

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Adéla Soukalová

Fetální DNA cirkulující v mateřské plazmě a možnosti její genetické analýzy
Fetal DNA circulating in maternal plasma and possibilities of its genetic analysis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

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

V Praze, 20. 4. 2024

Podpis

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. RNDr. Marii Korabečné, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, doporučení a zároveň za čas a ochotu, která mi byla věnována při psaní této práce. Dále bych také ráda poděkovala své rodině za podporu po celou dobu psaní této práce.

Abstrakt

Volně cirkulující DNA je krátká, fragmentovaná DNA, vyskytující se v plazmě a séru, do kterého je uvolňována různými mechanismy. Jako první byla prokázána v tělních tekutinách u onkologických pacientů a záhy se stala biomarkerem pro neinvazivní diagnostiku. Zanedlouho došlo k detekci přítomnosti fetální cfDNA v plazmě matky a stala se předmětem klinické využitelnosti. Neinvazivní prenatální diagnostika je screeningová metoda, která pomáhá určit pravděpodobnost výskytu vrozených vad již v rané fázi těhotenství, právě s využitím fetální cfDNA. Konečné výsledky určují invazivní metody, mezi něž řadíme například aminocentézu a odběr choriových klků. Invazivní metody prenatální diagnostiky s sebou nesou riziko ztráty plodu méně než 1 %. I přes takto malé riziko je neustálá snaha vědců směřována ke zdokonalení metod neinvazivních, pomocí kterých lze detekovat aneuploidie jako Downův, či Edwardsův syndrom. Dále lze u plodu detekovat pohlaví, monogenní choroby, či Rh faktor, přičemž se využívá metod polymerázové řetězové reakce (PCR), či sekvenování nové generace.

Klíčová slova: aneuploidie, fetální cfDNA, monogenně dědičné choroby, neinvazivní prenatální testování, polymerázová řetězová reakce (PCR), prenatální diagnostika, sekvenování nové generace, volně cirkulující DNA

Abstract

Cell free DNA is short, fragmented DNA found in plasma and serum, into which it is released by various mechanisms. It was first identified in body fluids of cancer patients and soon became a biomarker for non-invasive diagnostics. Soon after, the presence of fetal cfDNA in maternal plasma was detected and became the subject of clinical utility. Non-invasive prenatal diagnosis is a screening method that helps to determine the likelihood of birth defects early in pregnancy, specifically using fetal cfDNA. The final results are determined by invasive methods such as amniocentesis and chorionic villus sampling. Invasive methods of prenatal diagnosis carry a risk of fetal loss of less than 1 %. Despite this low risk, scientists are constantly striving to improve non-invasive methods that can detect aneuploidies such as Down's or Edwards syndrome, as well as determine the sex of the fetus, monogenic diseases and the Rh factor. Polymerase chain reaction (PCR) or next-generation sequencing methods are used for detection.

Keywords: aneuploidy, cell free DNA, cell free fetal DNA, monogenic inherited diseases, next-generation sequencing, non-invasive prenatal testing, polymerase chain reaction (PCR), prenatal diagnosis

Seznam zkratek

3 D	trojrozměrný	Three-Dimensional
4 D	čtyřrozměrný	Four-Dimensional
AD	autozomálně dominantní	Autosomal Dominant
AFP	alfa-fetoprotein	Alpha-Fetoprotein
AMC	aminocentéza	Amniocentesis
AR	autozomálně recesivní	Autosomal Recessive
bp	pár bází	Base Pair
CAH	kongenitální adrenální hyperplazie	Congenital Adrenal Hyperplasia
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí	Centers for Disease Control and Prevention
cdPCR	čipová digitální PCR	Chip-based Digital PCR
cfDNA	volná cirkulující DNA	Cell-free DNA
cffDNA	volná fetální DNA	Cell-free fetal DNA
CNS	centrální nervový systém	Central Nervous System
ctDNA	cirkulující nádorová DNA	Circulating Tumor DNA
CVS	odběr choriových klků	Chorionic Villus Sampling
ddPCR	digitální kapková PCR	Digital Droplet PCR
DNA	deoxyribonukleová kyselina	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát	Deoxynucleotide Triphosphates
dPCR	digitální PCR	Digital PCR
DS	Downův syndrom	Down syndrome
dsDNA	dvojřetězcová DNA	Double-Stranded DNA
GE	genomové ekvivalenty	Gene Equivalents
hCG	choriový gonadotropin	Chorionic Gonadotropin
HD	Huntingtonova choroba	Huntingtin's Disease
HDN	hemolytická nemoc novorozenců	Hemolytic Disease of the Newborn
HTT	gen pro huntingtin	Huntingtin Gene
IgG	imunoglobulin G	Imunoglobulin G
MPS	masivně paralelní sekvenování	Massive Parallel Sequencing
mRNA	messenger RNA	Messenger RNA
NET	neutrofilní extracelulární pasti	Neutrophil Extracellular Traps
NGS	sekvenování nové generace	Next-Generation Sequencing
NIPD	neinvazivní prenatální diagnostika	Non-invasive Prenatal Diagnosis

NIPT	neinvazivní prenatální testování	Non-invasive Prenatal Testing
NT	nuchální translucence	Nuchal Translucency
PCR	polymerázová řetězová reakce	Polymerase Chain Reaction
qPCR	kvantitativní PCR	Quantitative PCR
Rh ⁻	rhesus negativní	Rhesus Negative
Rh ⁺	rhesus pozitivní	Rhesus Positive
RNA	ribonukleová kyselina	Ribonucleic Acid
RT-PCR	PCR v reálném čase	Real-Time PCR
SLE	systémový lupus erythematoses	Systematic Lupus Rrythematosus
SNP	jednonukleotidový polymorfismus	Single Nucleotide Polymorphism
SRY	gen určující pohlaví	Sex-determining Region Y gene
T13	trizomie 13	Trisomy 13
T18	trizomie 18	Trisomy 18
T21	trizomie 21	Trisomy 21
uE	nekonjugovaný estriol	unconjugated Estriol
UZ	ultrazvuk	Ultrasound

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	VOLNĚ CIRKULUJÍCÍ DNA.....	2
2.1	Objev volně cirkulující DNA.....	2
2.1.1	Tekutá biopsie.....	2
2.2	Vznik a původ volně cirkulující DNA.....	3
2.3	Obecné vlastnosti volně cirkulující DNA.....	3
3	VOLNÁ FETÁLNÍ DNA.....	4
3.1	Objev volné fetální DNA.....	4
3.2	Vznik a původ fetální cfDNA.....	5
3.3	Obecné vlastnosti volné fetální DNA.....	5
3.3.1	Velikost mateřské a fetální cfDNA.....	5
3.3.2	Hladiny fetální cfDNA.....	6
3.3.3	Clearance fetální cfDNA.....	7
4	PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA.....	8
4.1	Definice a cíle prenatální diagnostiky.....	8
4.2	Vývoj prenatální diagnostiky.....	8
4.3	Metody prenatální diagnostiky.....	9
4.3.1	Invazivní metody prenatální diagnostiky.....	9
4.3.2	Neinvazivní metody prenatální diagnostiky.....	10
5	ANALÝZA A VYUŽITÍ FETÁLNÍ CFDNA V PRENATÁLNÍ DIAGNOSTICE.....	11
5.1	Detekce aneuploidií.....	11
5.2	Detekce pohlaví plodu.....	13
5.3	Detekce monogenních chorob.....	14
5.4	Detekce Rh faktoru plodu.....	16
6	METODY DETEKCE FETÁLNÍ CFDNA.....	17
6.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	17
6.1.1	Kvantitativní PCR.....	17
6.1.2	Digitální PCR.....	19
6.2	Sekvenování nové generace.....	20
7	ETICKÉ ASPEKTY A BUDOUCÍ SMĚRY NIPD.....	21
8	ZÁVĚR.....	23
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	24

1 Úvod

V současné době představuje neinvazivní prenatální diagnostika (NIPD) revoluční přístup v oblasti prenatální péče. Využívá se přítomnosti fetální cfDNA cirkulující v mateřské plazmě, jejíž analýza umožňuje lékařům získat genetické informace o plodu bez nutnosti podstoupení invazivních metod diagnostiky, při nichž dochází k zásahu do těla matky, což s sebou nese riziko pro matku a plod. I když jsou neinvazivní metody pouze screeningovým, nikoliv diagnostickým nástrojem, jejich popularita a přesnost stále roste.

Zvýšená hladina volně cirkulující DNA byla poprvé identifikována u pacientů s autoimunitním onemocněním SLE. V pozdějších letech byl výskyt prokázán také u onkologických pacientů, u kterých je cfDNA biomarkerem pro neinvazivní diagnostiku nádorů. V roce 1997 došlo k identifikaci přítomnosti volné fetální cfDNA v mateřské plazmě a séru, což otevřelo možnosti jejího klinického využití v NIPT. Původ této DNA patřící plodu, je stále předmětem zkoumání, ačkoliv za nejpravděpodobnější zdroj fetální cfDNA se dnes považují placentární trofoblasty. Hladiny fetální cfDNA stoupají s fází těhotenství a po porodu tato DNA rychle z mateřské plazmy vymizí. Díky pokrokům ve vývoji technologií lze detekovat například chromozomální aneuploidie a pohlaví plodu pomocí metod kvantitativní PCR (qPCR), digitální PCR (dPCR) a sekvenování nové generace (NGS).

V této práci budou popisovány různé metody analýzy fetální cfDNA a možnosti jejího využití pro prenatální diagnostiku. Bude se zabývat také zdroji, vlastnostmi a mechanismy uvolňování fetální cfDNA do cirkulace matky. Krom toho se zaměřím také na etické aspekty a budoucí směry neinvazivní prenatální diagnostiky.

Cílem práce je podat ucelený pohled na současné možnosti a perspektivy neinvazivní prenatální diagnostiky.

2 Volně cirkulující DNA

2.1 Objev volně cirkulující DNA

První zmínky o existenci volně cirkulující DNA (cfDNA) pochází již z roku 1948, kdy byla prokázána přítomnost cfDNA v cirkulaci zdravých jedinců (Mendel *et al.*, 1948). Následovalo období, ve kterém byl výzkum Mendela ohledně cfDNA téměř opomenutý a poznatky z jeho práce byly zpochybňovány. Zhruba o 20 let později bylo zjištěno, že v krvi pacientů s autoimunitním onemocněním systematickým lupus erythematoses (SLE) se vyskytuje zvýšená hladina cirkulující DNA . V následujících letech vycházely studie, ve kterých bylo zjišťováno, že toto onemocnění není zdaleka jediným, při kterém mají pacienti zvýšenou hladinu volně cirkulující DNA v krevní plazmě. V roce 1977 byla prokázána zvýšená koncentrace cfDNA u pacientů s rakovinou, poté pojmenovaná jako cirkulující nádorová DNA (ctDNA) (Leon *et al.*, 1977). Vasioukhin *et al.* (1993) se zabývali analýzou DNA v krevní plazmě a bylo zjištěno, že jedinec trpící právě rakovinou má v séru obsaženy nádorově specifické bodové mutace genů *RAS*. Přítomnost nádorově specifických mutací byla nalezena u několika typů nádorů (Bos, 1989). Toto zjištění představovalo krok vpřed v oblasti neinvazivní metody detekce rakoviny (Sorenson *et al.*, 1994) a vyvolalo zájem o další molekulární analýzu DNA z krevní plazmy. Lo *et al.*, položili základy neinvazivního prenatalního genetického testování, když v roce 1977 objevili přítomnost fetální cfDNA v mateřské plazmě.

