

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2021

Bc. Júlia Hurníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Kvantitatívne analýzy voľnej fetálnej
DNA v plazme tehotných žien
s využitím digitálnej PCR**

Diplomová práce

Bc. Júlia Hurníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2021

Vedoucí práce: doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Júlia HURNÍKOVÁ**
Osobní číslo: **R190611**
Studijní program: **N1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Kvantitativní analýzy volné fetální DNA v plazmě těhotných žen s využitím digitální PCR**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat přehled současných možností extrakce cell free fetal DNA (cffDNA) a prenatální diagnostických postupů cffDNA pomocí digitální PCR.
2. Vypracovat *in silico* optimální postup extrakce cffDNA vhodný a aplikovatelný pro klinické využití v DNA laboratoriu na ULG FN Olomouc.
3. Zavést a optimalizovat zvolené izolační postupy a pomocí droplet digitální PCR posoudit množství fetální frakce.
4. Na základě výsledků navrhnout izolační strategii vhodnou pro následnou neinvazivní prenatální diagnostiku fetomaternální inkompatibility krvních skupin a nejčastějších aneuploidií pomocí cffDNA.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

1. D'Aversa E, Breveglieri G, Pellegatti P, Guerra G, Gambari R, Borgatti M. Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR. *Molecular Medicine* 2018
2. Xu P, Zou Y, Li J, Huang S, Gao M, Kang R, Xie H, Wang L, Yan J, Gao Y. Application of droplet digital PCR for non-invasive prenatal diagnosis of single gene disease in two families. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2018: 224-227
3. Orhant L, Rondeau S, Vasson A, Anselem O, Goffinet F, Allach El Khattabi L, Leturcq F, Vidaud D, Bienvu T, Tsatsaris V, Nectoux J. Droplet digital PCR, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the determination of fetal RHD genotype. *Annales de Biologie Clinique (Paris)* 2016: 269-277
4. El Khattabi LA, Rouillac-Le Sciellour C, Le Tessier D, Luscan A, Coustier A, Porcher R, Bhourri R, Nectoux J, Sérazin V, Quibel T, Mandelbrot L, Tsatsaris V, Vialard F, Dupont JM. Could Digital PCR Be an Alternative as a Non-Invasive Prenatal Test for Trisomy 21: A Proof of Concept Study. *PLoS One* 2016
5. Manokhina I, Singh TK, Penaherrera MS, Robinson WP. Quantification of cell-free DNA in normal and complicated pregnancies: overcoming biological and technical issues. *PLoS One* 2014

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D.**
FN – Ústav lékařské genetiky



Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Júlia Hurníková

Název práce: Kvantitatívne analýzy voľnej fetálnej DNA v plazme tehotných žien s využitím digitálnej PCR

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UPOL

Vedoucí práce: doc. Mgr. Radek Vodička Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Klíčová slova: cffDNA, NIPT, ddPCR, obohatenie cffDNA, kvantifikácia fetálnej frakcie

Počet stran: 54

Počet příloh: 2

Jazyk: slovenský

SÚHRN

Diplomová práca bola zameraná na optimalizáciu krokov, ktoré predchádzajú analýze voľnej fetálnej DNA v rámci prenatalnej diagnostiky. Cieľom práce bolo otestovať dva izolačné postupy a tri rôzne metódy obohatenia voľnej fetálnej DNA, za účelom získania čo najvyššieho výťažku fetálnej frakcie. Dostatočný podiel fetálnej frakcie je kľúčový pri neinvazívnom prenatalnom testovaní, ktoré využíva ako vstupný biologický materiál krvnú plazmu matky.

V experimentálnej časti predloženej diplomovej práce bola analyzovaná voľná bunková DNA celkom z 50 vzoriek krvnej plazmy tehotných žien. Izolovaná DNA bola ďalej upravovaná metódami pre zvýšenie výťažku voľnej fetálnej DNA. Prvou obohacovacou metódou bola gélová elektroforéza, druhou metódou bola separácia na magnetických guľôčkach a treťou testovanou metódou bola amplifikácia vybranej dĺžky fragmentov. Výsledky všetkých postupov boli analyzované s použitím digitálnej kvapôčkovej polymerázovej reťazovej reakcie.

Najlepšie výsledky boli dosiahnuté použitím obohacovacej metódy založenej na separácii na magnetických guľôčkach. Priemerný výťažok fetálnej frakcie bol 9,89 %, čo bolo o 2,42 % viac ako vo vzorkách bez obohatenia. Druhou najslubnejšou metódou bolo obohatenie na základe gélovej elektroforézy, kde bola dosiahnutá

priemerná fetálna frakcia 8,54 %. Obohatenie pomocou amplifikácie vybranej dĺžky fragmentov bolo vyhodnotené ako nevyhovujúce kvôli vysokým smerodajným odchýlkam medzi jednotlivými vzorkami a nízkemu množstvu molekúl fetálneho pôvodu.

Obohacovacia metóda využívajúca separáciu na magnetických guľôčkach je podľa výsledkov práce vhodná na úpravu vzoriek izolovanej voľnej bunkovej DNA pre následnú neinvazívnu prenatalnú diagnostiku a predstavuje vhodný diagnostický nástroj pre použitie v klinickej praxi.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Júlia Hurníková

Title: Quantitative analyses of free fetal DNA in maternal plasma by means of digital PCR

Type of thesis: master

Department: Department of Cell biology and Genetics, PŘF UPOL

Supervisor: doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Keywords: cffDNA, NIPT, ddPCR, cffDNA enrichment, quantification of fetal fraction

Number of pages: 54

Number of appendices: 2

Language: slovak

SUMMARY

The master thesis was focused on the optimization of the steps that precede the analysis of free fetal DNA in the prenatal diagnosis. The work aimed to test two isolation approaches and three different methods of free fetal DNA enrichment, to obtain the highest possible yield of fetal fraction. Sufficient fetal fraction is crucial in non-invasive prenatal testing, which uses maternal blood plasma as biological material.

In the experimental part of the presented master thesis, cell free DNA was analyzed from 50 blood plasma samples of pregnant women. The isolated DNA was further modified to increase the yield of free fetal DNA. The first enrichment method was gel electrophoresis, the second method was magnetic bead separation, and the third method tested was the amplification of a selected fragment length. The results of all procedures were analyzed using a digital droplet polymerase chain reaction.

The best results were obtained using the enrichment method based on separation on magnetic beads. The average yield of the fetal fraction was 9.89%, which was 2.42% more than in the samples without enrichment. The second most promising method was enrichment based on gel electrophoresis, where an average fetal fraction of 8.54% was achieved. Enrichment by amplification of a selected fragment length was evaluated as unsatisfactory due to high standard deviations between samples and a low number of molecules of fetal origin.

According to the results of the work, the enrichment method using separation on magnetic beads is suitable for the preparation of cell free DNA isolated for subsequent non-invasive prenatal diagnosis and represents a suitable diagnostic tool for use in clinical practice.

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, pod vedením doc. Mgr. Radka Vodičku, Ph.D., s pomocou odborných konzultácií s Mgr. Janou Böhmovou a s použitím zdrojov uvedených v závere práce.

V Olomouci dňa.....

Podpis:.....

Pod'akovanie:

Chcela by som sa poďakovať svojmu školiteľovi doc. Mgr. Radkovi Vodičkovi, Ph.D. za odborné vedenie práce. Moje poďakovanie taktiež patrí Mgr. Jane Böhmovej, za pomoc pri spracovaní experimentálnej časti a Ústavu lekárskej genetiky za možnosť využívať ich laboratóriá. V neposlednom rade som vďačná svojej rodine za podporu pri spracovaní práce.

OBSAH

1 ÚVOD.....	1
2 CIELE PRÁCE	2
3 LITERÁRNY PREHĽAD	3
3.1 Prenatálna diagnostika	3
3.2 Metódy prenatálnej diagnostiky	3
3.2.1 Invazívne techniky.....	3
3.2.2 Metódy neinvazívnej prenatálnej diagnostiky	5
3.2 Mimobunková DNA – cfDNA.....	8
3.2.1 Pôvod.....	8
3.2.2 Spôsoby izolácie cfDNA	9
3.2.3 Aplikácia a potenciál cfDNA	10
3.3 Metódy analýzy cfDNA.....	13
3.3.1 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (qPCR).....	13
3.3.2 Masívne paralelné sekvenovanie (MPS)	14
3.3.3 Digitálna kvapôčková polymerázová reťazová reakcie (ddPCR)	14
4 MATERIÁL A METÓDY	16
4.1 Biologický materiál	16
4.2 Použité chemikálie, súbavy a roztoky.....	16
4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	17
4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	19
4.4.1 Izolácia cfDNA pomocou kitu.....	19
4.4.2 Izolácia cfDNA pomocou automatu	20
4.4.3 Meranie koncentrácie DNA.....	20
4.4.4 Obohatenie fetálnej frakcie pomocou magnetických guľôčok.....	21
4.4.5 Obohatenie fetálnej frakcie pomocou gélovej elektroforézy.....	21

4.4.6 Obohatenie fetálnej frakcie pomocou amplifikácie vybranej dĺžky fragmentov	22
4.4.7 ddPCR.....	27
4.4.7 Štatistická analýza	28
5 VÝSLEDKY	29
6 DISKUSIA.....	41
7 ZÁVER	46
8 LITERATÚRA	47
9 PRÍLOHY	54

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Schéma amniocentézy.

Obr. 2: Schéma uvoľnenia tDNA do krvného obehu.

Obr. 3: Schéma uvoľnenia cfDNA do krvi matky.

Obr. 4: Schéma priebehu ddPCR.

Obr. 5: Ukážka výstupu z programu QuantaSoft - vzorka obohatená pomocou elektroforézy.

Obr. 6: Ukážka výstupu z programu QuantaSoft - vzorka obohatená pomocou elektroforézy.

ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Priemerné namerané hodnoty fetálnych frakcií a počtu kópií chromozómov X a Y prepočítané na 1 ml plazmy.

Graf 2: Hodnoty fetálnych frakcií v testovaných vzorkách získané jednotlivými metódami.

Graf 3: Počty kópií chromozómu X vo vzorkách po izolácii a obohatení testovanými metódami prepočítané na 1 ml plazmy.

Graf 4: Počty kópií chromozómu Y vo vzorkách po izolácii a obohatení testovanými vzorkami prepočítané na 1 ml plazmy.

Graf 5: Namerané fetálne frakcie pomocou jednotlivých metód v závislosti na gestačnom veku.

Graf 6: Namerané počty kópií chromozómov X, prepočítané na 1 ml krvnej plazmy, pomocou jednotlivých metód v závislosti na gestačnom veku.

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Sekvencie nadizajnovaných oligonukleotidov.

Tabuľka 2: Pipetované objemy na prípravu premixu pre ligáciu linkerov.

Tabuľka 3: Pipetované objemy na prípravu premixu pre PCR.

Tabuľka 4: Teplotné programy použité pri univerzálnej PCR.

Tabuľka 5: Pipetované objemy na prípravu premixu pre ddPCR.

Tabuľka 6: Teplotné programy použité pri ddPCR.

Tabuľka 7: Korelácie jednotlivých metód pri meraní fetálnej frakcie.

Tabuľka 8: Korelácie jednotlivých metód pri meraní počtu kópií chromozómov X prepočítaných na 1 ml plazmy.

Tabuľka 9: Korelácie jednotlivých metód pri meraní počtu kópií chromozómov Y prepočítaných na 1 ml plazmy.

1 ÚVOD

Prenatálna diagnostika predstavuje multidisciplinárny odbor prístupov zameraných na stanovenie odchýlok vo vývoji plodu. Hlavnou výhodou je včasné upovedomenie lekárov aj rodičov o prípadnej vývojovej chybe plodu a následné nastavenie liečby, či zavedenie iných opatrení. V dnešnej dobe sa bežne vykonáva prenatálny screening tehotných žien, ktorého cieľom je výpočet rizika chromozómových aberácií, vrodenných vývojových chýb a defektov. V prípade pozitívnych výsledkov nasledujú špecifické vyšetrenia, ako odber chóriových klkov a amniocentéza. Tieto metódy sú však invazívne a nesú riziko potratu. V ostatných rokoch sa začala rozvíjať metóda využívajúca voľnú fetálnu DNA (cffDNA) odvodenú z trofoblastov. Táto cffDNA cirkuluje v krvi matky spolu s voľnou DNA z buniek matky. Schopnosť detegovať a kvantifikovať cffDNA z periférnej krvi matky priniesla možnosť nového neinvazívneho spôsobu prenatálnej diagnostiky – neinvazívne prenatálne testovanie (NIPT). Tento prístup umožňuje diagnostiku aneuploidií, monogénnych chorôb a včasné určenie pohlavia či RhD faktoru.

Veľmi malé množstvo cffDNA v materskej plazme predstavuje zásadný diagnostický problém, preto sú na jej izoláciu a detekciu potrebné špecifické a optimalizované techniky. Voľná fetálna DNA je navyše zmiešaná s materskou, ktorá sa v krvnom obehú nachádza v oveľa vyššej koncentrácii. Táto skutočnosť komplikuje získavanie výsledkov a vyžaduje rozlíšenie pozadia tvoreného materskou voľnou DNA od sledovanej cffDNA. Aby mohla byť NIPT metóda využívaná čo najefektívnejšie a v širšej miere, je potrebné nájsť vyhovujúcu metódu obohatenia cffDNA pre získanie spoľahlivejších výsledkov, aj napriek malému vstupnému množstvu vzorky.

V súčasnosti sa používajú dve základné metódy na absolútnu kvantifikáciu cffDNA: real-time kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (qPCR) a digitálna kvapôčková PCR (ddPCR). Do popredia sa dostáva práve druhá metóda, ktorej výhodou je detekcia cieľových kópií DNA s vysokou citlivosťou. Predkladaná diplomová práca sa venuje práve porovnaniu obohacovacích metód cffDNA s využitím ddPCR na ich analýzu.

2 CIELE PRÁCE

- Vypracovať prehľad súčasných možností extrakcie cell-free fetal DNA (cffDNA) a prenatalne diagnostických postupov cffDNA pomocou digitálnej PCR.
- Vypracovať *in silico* optimálny postup extrakcie cffDNA vhodný a aplikovateľný pre klinické využitie v DNA laboratóriu na ULG FN Olomouc.
- Zaviesť a optimalizovať zvolené izolačné a obohacujúce postupy, a pomocou droplet digitálnej PCR posúdiť množstvo fetálnej frakcie.
- Na základe výsledkov navrhnúť izolačnú stratégiu vhodnú pre následnú neinvazívnu prenatalnu diagnostiku fetomaternálnej inkompatibility krvných skupín a najčastejších aneuploidií pomocou cffDNA.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Prenatálna diagnostika

Prenatálna diagnostika predstavuje multidisciplinárny diagnostický prístup zameraný na stanovenie odchýlok vo vývoji fetu. Bez poznatkov získaných prenatálnou diagnostikou by mohli neodhalené genetické anomálie viesť k nepriaznivým výsledkom tehotenstva, keďže vrodené poruchy plodu sú príčinou 20-25 % úmrtí v prenatálnom veku (Levy a Stosic, 2019). Vďaka prenatálnej diagnostike je možné včas odhaliť problémy v tehotenstve a pripraviť sa tak na ďalší jeho priebeh, či v prípade porúch nezlučiteľných so životom, na jeho predčasné ukončenie. Výsledky prenatálneho testovania okrem iného umožňujú poskytnúť párom pred narodením postihnutého dieťaťa optimálnu voľbu postupov z hľadiska psychologickéj prípravy, starostlivosti o graviditu, vedenia pôrodu a postnatálnej starostlivosti (Wilson a kol., 2015).

3.2 Metódy prenatálnej diagnostiky

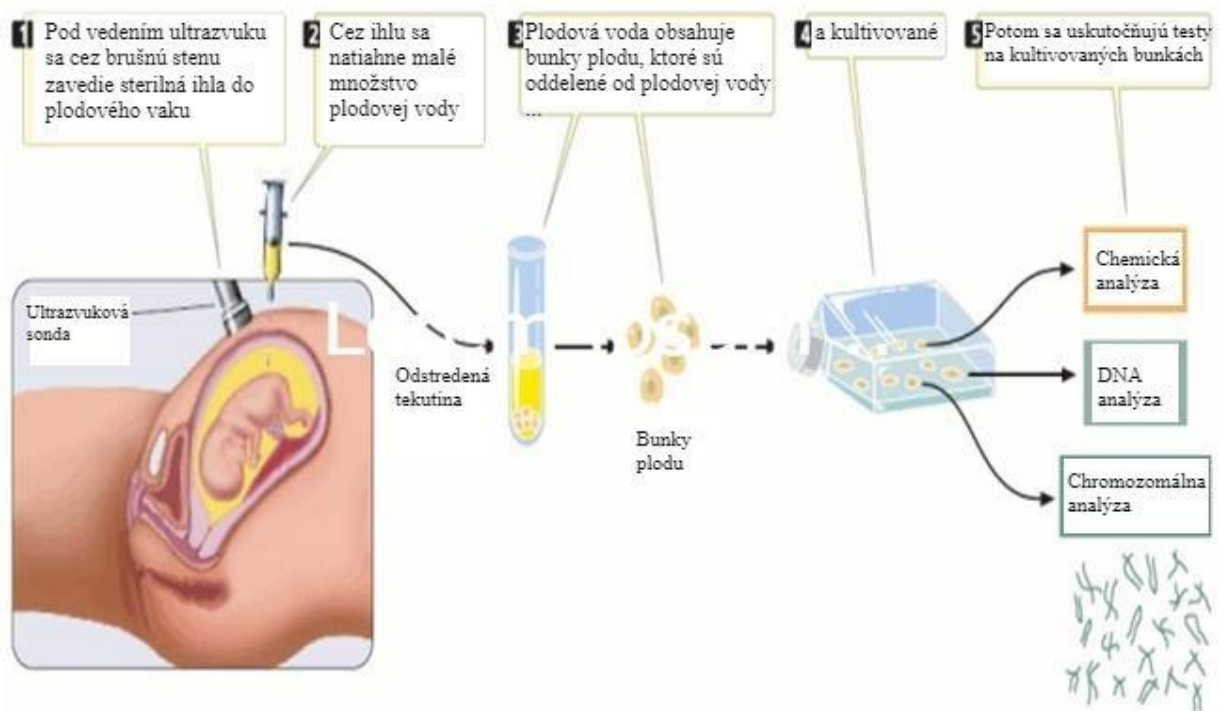
Prenatálna diagnostika využíva na stanovenie stavu a zdravia plodu rôzne techniky, ktoré sa podľa spôsobu získania vzoriek radia do dvoch skupín, a to na invazívne a neinvazívne techniky. Pri invazívnych technikách sú výsledky získavané analýzou tkanív súvisiacich s graviditou. Neinvazívne techniky využívajú krvné sérum matky, v ktorom cirkuluje voľná DNA (cfDNA). Pri invazívnych metódach existuje, síce minimálne, ale riziko spontánneho potratu, a preto je v súčasnej dobe snaha o ich minimalizáciu a nahradenie neinvazívnymi metódami (Carlson a Vora, 2017).

3.2.1 Invazívne techniky

3.2.1.1 Amniocentéza

Amniocentéza patrí medzi invazívne metódy prenatálnej diagnostiky, kedy sa do plodového vaku zavedie sterilná ihla a odoberie sa plodová voda (Obr. 1). Celý proces sa kontroluje pomocou ultrazvuku. V odobratej plodovej vode sa nachádzajú bunky plodu z tráviaceho a vylučovacieho traktu a bunky kože. Tieto bunky sú následne kultivované v médiu, kde dochádza k bunkovému deleniu, ktoré umožňuje štúdium metafázných chromozómov (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology, 2021). Amniocentéza sa môže vykonávať v ktoromkoľvek gestačnom veku po pätnástom týždni. Okrem hodnotenia genetických porúch sa táto metóda používa aj na overenie prítomnosti intraamniotickej či fetálnej infekcie, alebo aj na zistenie defektov neurálnej trubice meraním α -fetoproteínu a acetylcholinesterázy

v plodovej vode (Carlson a Vora, 2017). Komplikácie sú bežnejšie v skoršom gestačnom veku. Štúdie preukázali zvýšený úbytok plodovej vody ak sa amniocentéza uskutočnila pred dvanástym gestačným týždňom. Incidencia potratov spôsobených amniocentézou je podľa posledných odhadov približne 1 z 900 (Akolekar a kol., 2015).



