existuje vztah mezi koncentrací cffDNA a možnými komplikacemi v těhotenství jako je preeklampsie, předčasný porod, placenta previa a další. Měření fetální DNA může být užitečné jako marker předčasného porodu, jedna z příčin perinatální morbidit a úmrtnosti. (Leung et al., 1998; Farina et al., 2005) V několika dalších studiích bylo prokázáno, že fetální frakce je ovlivněna fyziologickými vlastnostmi plodu a matky. Gestační týden tedy není jediným parametrem ovlivňujícím množství cffDNA v mateřském oběhu. Existuje řada dodatečných faktorů ovlivňujících distribuci cffDNA, jako je například patologické onemocnění spojené s placentou. Na druhou stranu určité faktory mateřské vitality, zejména fyzická aktivita (Atamaniuk et al., 2004) nebo obezita (Haghiac et al., 2012), vedou k většímu uvolňování cfDNA do oběhu, což vede k relativnímu poklesu cffDNA. Fetální frakce se snížila se zvýšenou hmotností matky a dále se zvýšila při kouření matky a při patologickém karyotypu. (Ashoor et al., 2013) Patologickým karyotypem se zabývalo více studií, některé z nich potvrdily zvýšenou hladinu cffDNA u žen nesoucích plody s trisomií 21 nebo 13. (Lo et al., 1999a; Wataganara et al., 2003; Bianchi, 2004) Preeklampsie je závažné onemocnění v těhotenství. Těhotné ženy nepocítují většinou žádné příznaky a proto vhodný a jednoduchý test by byl revolucí při diagnostice tohoto onemocnění. Díky těmto předpokladům se této tématice věnovalo několik výzkumných center. Cílem bylo charakterizovat koncentraci cffDNA, která cirkuluje v plazmě matky v různých gestačních stádiích ve fyziologických těhotenstvích a analyzovat vlivy na koncentraci cffDNA. Ve většině studií byla použita metoda qPCR a Y specifické sekvence *SRY* a *DYS14*. Pozorování naznačují, že preeklampsie je spojena s poruchami uvolňování nebo clearance mechanismů cffDNA. Tyto výsledky také naznačují využití kvantitativní analýzy cirkulující DNA jako markeru pro diagnostiku a sledování preeklampsie. (Lo et al., 1999b; Zhong et al., 2001; Sekizawa et al., 2003) V dalších studiích zabývajících se stejnou tematikou bylo objeveno, že zvýšení koncentrací cffDNA souvisí i s omezením růstu plodu a dysfunkcí placenty. Hodnoty cffDNA byly vyšší u těžké preeklampsie než u mírnějších příznaků. (Alberry et al., 2009) Další komplikace v těhotenství může nastat v případech placenty previa, zejména u pacientek s invazivní placentou. Placenta previa a předchozí děložní

chirurgie, včetně císařských porodů, jsou považovány za rizikové faktory pro invazivní placentu. U žen, které mají tyto rizikové faktory, by kvantifikace cfDNA byla zvláště užitečná při detekci invazivní placenty. Invazivní placenta je spojena s vysokým rizikem mortality. (Sekizawa et al., 2002)

V proběhlé studii autoři předpokládali, že invaze trofoblastů do děložního svalu u těchto pacientek povede ke zvýšení koncentrace cfDNA v mateřské plazmě. U žen s invazivní placentou byly skutečně nalezeny vysoké koncentrace cfDNA v plazmě, což svědčí pro možné využití kvantitativní analýzy cfDNA jako biomarkeru pro monitorování komplikací těhotenství. (Sekizawa et al., 2002)

Metoda MPS v současné době umožňuje detekovat trizomie 21, 18, 13 a aneuploidie X chromozomů na úrovni cfDNA izolované ze vzorků mateřské plazmy. Vysoká citlivost a specifita této metody pro detekci trisomií a monosomií naznačuje, že tyto sekvenční přístupy mohou být začleněny mezi stávající screeningové metody pro detekci aneuploidií a napomoci tak snížení počtu invazivních výkonů. (Ashoor et al., 2012; Bianchi et al., 2012; Hartwig et al., 2017; Le Conte et al., 2017)

Určení pohlaví plodu z mateřské plazmy je nutné pro prenatalní diagnostiku u těhotných žen, které jsou heterozygotními nosičkami X vázaných genetických chorob. Pokud se zjistí, že plod je ženského pohlaví, je jisté, že nebude postižen, a další analýzy nejsou indikovány. Invazivní výkony (CVS nebo AMC) jsou pak prováděny jen u těhotenství s plody mužského pohlaví. Většina center používá k neinvazivnímu určení pohlaví plodu z cfDNA v mateřské plazmě metodu qPCR a detekci sekvencí specifických pro chromozom Y - *DYS14* nebo gen *SRY*. (Rijnders et al., 2001; Sekizawa et al., 2001; Guibert et al., 2003; Wataganara et al., 2004; Galbiati et al., 2005; Mahallawi et al., 2007; Finning a Chitty, 2008; Quintana a Passucci, 2015) Jedna studie srovnávala metody kvantitativní PCR a kvalitativní PCR. Při použití kvalitativní PCR byla celková citlivost identifikace mužského plodu 95%, ale její senzitivita po 7. týdnu byla 100%, zatímco při použití kvantitativního qPCR bylo této citlivosti dosaženo již po 5. týdnu. (Honda et al., 2002) Jedna ze studií demonstrovala vysokou spolehlivost neinvazivního určení pohlaví tak, že nebyly pozorovány žádné falešně negativní výsledky. Navíc nedošlo k žádným falešně pozitivním výsledkům, přestože u 27 žen nesoucích plod ženského pohlaví během současného těhotenství bylo předchozí těhotenství s plodem mužského pohlaví. (Costa et al., 2001)

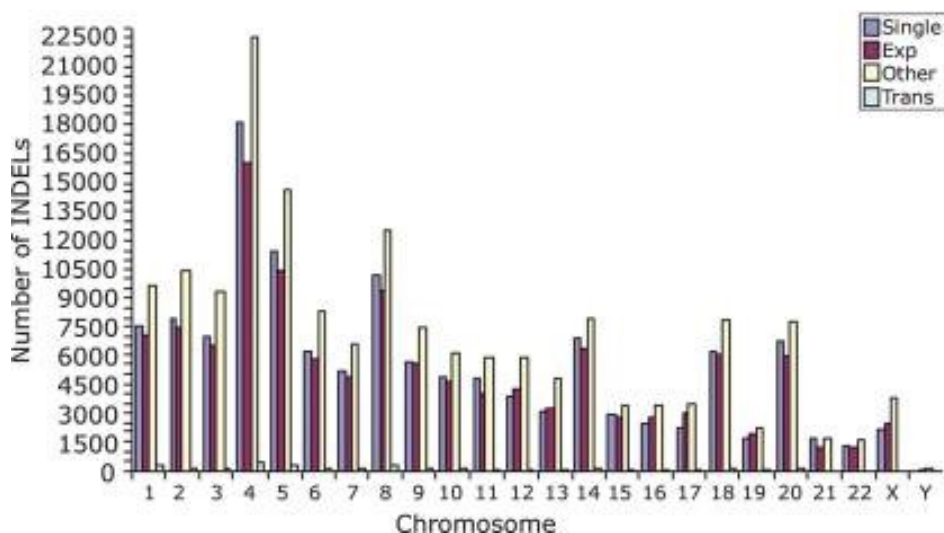
2.5 INDEL polymorfismy

INDEL polymorfismy jsou jedno či několika nukleotidové inserce nebo delece sekvencí DNA. Tyto polymorfismy značně přispívají k variabilitě našeho genomu a jsou využívány jako genetické markery. V současnosti je v lidském genomu známo přes dva miliony těchto sekvencí. (Mills et al., 2011) Tyto INDEL polymorfismy byly identifikovány přístupem, který byl původně vytvořen pro studium polymorfismů typu single nucleotide polymorphisms (SNP). Délka INDEL polymorfismů se pohybuje v rozmezí od 1 bp do 9989 bp. Bylo identifikováno pět hlavních tříd INDEL polymorfismů (Mills et al., 2006a):

1. inserce a delece jednoho páru bází
2. expanze monomerních párů bází
3. expanze více párů bází opakujících se jednotek - 2 až 15 bp
4. transpozonové inserce
5. INDEL polymorfismy obsahující náhodné sekvence DNA

První třída představuje přibližně jednu třetinu všech INDEL polymorfismů. INDEL polymorfismy jsou distribuovány v lidském genomu s průměrnou hustotou jednoho polymorfismu na 7,2 kb v DNA. Více než 148 000 INDEL polymorfismů (35,7%) bylo identifikováno v rámci známých genů, 5542 těchto INDEL polymorfismů bylo umístěno v promotorech a exonech genů a 262 INDEL polymorfismů bylo nalezeno v kódujících oblastech genů. (Mills et al., 2006a) Více než polovina INDEL polymorfismů identifikovaných v rámci genů (61,1%) je násobkem 3 bp, to znamená, že nedochází k posunu čtecího rámce proteinů. Nicméně v případech, kdy není délka INDEL polymorfismu násobkem tří, mohou se v kódující oblasti objevit změny aminokyselin. To je případ zbývajících 38,9% polymorfismů. Hustota INDEL polymorfismů v rámci genů je velmi podobná jako hustota v celém genomu. Nicméně alespoň 84 genů mělo hustoty INDEL polymorfismů, které byly až o dva řády vyšší než tento průměr. (Mills et al., 2006a) Polymorfismy jsou distribuovány na chromozomech podle množství DNA, které je přítomno na každém z chromozomu. Nicméně u některých chromozomů došlo k výjimce a množství polymorfismů je zde vyšší, nebo nižší. Nižší výskyt polymorfismů se týká hlavně pohlavních chromozomů. Na chromozomu X se nachází přibližně o polovinu méně INDEL polymorfismů oproti autozomům a Y chromozom obsahuje dokonce 5% z průměrného počtu polymorfismů na autozomálních chromozomech, viz Obrázek 5. (Mills et al., 2006b; Levy et al., 2007)

Obrázek 8 - Genomická distribuce INDEL polymorfismů, počet polymorfismů je vyobrazen pro každý chromozom (číslo chromozomu je na ose X), Single – jednonukleotidové inserce či delece, Exp – expanze jednoho či více párů bází, Other – ostatní INDEL polymorfismy, Trans – transpozonové inserce (Mills et al., 2006a)



Vlastnosti INDEL polymorfismů shrnul (Pereira et al., 2009a):

1. INDEL polymorfismy jsou rozloženy v celém lidském genomu se stejnou hustotou
2. INDEL polymorfismus je výsledkem jediné mutace
3. Mnoho INDEL polymorfismů vykazuje významné rozdíly ve frekvencích alel mezi geograficky oddělenými skupinami obyvatel
4. Malé INDEL polymorfismy mohou být analyzovány v krátkých amplikonech, je to skvělá vlastnost pro multiplexování a zlepšuje úspěšnou analýzu degradované DNA
5. Genotypizace INDEL polymorfismů je poměrně snadná a levná s jednoduchým elektroforetickým přístupem, vhodná pro automatizaci

Možnosti využití INDEL polymorfismů byly také testovány v oblasti forenzní genetiky a při určování příbuzenských vztahů. Stejně jako při analýze STR (short tandem repeat) a SNP polymorfismů lze pro vyšetření krátkých INDEL polymorfismů s výhodou využívat krátké amplikony, což je významné zejména s ohledem na možnost analýzy degradovaných vzorků DNA. Pro již plně etablované STR testování byl vytvořen jednoduchý pracovní postup pomocí PCR a kapilární elektroforézy, který je při testování INDEL polymorfismů rovněž využitelný. (Edelmann et al., 2009; Pereira et al., 2009b, 2012; Da Costa Francez et al., 2012; Zidkova et al., 2013; Oka et al., 2014)

Několik studií využilo při vyšetřování příbuzenství a identifikaci jednotlivce INDEL polymorfismy nacházející se na X chromozomu, důvodem byl mechanismus

dědičnosti tohoto chromozomu. (Freitas et al., 2010; Fan et al., 2015; Caputo et al., 2016)

Díky INDEL polymorfismům může dojít k rychlé a efektivní genotypizaci, která může vést k rozlišení hlavních etnických populací a určení jejich původu. Také se prokázala spolehlivost této metody při hodnocení smíšených populací. (Santos et al., 2010; Pereira et al., 2011; Francez et al., 2012; Ibarra et al., 2014) Díky použití INDEL polymorfismů došlo k potvrzení, že lidské populace jsou strukturovány do pěti geografických oblastí: Amerika, subsaharská Afrika, východní Asie, Oceánie, a oblast složená z Evropy, Středního východu a východní a střední Asie. (Bastos-Rodrigues et al., 2006)

Stručně shrnuto analýza INDEL polymorfismů je vhodná zejména pro hodnocení populační infrastruktury, individuální identifikaci a testování příbuznosti.

V nejnovější studii (Yee Ho et al., 2015) byly INDEL polymorfismy využity pro identifikaci ženského pohlaví plodu pomocí analýzy cfDNA z krve těhotné ženy. Cílem bylo určení ženského pohlaví plodu z mateřské plazmy na základě pozitivního amplifikačního signálu. Důvodem pro zkoumání je fakt, že v současné době probíhá určení pohlaví plodu z mateřské plazmy pouze pomocí pozitivního signálu pro mužské pohlaví. Právě výše uvedená studie se stala inspirací pro moji diplomovou práci.

3. Cíl práce

Cílem mojí práce bylo vyvinout a zhodnotit metodický přístup, který by dovilil spolehlivé určení ženského pohlaví plodu z mateřské plazmy na základě pozitivního signálu získaného amplifikací sekvencí cffDNA z paternálního X chromozomu plodu. V současnosti je určení pohlaví plodu v neinvazivní prenatalní diagnostice založeno na průkazu přítomnosti Y chromozomálních genů *SRY*, *DYS14*, eventuálně dalších. Pokud se neprokáže přítomnost zmíněných sekvencí genů, je plod určen jako ženský. Jedná se o určení založené na nepřítomnosti signálu. (Lo et al., 1998b; Zhong et al., 2000; Xiao Yan Zhong et al., 2001; Rijnders et al., 2001, 2003; Benachi et al., 2003; Hromadnikova et al., 2003; Boon et al., 2007; Minon et al., 2008; Devaney et al., 2011; Hill et al., 2011; Wright et al., 2012) V mé práci jsme se snažili najít vhodnou metodu, díky které přímo určíme ženské pohlaví plodu z plazmy těhotné díky X chromozomálním alelám plodu zděděných od otce. Z těchto požadavků vyplývají naše cíle a hypotézy:

Cíle:

- Určení přítomnosti paternálního X chromozomu ve frakci fetální cirkulující DNA pro potvrzení ženského pohlaví plodu
- Odhad velikosti fetální frakce cirkulující DNA u těhotenství s plodem ženského pohlaví

Předpoklady:

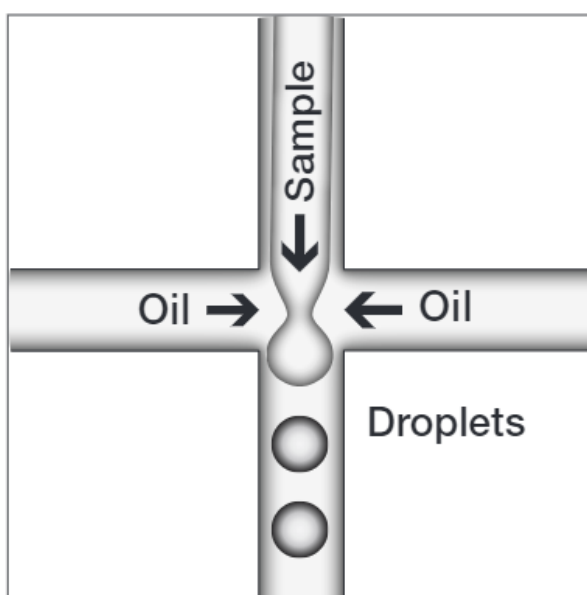
- Vybraná skupina polymorfismů typu INDEL bude využitelná pro určení ženského pohlaví plodu u většiny těhotenství
- Metoda Digital Droplet PCR bude schopná zachytit minoritní fetální frakci cell-free DNA na pozadí celkové volné DNA v plazmě

4. Materiál a metody

4.1 Digital droplet PCR

DdPCR byla vyvinuta jako nástroj absolutní kvantifikace sekvencí nukleových kyselin. Má široké spektrum jak výzkumných, tak diagnostických aplikací. Absolutní kvantifikace metodou ddPCR vychází z rozdělení roztoku obsahujícího kvantifikované sekvence do velkého počtu kapiček, z nichž každá slouží v emulzi jako samostatná reakční nádoba, v níž probíhá PCR reakce využívající TaqMan technologie. Po proběhnutí reakce je možné pomocí fluorescenčního signálu zjistit počet kapiček, ve kterých se nacházela cílová sekvence.