2.1.1 Tekutá biopsie

Jedná se o neinvazivní metodu, při níž je nejčastěji z krevní plazmy získána volně cirkulující DNA, která poskytuje diagnostické informace o pacientovi trpící onemocněním. Do jisté míry může nahrazovat metody invazivní, které představují vyšší stupně rizika pro pacienta. Odběr umožňuje nahlédnout do zdravotního stavu jedince (Lo *et al.*, 2021). Pokrok v oblasti tekuté biopsie umožňuje detekovat a analyzovat DNA v oblasti prenatalní diagnostiky (Lo *et al.*, 1997), onkologii, ale také v transplantologii, kde je sledována cfDNA u pacienta, který prošel transplantací (Lo *et al.*, 1998).

2.2 Vznik a původ volně cirkulující DNA

Původ cfDNA a mechanismy jejího uvolňování do cirkulace zůstávají nejasné a jsou stále předmětem zkoumání. Dle dostupných zdrojů, v původu cfDNA hraje důležitou roli právě buněčná smrt. Mezi procesy buněčné smrti se řadí apoptóza, nekróza a netóza.

Další mechanismus uvolňující cfDNA do cirkulace je aktivní sekrece, což je proces, při kterém se uvolňují nukleové kyseliny z buněk, které jsou živé, což je rozdílné oproti buněčné smrti, kde buňky zanikají.

Apoptóza, známá také jako programovaná buněčná smrt, zajišťuje řízené odstraňování buněk v organismu. Dochází při ní ke fragmentaci jádra, smršťování buňky a tvorbě apoptotických tělísek, které jsou fagocytovány (Saikumar et al., 1999).

Nekróza je typ buněčné smrti, která vzniká v důsledku traumatických událostí. Dochází ke zvětšování buňky, ztrátě integrity plazmatické membrány a k následnému uvolnění buněčného obsahu, což vyvolává zánětlivou reakci.

Netóza je unikátní typ buněčné smrti, při které v reakci na přítomnost bakterií a infekce v organismu dochází k tvorbě neutrofilních extracelulárních pastí (NET), které mají za úkol tyto patogenní bakterie zachycovat a chránit tak organismus proti infekcím. NETs jsou sítě, tvořeny rozvolněným chromatinem a proteiny (Brinkmann et al., 2004).

Studie říkají, že u zdravých jedinců vzniká cfDNA právě v procesu apoptózy buněk hematopoetické linie (Lui et al., 2002), u pacientů s rakovinou je hladina cfDNA v cirkulaci zvýšená a pochází přímo z nádorové tkáně (Stroun et al., 2000). Nádory v pokročilém stádiu rakoviny vykazují vyšší hladiny cfDNA, než nádory ve stádiu raném (Sozzi et al., 2003). Volná fetální DNA pochází z povrchu choriových klků placenty, odkud se uvolňují mnohojaderné fragmenty do mateřského oběhu (Chua et al., 1991) (Huppertz et al., 1998).

2.3 Obecné vlastnosti volně cirkulující DNA

Volně cirkulující DNA neboli cfDNA je směsí jaderné a mitochondriální DNA, která je složena z krátkých, dvouvláknových fragmentů DNA o velikosti 40-200 párů bází (bp) (Snyder et al., 2016). Tyto fragmenty DNA se nacházejí nejen v séru a plazmě, ale také v dalších tělních tekutinách člověka, jako je například moč, sliny, mozkomíšní mok atd. (Chan et al., 2003). Mezi mechanismy, které uvolňují cfDNA z buňky do extracelulárního prostředí se řadí například apoptóza, nekróza, netóza, fagocytóza a aktivní sekrece (Thierry et al., 2016). Tyto mechanismy do jisté míry ovlivňují, v jaké strukturní formě (volná, vázaná na

nukleosomy, či vázaná na vezikly) se bude pohybovat v tělních tekutinách (Snyder et al., 2016). Koncentrace cfDNA v cirkulaci zdravých jedinců je nižší, než u pacientů trpících onkologickým onemocněním (Fleischhacker et al., 2007).

3 Volná fetální DNA

3.1 Objev volné fetální DNA

V roce 1977 byla prokázána přítomnost volné nádorové DNA v cirkulaci onkologických pacientů. Na tuto skutečnost navázal vědec Sorenson se svým týmem, kteří o pár let později zjistili, že ctDNA je skvělým biomarkerem pro neinvazivní metodu diagnostiky rakoviny (Sorenson et al., 1994). Jeho myšlenkou se zabývali další vědci, kteří předpokládali ekvivalentní stav u plodu v těhotenství. Fakt, že jaderné buňky plodu přecházejí do mateřské krve byl známý již od roku 1969, když Walknovska et al. objevili v krvi matky, která nesla plod mužského pohlaví, chromozom Y. Fetální buňky v krvi matky jsou důležité v metodách neinvazivní prenatalní diagnostiky (Simpson et al., 1994).

Na základě poznatků z dřívější doby Dennis Yuk Ming Lo et al. objevili v roce 1997 přítomnost fetální cfDNA (cffDNA) v mateřské plazmě a séru. Tomuto objevu předcházelo testování 43 žen, které byly ve 12. až 40. týdnu těhotenství. Bylo odebráno 5-10 ml mateřské periferní krve, nejprve u žen v časném stádiu těhotenství ještě před tím, než podstoupily aminocentézu. Dále u nich bylo odebráno 10 ml plodové vody k určení pohlaví plodu. Odebráno bylo také 10 kontrolních vzorků od netěhotných žen. U žen v pozdním stádiu těhotenství byly odebrány vzorky těsně před porodem. Pohlaví bylo zjištěno během porodu. Pro další postup bylo důležité ze vzorku odizolovat plazmu a sérum k další analýze. Pomocí 60 cyklů polymerázové řetězové reakce (PCR) byly z plazmy a séra detekovány sekvence specifické pro chromozomy Y, které se vyskytují pouze u mužského pohlaví. Přítomnost těchto sekvencí ve vzorcích prokazovala jednak pohlaví plodu, ale také přítomnost fetální cfDNA. Do výzkumu bylo zahrnuto 30 žen, které porodily plod mužského pohlaví. U 24 z nich byl detekovaný chromozom Y z mateřské plazmy, což představuje 80 %. Ze séra byla přítomnost chromozomu prokázána v 21 případech, což je 70 %. Jaderné buňky plodu prokázaly pouze 17 % vzorků s přítomným Y, tedy u 5 žen z 30. 13 žen tedy nosilo plod s pohlavím ženským, u nichž nebyl prokázán pozitivní výsledek chromozomu Y pro plazmu, sérum, ani jaderné buňky plodu. Dle předpokladů, stejný výsledek byl i u negravidních žen (Lo et al., 1997).

3.2 Vznik a původ fetální cfDNA

I fetální cfDNA, stejně jako volně cirkulující, nemá jasný původ, a tak je stále předmětem zkoumání. První zmínky o původu fetální cfDNA publikovali Sekizawa et al. v roce 2000, kdy za primární zdroj byly dlouho považovány fetální krvetvorné buňky, které měly do cirkulace uvolňovat fetální cfDNA po procesu buněčné smrti, konkrétně apoptózy. Následující roky přinesly nové poznatky o původu fetální cfDNA. Dodnes se považuje za nejvíce pravděpodobný zdroj fetální cfDNA právě placenta, což je dočasný orgán, spojující matku s plodem, zajišťující výměnu živin, kyslíku a odpadních látek. Na placentární původ fetální cfDNA poukazují výzkumy, ve kterých bylo prokázáno, že je uvolňována z placentárních trofoblastů do cirkulace matky. Během tohoto procesu dochází k uvolnění syncytiálních uzlů, které jsou součástí syncytiotrofoblastu (Chua et al., 1991) (Huppertz et al., 1998). Důkazem tohoto zjištění bylo, když Ng et al. v roce 2003 detekovali placentárně specifické mRNA v mateřské plazmě. Většina fetální cfDNA v plazmě matky tedy pochází z placenty, malý podíl může tvořit také zdroj z fetálních krvetvorných buněk.

3.3 Obecné vlastnosti volné fetální DNA

Ve 20. století došlo k identifikaci nukleových kyselin patřících plodu v mateřské plazmě. Fetální cfDNA se ihned stala předmětem klinické využitelnosti v neinvazivní prenatalní diagnostice (NIPT), která představovala budoucnost pro matky, které by v mnoha případech nemusely podstupovat invazivní diagnostické procedury (Lo et al., 1997). Pomocí neinvazivních metod jsme schopni detekovat například pohlaví plodu (Costa et al. 2002), rhesus faktor (Lo et al., 1998), nebo také chromozomální aneuploidie (Chiu et al., 2008). Fetální frakce neboli podíl fetální DNA tvoří pouze malé procento celkové cfDNA v cirkulaci těhotné ženy. Lo et al. (1998) publikovali, že 3-6 % tvoří fetální DNA a zbylou většinu zaujímá právě cfDNA matky. Přibližně od 4. týdne těhotenství lze detekovat fetální cfDNA v krvi matky, její množství má tendenci zvyšovat své množství s délkou těhotenství (Lo et al., 1998). Tato DNA má velice rychlou kinetiku, což dokazuje její vyloučení z těla téměř hned po porodu (Lo et al., 1999).

3.3.1 Velikost mateřské a fetální cfDNA

Fetální cfDNA je v mateřské plazmě přítomna ve formě fragmentů, které vznikají po jejím uvolnění z placenty do cirkulace. Nejčastější délka fragmentů je přibližně 200 párů bází (bp). Velikostí těchto fragmentů se zabývalo několik vědců ve svých laboratořích. Například

Chan et al. (2004) zkoumali distribuci velikosti fragmentů DNA a došli k závěru, že fragmenty pocházející z plodu jsou výrazně kratší než fragmenty pocházející z mateřských tkání. Tomuto zjištění předcházelo testování pomocí kvantitativní metody PCR zaměřeným na gen pro leptin a gen *SRY*. Na sedmém chromozomu se nachází gen pro leptin, což znamená, že je přítomný ve všech buňkách. Distribuce délky amplifikovatelných fragmentů cfDNA odrážela distribuci délek fragmentů jak z mateřské, tak fetální cfDNA. Naopak gen *SRY* nalezneme pouze u mužů, matka musí tedy nést plod mužského pohlaví, aby byly sekvence *tohoto* genu v mateřské krvi detekovány. Distribuce délek amplifikovatelných fragmentů odpovídala cfDNA, která pocházela z plodu. Studie prokázala přítomnost delších fragmentů genu pro leptin v fetální cfDNA v plazmě těhotných žen než netěhotných, rovněž bylo prokázáno, že fragmenty fetální cfDNA v plazmě těhotných žen jsou kratší než fragmenty derivované z mateřských tkání. Na tuto myšlenku navázalo mnoho dalších vědců jako například Li et al., kteří v roce 2004 pomocí real-time PCR analyzovali fetální cfDNA. Novější poznatky o velikosti mateřských a fetálních fragmentů přinesli v Lo et al. (2010), když provedli masivní paralelní sekvenování, čímž jejich studie prokázala, že genetický materiál matky a plodu je přítomen v plazmě v konstantním relativním poměru.