Obr. 1: Schéma amniocentézy (prevzaté a upravené z www.forumzdravi.cz)

3.2.1.2 Odber chóriových klkov

Odber chóriových klkov sa môže vykonávať transcervikálnym alebo transabdominálnym prístupom. Pri oboch spôsoboch sa chóriové klky odoberajú pod kontrolou pomocou ultrazvuku bez vstupu do plodového vaku. Táto invazívna diagnostická metóda je jedinou dostupnou v prvom trimestri a umožňuje rovnaké diagnostické analýzy ako amniocentéza, vrátane fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH), karyotypizácie, microarrayí, molekulárneho testovania a sekvenovania génov. Odber chóriových klkov sa vykonáva medzi desiatym a štrnástym týždňom tehotenstva, keďže v minulosti sa preukázalo zvýšené riziko deformácie končatín plodu pri odberoch v skoršom štádiu tehotenstva. Táto metóda umožňuje skoršiu prenatalnú diagnostiku, čím skracuje čas neistoty a poskytuje včasnejšie, a teda bezpečnejšie ukončenie tehotenstva, ak je to potrebné. Nevýhodou tohto prístupu je možná nesprávna interpretácia výsledkov, keďže približne 1-2 %

výsledkov môžu odrážať skôr obmedzený placentárny mozaicizmus ako skutočné chromozomálne abnormality plodu (Carlson a Vora, 2017). Podľa najnovších odhadov dôjde k potratu po odobratí chóriových klkov približne v jednom zo 455 prípadov (Akolekar a kol., 2015).

3.2.1.3 Kordocentéza

Pri kordocentéze sa získava fetálna krv z pupočnej šnúry pod kontrolou ultrazvukom. Je to jednoduchý, rýchly a efektívny spôsob odberu vzoriek fetálnej krvi, ktorý sa používa ako rozhodujúci pri hodnotení vybraných stavov plodu, keď zlyhali iné invazívne prenatálne zákroky (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology, 2021). Kordocentéza sa môže vykonávať na konci druhého trimestra, ak je potrebné urgentne potvrdiť diagnózu, pretože tento postup umožňuje rýchlu chromozomálnu analýzu lymfocytov. Toto invazívne vyšetrenie je však spojené s asi 1–2% rizikom možných komplikácií, ktoré môžu niekedy skončiť aj samovoľným potratom. Preto sa voľba takého vyšetrenia musí starostlivo zvážiť zo strany lekárov aj rodičov (Can a kol., 2006).

3.2.1.4 Fetoskopia

Fetoskopia je ultrazvukový endoskopický zákrok, ktorý sa vykonáva transabdominálne v lokálnej anestéze. Je to technika, ktorá umožňuje vizualizovať plod koncom druhého trimestra zavedením trubice s optickými vláknami (fetoskopu) do maternice (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology, 2021). Poskytuje prístup k plodu v prípade diagnostických indikácií, ako sú odber krvi či tkanív, a pre terapeutické účely. Riziko potratu po fetoskopii je relatívne vysoké a pohybuje sa v rozmedzí 3–10%. Z bezpečnostných dôvodov preto táto invazívna technika nie je rutinným zákrokom a používa sa zriedka (Rodeck a Nicolaides, 1986).

3.2.2 Metódy neinvazívnej prenatálnej diagnostiky

3.2.2.1 Kombinovaný prvotrimestrálny skríning

Skríning v prvom trimestri je bežne používaným testom, ktorý zahŕňa kombináciu testovania krvného séra a ultrasonografického vyšetrenia nuchálnej translucencie. Vykonáva sa medzi desiatym a trinástym týždňom tehotenstva a ponúka včasné informácie o riziku chromozomálnych aneuploidií plodu, či o anatomických defektoch. Sledujú sa hladiny markerov v krvnom sére matky, a to konkrétne hCG (human chorionic gonadotropin) a PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein)

(Driscoll a Gross, 2008). Pri odhade rizika sa zohľadňuje vek matky, anamnéza tehotenstva, počet plodov v súčasnej gravidite, sérové markery a meranie nuchálnej translucencie. Niektoré odhady tiež zahŕňajú prítomnosť alebo neprítomnosť nosovej kosti. Tento odhad rizika je potom vyjadrený ako pomer, podľa ktorého sa rozhoduje o ďalšom postupe. Výhody screeningu v prvom trimestri zahŕňajú skorý gestačný vek, v ktorom sú dostupné výsledky, čo pacientom a lekárom poskytuje dostatok času na interpretáciu výstupov a rozhodovanie o ďalšej starostlivosti o tehotenstvo, vrátane vykonania viacerých diagnostických testov, konzultácie s genetickým poradcom či ukončenia tehotenstva, ak je to žiaduce (Carlson a Vora, 2017).

3.2.2.2 Ultrazvuk

Vyšetrenie pomocou ultrazvuku je neinvazívny zákrok bezpečný pre matku aj plod. Vysokofrekvenčné zvukové vlny sa používajú na produkciu viditeľných obrazov zo vzorov odozvy, ktoré sú vytvárané rôznymi tkanivami a orgánmi, vrátane plodu v amniotickej dutine. Vytvárajúce sa embryo je možné vizualizovať najskôr v šiestom týždni tehotenstva (Carlson a Vora, 2017).

Pri ultrazukovom vyšetrení v prvom trimestri sa sleduje dĺžka vzdialenosti od temena po kostrč plodu (CRL–crown rump length). Tento parameter udáva veľmi presný údaj o dĺžke tehotenstva a predpokladanom termíne pôrodu. Ďalej sa sleduje biparietálny priemer hlavy (BPD–biparietal diameter), ktorý sa spolu s inými ukazovateľmi využíva na zistenie asymetrického rastu plodu. V prvom trimestri sa hodnotí aj vitalita embrya záchytením srdcovej činnosti plodu a overuje sa lokalizácia tehotenstva. V druhom trimestri sa pridávajú parametre ako obvod brucha (AC–abdominal circumference), dĺžka stehennej kosti (FL–femur length), hodnotenie nosových kostí a hodnotenie prietoku krvi na trikuspidálnej chlopni. Pozorované sú už aj jednotlivé orgánové sústavy a kostra. Pre rozlíšenie abnormalít hlavných vnútorných orgánov a končatín je najlepšie vykonať ultrazukové vyšetrenie medzi 16 až 20 týždňom tehotenstva. V treťom trimestri sa pridáva meranie obvodu hlavy (HC–head circumference) a sledujú sa parametre súvisiace s pôrodom, ako uloženie plodu a placenty, či množstvo plodovej vody (Radiopaedia, 2021; Sonek a Nicolaidis, 2010).

Primárnou funkciou ultrazvuku v pôrodníckej starostlivosti je potvrdenie datovania a sledovanie vrodených chýb. Použitie ultrazvuku je užitočné i na určenie veľkosti a polohy plodu aj placenty, množstva plodovej vody a približnej anatómie

plodu. Táto metóda má však aj isté obmedzenia, keďže nedokáže zachytiť drobné abnormality (Carlson a Vora, 2017; The internet pathology laboratory for medical education, 2021).

3.2.2.3 Vyšetrenie biochemických markerov

Prvý biochemický skríning sa realizuje medzi 11–13 týždňom tehotenstva. Sleduje sa plazmatická koncentrácia proteínu PAPP-A a fβhCG (free β human chorionic gonadotropin). V druhom trimestri sa pridávajú ďalšie tri sledované parametre: hladina AFP (alfa-fetoproteín), thCG (total human chorionic gonadotropin) a nekonjugovaného estriolu (uE3). Pri quadruple teste sa navyše meria inhibín A. Zvýšené hodnoty AFP sú markerom vrodených vád nekrytých kožou, ako napríklad rázštep chrbtice. Znížené hodnoty AFP v spojení so zvýšenou hladinou hCG sú naopak charakteristické pre plody s Downovým syndrómom. Množstvo nekonjugovaného estriolu v sére matky závisí od životaschopnosti plodu, správne fungujúcej placenty a dobrého stavu matky. Zvýšená hladina inhibínu A je spojená s nárastom rizika trizómie chromozómu 21. Tieto merania hladiny proteínov sa kombinujú s údajmi o veku matky, rase, hmotnosti a gestačnom veku, aby sa získal odhad rizika (Carlson a Vora 2017; Gordon a Langaker 2020).

3.2.2.4 Neinvazívne prenatálne testovanie (NIPT)

Neinvazívne prenatálne testovanie, tiež známe ako testovanie mimobunkovej DNA plodu (cffDNA), je dôležitým doplnkom k rade skríningových testov na chromozomálne abnormality plodu. Najmä pri trizómii chromozómu 21 je NIPT spoľahlivejšie ako iné spôsoby skríningu. Mimobunková fetálna DNA je v krvi matky detekovateľná od 4. gestačného týždňa a mizne z cirkulácie po pôrode. Medzi ďalšie výhody využitia cfDNA patrí možnosť presnej identifikácie pohlavia plodu a určenie Rh faktoru plodu u tehotenstiev s rizikom Rh-izoimunizácie. Neinvazívne prenatálne testovanie vo všeobecnosti skúma podiel cfDNA odvodenej od špecifických chromozómov. Aneuploidia plodu môže spôsobiť odchýlku týchto proporcií od očakávaných hodnôt. Keďže väčšina cfDNA je materská, možnosť detegovať abnormality daného fetálneho chromozómu si vyžaduje dostatok fetálnej frakcie. Mnoho NIPT testov má preto stanovenú hraničnú cut-off hodnotu a vzorky s fetálnou frakciou pod definovanou hraničnou hodnotou neprinášajú žiadny výsledok. Hlavnou nevýhodou NIPT je teda závislosť na dostatočnej fetálnej frakcii (> 4 %), ktorej

zastúpenie stúpa s gestačným vekom a naopak klesá u obéznych matiek (Carlson a Vora, 2017; Harraway, 2017).

3.2 Mimobunková DNA – cfDNA

3.2.1 Pôvod

Existencia cirkulujúcej mimobunkovej DNA bola prvýkrát zaznamenaná v roku 1948 Matelom a Métaisom, ktorí dokázali prítomnosť voľnej nukleovej kyseliny v krvnej plazme zdravých subjektov. Táto cfDNA predstavuje dvojlákové fragmenty kyseliny deoxynukleotidovej, ktoré sú charakterizované približnou dĺžkou do 200 bp, nízkou molekulovou hmotnosťou a nízkou koncentráciou (Fleischhacker a Schmidt, 2007). Voľne cirkulujúca DNA je prítomná v komponentoch krvi bez buniek, ako sú plazma a sérum. Jej výskyt bol zistený aj v iných telesných tekutinách, kde vytvára komplexy s proteínmi alebo membránovo-viazané štruktúry. Hoci funkcia cfDNA a jej zdroj stále nie sú úplne známe, existujú rôzne dohady o pôvode a možných mechanizmoch uvoľňovania cfDNA (Stroun a kol., 2000; Stroun a kol., 2001).

Najpodporovanejšia hypotéza pre cirkuláciu cfDNA v plazme zdravých subjektov predpokladá, že cfDNA by mohla byť odvodená primárne z apoptózy normálnych hematopoetických buniek alebo ďalších buniek s jadrom, ktoré sú vo fyziologických podmienkach odstraňované infiltráciou fagocytov. Niekoľko vlastností cfDNA potvrdzuje túto hypotézu: jej rýchly obrat a krátky výskyt v obehu podporujú model uvoľnenia z apoptických buniek s následnou rýchlo degradáciou alebo filtráciou (Nagata, 2005; Snyder a kol., 2016).

V súčasnosti existuje domnienka, že apoptóza a nekróza nie sú jedinými mechanizmami zodpovednými za prítomnosť cfDNA v krvnom obehu. Zdá sa, že lymfocyty a mnoho iných typov živých buniek môžu spontánne uvoľniť novo syntetizovanú DNA. To by mohlo naznačovať rolu cfDNA v normálnom fungovaní buniek alebo účasť na akejsi aktívnej komunikácii medzi bunkami prostredníctvom uvoľňovania nukleových kyselín ako medzibunkovej signalizačnej dráhy. Nedávne dôkazy z rôznych oblastí indikujú aktívnu obchodovanie výmenu nukleovej kyseliny medzi bunkami cez prenášacie mechanizmy na bunkovej membráne počas vývoja, epigenetickej remodelácie, regenerácie tkanív a doladovania imunitného systému (Ho, 2009; Gardiner a kol., 2015).

Zdroje cfDNA a jej funkcie sa môžu líšiť v závislosti od rôznych fyziologických a patologických podmienok. cfDNA je väčšinou uvoľňovaná do obehu patologickými mechanizmami. Zvýšená koncentrácia cfDNA bola zaznamenaná v krvnej plazme alebo sére pacientov s rôznymi ochoreniami, ako infarkt, trauma, rôzne druhy rakoviny. Aj keď plazmová a sérová cfDNA sú charakterizované najlepšie, cfDNA je možné nájsť aj v iných telesných tekutinách ako je moč či mozgovomiechový mok (Martignano, 2019; Ranucci, 2019).

3.2.2 Spôsoby izolácie cfDNA

Prvým povinným krokom cfDNA analýzy je centrifugácia vzorky. V tomto kroku dôjde k precipitácii bunkových komponentov, ktorých genomická DNA spôsobuje kontamináciu. Centrifugácia vzorky umožňuje zber supernatantu, ktorý je bez buniek (napr. plazma), čím sa redukuje kontaminácia genomickou DNA. Optimálne podmienky centrifugácie závisia od typu biologickej tekutiny. Keďže pre analýzu cfDNA je majoritne odporúčaná krvná plazma, nasledujúci text bude sústredený na postup pri práci so vzorkami krvi (Page a kol., 2013).

Po centrifugácii je možné plazmu dlhodobo skladovať v hlbokomraziacom boxe pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, uskladnenie trvajúce až 1 rok však môže zvýšiť degradáciu cfDNA o 30 %. Uloženie v hlbokomraziacom boxe pred centrifugáciou sa neodporúča, nakoľko zmrazenie celej krvi spôsobuje lýzu buniek a následnú kontamináciu genomickou DNA (Sozzi a kol., 2005; Bronkhorst a kol., 2015).

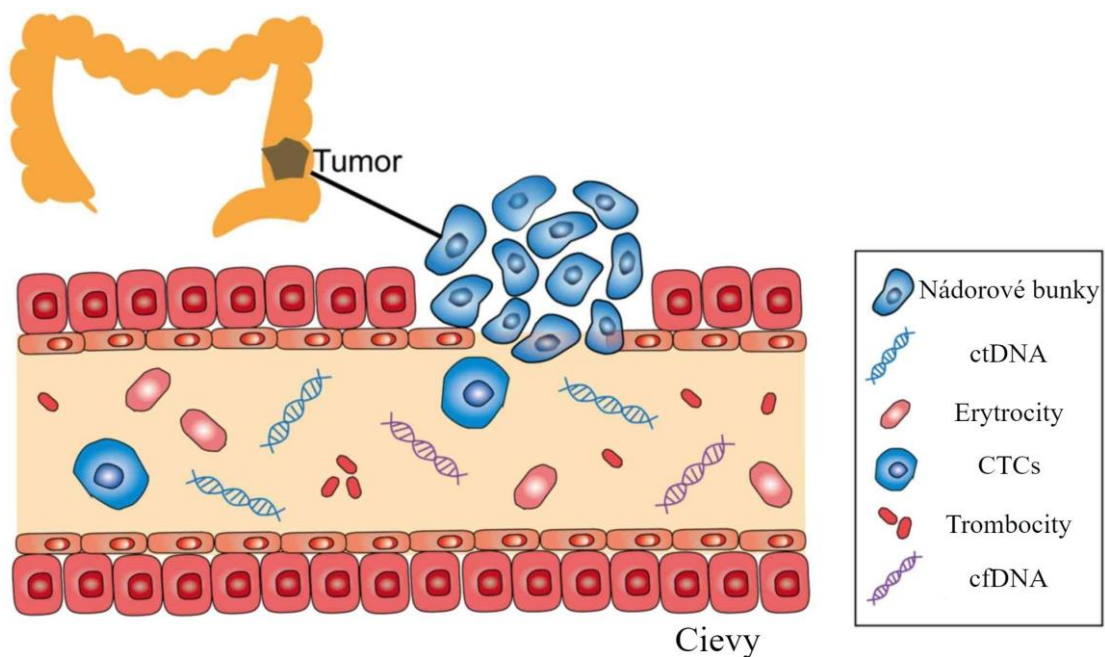
V súčasnosti je dostupných mnoho komerčne dostupných kitov na izoláciu cfDNA z plazmy. Podľa spôsobu seprácie sú rozdelené do dvoch hlavných kategórií, a to kity založené na kolónkach a kity založené na magnetických guľôčkach. Kolónkový prístup je založený na využití spinových kolóniek s kremičitou maticou schopnou naviazať DNA fragmenty počas prechodu plazmy kolónkou a následnom vymývaní, zaručujúcim odstránenie kontaminantov, ktoré sa vykonáva vo vákuovej pumpe alebo minicentrifúge. Druhý spôsob izolácie využíva magnetické guľôčky schopné viazať nukleové kyseliny, ktoré je následne možné získať pomocou magnetu bez potreby centrifugácie, čím sa znižuje riziko poškodenia DNA v dôsledku pôsobenia trecích síl. Je dôležité brať do úvahy malú veľkosť fragmentov cfDNA a podľa toho zvoliť správny protokol (Ali a kol., 2017; Sorber a kol., 2017).

3.2.3 Aplikácia a potenciál cfDNA

V ostatných rokoch rastie medicínsky význam cfDNA s ohľadom na jej spojitosť s niektorými ľudskými poruchami a jej klinické využitie ako neinvazívneho, presného a citlivého biomarkera je v centre aktívneho výskumu.

3.2.3.1 cfDNA a rakovina

Už desaťročia je známe, že cfDNA je vo vysokých koncentráciách prítomná v krvi pacientov s rakovinou. Cirkulujúca tumorová DNA (ctDNA) reprezentuje iba malú frakciu (< 1 %) celkovej cfDNA a pochádza z primárnych tumorov, cirkulujúcich tumorových buniek (CTCs), mikrometastáz alebo metastáz (Stroun a kol., 2001) (Obr. 2). Niekoľko prác potvrdilo, že ctDNA obsahuje špecifické zmeny súvisiace s nádorom, ako sú bodové mutácie, amplifikácie a zmeny v metylácii, ktoré pôsobia ako cirkulujúci obraz špecifického ochorenia a môžu slúžiť ako určitý druh tekutej biopsie, prostredníctvom ktorej je možné zrekonštruovať stav nádorového genómu (Salvi a kol., 2016).



Obr. 2: Schéma uvoľnenia ctDNA do krvného obehu (prevzaté a upravené z publikácie Li a kol., 2018)

Zvyšujúci sa záujem o ctDNA je spôsobený jej potenciálnym využitím ako tekutej biopsie, ktorá je veľmi sľubná v širokej škále klinických aplikácií, od neinvazívnej včasnej diagnostiky, po prognózu, detekciu minimálneho reziduálneho

ochorenia a predikciu odpovede na liečbu rakoviny (Heitzer a kol., 2015; Ulrich a Cloud, 2018). Aj keď chirurgická biopsia je stále zlatým štandardom pre diagnostiku a výber liečby, nesie so sebou isté nevýhody. Okrem invazívneho získavania vzorky poskytuje iba statický a priestorovo obmedzený obraz choroby v momente vykonania chirurgického zákroku. Naopak, analýza ctDNA, okrem toho že je neinvazívna, rýchla a finančne nenáročná, umožňuje aj sledovanie priebehu rakoviny v reálnom čase a dokáže zachytiť heterogenitu nádoru (Domínguez-Vigil a kol., 2018).

Cirkulujúca tumorová DNA sa javí byť potenciálnym zdrojom biomarkerov pre rozličné typy rakoviny pri včasnej detekcii tumorov, hoci jej veľmi malé množstvo v krvnom obeh, ktoré si vyžaduje vysoko citlivé a reprodukovateľné metódy a jej variabilita medzi pacientmi limitujú využitie ctDNA v klinickej praxi. Sľubnou optimálnou aplikáciou by mohla byť kombinácia ctDNA detekcie s panelom konvenčných rakovinových markerov používaných v skriningových programoch (Salvi a kol., 2016; Ulrich a Cloud 2018).

