

Cirkulujúca DNA – od jej objavenia cez neinvazívne prenatálne testovanie aneuploidii a monogénne dedičných ochorení až k neinvazívnej nádorovej diagnostike a prognostike

RNDr. Gabriel Minárik, PhD.

MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o., Bratislava

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Bratislava

Za posledných pár dekád si v oblasti biomedicínskeho výskumu vydobyla silnú pozíciu analýza cirkulujúcich nukleových kyselín. Táto pozícia je spojená s objavmi súvisiacimi s premenou genetických analýz na genomické, s rozsiahlym rozvojom bioinformatiky, technologickým pokrokom a dostupnosťou genomických analyzátorov. Robustnosť aktuálne využívaných genomických metód a ich kapacita poskytovať predtým bezprecedentné výsledky kvalitatívneho aj kvantitatívneho charakteru umožnila okrem iného rozvoj nových možností výskumu tzv. neinvazívneho testovania.

Kľúčové slová: cirkulujúca DNA, neinvazívne DNA testovanie, cirkulujúca voľná fetálna DNA, cirkulujúca nádorová DNA, masívne paralelné sekvenovanie

Circulating DNA – from its discovery through noninvasive prenatal testing of chromosomal aneuploidies and monogenic hereditary disorders up to noninvasive cancer diagnostics and prognostics

Over the last few decades analysis of circulating nucleic acids gained a strong position in the field of biomedical research. This position is associated with discoveries related to the shift from genetic analysis to the genomic, extensive development in bioinformatics as well as with technological advances and the availability of genomic analysers. Robustness of currently used genomic methods and their capacity to provide previously unprecedented results as from a qualitative as well as quantitative point of view allow the development of new research in the field of so-called noninvasive testing.

Keywords: Circulating DNA, noninvasive DNA testing, cell-free fetal DNA, circulating tumour DNA, massively parallel sequencing

NewsLab, 2017; roč. 8 (1): 48 – 52

Úvod

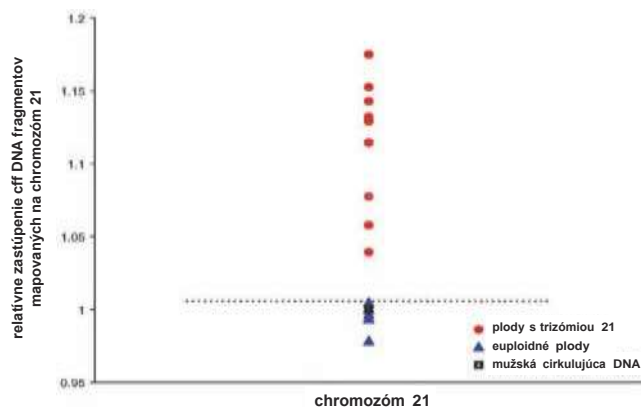
Dôležitosť objavenia cirkulujúcej DNA v roku 1947 Mandelom a Metaisom bola dlhý čas nerozpoznaná⁽¹⁾. Až o dvadsať rokov, v roku 1966, bola publikovaná štúdia poukazujúca na asociáciu medzi zvýšenou hladinou cirkulujúcej DNA v sére pacientov so systémovým lupus erythematosus⁽²⁾. V roku 1973 bola zvýšená hladina cirkulujúcej DNA identifikovaná aj pri ďalších závažných ochoreniach, napr. pri reumatoidnej artritíde, glomerulovej nefritíde, pankreatitíde, zápalových ochoreniach čriev a hepatitíde⁽³⁾. Krátko nato, v roku 1977, už bola opísaná asociácia aj medzi zvýšenými hladinami cirkulujúcej DNA a nádorovým ochorením u pacientov s lymfómom, gliómom, rakovinou pľúc, maternice, krčka maternice, prsníka, kolorekta, v porovnaní so zdravými jedincami a, navyše, pacienti s lokalizovaným nádorom dosahovali nižšiu koncentráciu cirkulujúcej DNA v porovnaní s pacientmi s metastatickým ochorením. Čo bolo ešte dôležitejšie, autori štúdie prvýkrát preukázali, že po liečbe týchto pacientov bo zaznamenaný pokles hladiny cirkulujúcej DNA u časti pacientov, a že jej sledovanie môže mať potenciál využitia v prognostike nádorových ochorení⁽⁴⁾. V tom období však neexistovali dostatočne senzitivné a špecifické metódy, ktoré by umožňovali identifikovať nádorovo špecifickú cirkulujúcu DNA a kvantitatívne analýzy boli realizované prostredníctvom biochemických metód alebo s využitím univerzálnych genetických markerov (ako napr. *Alu*-PCR).