3.3.2 Hladiny fetální cfDNA

Už Bianchi et al. v roce 1997 publikovali ve své studii, že se v mateřské plazmě a séru nachází vysoká koncentrace fetální cfDNA. Uvedli, že v krvi matek během druhého trimestru se nachází průměrně 19 fetálních buněk na 16 ml krve (1,2 buňky na 1 ml).

Lo et al. (1998) se domnívali, že koncentrace fetální frakce se v cirkulaci matky s postupem těhotenství zvyšuje. Pomocí PCR v reálném čase provedli měření koncentrace této DNA v plazmě a séru. Měřili výsledky u těhotných žen v časném a pozdním těhotenství. V časně fázi byla detekována průměrná koncentrace 25,4 (GE)/ml. Tato hodnota říká, že v krvi matky se nachází celkem asi 3,4 % fetální cfDNA. Ve fázi pozdní, vyšla koncentrace fetální DNA 292,2 (GE)/ml neboli 6,2 % fetální cfDNA v krvi matky, což potvrdilo hypotézu o zvyšující se koncentraci fetální DNA během těhotenství. Výsledky byly zaznamenány jak pro plazmu, tak pro sérum, přičemž bylo zřejmé, že v rané fázi těhotenství se nachází více fetální DNA v séru, taktéž se stalo i ve fázi pozdního těhotenství (Tabulka 1).

	Časná fáze těhotenství		Pozdní fáze těhotenství	
	Plazma	Sérum	Plazma	Sérum
Koncentrace (GE/ml)	25,4	28,7	292,2	342,1

Tabulka 1: Koncentrace fetální DNA v mateřské plazmě a séru v průběhu těhotenství (Lo et al., 1998) (upraveno)

Dle Wang et al. (2013) se hladina fetální cfDNA zvyšuje o 1 % za týden po 21. týdnu těhotenství. Ke zvýšení o 0,1 % dochází mezi 10. až 21. týdnem.

Koncentraci fetální cfDNA ovlivňuje nejen průběh těhotenství, ale také predispozice a zdravotní stav matky. Například v případě zvyšující se hmotnosti matky docházelo k poklesu fetální frakce. Příčina tohoto jevu není zcela známá, ale jedna z hypotéz vysvětluje, že se zvyšující se obezitou dochází ke zvýšení apoptózy tukových buněk, což má za následek vyšší hladinu mateřské DNA vůči fetální. Dále bylo zjištěno, že také například původ ženy, krevní skupina, fyzická zdatnost či například kouření má vliv na koncentraci fetální frakce. Naopak věk, nebo způsob početí jsou faktory, které nehrají roli v koncentracích cfDNA (Galbiati et al., 2005) (Ashoor et al., 2012) (Kinnings et al., 2015).

3.3.3 Clearance fetální cfDNA

Po porodu dochází ke změnám koncentrace fetální DNA. K měření těchto koncentrací byla i zde použita metoda real-time PCR, kde se k detekci využívalo genu *SRY*. Bylo testováno 12 žen, jímž byly odebírány vzorky v době 1-42 dní po porodu dítěte, které bylo mužského pohlaví. Po analýze bylo zjištěno, že fetální cfDNA byla nedetekovatelná již po pouhém jednom dni po porodu. Ve druhé části výzkumu byly odebrány vzorky osmi žen, opět s dětmi mužského pohlaví, které ale rodily císařským řezem. Celkem u sedmi z těchto žen nebylo možné detekovat fetální DNA do 2 hodin po porodu. Z těchto výsledků bylo zřejmé, že poločas clearance fetální cfDNA v cirkulaci matky byl 16,3 minuty (Lo et al., 1999).

4 Prenatální diagnostika

4.1 Definice a cíle prenatální diagnostiky

Prenatální diagnostika zahrnuje vyšetřovací metody, umožňující diagnostiku vrozených chorob, které v mnoha případech vykazují neslučitelnost se životem a poskytují informace o nenarozeném plodu během těhotenství. Jedná se o multidisciplinární obor, ve kterém je nutná souhra a spolupráce lékařů, laboratorních pracovníků a zdravotníků. Metody prenatální diagnostiky vzešly rychle do povědomí populace a staly se nepostradatelnou součástí v porodnictví (Lo et al., 2007).

Cílem prenatálního testování je včas odhalit a identifikovat možné odchylky a patologie plodu v průběhu těhotenství a případně zahájit včasnou léčbu. Možnosti testování mají právo využít všechny gravidní ženy, ovšem doporučeno ze strany lékařů bývá testování z důvodu vyššího věku matky, rodinné anamnézy, nebo nálezu ultrasonografického vyšetření. V případě nálezu chromozomálních abnormalit, či geneticky podmíněných chorob je nezbytné dostatečně rodiče informovat o diagnóze a dalším postupu. Na základě závažnosti diagnózy je rodičům buď umožněno zahájit příslušnou léčbu a připravit je také na život s dítětem, které má zdravotní postižení, nebo pokud jsou vady neslučitelné se životem, mají rodiče možnost těhotenství ukončit do 24. týdne gravidity, dle Zákona č.66/1986 Sb (O umělém přerušeni těhotenství).

4.2 Vývoj prenatální diagnostiky

Monitorování vývoje plodu přišlo koncem 50. let 20. století s vývojem prenatální ultrasonografie. Tento nástroj se stal velice populárním o pár let později, v 70. letech téhož století, kdy bylo možné vizualizovat pohybující se plod, v reálném čase pomocí dvourozměrného sonografického sekvenování. Mezi další výhody tohoto technického rozvoje řadíme možnost monitorovat plod již v časně fázi těhotenství a odhalit tak abnormality. V 80. letech došlo opět k inovaci, kdy sonografií bylo možné pozorovat také anatomii srdce a perfuzi plodu (Bianchi et al., 2010). Stále dostupnější se stává 3D a 4D ultrasonografie, která je schopna detekovat anomálie týkající se centrálního nervového systému, obličeje a končetin (Timor-Tritsch et al. 2002).

Amniocentéza, jakožto nástroj pro analýzu chromozomů plodu, byla použita poprvé v 50. letech 20. století. Steel a Berg v roce 1966 prokázali, že v plodové vodě, kterou odebrali právě touto metodou, se nacházejí fetální buňky, které jsou schopny kultivace. Jelikož se

jedná o metodu invazivní, která je spojena s riziky pro plod a matku, bylo cílem vyvinout techniky, které nebudou zatěžovat plod, a přitom budou schopny detekce chromozomálních abnormalit. Výše rizik u jednotlivých metod bude diskutována dále v této práci. V roce 1988 došlo k rozvoji neinvazivní prenatální diagnostiky, která využívá fetálních buněk, které jsou přítomné v mateřské krvi a tím pádem mohou sloužit k detekci vrozených vad plodu (Bianchi et al., 1990) (Simpson et al., 1993) (Lo et al., 1997). V současné době se usiluje o zvýšení citlivosti screeningových metod testování aneuploidií s pomocí právě fetální cfDNA z krve matky a snížení rizik jak pro matku, tak plod.

4.3 Metody prenatální diagnostiky

S rozvojem a vývojem technologií v medicíně se neustále rozšiřují také možnosti prenatálního genetického testování. Dle dostupných statistik Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) se až 5 % těhotných žen setkává s komplikacemi v podobě vrozených vad a genetických poruch plodu (<https://www.cdc.gov/>). Testy prenatální diagnostiky můžeme dělit na dva typy. Prvním typem jsou testy screeningové neboli neinvazivní. Na základě negativního výsledku tohoto screeningového testu, či na doporučení lékaře jsou k dispozici testy diagnostické (invazivní), které určují definitivní diagnózy. Jelikož jsou invazivní techniky spojeny s riziky jak pro plod, tak i matku, je předmětem snahy vědců nacházet postupy, které takové riziko nepředstavují a podají definitivní diagnózy bez potřeby použití testů diagnostických

4.3.1 Invazivní metody prenatální diagnostiky

Invazivní metody mají za cíl vyšetřit plod a vyloučit, či potvrdit genetické vady. Tyto metody se nazývají invazivními právě protože k vyšetření je nutné získat tkáň plodu a vstoupit tak do děložní dutiny, což s sebou nese riziko ztráty plodu. I přes toto riziko jsou v klinické praxi stále využívány, a to kvůli přesnosti určení chromozomálních odchylek. K této diagnostické metodě se přistupuje a je matkám doporučována pouze na základě indikací, které určuje lékař (Monni et al., 2014). Mezi nejběžnější invazivní metody patří aminocentéza, odběr choriových klků a kordocentéza.

4.3.1.1 Amniocentéza

AMC neboli odběr plodové vody byl ve spojení s prenatální diagnostikou poprvé proveden v roce 1956 Fuchsem a Riisem (Jindal et al., 2023). Jedná se o nejpoužívanější

metodu, která se provádí ve II. trimestru těhotenství, mezi 15. a 16. týdnem. Plodová voda je odebrána pomocí jehly transabdominálně za neustálé kontroly ultrazvukem. Jehlou se nasaje obvykle asi 20 ml z amniové dutiny a tento vzorek slouží k získání karyotypu plodu, který se dále vyšetřován. S výkonem tohoto zákroku souvisí i komplikace jako je krvácení, zavlečení infekce, či poškození plodu. I přesto, že se jedná o invazivní vyšetření, je riziko ztráty těhotenství dle nejnovějších studií méně než 1 % (Salomon et al., 2019).

4.3.1.2 Odběr choriových klků

Historie této metody sahá až do roku 1975, kdy odběr choriových klků byl použit pro diagnostické účely v Číně. Cílem je pomocí speciální jehly odebrat choriovou tkáň z trofoblastu k následnému vyšetření karyotypu plodu. Opět se u zákroku využívá ultrasonografie. Výhodou oproti AMC je časnější možnost odběru, a tedy i časnější získání informace o výsledku genetické analýzy. Provádí se v I. trimestru, mezi 10. až 14. týdnem těhotenství. Riziko ztráty těhotenství je o něco vyšší než při AMC, což se dá očekávat vzhledem k zásahu do dělohy matky v dřívějším stádiu těhotenství (Holtzman et al. 2008).

4.3.1.3 Kordocentéza

Jedná se o invazivní metodu, při které se odebírá fetální krev přímo z pupečnickové vény pomocí speciální jehly za pomoci ultrazvuku. Provádí se později ve srovnání s ostatními metodami a to od 18. týdne těhotenství. Určení karyotypu z fetální krve je velmi rychlé a výsledky jsou k dispozici 48-72 hodin po odběru. Riziko ztráty těhotenství je téměř stejné, mírně vyšší ve srovnání s dalšími invazivními metodami (Calda et al. 2007).