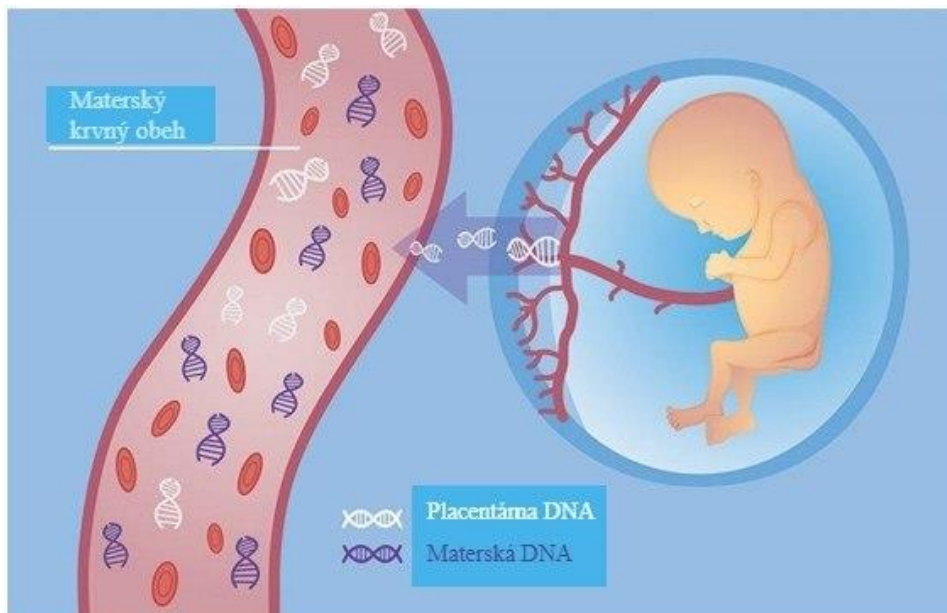
3.2.3.2 cfDNA v moči

Urinálna voľná DNA (ucfDNA) pochádza priamo z odumierajúcich buniek exfoliovaných v moči alebo z cirkulácie. Táto DNA by mohla byť dobrým zdrojom biomarkerov predovšetkým pre urologické typy rakoviny. Odber moču je dokonca menej invazívny ako odber krvi, sú ho dostupné veľké množstvá a môže byť pre monitorovanie vývoja choroby zbieraný rutinne (Lu a Li, 2017).

Nukleové kyseliny v moči sú kvôli zloženiu moču (DNA nukleázy, baktérie, variabilné pH) citlivejšie na degradáciu ako tie v krvi. Na základe pôvodu sa ucfDNA delí do troch kategórií: DNA z buniek močového traktu, transrenálna DNA a DNA pochádzajúca z baktérií a vírusov, ktoré napadli urogenitálnu sústavu (Burnham a kol., 2018). Niekoľko štúdií potvrdilo aj prítomnosť voľnej fetálnej DNA v moči matky. Ide o transrenálnu DNA, kedy časť cffDNA glomerulárnou filtráciou prestupuje bariéru obličiek, ktorá je priepustná pre krátke fragmenty DNA (Botezatu a kol., 2000). Detekcia fetálnej DNA v moči je však doposiaľ možná len s nízkou špecifitou, keďže je príliš degradovaná a jej fragmenty majú dĺžku iba 29–45 bp. Úloha ucfDNA v prenatalnej diagnostike genetických chorôb preto ostáva kontroverzná (Tsui a kol., 2012).

3.2.3.3 cfDNA v prenatalnej diagnostike

Jednou z oblastí, kde aplikácia cirkulujúcej cfDNA dosiahla najväčší úspech a využitie, je neinvazívne prenatálne testovanie (NIPT). Od plodu odvodené nukleové kyseliny v materskej plazme v priebehu tehotenstva boli po prvýkrát identifikované v roku 1997 (Lo a kol., 1997). Voľná fetálna DNA pochádza z placentárnych trofoblastov a k jej fragmentácii dochádza, keď sa mikročastice placenty vylučujú do krvného obehu matky (Obr. 3). Fragменты sú dlhé približne 200 bp a sú podstatne menšie ako fragmenty DNA matky. Voľná DNA cirkulujúca v krvi matky obsahuje zmes materskej a fetálnej DNA, kde fetálna frakcia zastupuje iba malé percento (11–13,4 %) z celkového množstva cfDNA. Množstvo cfDNA (cell free fetal DNA) rastie s gestačným vekom a priebehom tehotenstva (Chan a kol., 2004; Alberry a kol., 2007).



Obr. 3: Schéma uvoľnenia cfDNA do krvi matky (prevzaté a upravené z www.massivegenomics.co.ke)

Prvé klinické aplikácie mali veľký potenciál, ale obmedzili sa na identifikáciu alel prítomných v plode a nie v materskom genóme, ako sú paternálne zdedené alebo de novo mutácie. Tieto prístupy zahŕňali určenie pohlavia plodu a detekciu paternálne zdedených porúch jedného génu, ktoré sa dedia autozomálne dominantným spôsobom, ako je napríklad achondroplázia či svalová dystrofia (Lo a kol., 1997; Amicucci a kol., 2000; Chitty a kol., 2011). Stanovenie autozomálne recesívnych alebo maternálne

prenášaných autozomálne dominantných porúch bolo komplikovanejšie, hoci niekoľko štúdií bolo úspešných pri vylúčení otcovských alel v recesívnych podmienkach, ako napríklad cystická fibróza alebo β -talasémia (Chitty a Bianchi, 2013).

Vďaka neustálym pokrokom v technológiách sa perspektíva rapídne zmenila a aplikácie cffDNA priniesli do prenatalnej diagnostiky mnoho výhod. V súčasnosti sa v klinickej praxi vďaka jej spoľahlivosti a vysokej presnosti používa na stanovenie pohlavia, genotypizáciu systému RhD a systému krvných skupín plodu (Chitty a Bianchi, 2013). Okrem toho sa cffDNA používa na prenatalnú diagnostiku fetálnych aneuploidíí, vrátane trizómií, aneuploidíí pohlavných chromozómov a špecifických mikrodélií (Fiorentino a kol., 2017). Výhodami metód využívajúcich cffDNA sú teda neinvazívnosť, široká použiteľnosť a dostupnosť v ranom gestačnom veku. Hoci sa cffDNA považuje za výkonný skriningový nástroj, má niekoľko obmedzení. Pri detekcii aneuploidíí ju nemožno považovať za náhradu karyotypu, preto je súčasná detekcia aneuploidíí obmedzená na najbežnejšie trizómie. Okrem toho, použitie cffDNA na diagnostiku porúch viazaných na jeden gén a autozomálne recesívnych chorôb je zatiaľ iba v štádiu vývinu (Gerson a O'Brien, 2018).

3.3 Metódy analýzy cffDNA

3.3.1 Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase (qPCR)

qPCR je laboratórnou technológiou molekulárnej biológie, ktorá monitoruje amplifikáciu cieľovej molekuly DNA v priebehu PCR, teda v reálnom čase. Na detekciu produktov qPCR sa používajú dve metódy. Prvá metóda využíva nešpecifické fluorescenčné farbivá, ktoré interkalujú do akejkoľvek dvojvláknovej DNA. Druhou možnosťou je použitie sekvenčne špecifických DNA sond, zložených z oligonukleotidov značených fluorescenčným reportérom. Tento reportér je možné detegovať až po hybridizácii próby s komplementárnou sekvenciou (Bustin a kol., 2009; Logan a kol., 2009).

Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase je najbežnejšie používanou technológiou na kvantifikáciu fetálnej DNA v prípadoch, keď je plod mužského pohlavia. Analýza sa opiera o prítomnosť špecifických sekvencií pre chromozóm Y, ako je *SRY*. Pri rozšírení využitia tejto metódy aj na tehotenstvá s plodom ženského pohlavia sa výskum zameriava na paternálne dedené fetálne

jednonukleotidové polymorfizmy. Ďalšie nové postupy sa zase sústreďujú na odlišnú metyláciu materskej a fetálnej DNA (Manokhina a kol., 2014; Xu a kol., 2016) .

3.3.2 Masívne paralelné sekvenovanie (MPS)

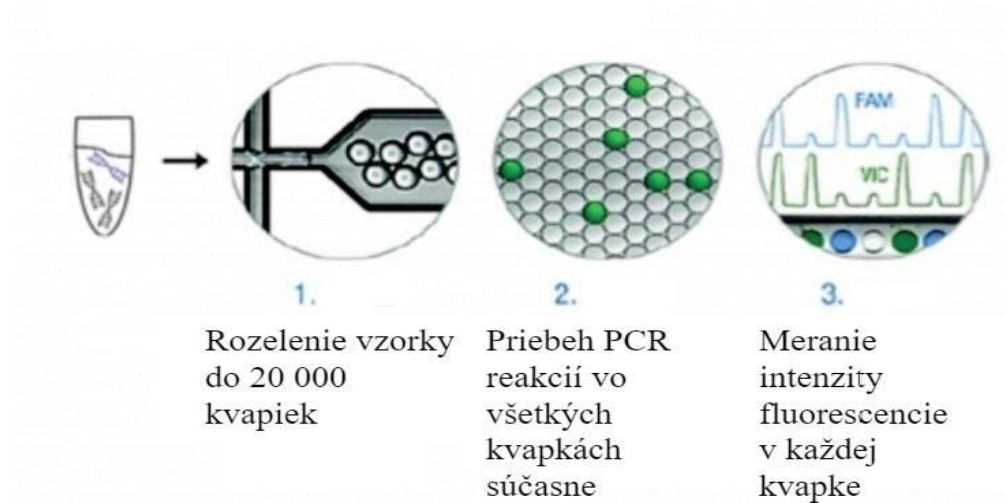
Všetky technológie masívneho paralelného sekvenovania sú založené na sekvenovaní veľkého množstva DNA templátov súčasne. Technológie prvej generácie MPS sa spoliehajú na prvú amplifikáciu jednotlivých templátov DNA pred určením sekvencie. MPS druhej generácie je založené na sekvenovaní jednotlivých molekúl DNA bez akejkoľvek amplifikácie pre zvýšenie intenzity signálu. Výhodou týchto technológií je, že sú schopné generovať čítania s dlhou sekvenciou. Rozsiahle dĺžky čítaní výrazne uľahčujú zostavovanie genómových sekvencií (Gao a Smith, 2020).

V porovnaní s technológiami s krátkym čítaním majú však dve kľúčové nevýhody: celkovú presnosť sekvencie a výstup sekvencie. Táto metóda sa využíva najmä na vyhľadávanie mutácií v jednotlivých lokusoch, molekulárnu karyotypizáciu či kvantitatívny odhad variability DNA kópií. Využitie však nachádza aj pri analýze fragmentovanej voľnej fetálnej DNA z maternálnej plazmy a je potenciálne použiteľná pre všetky tehotenstvá pri neinvazívnej prenatalnej diagnostike fetálnych chromozomálnych aneuploidí (Xu a kol., 2016).

3.3.3 Digitálna kvapôčková polymerázová reťazová reakcie (ddPCR)

ddPCR je digitálna metóda PCR využívajúca systém kvapiek s emulziou vody a oleja. Jednotlivé kvapôčky vytvárajú oddiely, ktoré oddeľujú templátové molekuly DNA. Kvapôčky plnia úlohu jednotlivých skúmaviek alebo jamiek na doštičke, v ktorých prebieha PCR reakcia, aj keď v menšom formáte. Masívne rozdelenie vzoriek je kľúčovým aspektom techniky ddPCR (Xu a kol., 2018). Systém rozdeľuje vzorky nukleových kyselín na tisíce kvapiek veľkosti nanolitrov a v každej kvapke dochádza k amplifikácii (Obr. 4). V čítačke sa následne analyzujú všetky kvapky pomocou fluorescenčného detektora, ktorý podľa fluorescenčného signálu v závislosti od prítomnosti či absencie cieľovej DNA rozlišuje PCR pozitívne a negatívne kvapôčky. Na základe počtu pozitívnych a negatívnych oddielov sa potom vypočíta absolútna kvantifikácia cieľovej DNA (Orhant a kol., 2016; Pinheiro a Emslie, 2018). Rozdelenie umožňuje meranie tisícok nezávislých amplifikácií v jednej vzorke, čo znamená, že jedna vzorka môže poskytnúť desiatky tisíc dátových bodov a nie jediný

výsledok, čím ponúka štatisticky významnú analýzu použiteľnú v praxi (El Khattabi a kol. 2016; Pinheiro a Emslie, 2018).



Obr. 4: Schéma priebehu ddPCR (prevzaté a upravené z www.labmedica.com)

Táto technika má menšie požiadavky na množstvá vstupných vzoriek, čo znižuje náklady a umožňuje uchovanie cenných vzoriek v malom množstve. Digitálna kvapôčková PCR bola navrhnutá ako alternatívna technika na zistenie aneuploidii v neinvazívnom prenatálnom testovaní, avšak vyžaduje si ešte malé vylepšenia, pretože na dosiahnutie štatisticky významného výsledku je potrebné veľké množstvo pozitívnych kvapiek, čo znamená uskutočnenie veľkého množstva PCR reakcií (Chiu a kol., 2008; El Khattabi a kol., 2016).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Na výskum boli použité vzorky krvnej plazmy odobraté päťdesiatim gravidným ženám čakajúcim dieťa mužského pohlavia, ktoré bolo stanovené z odberu plodovej vody alebo chóriových klkov pomocou metódy QF PCR. Pacientkam bola medzi 13–22 týždňom tehotenstva odobraná periférna krv a následne z nej bola separovaná krvná plazma. Všetky pacientky podpísali informovaný súhlas s použitím ich vzoriek na vedecké účely. Vzorky krvnej plazmy boli uchovávané v mraziacom boxe pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 Použité chemikálie, súbavy a roztoky

- QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit Qiagen, Hilden, G (LOT: 163039698)
- QIAEX® II Gel Extraction Kit, Hilden, G (LOT:160020018)
- Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit Promega, USA (LOT:112528)
- PCR Clean Decontamination Spray, Minerva Biolabs (LOT: 152D2029)
- Izopropanol p.a., mikroCHEM SR
- Ethanolum 96% (V/V), Fagron a.s. ČR
- QuantiFlour® ONE dsDNA System, Promega USA (kat.č. #E4870)
- QuantiFluor® ONE Lambda DNA, Promega USA (LOT: 0000405730)
- Elučný pufor Promega USA (LOT: 0000372713)
- magnetické guľičky AMPure XP, Beckman Coulter USA (LOT: 18222700)
- nanášací pufor Gel Loading Dye (6x), New England BioLabs (LOT: 0231710)
- 2-Log DNA Ladder (0,1–10 kb), New England BioLabs (LOT: 0661309)
- GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10 000x, Biotium USA (LOT: 19G0819)
- agaróza (Prolabo, Belgium)
- PureLink™ Quick PCR Purification Kit, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Lithuania (LOT: 00999286)
- Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (5 U/ μL), Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Lithuania (LOT: 2203604)
- T4 DNA Ligase, Thermo Fisher Scientific, Lithuania (LOT: 01008580)
- Anza™ DNA End Repair Kit, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Lithuania (LOT: 01020650)
- PCR Ultra H₂O, Top-Bio s.r.o ČR (LOT: P040122022)
- 10x High Fidelity PCR Buffer, Invitrogen Lithuania (LOT: 2191424)

- 50 mM MgSO₄, Invitrogen Lithuania (LOT: 2218088)
- 10x T4 DNA Ligase Buffer. Thermo Scientific, Lithuania (LOT: 00969762)
- PEG 4000, Thermo Scientific Lithuania (LOT: 00996866)
- univerzálny primer, sekvencia DNA (5'-3'):
GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC, Sigma-Aldrich Germany
- špecifický krátky linker, sekvencia DNA (5'-3'): P-GAATTCAGATC , Sigma-Aldrich Germany
- špecifický dlhý linker, sekvencia DNA (5'-3'):
GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTCT, Sigma-Aldrich Germany
- Prime PCR ddPCR Copy Number Assay: USP9Y Human. BIO-RAD USA (kat.č. #10031240)
- Prime PCR ddPCR Copy Number Assay: ATRX Human. BIO-RAD USA (kat.č. #10031243)
- 2x ddPCR Supermix for Probes (No dUTPs), BIO-RAD USA (LOT: 002699)
- oligonukleotidy (Merck)
- DNA dA-Tailing Kit, MCLAB, USA (kat.č. #NGDT-100)

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- trepačka (Combi-Spin FVL-2400N, BIOSAN Litva)
- vodná kúpeľ (Orbital Shaking Water Bath NB-303, N-BIOTEK Kórea)
- vákuová pumpa (Taigen VacEzor Taiwan)
- dryblock (MiniB-100 Dry Bath MIULAB Čína)
- spin column adaptéry (LabTurbo Taiwan, kat. č. S0101)
- centrifugačné skúmavky 50 ml (TPP Switzerland, LOT: 20180338)
- ClickSeal Microcentrifuge Tubes in Self-Standing Bags (BCN1700-BP GoldenGate BIOSCIENCE, USA)
- automat na izolovanie cfDNA z krvnej plazmy (Maxwell RSC Promega, USA)
- fluorometer QuantusTM (Promega USA, kat.č. #E6150)
- tenko-stenné 0,5ml PCR skúmavky (Promega USA, kat.č. #E4941)
- DNA LoBind 1,5ml skúmavky (Eppendorf Germany, LOT: G174032M)
- magnetický separačný stojan (Permagen Labware, USA, LOT: #MSR06)
- elektroforetická vaňa (Bio-Rad, USA)
- zdroj napätia (Pharmacia LKB, Švédsko)
- UV transluminátor MiniBis Pro (DNR Bio-Imaginig systems, Izrael)

- analytické váhy (Boeco, Germany)
- Droplet Reader QX 200™ (BIO-RAD, USA)
- PCR Plate Sealer PX1™ (BIO-RAD, USA)
- Automated Droplet Generator (BIO-RAD, USA)
- PCR Plate Spinner (VWR, USA)
- pipetové špičky s rôznym objemom 20-1000 µl s filtrom
- mikropipety 1000; 200; 20; 0,5 µl (Labmate, UK)
- laminárny box (Telstar Bio II Advance, Španielsko)
- hlbokomraziaci box (Dairei ULTF 80, Denmark)
- stolná centrifúga (MPW-310, Poland)
- minicentrifúga (Spectrafuge 7M Labnet USA)
- termocyklér, Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Izolácia cfDNA pomocou kitu

Na izoláciu cfDNA z krvnej plazmy bol použitý QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit od firmy Qiagen, podľa protokolu odporúčaného výrobcem. Pred začiatkom práce bolo pracovné miesto v laminárnom boxe vyčistené dekontaminačným roztokom PCR cleaner a spolu s pomôckami vyžiarené silným zdrojom germicídneho žiarenia po dobu 30 minút. Podľa pokynov v protokole od výrobcu bolo pridaných 200 ml izopropanolu k ACB pufru, 25 ml etanolu k ACW1 pufru a 30 ml etanolu k ACW2 pufru. Vzniknuté roztoky boli dôkladne premiešané a skladované pri izbovej teplote.