Pro naše experimenty jsme používali vybavení od firmy BioRad a TaqMan sondy značené FAM, HEX a reportérovými fluorofory. Vzorky byly umístěny do generátoru kapiček QX100, který používá speciálně vyvinutá čidla a mikrofluidiku pro rozdělení každého vzorku na kapičky o velikosti 1 nl. Každý vzorek je pro účely ddPCR rozdělen na 20 000 kapiček o tomto objemu - viz Obrázek 9.

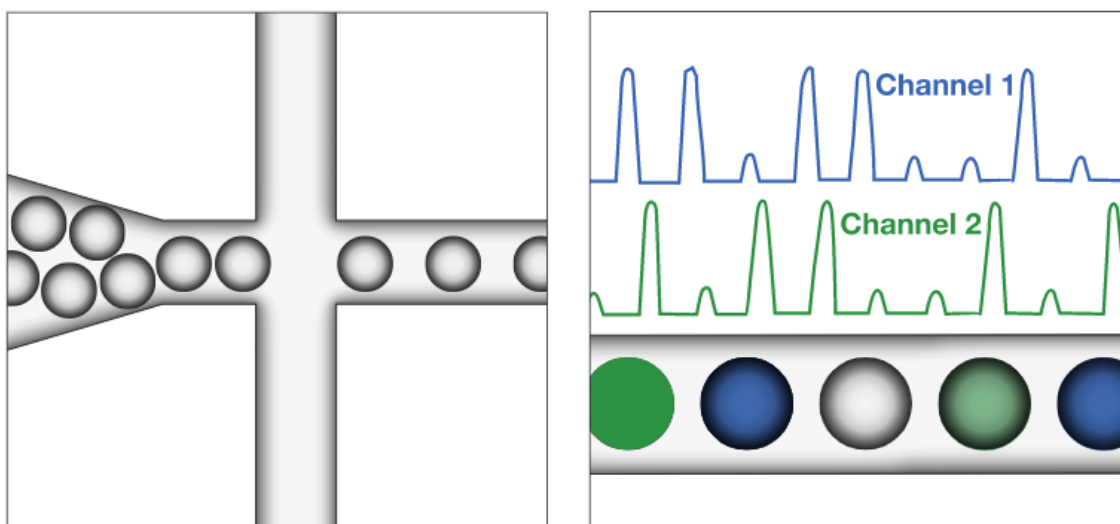


Obrázek 9 - Kapičky vytvářené QX100 Droplet generátorem mají stejnou velikost a objem (www.bio-rad.com)

Vzorky připravené pro emulzní PCR jsou přeneseny na destičky pro PCR a umístěny do cycleru T100 Thermal Cycler (BioRad). Po PCR amplifikaci se vzorek s nukleovými kyselinami v dropletech vloží do přístroje QX100 Droplet Reader (BioRad), který analyzuje kapky jednotlivě pomocí dvoubarevného detekčního systému nastaveného pro detekci FAM a HEX. Měří se fluorescenční signál vydávaný každou

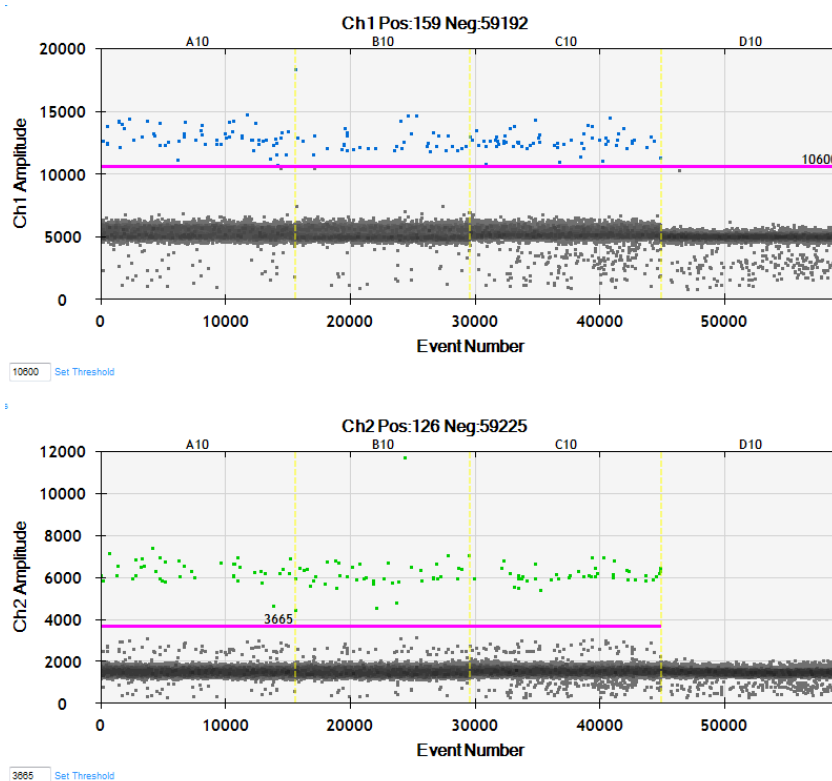
jednotlivou kapičkou (viz Obrázek 10). Pozitivní kapičky obsahující alespoň jednu kopii cílové molekuly DNA vykazují zvýšenou fluorescenci ve srovnání s negativními

Obrázek 10 - Separace jednotlivých kapiček v čtečce QX100 Droplet Reader a měření fluorescence pro každou kapičku ve dvou kanálech (www.bio-rad.cz)



kapičkami. Hodnoty fluorescence jsou měřeny pro každou kapičku ve dvou kanálech. Výsledky jsou zobrazené jako 1D graf - každá kapička vzorku je zde vynesena na základě intenzity svojí fluorescence. Na obrázku 11 jsou všechny kapičky, které jsou

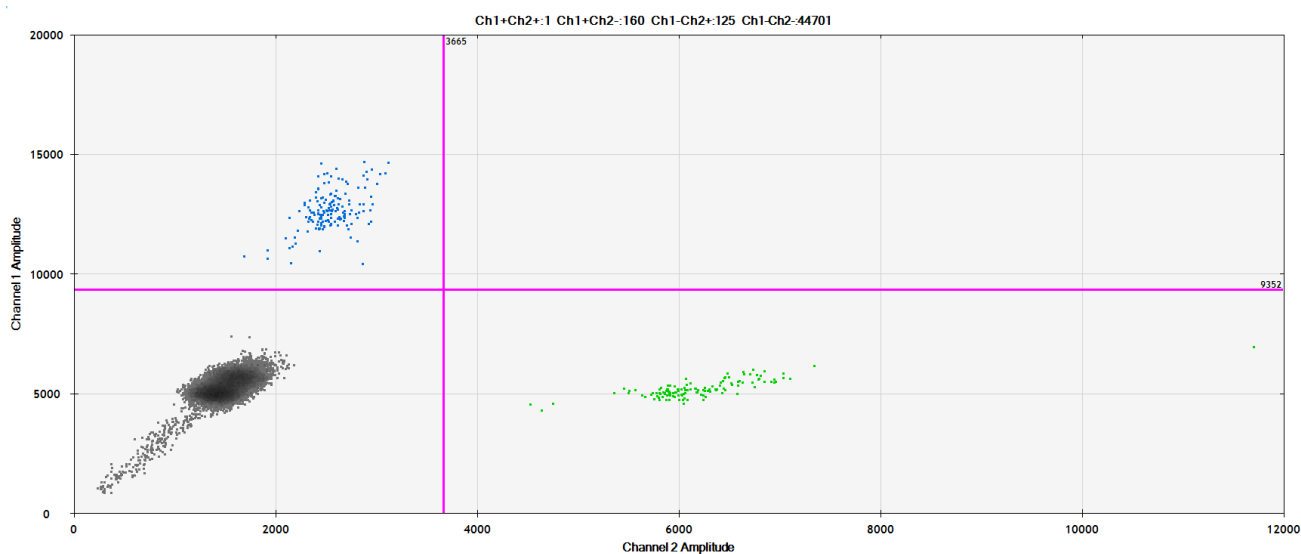
Obrázek 11 - 1D graf - každá kapička vzorku je vynesena na základě intenzity fluorescence proti počtu kapiček.



nad červenou prahovou hodnotou, označeny jako pozitivní. Všechny kapičky pod prahovou hodnotou jsou hodnoceny jako negativní. Jednotlivé vzorky jsou analyzovány v triplicátech s nezbytným zařazením negativní kontroly. Graf je pak rozdělen na sloupce žlutými čarami, ty oddělují jednotlivé reakce. Počet sloupců odpovídá počtu vyšetřovaných vzorků, poslední sloupec odpovídá negativní kontrole neobsahující žádné pozitivní droplety, pokud nedošlo ke kontaminaci. Digitální PCR data z duplexního experimentu, který pracuje se dvěma PCR templáty, jsou vidět na grafu 2D (viz Obrázek 12), ve kterém je fluorescence kanálu 1 (FAM) znázorněna proti fluorescenci kanálu 2 (HEX) pro každou kapku. Vzhledem k tomu, že distribuce DNA do kapiček je náhodná, seskupují se kapky do čtyř skupin:

- FAM negativní, HEX negativní
- FAM pozitivní, HEX negativní
- FAM negativní, HEX pozitivní
- FAM pozitivní, HEX pozitivní

Obrázek 12- Fluorescence kanálu 1 (FAM) znázorněna proti fluorescenci kanálu 2 (HEX) pro každou kapku



Náhodné rozdělení analyzovaného vzorku do kapek znamená, že daná cílová sekvence má stejnou pravděpodobnost, že skončí v jakékoli z výsledných 20 000 kapiček. Náhodné rozdělení také znamená, že cílové molekuly se pohybují nezávisle na sobě a vzájemně nereagují. Některé kapičky se ztrácejí v přenosových krocích a jiné jsou vyloučeny přísnými kritérii hodnotícího software QuantaSoft Software version

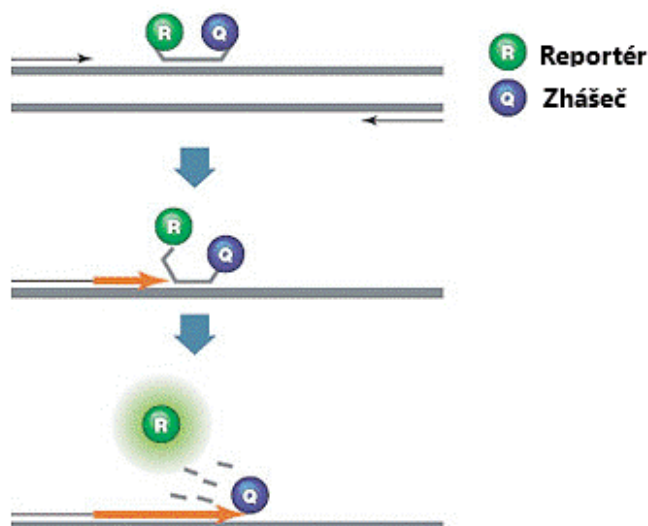
1.6.6.0320 (BioRad). Software pro určení koncentrace cílové molekuly DNA ve vzorku aplikuje rovnici Poissonova rozdělení a koncentraci vyjadřuje v jednotkách kopií na μl .

Digitální PCR nabízí výhody absolutní kvantifikace a vysokou citlivost. DdPCR vede k určení absolutní koncentrace cílové DNA ve vzorku bez potřeby standardních křivek ve srovnání s metodou qPCR. V kombinaci s aplikací TaqMan sond (viz kapitola 4.1.1) poskytuje vysokou specifitu, vysoký poměr signálu k šumu a možnost provádět multiplexní reakce.

4.1.1 TaqMan analýza

TaqMan technologie využívá 5' exonukleázovou aktivitu termostabilních polymeráz. Hydrolytická sonda je označena fluorescenčním reportérem na 5' konci a zhášecem na 3' konci. Když je sonda neporušená, je kvůli blízkosti zhášecce potlačena fluorescence reportéru. Pokud sonda hybridizuje s cílovou sekvencí, tak specifická 5' - 3' exonukleázová aktivita odštěpuje reportérovou sekvenci. Výsledkem je, že reportér je oddělen od zhášecce, což vede k emisi fluorescenčního signálu, který je úměrný množství amplifikovaného produktu ve vzorku. (viz Obrázek 13) (www.bio-rad.cz)

Obrázek 13 – Princip fungování Taq-Man sond a štěpení sondy TaqMan polymerázou (www.bio-rad.cz)



4.1.2 Postup ddPCR

Pro generování kapiček bylo pro každý analyzovaný vzorek vytvořeno 20 μ l reakční směsi o složení:

5 μ l vzorku DNA

1 μ l primerů a sondy značené FAM (BioRad)

1 μ l primerů a sondy značené HEX (BioRad)

10 μ l PCR BioRad ddPCR supermix (ddPCR™ Supermix for Probes #1863010)

3 μ l vody pro injekce (Kabi)

PCR master mix (ddPCR supermix od BioRadu) má všechny složky pro PCR reakci, které nejsou specifické pro vzorek. Hlavní mix obvykle obsahuje termostabilní DNA polymerázu, dNTPs, $MgCl_2$ a proprietární přísady v pufru optimalizovaném pro PCR. Primery byly naředěny tak, aby jejich konečná koncentrace ve vzorku byla 450 mM/reakci, koncentrace sond ve vzorku byla 250 mM/reakci. Připravené směsi byly pipetovány do kazet pro generaci dropletů. Každá kazeta slouží pro osm vzorků. Jakékoli nevyužité jamky na kazetě musí být naplněny kontrolou ddPCR. Po naplnění 20 μ l PCR reakce bylo nalito 70 μ l oleje pro tvorbu kapiček do spodní řady jamek kazety. Připojilo se těsnění přes horní část kazety a kazeta se vložila do generátoru kapiček QX100 pro osm vzorků. Po vytvoření kapiček v kazetě bylo napipetováno 40 μ l kapek z horních jamek kazety do destičky PCR. Roztok byl přenesen do 96-jamkové PCR destičky jemným pipetováním. Destičku PCR byla tepelně utěsněná pomocí přístroje PX1 PCR Plate Sealer firmy BioRad. Vzorky pro digitální PCR po tepelném utěsnění byly umístěny do termocycleru T100 Thermal Cycler (BioRad), kde proběhla PCR reakce dle daného protokolu:

1. 95°C, 10:00 min, ramp 3°C/s

2. 94°C, 0:30 min, ramp 3°C/s

3. 50°C, 1:00 min, ramp 3°C/s

Krok 2. a 3. – opakování 39x

4. 98°C, 10:00 min, ramp 3°C/s

5. 12°C, ∞

Pro vyhodnocení kapek po PCR amplifikaci byla umístěna PCR deska do přístroje QX100 Droplet Reader. Droplet Reader ve spojení se softwarem QuantaSoft version 1.6.6.0320 detekuje PCR-pozitivní a PCR-negativní kapičky, aby poskytly absolutní kvantifikaci cílové DNA. Software QuantaSoft měří počet pozitivních a negativních

kapiček pro každý fluorofor v každém vzorku. Čtečka měří intenzitu fluorescence každé kapky a detekuje její velikost a tvar tak, jak kapičky procházejí detektorem; kapky jsou z analýzy vyloučeny, pokud nesplňují zadané parametry kvality.

4.2 Vybrané INDEL polymorfismy

Výběr INDEL polymorfismů probíhal na základě studií provedených v Portugalsku, Číně a Německu. (Pereira et al., 2012; Zhang et al., 2015; Edelmann et al., 2016) Studie provedená R. Pereirou byla nejrozsáhlejší, vzorky byly odebrány z populací z Afriky, Evropy a západní Asie. Žádná z uvedených prací neobsahuje data použitelná pro populaci České republiky. Primery a sondy pro 5 INDEL polymorfismů vybraných pro analýzu byly navrženy ve spolupráci se specialistou firmy BioRad a syntetizovány touto firmou - viz Tabulka 3.

