

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Natálie Bilíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza NGS dat pro účely neinvazivní
prenatální diagnostiky**

Bakalářská práce

Natálie Bilíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Natálie BILÍKOVÁ**
Osobní číslo: **R21740**
Studijní program: **B0511A030011 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Analýza NGS dat pro účely neinvazivní prenatální diagnostiky**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Literární rešerše v oblasti posouzení fetální frakce DNA u těhotných žen.
2. Literární rešerše v oblasti výpočtu a algoritmu pro rozlišení nejčastějších aneuploidií pomocí cell free fetal DNA.
3. Podrobná literární rešerše v oblasti rozlišení nejčastějších aneuploidií s využitím jednonukleotidových polymorfismů (SNPs).
4. Vlastní analýza cfDNA NGS dat získaných ze studie na Ústavu lékařské genetiky FN Olomouc.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. EIBEN, B., M. KRAPP, H. BORTH, N. KUTUR, P. KREISELMAIER, R. GLAUBITZ, J. DEUTINGER a E. MERZ. Single Nucleotide Polymorphism-Based Analysis of Cell-Free Fetal DNA in 3000 Cases from Germany and Austria. *Ultrasound International Open* [online]. 2015, 01(01), E8-E11. ISSN 2199-7152.
2. KIM, Minjeong, Jai-Hoon KIM, Kangseok KIM a Sunshin KIM. Cost-effective and accurate method of measuring fetal fraction using SNP imputation. *Bioinformatics* [online]. 2018, 34(7), 1086-1091. ISSN 1367-4803.
3. LARSON, Nicholas B., Chen WANG, Jie NA, Ross A. ROWSEY, William Edward HIGHSMITH, Nicole L. HOPPMAN, Jean-Pierre KOCHER a Eric W. KLEE. Improving Single-Nucleotide Polymorphism-Based Fetal Fraction Estimation of Maternal Plasma Circulating Cell-Free DNA Using Bayesian Hierarchical Models. *Journal of Computational Biology* [online]. 2018, 25(9), 1040-1049. ISSN 1557-8666.
4. MCKANNA, T., A. RYAN, S. KRINSHPUN, et al. Fetal fraction-based risk algorithm for non-invasive prenatal testing: screening for trisomies 13 and 18 and triploidy in women with low cell-free fetal DNA. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [online]. 2019, 53(1), 73-79. ISSN 0960-7692.
5. SERAPINAS, Danielius, Evelina BOREIKAITĖ, Agnė BARTKEVIČIŪTĖ, Kristina NORVILAITĖ, Andrius NARBEOVAS a Daiva BARTKEVIČIENĖ. The Level of Free Fetal DNA as Precise Noninvasive Marker for Chromosomal Aneuploidies: First Results from BALTIC Region. *Medicina* [online]. 2020, 56(11). ISSN 1648-9144.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D.
FN – Ústav lékařské genetiky

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Natálie Bilíková

Název práce: Analýza NGS dat pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: aneuploidie, neinvazivní prenatalní testování, volná fetální DNA, fetální frakce, sekvenování nové generace, jednonukleotidový polymorfismus

Počet stran: 54

Počet příloh: 1

Jazyk: český

SOUHRN:

Bakalářská práce se zaměřuje na novou screeningovou metodu tzv. neinvazivní prenatalní vyšetření volné DNA plodu v mateřském séru (NIPT) a na možnost rozlišení nejčastějších aneuploidií, konkrétně trizomie 21 a trizomie 18, pomocí této metody. V rámci bakalářské práce byla bioinformaticky analyzována sekvenační data deseti gravidních pacientek, které podstoupily vyšetření na Ústavu lékařské genetiky FN Olomouc. Získaná sekvenační data obsahovala amplifikované a sekvenované jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) na požadovaných chromozomech. K následné analýze získaných dat byl využit program Microsoft Excel. Sekvenační data byla rozdělena do kategorií podle genotypu plodu a matky a pro jednotlivé SNP byl stanoven počet čtení patřící plodu. Následně byl stanoven celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích. U konkrétních SNPs na chromozomu 21 a 18 byla stanovena fetální frakce. U trizomií se očekává výskyt zvýšené fetální frakce na postiženém chromozomu, díky přítomnosti tří kopií tohoto chromozomu u plodu, namísto dvou. Tato skutečnost byla u značného počtu SNPs na chromozomu 21 a 18 potvrzena.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Natálie Bilíková

Title: NGS data analysis for the purposes of non-invasive prenatal diagnosis

Type of thesis: bachelor

Department: Department of cell biology and genetics, Faculty of Science UP Olomouc

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

The year of presentation: 2024

Keywords: aneuploidy, non-invasive prenatal testing, cell-free fetal DNA, fetal fraction, Next Generation Sequencing, single nucleotide polymorphism

Number of pages: 54

Number of appendices: 1

Language: czech

SUMMARY:

The bachelor thesis focuses on a new screening method called non-invasive prenatal testing of cell-free fetal DNA in maternal serum (NIPT) and on possible identification of the most common aneuploidies, namely trisomy 21 and trisomy 18, using this method. As a part of the bachelor thesis, the sequencing data of ten pregnant patients who underwent medical examination at the Institute of Medical Genetics of the Olomouc Faculty Hospital were bioinformatically analyzed. The obtained sequencing data contained amplified and sequenced single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the desired chromosomes. The Microsoft Excel program was used for subsequent analysis of the obtained data. The sequencing data were divided into categories according to fetal and maternal genotype and the number of reads belonging to the fetus was determined for each SNPs. Subsequently, the total number of reads belonging to the fetus and the number of SNPs on chromosomes in each sample were determined. For specific SNPs on chromosome 21 and 18, the fetal fraction was determined. In trisomies, an increased fetal fraction is expected on the affected chromosome, due to the presence of three copies of this chromosome in the fetus, instead of two. This fact has been confirmed for a significant number of SNPs on chromosome 21 and 18.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. Mgr. Radka Vodičky, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Natálie Bilíková

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce panu prof. Mgr. Radku Vodičkovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné rady při zpracování bakalářské práce. Dále děkuji rodině za podporu během studia.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Aneuploidie	3
3.1.1	Trizomie 21	4
3.1.2	Trizomie 18	6
3.1.3	Trizomie 13	8
3.1.4	Numerické aberace chromozomů X a Y	8
3.2	Prenatální diagnostika	9
3.2.1	Invazivní prenatální diagnostika	9
3.2.1.1	Odběr plodové vody (aminocentéza)	10
3.2.1.2	Odběr choriových klků (CVS)	11
3.2.1.3	Odběr pupečnickové krve (kordocentéza)	12
3.2.2	Neinvazivní prenatální diagnostika	13
3.2.2.1	Ultrazvukové vyšetření plodu	13
3.2.2.2	Screeningové metody	13
3.2.2.2.1	Kombinovaný screening I. trimestru	14
3.2.2.2.2	Neinvazivní prenatální vyšetření volné DNA plodu v mateřském séru	15
3.3	Volná DNA plodu v neinvazivní prenatální diagnostice	16
3.3.1	Fetální frakce	16
3.3.1.1	Metody stanovení fetální frakce	16
3.3.1.1.1	DEFRAG	16
3.3.1.1.2	BAYINDIR	17
3.4	Sekvenování nové generace – <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)	18
3.4.1	Masivní paralelní sekvenování (MPS)	18

3.5	Sekvenační přístupy analýzy cfDNA	20
3.5.1	Náhodné (celogenomové) sekvenování	22
3.5.1.1	Stanovení trizomií pomocí náhodného (celogenomového) sekvenování	22
3.5.1.1.1.1	Z-skóre	23
3.5.2	Cílené sekvenování	24
3.5.2.1	Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)	24
3.5.2.2	Stanovení trizomií pomocí cíleného sekvenování	24
3.5.2.2.1	Digitální analýza vybraných oblastí (DANSR) – algoritmus FORTE ...	24
4	MATERIÁL A METODY	26
4.1	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	27
4.1.1	Rozdělení sekvenčních dat do kategorií podle genotypu plodu a matky	27
4.1.2	Stanovení počtu čtení plodu v kategorii 1	28
4.1.3	Stanovení počtu čtení plodu v kategorii 2	29
4.1.4	Cut-off	30
4.1.4.1	Cut-off 1	30
4.1.4.2	Cut-off 2	30
4.1.4.3	Cut-off 3	31
5	VÝSLEDKY	33
5.1	Kategorie 1	33
5.1.1	Chromozom 21	36
5.1.2	Chromozom 18	39
5.2	Kategorie 2	42
6	DISKUSE	46
7	ZÁVĚR	48
8	LITERATURA	49
9	PŘÍLOHY	54

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	adenin
C	cytosin
cfDNA	volná DNA (anglicky: <i>cell-free DNA</i>)
cffDNA	volná fetální DNA (anglicky: <i>cell-free fetal DNA</i>)
CVS	odběr choriových klků (anglicky: <i>chorionic villus sampling</i>)
DANSR	digitální analýza vybraných oblastí (anglicky: <i>digital analysis of selected regions</i>)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (anglicky: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
Fβ-hCG	volná beta podjednotka lidského choriového gonadotropinu (anglicky: <i>free beta subunit of human chorionic gonadotropin</i>)
G	guanin
hg19	lidský referenční genom 19 (anglicky: <i>human reference genome 19</i>)
K	kontrolní vzorek
MPS	masivní paralelní sekvenování (anglicky: <i>massive parallel sequencing</i>)

NB	nosní kost (anglicky: <i>nasal bone</i>)
NGS	sekvenování nové generace (anglicky: <i>next generation sequencing</i>)
NIPS	neinvazivní prenatální screening (anglicky: <i>non-invasive prenatal screening</i>)
NIPT	neinvazivní prenatální testování (anglicky: <i>non-invasive prenatal testing</i>)
NT	šijové projasnění (anglicky: <i>nuchal translucency</i>)
P	počet čtení plodu v kategorii 1
PAPP-A	těhotenství asociující plazmatický protein A (anglicky: <i>pregnancy associated plasma protein A</i>)
RhD	antigen D Rh systému
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (anglicky: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SNP ID	identifikátor jednonukleotidového polymorfismu
T	thymin
TT	trojitý test (anglicky: <i>triple test</i>)
T18	vzorek s trizomií 18
T21	vzorek s trizomií 21

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Karyotyp pacienta s volnou trizomií chromozomu 21 (47, XY, +21)

Obrázek 2: Karyotyp pacienta s volnou trizomií 18 (47, XY, +18)

Obrázek 3: Schéma provedení aminocentézy

Obrázek 4: Schéma provedení odběru choriových klků

Obrázek 5: Ultrasonografické markery pozorované v souvislosti s prvotrimestrálním screeningem – šíjové projasnění (NT) a nosní kost (NB)

Obrázek 6: Schéma uvolnění fetální DNA do mateřského krevního oběhu

Obrázek 7: Princip sekvenační platformy Ion Torrent a Illumina

Obrázek 8: Hlavní přístupy sekvenování cfDNA pro prenatální screening fetálních chromozomálních aneuploidií (konkrétně trizomie 21) – náhodné (celogenomové) sekvenování a cílené sekvenování

Obrázek 9: Detekce fetální chromozomální aneuploidie (konkrétně trizomie 21) pomocí náhodného (celogenomového) sekvenování

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomu 21

Graf 2: Fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomu 18

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Kategorie sekvenačních dat podle genotypu plodu a matky

Tabulka 2: Kategorie 1 – stanovení počtu čtení plodu s korekcí na falešně pozitivní signál

Tabulka 3: Kategorie 2 – stanovení počtu čtení plodu s korekcí na falešně pozitivní signál

Tabulka 4: Cut-off určený třemi různými způsoby pro každý vzorek

Tabulka 5: Kategorie 2 – stanovení podílu čtení z daného nukleotidu oproti všem čtením

Tabulka 6: Stanovení hodnoty cut-off 3

Tabulka 7: Kategorie 1 – celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích

Tabulka 8: Stanovení fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomech 21 a 18

Tabulka 9: Fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomu 21

Tabulka 10: Chromozom 21 - stanovení procentuálního nárůstu fetální frakce při porovnání kontrolních vzorků se vzorkem s trizomií 21

Tabulka 11: Fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomu 18

Tabulka 12: Chromozom 18 - stanovení procentuálního nárůstu fetální frakce při porovnání kontrolních vzorků se vzorkem s trizomií 18

Tabulka 13: Kategorie 2 - celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení cut-off 1

Tabulka 14: Kategorie 2 - celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení cut-off 2

Tabulka 15: Kategorie 2 - celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení cut-off 3

1 ÚVOD

Prenatální diagnostika představuje soubor metod a postupů, které poskytují informace o zdravotním stavu plodu. V posledních letech se populární metodou využívanou v prenatální diagnostice stalo neinvazivní prenatální vyšetření volné DNA plodu v mateřském séru (NIPT).

Neinvazivní prenatální vyšetření volné DNA plodu v mateřském séru je nová metoda screeningového vyšetření, která umožňuje zjištění specifických vrozených vývojových vad plodu již od 10. týdne gravidity. Jedná se o sofistikovaný krevní test, při kterém se ze vzorku krve těhotné ženy izoluje volná DNA plodu.

Hlavními výhodami neinvazivního prenatálního vyšetření volné DNA plodu je citlivost a přesnost této metody, a jelikož se jedná o neinvazivní výkon, je eliminováno riziko fetální ztráty.

V rámci neinvazivního prenatálního vyšetření je využíváno sekvenování nové generace, konkrétně náhodné (celogenomové) sekvenování a cílené sekvenování. Pomocí těchto metod lze rozlišit nejčastější aneuploidie plodu.

2 CÍLE PRÁCE

- 1 Literární rešerše v oblasti posouzení fetální frakce DNA u těhotných žen.
- 2 Literární rešerše v oblasti výpočtu a algoritmu pro rozlišení nejčastějších aneuploidií pomocí cell-free fetal DNA.
- 3 Podrobná literární rešerše v oblasti rozlišení nejčastějších aneuploidií s využitím jednonukleotidových polymorfismů (SNPs).
- 4 Vlastní analýza cfDNA NGS dat získaných ze studie na Ústavu lékařské genetiky FN Olomouc.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Aneuploidie

Aneuploidie je termín, který v roce 1922 zavedl Täckholm. Jedná se o odchylku od normálního počtu chromozomů. Existují různé typy aneuploidií. Mezi nejběžnější aneuploidie patří monozomie, při které v chromozomové výbavě jedince chybí jeden chromozom a trizomie, při které naopak jeden chromozom přebývá. Oba zmíněné typy aneuploidií vznikají nejčastěji chybným rozdělením chromozomů do dceřiných buněk, tzv. nondisjunkcí, v průběhu meiózy. Nondisjunkce může nastat během obou fází meiózy. Za normálních okolností každá gameta nese jeden z páru homologních chromozomů. Pokud dojde k nondisjunkci během meiózy I, získává jedna dceřiná buňka oba homologní chromozomy namísto jednoho, vzniká tzv. dizomická gameta. Druhá dceřiná buňka nedostává žádný chromozom, vzniká tzv. nulizomická gameta. V případě, že k nondisjunkci dojde během meiózy II, dochází k chybnému rozchodu chromatid. Jedna dceřiná buňka dostává dva identické chromozomy (dizomie) a druhá dceřiná buňka je o chromozom připravena (nulizomie). U člověka přibližně 70 % nondisjunkcí vzniká během prvního meioitického dělení a 30 % během druhého meiotického dělení. Po oplození způsobí přítomnost dizomické gamety trizomickou zygotu. Přítomnost nulizomické gamety je příčinou vzniku monozomické zygoty. U živě narozených dětí se mohou vyskytovat tři různé trizomie autozomů, jedná se o trizomii 21, 18 a 13 a numerické aberace chromozomů X a Y (Passarge, 2019).

