

Původní práce

Distribuce volné DNA v plazmě těhotných – neinvazivní prenatalní testování aneuploidii

The distribution of cell-free DNA in maternal plasma - noninvasive prenatal testing for fetal aneuploidies

Martin Hynek, Filip Zembol, Martina Putzová, Ivona Marešová, Svatava Horáčková, David Stejskal
Gennet, s.r.o., Centrum pro fetální medicínu a reprodukční genetiku, Praha

Korespondenční adresa: MUDr. Martin Hynek, Gennet, s.r.o., Kostelní 9, 170 00 Praha 7,
tel.: +420 222 313 000, e-mail: martin.hynek@gennet.cz

Publikováno: 10. 10. 2014 Přijato: 3. 10. 2014 Akceptováno: 7. 10. 2014
Actual Gyn 2014, 6, 82 ISSN 1803-9588 © 2014, Aprofema s.r.o.
Článek lze stáhnout z www.actualgyn.com



Citujte tento článek jako: Hynek M, Zembol F, Putzová M, Marešová I, Horáčková S, Stejskal D. Distribuce volné DNA v plazmě těhotných – neinvazivní prenatalní testování aneuploidii. Actual Gyn. 2014;6:82

Úvod: Objev přítomnosti volné fetální DNA (cfDNA) v mateřské plazmě a rozvoj metod masivního paralelního sekvenování (MPSS) umožnil s vysokou přesností zachytit neinvazivně aneuploidie plodu. Protože fetální cfDNA tvoří pouze zlomek z celkového množství cfDNA v mateřské plazmě, je nutné během sekvenace získat miliony DNA fragmentů, abychom byli schopni zachytit malý vzestup v zastoupení příslušného chromozomu u plodu s aneuploidii. Byly publikovány různé statistické metody, jak zachytit tuto změnu. Společným rysem těchto metod je, že kvantifikují množství fragmentů (readů) pocházejících z daného chromozomu a zacházejí s tímto počtem jako s celkem. Cílem této práce je aplikace nové metodiky pro screening aneuploidii plodu na základě detekce odchylky v distribuci volné DNA v plazmě těhotných. Pro tuto detekci byla využita kombinace tří metod: vyjádření počtu readů v násobcích mediánu (MoM), chromozomální fingerprint a exponenciálně vážený pohyblivý průměr (EWMA), umožňující pohled na distribuci readů podél daného chromozomu.

Metodika: cfDNA izolovaná z krevní plazmy 39 těhotných, zahrnující 35 euploidních těhotenství, 1 případ trizomie 18 (T18) a 3 případy trizomie 21 (T21), byly sekvenovány pomocí sekvenátoru Ion Proton (Life Technologies). Po filtraci dat byly průměrné počty readů v 60kb úsecích příslušných chromozomů (binech) vyjádřeny ve formě MoM, kdy jako medián byl použit medián počtu readů/bin 1-10. chromozomu. Protože jsme zjistili, že v rámci jednotlivých chromozomů se všechny biny ne-

replikují a nesekvují identicky, byly vytvořeny tzv. chromozomální fingerprinty, které odrážejí, jakým způsobem se daný bin v průměru replikuje (průměrný MoM v daném binu). Korigovaný MoM (cMoM) potom vyjadřujeme jako odchylku v distribuci MoMu v daném binu oproti očekávaným hodnotám fingerprintu. Následně pro zobrazení rozsevu cMoMů v průběhu zkoumaného chromozomu používáme křivku EWMA, kde nám statisticky významný počet cMoM vychýlených mimo očekávané hranice indikuje zvýšené riziko aneuploidie.

Výsledek: Na základě 25 vzorků z euploidních těhotenství byl zkonstruován fingerprint pro chromozomy 13, 18, 21 a X a stanoven očekávaný cMoM a jeho SD. Následně byly pro 39 testovaných vzorků (35 euploidních, 1x T18 a 3x T21) vytvořeny EWMA křivky a sledováno, jaká část křivky se vychýlila mimo očekávané meze. U všech euploidních těhotenství byl počet cMoM nad horní mezi pod 20 %, zatímco u trizomických gravidit se pohyboval nad 60 %. Podíváme-li se na X chromozom, tak u plodů ženského pohlaví nám EWMA křivka indikovala přítomnost očekávaného diploidního stavu XX ve všech případech, zatímco u plodů mužského pohlaví nám monozomický stav indikovala v 75 %.

Závěr: Aplikace nové metody kombinující vyjádření počtu readů v MoM, chromozomálního fingerprintu a EWMA má vysoký potenciál pro využití v zachycení těhotenství s aneuploidii. Výhodou toho přístupu je kontrola profilu celého chromozomu, což by mohlo v budoucnu sloužit i k možnému zachytu subchromozomálních aberací.