Tabulka 3 - Sekvence primerů vybraných INDEL a sekvence jejich alel

INDEL č. 1	rs2307932	Značení
forward primer	ACTTCCAACCTAAGTTAATCTCT	
reverse primer	TTCCAAAATTTCTCAAAGGC	
Sonda pro inserční alelu	AGTCTCAGAATCTTataaTAATATCTTTT	FAM
Sonda pro deleční alelu	AGTCTCAGAATCTTaTAATATCTTTTTT	HEX

INDEL č. 2	rs16397	
forward primer	TGCCAAAGCATATAAAATGG	
reverse primer	TGATGGTGTCTTGTATTTCT	
Sonda pro inserční alelu	AAGGGTATGAAgtggTGAC	HEX
Sonda pro deleční alelu	ACAAGGGTATGAAgTGACTAT	FAM

INDEL č. 3	rs16637	
forward primer	TGATATGAAGTCTGGTATTGG	
reverse primer	TTATTTCTCACTTCTCCAC	
Sonda pro inserční alelu	ACTcaaccaatgGGGC	HEX
Sonda pro deleční alelu	AAATACTgGGGCTGTTAAC	FAM

INDEL č. 4	rs3048996	
forward primer	GACCCACGGTGTGAAT	
reverse primer	AGATAGACAGGAGATGAGTG	
Sonda pro inserční alelu	ATTTGCTTatcaTCCATCCAG	FAM
Sonda pro deleční alelu	TTGCTTaTCCATCCAGCC	HEX

INDEL č. 5	rs16680	
forward primer	AGAGAAGGCATCTTCTATATG	
reverse primer	ATCTGTGGGAACCCTATTAT	
Sonda pro inserční alelu	TTAACCAAGtacaACAACCTGT	HEX
Sonda pro deleční alelu	CACTTAACCAAGtACAACCTGT	FAM

4.3 Optimalizace metody ddPCR pro vybrané INDEL polymorfismy

Mým prvním úkolem, bylo nejdříve najít co nejlepší reakční podmínky a postup pro analýzu vybraných INDEL polymorfismů (viz Tab. 3). Byl použit protokol pro ddPCR firmy BioRad pro generaci kapiček, PCR amplifikaci a analýzu výsledků. Pro zjištění podmínek jsme nejdříve provedli reakci se standardní DNA (Standard DNA: TaqMan Control Genomic DNA, Human - male, Thermofisher Scientific). Abychom optimalizovali teplotu annealingu pro všechny primery INDEL polymorfismů, provedli jsme reakci s teplotním gradientem 60 - 48°C. DNA obsahovala jen některé alely INDEL polymorfismů. Pro zjištění všech optimálních teplot pro nasednutí primerů u všech INDEL polymorfismů byly použity bukální stěry žen odebírané na Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK na základě informovaných souhlasů pro účely prenatální diagnostiky RhD inkompatibility mezi matkou a plodem, při níž je ověření genotypu matky a získání informace o existenci fetální frakci v případě plodu ženského pohlaví rovněž zásadní.

Standardní DNA byla přidána do vzorku po 5 μ l (10 ng/ μ l). Vzorky DNA z bukálních stěrů byly 10x ředěny a přidávány do reakcí ve stejném objemu jako standardní DNA. Reakce byly připravovány způsobem uvedeným v kapitole 4.1.2.

Pro zjištění všech vhodných teplot nasedání primerů byla použita jedna standardní DNA a dva vzorky bukálních stěrů pacientek. Vzorky byly podrobeny metodě ddPCR a byla vyhodnocena souhrnně jedna teplota, při které metoda fungovala nejlépe.

4.4 Vyšetření X chromozomálních polymorfismů typu INDEL v bukálních stěrech pro získání údajů o populaci

4.4.1 Vyšetřované vzorky

Bylo vybráno 50 vzorků DNA izolované z bukálních stěrů odebraných v rámci rutinní prenatalní diagnostiky na základě informovaných souhlasů pacientek, jak je uvedeno v kapitole 4.3. Izolace DNA z bukálních stěrů byla prováděna kitem QIAamp Mini Kit (Qiagen) v souladu s pokyny výrobce. Vzorky izolované DNA byly uchovávány ve 20°C.

4.4.2 Metoda

Každý vzorek byl vyšetřen metodou ddPCR tak, jak je popsáno v kapitole 4.1.2. DNA z bukálního stěru byla 10x naředěná a použita pro reakci. Pro jednu reakci bylo použito 5 μ l takto zředěné DNA.

Pro otestování, zda námi získaná data odpovídají populaci nacházející se v Hardy–Weinbergově rovnováze byl použit chí-kvadrát test a vypočtena příslušná p-hodnota. (<http://www.socscistatistics.com/pvalues/chidistribution.aspx>)

4.5 Testování citlivosti ddPCR pro směsi 20%, 10%, 5% a 2,5% jednoho homozygota na pozadí opačné varianty

4.5.1 Vyšetřované vzorky

Ze vzorků vyšetřovaných pro získání populačních dat, byly vybrány pro každý studovaný INDEL polymorfismus homozygotky jak pro deleční, tak pro inzerční alelu.

4.5.2 Metoda

Dále popsaným přístupem byla simulována koncentrace fetální volné DNA v plazmě matky pro ověření, zda zvolená metoda dokáže zachytit i velmi nízkou koncentraci cffDNA na vysokém pozadí mateřské cfDNA. DNA izolovaná z bukálního stěru jedné homozygotky byla 100x ředěná a použita pro reakci. DNA z bukálního stěru homozygotky s opačnou alelickou variantou byla také 100x zředěna. Z obou vzorků pak byly tvořeny směsné vzorky tak, aby obsahovaly 20%, 10%, 5% a 2,5% DNA jedné homozygotky na pozadí opačné varianty. Množství cffDNA se během těhotenství mění (Lo et al., 1998b), proto zde bylo zvoleno toto rozpětí od 20% do 2,5%. Je udáváno, že obvykle v krvi matky tvoří cffDNA 3-10% z celkové volné DNA v plazmě. (Bianchi et al., 1990; Lo et al., 1998b).

Ředění bylo vypočteno tak, aby se koncentrace DNA jedné homozygotky na pozadí opačné varianty podobala množství volné fetální DNA v mateřské plazmě. Podle provedeného předchozího experimentu - vyšetření X chromozomálních polymorfismů typu INDEL v bukálních stěrech, byla vypočtena koncentrace DNA v ng/μl v každém vzorku použitým pro předchozí analýzu.

$$\text{Kvadruplikát} = 4 \times 20 \mu\text{l} - \text{v každé reakci } 5 \mu\text{l DNA}$$

Počet kopií v 20 μl reakci/2 = počet genomických ekvivalentů (GE) zachycených v 20 μl reakce, tj. v 5 μl vzorku DNA z bukálního stěru

$$1 \text{ GE} = 6.6 \text{ ng}$$

$$\text{Počet GE v } 5 \mu\text{l vzorku} * 6,6 = \text{pg DNA v } 5 \mu\text{l vzorku}$$

$$(\text{počet kopií}/20 \mu\text{l reakce})/2 * 6,6 = \text{pg DNA/reakce}$$

Pro reakci, v níž bylo nalezeno 100 kopií/20 μl:

$$(100/2) * 6,6 = 330 \text{ pg} = 0,33 \text{ ng}/5 \mu\text{l vzorku DNA z bukálního stěru}$$

Procentuální zastoupení vzorku B v reakci dle výsledku ddPCR:

$$\text{Počet kopií v } 20 \mu\text{l reakci vzorku A} + \text{počet kopií v } 20 \mu\text{l vzorku B} = \text{celkový počet kopií ve směsi}$$

Počet kopií v 20 μ l vzorku B *100/celkový počet kopií ve směsi = procentuální zastoupení vzorku B v reakci

Pro reakci, v níž bylo nalezeno 100 kopií/20 μ l vzorku A, 5 kopie/20 μ l ve vzorku B:

$$(5 * 100)/105 = 4,76\%$$

Reakce po naředění směsí DNA tak, aby bylo možné do každé vnášet 5 μ l vzorku, byly prováděny a hodnoceny, jak je uvedeno v kapitole 4.1.2 Všechny reakce byly provedeny v kvadruplikátech a doplněny negativní kontrolou bez templátové DNA.

4.6 Otestování plazmatické cfDNA těhotných žen

4.6.1 Vyšetřované vzorky

Bylo vybráno 13 těhotných pacientek, u kterých nebyla potvrzena přítomnost plodu mužského pohlaví na základě detekce sekvencí genu *SRY* v mateřské plazmě. Tento postup je v laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK rutinně prováděn u RhD negativních pacientek, u nichž je pro vyšetření RhD inkompatibility plodu nutné potvrzení amplifikovatelnosti fetální frakce cfDNA. U plodů ženského pohlaví ověření přítomnosti fetální frakce zatím možné nebylo. U všech těhotných je rovněž rutinně odebírán vzorek bukálního stěru pro ověření genotypu *RHD* genu u samotné těhotné. Vzorky DNA rutinně izolované z těchto stěrů (viz kapitola 4.4.1) byly použity pro zjištění, ve kterém z INDEL polymorfismů je těhotná homozygotní a který tudíž skýtá potenciál pro detekci paternálního chromozomu X s opačnou variantou daného polymorfismu ve fetální frakci cfDNA. Vyšetření plazmy těhotné bylo prováděno jen v případě, že analýzou bukálního stěru bylo zjištěno, že těhotná je pro daný INDEL polymorfismus homozygotní.

4.6.2 Metoda

Z odebrané plazmy od pacientek byla v rámci rutinního provozu laboratoře izolována cfDNA za využití systému MagNA Pure Compact System.

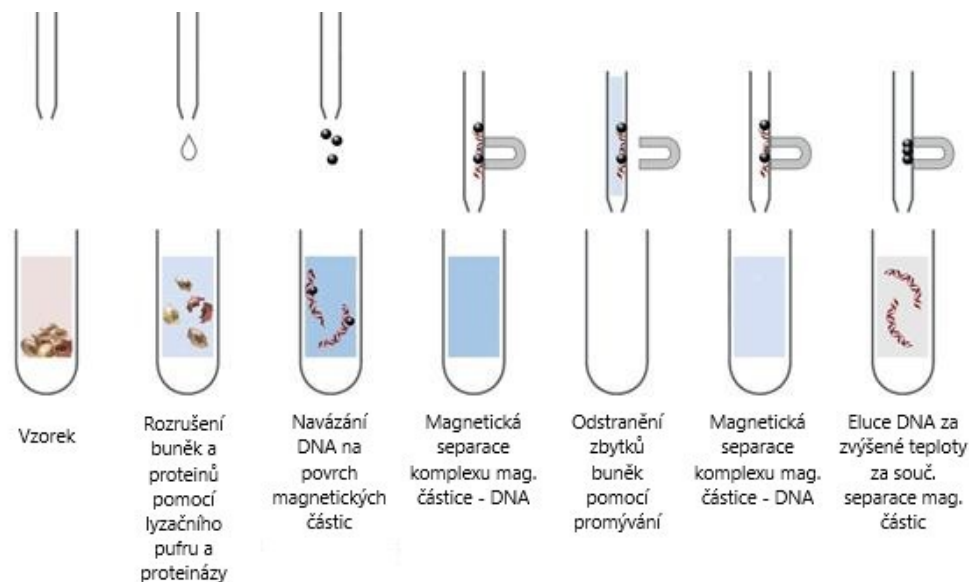


Obrázek 14 - Přístroj pro izolaci nukleových kyselin MagNA Pure Compact System, https://lifescience.roche.com/en_cz.html

Je to automatizovaná, rychlá a spolehlivá metoda pro izolaci nukleových kyselin. Princip této metody je založen na technologii izolace DNA pomocí magnetických

kuliček (viz Obrázek 15). Možnost kontaminace vzorku při izolaci touto metodou je výrazně snížena. (Kessler et al., 2001)

Obrázek 15 - Princip magnetické MagNA Pure Compact, https://lifescience.roche.com/en_cz.html



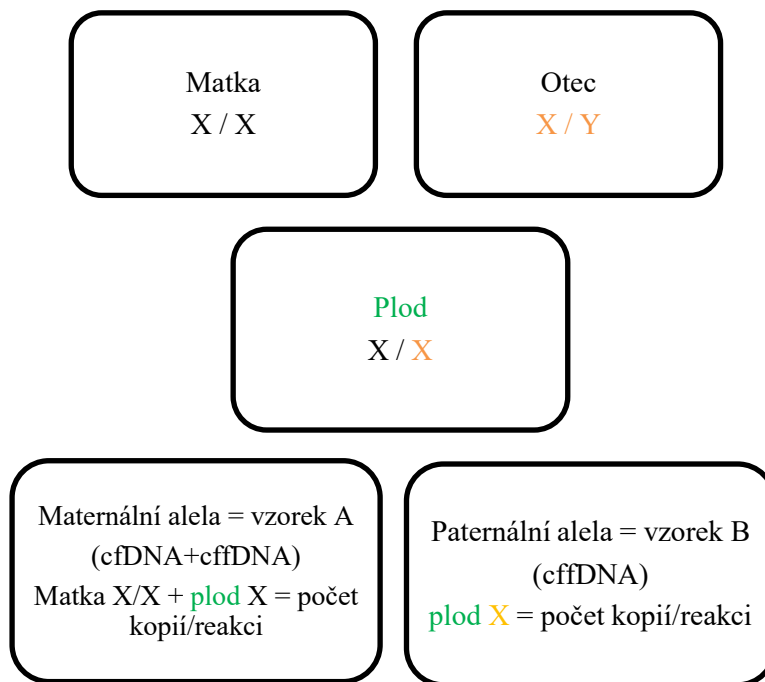
Vlastní izolace z 1 ml plazmy je možná až pro osm vzorků najednou. Izolace je kontrolována integrovaným počítačem, navigace se provádí pomocí dotykového monitoru. Do zkumavek určených pro izolaci DNA z plazmy bylo napipetováno po 1 ml vzorku, byly načteny čtečkou čárových kódů. Dále byly načteny a vloženy příslušné kazety s činidly, takový počet, kolik bylo vzorků plazmy. Software nabídne správný protokol podle načtených kazet. Dále byl zvolen vstupní objem 1000 μ l, eluční objem 50 μ l a použitý materiál, což byla plazma. Po vložení špiček, elučních zkumavek a vzorků byl izolační proces spuštěn.

U čtyř pacientek bylo potřeba provést izolační postup dvakrát, bylo potřeba tedy 2 ml plazmy. Tyto čtyři pacientky byly ve čtyřech INDEL polymorfismech homozygotkami, proto bylo potřeba většího množství DNA izolované z jejich plazmy tak, aby bylo možné vnášet 5 μ l do každé reakce a reakce mohly být realizovány v triplikátech. Všechny vzorky DNA byly vyšetřovány v triplikátech postupem uvedeným v kap. 4.1.2.

Pro výpočet koncentrace DNA (ng/ml) a velikosti fetální frakce cfDNA (tzv. cffDNA) jsme museli provést jednoduchou úvahu, znázorněnou na Obrázku 16. Pokud je matka homozygotka a došlo k identifikaci zděděné otcovské alely INDEL polymorfismu v její plazmě, plod má heterozygotní genotyp. Pozitivní droplety, které patří plodu, jsou tedy jen ty droplety, kde je zachycen signál z paternálních alel. A

pozitivní droplety, které patří matce, nejsou pouze její alely, ale obsahují i signály z maternálních alel plodu. Pro správný výpočet procentuálního zastoupení cffDNA v mateřské plazmě je proto nutné odečíst od pozitivních kopií matky, pozitivní kopie plodu.