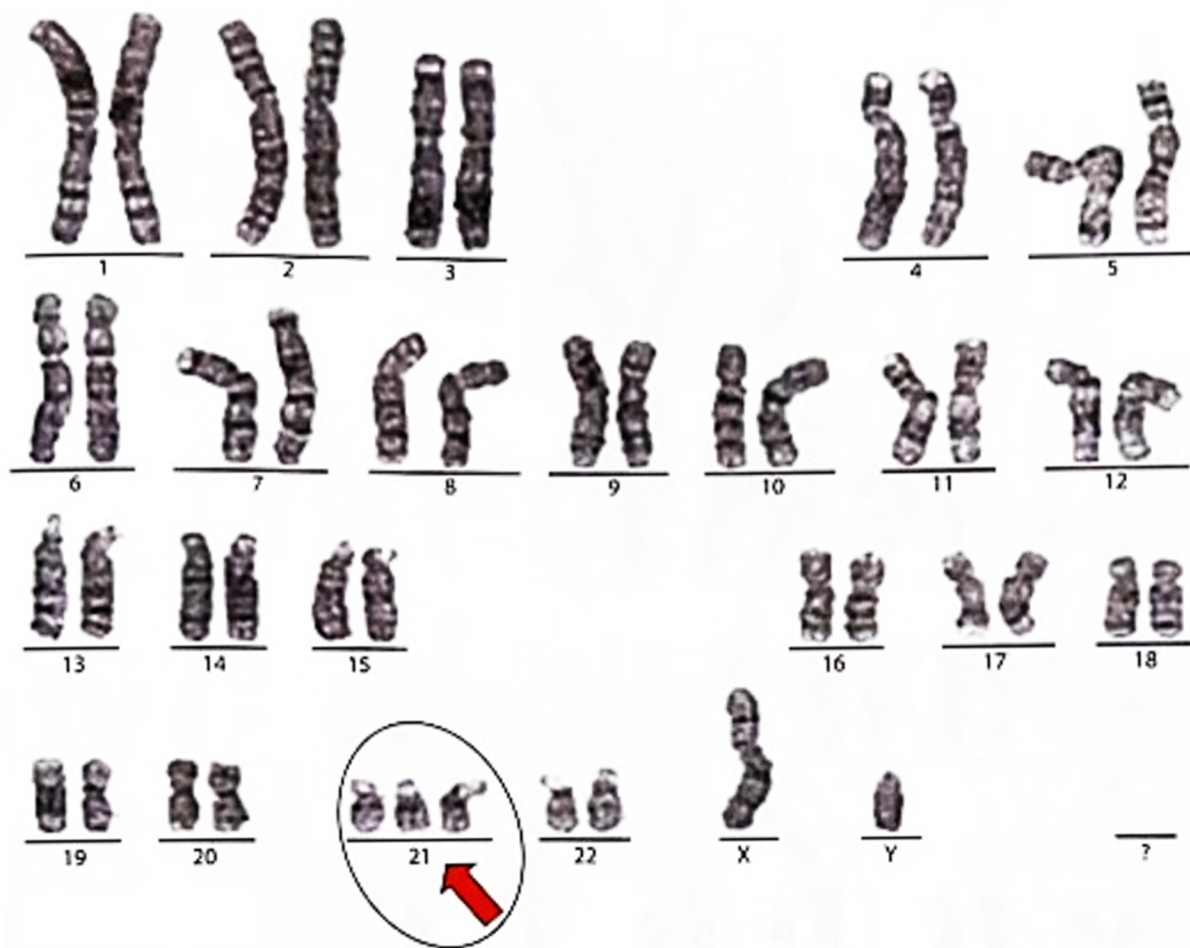
3.1.1 Trizomie 21

Nejběžnější aneuploidií je trizomie chromozomu 21, která způsobuje Downův syndrom. Eponymium syndromu pochází od lékaře Johna Langdona Downa, který popsal klinické aspekty syndromu v roce 1866 (Down, 1866). Karyotyp jedince s Downovým syndromem obsahuje celkem 47 chromozomů. Jedinec s Downovým syndromem má v somatických buňkách, místo dvou, tři chromozomy 21 (obrázek 1). Incidence Downova syndromu je uváděna od 1:650 do 1:800 živě narozených jedinců (Procházka *et al.*, 2018).

Fenotyp Downova syndromu zahrnuje projevy, které postihují zejména muskuloskeletální, neurologický a kardiovaskulární systém. Jedinci s Downovým syndromem mají obvykle malý vzrůst, svalovou hypotonii, atlantoaxiální nestabilitu, sníženou neuronální hustotu, cerebelární hypoplazii, mentální postižení a vrozené srdeční vady, zejména defekty atrioventrikulárního septa (Antonarakis *et al.*, 2020).

Hlavním rizikovým faktorem pro trizomii 21 je pokročilý věk matky (Nagaoka *et al.*, 2012). Toto riziko je spojeno s nondisjunkcí homologních chromozomů nebo chromatid během meiózy při tvorbě oocytů. Tento typ trizomie 21 je nazýván jako volná trizomie 21 (Gruhn *et al.*, 2019). Trizomie 21 se může vyskytovat také jako translokační forma, která vzniká v důsledku translokace 21. chromozomu, nejčastěji vlivem centrické fúze, tzv. Robertsonovy translokace, s jiným akrocentrickým chromozomem (Passarge, 2019). Existuje také mozaiková forma trizomie 21, která vzniká v důsledku mitotické chyby v buňkách rýhujícího se embrya. V 95 % případů je příčinou vzniku Downova syndromu volná trizomie 21 (Procházka *et al.*, 2018).

Trizomie 21 je slčitelná s přežitím až do dospělosti, ale očekávaná délka života jedinců je přibližně poloviční oproti normální populaci. Muži s Downovým syndromem jsou neplodní, u žen je narození potomka výjimečné (Passarge, 2019).



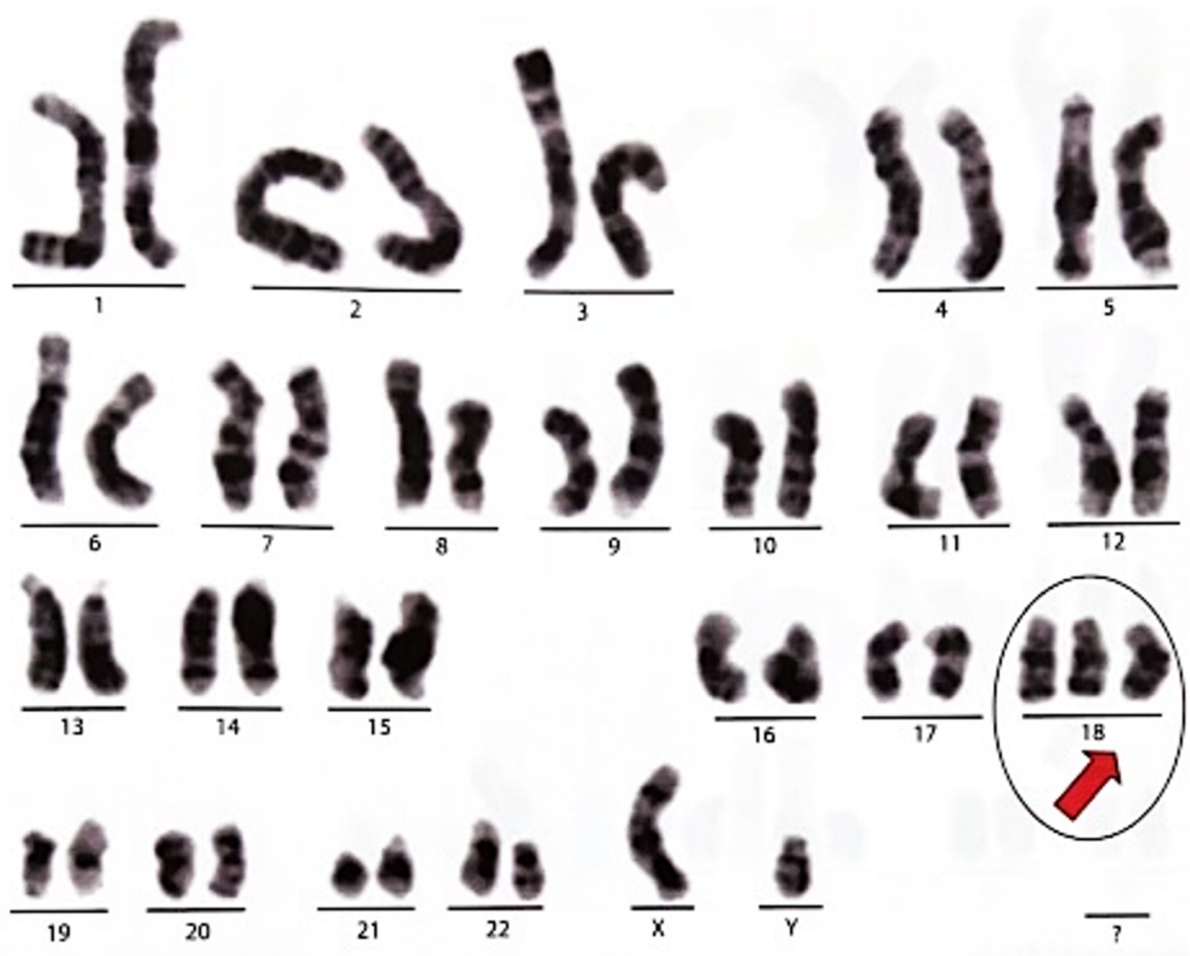
Obrázek 1: Karyotyp pacienta s volnou trizomií chromozomu 21 (47, XY, +21)
 (převzato z: Procházka *et al.*, 2018)

3.1.2 Trizomie 18

Trizomie chromozomu 18, která způsobuje Edwardsův syndrom, je druhou nejpočetnější autozomální aneuploidii po trizomii 21. Karyotyp jedince s Edwardsovým syndromem obsahuje celkem 47 chromozomů. Jedinec s Edwardsovým syndromem má v somatických buňkách, místo dvou, tři chromozomy 18 (obrázek 2). Eponym syndromu pochází od Johna. H. Edwardse, který společně s kolektivem v roce 1960 popsal trizomii chromozomu 18 (Edwards *et al.*, 1960). Ve stejném roce Smith a kolektiv potvrdili, že extra kopie chromozomu 18 je základní příčinu Edwardsova syndromu (Smith *et al.*, 1960).

V současné době je většina případů trizomie chromozomu 18 diagnostikována prenatalně na základě screeningu nebo sonografických abnormalit. Hlavní klinické příznaky pro diagnózu Edwardsova syndromu v prenatalním období zahrnují růstový deficit, zvýšenou tloušťku šíjového projasnění, cystu choroidálního plexu, charakteristické kraniofaciální rysy, výrazné držení ruky (překrývání prstů) a vrozené srdeční vady (Cereda *et al.*, 2012). Prenatální diagnostika trizomie 18 vede u 86 % případů k rozhodnutí o ukončení těhotenství (Irving *et al.*, 2011).

Trizomie 18 se vyskytuje jako volná trizomie nebo jako mozaiková forma. Ve většině případů je příčinou Edwardsova syndromu volná trizomie 18. chromozomu. Incidence Edwardsova syndromu je uváděna od 1:6000 do 1:8000 živě narozených jedinců. 95 % plodů umírá intrauterinně, více přežívají holčičky, které jsou zároveň 4krát častěji postiženy tímto onemocněním. Většina narozených dětí umírá do 1. roku života na kardiální, renální či neurologické komplikace nebo opakované infekce. Někteří jedinci mohou přežít i do dospělosti, v těchto případech se jedná většinou o mozaikovou formu trizomie 18, kde je závažnost klinického obrazu zmírněna přítomností buněčných linií s fyziologickou konstitucí (Procházka *et al.*, 2018).



Obrázek 2: Karyotyp pacienta s volnou trizomií 18 (47, XY, +18)
(převzato z: Procházka *et al.*, 2018)

3.1.3 Trizomie 13

Trizomie chromozomu 13, která způsobuje Patauův syndrom, je třetí nejpočetnější autozomální aneuploidii po trizomii 21 a trizomii 18. Karyotyp jedince s Patauovým syndromem obsahuje celkem 47 chromozomů. Jedinec s Patauovým syndromem má v somatických buňkách, místo dvou, tři chromozomy 13. Trizomii chromozomu 13 popsal genetik Klaus Patau a kolektiv v roce 1960 (Patau *et al.*, 1960).

Patauův syndrom se vyskytuje jako volná trizomie 13, translokační forma trizomie a mozaiková forma trizomie. Přibližně 75 % případů Patauova syndromu je důsledkem volné trizomie 13, která je způsobena nondisjunkcí v meióze a je spojována s pokročilým věkem matky. Přibližně 20 % případů je způsobeno nevyváženou Robertsonovou translokací a vzácně se může vyskytnout i mozaiková forma trizomie (Procházka *et al.*, 2018).

Během prenatálního období dochází k vyvíjení plodu bez fúze prechordálního mezodermu, což má za následek defekty střední čáry (Kruszka *et Muenke*, 2018). Typickými fenotypovými projevy, které lze odhalit během ultrasonografického vyšetření, jsou anomálie centrálního nervového systému, obličejové anomálie (rozštěpy patra), kosterní abnormality, renální a srdeční defekty a omezený růst plodu (Lehman *et al.*, 1995, Watson *et al.*, 2007).

Přibližně 95 % plodů umírá intrauterinně. Incidence Patauova syndromu je uváděna od 1:8000 do 1:15000 živě narozených jedinců. Přibližně polovina narozených dětí umírá do 1. měsíce života a poté 90 % do 1. roku na kardiální, renální a neurologické komplikace (Procházka *et al.*, 2018).

3.1.4 Numerické aberace chromozomů X a Y

Další tělesné odchylky spojené se změnou počtu chromozomů zahrnují nadbytečnou sadu chromozomů, nebo přebývající či chybějící chromozom X, resp. Y. Odchylky od normálního počtu chromozomů X nebo Y se vyskytují s frekvencí přibližně 1:400 a představují přibližně polovinu všech chromozomových aberací. Nejznámější numerická aberace gonozomů je monozomie X, která způsobuje Turnerův syndrom (45, X). Mezi další numerické aberace gonozomů patří nadbytečné chromozomy X nebo Y, které způsobují Klinefelterův syndrom (47, XXY), syndrom supermuže (47, XYY) a syndrom superženy (47, XXX) (Passarge, 2019).

3.2 Prenatální diagnostika

Prenatální diagnostika představuje soubor metod a postupů, které poskytují informace o zdravotním stavu plodu. Jedná se o multidisciplinární obor, ve kterém se prolíná zejména klinická genetika, embryologie, gynekologie a porodnictví, klinická biochemie a zobrazovací metody. Hlavním cílem prenatální diagnostiky je identifikace chromozomálních abnormalit a patologických stavů u plodu (Procházka *et al.*, 2018). Chromozomální abnormality jsou přítomny přibližně u 1 ze 150 narozených dětí (Nussbaum *et al.*, 2007). Mezi nejčastější chromozomální abnormality jsou zahrnuty aneuploidie, nejčastěji se jedná o trizomie chromozomu 21, 18 a 13 a aneuploidie pohlavních chromozomů, dále pak translokace, duplikace a delece (Carlson *et Vora*, 2017).

Na základě zjištěné diagnózy je následně možné přijmout specifická opatření pro další průběh těhotenství a porodu, zahájit prenatální terapii plodu, nebo v případě nepříznivé diagnózy těhotenství uměle ukončit. Mezi nejčastější indikace k prenatální diagnostice patří vyšší věk matky, chromosomální aberace v anamnéze, předchozí dítě s vrozenou chromozomální aberací a abnormality detekované v současné graviditě. Metody prenatální diagnostiky lze rozdělit na invazivní a neinvazivní (Procházka *et al.*, 2018).

3.2.1 Invazivní prenatální diagnostika

Invazivní prenatální diagnostika zahrnuje postupy, které zasahují do děložního prostředí. Při těchto invazivních výkonech dochází k odběru biologické tkáně fetálního původu pro následnou analýzu a stanovení diagnózy. Mezi metody invazivní prenatální diagnostiky se řadí odběr plodové vody tzv. amniocentéza, odběr choriových klků (CVS) a odběr pupečnickové krve tzv. kordocentéza. Hlavní nevýhodou těchto invazivních výkonů je nutný zásah do děložní dutiny, který s sebou přirozeně nese zvýšené riziko fetální ztráty (Monni *et al.*, 2014). Další metodou invazivní prenatální diagnostiky je fetoskopie, která se však v současnosti jako diagnostická metoda již neprovádí, jelikož byla nahrazena moderní ultrazvukovou zobrazovací metodou plodu (Procházka *et al.*, 2018).

3.2.1.1 Odběr plodové vody (aminocentéza)

Odběr plodové vody tzv. aminocentéza je invazivní prenatalní výkon dostupný ve druhém nebo třetím trimestru gravidity, který se provádí po dokončeném 15. týdnu gestace. Tato technika spočívá v zavedení sterilní jehly do plodového vaku a odebrání 15 až 30 ml plodové vody (obrázek 3). Výkon je prováděn pod ultrazvukovou kontrolou (Carlson *et Vora*, 2017). Plodová voda je následně podrobena cytogenetickému a molekulárně genetickému vyšetření. Amniocentéza se nejčastěji provádí za účelem stanovení karyotypu plodu z kultivovaných fetálních a membránových buněk nebo za účelem vyšetření základních aneuploidií (Procházka *et al.*, 2018). Riziko potratu v souvislosti s amniocentézou je dle nejnovějších studií přibližně 1:900 (Akolekar *et al.*, 2015).