Cirkulujúca voľná fetálna DNA – genetická éra

Ďalším dôležitým míľnikom vo výskume cirkulujúcej DNA bol v roku 1989 objav prítomnosti tzv. cirkulujúcej voľnej fetálnej DNA (cffDNA – cell free fetal DNA) ako súčasť celkovej cirkulujúcej DNA v krvi tehotných žien, ktorý predznamenal nielen vznik a rozvoj novej oblasti tzv. neinvazívneho prenatálneho testovania (NIPT), ale zároveň naštartoval vysoký záujem o oblasť výskumu cirkulujúcich nukleových kyselín všeobecne⁽⁵⁾. Prvou klinicky využiteľnou aplikáciou výskumu bol test založený na kvalitatívnej detekcii konkrétnych Y-chromozómových sekvencií v maternálnej plazme, umožňujúci neinvazívne určenie pohlavia plodu z krvi tehotnej. Prítomnosť týchto sekvencií bola na účely stanovenia pohlavia plodu kritériom, ktoré umožnilo využitie analýzy pri neinvazívnom prenatálnom testovaní X-viazaných dedičných ochorení. Po pridaní kvantitatívneho rozmeru analýzy boli definované množstvá fetálnej DNA v maternálnej cirkulácii, keď pôvodná práca z roku 1998 preukázala nielen prítomnosť dostatočného množstva fetálnej DNA pre rôzne typy genetických analýz už v skorých štádiách tehotenstva, ale aj nárast podielu fetálnej DNA s postupujúcim tehotenstvom. Podiel fetálnej DNA narástol od 7. týždňa tehotenstva z priemerných 25 GEq/ml (genomických ekvivalentov/ml plazmy) na priemerných 300 GEq/ml⁽⁶⁾. O rok neskôr bolo navyše preukázané rýchle odbúrание fetálnej DNA po pôrode, keď počas rozpadu fetálnej DNA bol na úrovni 16 minút a prakticky úplné odbúrание

fetálnej DNA do dvoch hodín po pôrode⁽⁷⁾. To znamenalo veľkú výhodu v porovnaní s dovtedy konkurenčnou stratégiou neinvazívneho prenatalného DNA testovania založeného na analýze cirkulujúcich fetálnych buniek. Ich nevýhodou bolo na jednej strane veľmi nízke zastúpenie v krvi tehotnej – 2 – 20/ml krvi^(8,9), na druhej strane dlhodobé prežívanie fetálnych buniek v krvi matky (mikrochimérizmus), ktoré mohlo kompromitovať výsledky DNA analýzy buniek z odberu krvi v priebehu aktuálnej tehotnosti s bunkami z tej predchádzajúcej⁽¹⁰⁾. V nadväznosti na tieto zistenia sa rozvoj v oblasti neinvazívnej prenatalnej DNA diagnostiky zamerával práve na cfDNA. Vďaka tomu sa postupne do klinickej praxe dostali testy pre determináciu RhD statusu plodu⁽¹¹⁾ či detekciu monogénových mendelických ochorení s autozomálne dominantnou dedičnosťou v prípadoch ich dedičnosti od otca plodu, ako napr. achondroplázia⁽¹²⁾, myotonická dystrofia⁽¹³⁾. V nadväznosti na zistenie, že DNA fetálneho a maternálneho pôvodu sú rozdielne fragmentované, pričom fetálna DNA bola fragmentovaná viac ako maternálna⁽¹⁴⁾, sa v nasledujúcom období začala testovať možnosť využitia frakcionácie cirkulujúcej DNA pred samotnou molekulárnou analýzou. Tá bola v začiatkoch sprostredkovaná predovšetkým vyrezávaním frakcie DNA s veľkosťou < 300 bp (bázových párov) z agarózových gélov po elektroforéze izolovanej DNA. Takto predpripravená DNA vykazovala preukaznejšie výsledky pri detekcii patogénnych variantov v DNA plodu napr. pri achondroplázii, β -talasémii či dokonca pri neinvazívnej detekcii parentálnych alel STR markerov využívaných štandardne pri detekcii chromozómových aneuploidií⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. V tomto období boli detegované a na účely využitia pri NIPT validované konkrétne oblasti DNA plodu (napr. RASSF1A), ktoré boli v porovnaní s maternálnou DNA rozdielne metylované a mali umožniť zvýšenie spoľahlivosti NIPT analýz najmä vďaka presnejšiemu stanoveniu podielu fetálnej DNA vo vzorke⁽¹⁸⁾. S nástupom technológie digitálnej PCR bola ešte preukázaná možnosť neinvazívnej determinácie prítomnosti trizómie chromozómu 21 u plodu v prípade, že jeho fetálna DNA bola zastúpená v celkovej cirkulujúcej DNA tehotnej nad 25 %⁽¹⁹⁾. Ani táto metóda však nebola všeobecne využiteľná pre rutinné použitie NIPT pri detekcii chromozómových aneuploidií plodu, pretože v tom čase publikované údaje uvádzali priemerný podiel cfDNA v maternálnej cirkulácii maximálne na úrovni 12 %⁽⁶⁾.