Obrázek 16 – Znázornění úvahy pro výpočet fetální frakce



Pro určení koncentrace DNA ng/ml u matky a dítěte byl použit tento výpočet:

Odběrem krve bylo získáno 1000 μ l plazmy, izolací bylo získáno 50 μ l DNA, a z těchto 50 μ l DNA bylo použito do každé reakce 5 μ l, tzv. v triplikátech bylo celkem 15 μ l \rightarrow ředění 3,33 (vztaženo k původnímu množství v 1ml plazmy)

Matka:

$$(\text{Počet kopií}/15 \mu\text{l v triplikátu vzorku A}) - (\text{počet kopií}/15 \mu\text{l v triplikátu vzorku B}) = \text{počet kopií}/15 \mu\text{l v triplikátu cfDNA matky}$$

$$(\text{Počet kopií}/15 \mu\text{l v triplikátu matky})/2 = \text{počet genomických ekvivalentů (GE) zachycených v 15 \mu\text{l reakce}}$$

$$1 \text{ GE} = 6.6 \text{ pg}$$

$$(\text{Počet kopií}/15 \mu\text{l v triplikátu matky})/2 * 3,33 * \text{GE (pg)} = \text{koncentrace cfDNA pg/ml}$$

Plod:

Počet kopií/15 μ l v triplikátu vzorku B = GE/15 μ l v triplikátu cffDNA plodu, detekce založena na přítomnosti 1 kopie paternální alely v 1 genomickém ekvivalentu

$$(\text{GE}/15 \mu\text{l v triplikátu plodu}) * 3,3 * 6,6 = \text{koncentrace DNA pg/ml}$$

Příklad pro nalezených 210 počtu kopií/15 µl v triplikátu vzorku A a 2 kopií/15 µl vzorku B:

$$\begin{aligned}210 - 2 &= 208 \dots \text{počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu cfDNA matky} \\(208/2) * 3,33 * 6,6 &= 2285 \text{ pg/ml maternální cfDNA} \\2285/1000 &= 2,29 \text{ ng/ml maternální cfDNA}\end{aligned}$$

Příklad pro nalezené 2 kopie/15 µl v triplikátu vzorku B:

$$\begin{aligned}2 &= \text{GE/15 } \mu\text{l v triplikátu cffDNA plodu} - \text{maternální} + \text{paternální počet kopií} \\2 * 3,33 * 6,6 &= 43,96 \text{ pg/ml cffDNA} \\43,96/1000 &= 0,04 \text{ ng/ml cffDNA}\end{aligned}$$

Výpočet pro určení procentuálního zastoupení cffDNA v cfDNA:

$$\begin{aligned}(\text{Počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu vzorku A}) + (\text{počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu vzorku B}) &= \\ \text{počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu celkové cfDNA (cfDNA matky + cffDNA plodu)} & \\ (\text{Počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu vzorku A}) - (\text{počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu vzorku B}) &= \\ \text{celkový počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu cfDNA matky} & \\ (\text{počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu vzorku B}) * 2 &= \text{celkový počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu} \\ \text{cffDNA plodu (maternální + paternální alely)} & \\ (\text{celkový počet kopií/15 } \mu\text{l v triplikátu cffDNA plodu}) * 100 / (\text{počet kopií/15 } \mu\text{l} & \\ \text{v triplikátu celkové cfDNA}) & \end{aligned}$$

Příklad pro nalezených 210 počtu kopií/15 µl v triplikátu vzorku A a 2 kopie/15 µl v triplikátu vzorku B:

$$\begin{aligned}210 + 2 &= 212 \dots \text{celková cfDNA} \\210 - 2 &= 208 \dots \text{cfDNA matky} \\2 * 2 &= 4 \dots \text{cffDNA plodu} \\(4 * 100)/212 &= 1,89\% \text{ fetální frakce cfDNA}\end{aligned}$$

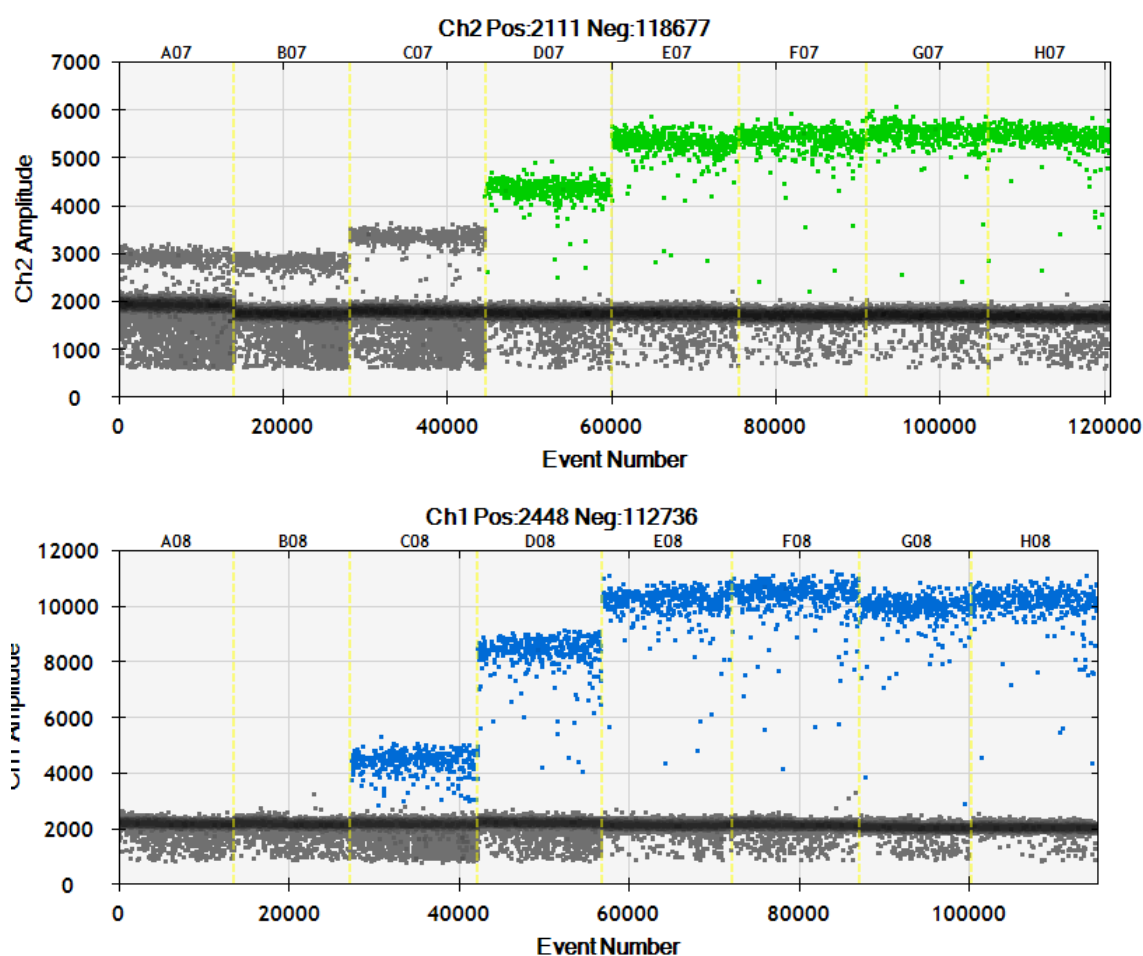
Pro výpočet byla použita úvaha zobrazená na Obrázku 16.

5. Výsledky

5.1 Optimalizace metody ddPCR pro vybrané INDEL

Výsledkem optimalizace bylo zvolení co nejlepších podmínek pro vybrané INDEL polymorfismy. Po provedení reakce s teplotním gradientem 60 - 48°C jsme zjistili nejlepší teplotu společnou pro annealing primerů u všech INDEL polymorfismů. Tato výsledná teplota byla 50°C a byla dále použita ve všech protokolech pro metodu ddPCR.

Obrázek 17 - Teplotní gradient 60 - 48 °C

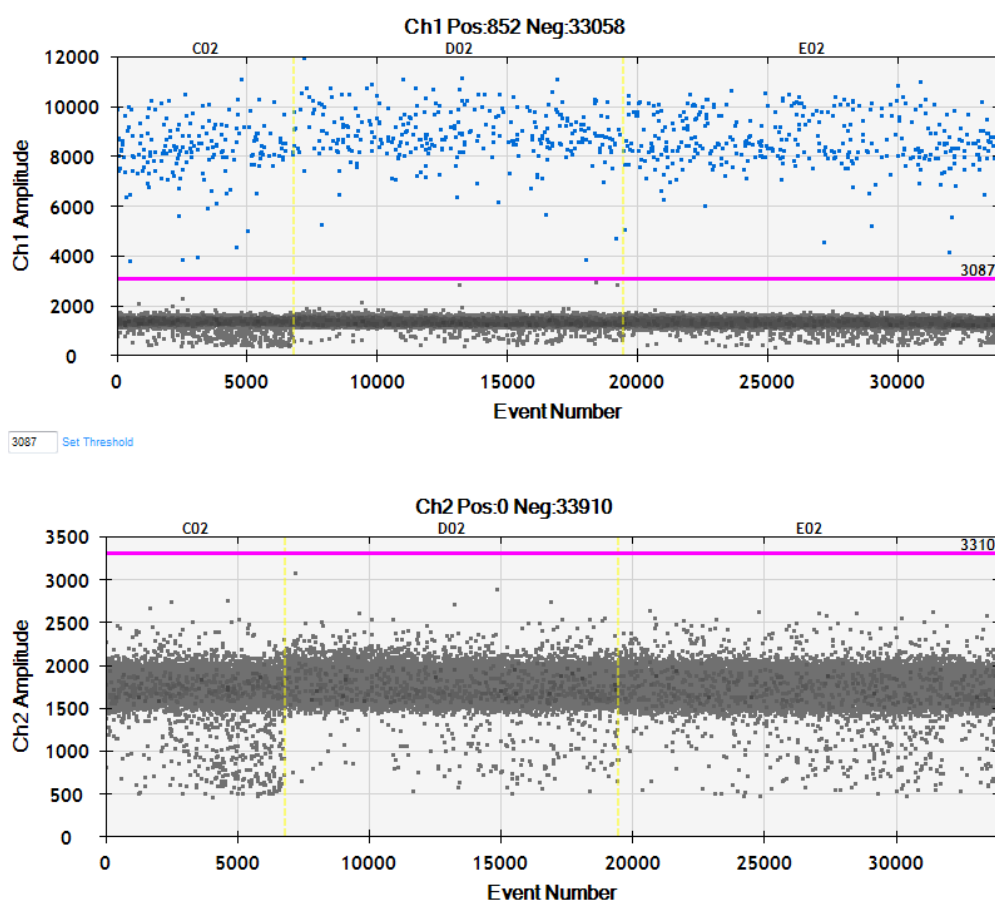


Na grafech teplotního gradientu je zřetelné postupné oddělování pozitivních dropletů od negativních – viz Obr. 17. Teplota pro annealing primerů byla vybrána tak, aby rozlišitelnost dropletů pozitivních a negativních byla vidět co nejlépe. Vybrané grafy jsou příkladem INDEL polymorfismů číslo 4. a 5. Svislé žluté čáry oddělují jednotlivé reakce. Nejlépe oddělené droplety jsou u sloupců F a G, kde se hodnota pohybuje mezi 50,3°C a 48,8°C. Pro všechny INDEL polymorfismy byla vybrána společná průměrná teplota pro annealing primerů 50°C.

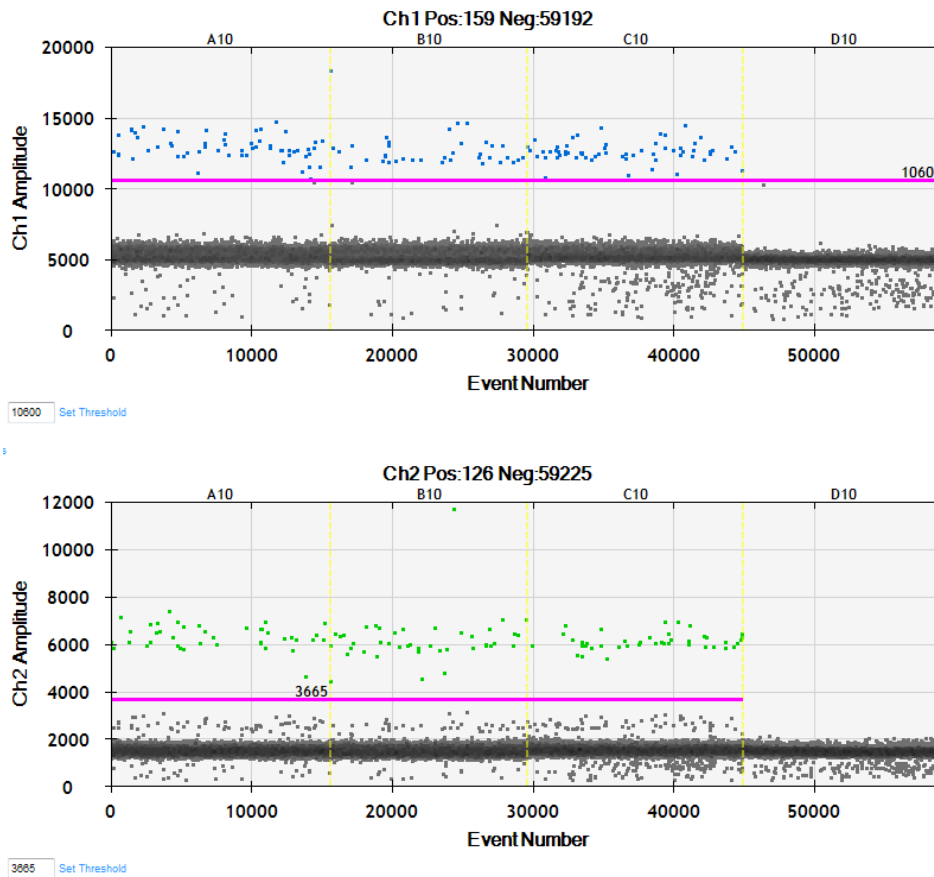
5.2 Vyšetření X chromozomálních polymorfismů typu INDEL v bukálních stěrech pro získání údajů o populaci

Každý vzorek DNA byl vyšetřen metodou ddPCR pro získání genotypu v každém INDEL polymorfismu. U všech 50 vzorků tedy došlo k získání potřebných výsledků. Tyto výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4. Znaménko plus (+) v tabulce znamená přítomnost pozitivních dropletů ve výsledné analýze z ddPCR. Vyšetřované ženy mohou mít pouze inserční či deleční alelu na obou chromozomech (homozygotky, viz obrázek 18) nebo jak inserční, tak i deleční alelu na X chromozomech (heterozygotky, viz obrázek 19).

Obrázek 18 - Příklad homozygotky pro INDEL rs 16397



Obrázek 19 - Příklad heterozygotky pro INDEL rs 16397



Výsledkem otestování našeho populačního vzorku 50 žen, resp. 100 alel od každého INDEL polymorfismu nám dalo představu o frekvenci alel vybraných polymorfismů v naší populaci. Výsledky jsou zapsány v následující tabulce. Pacientky číslo 38. – 50. jsou ty pacientky, kterým je dále testována plazmatická cfDNA pro určení přítomnosti ženského plodu. (Viz kapitola 4.6.)

Tabulka 4 - Souhrnné výsledky genotypizace pacientek

Pacientky	rs 2307932 wt HEX	rs 237932 mt FAM	rs 16397 wt HEX	rs 16397 mt FAM	rs 16637 wt HEX	rs 16637 mt FAM	rs 3048996 wt HEX	rs 3048996 mt FAM	rs 16680 wt HEX	rs 16680 mt FAM	Pohlaví dítěte	Počet homozygotních INDEL polymorfismů	Týden těhotenství při odběru
1.		+	+	+	+	+	+	+		+	-	2	
2.	+	+		+	+	+	+		+	+	-	2	
3.	+	+	+		+	+		+		+	-	3	
4.	+	+	+	+		+	+		+	+	-	2	
5.	+	+		+		+	+	+		+	-	3	

6.		+		+	+	+	+	+		+	-	3		
7.		+	+		+	+	+	+		+	-	2		
8.		+	+	+	+	+		+		+	+	-	2	
9.		+	+		+	+		+	+	+	+	-	2	
10.		+	+		+		+	+	+	+	+	-	2	
11.		+			+	+	+		+	+	+	-	3	
12.			+	+	+	+	+		+	+	+	-	2	
13.		+	+	+	+	+	+	+			+	-	2	
14.		+		+	+	+		+			+	-	4	
15.		+	+		+	+	+		+	+	+	-	2	
16.		+	+	+		+	+	+			+	M	3	
17.			+		+		+	+	+		+	M	4	
18.		+			+	+	+	+	+	+	+	M	2	
19.		+	+	+	+	+			+		+	M	3	
20.			+	+		+	+	+	+		+	M	3	
21.			+	+		+	+	+	+		+	M	3	
22.		+	+	+	+		+	+	+	+	+	M	1	
23.		+	+	+	+		+	+			+	M	3	
24.		+	+	+	+		+	+	+	+	+	M	1	
25.		+	+		+	+	+	+	+		+	M	2	
26.		+	+	+	+		+		+		+	M	3	
27.		+	+		+		+	+		+	+	M	3	
28.		+		+	+		+		+	+	+	M	3	
29.			+		+	+	+	+	+	+	+	M	2	
30.		+	+	+	+	+	+		+		+	M	3	
31.		+	+		+		+	+	+	+	+	M	2	
32.		+	+		+	+	+	+	+		+	M	2	
33.		+	+	+		+		+	+	+	+	M	2	
34.		+		+		+	+	+	+	+		M	3	
35.		+	+		+		+	+		+	+	M	3	
36.		+	+	+	+		+		+		+	M	3	
37.		+	+	+	+	+	+		+	+	+	M	1	
38.	1.	+	+		+	+	+	+	+		+	Ž	2	28.
39.	2.	+	+		+	+		+	+		+	Ž	3	17.
40.	3.	+	+		+	+	+	+	+		+	Ž	2	29.
41.	4.	+			+		+	+		+	+	Ž	4	30.
42.	5.	+	+		+	+		+	+	+	+	Ž	2	19.
43.	6.	+			+	+	+	+		+	+	Ž	3	23.
44.	7.		+		+	+		+	+	+		Ž	4	36.
45.	8.	+	+	+		+	+	+	+	+		Ž	2	23.
46.	9.	+	+		+	+	+	+	+		+	Ž	2	20.
47.	10.	+			+	+		+	+	+		Ž	4	20.
48.	11.		+		+	+	+		+	+	+	Ž	3	16.
49.	12.	+	+		+	+	+	+			+	Ž	3	19.
50.	13.		+	+	+	+	+		+	+	+	Ž	2	33.
Celkem počet alel		48	52	30	70	45	55	50	50	31	69			

Tabulka 5 - Frekvence výskytu alel polymorfismů v české populaci

INDEL polymorfismus	p (inserční alela)	q (deleční alela)
rs 2307932	0,52	0,48
rs 16397	0,30	0,70
rs 16637	0,45	0,55
rs 3048996	0,50	0,50
rs 16680	0,31	0,69

Získaná data byla použita pro ověření, zda se naše populace ve vztahu k vyšetřovaným polymorfismům nachází v Hardy–Weinbergově rovnováze. Chí-kvadrát test vedl k výsledkům uvedených v Tabulce 6.