Obrázek 3: Schéma provedení aminocentézy

(převzato z: Procházka *et al.*, 2018)

3.2.1.2 Odběr choriových klků (CVS)

Odběr choriových klků (CVS) je prvotrimestrální invazivní výkon, který se provádí mezi 11. a 14. týdnem gestace za účelem vyšetření fetálního karyotypu a molekulárních a biologických abnormalit. Výkon je prováděn pod ultrazvukovou kontrolou a dochází k odběru 5 až 25 mg choriové tkáně (obrázek 4). Choriová tkáň je následně podrobena cytogenetickému a molekulárně genetickému vyšetření. Za hlavní výhodu CVS je považován zisk časnějších výsledků, který umožňuje na základě zjištěné diagnózy dříve přijmout specifická opatření pro další průběh těhotenství nebo těhotenství dříve uměle ukončit (Procházka *et al.*, 2018). Nevýhodou a rizikem odběru choriových klků je tzv. placentární mozaicismus, kdy se přibližně 1 až 2 % získaných výsledků může jevit odlišně než skutečné fetální chromozomální abnormality (Carlson *et Vora*, 2017). Ztráta těhotenství v souvislosti s CVS je podle nejnovějších studií přibližně 1:455 (Akolekar *et al.*, 2015).



Obrázek 4: Schéma provedení odběru choriových klků

(převzato z: Procházka *et al.*, 2018)

3.2.1.3 Odběr pupečnickové krve (kordocentéza)

Odběr pupečnickové krve tzv. kordocentéza je invazivní prenatální výkon prováděný v druhém a třetím trimestru gravidity. Kordocentéza slouží k odběru fetální krve a v současnosti představuje jedinou proceduru, která umožňuje přímý přístup k fetálnímu oběhu. Kordocentéza poskytuje přímé údaje o stavu krve plodu. Nejvhodnější doba pro provedení odběru pupečnickové krve je mezi 17. až 40. týdnem těhotenství (Peddi *et al.*, 2021). Při kordocentéze se zavádí spinální jehla do pupeční žíly v místě odstupu z placenty a odebírá se 1-3 ml fetální krve. Výkon se provádí pod ultrazvukovou kontrolou. Riziko fetální ztráty v souvislosti s kordocentézou se u plodů s malformacemi a omezením růstu pohybuje okolo 3,2 %, u fyziologických plodů se riziko potratu udává okolo 1,25 %. Za hlavní výhodu kordocentézy je považován přímý přístup k plodu, který je využíván pro diagnostické a léčebné úkony. Z důvodu vysokého rizika fetální ztráty se v současnosti odběr pupečnickové krve provádí již pouze při fetální terapii Rh inkompatibility mezi matkou a plodem (Procházka *et al.*, 2018).

3.2.2 Neinvazivní prenatální diagnostika

Mezi neinvazivní prenatální výkony se řadí zejména ultrazvukové vyšetření plodu a screeningové metody. Mezi méně známé neinvazivní prenatální vyšetření patří magnetická rezonance plodu, která je využívána hlavně při diagnostice nitrolebních lézí (Procházka *et al.*, 2018). Neinvazivní prenatální diagnostika, na rozdíl od invazivní prenatální diagnostiky, nepředstavuje zvýšené riziko fetální ztráty.

3.2.2.1 Ultrazvukové vyšetření plodu

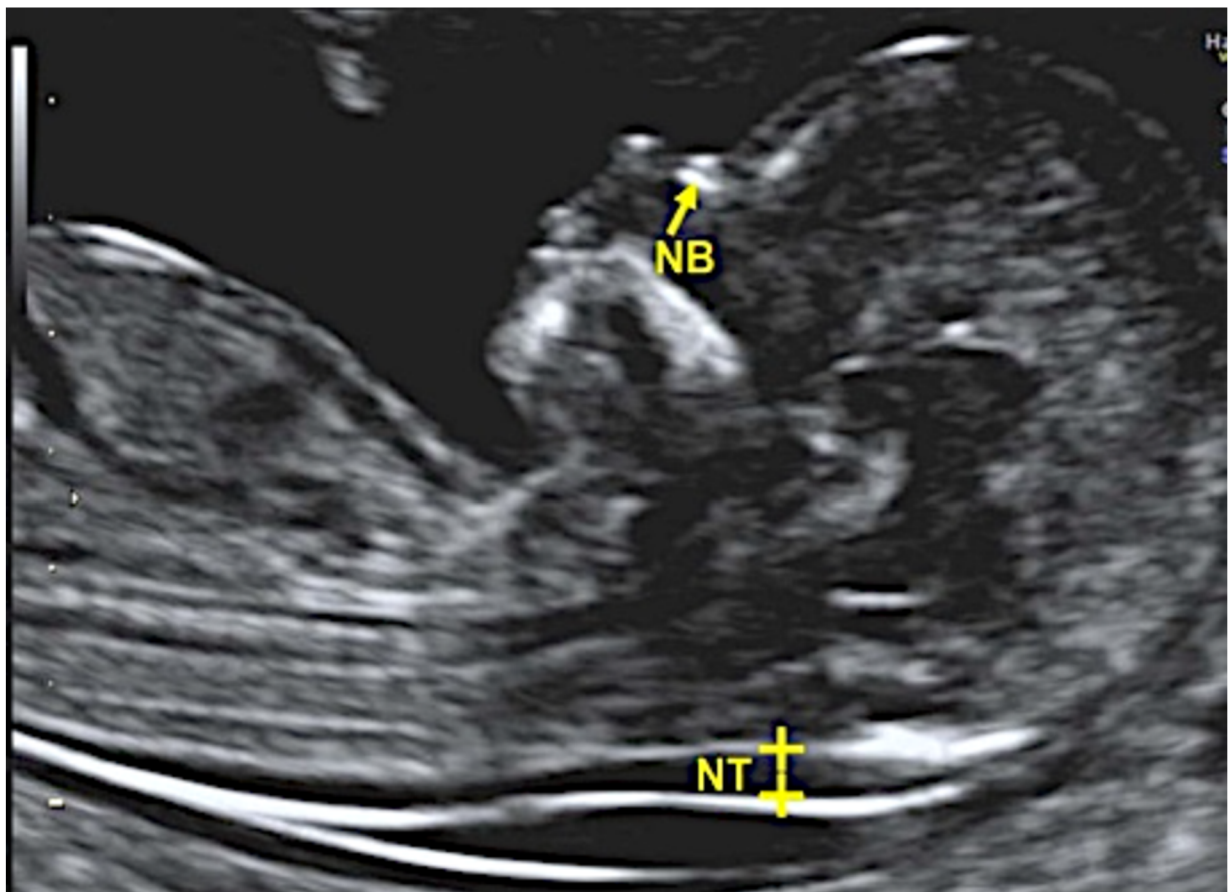
Těhotné ženy mají v ČR garantováno třístupňové screeningové ultrazvukové vyšetření, konkrétně se jedná o ultrazvukové vyšetření plodu do 14. týdne, ultrazvukové vyšetření plodu ve 20. až 22. týdnu a ultrazvukové vyšetření plodu ve 30. až 32. týdnu těhotenství (Procházka *et al.*, 2018). Primární funkcí je vyšetřit plod v děloze matky a vyloučit výskyt anomálií, které se vyskytují v souvislosti s konkrétními aneuploidiemi či chromosomálními defekty. Pokud jsou tyto anomálie pomocí ultrazvuku identifikovány, zvyšuje se přítomnost vady plodu (Carlson *et Vora*, 2017). Ultrazvuk je založen na technologii, kdy snímač přístroje vyzařuje zvukové vlny, které pronikají do těla a odráží se od kostí či orgánů. Po odrazu se vlny o vysoké frekvenci vrací zpět a na obrazovce tvoří obrazy vnitřních částí těla. Ultrazvukové vyšetření umožňuje diagnostikovat u plodu např. poruchy vývoje hlavy, rozštěpy páteře a srdeční vady (dostupné z: <https://www.fetmed.cz/ultrazvukove-vysetreni>).

3.2.2.2 Screeningové metody

Prenatální screening je soubor vyšetření, která jsou prováděna v I. a II. trimestru těhotenství, jejich cílem je zachycení vrozených vývojových vad plodu. V současnosti mezi nejvíce využívané screeningové metody patří kombinovaný screening I. trimestru a nová metoda screeningového vyšetření tzv. neinvazivní prenatální vyšetření volné DNA plodu v mateřském séru. Mezi další metody screeningu patří tzv. triple test (TT), který však není pro svoji nízkou senzitivitu a vysokou falešnou pozitivitu primárně nabízen a integrovaný screening I. a II. trimestru, který integruje výsledky biochemie a ultrazvuku získaných v I. a II. trimestru těhotenství (Procházka *et al.*, 2018).

3.2.2.2.1 Kombinovaný screening I. trimestru

Prvotrimestrální screening je běžně používaný screeningový test, který zahrnuje kombinaci sérového screeningu a ultrasonografického vyšetření. Mezi nejdůležitější ultrasonografické markery pozorované v souvislosti s prvotrimestrálním screeningem patří tloušťka šíjového projasnění (*nuchal translucency* – NT) a přítomnost či nepřítomnost nosní kosti (*nasal bone* – NB) (obrázek 5) (Carlson *et Vora*, 2017). Tloušťka šíjového projasnění větší než 3 mm je významně spojena s výskytem aneuploidií a malformacemi. V rámci studie byla u 35 % plodů s naměřenou tloušťkou šíjového projasnění větší než 3 mm následně potvrzena aneuploidie (Nicolaidis *et al.*, 1992). Optimální gestační stáří plodu pro provedení ultrasonografické části vyšetření je v 11. až 14. týden gravidity. V rámci sérového screeningu se pozorují dva biochemické markery – volná β podjednotka hCG (F β -hCG) a těhotenství asociující plazmatický protein A (PAPP-A). Optimální gestační stáří plodu pro stanovení hodnot biochemických markerů je v 10. až 11. týdnu gravidity (Procházka *et al.*, 2018).



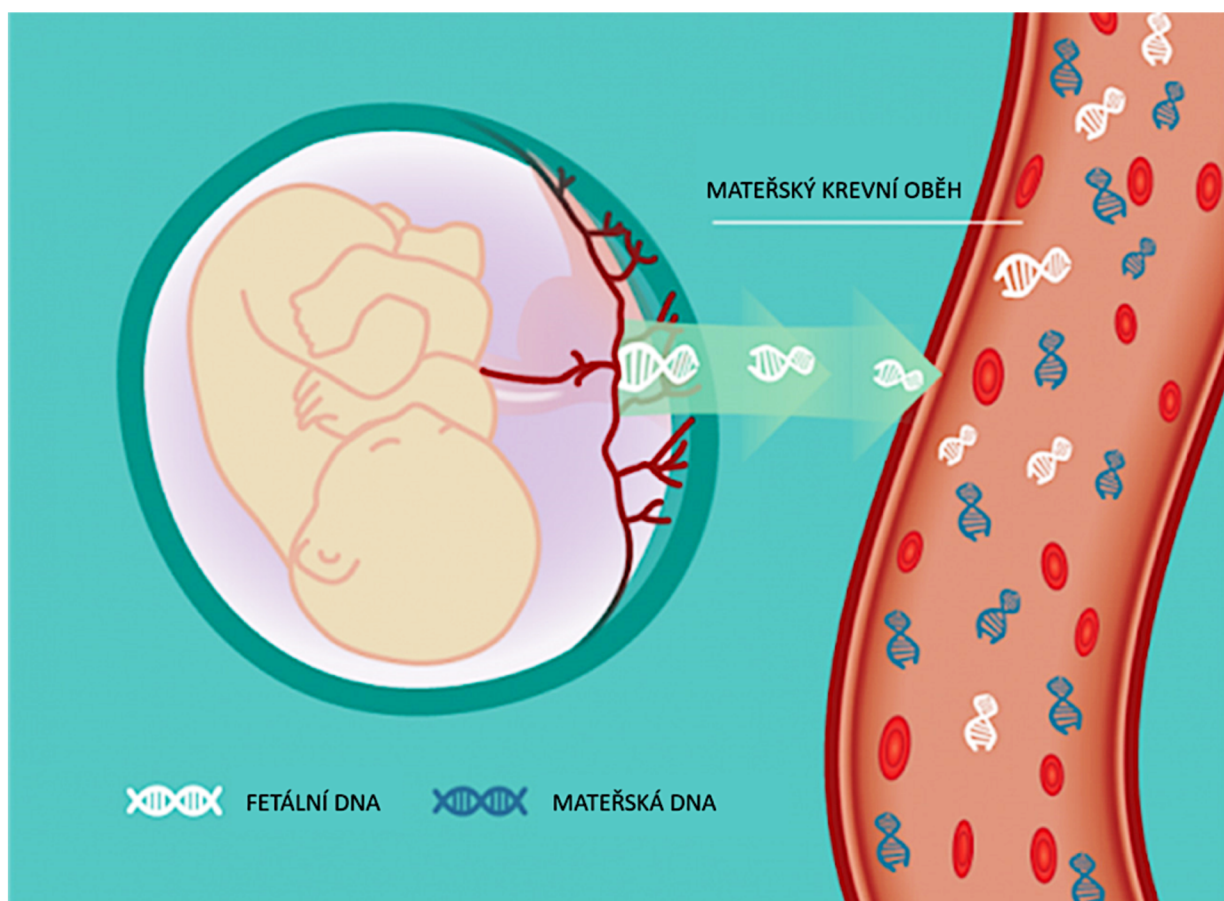
Obrázek 5: Ultrasonografické markery pozorované v souvislosti s prvotrimestrálním screeningem – šíjové projasnění (NT) a nosní kost (NB)

(převzato z: <https://fetalmedicine.org/fmf-certification-2/nuchal-translucency-scan>)

3.2.2.2 Neinvazivní prenatalní vyšetření volné DNA plodu v mateřském séru

V roce 1997 Lo a kolektiv identifikovali volnou DNA plodu (*cell-free fetal DNA* – cffDNA) v mateřském oběhu (obrázek 6) (Lo *et al.*, 1997). Toto zjištění vyvolalo výzkum ve vývoji klinických aplikací založených na analýze tohoto fetálního genetického materiálu a zahájilo novou éru prenatalního testování. Krevní testy, které vyšetřují volnou DNA plodu v periferní krvi matky, se označují jako neinvazivní prenatalní testy (NIPT), případně jako neinvazivní prenatalní screening (NIPS) (Rafi *et Chitty*, 2009, Pös *et al.*, 2019).

Neinvazivní prenatalní testování/screening se zaměřuje zejména na diagnostiku vrozených chromozomálních aberací, stanovení RhD genotypu plodu a stanovení pohlaví plodu (Rafi *et Chitty*, 2009). Tyhle testy byly do praxe zavedeny v roce 2011, jsou citlivější a přesnější než tradiční screening. Testy lze provádět od 10. týdne gravidity a výsledek je znám většinou do týdne (Procházka *et al.*, 2018).



Obrázek 6: Schéma uvolnění fetální DNA do mateřského krevního oběhu

(převzato a upraveno z: <https://www.inancmendilcioglu.com.tr/lang/en/prof-dr-inanc-mendilcioglu-antalya-gebelik-takibi-fetal-dna-analizi.asp>)

3.3 Volná DNA plodu v neinvazivní prenatalní diagnostice

Sekvenční analýza fragmentů volné DNA (cfDNA), které cirkulují v krvi těhotných, spolu s převedením této metody do screeningu fetálních chromozomových abnormalit je úspěšnou metodou neinvazivní prenatalní diagnostiky. Ke konci roku 2017 byla 4 milionům až 6 milionům gravidních žen analyzována DNA z jejich plazmy za účelem screeningu fetálních aneuploidií (Green *et al.*, 2017). Většina testů cfDNA rutinně hodnotí autozomální aneuploidie, zejména trizomii 21, trizomii 18 a trizomii 13 a aneuploidie pohlavních chromozomů (45, X, 47, XXX, 47, XXY a 47, XYY) (Bianchi *et Chiu*, 2018).

3.3.1 Fetální frakce

Analýza cirkulujících fragmentů DNA se provádí ze vzorku krevní plazmy, který obsahuje mateřskou i placentární cfDNA. Poměr placentární a celkové (mateřské a placentární) cfDNA je označován jako fetální frakce (Canick *et al.*, 2013, Rava *et al.*, 2014). Fragmenty fetální DNA v mateřské plazmě jsou primárně placentárního původu a jsou do krve matky uvolňovány z apoptických buněk trofoblastu. Naprostá většina volné DNA v mateřské krvi však pochází od matky. Hladina fetální frakce se zvyšuje s gestačním věkem plodu. Pro spolehlivou analýzu je zapotřebí, aby hladina fetální frakce v mateřském séru byla větší než 4 %. V době provádění NIPT testu, tzn. od 10. týdne gravidity, by měla hladina fetální frakce v mateřském séru přesahovat 10 % (Carlson *et Vora*, 2017).

3.3.1.1 Metody stanovení fetální frakce

3.3.1.1.1 DEFrag

Jedná se o metodu vyvinutou v roce 2017. Metoda DEFrag využívá počet čtení mapovaných na chromozom Y. Tato metoda počítá normalizovaný podíl čtení na chromozomu Y, kdy je fetální frakce ve vzorku určena následujícím způsobem:

$$DEFrag = \frac{\%Y_{XYplod} - \%Y_{XXplod}}{\%Y_{XYmuž}}$$

Ve vzorci $\%Y_{XYplod}$ označuje procento čtení, které je mapováno ke chromozomu Y, $\%Y_{XXplod}$ označuje procento čtení, které je mapováno ke chromozomu Y při 0% mužské DNA a $\%Y_{XYmuž}$ označuje procento čtení, které je mapováno ke chromozomu Y při 100% mužské DNA (van Beek *et al.*, 2017).