Skúmavky s krvnou plazmou boli vybrané z hlbokomraziaceho boxu a uložené pri izbovej teplote v laboratóriu pokiaľ nerozmrzli. Pri každej izolácii sa pracovalo s piatimi vzorkami kvôli kapacite používaných prístrojov. Medzičasom bolo v laminárnom boxe pripravených a označených 6 50ml centrifugačných skúmaviek. V jednej 50ml centrifugačnej skúmavke bolo zmiešaných 22 ml ACL pufru s 28 µl Carrier RNA, roztok bol ručne premiešaný. Do zvyšných 50ml centrifugačných skúmaviek označených číslami vzoriek bolo rozpipetovaných 500 µl Proteinázy K a pridaných cca 5 ml krvnej plazmy. Následne boli do 50ml centrifugačných skúmaviek s proteinázou a krvnou plazmou pridané 4 ml z pripraveného mixu ACL pufru + Carrier RNA. Vzniknuté roztoky v skúmavkách boli premiešané na vortexe a umiestnené do vodného kúpeľa predhriateho na 60 °C. Vzorky boli inkubované 30 minút za stáleho miešania. Po uplynutí času bolo ku vzorkám pridaných 9 ml ACB pufru, roztoky boli opäť premiešané na vortexe a umiestnené do ľadového kúpeľa na 10 minút. Počas inkubácie boli do vákuovej pumpy umiestnené spin column adaptéry s kolónkami, do ktorých boli umiestnené extendery kvôli veľkému objemu vzoriek. Vzorky boli naliate do príslušných extenderov a bola zapnutá vákuová pumpa. Po presatí celého objemu cez kolónky bola pumpa vypnutá a extendery odstránené. Následne bolo do kolóniek pridaných 600 µl ACW1 pufru a pumpa bola opäť zapnutá. Po presatí bolo pridaných 750 µl ACW2 pufru a opäť bola zapnutá pumpa. Na záver bolo pridaných 750 µl etanolu a proces sa opakoval. Potom boli kolónky premiestnené do zberných skúmaviek a centrifugované 3 minúty pri 10 000 rpm. Po centrifugácii boli zberné skúmavky vyhodnené a kolónky boli premiestnené do čistých zberných skúmaviek. Kolónky boli otvorené a inkubované v termobloku 10 minút pri teplote 56 °C do úplného vysušenia membrány. Po skončení inkubácie boli opäť zberné

skúmavky vyhodnené a kolónky boli umiestnené do elučných skúmaviek. Na membrány kolóniek bolo napipetovaných 60 µl elučného AVE pufru a boli nechané 3 minúty odpočívať v izbovej teplote. Na záver boli mikroskúmavky s kolónkami centrifugované 1 minútu pri 10 000 rpm. Kolónky boli na záver vyhodnené a izolovaná cfDNA v elučných skúmavkách bola rozpipetovaná do 4 mikrocentrifugačných skúmaviek v objemoch 2-krát po 20 µl a 2-krát po 10 µl. Všetky skúmavky boli umiestnené do hlbokomraziaceho boxu, kde boli uchovávané pri - 80 °C do ďalšieho použitia.

4.4.2 Izolácia cfDNA pomocou automatu

Izoláciu cfDNA z krvnej plazmy sme vykonali aj pomocou automatu Maxwell RSC a príslušného kitu Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit od firmy Promega podľa protokolu výrobcu.

Ako prvé boli kazety s puframi umiestnené do zásobníku a bola z nich opatrne odlepená ochranná fólia. Následne boli nanesené jednotlivé vzorky plaziem s objemom 400–1000 µl (v závislosti od dostupného množstva vzorky) do komôrok s číslom jedna. Obsah komôrky bol dôsledne premiešaný s pridanou plazmou pomocou pipetovej špičky. Do komôrok s číslom 8 boli umiestnené plastové piesty dodané v kite. Následne boli vsunuté elučné skúmavky do príslušných jamiek pri každej kazete a boli naplnené 60 µl elučného pufru, taktiež z kitu. Po dokončení prípravy bol zásobník s kazetami uložený do prístroja a bol spustený program na izoláciu. Po skončení izolácie boli prázdne kazety vyhodnené a elučné skúmavky s izolovanou cfDNA boli po meraní koncentrácie umiestnené do stojanu, a uskladnené v hlbokomraziacom boxe pri - 80 °C.

4.4.3 Meranie koncentrácie DNA

Po izolácii bola odmeraná koncentrácia izolovanej cfDNA v prístroji Quantus Fluorometer od firmy Promega. Najprv musel byť fluorometer kalibrovaný. V priehľadnej 0,5ml PCR skúmavke bol pripravený blank pridaním 200 µl farbiva QuantiFluor ONE dsDNA Dye a skúmavka bola umiestená do tmy. V druhej priehľadnej 0,5ml PCR skúmavke bol pripravený štandard zmiešaním 1 µl QuantiFluor ONE Lambda DNA standart a 200 µl fluorescenčného farbiva QuantiFluor ONE dsDNA Dye a skúmavka bola umiestnená do tmy. Po 5 minútach inkubácie pri izbovej teplote v tme boli použité na kalibráciu fluorometra. Po kalibrácii boli údaje do prístroja uložené pre ďalšie merania a následne boli odmerané vzorky izolovanej cfDNA. K 200 µl fluorescenčného farbiva boli pridané 2 µl vzorky, zmes bola premiešaná

a inkubovaná 5 minút pri izbovej teplote v tme. Po inkubácii boli do prístroja zadané objemy vzoriek a zvolené jednotky výslednej koncentrácie. Nasledovalo samotné meranie a zaznamenanie výsledkov.

4.4.4 Obohatenie fetálnej frakcie pomocou magnetických guľôčok

V nasledujúcej metóde bol použitý postup od Grendára a kol., 2019, upravený podľa Hu a kol., 2019.

Fetálna frakcia v prvej sekcii vyizolovanej cfDNA bola obohatená pomocou separácie na magnetických guľičkách AMPure XP od firmy Beckman Coulter. Pred začatím práce bol roztok s guľôčkami premiešaný a vytemperovaný na izbovú teplotu spolu s izolovanou cfDNA. Následne bolo do LoBind skúmaviek s nezmáčavým povrchom napipetovaných 10 μ l cfDNA a 6,7 μ l roztoku guľôčok; zmes bola premiešaná pomocou pipetovacej špičky a inkubovaná pri izbovej teplote 5 minút. Po inkubácii boli skúmavky vložené do magnetického separačného stojana, kde boli ponechané po dobu 7 minút. Medzičasom bol pripravený čerstvý 80% etanol zmiešaním 96% etanolu a PCR vody, v závislosti od počtu vzoriek. Po 7 minútach bol zo skúmaviek v magnetickom stojane odsatý supernatant a premiestený do čistých LoBind skúmaviek. K supernatantu bolo pridaných 31 μ l roztoku s guľôčkami a obsah bol premiešaný pomocou pipetovacej špičky. Zmes bola inkubovaná 5 minút pri izbovej teplote a následne 5 minút na magnetickom separačnom stojane. Supernatant bol odsatý a vyhodnený. Do skúmaviek s magnetickými guľôčkami, na ktorých bola naviazaná cfDNA bolo pridaných 80 μ l 80% etanolu na prečistenie, skúmavky boli jemne otáčané a následne bol etanol odsatý. Tento prečisťovací krok sa opakoval ešte raz. Po dôkladnom odstránení všetkého etanolu boli skúmavky ponechané na stojane po dobu približne 10 minút, kým nevyparal všetok etanol a magnetické terčičky neboli vysušené. Na záver bol do skúmaviek pridaný elučný pufor v objeme 25 μ l a pomocou pipetovacej špičky v ňom boli magnetické guľôčky resuspendované. Nasledovala inkubácia 2 minúty pri izbovej teplote a potom 2 minúty v magnetickom stojane. Supernatant obsahujúci cfDNA fragmenty o dĺžke 100–160 bp bol odpipetovaný do čistých skúmaviek a uložený do hlbokomraziaceho boxu.

4.4.5 Obohatenie fetálnej frakcie pomocou gélovej elektroforézy

V nasledujúcej metóde bol použitý upravený postup od Jorgez a Bischoff, 2009.

Na prípravu 1% agarózového gélu bolo navážených 0,75 g agarózy, ktoré sa rozpustili v 75 ml 0,5x TBE pufru. Zmes bola v mikrovlnnej rúre ohrievaná až do vyčistenia roztoku. Pripravený gél bol vyliaty do elektroforetickej vaničky a bol doň umiestnený hrebienok. Po stuhnutí gélu bol hrebienok opatrne vytiahnutý a gél bol zaliaty 0,5x TBE pufrom. Do jamiek bolo nanesených 10 μ l vzorky s 1,6 μ l nanášacieho pufru. Do prvej a poslednej jamky bolo nanesených 5 μ l DNA rebríka (DNA Ladder 100 bp), 1 μ l nanášacieho pufru a 2 μ l farbiva GelRed. Elektroforetická migrácia bola spustená najprv pri 60 V po dobu 30 minút a potom pri 80 V po dobu 50 minút. Výsledok bol vizualizovaný s použitím UV transluminátora. Z gélu boli pomocou sterilného skalpela vyrezané časti, ktoré odpovedali veľkosti približne 100–300 bp, na základe porovnania s rebríčkou. Vyrezané časti gélu boli umiestnené do čistých mikroskúmaviek.

Následne, s použitím QIAEX II Gel Extraction kitu od firmy Qiagen, bola z gélu izolovaná DNA podľa postupu navrhovaného výrobcom. Do mikroskúmavky s vyrezaným kúskom gélu bolo pridaných 1 200 μ l QX1 pufru a 10 μ l QIAEX II pufru. Obsah skúmavky bol premiešaný. Vzorky boli vložené do termobloku, kde boli inkubované pri 50 °C po dobu 10 minút. Každé dve minúty bol obsah skúmaviek premiešaný pomocou vortexu. Po inkubácii boli skúmavky umiestnené do stolnej centrifúgy a boli centrifugované pri 11 000 rpm po dobu 30 sekúnd. Následne bol odobratý supernatant a pelet bol resuspendovaný v 500 μ l QX1 pufru. Vzorky boli opäť centrifugované pri 11 000 rpm po dobu 30 sekúnd. Supernatant bol odobraný a pelet resuspendovaný v 500 μ l PE pufru. Vzorky boli centrifugované pri 11 000 rpm po dobu 30 sekúnd. Supernatant bol znovu odobraný a pelet resuspendovaný v 500 μ l PE pufru. Vzorky boli centrifugované pri 11 000 rpm po dobu 30 sekúnd. Supernatant bol dôkladne odobraný a pelet sa nechal sušiť pri izbovej teplote 15 minút. Vysušený pelet bol resuspendovaný v 25 μ l PCR vody a ponechaný v stojane pri izbovej teplote po dobu 5 minút. Následne boli vzorky centrifugované pri 11 000 rpm po dobu 30 sekúnd. Nakoniec bol supernatant prenesený do čistej skúmavky a uložený v hlbokomraziacom boxe.

4.4.6 Obogatenie fetálnej frakcie pomocou amplifikácie vybranej dĺžky fragmentov

Použitá metóda a postupy boli prevzaté z publikácie Young a kol., 2017 a upravené podľa potreby laboratória.

4.4.6.1 Úprava koncov fragmentov

Pre prípravu DNA s tupými koncami bol použitý Anza™ DNA End Repair Kit od firmy Invitrogen a postupovalo sa podľa protokolu odporúčaného výrobcom. Do pripravených PCR-mikroskúmaviek boli napipetované 2 µl Anza 10x Repair pufru, 1 µl Anza DNA End Repair mixu a 17 µl izolovanej cfDNA. Obsah mikroskúmavky bol premiešaný pomocou pipetovacej špičky a skúmavky boli umiestnené do termocykléra, kde boli inkubované pri 20 °C po dobu 15 minút.

4.4.6.2 Purifikácia

Na prečistenie vzoriek po úprave koncov bol použitý QIAEX II Gel Extraction kit od firmy QIAGEN. Postupovalo sa podľa protokolu od výrobcu. Do čistých mikroskúmaviek bolo napipetovaných 120 µl QX1, celý objem roztoku po úprave koncov (20 µl) a 10 µl QIAEX II pufru. Obsah bol premiešaný a skúmavky boli umiestnené do termobloku, kde boli inkubované 10 minút pri teplote 50 °C s pravidelným miešaním na vortexe v intervale dvoch minút. Následne boli vzorky centrifugované pri 13 000 rpm po dobu 30 sekúnd. Po centrifugácii bol opatrne odobratý supernatant a k peletu bolo pridaných 500 µl QX1 pufru. Obsah skúmaviek bol premiešaný na vortexe a vzorky boli opäť centrifugované 30 sekúnd pri 13 000 rpm. Supernatant bol odobratý a pelet premytý 500 µl PE pufru. Obsah skúmavky bol premiešaný na vortexe a centrifugovaný pri 13 000 rpm 30 sekúnd. Supernatant bol znovu odobratý a premývací krok s PE pufrom sa ešte jedenkrát zopakoval. Pelet bol sušený pri izbovej teplote po dobu 15 minút. Po sfarbení peletu dobiela bolo do skúmaviek pridaných 45 µl PCR vody a obsah bol premiešaný na vortexe do homogenizácie roztoku. Vzorky boli inkubované pri izbovej teplote 5 minút a centrifugované pri 13 000 rpm po dobu 30 sekúnd. Nakoniec bol supernatant obsahujúci DNA prenesený do čistých mikroskúmaviek.

4.4.6.3 Pridanie adenínu na tretí koniec tupej DNA

Pre pridanie adenínu na tretie konce upravených molekúl DNA bol použitý DNA dA-Tailing Kit od firmy MCLAB a postupovalo sa podľa odporúčaní od výrobcu. Do PCR-mikroskúmaviek bolo napipetovaných 10 µl 5 x dA-Tailing pufru, 1 µl dA-Tailing enzýmu a 39 µl upravenej a prečistenej DNA. Obsah mikroskúmaviek bol premiešaný pomocou pipetovacej špičky a inkubovaný v termocykléri 30 minút pri 37 °C.

4.4.6.4 Purifikácia

Na purifikáciu vzoriek po pridávaní adenínu bol opäť použitý QIAEX II Gel Extraction kit od firmy QIAGEN. Postup bol rovnaký ako v bode číslo 2, s výnimkou vstupného objemu vzorky, ktorý činil 50 µl a objemu QX1 pufru v prvom kroku, ktorý bol 300 µl. Na elúciu bolo použitých 20 µl PCR vody.

4.4.6.5 Ligácia špecifických linkerov

Po prečistení nasledovalo pripojenie špeciálne nadizajnovaných linkerov podľa Young a kol., 2017 (Tab. 1). Najprv bol vytvorený ligačný premix, ktorý pozostával z 10x T4 DNA Ligase pufru, 50% PEG 4000 solution, T4 DNA ligázy, 40x riedeného krátkeho linkru a 10x riedeného dlhého linkru (Tab. 2). Premix bol premiešaný a rozpipetovaný po 6,4 µl do PCR-mikroskúmaviek. Do skúmaviek bolo následne pridaných 13,6 µl prečistenej DNA z predošlého kroku a obsah bol premiešaný s pipetovacou špičkou. Skúmavky boli umiestnené do termocykléra, kde boli inkubované 1 hodinu pri 22 °C a potom 10 minút pri 65 °C kvôli inaktivácii enzýmu.

Tabuľka 1: Sekvencie nadizajnovaných oligonukleotidov.

Názov	Sekvencia DNA (5'-3')
Krátky linker	P-GAATTCAGATC
Dlhý linker	GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTCT
Univerzálny primer	GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC

Tabuľka 2: Pipetované objemy na prípravu premixu pre ligáciu linkerov.

Chemická látka	Pipetovaný objem pre 1 vzorku
10x T4 DNA Ligase pufor	2 μ l
50% PEG 4000 solution	2 μ l
T4 DNA ligáza	0,4 μ l
10x riedený dlhý linker	1 μ l
40x riedený krátky linker	1 μ l
DNA	13,6 μ l
Výsledný objem	20 μ l

4.4.6.6. Polymerázová reťazová reakcia s univerzálnym primerom

Vzorky DNA s naligovanými špecifickými linkermi boli následne pripravené na PCR s nadizajnovaným univerzálnym primerom podľa Young a kol., 2017 (Tab. 1), ktorý bol špecifický k naviazaným linkerom. Najprv bol pripravený PCR premix z 10x High Fidelity PCR pufru, MgSO₄ iónov, zmesi nukleotidov, Platinum *Taq* DNA polymerázy a nadizajnovaného univerzálného primeru (Tab. 3). Premix bol premiešaný a rozpipetovaný do PCR-mikroskúmaviek po 5,6 μ l. Do každej skúmavky bolo následne pridaných 19,4 μ l DNA s naviazanými linkermi a obsah bol premiešaný pomocou pipetovacej špičky. Na termocykléri bol nastavený špecifický program pre amplifikáciu prednostne krátkych primerov z publikácie Young a kol., 2017, upravený podľa potrieb používanej polymerázy (Tab. 4).

Tabuľka 3: Pipetované objemy na prípravu premixu pre PCR.

Chemická látka	Pipetovaný objem pre 1 vzorku
10x High Fidelity PCR pufor	2,5 μ l
Nukleotidy	1 μ l
MgSO ₄	1 μ l
Univerzálny primer	1 μ l
Platinum <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,1 μ l
DNA	19,4 μ l
Výsledný objem	25 μ l

Tabuľka 4: Teplotné programy použité pri univerzálnej PCR.

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Iniciálna denaturácia a aktivácia polymerázy	94	1 min	1
Renaturácia	94 – 1/cyklus	30 s	80
Extenzia linkerov	72	5 min	1
Denaturácia	82	20 s	15
	72 – 1/cyklus	30 s	
	72	2 min	
Annealing	82	20 s	45
	57	20 s	
	72	2 min	
Konečná polymerizácia	72	5 min	1
Stabilizácia DNA	5	∞	∞

4.4.6.7. Purifikácia

Na finálne prečistenie PCR produktov bol použitý PureLink PCR Purification Kit od firmy Invitrogen. Postupovalo sa podľa manuálu od výrobcu. K PCR produktom

bolo pridaných 100 μ l B2 pufru. Zmes bola premiešaná a prenesená do PureLink Spin kolóniek v zberných skúmavkách. Kolónky so vzorkami boli centrifugované 1 minútu pri 13 000 rpm. Obsah zberných skúmaviek bol vyliaty a do kolóniek bolo napipetovaných 650 μ l premývacieho pufru W1. Kolónky boli centrifugované 1 minútu pri 13 000 rpm, obsah zberných skúmaviek bol opäť vyliaty a kolónky boli znovu centrifugované pri 13 000 rpm 3 minúty. Zberné skúmavky boli vyhodené a kolónky boli umiestnené do čistých elučných skúmaviek. Na membránu kolóniek bolo nanesených 30 μ l elučného pufru a boli inkubované pri izbovej teplote 1 minútu. Nakoniec boli kolónky centrifugované 2 minúty pri 13 000 rpm. Kolónky boli vyhodené a elučné skúmavky s prečistenými PCR produktmi boli uskladnené do hlbokomraziaceho boxu do ďalšieho použitia.

4.4.7 ddPCR

Po vykonaní všetkých obohacovacích metód bola ich úspešnosť analyzovaná pomocou ddPCR. Najprv bol pripravený premix z ddPCR supermixu, fluorescenčne značenej sondy pre chromozóm X (ATRX) a fluorescenčne značenej sondy pre chromozóm Y (USP9Y) (Tab. 5). Premix bol premiešaný a rozpipetovaný do platničky po 12 μ l na jamku. Do jamiiek bolo následne pridaných 8 μ l vzorky a na platničku bola pritavená hliníková fólia. Potom bola platnička umiestnená do generátora kvapôčok. Po vytvorení emulzných kvapiek bola platnička opäť pokrytá fóliou a preložená do termocykléra s nastaveným programom odporúčaným výrobcom (Tab. 6), kde prebehla amplifikácia. Nakoniec boli pomocou ddPCR readru analyzované intenzity fluorescencie jednotlivých kvapôčok. Pomocou softvéru QuantaSoft™ boli vyhodnotené výsledky kvantifikácie a vypočítané fetálne frakcie v jednotlivých vzorkách.

Tabuľka 5: Pipetované objemy na prípravu premixu pre ddPCR.

Chemická látka	Pipetovaný objem pre 1 vzorku
2x ddPCR Supermix for Probes (no dUTP)	10 μ l
20x Sonda USP9Y (FAM)	1 μ l
20x Sonda ATRX (HEX)	1 μ l
DNA	8 μ l
Výsledný objem	20 μ l

Tabuľka 6: Teplotné programy použité pri ddPCR.

Proces	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklov
Aktivácia enzýmu	95	10 min	1
Denaturácia	94	30 s	40
Annealing	55	1 min	40
Inaktivácia enzýmu	98	10 min	1
Stabilizácia DNA	4	∞	∞

4.4.7 Štatistická analýza

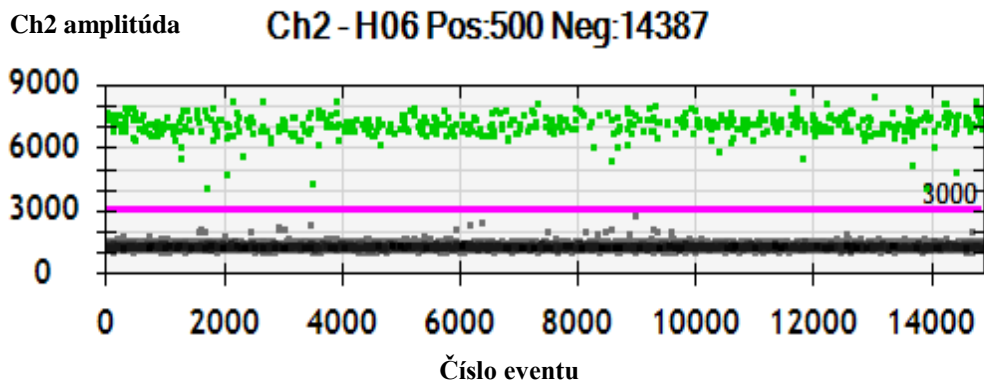
Namerné dáta boli štatisticky spracované v programe MATLAB Version 7.5.0.342 (R2007b). Hodnotené boli výsledky fetálnych frakcií prepočítané na 1 ml krvnej plazmy, počet kópií chromozómov X prepočítaný na 1 ml krvnej plazmy a počet kópií chromozómov Y prepočítaný na 1 ml krvnej plazmy. Vytvorená bola Spearman neparametrická korelácia medzi výsledkami jednotlivých metód. Pri výpočte fetálnej frakcie sa vychádzalo z predpokladu, že cf DNA pochádza z diploidných buniek s genotypom XX ak sa jedná o materskú bunku a genotypom XY v prípade bunky plodu.