4.3.2 Neinvazivní metody prenatální diagnostiky

Cílem neinvazivních metod je získat informaci o zdraví plodu takovým způsobem, který není rizikový pro matku a plod. Jelikož se jedná pouze o screeningové metody, odhaduje se pouze pravděpodobnost výskytu vrozených vad, ale nediodnostikují se konečné výsledky.

4.3.2.1 Ultrazukový screening

Vyšetření ultrazvukem je rutinní metoda při screeningu plodu. Ultrazvuk umožňuje detekovat pohlaví plodu, chromozomální abnormality, srdeční vady, rozštěpy páteře, nebo také orgánové vady. Od raného těhotenství lze pomocí UZ zjistit gestační věk embrya, či dvojčetné těhotenství. Typicky prováděným testem je měření záhlaví plodu-nuchální

translucence (NT). NT větší, než 3 mm mezi 10-14. týdnem těhotenství naznačuje možnost přítomnosti aneuploidií (Nicolaidides et al., 1992). V takovém případě je indikováno podstoupení invazivní metody k přesnému potvrzení diagnózy, při které je také využíváno metod ultrasonografie.

4.3.2.2 Biochemický screening

V mateřském séru lze pozorovat hladiny markerů, které jsou vyhodnocovány tzv. Triple testem. Tento test, dostupný od 80. let, se provádí u těhotných žen, které mají dokončený 16. gestační týden. Z krve matky se vyšetřují hladiny alfa-fetoproteinu (AFP), nekonjugovaného estriolu (uE) a choriového gonadotropinu (hCG) (Haddow et al. 1992). Tímto testem lze odhalit přítomnost chromozomálních aberací jako Downův syndrom, Edwardův syndrom, nebo také defekty neurální trubice.

4.3.2.3 Neinvazivní prenatální testování

Po prokázání přítomnosti fetální cfDNA v krevním řečišti matky se stala cenným materiálem pro vědce a jejich výzkumy. Tímto neinvazivním způsobem je možné od 10. týdne těhotenství z krve matky zjistit například pohlaví plodu a aneuploidie, jako je trizomie chromozomu 21, 18 a 13.

5 Analýza a využití fetální cfDNA v prenatální diagnostice

I když fetální cirkulující DNA představuje relativně malý podíl v mateřské plazmě, stala se oblíbeným nástrojem v klinické praxi. Neinvazivní prenatální testování využívá fetální cfDNA k níže popsaným procesům. Cílem neinvazivního prenatálního testování (NIPT) a jejím inovacím je snaha o snížení nutnosti podstoupení invazivních úkonů, jako je AMC, nebo CVS.

5.1 Detekce aneuploidií

Lidské diploidní buňky obsahují 46 chromozomů. Každý jedinec má dvě sady chromozomů, jednu haploidní sadu od matky a jednu od otce. V případě genomových mutací dochází k nadbytku, či ztrátě chromozomů v buňce a tomuto jevu se říká aneuploidie. Její příčinou je neoddělení homologních párů chromozomů během prvního meiotického dělení nebo chromatid ve druhém meiotickém dělení, tyto děje označujeme jako nondisjunkce.

Aneuploidie je spojena s významným rizikem pro těhotenství a může vést k porodu mrtvého plodu, potratu, či výskytu mentálního a fyzického postižení.

Existují dva typy aneuploidie a to monosomie, která nastává v případě, kdy jedinci jedna kopie chromozomu chybí. Příkladem monosomie je Turnerův syndrom (46, XX). Dalším typem je trisomie, která představuje karyotyp, ve kterém je jeden chromozom naopak navíc. Příkladem je Downův syndrom (T21), Edwardsův syndrom (T18) a Patauův syndrom (T13).

Nejčastěji vyskytující se chromozomální vada je právě trizomie 21 chromozomu – Downův syndrom s incidencí 1:800. Riziko výskytu této aneuploidie se zvyšuje s věkem matky. Ve věku 40 let matky je pravděpodobnost výskytu DS až 17krát vyšší, než u matky ve věku 20 let.

https://journals.lww.com/greenjournal/citation/2016/05000/practice_bulletin_no_163_screening_for_fetal.41.aspx.

Charakteristickými rysy pro toto onemocnění jsou například snížený intelekt, mentální postižení, faciální dysmorfie a další vývojové vady.

Nejpoužívanější metoda pro neinvazivní prenatální detekci aneuploidii je masivně paralelní sekvenování (MPS) (Chiu et al., 2008) (Fan et al., 2008). Citlivost těchto metod musí být vzhledem k vlastnostem fetální cfDNA v mateřské plazmě vysoká. V roce 2015 byla publikována metaanalýza, která hodnotí efektivitu screeningu aneuploidii s využitím fetální cfDNA (Gil et al., 2017). Výsledné hodnoty této analýzy jsou uvedeny v tabulce 2. Do tabulky jsem dále zahrнула incidenci jednotlivých aneuploidii.

	Citlivost (%)	Falešně pozitivní nálezy (%)	Incidence
Trizomie 21	99,7	0,040	1 z 800
Trizomie 18	97,9	0,040	1 z 7 500
Trizomie 13	99,0	0,040	1 z 15 000
Monozomie X	95,8	0,140	1 z 5000 žen
Další aneuploidie gonozomů	100	0,004	
Dvojčetné těhotenství T21	100	0	

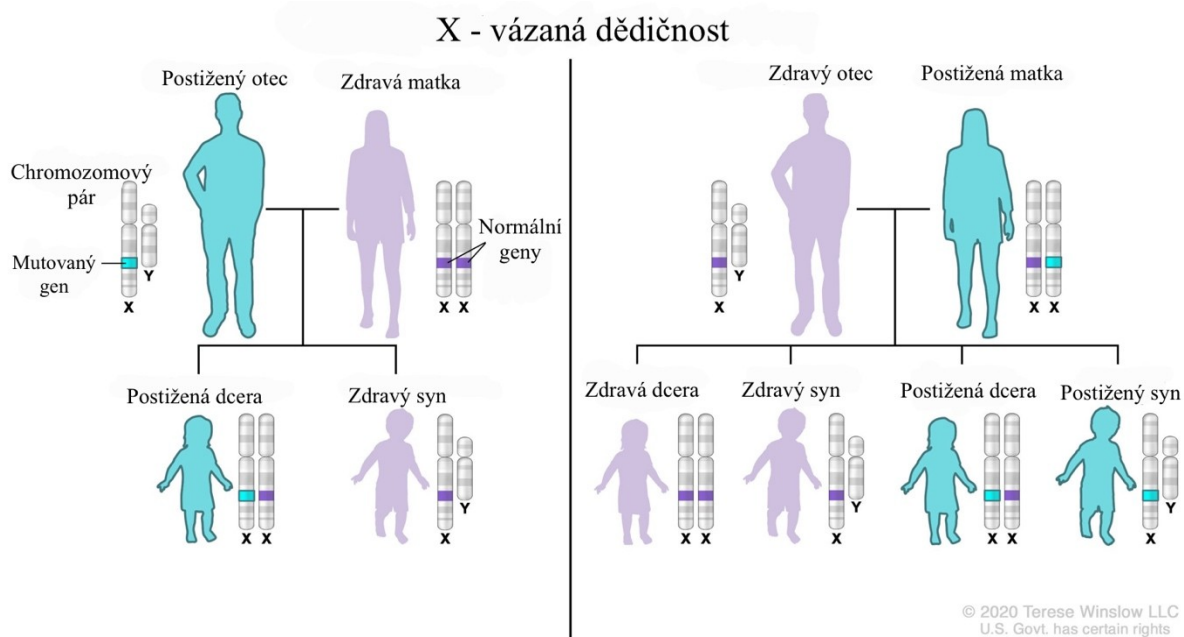
Tabulka 2: Hodnoty citlivosti a falešně pozitivních nálezů při screeningu aneuploidii a jejich incidence (Gil et al., 2017)

https://journals.lww.com/greenjournal/citation/2016/05000/practice_bulletin_no_163_screening_for_fetal.41.aspx.

V případě trizomie 13 a 18 jsou hodnoty citlivosti nižší, což může být způsobeno obsahem guaninu a cytosinu, který je v těchto chromozomech v nižší koncentraci, než u chromozomu 21 a tím pádem mohlo být sekvenování zkráceno. Vědci se domnívají, že NIPT nabízí mnohem větší specifitu a nižší míru falešně pozitivních nálezů než biochemický screening v prvním trimestru těhotenství. Díky takto vysoké specifitě se daří nabízet méně invazivních testů, což je dlouhodobým cílem lékařské genetiky (Norton et al., 2015).

5.2 Detekce pohlaví plodu

Neinvazivní prenatalní testování využívá fetální cfDNA mimo jiné k určení pohlaví plodu. Detekce pohlaví je možná pomocí real-time PCR již od 7. týdně těhotenství, odkdy je možno detekovat fetální cfDNA v mateřské plazmě (Lo et al., 1998). Právě možnost detekce pohlaví v takto ranném stádiu těhotenství je výhodou oproti ultrasonografii, která je schopna rozlišit vývoj zevních genitálií od 15. týdně gestace. Pokud existuje riziko výskytu genetického onemocnění vázaného na chromozom X, je žádoucí, aby bylo pohlaví zjištěno během prvních týdnů těhotenství. V případě, že žena nosí plod ženského pohlaví, je automaticky možnost tohoto onemocnění vyloučena, jelikož postihuje převážně chlapce. Honda et al. v roce 2002 uvedli, že NIPD je tzv. „předtest“, jehož výsledek určí, zda bude nutno podstupovat invazivní prenatalní diagnostiku. Mezi X vázaná onemocnění řadíme například Duchenneovu muskulární dystrofii, či hemofilii A i B.



Obrázek 1: Grafické znázornění přenosu X vázané recesivní dědičnosti (upraveno)

Podle: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/x-linked-dominant-inheritance>

K určení pohlaví plodu se využívá chromozom Y, který je v přítomnosti v mateřské plazmě v případě, že plod je pohlaví mužského. Konkrétně se detekují sekvence genu *SRY* (sex determination region Y), který leží na Y chromozomu a hraje rozhodující roli při vývoji mužského pohlaví. Další analyzovanou sekvencí pomocí real-time PCR je například *DYS14*, rovněž lokalizovaná na Y chromozomu (Finning et al., 2008). Spolehlivost této metody určující pohlaví se neustále zdokonaluje a dosahuje téměř 100 %. V časně fázi těhotenství je detekce pomocí fetální cfDNA je přesnější než užití ultrasonografie (Avent et al., 2006), (Hill et al., 2011).

5.3 Detekce monogenních chorob

Monogenně dědičné onemocnění je typ genetické choroby, při které dochází k mutaci právě v jednom genu. Charakter onemocnění závisí na funkci, kterou vykonává mutovaný gen. Mutace může způsobovat nedostatečnou, či naopak nadměrnou expresi genu, který kóduje enzymy, jejichž vlastnosti a metabolické dráhy, na kterých se enzymy podílí, jsou tím pádem také pozměněny. Vlivem mutace může také dojít k poruše tvorby strukturálních proteinů, což může výrazně ovlivňovat funkci orgánových soustav. Tyto mutace mohou být přenášeny z rodičů na své potomky a vyznačují se obvykle předvídatelnou dědičností. Dle typu dědičnosti se monogenní choroby rozdělují na autozomálně dominantní (AD), autozomálně recesivní (AR) a X-vázané choroby.