3.3.1.1.2 BAYINDIR

Bayindir *et al.* v roce 2015 zavedli metodu, která využívá robustního odhadu počtu čtení na chromozomech X a autozomálních chromozomech. Metoda spočívá v rozdělení genomu na tzv. biny o velikosti 50 kb, pro každý bin je následně určen podíl počtu čtení:

$$BAYINDIR = \frac{med(Chr_{auto}) - med(Chr_X)}{med(Chr_{auto})} * 2.$$

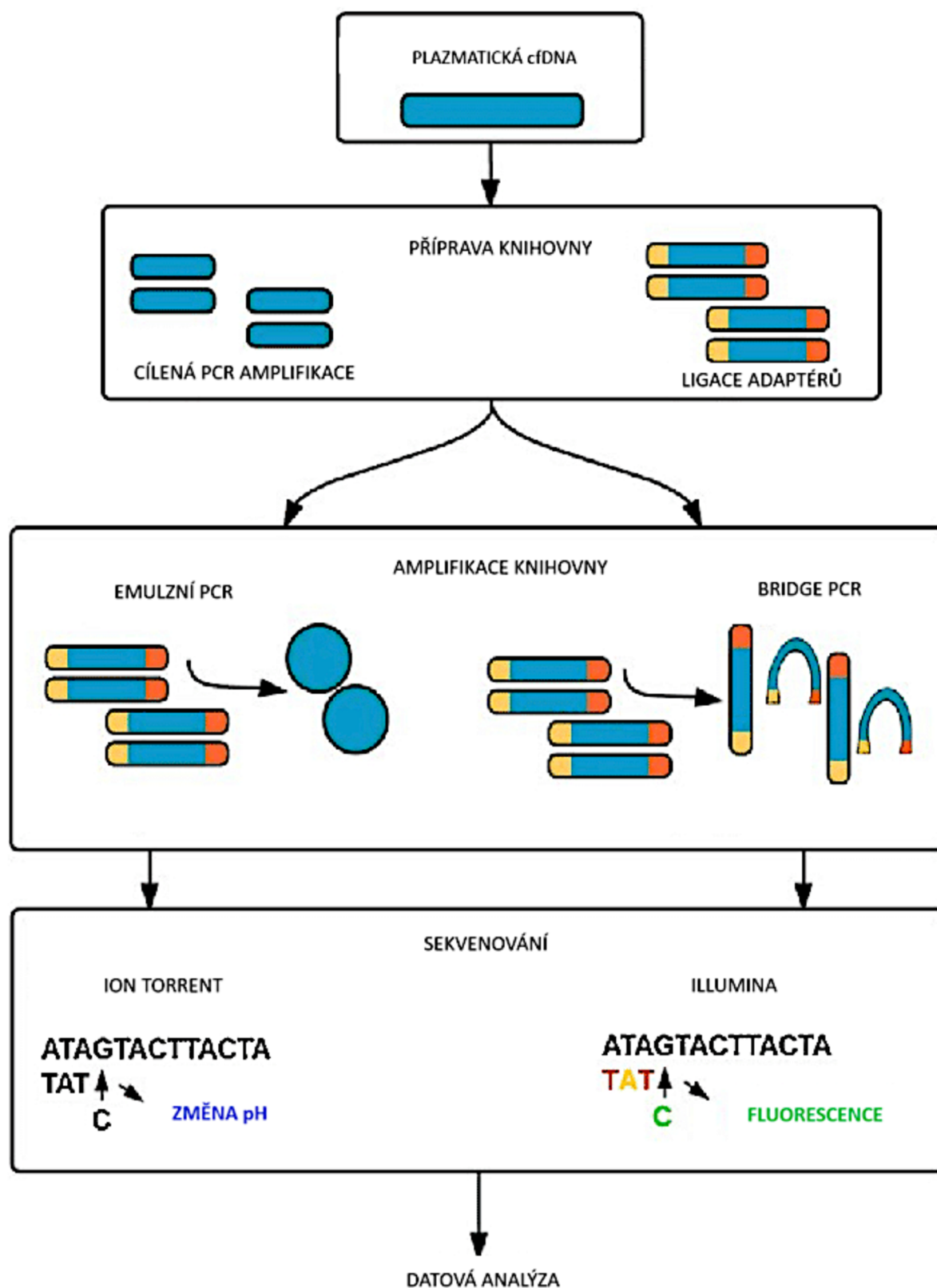
Ve vzorci $med(Chr_{auto})$ představuje medián počtu čtení v binech autozomálních chromozomů a $med(Chr_X)$ představuje medián pro bin na chromozomu X. Bayindir *et al.* navrhli i další metodu, která bere v úvahu pouze oblasti na chromozomu Y. (Bayindir *et al.*, 2015).

3.4 Sekvenování nové generace – *Next Generation Sequencing* (NGS)

Od roku 2005 se objevují kompletně nové sekvenační technologie, které bývají označovány jako *Next Generation Sequencing* (NGS) – sekvenování nové generace. Sekvenování nové generace umožňuje přečíst velké úseky DNA představující celé geny, soubory genů, celé exomy i genomy. To vše v relativně krátkém čase a za výrazně snížených nákladů. Sekvenování nové generace je v současnosti nejpoužívanější metodou analýzy volné fetální DNA z maternální plazmy (Procházka *et al.*, 2018, Passarge, 2019).

3.4.1 Masivní paralelní sekvenování (MPS)

Jedná se o sekvenování nové generace, jehož principem je paralelním čtení milionů až miliard sekvencí DNA. Metodika MPS je založena na přípravě knihovny pomocí fragmentace DNA, ligace adaptérů a amplifikace fragmentů, nebo pomocí přímé multiplexové amplifikace cílových sekvencí. Pro sekvenaci takto připravených knihoven může být použito několik sekvenačních platforem, v současnosti se nejčastěji využívá systém založený na snímání fluorescenčního signálu v průběhu syntézy komplementárního řetězce ke klonálně namnoženému fragmentu DNA (Illumina) a systém využívající detekci změny pH při uvolnění kationtu vodíku v průběhu inkorporace nukleotidu během syntézy komplementárního úseku DNA (Ion Torrent) (obrázek 7). Posledním krokem MPS je bioinformatická analýza získaných sekvenačních dat. Data se softwarově čistí od krajních sekvencí, nekvalitních signálů a polyklonálních signálů. Následně se sekvence navzájem srovnávají do sekvenčních klastrů nebo kontigů a přiřazují se k referenčním sekvencím. Na závěr se vyhodnocují nalezené varianty (Procházka *et al.*, 2018).

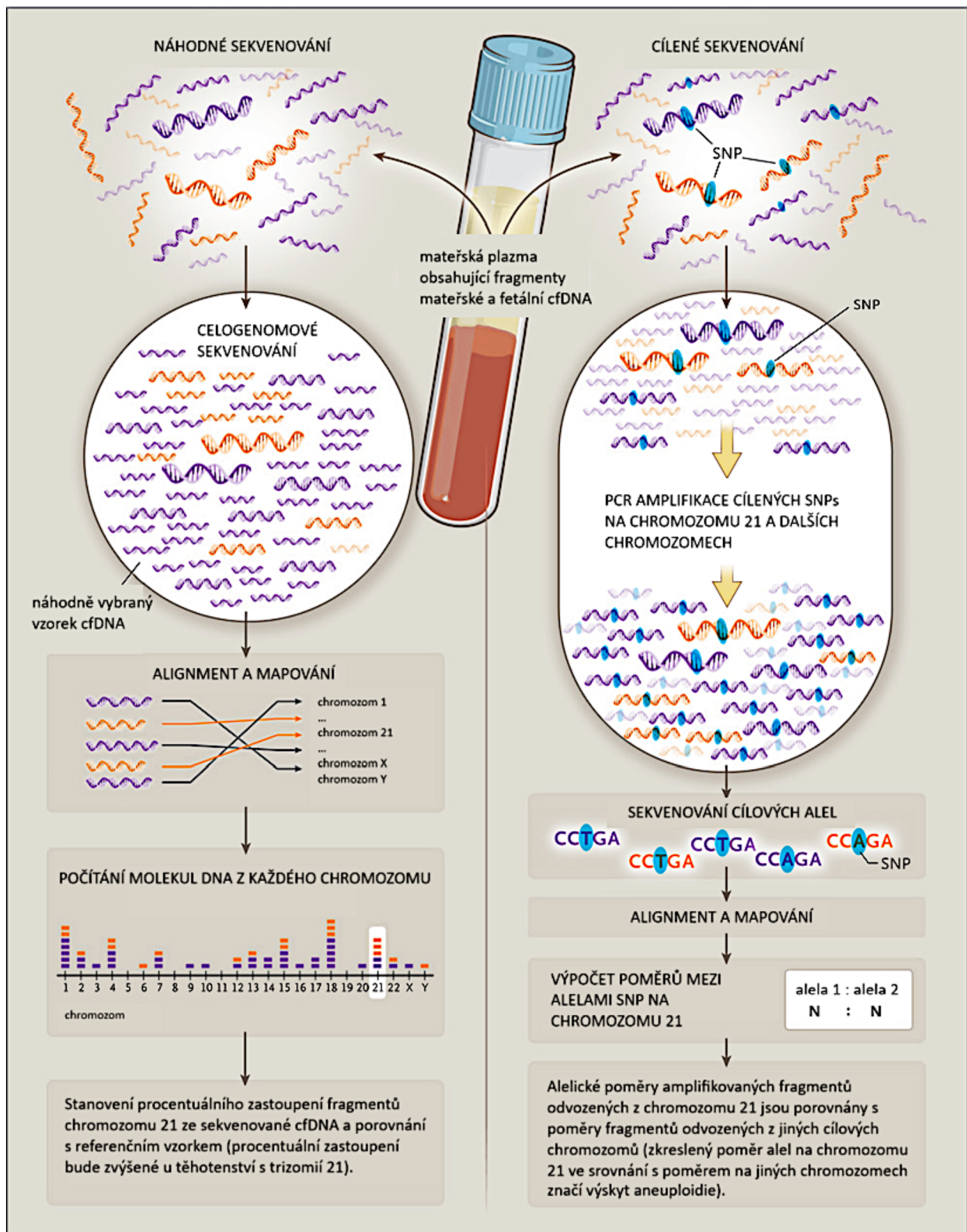


Obrázek 7: Princip sekvenační platformy Ion Torrent (vlevo) a Illumina (vpravo)

(převzato a upraveno z: https://www.researchgate.net/figure/Workflow-of-Ion-torrent-PGM-and-Illumina-MiSeq-NGS-platforms-Adapted-from-Silva_fig2_338289694)

3.5 Sekvenační přístupy analýzy cfDNA

K analýze cfDNA se používají dva základní přístupy – náhodný (celogenomový) a cílený. Při metodě sekvenování celého genomu jsou mateřské a fetální molekuly cfDNA odebírány, sekvenovány a mapovány na specifické chromozomy (Chiu *et al.*, 2008, Fan *et al.*, 2008). Následně se spočítají molekuly DNA patřící různým chromozomům. U těhotenství, která zahrnují plod s trizomií 21, se očekává, že podíl molekul cfDNA odvozených z chromozomu 21 bude vyšší než v referenčním souboru dat založeném na vzorcích od gravidních žen s fyziologickými plody, analogicky je tomu u trizomie 18 a trizomie 13. Při cíleném přístupu se amplifikují a sekvenují jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) na požadovaných chromozomech. Poměry mezi heterozygotními alelami SNPs jsou porovnány s poměry jiných cílových chromozomů. Pokud dojde ke zkreslení poměrů, očekává se výskyt aneuploidie konkrétního chromozomu (obrázek 8) (Vermeesch *et al.*, 2016, Bianchi *et al.*, 2018).

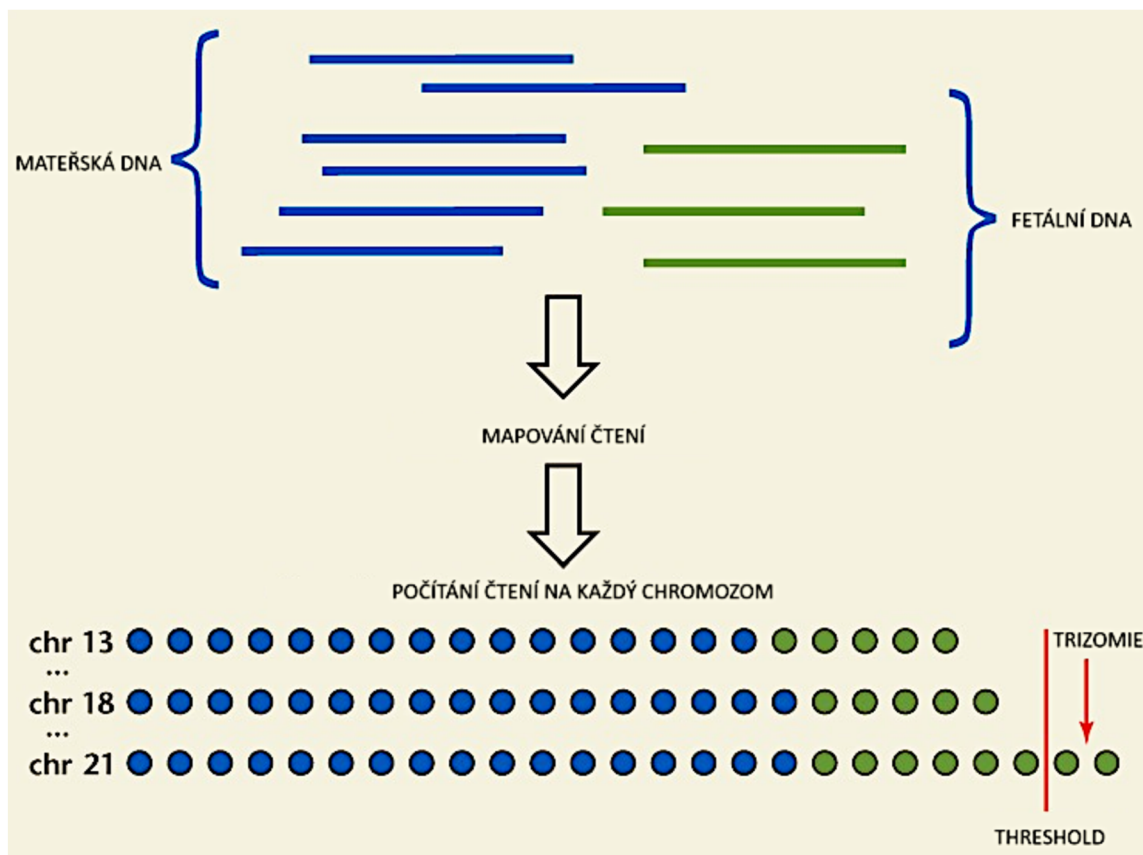


Obrázek 8: Hlavní přístupy sekvenování cfDNA pro prenatální screening fetálních chromozomálních aneuploidií (konkrétně trizomie 21) – náhodné (celogenomové) sekvenování (vlevo) a cílené sekvenování (vpravo) (převzato a upraveno z: Bianchi *et* Chiu, 2018)

3.5.1 Náhodné (celogenomové) sekvenování

3.5.1.1 Stanovení trizomií pomocí náhodného (celogenomového) sekvenování

Náhodné (celogenomové) sekvenování je vysoce výkonná technika, která využívá sekvenování velkého počtu malých sekvencí DNA podél celého genomu. Tento přístup umožňuje rychlé a současné sekvenování desítek milionů krátkých DNA fragmentů, typicky o délce 25-36 bp, v jediném běhu. Po sekvenování cfDNA přítomné v mateřské plazmě jsou fragmenty kategorizovány podle chromozomů. Následně se počet čtení mapovaných na požadované chromozomy porovnává s počtem čtení mapovaných na euploidní referenční chromozomy. Pokud množství chromozomově specifické sekvence překročí práh tzv. threshold, který představuje normální (dizomický) chromozom, je výsledek hlášen jako pozitivní na trizomii pro tento chromozom (obrázek 9). Trizomie má za následek zvýšení množství cfDNA z postiženého chromozomu, díky přítomnosti tří kopií tohoto chromozomu u plodu, namísto dvou. Právě tento rozdíl se náhodné (celogenomové) sekvenování pokouší odhalit (Norwitz *et* Levy, 2013).



Obrázek 9: Detekce fetální chromozomální aneuploidie (konkrétně trizomie 21) pomocí náhodného (celogenomového) sekvenování (zelená – fetální DNA, modrá – mateřská DNA) (převzato a upraveno z: Norwitz *et* Levy, 2013)

3.5.1.1.1 Z-skóre

Z-skóre odráží počet standardních odchylek, kdy je podíl čtení z konkrétního chromozomu, ve srovnání s podílem čtení ze všech ostatních chromozomů, nad průměrem. Pokud množství chromozomově specifické sekvence překročí práh tzv. threshold, je výsledek hlášen jako pozitivní na trizomii pro tento chromozom (Norwitz *et al.*, 2013).