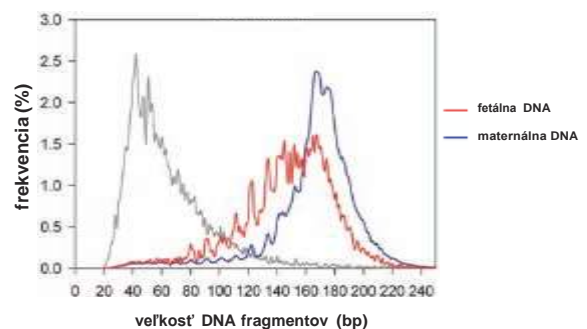
Obrázok 1. Identifikácia tehotenstiev s plodom s trizómiou chromozómu 21 v dôsledku detekcie vyššieho zastúpenia DNA molekúl zodpovedajúcim 21. chromozómu v analyzovaných vzorkách krvi tehotných žien a kontrolnej mužskej vzorky (Fan HC et al., 2008)



Cirkulujúca voľná fetálna DNA – genomická éra

Ďalší rozmach súvisel s nástupom éry genomiky sprostredkovej predovšetkým dostupnosťou masívneho paralelného sekvenovania (MPS). Technológia MPS spôsobila v oblasti NIPT revolúciu. Od roku 2008, keď boli simultánne publikované štúdie preukazujúce potenciál využitia MPS pri neinvazívnej detekcii trizómií chromozómov 21, 18 a 13 (**obrázok 1**)^(20,21), sa rozbehol rozsiahly výskum, ktorý priniesol nové základné informácie o charakteristike cfDNA v maternálnej cirkulácii. Okrem toho už v pôvodnej práci Fan a kol., 2008⁽²⁰⁾ bol opísaný charakteristický veľkostný profil DNA fragmentov cirkulujúcej DNA, ktorý poukázal na fragmentáciu založenú na veľkosti DNA sekvencie zodpovedajúcej nukleozómu. Táto informácia bola neskôr špecifikovaná a bolo preukázané, že priemerná veľkosť DNA fragmentov fetálneho pôvodu je 143 bp, kým fragmenty maternálnej DNA majú priemernú veľkosť 166 bp (**obrázok 2**)⁽²²⁾. Zároveň bola technológia MPS využitá na prípravu univerzálneho postupu umožňujúceho neinvazívnym spôsobom determináciu prenosu oboch parentálnych alel z rodičov na plod, nielen pri autozomálne dominantných ochoreniach dedených po otcovi, ale aj pri autozomálne recesívnych ochoreniach prostredníctvom kvantitatívnej genotypovej analýzy cirkulujúcej DNA vychádzajúcej z digitálne veľkostne selektovaných MPS dát a s využitím metódy tzv. stanovenia relatívnej mutačnej dávky⁽²³⁾. Veľkostná charakteristika slúžila neskôr pri optimalizácii metód prípravy vzoriek pre MPS analýzy, ale aj pri úprave bioinformatických algoritmov využívaných aj v súčasnosti pri NIPT zameranom na neinvazívnu detekciu závažných trizómií plodu. Zároveň v tej istej práci bola prostredníctvom pokročilej haplotypovej analýzy determinovaná celá chromozómová mapa plodu vychádzajúca z analýzy cirkulujúcej DNA tehotnej a DNA matky a otca plodu, čo predznamenalo éru neinvazívneho sekvenovania genómu plodu s potenciálnymi aplikáciami, napr. aj v oblasti výskumu cirkulujúcich nádorových DNA. V rokoch 2010 – 2013 boli v rozsiahlych štúdiách validované metódy a prístupy k analýze vzoriek tehotných žien s cieľom detekcie trizómií chromozómov 21, 18 a 13, ktoré preukázali vysokú senzitivitu (> 99,9 % pre trizómiu 21; > 91,9 % pre trizómiu 18; > 78,6 % pre trizómiu 13; > 93,8 % pre monozómiu X) a špecificitu (> 97,9 % pre autozómové aneuploidie), takéhoto neinvazívneho prenatalného testovania⁽²⁴⁻²⁷⁾. Nasledovala publikácia aktualizujúca a opisujúca priemerný podiel fetálnej DNA (fetálna frakcia) u tehotných v 11. týždni tehotenstva, čo je z pohľadu načasovania NIPT