Autozomálně dominantní onemocnění se fenotypově projevuje jak u heterozygotů (Aa), tak u dominantních homozygotů (AA), jelikož je znak přenášen právě dominantní alelou. Diagnostika mutací na fetálních autozomech je velice náročná, z důvodu převahy mateřské DNA. NIPD bylo tedy omezeno na detekci dominantního onemocnění, které je zděděno od otce, či vzniklého de novo spontánní mutací (Wright et al., 2009). S příchodem technologického rozvoje, MPS a digitálního PCR lze stanovit původ fetálních mutací autozomálně dominantního onemocnění (Lam et al. 2012). Příkladem je Huntingtonova choroba (HD), což je neurodegenerativní onemocnění, které vzniká mutací v *HTT* genu, který kóduje huntingtin, zajišťující funkčnost nervových buněk. Příznaky této nemoci se vyznačují pozdním nástupem, nejčastěji však ve středním věku. Pacienti trpí choreou, depresí, změnami

osobnosti, progresivní demenci a po několika letech trvání nemoci končí smrtí. V roce 2003 González-González et al. provedli neinvazivní diagnostiku HD pomocí fetální DNA v mateřské plazmě. Studována byla těhotná žena ve 13. týdnu gestace společně s jejím mužem, který byl postižen HD. Byly analyzovány počty repetic v genu *HTT*, kterých se vyskytuje u zdravých jedinců 9-36. Vyšší počet repetic se vyskytuje u nositelů tohoto onemocnění. Pomocí kvantitativně fluorescenční PCR došlo k úspěšné diagnostice a González-González et al. zjistili, že plod není chorobou postižen. Další onemocnění, řadící se mezi AD, které je možno detekovat analýzou mateřské plazmy je například achondroplazie (Saito et al., 2000) a myotonická dystrofie (Amicucci et al., 2000).

U autozomálně recesivních onemocnění je přenos znaku podmíněn recesivní alelou. Proto se nemoci tohoto druhu projeví pouze u recesivních homozygotů (aa). U heterozygotů (Aa) se recesivní alela projevuje pouze v případě neúplné dominance. AR onemocnění se vyskytují u obou pohlaví ve stejné míře a pravděpodobnost jejich vzniku se zvyšuje u příbuzenských párů. Diagnostika těchto onemocnění pomocí neinvazivního prenatalního testování je opět složitá díky neschopnosti rozlišit identické alely od matky a otce. Lépe proveditelné je to u rodiny, která už postiženého potomka má. V těchto případech je možné analyzovat geny, které jsou spojeny s onemocněním a jakým způsobem jsou spojeny s geny rodičů. S pomocí mateřské plazmy a MPS se sekvenují jednotlivé jednonukleotidové polymorfismy (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) v daných genech, což pomůže určit rodičovské genotypy a jejich spojitost s chorobou. Na základě výsledků z tohoto testování je možné posoudit riziko onemocnění u nenarozeného dítěte a případně navrhnout další kroky diagnostiky. Tento postup diagnostiky aplikovali například New et al. v roce 2014 na recesivní onemocnění kongenitální adrenální hyperplazie (CAH). Příkladem AR nemoci je β -talasémie. Při tomto dědičném onemocnění dochází k mutacím genů, které kódují syntézu β -globinového řetězce a ten je vlivem této události v nedostatku. Naopak α -globinový řetězec je v nadbytku, což způsobuje poškození a rozpad erytrocytů. NIPD tohoto onemocnění byla poprvé provedena v roce 2002 vědci Chiu et al., kteří využili metodu RT-PCR k detekci paternálně zděděných mutací. V následujících letech diagnostikovali β -talasémii pomocí detekce SNP (Papasavva et al., 2008), nebo již zmíněným MPS (Lam et al., 2012). Dle nejnovějších studií lze využít pro diagnostiku β -talasémie u plodu také metodu digital droplet PCR (ddPCR) (Suwannakhon et al. 2023). Další AR onemocnění, využívající metod NIPD je například cystická fibróza (González-González et al., 2002).

5.4 Detekce Rh faktoru plodu

Erytrocyty mají na svém povrchu vystaveny antigeny, dle kterých se určuje krevní skupina. Rozlišujeme dva základní systémy krevních skupin, a to konkrétně AB0 systém a Rh systém.

Rh faktor je determinován přítomností více než 40 antigenů, přičemž významnou roli hrají antigeny C, c, D, E, e. Nejvýznamnější je antigen D, jehož přítomnost na erytrocytech dává krvi označení Rh⁺. V případě jeho nepřítomnosti je efekt opačný a jedince označujeme jako Rh negativního (Rh⁻).

Rh pozitivitu determinujeme na genu RHD, přičemž pozitivní jedinci jsou heterozygoti, či homozygoti bez delecí na tomto genu. Naopak u Rh negativních jedinců nesou obě alely genu RHD delecí, takže jsou homozygoti s delecí. S pomocí fetální cfDNA lze identifikovat, jaký Rh faktor zdědil plod. V případě, že Rh negativní matka má plod bez delecí na RHD genu, znamená to, že plod zdědil gen od otce a je Rh pozitivní.

V bělošské populaci je Rh pozitivních více než 80 % jedinců (Wagner et al., 1995) (Daniels et al., 2009). Inkompatibilita nastává při krevní transfuzi, kdy je Rh negativnímu jedinci podaná Rh⁺ krev. V tento moment dochází ke vzniku protilátek a dochází k hemolytické reakci. Rh systém má význam také v inkompatibilitě matky a plodu, kdy matka je Rh negativní a plod má Rh⁺ zděděný od otce. V průběhu porodu se do mateřského oběhu dostávají fetální erytrocyty a evokují tvorbu anti-D protilátek. Protilátky typu IgG přechází přes placentu a vážou se na antigeny erytrocytů, což způsobuje hemolytickou nemoc novorozenců (HDN). Destruované fetální erytrocyty mohou mít za následek mimo jiné poškození CNS, anémii či dokonce úmrtí plodu *in utero*. Těmto následkům lze předejít imunoprophylaxí matky. Do 72 hodin je nutno podat matce profylaktickou infuzi anti-D imunoglobulin, který zajistí destrukci Rh pozitivních fetálních erytrocytů, které se dostaly do oběhu matky. V takovém případě není tvorba protilátek ani zahájena.

S pomocí NIPD a fetální cfDNA je možno určit Rh faktor v krvi plodu a tím předejít a minimalizovat výše uvedený proces. Poprvé byla neinvazivní prenatalní diagnostika k vyšetření Rh faktoru použita v roce 1998. Největší senzitivitu tento test vykazoval při provedení po prvním trimestru těhotenství (Lo et al., 1998) (Costa et al., 2002). Detekcí Rh statusu plodu se zabývalo hned několik studií, v nichž byla popsána NIPD Rh faktoru pomocí kvantitativní PCR (Geifman-Holzman et al. 2006). S využitím této metody byl amplifikován exon 7 na *RHD* genu, přičemž analýza Rh faktoru plodu se ukázala jako vysoce specifická

(Faas et al., 1998). Vysoké specifity dosáhly i další studie, zabývající se touto problematikou (Bischoff et al., 1999) (Zhong et al., 2000) (Finning et al., 2002).

6 Metody detekce fetální cfDNA

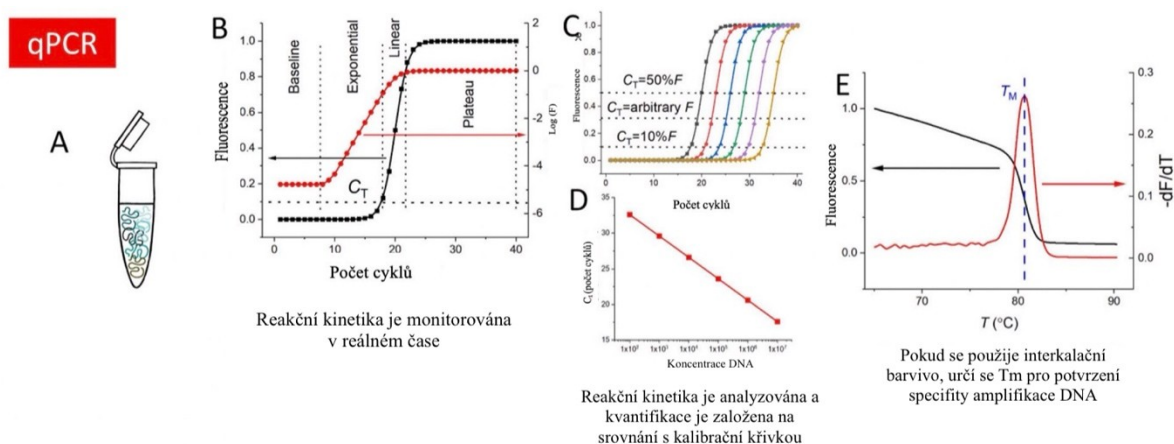
6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce byla objevena v roce 1983 Kary Mullisem (Mullis et al. 1983), který získal o 10 let později Nobelovu cenu za chemii. Tato metoda je využívána k amplifikaci určitého segmentu DNA/RNA *in vitro*. Pro průběh reakce je nezbytná přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů, pufru, DNA polymerázy. Princip PCR cyklu spočívá ve třech krocích, které se až 30krát opakují k získání dostatečného množství kopií úseku DNA pro následnou analýzu. Prvním krokem je denaturace, během které se dsDNA vlivem vysoké teploty (95 °C) rozdělí na jednovláčkovou DNA. Následuje vazba primerů, neboli annealing při teplotě 50-60 °C. Třetím krokem je elongace, čímž dojde k syntéze komplementárních řetězců pomocí dNTP a DNA polymerázy, která nasedla na primery za teploty 65-75 °C. Mezi metodami detekce fetální cfDNA se PCR a hlavně její modifikace řadí mezi metody rutinně využívané.

6.1.1 Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR) neboli real-time PCR (RT-PCR) je nejvíce využívanou modifikací PCR, jelikož lze sledovat amplifikaci molekuly DNA v reálném čase, což je výhodou oproti klasické PCR, která detekuje až výsledný amplikon na elektroforóze. Průběh amplifikace je zaznamenáván v PCR cycleru, který snímá fluorescenční záření, které vyzařují sondy navázané na DNA a také mění automaticky teplotu. Sondy umožňují kvantitativní detekci a můžeme je rozdělit na hydrolyzační, hybridizační a sondy vážící se na DNA. Hydrolyzační je například sonda TaqMan, která funguje na principu reportéru a zhášeče. Pokud jsou tyto dva komponenty v bezprostřední blízkosti, zhášeč pohlcuje emisi reportéru, který tím pádem nesvítí. Pro detekci fluorescenčního záření je potřeba Taq polymeráza, která hydrolyzuje sondu, zhášeč se dostane dál od reportéru a ten může svítit. Další skupinou jsou sondy hybridizační, mezi které řadíme například Molecular Beacon, které fungují opět na principu reportéru a zhášeče, u nichž k detekci záření dochází po změně tvaru sondy. SybrGreen je fluorescenční barvivo, které svítí v závislosti na vazbě do malého žlábků dsDNA.