Z-skóre se počítá následujícím způsobem:

$$Z = \frac{p - p_0}{\sqrt{\frac{p_0(1 - p_0)}{n}}}.$$

Ve vzorci hodnota p představuje pozorovaný podíl pro daný požadovaný chromozom, p_0 představuje očekávaný podíl pro daný testovací chromozom vypočítaný jako medián p . Hodnota n je jmenovatel proporční metriky (Sparks, *et al.*, 2012a).

3.5.2 Cílené sekvenování

3.5.2.1 Jednonukleotidový polymorfismus (SNP)

Každý genom se liší od kteréhokoliv jiného genomu variantami v sekvenci nukleotidů DNA. Pokud má varianta v populaci frekvenci 0,01 (1 %) nebo více, nazývá se polymorfismus DNA. Lidské genomy se od sebe liší na úrovni jednonukleotidových polymorfismů (SNPs), což znamená, že se v genomech vyskytují odlišnosti v jednom nukleotidu. Například SNP spojený s přítomností adeninu (A) nebo guaninu (G) se může vyskytovat v jedné ze tří kombinací AA, AG nebo GG. Každý SNP je opatřen jedinečným identifikátorem (SNP ID), např. rs3896732 (Procházka *et al.*, 2018, Passarge, 2019).

3.5.2.2 Stanovení trizomií pomocí cíleného sekvenování

Cílené sekvenování selektivně amplifikuje specifické genomové oblasti zájmu. Schopnost selektivně sekvenovat specifické oblasti genomu v cfDNA umožňuje cílenou analýzu klinicky důležitých chromozomů, jako jsou 13, 18, 21, X a Y. Tato strategie významně snižuje celkový počet analyzovaných čtení se současným zlepšením efektivity a snížením celkových nákladů (Sparks *et al.*, 2012b, Norwitz *et al.*, 2013).

3.5.2.2.1 Digitální analýza vybraných oblastí (DANSR) – algoritmus FORTE

Digitální analýza vybraných oblastí (DANSR) umožňuje vysoce multiplexované sekvenování vybraných lokusů ze specifických požadovaných chromozomů. Riziko trizomie optimalizované pro fetální frakci popisuje analytický algoritmus FORTE, který vypočítává pravděpodobnost fetální trizomie. Algoritmus FORTE odhaduje riziko aneuploidie pomocí poměru šancí, který srovnává model s dizomickým fetálním chromozomem a model s trizomickým fetálním chromozomem:

$$\frac{P[(p - p_0)/T]}{P[(p - p_0)/D]}$$

Ve vzorci hodnota p představuje pozorovaný podíl pro konkrétní vzorek a hodnota p_0 představuje odhadovaný referenční podíl. T označuje trizomický model a D označuje dizomický model (Sparks, *et al.*, 2012a).

Transformací $p - p_0$ na $p - \hat{p}$ získáme rozdíl mezi pozorovaným podílem a upraveným referenčním podílem fetální frakce definovaným pomocí \hat{p} :

$$\hat{p} = \frac{(1 + 0.5f)p_0}{[(1 + 0.5f)p_0] + (1 - p_0)}.$$

Ve vzorci hodnota f představuje fetální frakci pro konkrétní vzorek. Tato úprava vysvětluje předpokládané zvýšené zastoupení trizomického fetálního chromozomu (Sparks, *et al.*, 2012a).

Konečné skóre rizika pomocí algoritmu FORTE je definováno jako:

$$\frac{P[(p - \hat{p})/T]P(T)}{P[(p - \hat{p})/D]P(D)}.$$

Ve vzorci hodnota $P(T)/P(D)$ představuje předchozí riziko trizomie oproti dizomii. Předchozí riziko bylo převzato ze zavedených tabulek zachycujících riziko trizomie spojené s mateřským a gestačním věkem (Nicolaidis, 2003, Sparks, *et al.*, 2012a).

4 MATERIÁL A METODY

V rámci experimentální části mé bakalářské práce byla bioinformaticky analyzována sekvenační data deseti gravidních pacientek, které podstoupily invazivní prenatální vyšetření a zároveň souhlasily s experimentálním neinvazivním vyšetřením volné DNA plodu v mateřském séru (NIPT) na Ústavu lékařské genetiky FN Olomouc. U pěti gravidních pacientek byl jejich plod diagnostikován jako fyziologický, u dalších pěti pacientek jako patologický. U tří plodů byla diagnostikována trizomie 21. chromozomu, tzv. Downův syndrom. U dvou plodů byla diagnostikována trizomie 18. chromozomu, tzv. Edwardsův syndrom. Všechny plody byly mužského pohlaví. Zároveň se vzorkem krevní plazmy, který obsahuje mateřskou i placentární DNA, byla analyzována i referenční DNA matky z lymfocytů periferní krve, která neobsahuje DNA plodu. Pro sekvenování byla použita platforma Ion Torrent. K získání sekvenačních dat byl využit software Torrent Suite. Získaná sekvenační data obsahovala amplifikované a sekvenované jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) na požadovaných chromozomech. Celkově bylo nasekvenováno 317 jednonukleotidových polymorfismů. Každý SNP byl opatřen genomickou koordinátou (hg19) a identifikátorem (SNP ID) (příloha 1). K následné analýze získaných dat byl využit program Microsoft Excel.

4.1 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.1.1 Rozdělení sekvenačních dat do kategorií podle genotypu plodu a matky

Získaná sekvenační data byla roztríděna do tří kategorií podle genotypu plodu a matky. Kategorie 1 představovala situaci, kdy se plod choval pro konkrétní SNP jako heterozygot a matka jako homozygot. Kategorie 2 prozatím představovala dvě situace – situaci, kdy se plod pro konkrétní SNP choval jako homozygot a matka jako heterozygot, a situaci, kdy se plod i matka pro konkrétní SNP chovaly oba jako heterozygoti. Kategorie 3 představovala situaci, kdy se plod i matka pro konkrétní SNP chovaly oba jako homozygoti (tabulka 1).

Princip roztrídění byl založen na počtu čtení jednotlivých nukleotidů. V kategorii 1 měly dva nukleotidy nulový nebo zcela zanedbatelný počet čtení a zbývající dva nukleotidy se od sebe výrazně lišily v počtu čtení. V kategorii 2 měly dva nukleotidy nulový nebo zcela zanedbatelný počet čtení a zbývající dva nukleotidy se od sebe výrazně nelišily v počtu čtení. V kategorii 3 měly tři nukleotidy nulový nebo zcela zanedbatelný počet čtení.

Za situace, kdy se genotyp plodu shoduje s genotypem matky, tzn. plod i matka se pro konkrétní SNP chovají oba jako heterozygoti nebo oba jako homozygoti, nelze stanovit fetální frakci.

Tabulka 1: Kategorie sekvenačních dat podle genotypu plodu a matky

kategorie	genotyp plodu	genotyp matky
1	heterozygot	homozygot
2	homozygot/heterozygot	heterozygot
3	homozygot	homozygot

4.1.2 Stanovení počtu čtení plodu v kategorii 1

V kategorii 1 byla rozlišena čtení patřící plodu (cffDNA) a byl stanoven jejich počet. Počet čtení byl korigován využitím dat z referenčního maternálního genomu, čímž byly zredukovány falešně pozitivní signály. K tomu bylo použito dvanáct vzorců pro genotypy plodu: A/C, A/G, A/T, C/A, C/G, C/T, G/A, G/C, G/T, T/A, T/C a T/G (tabulka 2).

Tabulka 2: Kategorie 1 – stanovení počtu čtení plodu s korekcí na falešně pozitivní signál

genotyp plodu	počet čtení plodu
A/C	$[A_{\text{plazma}} - (C_{\text{plazma}} * A_{\text{ref.mat.genom}} / C_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
A/G	$[A_{\text{plazma}} - (G_{\text{plazma}} * A_{\text{ref.mat.genom}} / G_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
A/T	$[A_{\text{plazma}} - (T_{\text{plazma}} * A_{\text{ref.mat.genom}} / T_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
C/A	$[C_{\text{plazma}} - (A_{\text{plazma}} * C_{\text{ref.mat.genom}} / A_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
C/G	$[C_{\text{plazma}} - (G_{\text{plazma}} * C_{\text{ref.mat.genom}} / G_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
C/T	$[C_{\text{plazma}} - (T_{\text{plazma}} * C_{\text{ref.mat.genom}} / T_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
G/A	$[G_{\text{plazma}} - (A_{\text{plazma}} * G_{\text{ref.mat.genom}} / A_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
G/C	$[G_{\text{plazma}} - (C_{\text{plazma}} * G_{\text{ref.mat.genom}} / C_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
G/T	$[G_{\text{plazma}} - (T_{\text{plazma}} * G_{\text{ref.mat.genom}} / T_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
T/A	$[T_{\text{plazma}} - (A_{\text{plazma}} * T_{\text{ref.mat.genom}} / A_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
T/C	$[T_{\text{plazma}} - (C_{\text{plazma}} * T_{\text{ref.mat.genom}} / C_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$
T/G	$[T_{\text{plazma}} - (G_{\text{plazma}} * T_{\text{ref.mat.genom}} / G_{\text{ref.mat.genom}})] * 2$

4.1.3 Stanovení počtu čtení plodu v kategorii 2

V kategorii 2 byla rozlišena čtení patřící plodu (cffDNA) a byl stanoven jejich počet. Počet čtení byl korigován využitím dat z referenčního maternálního genomu, čímž byly zredukovány falešně pozitivní signály. Jelikož situaci, kdy se plod i matka pro konkrétní SNP chovají oba jako heterozygoti, nelze hodnotit, byla prozatím modelována a počítána pouze situace, kdy se plod pro konkrétní SNP choval jako homozygot a matka jako heterozygot. Sekvenační data byla rozdělena do šesti podkategorií podle genotypů matky (A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T). V každé z podkategorií existovaly dvě varianty, například matka s genotypem A/C může mít plod s genotypem A/A nebo C/C. Po vyzkoušení obou variant genotypů plodu byla získána kladná a záporná hodnota. Správný genotyp plodu byl určen kladnou hodnotou (tabulka 3).

Tabulka 3: Kategorie 2 – stanovení počtu čtení plodu s korekcí na falešně pozitivní signál

genotyp matky	genotyp plodu	počet čtení plodu
A/C	A/A	$A_{\text{plazma}} - (C_{\text{plazma}} * A_{\text{ref.mat.genom}} / C_{\text{ref.mat.genom}})$
	C/C	$C_{\text{plazma}} - (A_{\text{plazma}} * C_{\text{ref.mat.genom}} / A_{\text{ref.mat.genom}})$
A/G	A/A	$A_{\text{plazma}} - (G_{\text{plazma}} * A_{\text{ref.mat.genom}} / G_{\text{ref.mat.genom}})$
	G/G	$G_{\text{plazma}} - (A_{\text{plazma}} * G_{\text{ref.mat.genom}} / A_{\text{ref.mat.genom}})$
A/T	A/A	$A_{\text{plazma}} - (T_{\text{plazma}} * A_{\text{ref.mat.genom}} / T_{\text{ref.mat.genom}})$
	T/T	$T_{\text{plazma}} - (A_{\text{plazma}} * T_{\text{ref.mat.genom}} / A_{\text{ref.mat.genom}})$
C/G	C/C	$C_{\text{plazma}} - (G_{\text{plazma}} * C_{\text{ref.mat.genom}} / G_{\text{ref.mat.genom}})$
	G/G	$G_{\text{plazma}} - (C_{\text{plazma}} * G_{\text{ref.mat.genom}} / C_{\text{ref.mat.genom}})$
C/T	C/C	$C_{\text{plazma}} - (T_{\text{plazma}} * C_{\text{ref.mat.genom}} / T_{\text{ref.mat.genom}})$
	T/T	$T_{\text{plazma}} - (C_{\text{plazma}} * T_{\text{ref.mat.genom}} / C_{\text{ref.mat.genom}})$
G/T	G/G	$G_{\text{plazma}} - (T_{\text{plazma}} * G_{\text{ref.mat.genom}} / T_{\text{ref.mat.genom}})$
	T/T	$T_{\text{plazma}} - (G_{\text{plazma}} * T_{\text{ref.mat.genom}} / G_{\text{ref.mat.genom}})$

4.1.4 Cut-off

Následně byl v kategorii 2 stanoven cut-off, pomocí kterého bylo rozlišeno, zda se plod pro konkrétní SNP chová stále jako homozygotní nebo již jako heterozygotní. Pokud byl plod pro konkrétní SNP na chromozomu vyhodnocen jako heterozygotní, nelze tuhle situaci hodnotit, jelikož se genotyp plodu shoduje s genotypem matky. Cut-off byl určen třemi různými způsoby, pro každý vzorek zvlášť (tabulka 4). V tabulce 4 jsou fyziologické vzorky označeny zeleně, vzorky s trizomií 21 červeně a vzorky s trizomií 18 oranžově.

Tabulka 4: Cut-off určený třemi různými způsoby pro každý vzorek

vzorek	cut-off 1	cut-off 2	cut-off 3
1240	203	203	2,78 %
1755	161	164	6,47 %
1877	98	169	1,51 %
1249	215	389	4,91 %
1830	40	59	0,42 %
3615	79	67	2,79 %
11705	85	38	1,38 %
1806	18	21	0,34 %
1546	87	231	2,56 %
3623	10	15	0,21 %

4.1.4.1 Cut-off 1

Jako cut-off 1 byl stanoven nejmenší počet čtení plodu v kategorii 1. Počty čtení plodu z kategorie 2, menší než nejmenší počet čtení plodu v kategorii 1, nebyly hodnoceny, jelikož u nich nelze stanovit fetální frakci.

4.1.4.2 Cut-off 2

Jako cut-off 2 byl stanoven nejmenší počet čtení na chromozomu Y plodu. Počty čtení plodu, menší než nejmenší počet čtení na chromozomu Y, nebyly hodnoceny, jelikož u nich nelze stanovit fetální frakci.

4.1.4.3 Cut-off 3

Nejprve byl v kategorii 2 stanoven podíl čtení z daného nukleotidu oproti všem čtením. Tento podíl byl stanoven u vzorku krevní plazmy, která obsahuje fetální i mateřskou DNA a u referenční DNA matky. Ke stanovení podílu bylo využito šest vzorců pro heterozygotní genotypy: A/C, A/G, A/T, C/G, C/T a G/T (tabulka 5).

Tabulka 5: Kategorie 2 – stanovení podílu čtení z daného nukleotidu oproti všem čtením

heterozygotní genotyp	podíl čtení z daného nukleotidu oproti všem čtením
A/C	$A/(A+C)$
A/G	$A/(A+G)$
A/T	$A/(A+T)$
C/G	$C/(C+G)$
C/T	$C/(C+T)$
G/T	$G/(G+T)$

V případě referenční DNA matky se očekává podíl čtení 1:1 (50 %). V případě, že se plod i matka pro konkrétní SNP chovají oba jako heterozygoti, se očekává buď stejný nebo velice podobný podíl. V případě, že se plod pro konkrétní SNP chová jako homozygot a matka jako heterozygot, se očekávají rozdílné podíly. Následně byl vypočítán rozdíl získaných podílů – od podílu stanoveného u vzorku krevní plazmy byl odečten podíl stanovený u referenční DNA matky. V případě, že se plod i matka pro konkrétní SNP chovají oba jako heterozygoti, je rozdíl podílů nulový nebo zcela zanedbatelný. V případě, že se plod pro konkrétní SNP chová jako homozygot a matka jako heterozygot, je rozdíl podílů natolik velký, že lze stanovit počet čtení patřící plodu. Získané rozdíly podílů byly převedeny na procenta.

Následně bylo využito počtů čtení plodu v kategorii 1, ze kterých byl spočítán cut-off. K tomu byly použity vzorce uvedené v tabulce 6. Nejmenší získaná hodnota byla stanovena jako cut-off 3.

Tabulka 6: Stanovení hodnoty cut-off 3

(P označuje počet čtení plodu v kategorii 1)

genotyp plodu	cut-off 3
C/A	$[P/(A_{\text{plazma}}-P/2)]*100$
G/A	
T/A	
A/C	$[P/(C_{\text{plazma}}-P/2)]*100$
G/C	
T/C	
A/G	$[P/(G_{\text{plazma}}-P/2)]*100$
C/G	
T/G	
A/T	$[P/(T_{\text{plazma}}-P/2)]*100$
C/T	
G/T	

Případy, kdy rozdíly podílů, které byly převedeny na procenta, jsou menší než cut-off 3 byly považovány za heterozygotní, a tudíž u nich nelze stanovit fetální frakci.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kategorie 1

Pomocí výše uvedených experimentálních a vyhodnocovacích postupů byl pro jednotlivé SNPs v kategorii 1 stanoven počet čtení patřící plodu. Celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích jsou shrnuty v tabulce 7. Fyziologické vzorky jsou v tabulce označeny zeleně, vzorky s trizomií 21 červeně a vzorky s trizomií 18 oranžově.