Obrázok 2. Analýza veľkosti fragmentov cirkulujúcej DNA izolovanej z krvi tehotných žien. Šedá krivka – mitochondriálna DNA, červená krivka – DNA fetálneho pôvodu, modrá krivka – DNA maternálneho pôvodu (Tsui NB et al., 2012)

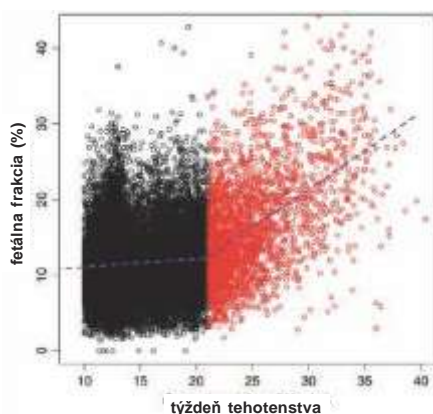


ideálny čas, v hodnote 10,2 % (obrázok 3)⁽²⁸⁾. Ďalšia preukázala medzipopulačné rozdiely v priemernej fetálnej frakcii a tiež závislosť fetálnej frakcie od hmotnosti tehotnej. Fetálna frakcia bola nižšia u tehotných afrokaribského pôvodu v porovnaní s tehotnými kaukazského pôvodu a kým sa fetálna frakcia < 4 % vyskytovala u tehotných s hmotnosťou 60 kg len u 0,7 % žien, pri hmotnosti 100 kg to už bolo u 7,1 % žien a hmotnosti 160 kg až 51,1 % žien⁽²⁹⁾. Tento údaj je dôležitý preto, že nízka fetálna frakcia < 4 % je aj v súčasnosti používaným štandardom pre neinformativnosť výsledku NIPT pre detekciu trizómií chromozómov 21, 18 a 13 v prípade analýzy celogenómovým skenom cirkulujúcej DNA tehotnej. V prípade determinácie celého fetálneho genómu z cirkulujúcej maternálnej DNA sa aj vďaka spomenutým poznatkom v jednej z najaktuálnejších štúdií podarilo pri genómovom resekvenovaní s pokrytím 270x (haploidný genóm) zvýšiť senzitivitu detekcie *de novo* patogénnych variantov až na 85 % a zvýšenie pozitívnej prediktívnej hodnoty na 74 % (169-násobné zlepšenie v porovnaní s predchádzajúcou štúdiou). Uvedené zlepšenie senzitivity a pozitívnej prediktívnej hodnoty dáva významný predpoklad na využívanie NIPT nielen v rámci detekcie chromozómových aberácií, ale dokonca aj pri neinvazívnom prenatalnom skríningu zameranom na monogénne dedičné ochorenia, čím sa využitie NIPT významne rozšíri. Zároveň bola zistená nová skutočnosť ďalej rozvíjajúca poznatok o rozdielnej veľkostnej charakteristike fetálnej a maternálnej DNA. Bolo preukázané, že rozdiel nie je len vo veľkosti týchto pôvodom odlišných fragmentov, ale aj v lokalizácii miest v genóme, kde k štiepeniu genomickej DNA pri fragmentácii dochádza (obrázok 4)⁽³⁰⁾. To môže výrazným spôsobom pomôcť k ďalšiemu zvýšeniu špecificity NIPT, napr. pri presnejšom výpočte fetálnej frakcie, ktorá slúži ako jeden zo základných parametrov pri štatistických a bioinformatických analýzach získaných dát.