V klinické praxi je tato metoda velice využívanou v oboru lékařské genetiky, onkologie, mikrobiologie apod. V návaznosti na fetální cfDNA byla tato metoda poprvé použita v roce 1998, kdy byly zkoumány hladiny fetální frakce v mateřské plazmě (Lo et al., 1998). Své využití také našla v detekci pohlaví, nebo při studiu vymizení fetální cfDNA z plazmy po porodu pomocí genu *SRY* (Lo et al., 1999). V této práci jsem také zmiňovala využití RT-PCR pro účely detekce paternálně zděděných mutací u HD (González-González et al., 2003) a dalších monogenních onemocnění v kapitole 5.3.



Obrázek 2: Kvantitativní PCR (Zhang et al., 2024) (upraveno)

(A) Zkumavka se vzorkem. (B) Amplifikační křivka qPCR se čtyřmi fázemi. (C) Určení kritického prahu – křivky pro různé hodnoty počtu kopií DNA. (D) Odvozená standardní křivka qPCR. (E) Analýza křivky tání provedená po dokončení PCR s použitím interkalačního barviva k určení hodnoty T_m .

6.1.2 Digitální PCR

Digitální PCR (dPCR) je pokročilá technika polymerázové řetězové reakce, která zajišťuje vysokou citlivost a přesnost. Tato metoda byla poprvé popsána a uvedena do klinické aplikace v roce 1999. Celý reakční objem je rozdělen do subreakcí do jamek na čipu, nebo kapek o nanolitrových objemech separovaných v emulzi. V každé jamce či kapce pak probíhá samostatná PCR reakce. I zde se využívá vlastností fluorescenčních sond, které jsou součástí reakcí, kde detekují například mutantní a wild-type alely a poskytují absolutní kvantifikaci počtu kopií DNA (Vogelstein et al., 1999).

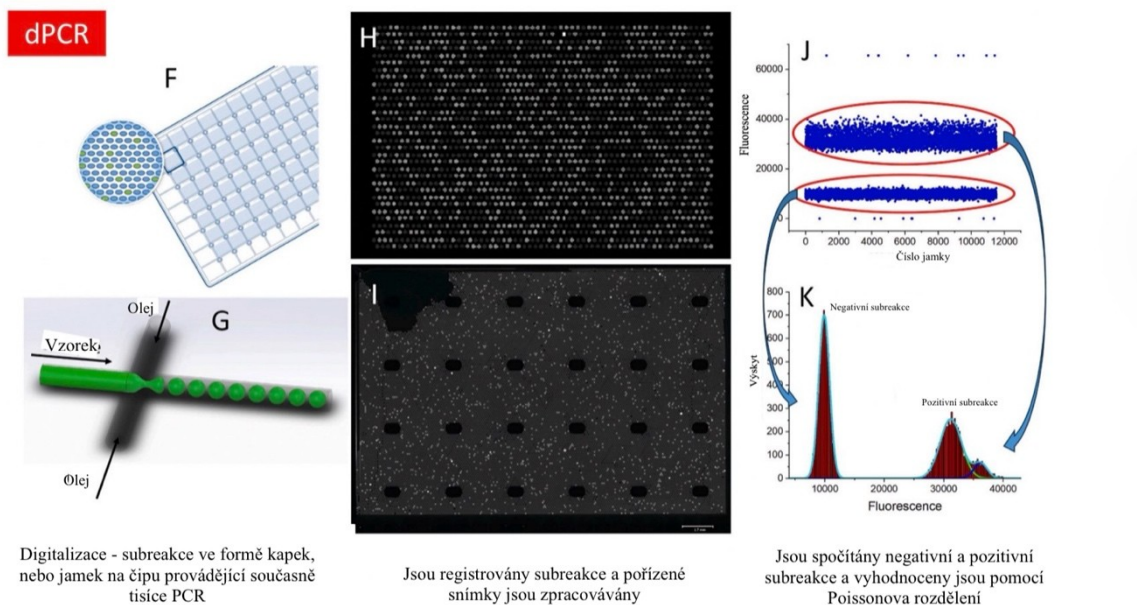
Metoda čipové cdPCR využívá mikrofluidické křemíkové čipy, které obsahují reakční jamky, do nichž je přidána subreakce. V každé jamce probíhá PCR reakce, jejíž produkty jsou

fluorescenčně detekovány pomocí fluorescenčního mikroskopu (Dube et al., 2008) (Li et al., 2018).

6.1.2.1 Droplet digital PCR

Principem ddPCR je rozdělení subreakce do kapek, k čemž se využívá metod mikrofluidiky. Dochází ke tvorbě kapek v olejové emulzi, kde následně probíhají jednotlivé PCR reakce například s pomocí TaqMan sondy. K analýze výsledků se využívá průtoková cytometrie, která detekuje kapku po kapce a pomocí fluorescence detekuje, ve kterých kapkách se nachází cílový fragment DNA. Výsledky zpracovává speciální software, který je schopen určit koncentraci kapek, které vykazují pozitivní signál a je v nich tedy přítomna cílová DNA (Hindson et al., 2011) (Li et al., 2018).

K prvnímu využití digitálního PCR pro neinvazivní prenatální diagnostiku došlo v roce 2007, kdy Lo et al. detekovali fetální trizomii 21 z fetální cfDNA v mateřské plazmě (Lo et al., 2007). O pár let později byly pomocí digitálního PCR diagnostikovány další typy aneuploidii. Pomocí mikrofluidní dPCR byla detekována mimo trizomie 21 také trizomie 18 a 13 chromozomu (Fan et al. 2009). Své využití našla tato metoda v RHD genotypizaci (Svobodová et al. 2015), dále také v detekci otcovsky zděděných mutací při cystické fibróze (Debrand et al., 2015). X – vázané choroby jako například β -talasémie (Camunas-Soler et al., 2018), srpkovitá anémie (Barrett et al., 2012), hemofilie A i B jsou také detekovatelné pomocí dPCR (Tsui et al. 2011). V několika případech detekce vykazovala dokonce dPCR vyšší senzitivitu než kvantitativní PCR (RT-PCR) (Sillence et al., 2015).



Obrázek 3: Digitální PCR (Zhang et al., 2024) (upraveno)

(F) Kompartmentalizace vzorku pro PCR na čipu. (G) Kompartmentalizace vzorku pro PCR pomocí kapek. (H) Vizualizace simulovaného obrazu dPCR založeného na čipu. (I) Skutečný obraz dPCR založeného na kapkách. (J) 1D graf zobrazující výsledky ve dvou pásech. (K) Graf znázorňující data ve formátu histogramu proloženého Gaussovou distribuční křivkou.

6.2 Sekvenování nové generace

Sekvenování nové generace (NGS – next generation sequencing) je inovativní technologie, k jejímuž rozvoji došlo v 90. letech 20. století. Touto metodou dokážeme sekvenovat velké množství sekvencí současně za kratší čas a menší náklady, oproti jiným metodám. Dříve se k sekvenaci využívalo modifikací Sangerových metod, které postupem vývoje technik vystřídal právě sekvenování nové generace. Cílem NGS je osekvenovat buďto celý genom, nebo panely vybraných genů. Někdy bývá označována jako masivně paralelní sekvenování (MPS) právě z důvodu generování velkých množství dat, které se následně musí složitě analyzovat pomocí bioinformatických metod.

Principem je fragmentace templátové DNA a následné připojení adaptérů. Poté dochází k amplifikaci jednotlivých fragmentů pomocí PCR a k paralelnímu sekvenování. Výsledkem jsou sekvence o velikosti 20-700 bp. Mezi rutinně zavedené metody dnešní doby patří například Illumina, což je metoda založená na syntéze s využitím reverzních terminátorů barviva. V případě nasednutí nukleotidu proběhne fluorescenční záření, které jsme schopni detekovat. S technickým rozvojem dochází k vývoji metod, které překonávají úskalí metod předchozích a umožňují nám dlouhé čtení fragmentů a sekvenaci jedné molekuly DNA

v reálném čase. Jako příklad těchto metod lze uvést sekvenování PacBio, využívající SMRT – jednomolekulový přístup sekvenování s fluorescenčními sondami v reálném čase. Další je metoda sekvenování Oxford Nanopore, která se založena na průchodu jednovláknové DNA nanopórem, přičemž dochází k měření změn elektrického proudu, čímž se určí přesná sekvence DNA (Satam et al., 2023).

První sekvenaci pomocí metody MPS provedli v roce 2007 Chiu et al., kteří sekvenovali DNA z mateřské plazmy v prvním a druhém trimestru těhotenství. Z těchto vzorků diagnostikovali přítomnost trizomie 21 chromozomu, tedy zda je plod postižen Downovým syndromem či nikoliv (Chiu et al., 2008). I tato metoda je využitelná k detekci dalších fetálních aneuploidií (Chen et al., 2011) (Bianchi et al., 2012), včetně pohlavních, jako je například Turnerův syndrom (Mazloom et al., 2013) (Zhang et al., 2017). Lo et al. v roce 2010 osekvenovali genom k zjištění velikosti fragmentů fetálních a mateřských fragmentů. Tato technika má širokou škálu klinického využití.

7 Etické aspekty a budoucí směry NIPD

Od počátku zavedení neinvazivních prenatalních technik vědci usilují o neustálé zlepšování a zkvalitňování její účinnosti. Cílem je snížit míru falešně negativních výsledků screeningových metod, mezi které se řadí právě neinvazivní prenatalní testování. Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny několika faktory, a to například nízkým množstvím fetální cfDNA v mateřské plazmě (Kinnings et al., 2015). V případě, že by NIPT bylo natolik citlivé a spolehlivé v detekci chromozomálních aberací, mohli bychom se v budoucnu vyhnout podstupování invazivních zákroků, které představují riziko pro plod a matku. Vědečtí pracovníci předpokládají, že s rozvojem NIPD bude možno diagnostikovat širší spektrum chromozomálních aberací bez nutnosti aplikace invazivních metod. Sekvenování nové generace (NGS) přineslo do této oblasti také mnoho inovací. S využitím těchto technik jsme schopni analyzovat fetální cfDNA s vyšší citlivostí a přesností již v rané fázi těhotenství. Neodmyslitelnou částí je rozhodně nabídnout větší dostupnost NIPT i v zemích, které nehradí tyto testy z veřejného financování, jelikož neinvazivní analýza fetální cfDNA není cenově dostupná pro všechny ženy. Někteří vědci se domnívají, že integrace umělé inteligence do tohoto oboru by mohla přinést efektivnější zpracování dat získaných z analýzy fetální cfDNA (Gahan et al., 2022) (Jayashankar et al., 2023).

Vyšetření prenatalní diagnostiky s sebou nesou jisté etické otázky, které je třeba zvážit. Před provedením vyšetření je důležité nechat rodičku podepsat informovaný souhlas, kterým těhotná žena potvrzuje souhlas s testováním. Dále má informovaný souhlas za úkol

informovat rodiče o tom, co NIPD zahrnuje, jaké mohou být výsledky, zmíněny musí být rovněž limitující faktory těchto testů a jejich následky. Velice důležitým aspektem je zachování lékařského tajemství pro řádné dodržení soukromí rodiny. Po obdržení výsledků testu je neméně důležitá také jejich dostatečná interpretace a kvalifikované genetické poradenství. V případě rozhodnutí matky o přerušení těhotenství vznikají další etické otázky, které se týkají práv plodu a matky (Calda et al. 2003) (Gahan et al., 2022) (Moufarrej et al., 2023).