5 VÝSLEDKY

Na experiment bolo použitých 50 vzoriek krvnej plazmy tehotných žien v 13.–22. týždni tehotenstva, z ktorých bola izolovaná cfDNA dvoma metódami. Všetkých 50 vzoriek bolo použitých na izoláciu pomocou kitu QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit od firmy Qiagen, kde bol vstupný objem 5 ml plazmy. Vzorky, ktoré obsahovali väčší objem plazmy boli použité aj na izoláciu pomocou automat Maxwell od firmy Promega, kde bol vstupný objem od 400–1 000 μ l, podľa množstva zvyšnej plazmy. Takýchto vzoriek bolo 32. Po izolácii bola odmeraná koncentrácia cfDNA 32 vzoriek izolovaných pomocou automatu a rovnakých 32 vzoriek izolovaných pomocou kitu. Výsledky všetkých koncentrácií boli prepočítané na 1 ml plazmy, aby bolo možné ich porovnať (Príloha 1).

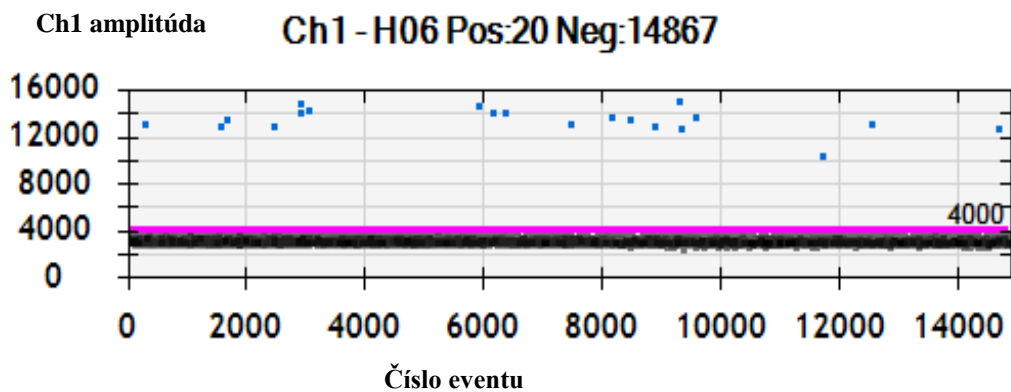
Na obohacovacie metódy fetálnej frakcie boli použité vzorky s izolovanou cfDNA pomocou kitu. Vyhodnotenie úspešnosti jednotlivých metód bolo vykonané s použitím ddPCR, kde boli použité fluorescenčne značené sondy označujúce chromozóm X a chromozóm Y. Do tabuľky boli zaznamenané dáta zo softvéru QuantaSoft, a to konkrétne: počet kópií X, počet kópií Y a počet negatívnych reakcií, ktorý slúžil ako kontrola správnej funkcie generátoru kvapôčok. V programe bola manuálne nastavená treshold hodnota relatívnej fluorescencie pre oddelenie pozitívnych signálov, a to pre sondy chromozómu X na 3 000 (Obr. 5) a pre sondy chromozómu Y na 4 000 (Obr. 6). Všetky detegované signály nad touto hodnotou boli považované za pozitívne. Následne bola z týchto dát vypočítaná fetálna frakcia, ktorá bola počítaná ako podiel počtu kópií chromozómu Y x 2 a (celkového počtu kópií chromozómu X + počtu kópií chromozómu Y) x 100 (Barret a kol., 2017). Ďalej bol prepočítaný počet kópií chromozómu X a počet kópií chromozómu Y na 1 ml plazmy, keďže každá použitá metóda mala iný vstupný objem cfDNA (Príloha 1).

Obr. 5: Ukážka výstupu z programu QuantaSoft - vzorka obohatená pomocou elektroforézy.



Legenda: zelené body predstavujú pozitívne signály sondy viažucej sa na chromozóm X, sivé body predstavujú negatívne reakcie a ružová čiara znázorňuje treshold líniu

Obr. 6: Ukážka výstupu z programu QuantaSoft - vzorka obohatená pomocou elektroforézy.



Legenda: modré body predstavujú pozitívne signály sondy viažucej sa na chromozóm Y, sivé body predstavujú negatívne reakcie a ružová čiara znázorňuje trashold líniu

Z neobohatených vzoriek izolovaných pomocou kitu bolo metódou ddPCR analyzovaných 32 vzoriek, avšak kvôli technickej chybe 4 z nich neboli zahrnuté do výsledkov. Priemerná fetálna frakcia bola stanovená na 7,48 % so smerodajnou odchýlkou 3,5. Priemerná nameraná koncentrácia cfDNA prepočítaná na 1 ml krvnej plazmy bola 0,09 ng. μ l⁻¹ so smerodajnou odchýlkou 0,17. Priemerný počet kópií

chromozómu X prepočítaný na 1 ml plazmy bol 910 so smerodajnou odchýlkou 561,21 a priemerný počet kópií chromozómu Y prepočítaný na 1 ml plazmy bol 31,23 so smerodajnou odchýlkou 22,73 (Graf č. 1).

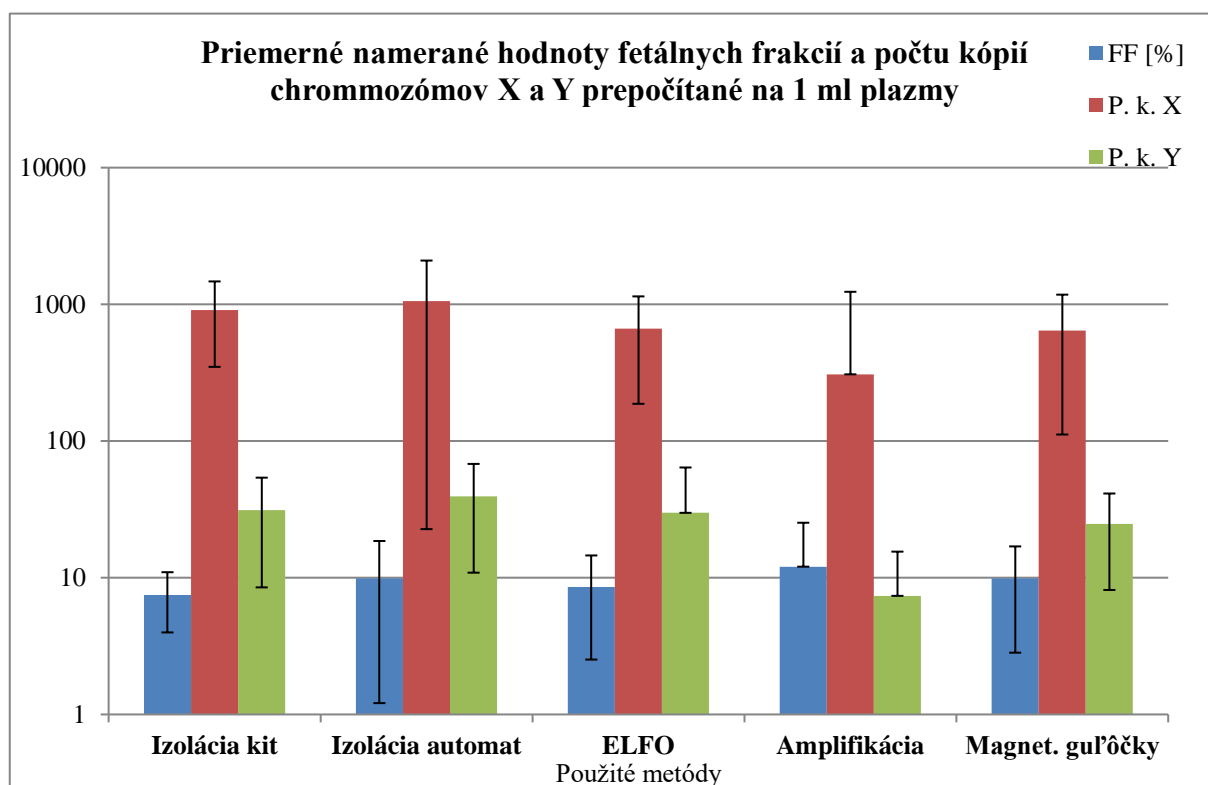
S použitím ddPCR boli analyzované aj neobohatené vzorky izolované pomocou automatu, a to v plnom počte 32 vzoriek. Priemerná fetálna frakcia bola 9,89 % so smerodajnou odchýlkou 8,68. Priemerná koncentrácia prepočítaná na 1 ml krvnej plazmy činila $0,06 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ so smerodajnou odchýlkou 0,1. Priemerný počet kópií chromozómu X prepočítaný na 1 ml plazmy predstavoval 1 056,84 so smerodajnou odchýlkou 1 034,16 a priemerný počet kópií chromozómu Y prepočítaný na 1 ml plazmy bol 39,46 so smerodajnou odchýlkou 28,56 (Graf 1).

Prvou testovanou metódou bolo obohatenie fetálnej frakcie pomocou magnetických guľôčok. Pre túto metódu bolo vybraných 42 vzoriek. Priemerná fetálna frakcia bola stanovená na 9,89 % so smerodajnou odchýlkou 7,06. Priemerný počet kópií chromozómu X prepočítaný na 1 ml plazmy bol 644,5 so smerodajnou odchýlkou 532,91 a priemerný počet kópií chromozómu Y prepočítaný na 1 ml plazmy bol 24,73 so smerodajnou odchýlkou 16,59 (Graf 1).

Ďalšou testovanou metódou bolo obohatenie fetálnej frakcie pomocou amplifikácie vybranej dĺžky fragmentov. Pre túto metódu bolo vybraných 32 vzoriek. Priemerná fetálna frakcia bola stanovená na 12,05 % so smerodajnou odchýlkou 13,21. Priemerný počet kópií chromozómu X prepočítaný na 1 ml plazmy bol 307,64 so smerodajnou odchýlkou 927,64 a priemerný počet kópií chromozómu Y prepočítaný na 1 ml plazmy bol 7,37 so smerodajnou odchýlkou 8,15 (Graf 1).

Poslednou testovanou metódou bolo obohatenie fetálnej frakcie pomocou gélovej elektroforézy. Pre túto metódu bolo vybraných 45 vzoriek. Priemerná fetálna frakcia bola stanovená na 8,54 % so smerodajnou odchýlkou 6,02. Priemerný počet kópií chromozómu X prepočítaný na 1 ml plazmy bol 665,48 so smerodajnou odchýlkou 478,27 a priemerný počet kópií chromozómu Y prepočítaný na 1 ml plazmy bol 29,83 so smerodajnou odchýlkou 34,22 (Graf 1).

Graf 1: Priemerné namerané hodnoty fetálnych frakcií a počtu kópií chromozómov X a Y prepočítané na 1 ml plazmy.



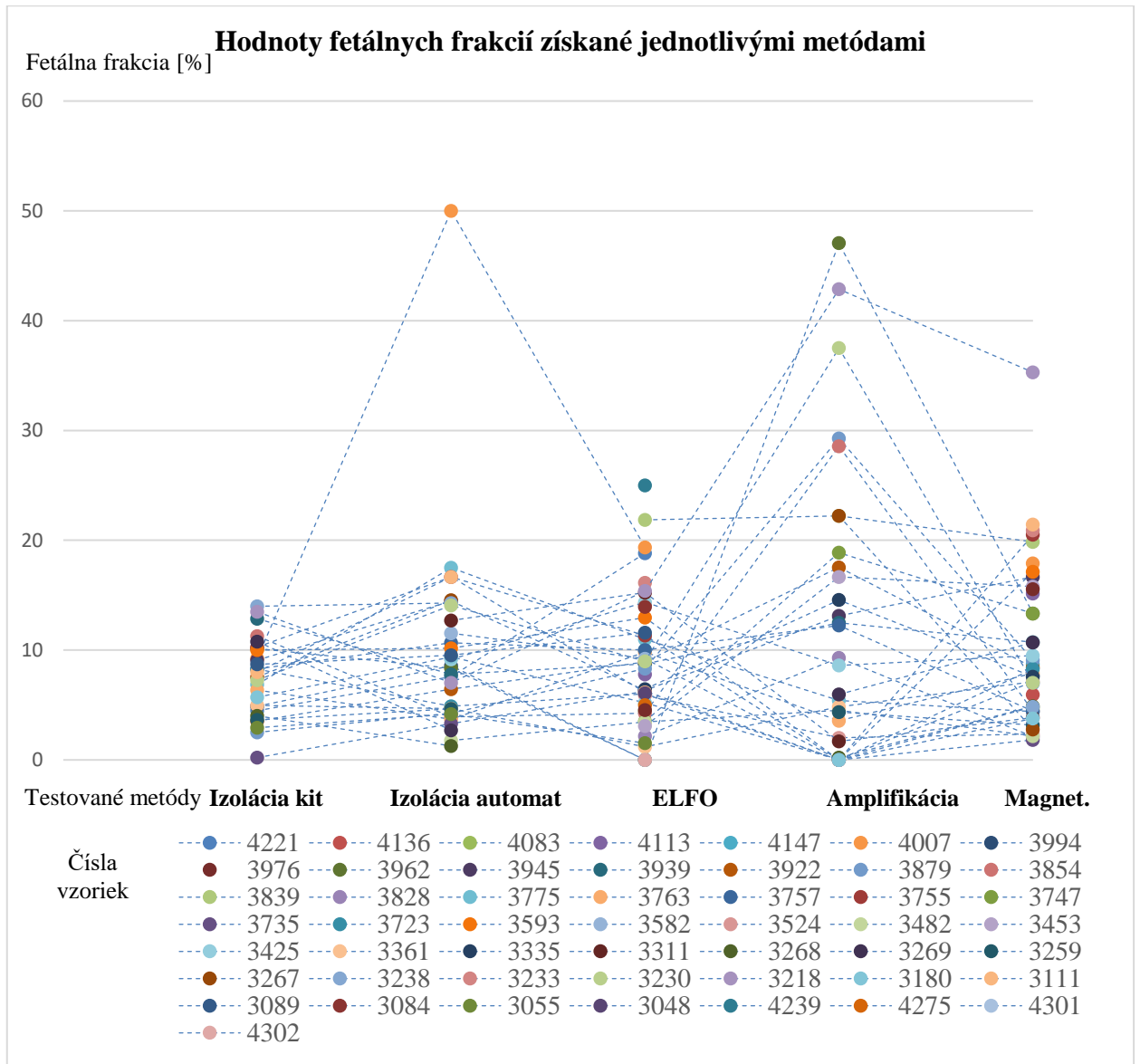
Legenda: FF – fetálna frakcia, P. k. X – počet kópií chromozómu X prepočítaný na 1 ml krvnej plazmy; P. k. Y – počet kópií chromozómu Y prepočítaný na 1 ml krvnej plazmy.

Izoláciou cfDNA pomocou automatu bol dosiahnutý vyšší priemerný počet kópií chromozómov X a Y a taktiež aj vyššia priemerná fetálna frakcia (9,89 %) ako pri izolácii kitom, a to aj napriek menšej priemernej koncentrácii, ktorá bola iba $0,06 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Všetky priemerné hodnoty ale boli sprevádzané pomerne vysokou smerodajnou odchýlkou v porovnaní s hodnotami získanými z izolácie s kitom. cfDNA izolovaná s použitím kitu obsahovala v priemere 7,48 % fetálnej zložky pri priemernej koncentrácii $0,09 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Priemerné počty kópií chromozómov X a Y boli porovnateľné s výsledkami vzoriek izolovaných automatom.

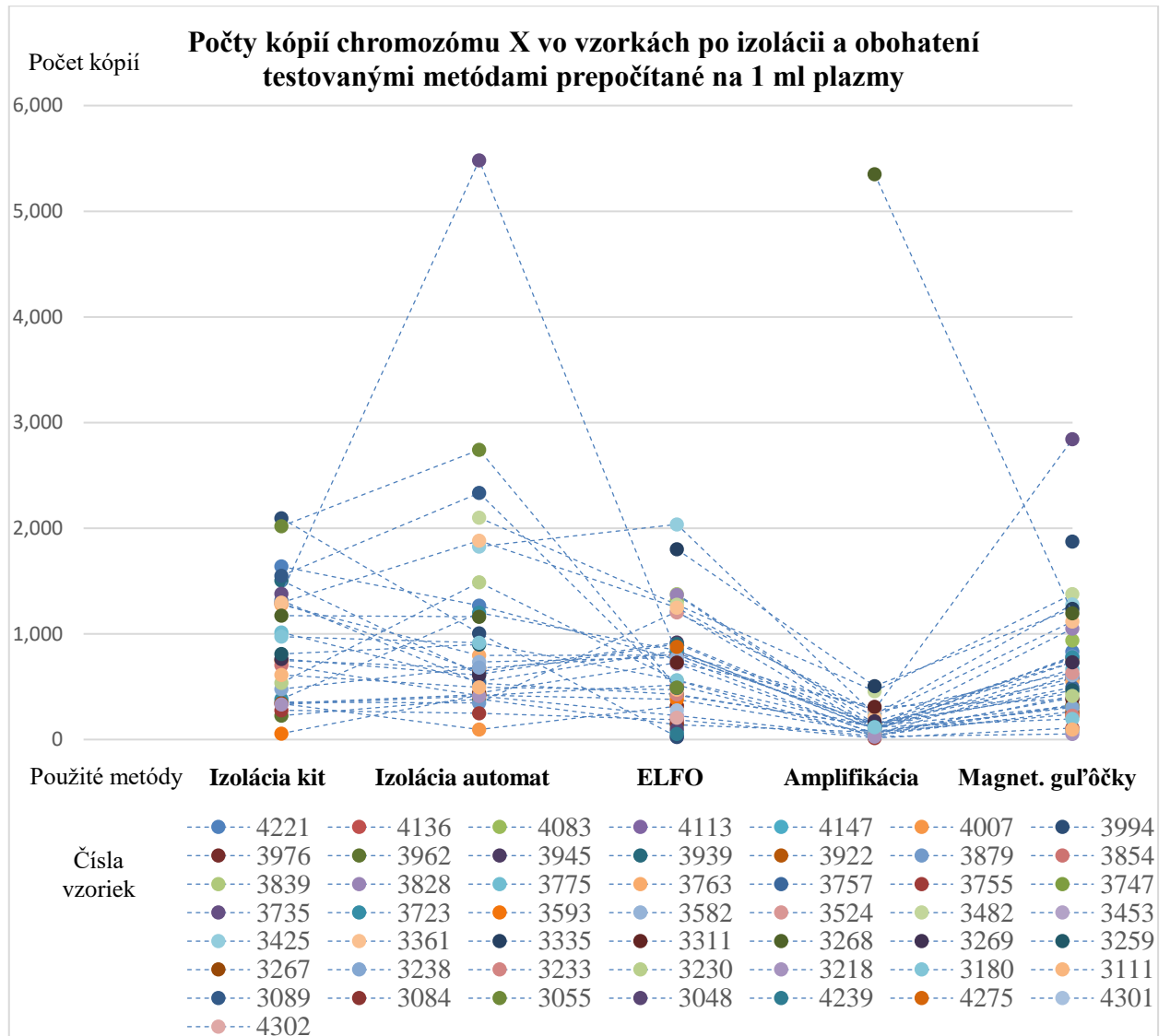
Najvyšší podiel fetálnej frakcie po obohatení bol dosiahnutý metódou amplifikácie vybranej dĺžky fragmentov, s hodnotou 12,05 %, avšak s najvyššou smerodajnou odchýlkou. V tomto prípade bol aj najnižší zaznamenaný počet kópií chromozómov X aj Y, čo robí túto metódu nedostačujúcou pre diagnostické účely. Priemerná fetálna frakcia získaná obohacovacou metódou s využitím gélovej

elektroforézy bola 8,54 % s dvojnásobne nižšou smerodajnou odchýlkou ako pri amplifikácii vybranej dĺžky fragmentov. Priemerný počet kópií chromozómov X bol dvojnásobne vyšší ako v predošlej metóde a počet kópií chromozómov Y bol až štyrikrát vyšší. Poslednou testovanou metódou bolo obohatenie pomocou magnetických guľôčok. Priemerná dosiahnutá fetálna frakcia bola 9,89 % so smerodajnou odchýlkou 7,06. Počet kópií chromozómu X bol v priemere 644,5 a chromozómu Y 24,73. Smerodajné odchýlky boli v tomto prípade porovnateľné s metódou využívajúcou elektroforézu, s výnimkou odchýlky pri počte kópií chromozómu Y, ktorej hodnota bola dvojnásobne nižšia. Priemerné hodnoty fetálnych frakcií a počtov kópií chromozómov X a Y prepočítaných na 1ml plazmy vo všetkých testovaných vzorkách pri použití vybraných metód sú zobrazené v grafoch 2–4.