Cirkulujúca nádorová DNA – paralelné využitie výsledkov výskumu z cfDNA

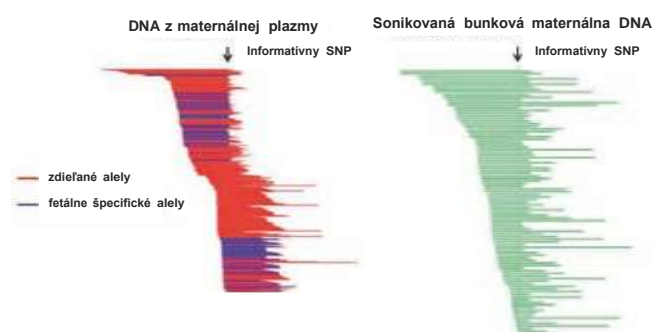
Paralelne s výskumom v oblasti analýzy cfDNA bolo možné sledovať podobný výskum v oblasti analýzy cirkulujúcej nádorovej DNA (ctDNA – circulating tumor DNA). Základné poznatky o prítomnosti a množstve ctDNA u pacientov s rôznymi nádorovými ochoreniami boli detailne študované, avšak do prechodu na genomické metódy analýzy univerzálnymi

Obrázok 3. Nárast podielu fetálnej DNA (fetálnej frakcie) na celkovej cirkulujúcej DNA tehotných v priebehu tehotenstva (Wang *et al.*, 2013)

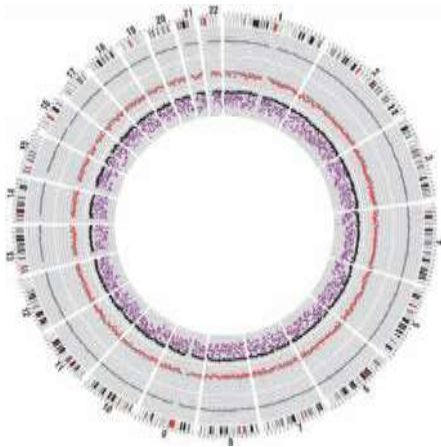


metódami, ktoré neumožňovali špecifickú detekciu, a teda ani kvantifikáciu ctDNA, bola ich aplikácia v klinickej praxi relatívne obmedzená. Po zavedení metód MPS sa však postupne preukázalo, že ctDNA možno špecificky detegovať, a to kvalitatívne (detekcia nádorovo špecifických patogénnych zmien v cirkulujúcej DNA) aj kvantitatívne (množstvo ctDNA koreluje s veľkosťou nádorovej masy) a tiež s vyššou senzitivitou a špecificitou ako pri využití cirkulujúcich nádorových buniek⁽³¹⁾. Len nedávno bola publikovaná práca, ktorá sledovala nádorovo špecifické zmeny identifikované v podobe globálnej hypometylácie v plazme pacienta s hepatocelárnym karcinómom (obrázok 5). Genomická analýza zameraná na hypometyláciu a analýzu CNV poukázala na rýchle odbúranie ctDNA po odstránení nádorového tkaniva a tiež na možnosť využitia tejto univerzálnej na zároveň nádorovo špecifickej analýzy zameranej na sledovanie prítomnosti a množstva ctDNA, na monitoring, keď bolo možné vidieť udržanie či nárast týchto nádorovo špecifických zmien v cirkulujúcej DNA u pacientov s neúspešným chirurgickým odstránením nádorového tkaniva či relapsom ochorenia⁽³²⁾. V súčasnosti možno už aj v klinickej rutine využiť molekulárne testy zamerané na neinvazívnu detekciu nádorovo špecifických genetických zmien. Navyše možno pri takýchto analýzach využiť na MPS alternatívne, pre rutinnú laboratórnu prax efektívnejšie a jednoduchšie vysokopriepustné metódy ich identifikácie, ako napr. digitálnu PCR alebo tzv. Beaming metódu, ktoré sú schopné identifikovať nádorovo špecifické bodové mutácie a kvantifikovať ich s vysokou presnosťou. Ako v súčasnosti komerčne dostupné analyzačné komplety možno spomenúť komplety na identifikáciu dôležitých patogénnych a farmakogeneticky relevantných variantov v génoch *KRAS*, *NRAS* a *EGFR* relevantných pre pacientov s kolorektálnym a nemalobunkovým pľúcny karcinómom. Podobne ako pri cfDNA bolo aj pri ctDNA preukázané, že táto je viac fragmentovaná ako zvyšná cirkulujúca DNA, pričom ctDNA je priemerne najviac zastúpená vo veľkosti 144 bp, kým nenádorová cirkulujúca DNA vo veľkosti 165 bp⁽³³⁾. Opäť je možné, že veľkostná selekcia zameraná na obohatenie ctDNA veľkostnej frakcie môže viesť k zvýšeniu senzitivity či špecificity použitých molekulárnych metód analýzy DNA, ako to bolo pri NIPT. Aktuálne najnovším a vysokoperspektívnym výsledkom výskumu cirkulujúcich DNA je možnosť identifikácie tkaniva, z ktorého v cirkulujúcej DNA sa nachádzajú DNA molekuly pochádzajú, tzv. tkanivové mapovanie. Využitie