8 Závěr

V této práci byly shrnuty dosavadní poznatky o volně cirkulující a fetální cfDNA, využívaných v prenatalní diagnostice. Diskutovány byly také mechanismy jejího uvolňování do krevního oběhu matky a hladiny v průběhu celého těhotenství. Dále jsem popsala metody prenatalní diagnostiky, které využívají analýzu fetální cfDNA k detekci mnoha důležitých genetických informací o plodu. Metody PCR a NGS se ukázaly být efektivními v detekci chromozomálních abnormalit, monogenních onemocnění, nebo také v určení pohlaví plodu v rané fázi těhotenství. Vzhledem k dosavadním technologickým pokrokům má NIPD potenciál se stát více průkaznou metodou a standardem v prenatalní diagnostice, aby byla zajištěna co nejvyšší možná kvalita péče pro matku a plod, bez nutnosti podstoupit zákroky invazivní.

I přes mnohé výhody neinvazivních metod je třeba brát v úvahu i etické aspekty. S využitím těchto metod přichází etické otázky týkající se soukromí, či dostatečné informovanosti rodičů o použitých metodách a jejich následcích, které je potřeba konzultovat před provedením vyšetření.

Tuto problematiku bych ráda dále zpracovávala ve své diplomové práci v navazujícím magisterském studiu na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy, s cílem získat hlubší poznatky a informace o tomto tématu, přesahující do praxe.

Seznam použité literatury

- Amicucci, P., Gennarelli, M., Novelli, G., & Dallapiccola, B. (2000). Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clinical chemistry*, 46(2), 301–302.
- Ashoor, G., Syngelaki, A., Poon, L. C., Rezende, J. C., & Nicolaides, K. H. (2013). Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 41(1), 26–32. <https://doi.org/10.1002/uog.12331>
- Avent, N. D., & Chitty, L. S. (2006). Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenatal diagnosis*, 26(7), 598–603. <https://doi.org/10.1002/pd.1493>
- Barrett, A. N., McDonnell, T. C., Chan, K. C., & Chitty, L. S. (2012). Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clinical chemistry*, 58(6), 1026–1032. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.178939>
- Bianchi, D. W., Flint, A. F., Pizzimenti, M. F., Knoll, J. H., & Latt, S. A. (1990). Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(9), 3279–3283. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.9.3279>
- Bianchi, D. W., Platt, L. D., Goldberg, J. D., Abuhamad, A. Z., Sehnert, A. J., Rava, R. P., & MatErnal BLood IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group (2012). Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstetrics and gynecology*, 119(5), 890–901. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31824fb482>
- Bianchi, D. W., Williams, J. M., Sullivan, L. M., Hanson, F. W., Klinger, K. W., & Shuber, A. P. (1997). PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *American journal of human genetics*, 61(4), 822–829. <https://doi.org/10.1086/514885>
- Bianchi. *Fetology: Diagnosis and Management of the Fetal Patient*, . 2. McGraw-Hill Education, 2000. ISBN 978-0071442015.
- Bischoff, F. Z., Nguyen, D. D., Marqu ez-Do, D., Moise, K. J., Jr, Simpson, J. L., & Elias, S. (1999). Noninvasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 6(2), 64–69. [https://doi.org/10.1016/s1071-5576\(98\)00051-3](https://doi.org/10.1016/s1071-5576(98)00051-3)
- Bos J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*, 49(17), 4682–4689.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>

Calda P. 2003. Etické problémy prenatalní diagnostiky a terapie na počátku 3. tisíciletí. *Interní Med pro praxi* [Internet] 5:6–10. Available from: <https://www.internimedica.cz/artkey/int-200303-0012.php>

CALDA, Pavel. *Ultrazvuková diagnostika v těhotenství: pro praxi*. Praha: Aprofema, 2007. ISBN 978-80-903706-1-6.

Camunas-Soler, J., Lee, H., Hudgins, L., Hintz, S. R., Blumenfeld, Y. J., El-Sayed, Y. Y., & Quake, S. R. (2018). Noninvasive Prenatal Diagnosis of Single-Gene Disorders by Use of Droplet Digital PCR. *Clinical chemistry*, *64*(2), 336–345. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.278101>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2008). Update on overall prevalence of major birth defects--Atlanta, Georgia, 1978-2005. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, *57*(1), 1–5.

Costa, J. M., Benachi, A., & Gautier, E. (2002). New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. *The New England journal of medicine*, *346*(19), 1502. <https://doi.org/10.1056/NEJM200205093461918>

Costa, J. M., Giovangrandi, Y., Ernault, P., Lohmann, L., Nataf, V., El Halali, N., & Gautier, E. (2002). Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *British journal of haematology*, *119*(1), 255–260. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03780.x>

Daniels G. (2009). The molecular genetics of blood group polymorphism. *Human genetics*, *126*(6), 729–742. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0738-2>

Debrand, E., Lykoudi, A., Bradshaw, E., & Allen, S. K. (2015). A Non-Invasive Droplet Digital PCR (ddPCR) Assay to Detect Paternal CFTR Mutations in the Cell-Free Fetal DNA (cffDNA) of Three Pregnancies at Risk of Cystic Fibrosis via Compound Heterozygosity. *PloS one*, *10*(11), e0142729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142729>

Dube, S., Qin, J., & Ramakrishnan, R. (2008). Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PloS one*, *3*(8), e2876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002876>

Faas, B. H., Beuling, E. A., Christiaens, G. C., von dem Borne, A. E., & van der Schoot, C. E. (1998). Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet (London, England)*, *352*(9135), 1196. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)60534-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)60534-x)

Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., El-Sayed, Y. Y., Chueh, J., & Quake, S. R. (2009). Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 200(5), 543.e1–543.e5437. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.03.002>

Fan, H. C., Blumenfeld, Y. J., Chitkara, U., Hudgins, L., & Quake, S. R. (2008). Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), 16266–16271. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808319105>

Finning, K. M., & Chitty, L. S. (2008). Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 13(2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.12.007>

Finning, K. M., Martin, P. G., Soothill, P. W., & Avent, N. D. (2002). Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion*, 42(8), 1079–1085. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2002.00165.x>

Fleischhacker, M., & Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochimica et biophysica acta*, 1775(1), 181–232. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.10.001>

Gahan, P. B., Schwarzenbach, H., & Anker, P. (2022). The History and Future of Basic and Translational Cell-Free DNA Research at a Glance. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(5), 1192. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12051192>

Galbiati, S., Smid, M., Gambini, D., Ferrari, A., Restagno, G., Viora, E., Campogrande, M., Bastonero, S., Pagliano, M., Calza, S., Ferrari, M., & Cremonesi, L. (2005). Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Human genetics*, 117(2-3), 243–248. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-1330-z>

Geifman-Holtzman, O., & Ober Berman, J. (2008). Prenatal diagnosis: update on invasive versus noninvasive fetal diagnostic testing from maternal blood. *Expert review of molecular diagnostics*, 8(6), 727–751. <https://doi.org/10.1586/14737159.8.6.727>

Geifman-Holtzman, O., Grotegut, C. A., & Gaughan, J. P. (2006). Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood--a meta-analysis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 195(4), 1163–1173. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.07.033>

Gil, M. M., Accurti, V., Santacruz, B., Plana, M. N., & Nicolaidis, K. H. (2017). Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for aneuploidies: updated meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 50(3), 302–314. <https://doi.org/10.1002/uog.17484>

González-González, M. C., García-Hoyos, M., Trujillo, M. J., Rodríguez de Alba, M., Lorda-Sánchez, I., Díaz-Recasens, J., Gallardo, E., Ayuso, C., & Ramos, C. (2002). Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *Prenatal diagnosis*, 22(10), 946–948. <https://doi.org/10.1002/pd.439>

González-González, M. C., Trujillo, M. J., Rodríguez de Alba, M., García-Hoyos, M., Lorda-Sánchez, I., Díaz-Recasens, J., Ayuso, C., & Ramos, C. (2003). Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenatal diagnosis*, 23(3), 232–234. <https://doi.org/10.1002/pd.570>

Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Knight, G. J., Williams, J., Pulkkinen, A., Canick, J. A., Saller, D. N., Jr, & Bowers, G. B. (1992). Prenatal screening for Down's syndrome with use of maternal serum markers. *The New England journal of medicine*, 327(9), 588–593. <https://doi.org/10.1056/NEJM199208273270902>

Hill, M., Finning, K., Martin, P., Hogg, J., Meaney, C., Norbury, G., Daniels, G., & Chitty, L. S. (2011). Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clinical genetics*, 80(1), 68–75. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01533.x>

Honda, H., Miharu, N., Ohashi, Y., Samura, O., Kinutani, M., Hara, T., & Ohama, K. (2002). Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Human genetics*, 110(1), 75–79. <https://doi.org/10.1007/s00439-001-0649-3>

Huppertz, B., Frank, H. G., Kingdom, J. C., Reister, F., & Kaufmann, P. (1998). Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochemistry and cell biology*, 110(5), 495–508. <https://doi.org/10.1007/s004180050311>

Chan, A. K., Chiu, R. W., Lo, Y. M., & Clinical Sciences Reviews Committee of the Association of Clinical Biochemists (2003). Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Annals of clinical biochemistry*, 40(Pt 2), 122–130. <https://doi.org/10.1258/000456303763046030>

Chen, E. Z., Chiu, R. W., Sun, H., Akolekar, R., Chan, K. C., Leung, T. Y., Jiang, P., Zheng, Y. W., Lun, F. M., Chan, L. Y., Jin, Y., Go, A. T., Lau, E. T., To, W. W., Leung, W. C., Tang, R. Y., Au-Yeung, S. K., Lam, H., Kung, Y. Y., Zhang, X., ... Lo, Y. M. (2011). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PloS one*, 6(7), e21791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021791>

Chiu, R. W., Chan, K. C., Gao, Y., Lau, V. Y., Zheng, W., Leung, T. Y., Foo, C. H., Xie, B., Tsui, N. B., Lun, F. M., Zee, B. C., Lau, T. K., Cantor, C. R., & Lo, Y. M. (2008). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20458–20463. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810641105>

Chiu, R. W., Lau, T. K., Leung, T. N., Chow, K. C., Chui, D. H., & Lo, Y. M. (2002). Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet (London, England)*, 360(9338), 998–1000. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)11086-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)11086-5)

Chua, S., Wilkins, T., Sargent, I., & Redman, C. (1991). Trophoblast deportation in pre-eclamptic pregnancy. *British journal of obstetrics and gynaecology*, 98(10), 973–979. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1991.tb15334.x>

Jindal, A., Sharma, M., Karena, Z. V., & Chaudhary, C. (2023). Amniocentesis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Kinnings, S. L., Geis, J. A., Almasri, E., Wang, H., Guan, X., McCullough, R. M., Bombard, A. T., Saldivar, J. S., Oeth, P., & Deciu, C. (2015). Factors affecting levels of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma and their implications for noninvasive prenatal testing. *Prenatal diagnosis*, 35(8), 816–822. <https://doi.org/10.1002/pd.4625>

Lam, K. W., Jiang, P., Liao, G. J., Chan, K. C., Leung, T. Y., Chiu, R. W., & Lo, Y. M. (2012). Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to β -thalassemia. *Clinical chemistry*, 58(10), 1467–1475. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.189589>

Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., & Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*, 37(3), 646–650.