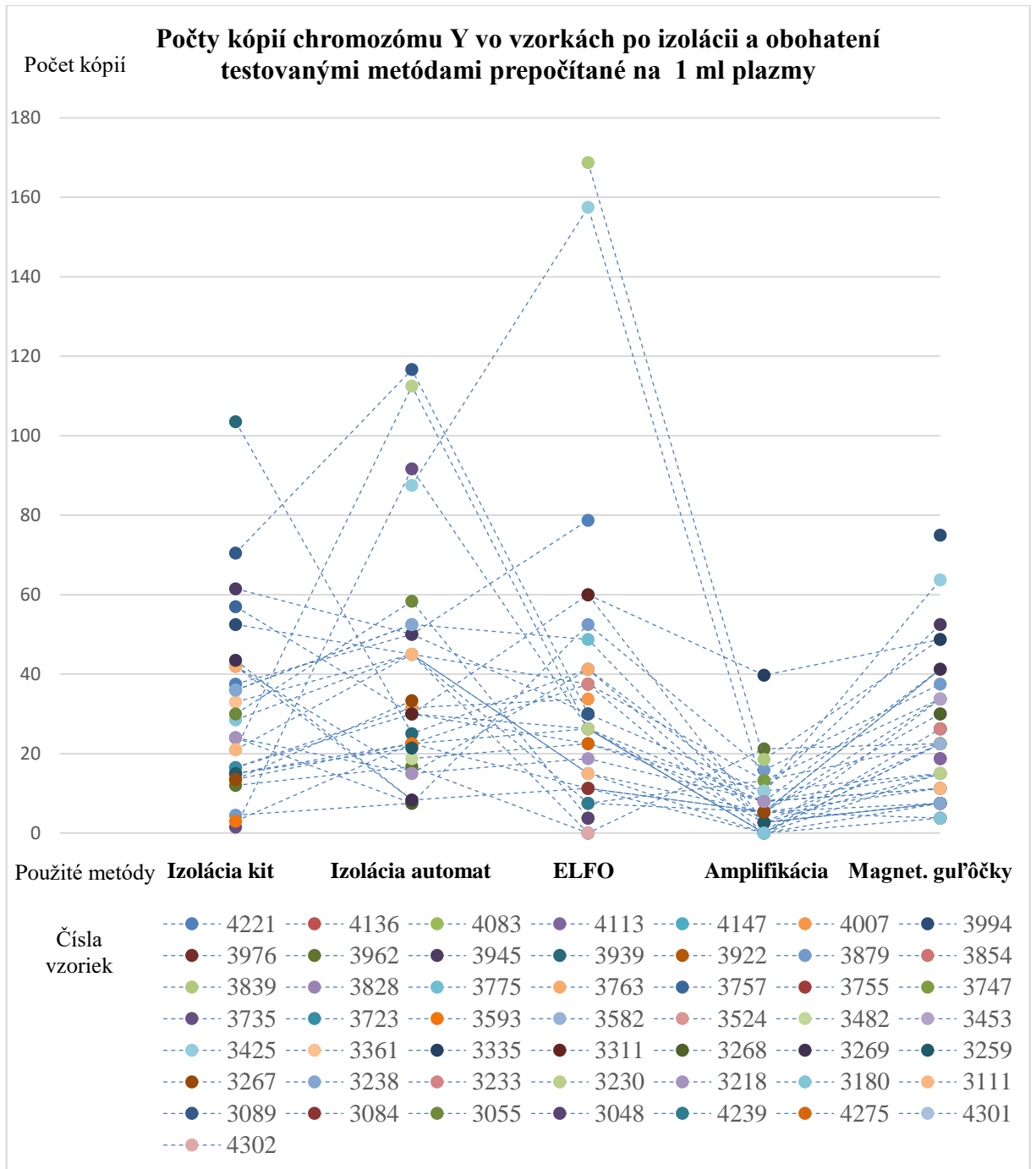
Graf 2: Hodnoty fetálnych frakcií v testovaných vzorkách získané jednotlivými metódami.



Graf 3: Počty kópií chromozómu X vo vzorkách po izolácii a obohatení testovanými metódami prepočítané na 1 ml plazmy.



Graf 4: Počty kópií chromozómu Y vo vzorkách po izolácii a obohatení testovanými vzorkami prepočítané na 1 ml plazmy.



Z nameraných výsledkov bola vykonaná štatistická analýza pre zistenie korelácie medzi jednotlivými metódami. V tabuľkách 7–9 sú zobrazené hodnoty neparametrických korelácií jednotlivých metód pri troch rôznych meraniach: fetálnej frakcie a počtu kópií chromozómov X a Y prepočítaných na 1 ml krvnej plazmy.

Modrou farbou sú označené štatisticky významné korelácie. Pri meraní fetálnej frakcie je viditeľná pozitívna korelácia obohacovacej metódy využívajúcej separáciu na magnetických guľôčkach so všetkými metódami okrem izolácie automat. Naopak metóda využívajúca amplifikáciu vybraných dĺžok segmentov nekoreluje so žiadnou metódou okrem magnetických guľôčok. Pri meraní počtu kópií chromozómov X pozitívne korelujú úplne všetky metódy s výnimkou obohacovacej metódy založenej na elektroforéze s izoláciou pomocou kitu. Pri meraní počtu kópií chromozómu Y takýto trend nebol zaznamenaný. Jediná štatisticky významná korelácia je medzi metódou s magnetickými guľôčkami a metódami využívajúcimi elektroforézu a amplifikáciu.

Tabuľka 7: Korelácie jednotlivých metód pri meraní fetálnej frakcie.

FF	Izolácia kit	Izolácia automat	ELFO	Amplifikácia	Magnet. guľôčky
Izolácia kit	1.00	0.37	0.27	0.14	0.46
Izolácia automat		1.00	0.45	-0.01	0.24
ELFO			1.00	-0.10	0.30
Amplifikácia				1.00	0.31
Magnet. guľôčky					1.00

Tabuľka 8: Korelácie jednotlivých metód pri meraní počtu kópií chromozómov X prepočítaných na 1 ml plazmy.

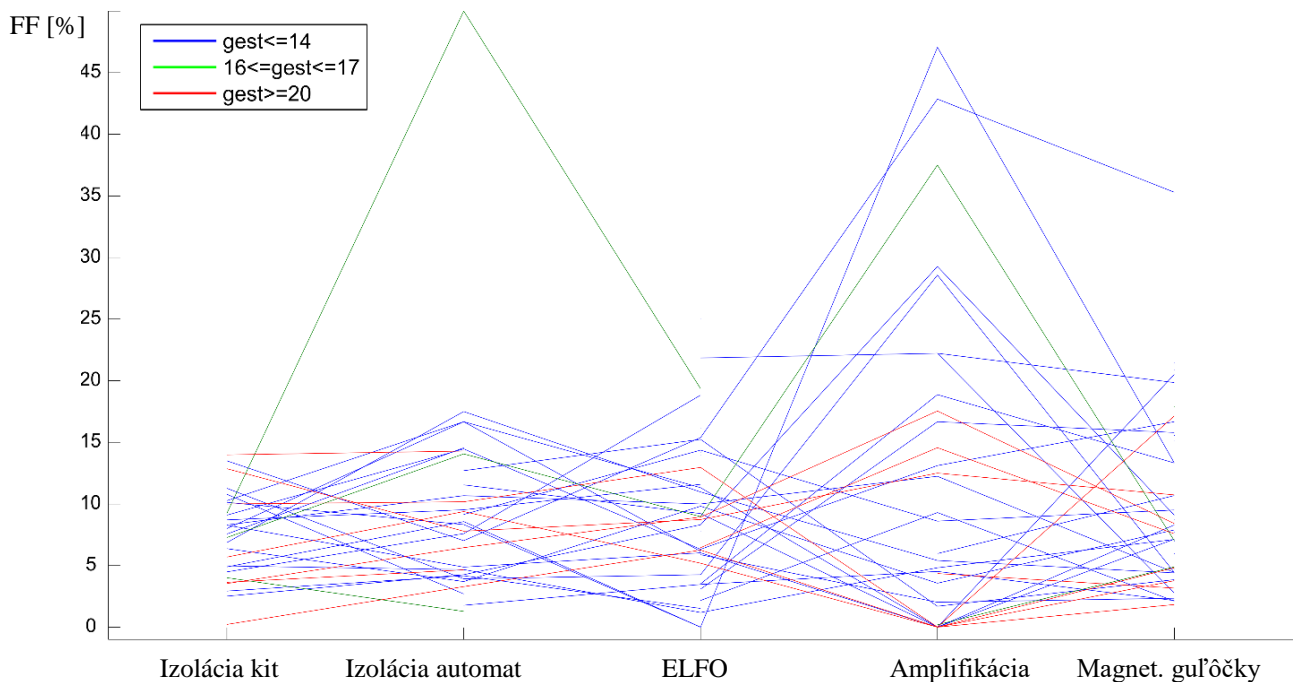
P.k.X	Izolácia kit	Izolácia automat	ELFO	Amplifikácia	Magnet. guľôčky
Izolácia kit	1.00	0.71	0.27	0.78	0.67
Izolácia automat		1.00	0.43	0.58	0.69
ELFO			1.00	0.65	0.71
Amplifikácia				1.00	0.65
Magnet. guľôčky					1.00

Tabuľka 9: Korelácie jednotlivých metód pri meraní počtu kópií chromozómov Y prepočítaných na 1 ml plazmy.

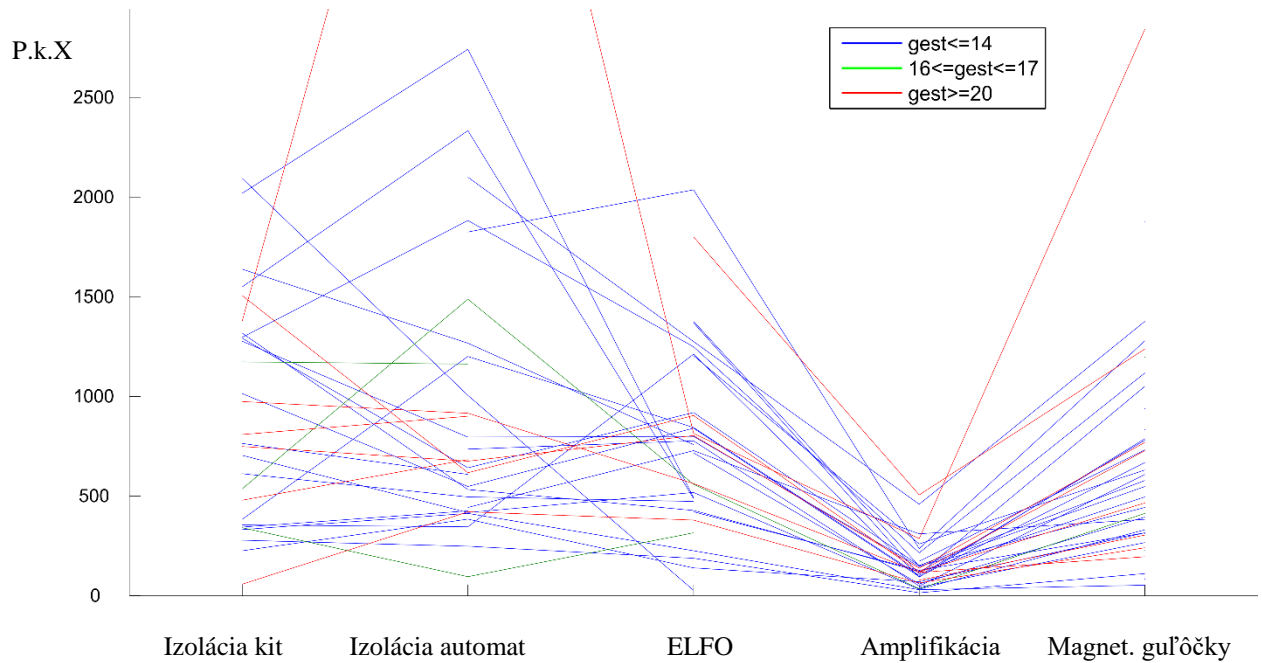
P.k.Y	Izolácia kit	Izolácia automat	ELFO	Amplifikácia	Magnet. guľôčky
Izolácia kit	1.00	0.20	0.08	0.11	0.21
Izolácia automat		1.00	0.12	-0.28	0.04
ELFO			1.00	0.15	0.31
Amplifikácia				1.00	0.46
Magnet. guľôčky					1.00

V nasledujúcich grafoch (č. 5–7) sú znázornené testovanými metódami namerané hodnoty fetálnych frakcií a počtov kópií chromozómov X a Y v jednotlivých vzorkách s farebným označením krivky podľa gestačného veku, v ktorom boli vzorky odobraté. Keďže bol testovaný iba malý počet vzoriek, nenachádzame v našich výsledkoch štatisticky významnú koreláciu medzi výškou fetálnej frakcie a gestačným vekom. V grafoch č. 6 a 7 však môžeme pozorovať vizuálne zobrazenie štatisticky pozitívnej korelácie metódy s magnetickými guľôčkami s metódou amplifikácie a elektroforézy, kde nedochádza takmer k žiadnemu kríženiu priamok. Ďalej môžeme vidieť v grafe č. 5 vysoký rozptyl hodnôt fetálnych frakcií získaný metódou amplifikácie, čo sa zhoduje aj s najvyššou vypočítanou smerodajnou odchýlkou. V grafoch 6 a 7 je výrazne znížená poloha kriviek pri metóde amplifikácie na rozdiel od ďalších dvoch testovaných obohacovacích metód, čo značí malé množstvo kópií chromozómov po obohatení touto metódou. Štatistické výstupy sa zhodujú s našimi závermi založenými na výpočte priemerných hodnôt a smerodajných odchýlok.

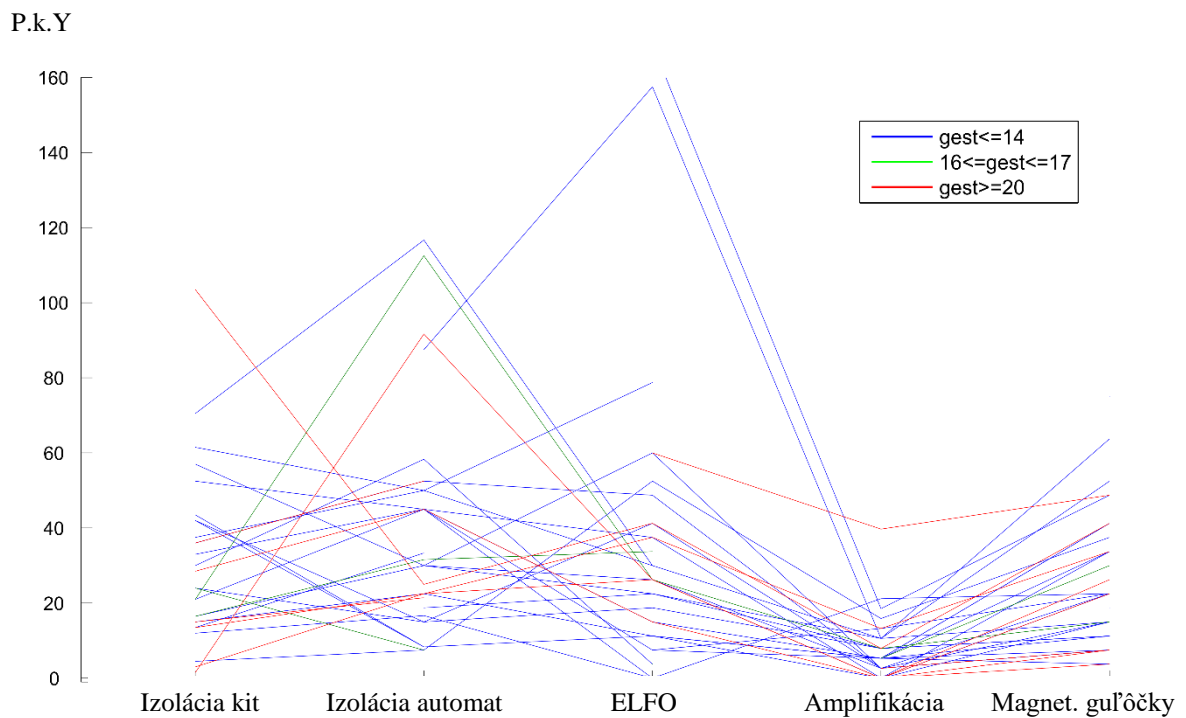
Graf 5: Namerané fetálne frakcie pomocou jednotlivých metód v závislosti na gestačnom veku.



Graf 6: Namerané počty kópií chromozómov X, prepočítané na 1 ml krvnej plazmy, pomocou jednotlivých metód v závislosti na gestačnom veku.



Graf 7: Namerané počty kópií chromozómov Y, prepočítané na 1 ml krvnej plazmy, pomocou jednotlivých metód v závislosti na gestačnom veku.



Z nami získaných výsledkov vyplýva, že najúčinnším testovaným postupom na obohatenie fetálnej frakcie bola metóda využívajúca separáciu na magnetických guľôčkach. Použitie tejto metódy po izolácii cfDNA z krvnej plazmy matky zvýšilo podiel fetálnej frakcie v priemere o 2,41 % a aj počet kópií chromozómov X a Y bol dostatočný pre potenciálne použitie v neinvazívnom prenatalnom testovaní.

6 DISKUSIA

V predkladanej práci sme sa zamerali na zvýšenie výťažku fetálnej frakcie vo vzorkách krvných plaziem tehotných žien. Percentá fetálnej frakcie spolu s počtom kópií chromozómov fetálneho pôvodu sú rozhodujúcim faktorom pre použitie cffDNA v neinvazívnej prenatalnej diagnostike. cffDNA je zmiešaná s voľnou bunkovou DNA maternálneho pôvodu, ktorá je v omnoho vyššom zastúpení a tvorí interferujúce pozadie pri analýzach. Táto skutočnosť obmedzuje použitie voľnej fetálnej DNA v klinickom testovaní či diagnostike. Preto, pre rozšírenie klinickej aplikácie cffDNA v spoľahlivom rutinnom testovaní je potrebné eliminovať interferenciu pozadia cfDNA maternálneho pôvodu a zvýšiť výťažok cffDNA.

Canic a kol., 2013 vo svojej štúdií potvrdili, že najčastejšou príčinou falošne negatívnych výsledkov v neinvazívnom prenatalnom testovaní je nízka fetálna frakcia. Najaktuálnejšie NIPT protokoly nastavili pre spoľahlivé výsledky testov prahovú hodnotu fetálnej frakcie na 4 %. Napriek tomu, aj keď je fetálna frakcia o niečo vyššia ako 4 %, stále existuje riziko získania falošne negatívnych výsledkov. Z toho dôvodu sa odporúča vykonať obohatenie cffDNA a vylúčiť tak nízky pomer fetálnej frakcie ako potenciálnu príčinu falošne negatívnych výsledkov, aby nebolo potrebné overovať diagnózu prostredníctvom invazívnych metód, ktoré so sebou nesú isté riziko.