Tabulka 7: Kategorie 1 – celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích

(počet čtení patřící plodu uvedený v tabulce byl zaokrouhlen na celá čísla)

	vzorek 1240		vzorek 1755		vzorek 1877		vzorek 1249		vzorek 1830		vzorek 3615		vzorek 11705		vzorek 1806		vzorek 1546		vzorek 3623	
	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs
chr1	-	-	-	-	-	-	-	-	398	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr2	1242	4	958	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	356	1	-	-
chr3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr4	-	-	789	1	-	-	-	-	192	1	175	1	-	-	-	-	-	-	-	-
chr5	-	-	-	-	225	1	-	-	803	2	202	1	229	1	114	1	-	-	-	-
chr6	213	1	577	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	190	1	-	-	-	-	34	1
chr9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr12	-	-	-	-	140	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr13	3847	7	6910	7	3912	20	16129	16	2958	12	2541	11	2625	14	1935	15	864	3	489	10
chr14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr17	579	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr18	6197	12	13306	15	5235	18	5489	5	2655	13	2985	12	2154	11	427	6	4331	11	451	6
chr19	-	-	161	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	335	1	-	-	-	-	729	1	-	-
chr21	3178	5	7955	9	3250	11	7751	6	3510	7	5280	16	1805	11	416	6	2974	8	259	6
chr22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chrX	1881	4	3883	3	1183	4	4286	4	620	2	790	3	298	1	183	4	1597	3	84	2
chrY	203	1	2222	6	169	1	389	1	869	6	747	6	434	6	21	1	231	1	15	1

Následně byly analyzovány pouze SNPs na chromozomech 21 a 18, jelikož u tří plodů byla pomocí invazivního prenatalního vyšetření diagnostikována trizomie 21 a u dvou plodů trizomie 18. V rámci statistické analýzy byly z kategorie 1 vybrány SNPs na chromozomech 21 a 18, které splňovaly následující podmínky – SNP byl zastoupen minimálně v jednom z fyziologických vzorků a zároveň minimálně v jednom z patologických vzorků.

Chromozomy 21 a 18 analyzované ve fyziologických vzorcích jsou normální (díizomické), tudíž SNPs na chromozomech 21 a 18 zastoupené ve fyziologických vzorcích sloužily jako kontrolní. Chromozomy 21 a 18 analyzované v patologických vzorcích jsou trizomické. Při analýze SNPs na chromozomu 21 bylo možné za kontrolní SNP považovat SNP, který pocházel ze vzorku s trizomií 18. Při analýze SNPs na chromozomu 18 bylo možné za kontrolní považovat SNP, který pocházel ze vzorku s trizomií 21. Pro konkrétní SNPs na chromozomech 21 a 18 z kategorie 1, které splňovaly výše uvedené podmínky, byla stanovena fetální frakce pomocí vzorců uvedených v tabulce 8.

Tabulka 8: Stanovení fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomech 21 a 18

(P označuje počet čtení plodu v kategorii 1)

genotyp plodu	kontrolní vzorek – fetální frakce	patologický vzorek – fetální frakce
A/C	$P/(A_{\text{plazma}}+C_{\text{plazma}})$	$[P+(1/2*P)]/(A_{\text{plazma}}+C_{\text{plazma}})$
C/A		
A/G	$P/(A_{\text{plazma}}+G_{\text{plazma}})$	$[P+(1/2*P)]/(A_{\text{plazma}}+G_{\text{plazma}})$
G/A		
A/T	$P/(A_{\text{plazma}}+T_{\text{plazma}})$	$[P+(1/2*P)]/(A_{\text{plazma}}+T_{\text{plazma}})$
T/A		
C/G	$P/(C_{\text{plazma}}+G_{\text{plazma}})$	$[P+(1/2*P)]/(C_{\text{plazma}}+G_{\text{plazma}})$
G/C		
C/T	$P/(C_{\text{plazma}}+T_{\text{plazma}})$	$[P+(1/2*P)]/(C_{\text{plazma}}+T_{\text{plazma}})$
T/C		
G/T	$P/(G_{\text{plazma}}+T_{\text{plazma}})$	$[P+(1/2*P)]/(G_{\text{plazma}}+T_{\text{plazma}})$
T/G		

5.1.1 Chromozom 21

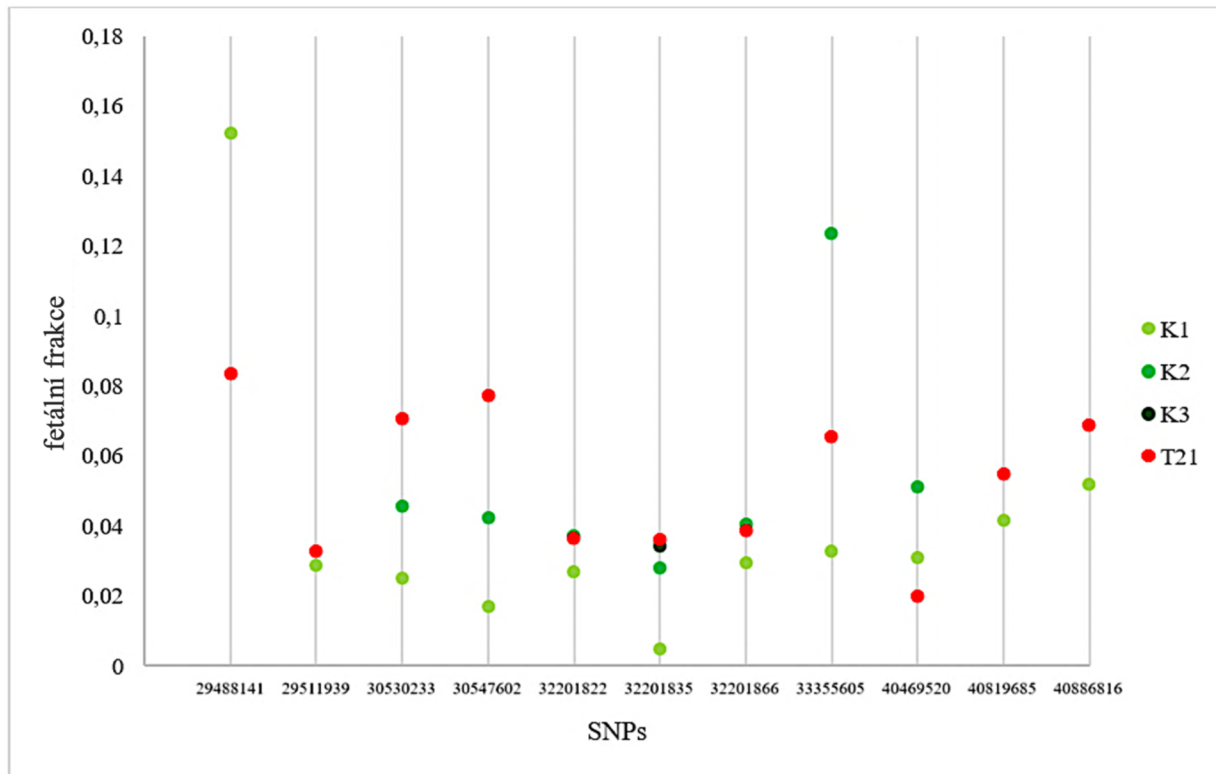
Pro konkrétní SNPs na chromozomu 21, které byly zastoupeny minimálně v jednom z kontrolních vzorků a zároveň minimálně v jednom ze vzorků s trizomií 21, byla stanovena fetální frakce. Stanovené fetální frakce pro tyto SNPs jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomu 21

(hodnoty uvedené v tabulce byly zaokrouhleny na pět desetinných míst)

genomická koordináta SNP (hg19)	kontrolní vzorek – fetální frakce			vzorek s trizomií 21 (T21) – fetální frakce
	K1	K2	K3	
29488141	0,15247	-	-	0,08358
29511939	0,02884	-	-	0,03287
30530233	0,02539	0,04561	-	0,07089
30547602	0,01691	0,04236	-	0,07737
32201822	0,02681	0,03707	-	0,03642
32201835	0,00481	0,02803	0,03431	0,03596
32201866	0,02962	0,04049	-	0,03886
33355605	0,03293	0,12354	-	0,06542
40469520	0,03118	0,05133	-	0,01973
40819685	0,04192	-	-	0,05458
40886816	0,05202	-	-	0,06883

Ze stanovených fetálních frakcí pro konkrétní SNPs na chromozomu 21 byl sestrojen graf (graf 1). V grafu 1 jsou zeleně zaznačeny fetální frakce v kontrolních vzorcích (K1, K2, K3) a červeně jsou zaznačeny fetální frakce ve vzorcích s trizomií 21 (T21).



Graf 1: Fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomu 21

U trizomií 21 se očekává výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21, díky přítomnosti tří kopií tohoto chromozomu u plodu, namísto dvou. V případech, kdy byla fetální frakce ve vzorku s trizomií vyšší než fetální frakce v kontrolních vzorcích (K1, K2, K3), byl stanoven procentuální nárůst fetální frakce, tzn. o kolik procent se zvýšila fetální frakce na chromozomu 21. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10. Případy, kdy byla fetální frakce ve vzorku s trizomií nižší než fetální frakce v kontrolních vzorcích, byly považovány za chybné a nebyly dále hodnoceny (v tabulce 10 jsou tyto případy zvýrazněny červeně).

Tabulka 10: Chromozom 21 - stanovení procentuálního nárůstu fetální frakce při porovnání kontrolních vzorků se vzorkem s trizomií 21

(hodnoty uvedené v tabulce byly zaokrouhleny na celá procenta)

genomická koordináta SNP (hg19)	procentuální nárůst při porovnání K1 a T21	procentuální nárůst při porovnání K2 a T21	procentuální nárůst při porovnání K3 a T21
29488141		-	-
29511939	14 %	-	-
30530233	179 %	55 %	-
30547602	357 %	83 %	-
32201822	36 %		-
32201835	648 %	28 %	5 %
32201866	31 %		-
33355605	99 %		-
40469520			-
40819685	30 %	-	-
40886816	32 %	-	-

Výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21 při porovnání se všemi kontrolními vzorky byl pozorován u šesti z jedenácti SNPs, konkrétně u SNPs s genomickou koordinátou 29511939, 30530233, 30547602, 32201835, 40819685 a 40886816. U SNPs s genomickou koordinátou 32201822, 32201866 a 33355605 byl výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21 pozorován pouze při porovnání K1 a T21. U SNPs s genomickou koordinátou 29488141 a 40469520 nebyl pozorován výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21.

5.1.2 Chromozom 18

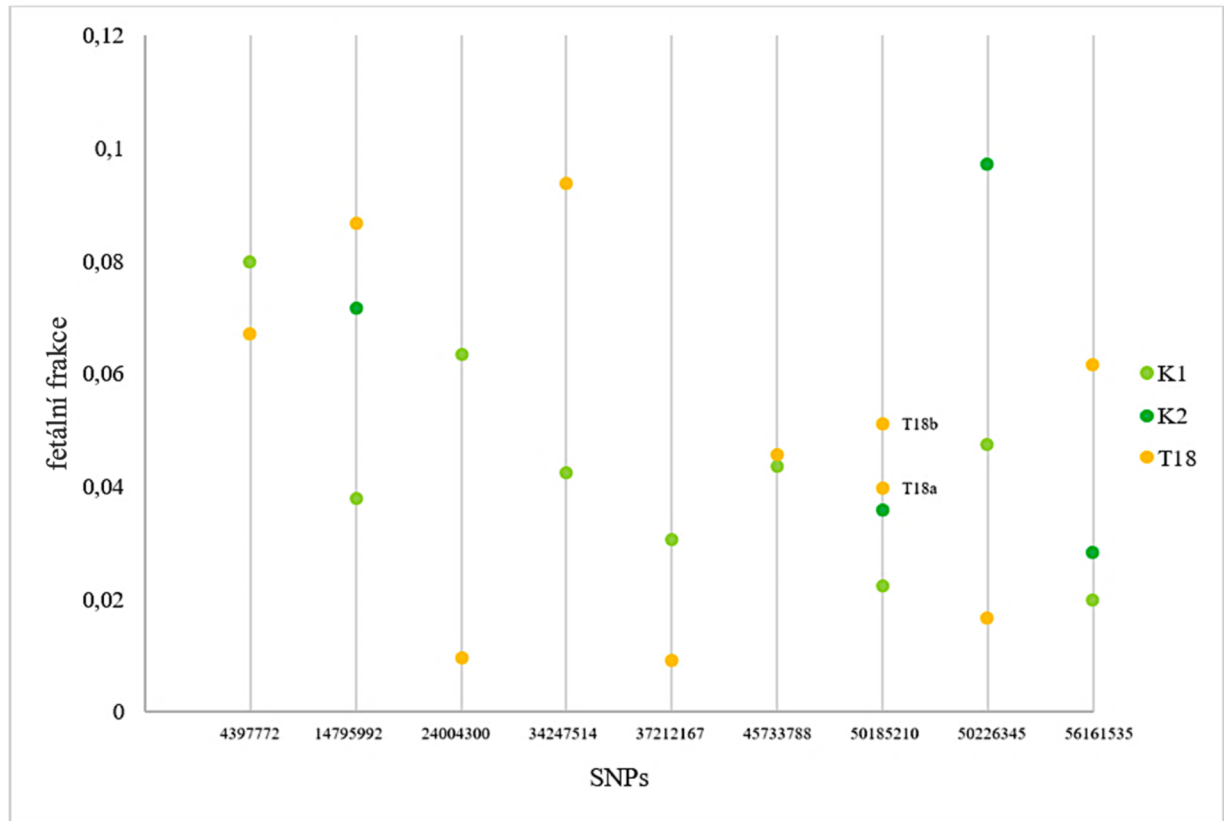
Pro konkrétní SNPs na chromozomu 18, které byly zastoupeny minimálně v jednom z kontrolních vzorků a zároveň minimálně v jednom ze vzorků s trizomií 18, byla stanovena fetální frakce. Stanovené fetální frakce pro tyto SNPs jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11: Fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomu 18

(hodnoty uvedené v tabulce byly zaokrouhleny na pět desetinných míst)

genomická koordináta SNP (hg19)	kontrolní vzorek – fetální frakce		vzorek s trizomií 18 (T18) – fetální frakce
	K1	K2	
4397772	0,07983	-	0,06714
14795992	0,03792	0,07162	0,08679
24004300	0,06339	-	0,00959
34247514	0,04226	-	0,09365
37212167	0,03056	-	0,00923
45733788	0,04344	-	0,04579
50185210	0,02233	0,03581	T18a: 0,03984
			T18b: 0,05125
50226345	0,04729	0,09722	0,01663
56161535	0,01973	0,02845	0,06167

Ze stanovených fetálních frakcí pro konkrétní SNPs na chromozomech 18 byl sestrojen graf (graf 2). V grafu 2 jsou zeleně označeny fetální frakce v kontrolních vzorcích (K1, K2) a oranžově jsou označeny fetální frakce ve vzorcích s trizomií 18 (T18).



Graf 2: Fetální frakce pro konkrétní SNPs na chromozomu 18

U trizomií 18 se očekává výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 18, díky přítomnosti tří kopií tohoto chromozomu u plodu, namísto dvou. V případech, kdy byla fetální frakce ve vzorku s trizomií vyšší než fetální frakce v kontrolních vzorcích (K1, K2), byl stanoven procentuální nárůst fetální frakce, tzn. o kolik procent se zvýšila fetální frakce na chromozomu 18. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 12. Případy, kdy byla fetální frakce ve vzorku s trizomií nižší než fetální frakce v kontrolních vzorcích, byly považovány za chybné a nebyly dále hodnoceny (v tabulce 12 jsou tyto případy zvýrazněny červeně).

Tabulka 12: Chromozom 18 - stanovení procentuálního nárůstu fetální frakce při porovnání kontrolních vzorků se vzorkem s trizomií 18

(hodnoty uvedené v tabulce byly zaokrouhleny na celá procenta)

genomická koordináta SNP (hg19)	procentuální nárůst při porovnání K1 a T18	procentuální nárůst při porovnání K2 a T18
4397772		-
14795992	129 %	21 %
24004300		-
34247514	122 %	-
37212167		-
45733788	5 %	-
50185210	78 % při porovnání s T18a	11 % při porovnání s T18a
	130 % při porovnání s T18b	43 % při porovnání s T18b
50226345		
56161535	212 %	117 %

Výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 18 byl pozorován u pěti z devíti SNPs, konkrétně u SNPs s genomickou koordinátou 14795992, 34247514, 45733788, 50185210 (při porovnání s T18a i T18b) a 56161535. Výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 18 nebyl pozorován u SNPs s genomickou koordinátou 4397772, 24004300, 37212167 a 50226345.