Li, Huanan & Zhang, Haoqing & Xu, Ying & Turečková, Alžběta & Zahradník, Pavel & Chang, Honglong & Neuzil, Pavel. (2018). Versatile digital polymerase chain reaction chip design, fabrication, and image processing. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 283. 10.1016/j.snb.2018.12.072.

Li, Y., Zimmermann, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2004). Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clinical chemistry*, 50(6), 1002–1011. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.029835>

Lo, Y. M. D., Han, D. S. C., Jiang, P., & Chiu, R. W. K. (2021). Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies. *Science (New York, N.Y.)*, 372(6538), eaaw3616. <https://doi.org/10.1126/science.aaw3616>

Lo, Y. M., & Chiu, R. W. (2007). Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nature reviews. Genetics*, 8(1), 71–77. <https://doi.org/10.1038/nrg1982>

- Lo, Y. M., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., Rai, V., Sargent, I. L., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet (London, England)*, *350*(9076), 485–487. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0)
- Lo, Y. M., Hjelm, N. M., Fidler, C., Sargent, I. L., Murphy, M. F., Chamberlain, P. F., Poon, P. M., Redman, C. W., & Wainscoat, J. S. (1998). Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *The New England journal of medicine*, *339*(24), 1734–1738. <https://doi.org/10.1056/NEJM199812103392402>
- Lo, Y. M., Chan, K. C., Sun, H., Chen, E. Z., Jiang, P., Lun, F. M., Zheng, Y. W., Leung, T. Y., Lau, T. K., Cantor, C. R., & Chiu, R. W. (2010). Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science translational medicine*, *2*(61), 61ra91. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001720>
- Lo, Y. M., Lun, F. M., Chan, K. C., Tsui, N. B., Chong, K. C., Lau, T. K., Leung, T. Y., Zee, B. C., Cantor, C. R., & Chiu, R. W. (2007). Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(32), 13116–13121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705765104>
- Lo, Y. M., Tein, M. S., Lau, T. K., Haines, C. J., Leung, T. N., Poon, P. M., Wainscoat, J. S., Johnson, P. J., Chang, A. M., & Hjelm, N. M. (1998). Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American journal of human genetics*, *62*(4), 768–775. <https://doi.org/10.1086/301800>
- Lo, Y. M., Tein, M. S., Pang, C. C., Yeung, C. K., Tong, K. L., & Hjelm, N. M. (1998). Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet (London, England)*, *351*(9112), 1329–1330. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)79055-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)79055-3)
- Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M., & Hjelm, N. M. (1999). Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *American journal of human genetics*, *64*(1), 218–224. <https://doi.org/10.1086/302205>
- Lui, Y. Y., Chik, K. W., Chiu, R. W., Ho, C. Y., Lam, C. W., & Lo, Y. M. (2002). Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical chemistry*, *48*(3), 421–427.
- MANDEL, P., & METAIS, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, *142*(3-4), 241–243.

Mazloom, A. R., Džakula, Ž., Oeth, P., Wang, H., Jensen, T., Tynan, J., McCullough, R., Saldivar, J. S., Ehrich, M., van den Boom, D., Bombard, A. T., Maeder, M., McLennan, G., Meschino, W., Palomaki, G. E., Canick, J. A., & Deciu, C. (2013). Noninvasive prenatal detection of sex chromosomal aneuploidies by sequencing circulating cell-free DNA from maternal plasma. *Prenatal diagnosis*, 33(6), 591–597.

<https://doi.org/10.1002/pd.4127>

Monni, G., Zoppi, M. A., Iuculano, A., Piras, A., & Arras, M. (2014). Invasive or non-invasive prenatal genetic diagnosis?. *Journal of perinatal medicine*, 42(5), 545–548. <https://doi.org/10.1515/jpm-2014-0135>

Moufarrej, M. N., Bianchi, D. W., Shaw, G. M., Stevenson, D. K., & Quake, S. R. (2023). Noninvasive Prenatal Testing Using Circulating DNA and RNA: Advances, Challenges, and Possibilities. *Annual review of biomedical data science*, 6, 397–418. <https://doi.org/10.1146/annurev-biodatasci-020722-094144>

Mullis K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56–65.

<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>

New, M. I., Tong, Y. K., Yuen, T., Jiang, P., Pina, C., Chan, K. C., Khattab, A., Liao, G. J., Yau, M., Kim, S. M., Chiu, R. W., Sun, L., Zaidi, M., & Lo, Y. M. (2014). Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 99(6), E1022–E1030. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1118>

Ng, E. K., Tsui, N. B., Lau, T. K., Leung, T. N., Chiu, R. W., Panesar, N. S., Lit, L. C., Chan, K. W., & Lo, Y. M. (2003). mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4748–4753.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0637450100>

Nicolaides, K. H., Azar, G., Byrne, D., Mansur, C., & Marks, K. (1992). Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ (Clinical research ed.)*, 304(6831), 867–869. <https://doi.org/10.1136/bmj.304.6831.867>

Norton, M. E., Jacobsson, B., Swamy, G. K., Laurent, L. C., Ranzini, A. C., Brar, H., Tomlinson, M. W., Pereira, L., Spitz, J. L., Hollemon, D., Cuckle, H., Musci, T. J., & Wapner, R. J. (2015). Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *The New England journal of medicine*, 372(17), 1589–1597.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407349>

Papasavva, T., Kalikas, I., Kyri, A., & Kleanthous, M. (2008). Arrayed primer extension for the noninvasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia based on detection of single nucleotide polymorphisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 302–308. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.029>

Practice Bulletin No. 163. Online. *Obstetrics & Gynecology*. 2016, roč. 127, č. 5, s. e123-e137. ISSN 0029-7844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001406>. [cit. 2024-04-22].

Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M., & Venkatachalam, M. A. (1999). Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American journal of medicine*, 107(5), 489–506. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(99\)00259-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(99)00259-4)

Saito, H., Sekizawa, A., Morimoto, T., Suzuki, M., & Yanaihara, T. (2000). Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet (London, England)*, 356(9236), 1170. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02767-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02767-7)

Salomon, L. J., Sotiriadis, A., Wulff, C. B., Odibo, A., & Akolekar, R. (2019). Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 54(4), 442–451. <https://doi.org/10.1002/uog.20353>

Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>

Sekizawa, A., Samura, O., Zhen, D. K., Falco, V., Farina, A., & Bianchi, D. W. (2000). Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenatal diagnosis*, 20(11), 886–889. [https://doi.org/10.1002/1097-0223\(200011\)20:11<886::aid-pd942>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0223(200011)20:11<886::aid-pd942>3.0.co;2-4)

Sillence, K. A., Roberts, L. A., Hollands, H. J., Thompson, H. P., Kiernan, M., Madgett, T. E., Welch, C. R., & Avent, N. D. (2015). Fetal Sex and RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. *Clinical chemistry*, 61(11), 1399–1407. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.239137>

Simpson, J. L., & Elias, S. (1994). Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis. *Prenatal diagnosis*, 14(13), 1229–1242. <https://doi.org/10.1002/pd.1970141308>

Sorenson, G. D., Pribish, D. M., Valone, F. H., Memoli, V. A., Bzik, D. J., & Yao, S. L. (1994). Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 3(1), 67–71.

Sozzi, G., Conte, D., Leon, M., Ciricione, R., Roz, L., Ratcliffe, C., Roz, E., Cirenei, N., Bellomi, M., Pelosi, G., Pierotti, M. A., & Pastorino, U. (2003). Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(21), 3902–3908. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.006>

- Steele, M. W., & Breg, W. R., Jr (1966). Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet (London, England)*, *1*(7434), 383–385. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)91387-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)91387-0)
- Stroun, M., Maurice, P., Vasioukhin, V., Lyautey, J., Lederrey, C., Lefort, F., Rossier, A., Chen, X. Q., & Anker, P. (2000). The origin and mechanism of circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *906*, 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06608.x>
- Suwannakhon, N., Hemvuthiphan, J., Pangeson, T., Mahingsa, K., Pingyod, A., Bumrungrakdee, W., & Sanguansermstri, T. (2023). Non-invasive prenatal screening & diagnosis of β -thalassaemia in an affected foetus. *The Indian journal of medical research*, *157*(5), 447–452. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_3226_20
- Svobodová, I., Pazourková, E., Hořínek, A., Novotná, M., Calda, P., & Korabečná, M. (2015). Performance of Droplet Digital PCR in Non-Invasive Fetal RHD Genotyping - Comparison with a Routine Real-Time PCR Based Approach. *PloS one*, *10*(11), e0142572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142572>
- Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I., & Kunkel, H. G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, *45*(11), 1732–1740. <https://doi.org/10.1172/JCI105479>
- Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P. B., Anker, P., & Stroun, M. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer metastasis reviews*, *35*(3), 347–376. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x>
- Timor-Tritsch, I. E., & Platt, L. D. (2002). Three-dimensional ultrasound experience in obstetrics. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, *14*(6), 569–575. <https://doi.org/10.1097/00001703-200212000-00001>
- Tsui, N. B., Kadir, R. A., Chan, K. C., Chi, C., Mellars, G., Tuddenham, E. G., Leung, T. Y., Lau, T. K., Chiu, R. W., & Lo, Y. M. (2011). Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood*, *117*(13), 3684–3691. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-310789>
- Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C., & Stroun, M. (1994). Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *British journal of haematology*, *86*(4), 774–779. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1994.tb04828.x>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(16), 9236–9241. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9236>
- Wagner, F. F., Kasulke, D., Kerowgan, M., & Flegel, W. A. (1995). Frequencies of the blood groups ABO, Rhesus, D category VI, Kell, and of clinically relevant high-frequency antigens in south-western Germany. *Infusionstherapie und Transfusionsmedizin*, *22*(5), 285–290. <https://doi.org/10.1159/000223144>

Walknowska, J., Conte, F. A., & Grumbach, M. M. (1969). Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer. *Lancet (London, England)*, *1*(7606), 1119–1122. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(69\)91642-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(69)91642-0)

Wang, E., Batey, A., Struble, C., Musci, T., Song, K., & Oliphant, A. (2013). Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal diagnosis*, *33*(7), 662–666. <https://doi.org/10.1002/pd.4119>

Wright, C. F., & Burton, H. (2009). The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Human reproduction update*, *15*(1), 139–151. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn047>

Zhang, B., Lu, B. Y., Yu, B., Zheng, F. X., Zhou, Q., Chen, Y. P., & Zhang, X. Q. (2017). Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood. *The Journal of international medical research*, *45*(2), 621–630. <https://doi.org/10.1177/0300060517695008>

Zhong, X. Y., Holzgreve, W., & Hahn, S. (2000). Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, *107*(6), 766–769. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2000.tb13338.x>