Doteraz bolo v rámci neinvazívneho prenatalného testovania opísaných niekoľko pokusov o obohatenie fetálnej cfDNA. Yang a kol., 2017 zaviedli obohacovaciu metódu na báze PCR pre selektívnu amplifikáciu cffDNA. Ďalšia práca od Vonga a kol., 2017 uvádza prípravu jednovláknovej DNA knižnice na obohatenie krátkej cfDNA v maternálnej plazme. Yu a kol., 2014 skúmali prístup založený na použití veľkosti fragmentu DNA ako diagnostického parametra, na rozdiel od generácie testov využívajúcich masívne paralelné sekvenovanie, založené na počítaní sekvencií plazmatickej DNA pochádzajúcej z rôznych genómových oblastí. Rovnako ako vo všetkých spomenutých prácach, aj v našej bola kľúčovým faktorom pri obohacovaní vzoriek pre zefektívnenie neinvazívneho prenatalného testovania rozdielna veľkosť voľnej fetálnej DNA v maternálnej plazme

Prvou nami testovanou metódou bolo obohatenie na základe separácie fragmentov cfDNA v gélovej elektroforéze. Z gélu boli následne vyrezané a extrahované fragmenty zodpovedajúce priemernej dĺžke fragmentov voľnej fetálnej

DNA. Postup bol prevzatý a upravený podľa práce Jorgeza a Bischoff, 2009, ktorí sa vo výskume zamerali na overenie veľkosti fragmentov cirkulujúcej fetálnej DNA, a tým aj na potvrdenie hypotézy o apoptickom pôvode s využitím gélovej elektroforézy a celogenómovej amplifikácie. Výsledky ich práce potvrdili zlepšenie detekcie fetálnych alel v maternálnych vzorkách po gélovej extrakcii, kde viac ako 50 % cfDNA bolo lokalizovaných v rozmedzí veľkostí fragmentov 100–300 bp. V našom experimente sme zvolili rovnaký rozsah vyrezávanej časti gélu, ako uvádzajú títo autori.

Metódu obohatenia fetálnej frakcie pomocou gélovej elektroforézy, ktorú sme využili v našej práci, použili viacerí autori, ako napr. Li a kol., 2005 alebo Liang a kol., 2018, ktorí zvolili rovnaký interval dĺžky fragmentov s pozitívnym výsledkom. Liang a kol. testovali aj menšie intervaly dĺžok v rámci rozhrania 100–300 bp, kde bol ako interval s najvyšším zastúpením cfDNA vyhodnotený úsek dĺžok fragmentov 125–135 bp. Využitie fragmentov tejto veľkosti viedlo k v priemere dvojnásobnému zvýšeniu fetálnej frakcie. Podľa výsledkov našej práce použitie gélovej elektroforézy viedlo k zvýšeniu fetálnej frakcie v priemere o 1 % oproti vzorkám bez obohatenia. Vzorky cfDNA nanášané do agarózového gélu neboli nijak ofarbené pre uchovanie ich kvality. Preto boli kúsky gélu obsahujúce vybrané rozpätie fragmentov vyrezávané "naslepo" podľa pozície vizualizovaného markera molekulovej veľkosti. Tento postup mohol viesť k strate určitého množstva fragmentov pri nepresnom odhade miesta výrezu.

Druhým nami zvoleným obohacovacím postupom bola metóda založená na separácii pomocou magnetických guľôčok. Pracovný postup bol upravený podľa autorov Hu a kol., 2019, ktorí vo svojej práci testovali okrem iného aj správny pomer magnetických guľôčok a cfDNA prinášajúci najlepšie výsledky výťažku fetálnej frakcie. V štúdiu použili rovnako ako my vzorky pacientok s plodom mužského pohlavia. S využitím pomeru s najefektívnejšími výsledkami dosiahli zvýšenie fetálnej frakcie až na $22,6 \pm 6$ %. Pri analýze výsledkov sekvenovaním zaznamenali aj zvýšenie pomeru Y-špecifických amplikónov 1,5–4x. V našom experimente sme touto metódou obohatenia dosiahli najlepšie výsledky. Priemerné zastúpenie fetálnej frakcie dosahovala 9,89 % a priemerný počet kópií chromozómu Y bol taktiež dostatočne vysoký, v priemere 24,73 kópií na 1 ml krvnej plazmy. Naše výsledky nedosahujú až také výrazné hodnoty fetálnych frakcií ako v komentovanej publikácii. Jedným z dôvodov môže byť oveľa väčšie množstvo testovaných vzoriek (902).

Cieľom práce kolektívu Yang a kol., 2017 bolo ustanoviť metódu selektívnej amplifikácie cfDNA v maternálnej plazme a zachovať integritu DNA fragmentov počas amplifikácie a tým zabezpečiť dostatočné množstvo cfDNA spĺňajúce požiadavky rutinného neinvazívneho prenatalného testovania. Molekuly DNA boli amplifikované v jedno-reakčnom systéme bez zohľadnenia ich konkrétnych sekvencií a dĺžok použitím obohatenia založeného na PCR s modifikovanou teplotou denaturácie. Zvolením správneho rozsahu teplôt jednotlivých krokov PCR dosiahli prednostnú amplifikáciu krátkych fragmentov DNA. Výsledky ich práce naznačujú, že fetálna frakcia by sa mala zvyšovať, ak by nedochádzalo k amplifikácii fragmentov dlhších ako 300 bp. Zvolený postup zvýšil výtťažok cfDNA a taktiež zredukoval pozadie tvorené cfDNA materského pôvodu. Metóda má potenciál v NIPT využívajúcom prednostne qPCR a predpokladá zvýšenie citlivosti detekcie aneuploidii.

V našej práci sme použili postup týchto autorov na obohatenie jednej skupiny vzoriek. Keďže v spomínanej publikácii použili pre analýzu gélovú elektroforézu a nevyhodnocovali fetálnu frakciu, nemôžeme výsledky porovnať. Oproti ostatným dvom testovaným metódam sme však tento postup vyhodnotili ako najmenej úspešný. Priemerná hodnota fetálnej frakcie síce vyšla najvyššia, ale s veľmi vysokou smerodajnou odchýlkou. Individuálne výsledné hodnoty boli značne rozptýlené a navyše došlo aj k výraznému poklesu priemerného počtu kópií chromozómu Y a v niektorých vzorkách dokonca k nulovej hodnote. Príčinou môže byť použitie inej polymerázy ako použili Yang a kol.. Namiesto Platinum HiProof Taq polymerázy, ktorá nepotrebuje vysokú teplotu na aktiváciu sme použili Platinum® Taq DNA polymerázu, ktorá vyžadovala aktiváciu pri 94 °C. Preto sme museli zmeniť aj počiatočné teplotné programy v univerzálnej amplifikácii a zaradiť aj renaturačný cyklus. Metóda zahŕňala aj niekoľko purifikačných krokov, pri ktorých nemožné predísť istej strate cfDNA. Sami autori to spomínajú ako jednu z nevýhod, spolu so zdĺhavým procesom pozostávajúcim z viacerých krokov.

Na analýzu výsledkov sme použili digitálnu kvapôčkovú PCR, ktorá prekonáva jeden z dvoch hlavných nedostatkov digitálnej PCR a dokáže uskutočniť niekoľko tisícok PCR v rovnakom čase. El Khattabi a kol., 2016 testovali využitie ddPCR pri neinvazívnej prenatalnej diagnostike trizomií chromozómu 21. Vzhľadom na to, že cfDNA predstavuje malý podiel z celkovej cfDNA v materskej plazme, je potrebné spočítať tisíce molekúl, teda pozitívnych PCR reakcií, aby sa spoľahlivo detegovali

molekuly pochádzajúce z trizomického chromozómu. Čím menšia je fetálna frakcia, tým vyššie množstvo pozitívnych PCR reakcií sa vyžaduje (Lo a kol., 2007). El Khattabi a kol. zdôrazňujú dôležitosť korelácie množstva pozitívnych reakcií s množstvom prôb, čo naznačuje absenciu interferencie. Výber prôb a primerov je kľúčový, musia totiž zachytiť krátke sekvencie, keďže priemerná dĺžka fragmentov voľnej fetálnej DNA je do 300 bp. Podľa výsledkov práce spomínaných autorov je ddPCR sľubnou metódou pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku trizómií, avšak vyžaduje ešte isté modifikácie postupov.

Manokhina a kol., 2014 vo svojej práci využili ddPCR a qPCR pri zisťovaní množstva cfDNA v materskej plazme, s cieľom porovnať tieto dva prístupy. Dáta získané obidvomi metódami vykazovali pozitívnu koreláciu. Na základe faktu, že ddPCR umožňuje kvantifikáciu absolútnych koncentrácií DNA prostredníctvom digitálnych meraní namiesto kalibrácie analógového signálu so štandardnou krivkou, vedci očakávali lepšie výsledky s použitím tejto metódy. Hoci autori označili ddPCR ako citlivejšiu metódu, došlo pri jej použití k mylnému vyhodnoteniu viacerých vzoriek ako falošne-negatívnych na rozdiel od analýzy qPCR. Podľa výsledkov experimentu zhodnotili, že ddPCR je vhodná na analýzu cfDNA v plazme, avšak na to, aby prekonala qPCR sú potrebné viaceré optimalizácie.

Určenie pohlavia plodu je zásadné pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku pohlavne viazaných chorôb. Umožňuje predpovedať fenotyp nenarodeného dieťaťa bez použitia invazívnych diagnostických procedúr. Najbežnejšie používanou technológiou na detekciu DNA špecifickej pre plod mužského pohlavia v maternálnej plazme je qPCR. S využitím tejto metódy pri analýze cfDNA z materskej plazmy v nižšom ako siedmom gestačnom týždni však neboli dosiahnuté spoľahlivé výsledky (Devaney a kol., 2011). D'Aversa a kol., 2018 po prvýkrát dokázali, že ddPCR môže byť použitá v neinvazívnej prenatalnej diagnostike Y chromozómu aj pred siedmym týždňom tehotenstva. Vo všetkých vzorkách maternálnej plazmy bola správne so 100% presnosťou určená prítomnosť *SRY* génu, a to aj v najskoršom gestačnom týždni (4 + 5). Metódu ddPCR ohodnotili ako spoľahlivú a efektívnu pri určovaní pohlavia plodu z krvnej plazmy matky v najskoršom možnom gestačnom veku.

V našej práci sme ddPCR použili pre analýzu vzoriek cfDNA z krvnej plazmy tehotných žien s plodom mužského pohlavia. V takmer všetkých vzorkách bola

detegovaná prítomnosť chromozómu Y, hoci vo vzorkách s nízkou fetálnou frakciou sa nachádzal iba v minimálnom množstve. Na základe nami získaných výsledkov môžeme potvrdiť, že ide o citlivú metódu. Jednoduchý a relatívne rýchly pracovný postup je plusom pri využití tejto metódy v diagnostike na rôznych pracoviskách. Analýza výsledkov je navyše možná ešte v deň experimentu, čo poskytuje možnosť rýchlo informovať lekárov a rodičov, a skrátiť tak dobu neistoty a stresu.

7 ZÁVER

Predkladaná diplomová práca bola zameraná na optimalizáciu postupu extrakcie voľnej fetálnej DNA vhodného pre klinické využitie v rámci prenatalnej diagnostiky. Na experiment bolo použitých 50 vzoriek krvnej plazmy tehotných žien, z ktorých bola izolovaná voľná bunková DNA. Na porovnanie boli vybrané vzorky od žien s plodom mužského pohlavia, pre jednoznačné rozlíšenie chromozómov fetálneho a maternálneho pôvodu. Izolácia bola vykonaná s použitím komerčného kitu a pomocou izolačného automatu. Vzorky izolovanej cfDNA boli s cieľom obohatenia fetálnej frakcie následne upravené tromi metódami. Pomer fetálnej frakcie je dôležitý ukazovateľ pri aplikácii cffDNA v neinvazívnej prenatalnej diagnostike.

Úspešnosť jednotlivých metód bola vyhodnotená pomocou ddPCR. Na základe vyhodnotenia výsledkov fetálnych frakcií a počtov kópií chromozómov Y, ktoré sú rovnako dôležité pre spoľahlivú diagnostiku využívajúcu cffDNA, sa ako najprínosnejšia ukázala metóda obohatenia využívajúca separáciu na magnetických guľôčkach. Testovaný postup zvýšil výtťažok fetálnej frakcie oproti vzorkám, ktoré neboli nijak upravované. Počet kópií chromozómov Y bol taktiež dostatočný pre potenciálnu diagnostiku. Ďalšou testovanou metódou bola metóda založená na separácii pomocou gélovej elektroforézy. Tento spôsob obohatenia zvýšil výtťažok fetálnej frakcie v priemere o 1 % oproti neobohateným vzorkám, došlo však k zníženiu počtu kópií chromozómov Y. Tretí spôsob obohatenia pomocou amplifikácie vybranej dĺžky segmentov nepriniesol želané výsledky. Výsledné hodnoty boli značne rozptýlené a zaznamenali sme aj výrazné zníženie počtu kópií chromozómu Y.

Výsledky získané v rámci riešenia diplomovej práce ukázali, že metóda obohatenia fetálnej frakcie pomocou separácie na magnetických guľôčkach je aplikovateľná pre doplnenie postupu extrakcie cffDNA v klinickej praxi. Ide o jednoduchý, rýchly a finančne nenáročný spôsob obohatenia fetálnej frakcie, vďaka čomu je vhodný pre neinvazívnu prenatalnú diagnostiku inkompatibility krvných skupín a najčastejších aneuploidií pomocou cffDNA.

8 LITERATÚRA

AKOLEKAR R., BETA J., PICCIARELLI G. (2015): Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 45(1): 16-26

ALBERRY M., MADDOCKS D., JONES M., ABDEL HADI M., ABDEL-FATTAH S., AVENT N., SOOTHILL P. W. (2007): Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal Diagnosis* 27(5): 415-418

ALI N., RAMPAZZO R. C. P., COSTA A. D. T., KRIEGER M. A. (2017): Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *BioMed Research International*

AMICUCCI P., GENNARELLI M., NOVELLI G., DALLAPICCOLA B. (2000): Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clinical Chemistry* 46(2): 301-302

Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology [online] [navštívené 11.2.2021] Dostupné z <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/PrenatID30055ES.html>

BOTEZATU I., SERDYUK O., POTAPOVA G., SHELEPOV V., ALECHINA R., MOLYAKA Y., ANANEV V., BAZIN I., GARIN A., NARIMANOV M., KNYSH V., MELKONYAN H., UMANSKY S., LICHTENSTEIN A. (2000): Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. *Clinical Chemistry* 46(1): 1078-1084

BRONKHORST A. J., AUCAMP J., PRETORIUS P. J. (2015): Cell-free DNA: preanalytical variables. *Clinica Chimica Acta* 450: 243-253

BURNHAM P., DADHANIA D., HEYANG M., CHEN F., WESTBLADE L. F., SUTHANTHIRAN M., LEE J. R., VLAMINCK I. (2018): Urinary cell-free DNA is versatile analyte for monitoring infections of the urinary tract. *Nature Communications* 9(1): 2412

BUSTIN S. A., BENES V., GARSON J. A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M. W., SHIPLEY G. L., VANDESOMPELE J., WITTEWER C. T. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55(4): 611-622

CANICK J. A., PALOMAKI G. E., KLOZA E. M., LAMBERT-MESSERLIAN G. M., HADDOW J. E. (2013): The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenatal diagnosis* 33: 667-674

CARLSON L. M., VORA N. L. (2017): Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 44(2): 245-256

D'AVERSA E., BREVEGLIERI G., PELLEGGATTI P., GUERRA G., GAMBARI R., BOTGATTI M. (2018): Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR. *Molecular Medicine* 24: 14

DOMÍNGUEZ-VIGIL I. G., MORENO-MARTÍNEZ A. K., WANG J.Y., ROEHRL M. H. A., BARRERA-SALDANA H. A. (2018): The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget* 9(2): 2912-2922

DRISCOLL D. A., GROSS S. J. (2008): First trimester diagnosis and screening for fetal aneuploidy. *Genetics in Medicine* 10(1): 73-75

EL KHATTABI L. A., ROUILLAC-LE SCIELLOUR CH., LE TESSIER D., LUSCAN A., COUSTIER A., PORCHER R., BHOURI R., NECTOUX J., SÉRAZIN V., QUIBEL T., MANDELBROT L., TSATSARIS V., VIALARD F., DUPONT J .M., (2016): Could digital PCR be an alternative as a non-invasive prenatal test for trisomy 21: A proof of concept study. *Plos One Journal* 11(5)

FIorentino F., BONO S., PIZZUTI F., DUCA S., POLVERARI A., FAIETA M., BALDI M., DIANO L., SPINELLA F. (2017): The clinical utility of genome-wide non invasive prenatal screening. *Prenatal Diagnosis* 37(6): 593-601

FLEISCHHACKER M., SCHMIDT B. (2007): Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1775: 181-232

Fórum zdraví [online] [navštívené 11.2.2021] Dostupné z <https://www.forumzdravi.cz/gynekologie/genetika/255-amniocenteza-a-biopsie-choria>

GAO G., SMITH D. I. (2020): Clinical Massively Paralle Sequencing. *Clinical Chemistry* 66(1): 77-88

GARDINER C., HARRISON P., BELTING M., BOING A., CAMPELLO E., CARTER B. S., COLLIER M. E., COUMANS F., ETTELAIE C., ES N., HOCHBERG F. H., MACKMAN N., RENNERT R. C., THALER J., RAK J., NIEUWLAND R. (2015): Axtracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis-discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day. *Journal of Extracellular Vesicles* 4

GERSON K. D., O'BRIEN B. M. (2018): Cell-free DNA. Screening for single-gene disorders and determination of fetal rhesus D genotype. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 45: 27-39

GORDON S., LANGAKER M. D. (2020): Prenatal genetic screening. StatPearls Publishing

GRENDÁR M., LODERER D., LAUČEKOVÁ Z., ŠVECOVÁ I., HRTÁNKOVÁ M., HORNÁKOVÁ A., NAGY B., ŽÚBOR P., LASABOVÁ Z., DANKO J. (2019):

Uncertainty of fetal fraction determination in Non-Invasive Prenatal Screening by highly polymorphic SNPs. *Journal of Biotechnology* 299: 32-36

HARRAWAY J. (2017): Non-invasive prenatal testing. *Contraception* 46(10): 735-739

HO M. W. (2009): Intercommunication via circulating nucleic acids. *Scientific Societes* 42: 46-48

HU P., LIANG D., CHEN Y., LIN Y., QIAO F., LI H., WANG T., PENG CH., LUO D., LIU H., XU Z. (2019): An enrichment method to increase cell-free fetal DNA fraction and significantly reduce false negatives and test failures for non-invasive prenatal screening: a feasibility study. *Journal of Translational Medicine* 17: 124

CHAN K. C., ZHANG J., HUI A. B., WONG N., LAU T. K., LEUNG T. N., LO K. W., HUANG D. W., LO Y. M. (2004): Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *American Association for Clinical Chemistry* 50(1): 88-92

CHITTY L. S., BIANCHI D. W. (2013): Noninvasive prenatal testing: the paradigm is shifting rapidly. *Prenatal Diagnosis* 33(6): 511-513

CHITTY L. S., GRIFFIN D. R., MEANEY C., BARRET A., KHALIL A., PAJKRT E., COLE T. J. (2011): New aids for the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia: dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 37(3): 283-289

CHIU R. W. K., CHAN K. C. A., GAO Y., LAU V. Y. M., ZHENG W., LEUNG T. Y., FOO CH. H. F., XIE B., TSUI N. B. Y., LUN F. M. F., ZEE B. C. Y., LAU T. K., CANTOR CH. R., LO Y. M. D. (2008): Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(51): 20458-20463

JORGEZ C. J., BISCHOFF F. Z. (2009): Improving Enrichment of Circulating Fetal DNA for Genetic Testing: Size Fractionation Followed by Whole Gene Amplification. *Fetal Diagnosis and Therapy* 25: 314-319

LabMedica [online] [navštívené 11.2.2021] Dostupné z <https://www.labmedica.com/molecular-diagnostics/articles/294777571/liquid-biopsy-potential-tested-with-ddpcr-technology.html>

LEVY B., STOSIC M. (2018): *Traditional Prenatal Diagnosis: Past to Present*. Springer Protocols. Humana Press NY USA

LEWIS A. R., VALLE J. W., MCNAMARA M. G. (2016): Pancreatic cancer: are liquid biopsies ready for prime-time? *World Journal of Gastroenterology* 22(32): 7175-7185