5.2 Kategorie 2

Pomocí výše uvedených experimentálních a vyhodnocovacích postupů byl pro jednotlivé SNPs v kategorii 2 stanoven počet čtení patřící plodu. Celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích jsou shrnuty v tabulkách 13, 14 a 15. V tabulce 13 jsou uvedeny počty čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení hodnoty cut-off 1. V tabulce 14 jsou uvedeny počty čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení hodnoty cut-off 2. V tabulce 15 jsou uvedeny počty čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení hodnoty cut-off 3. Fyziologické vzorky jsou v tabulkách označeny zeleně, vzorky s trizomií 21 červeně a vzorky s trizomií 18 oranžově.

Tabulka 13: Kategorie 2 - celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení cut-off 1

(počet čtení patřící plodu uvedený v tabulce byl zaokrouhlen na celá čísla)

	vzorek 1240		vzorek 1755		vzorek 1877		vzorek 1249		vzorek 1830		vzorek 3615		vzorek 11705		vzorek 1806		vzorek 1546		vzorek 3623	
	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs
chr1	-	-	-	-	280	1	521	1	-	-	137	1	164	1	189	1	-	-	-	-
chr2	597	1	723	1	722	2	2168	3	950	3	318	1	358	1	229	2	-	-	2607	9
chr3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr4	-	-	-	-	305	1	1089	1	297	1	-	-	-	-	82	1	337	1	720	2
chr5	840	2	-	-	197	1	1148	2	-	-	205	1	-	-	116	1	-	-	296	1
chr6	567	1	2763	1	113	1	1309	2	822	1	81	1	1143	1	-	-	-	-	1529	1
chr7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr8	412	1	979	1	133	1	1935	3	355	1	264	1	169	1	133	2	-	-	-	-
chr9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr10	-	-	-	-	265	1	1921	1	-	-	-	-	180	1	-	-	-	-	364	1
chr11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr12	-	-	240	1	-	-	639	1	589	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr13	19542	38	27051	42	6621	27	28638	35	31092	46	14039	43	5670	32	3551	31	20897	50	18264	59
chr14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	1	-	-	245	1	-	-	215	1
chr15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr16	-	-	927	1	312	1	324	1	-	-	452	1	325	1	164	1	-	-	-	-
chr17	-	-	563	1	417	2	1163	1	1676	3	-	-	276	2	89	1	133	1	1274	3
chr18	16098	34	26911	29	11497	31	24654	35	24907	40	11244	36	6864	28	8232	34	11394	31	18714	49
chr19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	177	2	-	-	23	1	-	-	-	-
chr20	1051	1	1604	2	-	-	-	-	580	2	-	-	99	1	241	2	166	1	-	-
chr21	18717	29	24129	34	13724	31	30046	31	26373	42	8163	23	10028	33	8883	42	14062	37	14657	39
chr22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	111	1	-	-	75	1	-	-	54	1
chrX	3876	6	20987	21	7896	18	17869	17	12006	21	3447	13	4242	13	5017	27	12843	17	13884	26
chrY	203	1	2222	6	169	1	389	1	869	6	747	6	434	6	21	1	231	1	15	1

Tabulka 14: Kategorie 2 - celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení cut-off 2

(počet čtení patřící plodu uvedený v tabulce byl zaokrouhlen na celá čísla)

	vzorek 1240		vzorek 1755		vzorek 1877		vzorek 1249		vzorek 1830		vzorek 3615		vzorek 11705		vzorek 1806		vzorek 1546		vzorek 3623	
	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs
chr1	-	-	-	-	280	1	521	1	-	-	137	1	164	1	189	1	-	-	-	-
chr2	597	1	723	1	567	1	2168	3	950	3	318	1	358	1	229	2	-	-	2607	9
chr3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr4	-	-	-	-	305	1	1089	1	297	1	-	-	-	-	82	1	337	1	720	2
chr5	840	2	-	-	197	1	867	1	-	-	205	1	-	-	116	1	-	-	296	1
chr6	567	1	2763	1	-	-	1309	2	822	1	81	1	1212	2	-	-	-	-	1529	1
chr7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr8	412	1	979	1	-	-	1677	2	355	1	264	1	169	1	114	1	-	-	-	-
chr9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr10	-	-	-	-	265	1	1921	1	-	-	-	-	180	1	-	-	-	-	364	1
chr11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr12	-	-	240	1	-	-	639	1	589	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr13	19542	38	27241	43	5493	18	25458	24	31034	45	14187	45	6292	41	3511	29	18935	38	18264	59
chr14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	1	-	-	245	1	-	-	215	1
chr15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr16	-	-	927	1	312	1	-	-	-	-	452	1	325	1	164	1	-	-	-	-
chr17	-	-	563	1	417	2	1163	1	1676	3	-	-	276	2	89	1	-	-	1274	3
chr18	16098	34	26911	29	10298	22	20871	21	24808	38	11388	38	7516	38	8213	33	9781	21	18714	49
chr19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	177	2	-	-	23	1	-	-	-	-
chr20	1051	1	1604	2	-	-	-	-	580	2	-	-	180	2	241	2	-	-	-	-
chr21	18717	29	24129	34	13260	28	28097	24	26332	41	8315	25	10436	39	8862	41	11912	23	14657	39
chr22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	111	1	-	-	75	1	-	-	54	1
chrX	3876	6	20987	21	7767	17	17165	15	11841	18	3516	14	4602	18	4976	25	12522	15	13884	26
chrY	203	1	2222	6	169	1	389	1	869	6	747	6	434	6	21	1	231	1	15	1

Tabulka 15: Kategorie 2 - celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích po stanovení cut-off 3

(počet čtení patřící plodu uvedený v tabulce byl zaokrouhlen na celá čísla)

	vzorek 1240		vzorek 1755		vzorek 1877		vzorek 1249		vzorek 1830		vzorek 3615		vzorek 11705		vzorek 1806		vzorek 1546		vzorek 3623	
	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs	počet čtení	počet SNPs
chr1	-	-	-	-	280	1	-	-	-	-	-	-	-	-	189	1	-	-	-	-
chr2	597	1	-	-	722	2	2168	3	950	3	318	1	358	1	229	2	-	-	2607	9
chr3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr4	-	-	-	-	305	1	1089	1	297	1	-	-	-	-	82	1	-	-	720	2
chr5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	116	1	-	-	296	1
chr6	567	1	-	-	-	-	804	1	822	1	-	-	1143	1	-	-	-	-	1529	1
chr7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr8	-	-	-	-	-	-	-	-	355	1	264	1	169	1	114	1	-	-	-	-
chr9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr10	-	-	-	-	-	-	1921	1	-	-	-	-	180	1	-	-	-	-	364	1
chr11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr12	-	-	-	-	-	-	639	1	589	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr13	13002	20	7749	8	5248	19	17265	14	31056	46	9049	18	4525	24	3487	29	12104	21	18272	60
chr14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	245	1	-	-	215	1
chr15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chr16	-	-	-	-	312	1	-	-	-	-	452	1	325	1	164	1	-	-	-	-
chr17	-	-	-	-	417	2	-	-	1676	3	-	-	162	1	89	1	-	-	1274	3
chr18	7220	9	-	-	8865	19	11172	7	24739	37	6874	14	5529	19	8250	36	3504	7	18720	50
chr19	-	-	-	-	60	1	-	-	-	-	177	2	-	-	23	1	-	-	-	-
chr20	1051	1	-	-	-	-	-	-	580	2	-	-	-	-	241	2	-	-	-	-
chr21	13741	15	3995	4	11594	21	19420	13	26373	42	5373	10	9282	27	8836	40	8372	13	14657	39
chr22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75	1	-	-	54	1
chrX	3125	6	1555	1	7316	15	8805	6	11932	20	2006	5	3761	10	4962	25	9537	9	13848	24
chrY	203	1	2222	6	169	1	389	1	869	6	747	6	434	6	21	1	231	1	15	1

6 DISKUSE

Sekvenační data byla rozdělena do tří kategorií podle genotypu plodu a matky. Pro jednotlivé SNP v kategorii 1 a 2 byl stanoven počet čtení patřící plodu. Následně byl v kategorii 2 stanoven cut-off, pomocí kterého bylo rozlišeno, zda se plod pro konkrétní SNP chová jako homozygotní nebo již jako heterozygotní. Cut-off byl určen třemi různými způsoby, pro každý vzorek zvlášť. Následně byl stanoven celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích.

Po stanovení hodnot cut-off 1 se celkový počet čtení plodu ve vzorcích pohyboval v rozmezí od 30 365 do 147 466. Medián celkového počtu čtení plodu po stanovení hodnot cut-off 1 činil 72 412. Po stanovení hodnot cut-off 2 se celkový počet čtení plodu ve vzorcích pohyboval v rozmezí od 30 225 do 143 827. Medián celkového počtu čtení plodu po stanovení hodnot cut-off 2 činil 69 240. Po stanovení hodnot cut-off 3 se celkový počet čtení plodu ve vzorcích pohyboval v rozmezí od 30 199 do 111 373. Medián celkového počtu čtení plodu po stanovení hodnot cut-off 3 činil 49 647.

Podrobnější bioinformatická analýza byla provedena v případě heterozygotního genotypu plodu v kombinaci s homozygotním genotypem matky. V tomto případě byly dále analyzovány SNPs na chromozomu 21 a 18. Pro konkrétní SNPs na chromozomu 21 a 18 byla stanovena fetální frakce. Ze stanovených fetálních frakcí na chromozomu 21 a 18 byly sestrojeny grafy, ve kterých byly srovnány fetální frakce v kontrolních vzorcích a fetální frakce ve vzorcích s trizomií. U trizomií se očekává výskyt zvýšené fetální frakce na postiženém chromozomu, díky přítomnosti tří kopií tohoto chromozomu u plodu, namísto dvou. Tato skutečnost byla u značného počtu SNPs na chromozomu 21 a 18 potvrzena.

Výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21 při porovnání se všemi kontrolními vzorky byl pozorován u šesti z jedenácti SNPs, konkrétně u SNPs s genomickou koordinátou 29511939, 30530233, 30547602, 32201835, 40819685 a 40886816. U tří SNPs, konkrétně u SNPs s genomickou koordinátou 32201822, 32201866 a 33355605, byl výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21 pozorován pouze při porovnání s jedním kontrolním vzorkem (při porovnání K1 a T21). U dvou SNPs, konkrétně u SNPs s genomickou koordinátou 29488141 a 40469520, nebyl pozorován výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21.

Výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 18 byl pozorován u pěti z devíti SNPs, konkrétně u SNPs s genomickou koordinátou 14795992, 34247514, 45733788, 50185210 (při porovnání s T18a i T18b) a 56161535. Výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 18 nebyl pozorován u čtyř SNPs s genomickou koordinátou 4397772, 24004300, 37212167 a 50226345.

V rámci mé bakalářské práce byl reprezentován pouze model, kdy se genotyp chová jako fyziologický. Pro přesnější a efektivnější bioinformatickou analýzu by bylo relevantní vyhodnotit a namodelovat i situaci, kdy se fetální genotyp chová jako patologický (s trizomií 21 nebo s trizomií 18) a na základě rozdílu výše zmíněných modelů stanovit fetální frakci a vyhodnotit výsledek. Přesnější rozlišení fetální frakce a stanovení aneuploidii lze podpořit také zvýšením počtu analyzovaných vzorků. V neposlední řadě je třeba zohlednit i kvantitativní spolehlivost jednotlivých SNPs.

7 ZÁVĚR

V rámci teoretické části mé bakalářské práce byla sepsána literární rešerše zaměřená na neinvazivní prenatalní vyšetření volné DNA plodu v mateřském séru (NIPT), posouzení fetální frakce u těhotných žen a rozlišení nejčastějších aneuploidií s využitím jednonukleotidových polymorfismů (SNPs).

V rámci experimentální části mé bakalářské práce byla v programu Microsoft Excel bioinformaticky analyzována sekvenační data získaná na Ústavu lékařské genetiky FN Olomouc. Získaná sekvenační data obsahovala amplifikované a sekvenované jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) na požadovaných chromozomech. Celkově bylo nasekvenováno 317 jednonukleotidových polymorfismů.

Sekvenační data byla rozdělena do kategorií podle genotypu plodu a matky a pro jednotlivé SNP byl stanoven počet čtení patřící plodu. Následně byl stanoven celkový počet čtení patřící plodu a počet SNPs na chromozomech v jednotlivých vzorcích. U konkrétních SNPs na chromozomu 21 a 18 byla stanovena fetální frakce.

U trizomií se očekává výskyt zvýšené fetální frakce na postiženém chromozomu, díky přítomnosti tří kopií tohoto chromozomu u plodu, namísto dvou. Výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21, při porovnání se všemi kontrolními vzorky, byl pozorován u šesti z jedenácti SNPs. U tří SNPs byl výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 21 pozorován pouze při porovnání s jedním kontrolním vzorkem. Výskyt zvýšené fetální frakce na chromozomu 18 byl pozorován u pěti z devíti SNPs.

8 LITERATURA

Odborná literatura

Akolekar R., Beta J., Picciarelli G., Ogilvie C., D'Antonio F. (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.

Antonarakis SE., Skotko BG., Rafii MS., Strydom A., Pape SE., Bianchi DW., Sherman SL., Reeves RH. (2020): Down syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* 6(1): 9.

Bayindir B., Dehaspe L., Brison N., Brady P., Ardui S., Kammoun M., Van der Veken L., Lichtenbelt K., Van den Bogaert K., Van Houdt J., Peeters H., Van Esch H., de Ravel T., Legius E., Devriendt K., Vermeesch JR. (2015): Noninvasive prenatal testing using a novel analysis pipeline to screen for all autosomal fetal aneuploidies improves pregnancy management. *European Journal of Human Genetics* 23(10): 1286-1293.

Bianchi DW., Chiu RWK. (2018): Sequencing of Circulating Cell-free DNA during Pregnancy. *The New England Journal of Medicine* 379(5): 464-473.

Canick JA., Palomaki GE., Kloza EM., Lambert-Messerlian GM., Haddow JE. (2013): The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenatal Diagnosis* 33(7): 667-674.

Carlson LM., Vora NL. (2017): Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 44(2): 245-256.

Cereda A., Carey JC. (2012): The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7: 81.

Chiu RW., Chan KC., Gao Y., Lau VY., Zheng W., Leung TY., Foo CH., Xie B., Tsui NB., Lun FM., Zee BC., Lau TK., Cantor CR., Lo YM. (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 USA* 105(51): 20458-20463.

Down JLH. (1866): Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Clinical Report* 3: 259-262.

Edwards JH., Harnden DG., Cameron AH., Crosse VM., Wolff OH. (1960): A new trisomic syndrome. *The Lancet* 1(7128): 787-790.

Fan HC., Blumenfeld YJ., Chitkara U., Hudgins L., Quake SR. (2008): Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105(42): 16266-16271.

Green ED., Rubin EM., Olson MV. (2017): The future of DNA sequencing. *Nature* 550(7675): 179-181.

Gruhn JR., Zielinska AP., Shukla V., Blanshard R., Capalbo A., Cimadomo D., Nikiforov D., Chan AC., Newnham LJ., Vogel I., Scarica C., Krapchev M., Taylor D., Kristensen SG., Cheng J., Ernst E., Bjørn AB., Colmorn LB., Blayney M., Elder K., Liss J., Hartshorne G., Grøndahl ML., Rienzi L., Ubaldi F., McCoy R., Lukaszuk K., Andersen CY., Schuh M., Hoffmann ER. (2019): Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span. *Science* 365(6460): 1466-1469.

Irving C., Richmond S., Wren C., Longster C., Embleton ND. (2011): Changes in fetal prevalence and outcome for trisomies 13 and 18: a population-based study over 23 years. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 24(1): 137-141.

Kruszka P., Muenke M. (2018): Syndromes associated with holoprosencephaly. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 178(2): 229-237.

Lehman CD., Nyberg DA., Winter TC. 3rd, Kapur RP., Resta RG., Luthy DA. (1995): Trisomy 13 syndrome: prenatal US findings in a review of 33 cases. *Radiology* 194(1): 217-222.

Lo YM., Corbetta N., Chamberlain PF., Rai V., Sargent IL., Redman CW., Wainscoat JS. (1997): Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *The Lancet* 350(9076): 485-487.

Monni G., Zoppi MA., Iuculano A., Piras A., Arras M. (2014): Invasive or non-invasive prenatal genetic diagnosis? *Journal of Perinatal Medicine* 42(5): 545-548.

Nagaoka SI., Hassold TJ., Hunt PA. (2012): Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics* 13(7): 493-504.

Nicolaides KH. (2003): Screening for chromosomal defects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 21(4): 313-321.

Nicolaides KH., Azar G., Byrne D., Mansur C., Marks K. (1992): Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *The British Medical Journal* 304(6831): 867-869.

Norwitz ER., Levy B. (2013): Noninvasive prenatal testing: the future is now. *Reviews in Obstetrics and Gynecology* 6(2): 48-62.

Nussbaum RL., McInnes RR., Willard HF., et al. (2007): *Thompson & Thompson genetics in medicine* (7th edition). Saunders/Elsevier, Philadelphia.