Obrázok 4. Rozdielnosť miesta fragmentácie molekúl cirkulujúcej DNA izolovanej z maternálnej plazmy podľa ich fetálneho a maternálneho pôvodu pri porovnaní s náhodne štiepenou bunkovou DNA (Chan *et al.*, 2016)



Obrázok 5. Identifikácia hypometylácie genomického DNA z nádorových buniek - fialové bodky (vnútorná časť) a plazmy – šedo-červené bodky (stredná časť) pacienta s hepatocelulárnym karcinómom. Čierne bodky reprezentujú DNA z lymfocytov pacienta, šedé bodky (vonkajšia časť) DNA zdravého človeka (Chan KC et al., 2013)



možnosti takejto identifikácie je aplikovateľné v rôznych klinických špecializáciách nielen v NIPT či nádorovej diagnostike a prognostike (obrázok 6)⁽³⁴⁾. Podobne ho možno využiť tam, kde je potrebné sledovať nárast poškodenia tkanív prejavujúce sa odumieraním buniek (kardiovaskulárne zlyhanie, posttransplantačný monitoring, extrémna námaha, a pod.)^(34,35).

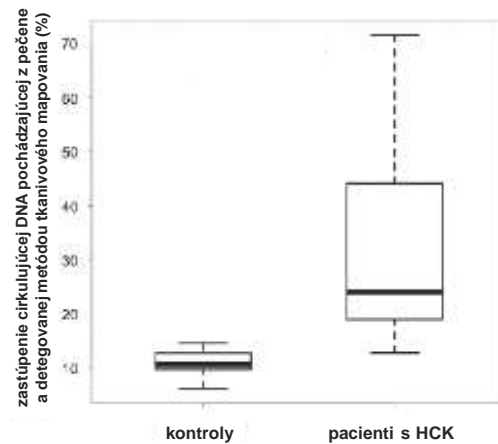
Záver

Analýza cirkulujúcich nukleových kyselín sa v súčasnosti ukazuje ako najvhodnejší spôsob neinvazívneho DNA skríningu, prognostiky a diagnostiky s mnohými klinickými aplikáciami. Výskum za posledných pár rokov ukázal, že ju

LITERATÚRA

- Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. C R Seances Soc Biol Fil 1948; 142(3-4): 241-3.
- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1966; 45(11): 1732-40.
- Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. J Clin Invest 1973; 52(1): 198-204.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. Cancer Res 1977; 37(3): 646-50.
- Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, et al. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet 1989; 2(8676): 1363-5.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998; 62(4): 768-75.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet 1999; 64(1): 218-24.
- Krabchi K, Gros-Louis F, Yan J, et al. Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques. Clin Genet 2001; 60(2): 145-50.
- Mergenthaler S, Babochkina T, Kiefer V, et al. FISH analysis of all fetal nucleated cells in maternal whole blood: improved specificity by the use of two Y-chromosome probes. J Histochem Cytochem 2005; 53(3): 319-22.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, et al. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(2): 705-8.