Tabulka 6 - Výsledky chí-kvadrát testu pro jednotlivé polymorfismy, hladina významnosti je 0,05

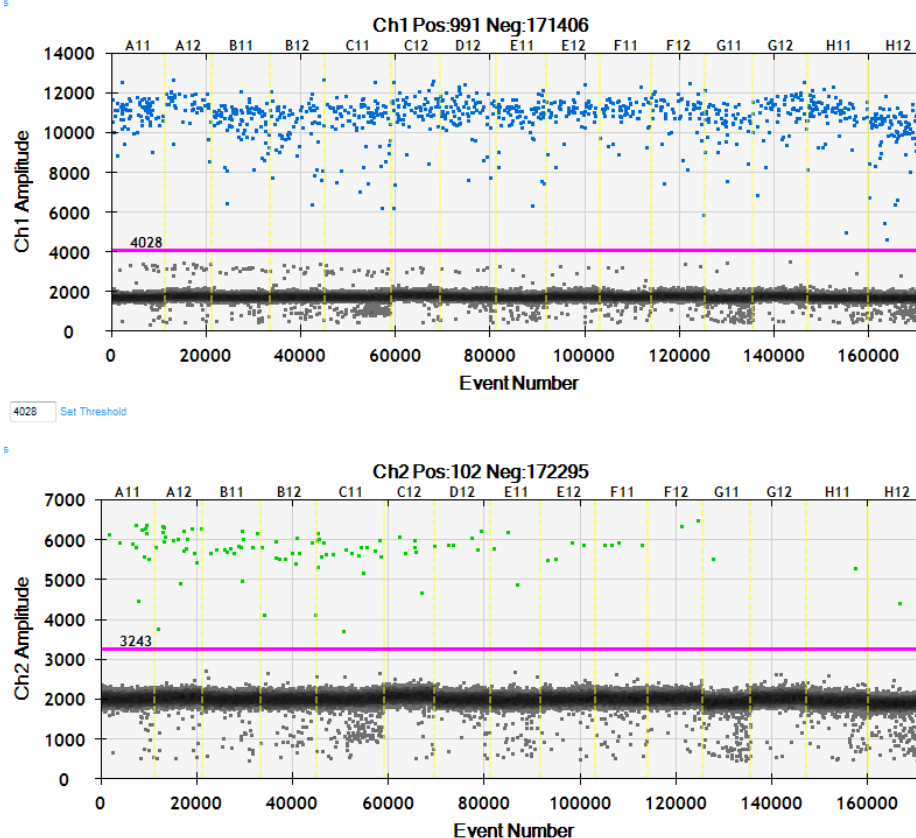
INDEL polymorfismus	p-hodnota	Výsledek
rs 2307932	0,020	Signifikantní
rs 16397	0,059	Nesignifikantní
rs 16637	0,723	Nesignifikantní
rs 3048996	0,923	Nesignifikantní
rs 16680	0,750	Nesignifikantní

Na základě této analýzy můžeme konstatovat, že rozložení genotypů v INDEL polymorfismech rs 16397, rs 16637, rs 3048996 a rs 16680 odpovídá polymorfismům nacházejícím se v Hardy–Weinbergově rovnováze. Pozorované zastoupení jednotlivých genotypů v našem populačním vzorku se v těchto případech neliší od jejich očekávaného zastoupení vypočteného na základě frekvence jednotlivých alel.

5.3 Testování citlivosti ddPCR pro směsi 20%, 10%, 5% a 2,5% jednoho homozygota na pozadí opačné varianty

Ve všech experimentech jsme byli schopni zachytit pozitivní signály i u nejnižší koncentrace simulující fetální frakci (viz Obrázek 20 a Tabulky 7 až 11).

Obrázek 20 - Testování citlivosti ddPCR jednoho homozygota na pozadí opačné varianty-INDEL polymorfismus č. 5



Na Obrázku 20 jsou na horním grafu zobrazeny modré pozitivní droplety, které patří vzorku A, který představuje homozygotní matku s FAM sondou, deleční alela. Na spodním grafu vidíme zelené pozitivní droplety patřící inserční alele téhož INDEL polymorfismu na X chromozomu patřící vzorku B, který představuje DNA plodu (HEX sonda). Žluté svislé čáry oddělují jednotlivé reakce, z obrázku je patrná klesající tendence pozitivních zelených dropletů díky klesající koncentraci testovací směsi. V pravé části spodního grafu už je zachyceno jen malé množství pozitivních dropletů, které odpovídají 2,5% vzorku B na pozadí vzorku A.

Množství DNA obou typů ve vzorku bylo vypočítáváno v souladu s postupem uvedeným v kapitole 4.5.2. Pro výpočet procentuálního zastoupení minoritní frakce byly základem počty kopií obou DNA ve vzorku.

V krvi matky tvoří cfDNA 3 - 10% z celkové volné DNA v plazmě. Pokud tedy například u vyšetření INDEL polymorfismu č. 1 je průměrná koncentrace majoritní DNA 1,89 ng/vzorek, pak 3 – 10% z tohoto množství se rovnají 0,06 – 0,19 ng/vzorek (viz Tabulka 7). V uvedeném příkladu jsme potvrdili, že metoda ddPCR dokáže zachytit i koncentraci 0,03 ng/vzorek. U dalších polymorfismů jsme dokázali zachytit i menší koncentraci 0,02 ng/vzorek u INDEL polymorfismu č. 2 a 5 (viz Tabulky 8 a 11).

Detekovali jsme malou frakci představující otcovskou X chromozomální alelu na mateřském pozadí ve všech umělých směsích. Díky těmto výsledkům jsme potvrdili citlivost vybrané metody.

Tabulka 7 - Testování metody ddPCR na směsných vzorcích pro INDEL polymorfismus č. 1, počty kapek jsou uvedeny pro kvadruplikát celkem

Procentuální zastoupení vzorku B v reakci	vzorek A – matka			vzorek B – plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/ kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet akceptovaných kapek - kvadruplikát	Procentuální zastoupení vzorku B v reakci dle výsledku ddPCR
20%	550	299	1,82	104	64	0,34	56576	15,90
10%	508	332	1,68	49	32	0,16	72764	8,80
5%	616	230	2,03	13,4	5	0,04	35321	2,13
2,5%	614	249	2,03	7,6	3	0,03	38409	1,22

Tabulka 8 - Testování metody ddPCR na směsných vzorcích pro INDEL polymorfismus č. 2, počty kapek jsou uvedeny pro kvadruplikát celkem

Procentuální zastoupení vzorku B v reakci	vzorek A – matka			vzorek B – plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet akceptovaných kapek - kvadruplikát	Procentuální zastoupení vzorku B v reakci dle výsledku ddPCR
20%	534	244	1,76	90	41	0,30	43165	14,42
10%	610	243	2,01	60	26	0,20	37796	8,96
5%	616	283	2,03	23	10	0,08	41486	3,6
2,5%	596	268	1,97	4,6	2	0,02	42658	0,77

Tabulka 9 - Testování metody ddPCR na směsných vzorcích pro INDEL polymorfismus č. 3, počty kapek jsou uvedeny pro kvadruplikát celkem

Procentuální zastoupení vzorku B v reakci	vzorek A – matka			vzorek B – plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet akceptovaných kapek - kvadruplikát	Procentuální zastoupení vzorku B v reakci dle výsledku ddPCR
20%	398	203	1,31	58,8	30	0,19	47775	12,87
10%	390	204	1,29	44,8	4,51	0,15	49816	10,30
5%	404	199	1,33	23,8	11	0,08	45703	5,56
2,5%	428	233	1,41	13,2	7	0,04	51420	2,99

Tabulka 10 - Testování metody ddPCR na směsných vzorcích pro INDEL polymorfismus č. 4, počty kapek jsou uvedeny pro kvadruplikát celkem

Procentuální zastoupení vzorku B v reakci	vzorek A – matka			vzorek B – plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet akceptovaných kapek - kvadruplikát	Procentuální zastoupení vzorku B v reakci dle výsledku ddPCR
20%	630	337	2,08	98	52	0,32	50606	13,46
10%	586	350	1,93	50,6	21	0,17	56293	7,95
5%	618	337	2,04	32,8	18	0,11	51423	5,04
2,5%	580	333	1,91	15,4	9	0,05	54104	2,59

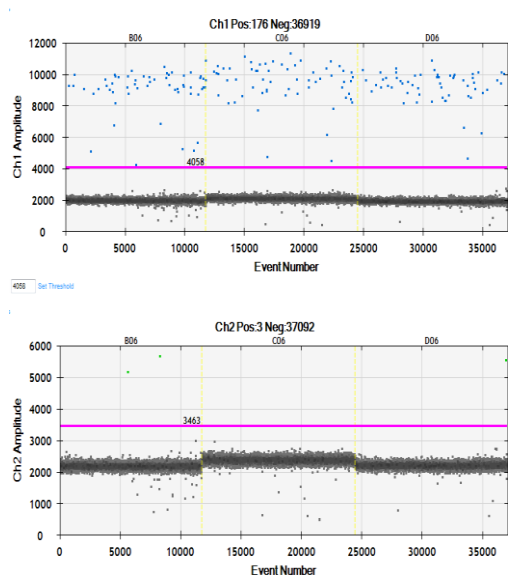
Tabulka 11 - Testování metody ddPCR na směsných vzorcích pro INDEL polymorfismus č. 5, počty kapek jsou uvedeny pro kvadruplikát celkem

Procentuální zastoupení vzorku B v reakci	vzorek A – matka			vzorek B – plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet kopií/reakce (20 µl) - kvadruplikát	Počet pozitivních kapek/kvadruplikát	Množství DNA (ng)/reakce (20 µl)	Počet akceptovaných kapek - kvadruplikát	Procentuální zastoupení vzorku B v reakci dle výsledku ddPCR
20%	530	258	1,75	118	56	0,39	45295	18,21
10%	532	265	1,76	78	40	0,26	47110	12,79
5%	496	231	1,64	27,8	13	0,09	44160	5,31
2,5%	592	295	1,95	6,2	3	0,02	46685	1,04

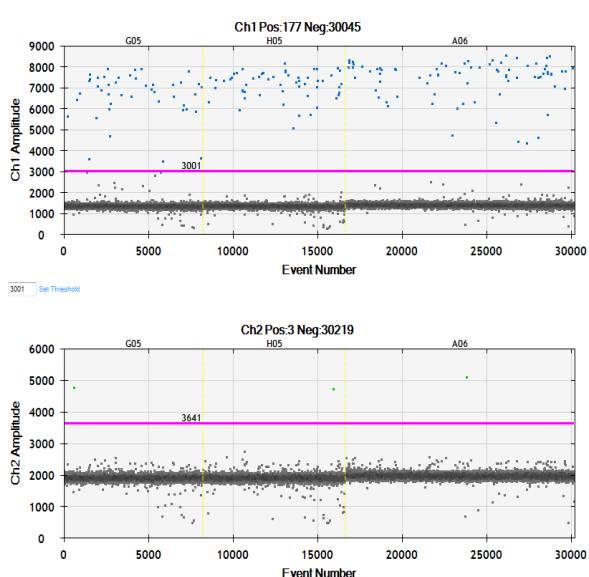
5.4 Otestování plazmatické cfDNA těhotných žen

Nejprve byly vyšetřeny bukální stěry vybraných pacientek. K vyšetření plazmy se přistoupilo jen v těch situacích, kdy byl u těhotné nalezen homozygotní genotyp v některém ze zkoumaných polymorfismů. V těch polymorfismech, ve kterých je matka heterozygotkou, by nebylo možné nalézt paternálně zděděnou alelu na úrovni cfDNA.

Obrázek 21- Analýza cfDNA u těhotné č. 12, INDEL polymorfismus č. 5



Obrázek 22 - Analýza cfDNA u těhotné č. 12, INDEL polymorfismus č. 2

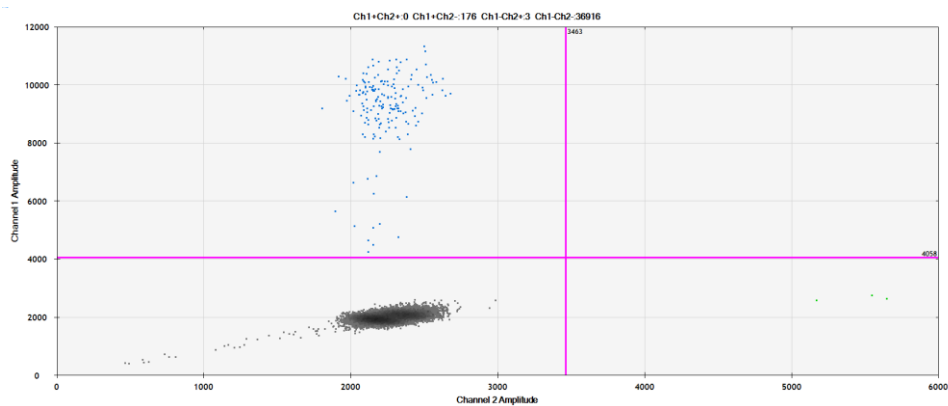


Příklady konkrétních výsledků analýzy cfDNA jsou uvedeny na Obrázcích č. 21 a 22. Na obou obrázcích jsou na horních grafech nad červenou čarou modře označené pozitivní droplety, které znázorňují cfDNA z plazmy matky. U INDEL polymorfismů č. 2 a 5 jsou FAM sondou označené deleční alely na X chromozomu, těhotné jsou v těchto případech homozygotkami $-/-$. Na spodních grafech jsou nad červenou čarou pozitivní zeleně označené droplety, které jsou označeny HEX sondou. U těchto INDEL polymorfismů jsou HEX sondou označeny inserční alely na X chromozomu. Přítomnost těchto dropletů tedy potvrzuje výskyt paternálně zděděných X chromozomálních sekvencí v mateřské plazmě. Tuto inserční alelu musel získat plod od otce a získat tím tedy jeho X chromozom. Díky identifikaci těchto dropletů jsme určili pohlaví plodu jako ženské.

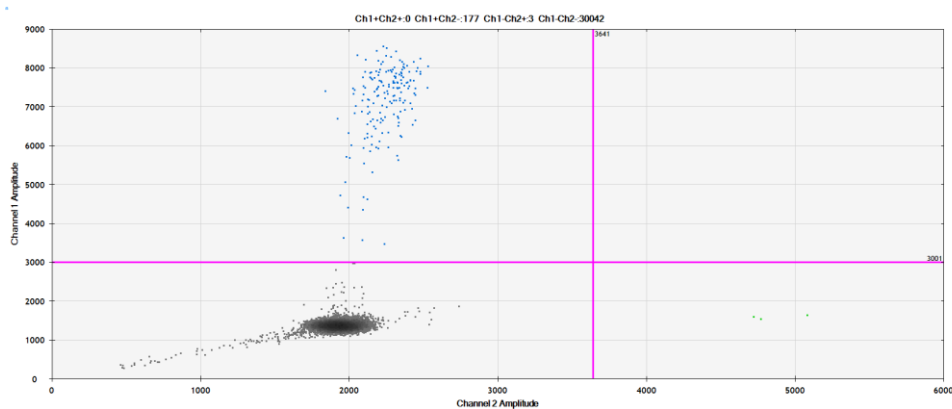
Výsledky analýzy pro stejné dvě situace jako na Obrázcích 21 a 22 jsou znázorněny také na obrázcích 23 a 24. Na těchto grafech jsou vidět oba typy dropletů a jejich početní zastoupení ve vzorku ve společném náhledu. Výsledky získané analýzou

cfDNA z plazmy těhotných pro jednotlivé INDEL polymorfismy jsou shrnuty v Tabulkách 11 až 15.