Passarge E. (2019): *Barevný atlas genetiky*. Grada Publishing, Praha. (přeložila Kohoutová M. z anglického originálu: Passarge E. (2018): *Color Atlas of Genetics* (5th edition). Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart)

Patau K., Smith DW., Therman E., Inhorn SL., Wagner HP. (1960): Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *The Lancet* 1(7128): 790-793.

Peddi NC., Avanthika C., Vuppapapati S., Balasubramanian R., Kaur J, N CD. (2021): A Review of Cordocentesis: Percutaneous Umbilical Cord Blood Sampling. *Cureus* 13(7): e16423.

Pös O., Budiš J., Szemes T. (2019): Recent trends in prenatal genetic screening and testing. Faculty Reviews: 764.

Procházka M., Vodička R., Vrtěl R. (2018): Základy lékařské genetiky pro studenty všeobecného lékařství. Univerzita Palackého, Olomouc.

Rafi I., Chitty L. (2009): Cell-free fetal DNA and non-invasive prenatal diagnosis. British Journal of General Practice 59(562): e146-148.

Rava RP., Srinivasan A., Sehnert AJ., Bianchi DW. (2014): Circulating fetal cell-free DNA fractions differ in autosomal aneuploidies and monosomy X. Clinical Chemistry 60(1): 243-250.

Smith DW., Patau K., Therman E., Inhorn SL. (1960): A new autosomal trisomy syndrome: multiple congenital anomalies caused by an extra chromosome. The Journal of Pediatrics 57: 338-345.

Sparks AB., Struble CA., Wang ET., Song K., Oliphant A. (2012a): Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18. American Journal of Obstetrics and Gynecology 206(4): 319.e1-9.

Sparks AB., Wang ET., Struble CA., Barrett W., Stokowski R., McBride C., Zahn J., Lee K., Shen N., Doshi J., Sun M., Garrison J., Sandler J., Hollemon D., Pattee P., Tomita-Mitchell A., Mitchell M., Stuelpnagel J., Song K., Oliphant A. (2012b): Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. Prenatal Diagnosis 32(1): 3-9.

van Beek DM., Straver R., Weiss MM., Boon EMJ., Huijsdens-van Amsterdam K., Oudejans CBM., Reinders MJT., Sistermans EA. (2017): Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples. Prenatal Diagnosis 37(8): 769-773.

Vermeesch JR., Voet T., Devriendt K. (2016): Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis. Nature Reviews Genetics 17(10): 643-656.

Watson WJ., Miller RC., Wax JR., Hansen WF., Yamamura Y., Polzin WJ. (2007):
Sonographic detection of trisomy 13 in the first and second trimesters of pregnancy.
Journal of Ultrasound in Medicine 26(9): 1209-1214.

Hypertextové odkazy

Ultrazvukové vyšetření – Fetmed. [online] [navštíveno 27.6.2024]

Dostupné z: <https://www.fetmed.cz/ultrazvukove-vysetreni>

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Seznam sekvenovaných SNPs na požadovaných chromozomech s genomickou koordinátou (hg19) a identifikátorem (SNP ID)

Příloha 1: Seznam sekvenovaných SNPs na požadovaných chromozomech s genomickou koordinátou (hg19) a identifikátorem (SNP ID)

chromozom	genomická koordináta (hg19) – začátek	genomická koordináta (hg19) – konec	identifikátor (SNP ID)
chr1	91313636	91313724	rs3896732
chr2	17927218	17927295	rs12474069
chr2	67474335	67474411	rs4103194
chr2	106776855	106776944	rs1470240
chr2	189185708	189185787	rs4381753
chr2	236559882	236559976	rs12473883
chr4	40347997	40348089	rs62302178
chr4	75938202	75938282	rs1062293
chr4	175852123	175852211	rs62334419
chr5	7870933	7871021	rs1801394
chr5	34004653	34004731	rs10941112
chr6	44224870	44224969	rs575034
chr6	155751755	155751839	rs231956
chr8	10935004	10935089	rs11773990
chr8	38936949	38937013	rs6474525
chr8	103288298	103288389	rs2853238
chr10	9261666	9261739	rs2764394
chr12	25358879	25358957	rs8720
chr13	19861616	19861704	rs1831443
chr13	19888208	19888297	rs9285353
chr13	22249910	22250005	rs9550757
chr13	24734936	24735040	rs2244601
chr13	25075792	25075884	rs1539096
chr13	27194791	27194879	rs4769507
chr13	28536856	28536956	rs2481952
chr13	30522381	30522460	rs1359475
chr13	31470622	31470708	rs9600625
chr13	32775087	32775174	rs2520702

chr13	32893715	32893796	rs9534174
chr13	33720787	33720871	rs523656
chr13	33924083	33924179	rs5011113
chr13	35664734	35664821	rs1444899
chr13	36402355	36402442	rs2296645
chr13	37248713	37248804	rs908695
chr13	37264318	37264407	rs1517892
chr13	37271104	37271180	rs9547646
chr13	38114364	38114450	rs7331874
chr13	38932162	38932242	rs9576514
chr13	40313007	40313080	rs9576894
chr13	41374158	41374237	rs2282022
chr13	42374353	42374433	rs9566852
chr13	42624529	42624607	rs11620075
chr13	43434982	43435072	rs1886318
chr13	43730912	43730991	rs1324017
chr13	46750334	46750401	rs61949182
chr13	48461476	48461564	rs7338119
chr13	49951107	49951198	rs8002829
chr13	49961216	49961304	rs13378689
chr13	50095062	50095137	rs3765526
chr13	53197619	53197702	rs616969
chr13	53231483	53231555	rs6561675
chr13	53608589	53608659	rs2298231
chr13	53716966	53717045	rs9536364
chr13	58236840	58236913	rs4497560
chr13	58258075	58258150	rs9537776
chr13	61268129	61268211	rs9563833
chr13	66941756	66941842	rs9592461
chr13	66986422	66986513	rs9540739
chr13	67020922	67020992	rs3843947
chr13	67038349	67038435	rs1470370
chr13	67055964	67056040	rs9571588

chr13	67532276	67532361	rs9571703
chr13	67771672	67771749	rs1983949
chr13	69802128	69802209	rs2121293
chr13	69810190	69810263	rs9541841
chr13	69814154	69814226	rs4389038
chr13	69831867	69831942	rs9572140
chr13	69856390	69856472	rs9572150
chr13	69867642	69867726	rs17605284
chr13	69877742	69877809	rs34838074
chr13	69891813	69891901	rs2782446
chr13	70284071	70284156	rs9317836
chr13	70496913	70496992	rs9529657
chr13	70663147	70663232	rs9542174
chr13	70692666	70692748	rs8002227
chr13	70705403	70705482	rs11841483
chr13	73324744	73324829	rs9543110
chr13	73649254	73649338	rs9573096
chr13	74143139	74143211	rs9543396
chr13	74707926	74708021	rs545893680
chr13	75953697	75953765	rs6562888
chr13	75972802	75972892	rs9285295
chr13	79886645	79886725	rs7317343
chr13	79894730	79894808	rs3187338
chr13	79918262	79918344	rs2274555
chr13	79940756	79940839	rs7327603
chr13	79976408	79976485	rs9574419
chr13	79992146	79992232	rs7990321
chr13	88103934	88103999	rs9517212
chr13	88111959	88112039	rs1572883
chr13	88112930	88113017	rs9517244
chr13	92527610	92527687	rs1330472
chr13	92621986	92622072	rs9523460
chr13	92744230	92744291	rs4773666

chr13	93054546	93054633	rs4142024
chr13	93060775	93060844	rs7329553
chr13	93912638	93912722	rs1328372
chr13	94638210	94638295	rs9556345
chr13	95414915	95415001	rs792298
chr13	95517567	95517656	rs2209852
chr13	96444159	96444241	rs2305091
chr13	96940237	96940321	rs7998759
chr13	97482090	97482168	rs7332250
chr13	100285924	100285989	rs4771340
chr13	100925083	100925163	rs9518037
chr13	109425403	109425480	rs2391690
chr13	111980523	111980608	rs1359428
chr14	50412182	50412265	rs10129382
chr14	78838501	78838590	rs2886580
chr16	85218685	85218772	rs8050680
chr17	38074040	38074131	rs9303281
chr17	78858110	78858190	rs2672875
chr18	334695	334788	rs2305027
chr18	4397706	4397777	rs9955475
chr18	5781059	5781135	rs11873750
chr18	6387903	6387972	rs236037
chr18	6728449	6728537	rs7505283
chr18	7783029	7783110	rs2155524
chr18	9603268	9603349	rs678567
chr18	9776963	9777050	rs7228583
chr18	10604649	10604738	rs6505581
chr18	10971127	10971212	rs264243
chr18	11013532	11013614	rs1872032
chr18	14795951	14796029	rs9303862
chr18	19886807	19886879	rs4800117
chr18	20953675	20953765	rs8099409
chr18	21814816	21814903	rs11083037

chr18	22684031	22684103	rs9965569
chr18	22871420	22871503	rs45557840
chr18	22912566	22912643	rs9950013
chr18	22916934	22917018	rs8084062
chr18	24004285	24004380	rs1786254
chr18	24073340	24073425	rs66848483
chr18	24164647	24164735	rs7237338
chr18	25589335	25589408	rs623234
chr18	25603605	25603682	rs643555
chr18	28898247	28898337	rs1426310
chr18	29078607	29078701	rs7227984
chr18	29095402	29095481	rs2704052
chr18	29204191	29204270	rs1791161
chr18	29675760	29675849	rs7238559
chr18	31608825	31608901	rs55823517
chr18	31623319	31623398	rs12327165
chr18	33765960	33766057	rs607856
chr18	34233513	34233600	rs2848904
chr18	34247465	34247545	rs584508
chr18	34324325	34324408	rs2303508
chr18	34882706	34882798	rs4622585
chr18	35105115	35105213	rs12607066
chr18	37010705	37010795	rs1601002
chr18	37018963	37019056	rs1482961
chr18	37194253	37194331	rs2726254
chr18	37212110	37212199	rs2726232
chr18	41947920	41948002	rs9947029
chr18	42296286	42296373	rs1037939
chr18	42336405	42336503	rs4617956
chr18	42534538	42534621	rs9783858
chr18	43049442	43049530	rs2852286
chr18	43104371	43104450	rs2705387
chr18	43162841	43162934	rs10775478

chr18	43307057	43307151	rs10432193
chr18	43321399	43321486	rs8086631
chr18	43405717	43405798	rs1440822
chr18	45733732	45733813	rs2156650
chr18	47097427	47097508	rs3786249
chr18	47501122	47501219	rs28671329
chr18	48220300	48220389	rs1545129
chr18	48980823	48980899	rs1656749
chr18	50185187	50185270	rs1466373
chr18	50226317	50226390	rs17682244
chr18	50713190	50713277	rs7243019
chr18	50743491	50743578	rs6508209
chr18	52942795	52942883	rs1788027
chr18	53851030	53851102	rs1944351
chr18	55232247	55232329	rs2040241
chr18	55909642	55909711	rs158857
chr18	56003979	56004061	rs12051999
chr18	56058324	56058413	rs8098126
chr18	56161490	56161573	rs4361013
chr18	56227793	56227879	rs7238217
chr18	56247513	56247606	rs9944810
chr18	56891358	56891439	rs1563713
chr18	56968570	56968648	rs668992
chr18	57122547	57122616	rs7229033
chr18	59520344	59520433	rs7229834
chr18	62013309	62013399	rs10503091
chr18	67464630	67464717	rs1620083
chr18	74348940	74349029	rs2406211
chr18	77407474	77407549	rs668013
chr18	77907035	77907128	rs1050921
chr19	28975292	28975377	rs4805218
chr20	41207329	41207413	rs6030341
chr21	15481226	15481307	rs7279700

chr21	15481356	15481435	rs7278737
chr21	15649477	15649544	rs4816274
chr21	19155795	19155878	rs243591
chr21	19401969	19402059	rs2849912
chr21	22539516	22539595	rs11909114
chr21	22554566	22554651	rs2826721
chr21	22556023	22556108	rs1598
chr21	23122543	23122629	rs1735969
chr21	27522864	27522953	rs12483003
chr21	27824259	27824339	rs219649
chr21	27824574	27824658	rs150755
chr21	27825288	27825370	rs219650
chr21	27929806	27929892	rs222966
chr21	28337067	28337159	rs28483968
chr21	29488140	29488213	rs9979020
chr21	29509163	29509249	rs10154107
chr21	29511876	29511964	rs4817220
chr21	29580435	29580520	rs2831641
chr21	30521868	30521949	rs2832216
chr21	30530213	30530301	rs1999321
chr21	30547577	30547653	rs2832236
chr21	30623072	30623165	rs10460703
chr21	31198682	31198768	rs466013
chr21	32201773	32201868	rs9982675
chr21	32727112	32727202	rs2243936
chr21	33355535	33355622	rs2096512
chr21	34017786	34017870	rs2406
chr21	35253856	35253945	rs9978563
chr21	35321279	35321358	rs2154567
chr21	35323783	35323869	rs7280837
chr21	35334543	35334638	rs766425
chr21	35795327	35795416	rs2834481
chr21	35819041	35819127	rs3453

chr21	35821401	35821486	rs2070357
chr21	36335949	36336037	rs2834694
chr21	36421016	36421101	rs8133634
chr21	36753706	36753788	rs2742146
chr21	37695439	37695528	rs9305584
chr21	38129069	38129157	rs2845804
chr21	38444849	38444935	rs2298682
chr21	38449458	38449523	rs1015551
chr21	38455313	38455399	rs2835574
chr21	38455875	38455961	rs2835575
chr21	38839096	38839179	rs7279050
chr21	39113075	39113165	rs1892681
chr21	39145992	39146079	rs1160350
chr21	39153979	39154065	rs2226356
chr21	39245475	39245563	rs725573
chr21	39602539	39602623	rs2898348
chr21	39671423	39671504	rs2230033
chr21	39815766	39815853	rs2836402
chr21	39816751	39816838	rs2836405
chr21	39965525	39965601	rs2244890
chr21	40469512	40469595	rs378108
chr21	40533106	40533198	rs1888489
chr21	40536747	40536836	rs2836926
chr21	40545594	40545674	rs2836930
chr21	40552285	40552372	rs3171465
chr21	40564842	40564930	rs2836934
chr21	40596691	40596778	rs2836945
chr21	40819665	40819750	rs2049823
chr21	40875282	40875366	rs9984305
chr21	40878560	40878651	rs4818044
chr21	40886777	40886849	rs2246616
chr21	41000335	41000427	rs651029
chr21	41509266	41509352	rs741801

chr21	41625872	41625957	rs7280961
chr21	41920416	41920499	rs72613624
chr21	44293721	44293816	rs2248490
chr21	44339309	44339403	rs2187247
chr21	46922384	46922467	rs7409857
chr22	30519119	30519199	rs4823075
chrX	193409	193509	rs28432303
chrX	322138	322226	rs3813594
chrX	329787	329885	rs4906980
chrX	594080	594168	rs28574910
chrX	1388512	1388596	rs28874598
chrX	1531684	1531775	rs5949004
chrX	1597777	1597857	rs4933159
chrX	2139572	2139652	rs34553691
chrX	2142003	2142089	rs138415145
chrX	2322091	2322169	rs7062927
chrX	2361423	2361499	rs6642165
chrX	2619447	2619536	rs311042
chrX	2621424	2621516	rs311045
chrX	2633741	2633833	rs5982579
chrX	2638082	2638172	rs3763368
chrX	2688415	2688511	rs2857323
chrX	2689488	2689579	rs311149
chrX	5890012	5890102	rs12393905
chrX	12201038	12201123	rs12690196
chrX	14612337	14612423	rs2238912
chrX	15490833	15490908	rs4830955
chrX	18322596	18322680	rs5955962
chrX	18839866	18839959	rs12006722
chrX	21655313	21655399	rs5951454
chrX	21901874	21901957	rs5951476
chrX	22599871	22599958	rs5970600
chrX	23179374	23179447	rs5971046

chrX	26210560	26210641	rs11795624
chrX	27759518	27759615	rs5926893
chrX	28635442	28635525	rs12688555
chrX	32113727	32113806	rs1630727
chrX	36373306	36373390	rs7886097
chrX	39246474	39246563	rs5963125
chrX	43553158	43553246	rs909525
chrX	45366107	45366197	rs11091163
chrX	48206871	48206959	rs6609714
chrX	57313340	57313435	rs2516023
chrX	103912873	103912961	rs12690006
chrX	107460454	107460539	rs944629
chrX	109365188	109365268	rs5985446
chrX	117574339	117574424	rs5956996
chrX	140948030	140948101	rs5954449
chrX	149539523	149539611	rs5925535
chrX	151092625	151092704	rs1047251
chrY	2902796	2902885	rs9786562
chrY	6930991	6931088	rs72617693
chrY	8679782	8679856	rs3853054
chrY	14898084	14898164	rs13305774
chrY	15472857	15472937	rs9786043
chrY	15529829	15529904	rs57351463
chrY	21125416	21125481	rs61797733
chrY	21730238	21730325	rs3900