Obrázok 6. Rozdielne zastúpenie cirkulujúcej DNA pečenej pôvodu v celkovej cirkulujúcej DNA izolovanej z plazmy zdravého jedinca a pacienta s hepatocelulárnym karcinómom a charakterizovanej s využitím metylačne špecifickej analýzy DNA tzv. tkanivovým mapovaním (Sun K et al., 2015)



možno zužitkovať pri prenatalnom genetickom skríningu, v rámci ktorého bola najmä zo začiatku intenzívne študovaná, ale po celosvetovom rozšírení genomických analyzátorov aj pri rutinných analýzach cirkulujúcej nádorovej DNA v oblasti diagnostiky kardiovaskulárneho poškodenia či posttransplantačného monitoringu, založenej na univerzálnej metóde tkanivového mapovania.

Pod'akovanie

Publikácia je výsledkom implementácie projektu podporeného grantom APVV-14-0273 a APVV-15-0327 Agentúry pre podporu výskumu a vývoja.

- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Set al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998; 339(24): 1734-8.
- Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, et al. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. Lancet 2000; 356(9236): 1170.
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. Clin Chem 2000; 46(2): 301-2.
- Chan KC, Zhang J, Hui AB, et al. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. Clin Chem 2004; 50(1): 88-92.
- Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, et al. Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma – case report. Prenat Diagn 2004; 24(11): 896-8.
- Li Y, Di Naro E, Vitucci A, et al. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. JAMA. 2005 Feb 16;293(7):843-9. Erratum in: JAMA 2005; 293(14):1728.
- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, et al. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. Clin Chem 2004; 50(6): 1002-11.
- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. Clin Chem 2006; 52(12): 2211-8.
- Lo YM, Lun FM, Chan KC, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(32): 13116-21.

20. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, et al. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(42): 16266-71.
21. Chiu RW, Chan KC, Gao Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(51): 20458-63.
22. Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010; 2(61): 61ra91.
23. Lun FM, Tsui NB, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 200; 105(50): 19920-5.
24. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* 2011; 342: c7401.
25. Chen EZ, Chiu RW, Sun H, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 2011; 6(7): e21791.
26. Ashoor G, Syngelaki A, Wagner M, et al. Chromosome-selective sequencing of maternal plasma cell-free DNA for first-trimester detection of trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206(4): 322.e1-5.
27. Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, et al; Maternal Blood IS Source to Accurately Diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group. Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* 2012; 119(5): 890-901.
28. Wang E, Batey A, Struble C, et al. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2013; 33(7): 662-6.
29. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, et al. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 41(1): 26-32.
30. Chan KC, Jiang P, Sun K, et al. Second generation noninvasive fetal genome analysis reveals de novo mutations, single-base parental inheritance, and preferred DNA ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(50): E8159-E8168.
31. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res* 2012; 18(8): 2391-401.
32. Chan KC, Jiang P, Chan CW, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(47): 18761-8.
33. Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S, et al. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genet* 2016; 12(7): e1006162.
34. Sun K, Jiang P, Chan KC, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(40): E5503-12.
35. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, et al. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem* 2004; 50(9): 1668-70.



RNDr. Gabriel Minárik, PhD.
MEDIREX GROUP ACADEMY, n. o.
 Galvaniho 17/C, 820 16 Bratislava
 e-mail: gabriel.minarik@gmail.com



Vaše komplexné diagnostické riešenie

Využite plno automatický systém pre molekulárnu diagnostiku, vyvinutý pre rýchle získanie klinických diagnostických informácií.

Systém Idylla™ pracuje na princípe RT-PCR. Je to komplexné diagnostické riešenie od izolácie DNA až po užívateľsky modifikovaný report. Celý proces trvá od 40 do 150 minút. **Systém Idylla™** je určený na spracovanie rôznych typov vzoriek vrátane FFPE a plazmy. Vďaka patentovanej technológii si poradí aj s problematickými alebo archívnymi vzorkami.



Idylla™ BRAF Mutation test CE-IVD
 Idylla™ KRAS Mutation test CE-IVD
 Idylla™ NRAS/BRAF Mutation test CE-IVD
 Idylla™ NRAS-BRAF-EGFR S492R Mutation Assay RUO
 Idylla™ EGFR Mutation Assay RUO
 Idylla™ ctBRAF Mutation Assay RUO
 Idylla™ ctKRAS Mutation Assay RUO
 Idylla™ ctNRAS/BRAF Mutation Assay RUO cca 03/2017

Testy Idylla™