- LI H., JING CH., WU J., NI J., SHA H., XU X., DU Y., LOU R., DONG S., FENG J. (2019): Circulating tumor DNA detection: A potential tool for colorectal cancer management. *Oncology Letters* 17(2): 1409-1416
- LI Y., DI NARO E., VITUCCI A., ZIMMERMANN B., HOLZGREVE W., HAHN S. (2005): Detection of paternally inherited fetal point mutations for β -thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA* 293(7): 843-849
- LIANG B., LI H., HE Q., LI H., KONG L., XUAN I., XIA Y., SHEN J., MAO Y., LI Y., WANG T., ZHAO Y. (2018): Enrichment of the fetal fraction in non-invasive prenatal screening reduces maternal background interference. *Scientific Reports* 8: 17675
- LIAO C., WEI J., LI Q., LI L., LI J., LI D. (2006): Efficacy and safety of cordocentesis for prenatal diagnosis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 93(1): 13-17
- LO Y. M. D., LUN F. M. F., CHAN K. C. A., TSUI N. B. Y., CHONG K. C., LAU T. K., LEUNG T. Y., ZEE B. C. Y., CANTOR CH. R., CHIU R. W. K. (2007): Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(32): 13116-13121
- LO Y. M., CORBETTA N., CHAMBERLAIN P. F., RAI V., SARGENT I. L., REDMAN C. W., WAINSCOT J. S. (1997): Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350(9076): 485-487
- LOGAN J., EDWARDS K., SAUNDERS N. (2009): *Real-Time PCR: Current technology and applications*. Caister Academic Press UK
- LU T., LI J. (2017): Clinical applications of urinary cell-free DNA in cancer: current insight and promising future. *American Journal of Cancer Research* 7(11): 2318-2332
- MANDEL P., MÉTAIS P. (1948): Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Biologie* 3-4: 241-243
- MANOKHINA I., SINGH T. K., PENAHERRERA M. S., ROBINSON W. P. (2014): Quantification of cell-free DNA in normal and complicated pregnancies: Overcoming biological and technical issues. *Plos One Journal* 9(7)
- MARTIGNANO F. (2019): Cell-free DNA: An overview of sample types and isolation procedures. In: CASADIO V., SALVI S. :*Cell-free DNA as Diagnostic Markers Methods and Protocols*. Springer Protocolols. Humana Press NY USA
- Massive Genomics [online] [navštívené 11.2.2021] Dostupné z <https://www.massivegenomics.co.ke/niptprofessional.html>
- NAGATA S. (2005): DNA degradation in development and programmed cell death. *Annual Review of Immunology* 23: 853-875

NAGY B. (2019): Cell-free nucleic acids in prenatal diagnosis and pregnancy-associated diseases. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 30(2): 215-223

ORHANT L., RONDEAU S., VASSON A., ANSELEM O., GOFFINET F., EL KHATTABI L. A., LETURCQ F., VIDAUD D., BIENVENU T., TSATSARIS V., NECTOUX J. (2016): Droplet digital PCR, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the determination of fetal RHD genotype. *Annales de Biologie Clinique* 74(3): 259-277

PAGE K., GUTTERY D. S., ZAHRA N., PRIMROSE L., ELSHAW S. R., PRINGLE J. H., BLIGHE K., MARCHESE S. D., HILLS A., WOODLEY L., STEBBING J., COOMBES R. CH., SHAWJ. A. (2013): Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *Plos One Journal*

PINHEIRO L., EMSLIE K. R. (2018): Basic concepts and validation of digital PCR Measurements. In: KARLIN-NEUMANN G., BIZOUARN F.: *Digital PCR Methods and Protocols*. Springer Protocols. Humana Press NY USA

Radiopaedia [online] [navštívené 19.4.2021] Dostupné z <https://radiopaedia.org/articles/second-trimester-ultrasound-scan?lang=us>

RANUCCI R. (2019): Cell-free DNA: Applications in different diseases. In: CASADIO V., SALVI S. :*Cell-free DNA as Diagnostic Markers Methods and Protocols*. Springer Protocols. Humana Press NY USA

RODECK C. H., NICOLAIDES K. H. (1986): Fetoscopy. *British Medical Bulletin* 42(3): 296-300

SALVI S., GURIOLI G., DE GIORGI U., CONTEDEUCA V., TEDALDI G., CALISTRI D., CASADIO V. (2016): Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *Onco Targets and Therapy* 9: 6549-6559

SNYDER M. W., KIRCHER M., HILL A. J., DAZA R. M., SHENDURE J. (2016): Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell Press* 164(1-2): 57-68

SONEK J, NICOLAIDES K. (2010): Additional first-trimester ultrasound markers. *Clinics in Laboratory medicine* 30(3): 573-592

SORBER L., ZWAENEPOEL K., DESCHOOLMEESTER V., ROEYEN G., LARDON F., ROLFO CH., PAUWELS P. (2017): A comparison of cell-free DNA isolation kits. *The Journal of Molecular Diagnostics* 19: 162-168

SOZZI G., ROZ L., CONTE D., MARIANI L., ANDRIANI F., VERDERIO P., PASTORINO U. (2005): Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *Journal of the National Cancer Institute* 97(24): 1848-1850

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. *Clinica Chimica Acta* 313(1-2): 139-142

STROUN M., MAURICE P., VASIOUKHIN V., LYAUTEY C., LEDERREY J., LEFORT F., ROSSIER A., CHEN X. CH., ANKER P. (2000): The origin and mechanism of circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 906: 161-168

The internet pathology laboratory for medical education [online] [navštívené 11.2.2021]
Dostupné z <https://webpath.med.utah.edu/TUTORIAL/PRENATAL/PRENATAL.html>

TSUI N. B., JIANG P., CHOW K. C., SU X., LEUNG T. Y., SUN H., CHAN K. C. A., CHIU R. W. K., LO Y. M. D. (2012): High resolution size analysis of fetal DNA in the urine of pregnant women by paired-end massively parallel sequencing. *Plos One journal*7(10)

ULRICH B. C., CLOUD P. P. (2018): Cell-free DNA in oncology: gearing up for clinic. *Annals of Laboratory Medicine* 38: 1-8

VONG J. S. L., TSANG J. C. H., JIANG P., LEE W. S., LEUNG T. Y., CHAN K. C. A., CHIU R. W. K., LO Y. M. D. (2017): Single-stranded DNA library preparation preferentially enriches short maternal DNA in maternal plasma. *Clinical Chemistry* 63: 1031-1037

WILSON D., GAGNON A., AUDIBERT F., CAMPAGNOLO C., CARROLL J. (2015): Prenatal Diagnosis Procedures and Techniques to Obtain a Diagnostic Fetal Specimen or Tissue: Maternal and Fetal Risks and Benefits. *SOGC Clinical Practice Guideline* 326: 656-668

XU P., ZOU Y., HUANG S., GAO M., KANG R., XIE H., WANG L., YAN J., GAO Y. (2018): Application of droplet digital PCR for non-invasive prenatal diagnosis of single gene disease in two families. *Zhounghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 35(2): 224-227

XU X., GAN H., LI F., TIAN Q., ZHANG J., LIANG R., LI M., YANG X., WU Y. (2016): A Method to Quantify Cell-Free Fetal DNA Fraction in Maternal Plasma Using Next Generation Sequencing: Its Application in Non-Invasive Prenatal Chromosomal Aneuploidy Detection. *Plos One Journal*

YANG Q., DU Z., SONG Y., GAO S., YU S., ZHU H., REN M., ZHANG G. (2017): Size-selective separation and overall amplification of cell-free fetal DNA fragments using PCR-based enrichment. *Scientific Reports*

YU S. C., CHAN K. C., ZHENG Y. W., JIANG P., LIAO G. J., SUN H., AKOLEKAR R., LEUNG T. Y., GO A. T., VAN VUGT J. M., MINEKAWA R., OUDEJANS C. B. M., NICOLAIDES K. H., CHIU R. W. K., LO Y. M. D. (2014): Size-based molecular

diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111: 8583-8588

9 PRÍLOHY

Príloha 1: Výsledky ddPCR vzoriek bez obohatenia, s výsledkami výpočtov fetálnej frakcie, počtu kópií chromozómov X a Y prepočítané na 1 ml plazmy a koncentrácie prepočítanej na 1 ml plazmy.

Príloha 2: Výsledky ddPCR vzoriek po obohatení testovanými metódami, s výsledkami výpočtov fetálnej frakcie a počtu kópií chromozómov X a Y prepočítané na 1 ml plazmy.

Príloha 1: Výsledky ddPCR vzoriek bez obohatenia, s výsledkami výpočtov fetálnej frakcie, počtu kópií chromozómov X a Y prepočítané na 1 ml plazmy a koncentrácie prepočítanej na 1 ml plazmy.

Vzorka	G. vek	Kit							Automat						
		X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	c [ng.µl ⁻¹]	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	c [ng.µl ⁻¹]
4221	13+3	1 092	25	11 780	4,48	1 638	37,5	0,0754	152	6	12 809	7,59	1 266,67	50	0,045
4136	12+5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4083	13+6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4113	13+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4147	13+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4007	17+0	227	11	12 606	9,24	340,5	16,5	0,0278	12	4	11 998	50	94,74	31,58	0,0052
3994	13+0	1 396	35	15 121	4,89	2 094	52,5	0,1194	134	6	10 654	8,57	1 005	45	0,0437
3976	13+6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3962	13+6	150	8	4 637	10,13	225	12	0,0608	46	2	12 481	8,33	383,33	16,67	0,022
3945	12+6	861	41	10 871	9,09	1 291,50	61,5	0,0346	77	6	11 187	14,46	641,67	50	0,0329
3939	21+4	1 004	69	12 666	12,86	1 506	103,5	0,039	74	3	12 099	7,79	616,67	25	0,021
3922	21+0	499	9	8 035	3,54	748,5	13,5	0,0684	90	3	11 443	6,45	675	22,5	0,0285

Vzorka	G. vek	Kit							Automat						
		X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	c [ng.µl ⁻¹]	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	c [ng.µl ⁻¹]
3482	13+1	-	-	-	-	-	-	-	112	1	14 115	1,77	2 100	18,75	0,0875
3453	12+6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3425	13+0	-	-	-	-	-	-	-	146	7	13 333	9,15	1 825	87,5	0,093
3361	12+5	864	22	6 498	4,97	1 296	33	0,898	251	6	14 874	4,67	1 882,50	45	0,0612
3335	20+4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3311	13+3	-	-	-	-	-	-	-	59	4	11 353	12,7	442,4	30	0,0203
3268	16+1	782	16	7 528	4,01	1 173	24	0,105	155	1	11 510	1,28	1 162,50	7,5	0,0527
3269	13+2	509	29	8 451	10,78	763,5	43,5	0,056	73	1	9 902	2,7	608,33	8,33	0,0249
3259	20+2	539	10	10 361	3,64	808,5	15	0,0484	84	2	13 492	4,65	900	21,43	0,0509
3267	13+4	229	9	13 442	7,56	343,5	13,5	0,0165	51	4	17 299	14,55	425	33,33	0,0132
3238	21+4	319	24	10 380	13,99	478,5	36	0,0218	91	7	14 327	14,29	682,5	52,5	0,019
3233	13+4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3230	16+1	357	14	11 188	7,27	535,5	21	0,0258	119	9	14 945	14,06	1 487,50	112,5	0,0425
3218	13+1	221	16	15 698	13,5	331,5	24	0,0136	55	2	13 903	7,02	412,5	15	0,014

Vzorka	G. vek	Kit							Automat						
		X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	c [ng.µl ⁻¹]	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	c [ng.µl ⁻¹]
3180	21+4	649	19	16 274	5,69	973,5	28,5	0,0224	122	6	16 268	9,38	915	45	0,0303
3111	13+0	408	17	15 451	8	612	21	0,0268	66	6	14 967	16,67	495	45	0,0179
3089	12+5	1 033	47	11 860	8,7	1 549,50	70,5	0,0376	140	7	14 788	9,52	2 333,33	116,67	0,1069
3084	13+4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3055	14+0	1 346	20	14 411	2,93	2 019	30	0,0442	329	7	17 339	4,17	2 741,67	58,33	0,0941
3048	16+6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4239	13+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4275	13+0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4301	13+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4302	12+5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: X – počet kópií chromozómu X v reakcii; Y- počet kópií chromozómu Y v reakcii; N – počet negatívnych reakcií, FF – fetálna frakcia; P. k. X – počet kópií chromozómu X prepočítaný na 1 ml plazmy; P. k. Y - kópií chromozómu Y prepočítaný na 1 ml plazmy; c – koncentrácia cfDNA prepočítaná na 1 ml plazmy

Príloha 2: Výsledky ddPCR vzoriek po obohatení testovanými metódami, s výsledkami výpočtov fetálnej frakcie a počtu kópií chromozómov X a Y prepočítané na 1 ml plazmy.

Vzorka	G. vek	ELFO						Amplifikácia						Magnet. guľôčky					
		X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y
4221	13+3	202	21	11 636	18,83	757,5	78,75	-	-	-	-	-	-	222	8	12 461	6,96	832,5	30
4136	12+5	131	10	14 445	14,18	491,25	37,5	-	-	-	-	-	-	163	5	13 842	5,95	611,25	18,75
4083	13+6	351	8	14 527	4,46	1 316,25	30	-	-	-	-	-	-	250	6	16 270	4,69	937,5	22,5
4113	13+2	74	3	14 641	7,79	25,9	11,25	-	-	-	-	-	-	61	5	13 756	15,15	228,75	18,75
4147	13+2	19	1	11 052	10	71,25	3,75	-	-	-	-	-	-	22	1	14 897	8,7	82,5	3,75
4007	17+0	84	9	14 494	19,35	315	33,75	-	-	-	-	-	-	61	6	16 245	17,91	228,75	22,5
3994	13+0	7	0	440	0	26,25	0	-	-	-	-	-	-	500	20	14 867	7,69	1 875	75
3976	13+6	86	2	14 102	4,55	322,5	7,5	-	-	-	-	-	-	83	7	15 289	15,56	311,25	26,25
3962	13+6	37	0	19 675	0	138,75	0	26	8	13 782	47,06	68,85	21,18	84	6	14 737	13,33	315	22,5
3945	12+6	245	8	18 810	6,32	918,75	30	57	4	15 015	13,11	150,94	10,59	154	14	14 547	16,67	577,5	52,5
3939	21+4	241	11	18 419	8,73	903,75	41,25	45	3	12 782	12,5	119,16	7,94	194	11	15 877	10,73	727,5	41,25
3922	21+0	214	10	17 214	8,93	802,5	37,5	52	5	13 833	17,54	137,7	13,24	205	9	14 572	8,41	768,75	33,75

Vzorka	G. vek	ELFO						Amplifikácia						Magnet. guľôčky					
		X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y
3879	13+4	323	14	20 254	8,31	1 211,25	52,5	35	6	13 004	29,27	92,68	15,89	210	10	16 962	9,09	787,5	37,5
3854	13+3	138	3	20 750	4,26	517,5	11,25	12	2	12 586	28,57	31,78	5,3	88	2	15 257	4,44	330	7,5
3839	12+5	367	45	21 008	21,85	1 376,25	168,75	56	7	12 602	22,22	148,29	18,54	118	13	14 443	19,85	442,5	48,75
3828	13+1	365	4	17 057	2,17	1 368,75	15	41	2	14 279	9,3	108,57	5,3	280	3	17 028	2,12	1 050	11,25
3775	13+3	224	13	17 057	10,97	840	48,75	36	1	13 378	5,41	95,33	2,64	178	4	14 964	4,4	667,5	15
3763	13+1	213	11	19 675	9,82	798,75	41,25	55	1	13 751	3,57	145,64	2,65	146	6	15 528	7,89	547,5	22,5
3757	13+1	114	6	15 774	10	427,5	22,5	46	3	16 783	12,24	121,81	7,94	132	3	15 701	4,44	495	11,25
3755	13+1	50	3	14 621	11,32	187,5	11,25	15	0	13 921	0	14,56	0	35	4	13 971	20,51	110,25	15
3747	12+5	112	2	14 604	3,51	420	7,5	48	5	14 042	18,87	127,1	13,24	84	6	16 725	13,33	315	22,5
3735	21+1	217	7	12 464	6,25	813,75	26,25	108	0	15 721	0	285,98	0	758	7	16 725	1,83	2 842,50	26,25
3723	13+5	225	7	14 877	6,03	843,75	26,25	38	0	13 474	0	100,62	0	208	9	13 806	8,29	780	33,75
3593	20+5	101	7	11 980	12,96	378,75	26,25	24	0	14 092	0	63,55	0	64	6	14 955	17,14	240	22,5
3582	12+4	207	10	13 796	9,22	776,25	37,5	18	0	9616	0	47,664	0	162	6	14 898	7,14	607,5	22,5
3524	13+2	231	7	13 890	5,88	1 203,75	26,25	98	1	11 811	2,02	259,5	2,65	168	2	13 569	2,35	630	7,5

Vzorka	G. vek	ELFO						Amplifikácia						Magnet. guľôčky					
		X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y
3482	13+1	340	6	18 217	3,47	1 275	22,5	173	4	12 257	4,52	458,1	10,59	367	4	16 702	2,16	1 376,25	15
3453	12+6	191	3	20 840	3,09	716,25	11,25	22	2	10 690	16,67	58,26	5,3	105	9	15 930	15,79	393,75	33,75
3425	13+0	543	42	18 724	14,36	2 036,25	157,5	89	4	11 772	8,6	235,67	10,59	341	17	14 479	9,5	1 278,75	63,75
3361	12+5	333	2	20 868	1,19	1 248,75	7,5	81	2	11 981	4,82	214,49	5,3	298	11	14 416	7,12	1 117,50	41,25
3335	20+4	480	16	19 363	6,45	1 800	60	191	15	13 050	14,56	505,77	39,72	330	13	17 342	7,58	1 237,50	48,75
3311	13+3	194	16	20 544	15,24	727,5	60	117	1	14 653	1,69	309,82	2,65	102	2	16 149	3,85	382,5	7,5
3268	16+1	-	-	-	-	-	-	2 021	2	16 027	0,2	5 351,61	5,3	319	8	15 013	4,89	1 196,25	30
3269	13+2	-	-	-	-	-	-	65	2	15 546	5,97	172,12	5,3	195	11	17 218	10,68	731,25	41,25
3259	20+2	-	-	-	-	-	-	45	1	14 296	4,35	119,16	2,65	124	2	16 225	3,17	465	7,5
3267	13+4	-	-	-	-	-	-	16	2	14 687	22,22	42,37	5,3	71	1	17 692	2,78	266,25	3,75
3238	21+4	-	-	-	-	-	-	26	0	13 179	0	77,32	0	81	2	14 705	4,82	303,75	7,5
3233	13+4	114	10	19 545	16,13	427,5	37,5	-	-	-	-	-	-	60	7	14 119	20,9	225	26,25
3230	16+1	149	7	19 770	8,97	558,75	26,25	13	3	17 004	37,5	34,42	7,94	110	4	15 100	7,02	412,4	15
3218	13+1	60	5	21 171	15,38	225	18,75	11	3	14 386	42,86	29,13	7,94	14	3	6 026	35,29	52,5	11,25

Vzorka	G. vek	ELFO						Amplifikácia						Magnet. guľôčky					
		X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y	X	Y	N	FF [%]	P. k. X	P. k. Y
3180	21+4	150	4	19 431	5,19	562,5	15	44	0	13 224	0	116,51	0	52	1	5 938	3,77	195	3,75
3111	13+0	126	4	16 473	6,15	472,5	15	-	-	-	-	-	-	25	3	6 616	21,43	93,75	11,25
3089	12+5	130	8	13 830	11,59	487,5	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3084	13+4	40	3	13 783	13,95	150	11,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3055	14+0	131	1	17 109	1,52	491,25	3,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3048	16+6	32	1	18 050	6,06	100,8	3,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4239	13+2	14	2	12 202	25	52,5	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4275	13+0	234	6	17 938	5	877,5	22,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4301	13+1	74	0	17 938	0	277,5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4302	12+5	55	0	20 569	0	206,25	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: X – počet kópií chromozómu X v reakcii; Y- počet kópií chromozómu Y v reakcii; N – počet negatívnych reakcií, FF – fetálna frakcia; P. k. X – počet kópií chromozómu X prepočítaný na 1 ml plazmy; P. k. Y - kópií chromozómu Y prepočítaný na 1 ml plazmy