Obrázek 23 - 2D graf analýzy plazmatické cfDNA u INDEL polymorfismu č. 2 u pacientky č. 12



Obrázek 24 - 2D graf analýzy plazmatické cfDNA u INDEL polymorfismu č. 5 u pacientky č. 12



Výsledky pro celý soubor vyšetřovaných těhotných pak shrnuje Tabulka 17

Tabulka 12 - Souhrnná tabulka INDEL polymorfismu č. 1

Číslo pacientky	Matka			Plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/vzorek (15 µl) – triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet akceptovaných kapek - triplikát	Procentuální zastoupení cfDNA v cfDNA
1.	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	210	107	2,29	2	1	0,04	26054	1,89
5.	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	2900	947	31,48	35,2	11	0,77	23371	2,40
7.	732	354	6,88	106	52	2,33	34189	25,30
8.	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	638	199	6,78	21,4	7	0,47	22082	6,49
11.	5000	1533	54,09	78	35	1,71	32664	3,07
12.	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	186	80	1,87	15,4	8	0,34	30483	15,29

Tabulka 13 - Souhrnná tabulka INDEL polymorfismu č. 2

Číslo pacientky	Matka			Plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet akceptovaných kapek - triplikát	Procentuální zastoupení cfDNA v cfDNA
1.	614	226	6,75	0	0	0	25878	0
2.	320	158	3,47	4	2	0,09	23399	2,47
3.	1482	645	16,26	2,6	1	0,06	31344	0,35
4.	388	197	4,26	0	0	0	33910	0
5.	340	116	3,58	13,8	5	0,03	23936	7,80
6.	5520	2149	60,66	0	0	0	28752	0
7.	1392	698	15,30	0	0	0	35882	0
8.	352	193	3,68	16,8	9	0,37	38831	9,11
9.	716	355	7,71	14,2	7	0,31	35386	3,89
10.	1162	319	12,77	0	0	0	20269	0
11.	10280	3378	111,23	158	56	3,47	24897	3,03
12.	408	174	4,40	7,4	3	0,16	30222	3,56
13.	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabulka 14 - Souhrnná tabulka INDEL polymorfismu č. 3

Číslo pacientky	Matka			Plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet akceptovaných kapek – triplikát	Procentuální zastoupení cfDNA v cfDNA
1.	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	606	294	6,56	3,8	2	0,08	34307	1,25
3.	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	424	215	4,62	0	0	0	36753	0
5.	404	142	4,34	5,6	2	0,12	24913	2,73
6.	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	1220	644	10,87	222	118	4,84	37778	30,79
8.	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	1212	445	13,20	0	0	0	26043	0
11.	-	-	-	-	-	-	-	-
12.	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabulka 15 - Souhrnná tabulka INDEL polymorfismu č. 4

Číslo pacientky	Matka			Plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet akceptovaných kapek – triplikát	Procentuální zastoupení cfDNA v cfDNA
1.	-	-	-	-	-	-	-	-
2.	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	344	187	3,40	31,8	18	0,69	38309	17,00
5.	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	4920	2386	52,64	86	42	1,87	35418	3,44
7.	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	10880	4641	115,94	234	108	5,10	32602	4,21
12.	448	235	4,65	20,8	11	0,45	37166	8,87
13.	340	158	3,05	60	29	1,30	33285	30,00

Tabulka 16 - Souhrnná tabulka INDEL polymorfismu č. 5

Číslo pacientky	Matka			Plod			Reakce celkem	
	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet kopií/vzorek (15 µl) - triplikát	Počet pozitivních kapek/triplikát	Množství DNA (ng)/ml	Počet akceptovaných kapek – triplikát	Procentuální zastoupení cfDNA v cfDNA
1.	492	220	5,36	0	0	0	32416	0
2.	364	181	3,94	2	1	0,04	34824	1,09
3.	876	387	9,54	0	0	0	31338	0
4.	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	612	347	5,47	110	63	2,40	40004	30,47
8.	286	141	3,02	8,4	4	0,18	35081	5,71
9.	510	236	5,53	2,2	1	0,05	32848	0,86
10.	820	354	8,88	4,6	2	0,10	30551	1,12
11.	-	-	-	-	-	-	-	-
12.	324	170	3,47	5,8	3	0,13	37095	3,52
13.	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabulka 17 - Souhrnná tabulka testování plazmatické cfDNA u těhotných žen

Číslo pacientky	INDEL polymorfismy									
	1		2		3		4		5	
	Matka	Plod	Matka	Plod	Matka	Plod	Matka	Plod	Matka	Plod
1.	+-	N	--	--	+-	N	+-	N	--	--
2.	+-	N	--	+-	++	+-	+-	N	--	+-
3.	+-	N	--	+-	+-	N	+-	N	--	--
4.	++	+-	--	--	--	--	++	+-	+-	N
5.	+-	N	--	+-	++	+-	+-	N	+-	N
6.	++	+-	--	--	+-	N	++	+-	+-	N
7.	--	+-	--	--	++	+-	+-	N	++	+-
8.	+-	N	++	+-	+-	N	+-	N	++	+-
9.	+-	N	--	+-	+-	N	+-	N	--	+-
10.	++	+-	--	--	++	++	+-	N	++	+-
11.	--	+-	--	+-	+-	N	--	+-	+-	N
12.	+-	N	--	+-	+-	N	++	+-	--	+-
13.	--	+-	+-	N	+-	N	-	+-	+-	N

V této tabulce znaky +- znamenají heterozygotní genotyp pacientky. Při tomto genotypu se dále nepokračovalo v testování cfDNA u daného INDEL polymorfismu (= N). Znaky ++ nebo -- znamenají genotyp homozygotní. Zvýrazněné buňky v tabulce jsou ty situace, kdy došlo k zjištění paternální alely odlišné od mateřské a plod je tedy ženského pohlaví (zdědil X chromozom od otce). U pacientky č. 1 došlo k situaci, kdy nebylo možné ověřit pohlaví plodu nenesoucího sekvenci *SRY* genu pozitivním amplifikačním signálem pocházejícím z paternálního X chromozomu. Pacientka byla ve třech INDEL polymorfismech heterozygotka a ve dvou INDEL polymorfismech má plod (ženského pohlaví) stejný genotyp jako matka. Ověření přítomnosti fetální frakce v tomto případě tedy nebylo možné.

V Tabulce 18 jsem shrnula průměrné fetální frakce k jednotlivým INDEL polymorfismům, zobrazila jsem průměrné zastoupení cfDNA v cfDNA vzhledem ke gestačnímu týdnu a provedla jsem statistické výpočty.

Tabulka 18 - Shrnutí průměrné fetální frakce jednotlivých INDEL polymorfismů

Gestační týden	Číslo pacientky	Průměr	Variační koeficient	Směrodatná odchylka	INDEL polymorfismy				
					Procentuální zastoupení cfDNA v cfDNA				
					1.	2.	3.	4.	5.
16.	11.	3,44	0,16	0,55	3,07	3,03	-	4,21	-
17.	2.	1,60	0,38	0,62	-	2,47	1,25	-	1,09
19.	5.	5,27	0,48	2,54	-	7,80	2,73	-	-
19.	12.	5,32	0,47	2,51	-	3,56	-	8,87	3,52
20.	9.	2,38	0,64	1,52	-	3,89	-	-	0,86
20.	10.	3,81	0,71	2,69	6,49	-	-	-	1,12
23.	6.	2,92	0,18	0,52	2,40	-	-	3,44	-
23.	8.	7,41	0,23	1,70	-	9,11	-	-	5,71
28.	1.	-	-	-	-	-	-	-	-
29.	3.	0,35	0,00	0,00	-	0,35	-	-	-
30.	4.	9,45	0,80	7,56	1,89	-	-	17,00	-
33.	13.	22,65	0,32	7,36	15,29	-	-	30,00	-
36.	7.	28,85	0,09	2,52	25,30	-	30,79	-	30,47

Potvrdili jsme přítomnost otcovského X chromozomu v cfDNA u 12 z 13 těhotenství žen nesoucích plody ženského pohlaví. Zjistili jsme, že senzitivita námi provedeného testování ve vztahu k nalezení paternální X chromozomální alely na úrovni cfDNA je 92,31%. Jako kontrola pro správné určení pohlaví plodu nám sloužily výsledky získané v rutinním provozu diagnostické laboratoře Ústavu biologie a lékařské

genetiky 1. LF UK, kde došlo k testování pohlaví detekováním *SRY* genů na Y chromozomu v rámci vyšetřování RhD inkompatibility matky a plodu.

Na základě získaných populačních dat jsme provedli výpočet teoretické pravděpodobnosti výskytu informativních těhotenství v naší populaci následovně:

Pravděpodobnost setkání matky homozygotky s otcem, který má na svém X chromozomu jinou alelu, než jakou má matka:

$$(q^2 * p) + (p^2 * q)$$

Příklad na INDEL polymorfismu č. 1

$$(0,48^2 * 0,52) + (0,52^2 * 0,48) = 0,25 * 100\% = 25\%$$

Porovnání teoretických pravděpodobností s výsledky námi provedené studie shrnuje Tabulka 19.

Tabulka 19 - Informativnost INDEL polymorfismů

INDEL polymorfismy	% informativních těhotenství - teoreticky vypočteno na základě populačních dat	Počet (%) informativních těhotenství - prakticky dosaženo
1.	25	6 (46)
2.	21	7 (54)
3.	25	3 (23)
4.	25	4 (38)
5.	21	6 (46)

6. Diskuze

Cílem práce bylo vyvinout a zhodnotit metodický přístup vedoucí ke spolehlivému určení ženského pohlaví plodu z mateřské plazmy na základě pozitivního signálu získaného amplifikací sekvencí cfDNA z paternálního X chromozomu plodu. K určení pohlaví pomocí cfDNA se v současné klinické praxi používá metoda, kde se detekují sekvence na Y chromozomu. Dnešní výzkumy jsou natolik přesné a účinné, že spolehlivost testů pro určení pohlaví pomocí detekce genů na Y chromozomu se blíží k 100%. (Hill et al., 2011) Při neinvazivním vyšetření RhD inkompatibility mezi matkou a plodem však i za předpokladu 100% senzitivity ve vztahu k detekci Y chromozomálních sekvencí nelze odhadnout velikost fetální frakce cfDNA u těhotenství nesoucích plody ženského pohlaví a tak získat pozitivní kontrolu ve vztahu k možnostem genetické analýze fetální frakce cfDNA u těchto těhotenství. (Svobodová et al., 2015)

V naší studii jsme při testování plazmatické cfDNA těhotných žen potvrdili přítomnost otcovského X chromozomu v cfDNA u 12 z 13 těhotenství žen nesoucích plody ženského pohlaví – senzitivita testu je tedy 92,31%. Ve srovnání se studií, která byla pro moji práci výchozí (Yee Ho et al., 2015), byla naše metoda citlivější, což však může být zkresleno malým počtem pacientek v naší pilotní testovací studii. Sensitivita testu popsaného v citované studii, kde použili pro identifikaci cfDNA vybrané INDEL polymorfismy pomocí metody qPCR, byla 88,37%. (Yee Ho et al., 2015) Jako kontrola pro správné určení pohlaví plodu byly použity v naší i citované práci výsledky detekce SRY genů na Y chromozomu. Práce Pertl et al., 2000 si vytyčila stejný cíl, a to získat pozitivní signál o tom, že je plod ženského pohlaví. Pro výzkum využil analýzu STR polymorfismů a jejich metoda byla u 84% těhotných informativní. Pomocí vysoce polymorfních STR se snažili prokázat, že fetální DNA, která obsahuje otcovské alely, může být detekována v mateřské plazmě. (Pertl et al., 2000) Nevýhodou této metody je hlavně to, že je zapotřebí znát i genotyp otce, v naší studii je pouze potřeba znát genotyp matky pro příslušné alely INDEL polymorfismů. Ten je možné zjistit z bukalních stěrů, které jsou v případě testování RhD inkompatibility mezi matkou a plodem rutinně odebírány všem pacientkám s cílem zjistit jejich genotyp v *RHD* genu. (Svobodová et al., 2015)

Při určení pohlaví detekcí Y chromozomu se však objevují také falešně pozitivní či falešně negativní výsledky, proto testy nedosahují vždy úplně stoprocentní

spolehlivosti. (Devaney et al., 2011; Wright et al., 2012) V naší pilotní studii jsme nebyli schopni získat pozitivní amplifikační signál u jedné z pacientek nesoucích plod ženského pohlaví z toho důvodu, že paternální X chromozom nesl ve dvou případech alely stejného typu, pro něž byla matka homozygotní. Řešením situace by bylo přidání dalších INDEL polymorfismů k panelu aktuálně vyšetřovaných tak, aby na paternálním chromozomu plodu byla nalezena alela nepřítomná u matky.

Předpokladem pro tuto práci bylo vybrat vhodnou metodu ddPCR, která bude schopná zachytit minoritní fetální frakci cfDNA na pozadí celkové volné DNA v plazmě a zároveň skupinu polymorfismů typu INDEL, která bude využitelná pro určení ženského pohlaví plodu u většiny těhotenství. Nejdříve bylo nutné optimalizovat metodu, tak abychom všech pět INDEL polymorfismů mohli testovat naráz stejným PCR protokolem. Bylo potřeba najít správnou teplotu pro annealing primerů jednotlivých INDEL polymorfismů. Zvolená teplota byla pro všechny INDEL polymorfismy úplně optimální a výsledek šel vždy odečíst.

Skupina INDEL polymorfismů byla vybrána na základě studií provedených v Portugalsku, Číně a Německu. Žádná z uvedených prací neobsahuje data použitelná pro populaci České republiky. Výsledky chí-kvadrát testu vyšly pro čtyři polymorfismy nesignifikantní, tedy že rozložení souhlasí s nulovou hypotézou – pozorované zastoupení jednotlivých genotypů v našem populačním vzorku se v těchto případech neliší od jejich očekávaného. Rozložení genotypů v INDEL polymorfismech rs 16397, rs 16637, rs 3048996 a rs 16680 tedy odpovídá polymorfismům nacházejícím se v Hardy–Weinbergově rovnováze. Pro účely tohoto výzkumu, je nutné, aby zastoupení inserčních a delečních alel jednotlivých INDEL polymorfismů bylo v populaci vyrovnané. Zbylý INDEL polymorfismus rs2307932 a jeho zastoupení genotypu v naší populaci není v rovnováze s teoretickým zastoupením genotypu. Jedním z možných důvodů je fakt, že INDEL polymorfismy vykazují významné rozdíly ve frekvencích alel mezi geograficky oddělenými skupinami obyvatel. (Pereira et al., 2009a) Další možností je, že pro získání údajů o populaci je potřeba většího vzorku než 100 alel od každého INDEL polymorfismu.

Předpokladem pro náš výzkum bylo, že metoda ddPCR bude schopná zachytit minoritní fetální frakci cffDNA na pozadí celkové volné DNA v plazmě. Jelikož v krvi matky tvoří cffDNA 3 - 10% z cfDNA v plazmě. (Bianchi et al., 1990; Lo et al., 1998b) Právě kvůli nízké koncentraci cffDNA byla vybrána tato metoda. Nová technologie ddPCR umožňuje přímou kvantifikaci absolutních koncentrací DNA ve vzorku, ve

srovnání s qPCR je přímá absolutní kvantifikace cílových molekul DNA jednodušší, není potřeba kalibrace signálu se standardní křivkou. (Svobodová et al., 2015) Oproti qPCR metoda ddPCR umožňuje kvantifikaci s vyšší citlivostí, ukazuje nižší variabilitu mezi replikáty a vyšší regresní koeficienty standardních křivek. Kvantifikace není ovlivněna účinností reakce ani potenciálními inhibitory reakce, ddPCR tedy nehodnotí průběh reakce, ale pouze výsledek. Mírné omezení přesnosti bylo ovlivněno při velmi vysokých, či velmi nízkých koncentracích, pravděpodobně kvůli Poissonově statistice aplikované v ddPCR k přepočtu počtu pozitivních kapiček. (Papageorgiou a Patsalis, 2012; Svobodová et al., 2015) Celkově je tato metoda i nákladově efektivnější. (Debrand et al., 2015) Výsledkem testování citlivosti metody bylo, že jsme detekovali malou frakci představující otcovskou X chromozomální alelu na mateřském pozadí ve všech umělých směsích. Dokázali jsme zachytit i 0,77% v teoretické směsi představující zastoupení cfDNA v cfDNA. Díky těmto poznatkům dokážeme vyvodit závěr, že vybraná metoda je dostatečně citlivá pro testování cfDNA z plazmy matky.

Cílem naší práce bylo také odhadnout množství cirkulující DNA u těhotenství s plodem ženského pohlaví. Pro všechny pacientky bylo vypočítáno množství DNA ng/ml a velikost fetální frakce. Pro srovnání výsledků si uvedeme například pacientku č. 12, její průměrné množství cfDNA je 0,25 ng/ml. Pacientka byla při odběrech v 19. týdnu těhotenství. Ve srovnání se studií Horinek et al. 2008, kde množství cfDNA je 0,33 ng/ml nejsou výsledky zásadně rozdílné.

V naší studii se zjištěná velikost fetální frakce pro všechny INDEL polymorfismy pohybovala v rozsahu 0,35 - 28,85%. Oproti práci (Barrett et al., 2012), kde byla použita stejná metoda, jsme zachytili nižší procentuální zastoupení i přesto, že citovaná studie vyšetřovala cfDNA u těhotných v nižším gestačním týdnu (13. - 17.) V našem případě bylo rozmezí gestačních týdnů u pacientek 16. - 33. Jelikož se zvyšuje koncentrace cfDNA v průběhu těhotenství, naše spodní hodnota rozpětí fetální frakce by měla být vyšší. Hodnota 0,35% fetální frakce pro 3. pacientku v INDEL polymorfismu č. 2 je nejspíše velmi podhodnocená. Pacientka byla při odebrání plazmy ve 29. týdnu těhotenství, hodnota fetální frakce ve třetím trimestru těhotenství by se však měla pohybovat v rozmezí 10 - 40%. (Horinek et al., 2008) Tento výsledek je nejspíše ovlivněn tím, že této pacientce, jako jediné bylo prováděno hodnocení velikosti fetální frakce pouze z INDEL polymorfismu č. 3, protože pouze v tomto polymorfismu byla informativní. Je-li těhotná informativní ve více polymorfismech, odhad velikosti fetální frakce se zpřesňuje. V Tabulce 18 jsou vypočítané pro všechny pacientky

směrodatné odchylky a variační koeficienty. Z těchto statistických parametrů vyplývá, že čím vyšší je fetální frakce cfDNA a čím více testovaných polymorfismů přinese informativní výsledek, tím je získaná informace věrohodnější. Do budoucna, pro zlepšení této metody by bylo optimální přidat další polymorfizmy k testování.

Velikost fetální frakce je ovlivněna fyziologickými vlastnostmi plodu a matky. Parametry, které ji ovlivňují, jsou gestační týden (Costa et al. 2001, Chan et al. 2003 a Horinek et al. 2008), patologické onemocnění spojené s placentou (Sekizawa et al., 2002; Alberry et al., 2009), fyzická aktivita matky (Atamaniuk et al., 2004), obezita (Haghiac et al., 2012), kouření matky a patologický karyotyp. (Ashoor et al., 2013) Úroveň celkové cfDNA nemá tendenci se zvyšovat s rostoucím gestačním stářím. (Horinek et al., 2008) Takové údaje mohou znamenat existenci teorie, že pokud se zvýší procentuální cfDNA v celkové mateřské cfDNA přiblíží se tím čas porodu. (Majer et al., 2007) Podíl cfDNA se po 20. týdnu těhotenství stabilně zvyšuje rychlostí 1% týdně a vrcholí na konci těhotenství. (Wang et al., 2013). Díky těmto předpokladům by se pomocí určení přesné velikosti fetální frakce dal předpovědět termín porodu, eventuálně na základě zvýšených hladin cfDNA vzhledem ke gestačnímu týdnu předpovědět možné komplikace těhotenství. Z mojí práce se bohužel nedají vyvodit žádné výsledky, co se týče těchto změn koncentrace cfDNA během těhotenství, jelikož odebrané vzorky od těhotných pacientek byly sice odebrány v různých gestačních týdnech ale od různých pacientek. Srovnání jejich fetálních frakcí by tudíž nebylo vypovídající tak jako v případě opakovaných odběrů od stejných těhotných.

Na závěr byl proveden výpočet teoretické pravděpodobnosti výskytu informativních těhotenství v naší populaci a byl porovnán s výsledky naší studie. Prakticky bylo dosaženo většího počtu informativních těhotenství než by odpovídalo teoretickému výpočtu. Pro účely tohoto výpočtu bylo předpokládáno, že všechny studované polymorfnní lokusy se nacházejí ve stavu Hardy-Weinbergovy rovnováhy, ačkoliv tento předpoklad nebyl v případě rs 2307932 potvrzen. Důvodem je nejspíše malý vzorek pacientek pro náš výzkum.

7. Závěr

Práce splnila cíle, které si vytkla:

- Určení přítomnosti paternálního X chromozomu ve frakci fetální cirkulující DNA pro potvrzení ženského pohlaví plodu
- Odhad velikosti fetální frakce cirkulující DNA u těhotenství s plodem ženského pohlaví

Při neinvazivní prenatalní diagnostice dochází k určení pohlaví plodu analýzou přítomnosti genů vyskytujících se pouze na Y chromozomu v cfDNA v plazmě těhotné. Při přítomnosti těchto genů je plod označen za mužský. V předkládané práci jsme se snažili najít vhodnou metodu, díky které přímo určíme ženské pohlaví plodu díky X chromozomálním alelám INDEL polymorfismů zděděných od otce.

Jedním z hlavních předpokladů pro naši práci bylo potvrdit, že vybraná skupina polymorfismů typu INDEL bude využitelná pro určení ženského pohlaví plodu u většiny těhotenství v naší populaci. Výsledky pilotní studie potvrdily, že vybrané polymorfismy jsou schopny tento úkol plnit.

Dalším předpokladem bylo, že metoda ddPCR bude schopná zachytit minoritní fetální frakci cfDNA na pozadí celkové volné DNA v plazmě. Tento předpoklad jsme také potvrdili. Nejdříve jsme testovali citlivost metody na směsích DNA izolovaných z bukových stěrů. Poté jsme tento předpoklad potvrdili i při testování plazmatické cfDNA těhotných žen.

Prvním cílem této diplomové práce bylo určení přítomnosti paternálního X chromozomu ve frakci fetální cirkulující DNA pro potvrzení ženského pohlaví plodu. Tohoto cíle jsme dosáhli díky kombinaci metody ddPCR s vhodným výběrem INDEL polymorfismů. Přítomnost paternálního X chromozomu jsme potvrdili u 12 pacientek ze 13. Citlivost této metody tedy na našem souboru byla 92,31%.

Druhým cílem naší práce bylo stanovit velikost fetální frakce cirkulující DNA u těhotenství s plodem ženského pohlaví. Velikost fetální frakce se v našem studovaném souboru pohybovala v rozmezí 0,35 – 28,85%.

Vyvinuli jsme přístup umožňující stanovení otcovských X chromozomálních alel na mateřském pozadí pro neinvazivní prenatalní diagnostiku pomocí metody ddPCR a vhodného výběru INDEL polymorfismů.

8. Seznam citované literatury

- Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F. 2014. Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]:16–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25042845>
- Alberry MS, Maddocks DG, Hadi MA, Metawi H, Hunt LP, Abdel-Fattah SA, Avent ND, Soothill PW. 2009. Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. *Am J Obstet Gynecol* [Internet] 200:98.e1-98.e6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2008.07.063>
- Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. 2001. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 41:1524–1530.
- Arnemann J, Epplen JT, Cooke HJ, Sauermann U, Engel W, Schmidtke J. 1987. A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids Res.*
- Ashoor G, Syngelaki A, Poon LCY, Rezende JC, Nicolaides KH. 2013. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11 – 13 weeks ' gestation : relation to maternal and fetal characteristics. :26–32.
- Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, Birdir C, Nicolaides KH. 2012. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* [Internet] 206:322.e1-322.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2012.01.029>
- Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Müller MM. 2004. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem* 50:1668–1670.
- Barrett AN, McDonnell TCR, Chan KCA, Chitty LS. 2012. Digital PCR Analysis of Maternal Plasma for Noninvasive Detection of Sickle Cell Anemia. *Clin Chem* [Internet] 58:1026–1032. Available from: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2011.178939>
- Bartha JL, Finning K, Soothill PW. 2003. Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency. *Obstet Gynecol*

101:1135–1136.

- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Pena SDJ. 2006. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet* 70:658–665.
- Benachi A, Steffann J, Gautier E, Ernault P, Olivi M, Dumez Y, Costa J-M. 2003. Fetal DNA in maternal serum: does it persist after pregnancy? *Hum Genet* [Internet] 113:76–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12640544>
- Benoit B. 1999. Early fetal gender determination. *Ultrasound Obstet Gynecol* 13:299–300.
- Berta P, Hawkins JB, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348:448–450.
- Bianchi DW. 2004. Circulating fetal DNA: Its origin and diagnostic potential - A review. *Placenta* 25:93–101.
- Bianchi DW, Flint a F, Pizzimenti MF, Knoll JH, Latt S a. 1990. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3279–3283.
- Bianchi DW, Parsa S, Bhatt S, Halks-Miller M, Kurtzman K, Sehnert AJ, Swanson A. 2015. Fetal sex chromosome testing by maternal plasma DNA sequencing: Clinical laboratory experience and biology. *Obstet Gynecol* 125:375–382.
- Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP. 2012. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 119:890–901.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. 1996. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci* [Internet] 93:705–708. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.2.705>
- Bio-Rad | Products for Life Science Research & Clinical Diagnostics | Bio-Rad. Bio-Rad | Products for Life Science Research & Clinical Diagnostics | Bio-Rad [online]. Copyright © 2018 Bio [cit. 08.08.2018]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/>
- Bogart MH, Pandian MR, Jones OW. 1987. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn.*
- Boon EMJ, Schlecht HB, Martin P, Daniels G, Vossen RHAM, Den Dunnen JT, Bakker

- B, Elles R. 2007. Y chromosome detection by Real Time PCR and pyrophosphorolysis-activated polymerisation using free fetal DNA isolated from maternal plasma. *Prenat Diagn*.
- Butler E, Li R. 2014. Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis. *J Forensic Investig* [Internet] 2:1–10. Available from: <http://www.avensonline.org/wp-content/uploads/JFI-2330-0396-02-0013.pdf>
<http://www.avensonline.org/fulltextarticles/JFI-2330-0396-02-0013.html>
<http://www.avensonline.org/wp-content/uploads/JFI-2330-0396-02-0013.pdf>
- Calda P. 2003. Eticke problémy prenatalni diagnostiky a terapie na pocatku 3. tisíciletí. *Interni Med pro praxi* [Internet] 5:6–10. Available from: <https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200303-0012.php>
- Calda P, Břešťák M, Fischerová D. 2010. Ultrazvuková diagnostika v těhotenství a gynekologii. 2., komple. Praha: Aprofema. Available from: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:9d6127e0-318d-11e8-9dd8-005056827e51>
- Caputo M, Amador MA, Santos S, Corach D. 2016. Potential forensic use of a 33 X-InDel panel in the Argentinean population. *Int J Legal Med* [Internet]:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-016-1399-z>
- Carpenter G. 1909. Muscular Dystrophy. *Proc R Soc Med*:56–59.
- Caughey AB. 2006. Amniocentesis and the Difference in the Rate of Pregnancy Loss. *108*:612–616.
- Chan KCA. 2004. Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clin Chem* [Internet] 50:88–92. Available from: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2003.024893>
- Chan LYS, Leung TN, Chan KCA, Tai H-L, Lau TK, Wong EMC, Lo YMD. 2003. Serial Analysis of Fetal DNA Concentrations in Maternal Plasma in late Pregnancy. *Clin Chem*:678–680.
- Chi C, Hyett JA, Finning KM, Lee CA, Kadir RA. 2006. Non-invasive first trimester determination of fetal gender: A new approach for prenatal diagnosis of haemophilia. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 113:239–242.
- Chiu RW, Lo YMD. 2002. Application of fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet] 2:32–40. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.2.1.32>

- Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, Foo CHF, Xie B, Tsui NBY, Lun FMF, Zee BCY, Lau TK, Cantor CR, Lo YMD. 2008. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet] 105:20458–20463. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2600580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chueh J, Golbus MS. 1993. Prenatal diagnosis using fetal cells from the maternal circulation. *West J Med* [Internet] 159:308–311. Available from: g:%5CRessourcen%5CLiteraturverwaltung%5CBiotype_PDF_Files%5CChueh_1993_FetalCells_MaternalBlood.pdf
- Chromosome idiogram. Genetics Home Reference - NIH [online]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/X#idiogram>
- Conner SN, Longman RE, Cahill AG. 2014. The role of ultrasound in the diagnosis of fetal genetic syndromes. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.
- Le Conte G, Letourneau A, Jani J, Kleinfinger P, Lohmann L, Costa J-M, Benachi A. 2017. Cell-free fetal DNA analysis in maternal plasma as a screening test for trisomy 21, 18 and 13 in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.18838>
- Da Costa Francez PA, Rodrigues EMR, De Velasco AM, Dos Santos SEB. 2012. Insertion-deletion polymorphisms-utilization on forensic analysis. *Int J Legal Med* 126:491–496.
- Costa JM, Benachi A, Gautier E. 2002a. New Strategy for Prenatal Diagnosis of X-Linked Disorders. *N Engl J Med* [Internet] 346:1502–1502. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200205093461918>
- Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic J, Ernault P, Dumez Y. 2001. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. :1070–1074.
- Costa JM, Giovangrandi Y, Ernault P, Lohmann L, Nataf V, El Halali N, Gautier E. 2002b. Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 119:255–260.
- Debrand E, Lykoudi A, Bradshaw E, Allen SK. 2015. A non-invasive droplet digital PCR (ddPCR) assay to detect paternal CFTR mutations in the cell-free fetal DNA (cffDNA) of three pregnancies at risk of cystic fibrosis via compound heterozygosity. *PLoS One* 10:1–8.

- Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. 2011. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *Jama* [Internet] 306:627–36. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4526182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dunne GM, Cunat JS. 1982. Sonographic determination of fetal size. :741–743.
- Edelmann J, Hering S, Augustin C, Szibor R. 2009. Indel polymorphisms-An additional set of markers on the X-chromosome. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 2:510–512.
- Edelmann J, Kohl M, Dressler J, Hoffmann A. 2016. X-chromosomal 21-indel marker panel in German and Baltic populations. *Int J Legal Med* 130:357–360.
- Efrat Z, Akinfenwa OO, Nicolaidis KH. 1999. First-trimester determination of fetal gender by ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 13:305–307.
- Emerson DS, Felker RE, Brown DL. 1989. The sagittal sign. An early second trimester sonographic indicator of fetal gender. *J Ultrasound Med* 8:293–297.
- Falzarano MS, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. 2015. Duchenne muscular dystrophy: From diagnosis to therapy. *Molecules* 20:18168–18184.
- Fan G, Ye Y, Luo H, Hou Y. 2015. Screening of Multi-InDel markers on X-chromosome for forensic purpose. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 5:e42–e44.
- Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N, Bianchi DW. 2005. High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: A risk factor for spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 193:421–425.
- Finning KM, Chitty LS. 2008. Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* 13:69–75.
- Francez PADC, Ribeiro-Rodrigues EM, Dos Santos SEB. 2012. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. *Forensic Sci Int Genet* [Internet] 6:132–135. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.002>
- Freitas SCN, Resque RL, Ribeiro-Rodrigues EM, Guerreiro JF, Santos NPC, Ribeiro-Dos-Santos ?ndrea, Santos S. 2010. X-linked insertion/deletion polymorphisms: Forensic applications of a 33-markers panel. *Int J Legal Med* 124:589–593.
- Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L. 2005. Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 117:243–248.
- González-González MC, García-Hoyos M, Trujillo MJ, Rodríguez De Alba M, Lorda-

- Sánchez I, Díaz-Recasens J, Gallardo E, Ayuso C, Ramos C. 2002. Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* 22:946–948.
- González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. 2003. Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* 23:232–234.
- Gorduz VE, Socolov G, Socolov V. 2018. Prenatal Biochemical and Ultrasound Markers in Chromosomal Anomalies.
- Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. 2003. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: Detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 18:1733–1736.
- Haddow JE, Palomaki GE, Knight GJ, Williams J, Pulkkinen A, Canick JA, Saller DN, Bowers GB. 1992. Prenatal Screening for Down's Syndrome with Use of Maternal Serum Markers. *N Engl J Med*.
- Haghiac M, Vora NL, Basu S, Johnson KL, Presley L, Bianchi DW, Mouzon SH De. 2012. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women. *Obesity* 20:2213–2219.
- Hájek Z, Kulovaný E, Milan M. 2000. *Základy prenatální diagnostiky*.
- Hammer-Jacobsen E. 1959. THERAPEUTIC ABORTION ON ACCOUNT OF X-RAY EXAMINATION DURING PREGNANCY. 6.
- Harrington K, Armstrong V, Freeman J, Aquilina J, Campbell S. 1996. Fetal sexing by ultrasound in the second trimester: Maternal preference and professional ability. *Ultrasound Obstet Gynecol* 8:318–321.
- Hartwig TS, Ambye L, Werge L, Weiergang MK, Høgh A, Nørgaard P, Sørensen S, Joergensen FS. 2017. OP22.07: Validation of NIPT as a screening test for Trisomy 21, 18, 13 and fetal sex performed at Hvidovre Hospitals NIPT Centre, Copenhagen, Denmark. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet] 50:120. Available from: <http://doi.org/10.1002/uog.17904>
- Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G, Daniels G, Chitty L. 2011. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: Translating research into clinical practice. *Clin Genet* 80:68–75.
- Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K. 2002. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative

- analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 110:75–79.
- Horinek A, Korabecna M, Panczak A, Gallova ZU, Nouzova K, Calda P, Hancarova M. 2008. Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: Methodology issues and kinetics. *Fetal Diagn Ther* 24:15–21.
- Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Kofer J, Komrska V, Habart D. 2003. Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat Diagn* 23:235–238.
- Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K, Benesova B, Doucha J, Kulovany E, Vlk R. 2005. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn Ther* 20:275–280.
- Hsiao CH, Wang HC, Hsieh CF, Hsu JJ. 2008. Fetal gender screening by ultrasound at 11 to 13+6 weeks. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87:8–13.
- Hsu LYF, Dubin EC, Kerenyi T, Hirschhorn K. 1973. Results and Pitfalls in Prenatal Cytogenetic Diagnosis *. :112–119.
- Hui L, Ferres MA. 2014. Antenatal Noninvasive DNA Testing : Clinical Experience and Impact Antenatal Noninvasive DNA Testing : Clinical Experience and Impact.
- Hunter A. 1988. Invasive Prenatal Testing. *Can Fam Physician* 34:903–906.
- Ibarra A, Restrepo T, Rojas W, Castillo A, Amorim A, Martínez B, Burgos G, Ostos H, Álvarez K, Camacho M, Suarez Z, Pereira R, Gusmão L. 2014. Evaluating the X chromosome-specific diversity of Colombian populations using insertion/deletion polymorphisms. *PLoS One* 9.
- Kessler HH, Mühlbauer G, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, Marth E. 2001. Fully automated nucleic acid extraction: MagNa pure LC. *Clin Chem* 47:1124–1126.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. 1977. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. 37:646–650.
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YMD. 1998. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* [Internet] 352:1904–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9863792>
- Lev-Toaff AS, Ozhan S, Pretorius D, Bega G, Kurtz AB, Kuhlman K. 2000. Three-dimensional multiplanar ultrasound for fetal gender assignment: Value of the mid-sagittal plane. *Ultrasound Obstet Gynecol* 16:345–350.
- Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, Axelrod N, Huang J, Kirkness EF, Denisov G, Lin Y, MacDonald JR, Pang AWC, Shago M, Stockwell

- TB, Tsiamouri A, Bafna V, Bansal V, Kravitz SA, Busam DA, Beeson KY, McIntosh TC, Remington KA, Abril JF, Gill J, Borman J, Rogers YH, Frazier ME, Scherer SW, Strausberg RL, Venter JC. 2007. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 5:2113–2144.
- Li C-N, Hsu H-L, Wu T-L, Tsao K-C, Sun C-F, Wu JT. 2003. Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: A study of tissue cultures of tumor cell lines. *J Clin Lab Anal* [Internet] 17:103–107. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcla.10081>
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. 2004. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 50:1002–1011.
- Lo YMD. 1996. Noninvasive prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood. *Methods Mol Med* 5:237–244.
- Lo YMD, Chiu RWK, Lau TK, Chui DHK, Leung TN, Chow KCK. 2002. Prenatal exclusion of Beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *TT - Lancet* [Internet] 360:998–1000. Available from: <http://www.thelancet.com>
- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350:485–487.
- Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PM, Redman CW, Wainscoat JS. 1998a. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*.
- Lo YMD, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AMZ, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. 1999a. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 45:1747–1751.
- Lo YMD, Leung TN, Tein MSC, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CWG. 1999b. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem* 45:184–188.
- Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AMZ, Hjelm NM. 1998b. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum : Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. :768–775.
- Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. 1999c. Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma. *Am J Hum Genet* [Internet] 64:218–224. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707616759>

- Mahallawi MN El, Omran O, Tamara T, Teama S. 2007. Early Detection of Fetal Gender from Maternal Blood Using Polymerase Chain Reaction. *Egypt J Med Hum Genet* 8:1–2.
- Majer S, Bauer M, Magnet E, Strele A, Giegerl E, Eder M, Lang U, Pertl B. 2007. Maternal urine for prenatal diagnosis—an analysis of cell-free fetal DNA in maternal urine and plasma in the third trimester. *Prenat Diagn* 27:1219–1223.
- Martin JP, Bell J. 1943. A Pedigree of Mental Defect Showing Sex-Linkage. *J Neurol Psychiatry* 6:154–157.
- Meagher S, Davison G. 1996. Early second-trimester determination of fetal gender by ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 8:322–324.
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE. 2006a. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. :1182–1190.
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE. 2006b. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 16:1182–1190.
- Mills RE, Pittard WS, Mullaney JM, Farooq U, Creasy TH, Mahurkar A a, Kemeza DM, Strassler DS, Ponting CP, Webber C, Devine SE. 2011. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. :830–839.
- Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. 2008. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: A four-year experience in Belgium. *Transfusion* 48:373–381.
- Monni G, Zoppi MA, Iuculano A, Piras A, Arras M. 2014. Invasive or non-invasive prenatal genetic diagnosis? *J Perinat Med* 42:545–548.
- Nelson MM, Emery AEH. 1970. Amniotic Fluid Cells; Prenatal Sex Prediction and Culture. *Br Med J* 1:523–526.
- Niermeijer MF, Sachs ES, Jahodova M. 1976. Prenatal diagnosis of genetic disorders. :182–194.
- Oka K, Asari M, Omura T, Yoshida M, Maseda C, Yajima D, Matsubara K, Shiono H, Matsuda M, Shimizu K. 2014. Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms

- for human identification using universal fluorescent PCR. *Mol Cell Probes* [Internet] 28:13–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2013.09.002>
- Papageorgiou EA, Patsalis PC. 2012. Non-invasive prenatal diagnosis of aneuploidies: New technologies and clinical applications. *Genome Med* [Internet] 4:1–12. Available from: <http://genomemedicine.com/content/4/5/46%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=2012306765>
- Pereira R, Pereira V, Gomes I, Tomas C, Morling N, Amorim A, Prata MJ, Carracedo Á, Gusmão L. 2012. A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR. *Int J Legal Med* 126:97–105.
- Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo Á, Gusmão L. 2009a. A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis* 30:3682–3690.
- Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo Á, Gusmão L. 2009b. Insertion/deletion polymorphisms: A multiplex assay and forensic applications. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 2:513–515.
- Pereira V, Moncada E, Diez IE, Tomas C, Amorim A, Morling N, Gusmão L, Prata MJ. 2011. Genetic characterization of Somali and Iraqi populations using a set of 33 X-chromosome Indels. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 3.
- Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. 2000. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats. *Hum Genet* [Internet] 106:45–49. Available from: <http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s004390051008>
- Powers JM, Schaumburg HH. 1974. Adreno-leukodystrophy (sex-linked Schilder's disease). *Am J Pathol* [Internet] 76:481–91. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1910882&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Quick P Value from Chi-Square Score Calculator. Social Science Statistics Home Page [online]. Dostupné z: <http://www.socscistatistics.com/pvalues/chidistribution.aspx>
- Quintana S, Passucci J. 2015. Early fetal sex determination in maternal plasma by real-time PCR Determinación temprana del sexo fetal en plasma materno mediante

PCR en tiempo real.

- Rijnders RJ, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede M a, Christiaens GC. 2001. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. *Obstet Gynecol* [Internet] 98:374–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11530115>
- Rijnders RJP, Van Der Luijt RB, Peters EDJ, Goeree JK, Van Der Schoot CE, Ploos Van Amstel JK, Christiaens GCML. 2003. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn* 23:1042–1044.
- Roche Life Science | Welcome. Roche Life Science | Welcome [online]. Copyright ©1999 [cit. 08.08.2018]. Dostupné z: https://lifescience.roche.com/en_cz.html
- Ross MT, Grafham D V., Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP, Prankish A, Lovell FL, Howe KL, Ashurst JL, Fulton RS, Sudbrak R, Wen G, Jones MC, Hurles ME, Andrews TD, Scott CE, Searle S, Ramser J, Whittaker A, Deadman R, Carter NP, Hunt SE, Chen R, Cree A, Gunaratne P, Havlak P, Hodgson A, Metzker ML, Richards S, Scott G, Steffen D, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Alnscough R, Ambrose KD, Ansari-Lari MA, Aradhya S, Ashwell RIS, Babbage AK, Bagguley CL, Ballabio A, Banerjee R, Barker GE, Barlow KF, Barrett IP, Bates KN, Beare DM, Beasley H, Beasley O, Beck A, Bethel G, Blechschmidt K, Brady N, Bray-Allen S, Bridgeman AM, Brown AJ, Brown MJ, Bonnin D, Bruford EA, Buhay C, Burch P, Burford D, Burgess J, Burrill W, Burton J, Bye JM, Carder C, Carrel L, Chako J, Chapman JC, Chavez D, Chen E, Chen G, Chen Y, Chen Z, Chinault C, Ciccodicola A, Clark SY, Clarke G, Clee CM, Clegg S, Clerc-Blankenburg K, Clifford K, Cogley V, Cole CG, Conquer JS, Corby N, Connor RE, David R, Davies J, Davis C, Davis J, et al. 2005. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*.
- Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. 2000. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* 356:1170.
- Santacroce R, Vecchione G, Tomaiuolo M, Sessa F, Sarno M, Colaizzo D, Grandone E, Margaglione M. 2006. Identification of fetal gender in maternal blood is a helpful tool in the prenatal diagnosis of haemophilia. *Haemophilia* 12:417–422.
- Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos ÂKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Dos Santos SEB. 2010. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat*

31:184–190.

- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T, Farina A. 2003. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 188:480–484.
- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J, Okai T. 2002. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 48:353–354.
- Sekizawa A, Kondo T, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Saito H, Okai T. 2001. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 47:1856–1858.
- Simpson JL, Bianchi D, Brambati B, Campbell S, De La Cruz F, Elias S, Evans M, Ferguson-Smith MA, Golbus M, Holzgreve W, Jackson L, Katz M, Platt L, Timer-Tritsch I, Wald N, Zakut H, Boulyjenkov V. 1995. Noninvasive screening for prenatal genetic diagnosis. *Bull World Health Organ* 73:799–804.
- Simpson JL, Elias S. 1994. Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenat Diagn* [Internet] 14:1229–1242. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pd.1970141308>
- Spencer K, Coombes EJ, Mallard AS, Ward AM. 1992. Free beta human choriongonadotropin in down's syndrome screening: A multicentre study of its role compared with other biochemical markers. *Ann Clin Biochem* 29:506–518.
- Spencer K, Souter V, Tul N, Snijders R, Nicolaides KH. 1999. A screening program for trisomy 21 at 10-14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free ss-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet] 13:231–237. Available from: <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1469-0705.1999.13040231.x>
- Steele M, Roy Breg W. 1966. CHROMOSOME ANALYSIS OF HUMAN AMNIOTIC-FLUID CELLS. *Lancet* [Internet] 287:383–385. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673666913870>
- Steinman CR, Ginman CRS. 1975. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *CONCISE PUBLICATIONS Free DNA in Serum and Plasma from Normal Adults. J Clin Invest* [Internet] 56:512–515. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI108118.%0Ahttp://jci.me/108118-pdf>
- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. 2001. About the possible

- origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. In: *Clinica Chimica Acta*.
- Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. 2008. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta* 387:55–58.
- Svobodová I, Pazourková E, Hořínek A, Novotná M, Calda P, Korabečna M. 2015. Performance of droplet digital PCR in non-invasive fetal RHD genotyping - Comparison with a routine real-time PCR based approach. *PLoS One* 10:1–13.
- Tabor A, Vestergaard CHF, Lidegaard Ø. 2009. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and amniocentesis: an 11-year national registry study. *Ultrasound Obstet Gynecol* [Internet] 34:19–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/uog.6377>
- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. 1966. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* [Internet] 45:1732–1740. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4959277><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC292857><http://www.jci.org/articles/view/105479>
- Thompson JS, Thompson MW, Nussbaum RL, Willard HF, McInnes RR. 2004. *Klinická genetika : Thompson & Thompson : 6. vyd.* Available from: <http://www.medvik.cz/link/MED00114922>
- Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, van Ommen GJB, Blonden LAJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunst CB, Galjaard H, Thomas Caskey C, Nelson DL, Oostra BA, Warran ST. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65:905–914.
- Wald NJ, Cuckle HS, Densem JW, Nanchahal K, Royston P, Chard T, Haddow JE, Knight GJ, Palomaki GE, Canick JA. 1988. Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy. *Br Med J* [Internet] 297:883–887. Available from: <http://www.bmj.com/content/297/6653/883?variant=abstract>
- Wang E, Batey A, Struble C, Musci T, Song K, Oliphant A. 2013. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 33:662–666.
- Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, Johnson

- KL. 2004. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 81:638–644.
- Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick J a, Bianchi DW. 2003. Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. *Hum Genet* 112:204–208.
- Webb A, Te M, Miran T, Sillence K, Kaushik N, Kiernan M, Nd A. 2012. NON INVASIVE PRENATAL DIAGNOSIS OF ANEUPLOIDY : NEXT GENERATION SEQUENCING OR FETAL DNA ENRICHMENT ? 15:17–26.
- What are the different ways in which a genetic condition can be inherited? - Genetics Home Reference - NIH. Genetics Home Reference - NIH [online]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/inheritance/inheritancepatterns>
- Whitlow BJ, Lazanakis MS, Economides DL. 1999. The sonographic identification of fetal gender from 11 to 14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 13:301–304.
- Wright CF, Wei Y, Higgins JPT, Sagoo GS. 2012. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res Notes* [Internet] 5:476. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1186/1756-0500-5-476/fulltext.html>
- Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. 2002. Cell-free DNA: Measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta* 321:77–87.
- Xiao Yan Zhong, Holzgreve W, Hahn S. 2001. Risk free simultaneous prenatal identification of fetal Rhesus D status and sex by multiplex real-time PCR using cell free fetal DNA in maternal plasma. *Swiss Med Wkly* 131:70–74.
- Yee Ho SS, Barrett A, Thadani H, Asibal CL, Koay ESC, Choolani M. 2015. Application of real-time PCR of sex-independent insertion-deletion polymorphisms to determine fetal sex using cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Clin Chem Lab Med* 53:1189–1195.
- Youssef A, Arcangeli T, Radico D, Contro E, Guasina F, Bellussi F, Maroni E, Morselli-Labate AM, Farina A, Pilu G, Pelusi G, Ghi T. 2011. Accuracy of fetal gender determination in the first trimester using three-dimensional ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 37:557–561.

- Zákon České národní rady o umělém přerušení těhotenství - Zákony.cz. Zákony.cz - Právní poradna, smlouvy [online]. Copyright © 2018 Heagl, s.r.o. [cit. 10.08.2018]. Dostupné z: <http://www.zakony.cz/zakon-SB1986066>
- Zhang S, Sun K, Bian Y, Zhao Q, Wang Z, Ji C, Li C. 2015. Developmental validation of an X-Insertion/Deletion polymorphism panel and application in HAN population of China. *Sci Rep* [Internet] 5:1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep18336>
- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. 2000. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol* 107:766–769.
- Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, Ylikorkala O, Sibai BM, Holzgreve W, Hahn S. 2001. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 184:414–419.
- Zidkova A, Horinek A, Kebrdlova V, Korabecna M. 2013. Application of the new insertion-deletion polymorphism kit for forensic identification and parentage testing on the Czech population. *Int J Legal Med* 127:7–10.
- Zimmermann B, Hill M, Gemelos G, Demko Z, Banjevic M, Baner J, Ryan A, Sigurjonsson S, Chopra N, Dodd M, Levy B, Rabinowitz M. 2012. Noninvasive prenatal aneuploidy testing of chromosomes 13, 18, 21, X, and Y, using targeted sequencing of polymorphic loci. *Prenat Diagn.*