

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Lékařská fakulta**



**Detekcia chromozomálnych aberácií v prenatálnej  
diagnostike**

Dizertačná práca

**Mgr. Andrea Štefeková**

Študijný program: Lékařská genetika

Forma štúdia: Prezenčná

**Olomouc 2023**

**Školiteľ:** RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D

Čestne prehlasujem, že som túto dizertačnú prácu vypracovala samostatne pod odborným vedením RNDr. Pavlíny Čapkovej, Ph.D, a s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa

.....

Rada by som poďakovala všetkým tým, ktorí mi pomohli pri realizácii tejto dizertačnej práce, hlavne mojej školiteľke RNDr. Pavlíne Čapkovej, Ph.D za cenné rady a pripomienky, vedeniu Ústavu lekárskej genetiky FN Olomouc za umožnenie vypracovať túto prácu a všetkým spolupracovníkom a kolegom za pomoc, ústretovosť a podporu. A samozrejme rodine za trpezlivosť, podporu a pochopenie.

## Abstrakt

Prenatálna diagnostika zahŕňa súbor vyšetrovacích metód a postupov, vďaka ktorým sa dá odhaliť prítomnosť vrodených vývojových porúch u plodu.

Dizertačná práca bola zameraná na určenie pridanej hodnoty pre záchyt patogénnych variant v prenatálnej diagnostike, pomocou metód MLPA a CMA a určenie efektivity týchto metód pre záchyt patogénnych variant v jednotlivých skupinách vrodených vývojových porúch u plodov.

Na analýzu DNA boli použité prenatálne vzorky choriových klkov, plodovej vody alebo potratového tkaniva od tehotných pacientiek. Celkom analyzovaných bolo 1029 prenatálnych vzoriek. Z analyzovaného súboru plodov, po odčítaní aneuploidí – 107 (10,40 % N=1029) bolo analýzou karyotypu zachytených 22 štruktúrnych aberácií (2,39 % N=922) – 9 nebalansovaných zmien (0,98 %), 10 balansovaných zmien (1,08 %), 1 prípad nejasnej mozaiky (0,11 %), 1 prípad prítomnosti marker chromozómu (0,11 %) a 1 prípad diskordancie pohlavia (0,11 %). Všetky nebalansované zmeny boli potvrdené metódou MLPA alebo metódou aCGH. U 255 vzoriek s fyziologickým karyotypom, indikovaných k molekulárne cytogenetickému vyšetreniu na základe prevažne ultrasonografických nálezov u plodu, bolo zachytených celkom 8 (7,21 %) patologických variant metódou CMA. Metódou MLPA bolo z týchto 8 patogénnych variant zachytených iba 5 variant (3,47 %). Potvrdila sa vyššia úspešnosť záchytu patologických CNV variant metódou microarray než metódou MLPA. Záchyt patologických variant v skupine s izolovanými poruchami a mnohopočetnými vývojovými poruchami bol rovnaký (po 3 varianty v oboch skupinách), avšak vzhľadom na veľkosť analyzovaného súboru pacientov v týchto dvoch skupinách (izolované poruchy N=101, mnohopočetné vývojové poruchy N=22), bol záchyt v skupine s izolovanými poruchami nižší než v skupine s mnohopočetnými poruchami (5,08 % x 21,42 %).

## **Abstract**

Prenatal diagnosis includes a set of examination methods and procedures that can detect the presence of congenital developmental disorders in the foetus.

This thesis aimed to determine the added value for the detection of pathogenic variants in prenatal diagnosis using MLPA and CMA methods and to determine the effectiveness of these methods for the detection of pathogenic variants in different groups of congenital developmental disorders in foetuses.

Prenatal samples of chorionic villi, amniotic fluid or aborted tissue, from pregnant patients were used for DNA analysis. A total of 1029 prenatal samples were analysed in this work. From the analysed set of foetuses, after subtraction of aneuploidies - 107 (10.40% N=1029), 22 (2.39%) structural aberrations - 9 unbalanced changes (0.98%), 10 balanced changes (1.08%), 1 case of unclear mosaicism (0,11 %), 1 case of presence of a marker chromosome (0,11 %) and 1 case of sex discordance (0,11 %) were detected by karyotype analysis. All unbalanced changes were confirmed by MLPA or aCGH method. A total of 8 (7,21%) pathological variants were detected by the CMA method in 255 samples with physiological karyotype indicated for molecular cytogenetic examination based on predominantly ultrasonographic findings in the foetus. Of these 8 pathogenic variants, only 5 variants (3,47%) were captured by MLPA method. The higher success rate of capturing pathological CNV variants by microarray method than by MLPA was confirmed. The detection of pathological variants in the isolated disorders and multiple developmental disorders groups was the same (3 variants each in both groups); however, due to the size of the analysed set of patients in these two groups (isolated disorders N=101, multiple developmental disorders N=22), the detection rate in the isolated disorders group was lower than in the multiple disorders group (5.08% x 21.42%).

## Obsah

1	Úvod.....	7
1.1	Prenatálna diagnostika – prevencia vrodených porúch.....	7
1.2	Prenatálne genetické vyšetrenie plodu.....	8
1.2.1	Preimplantačné genetické vyšetrenie.....	9
1.2.2	NIPT.....	10
1.3	Kongenitálne poruchy.....	10
1.3.1	Vrodené vývojové poruchy srdca.....	11
1.3.2	Vrodené vývojové poruchy CNS .....	11
1.3.3	Vrodené vývojové poruchy urotraktu.....	12
1.4	Záchyt vrodených defektov v prenatálnom období v ČR.....	12
2	Chromozómové aberácie.....	13
2.1	CNVs ako príčina genetických porúch.....	14
3	Metódy analýzy chromozomálnych aberácií u plodov.....	14
3.1	MLPA (Multiplex ligation – dependent probe amplification).....	15
3.2	Použité platformy na microarray analýzu.....	16
4	Ciele práce.....	18
5	Materiál a metotika.....	19
5.1	Vybraný súbor pacientov.....	19
5.2	Cytogenetická analýza karyotypu.....	20
5.3	MLPA (Multiplex ligation dependent probe amplification).....	20
5.4	Kapilárna elektroforéza.....	22
5.5	Microarray analýza.....	23
6	Výsledky.....	24
6.1	Efektivita UZ vyšetrenia pre záchyt CNV variant.....	26
7	Diskusia.....	28
7.1	Prínos a problematické hodnotenie VOUS variant.....	31
8	Záver.....	33
9	Použité skratky.....	34
10	Zoznam použitej literatúry.....	37
11	Prílohy.....	56

## 1. Úvod

Perinatálna morbidita a mortalita sú jedným zo základných ukazateľov kvality zdravotnej starostlivosti, ktorú monitoruje každý štát a na medzinárodnej úrovni Svetová zdravotnícka organizácia (WHO). Epidemiológia vrodených porúch predstavuje multidisciplinárny odbor, ktorého hlavným cieľom je svojimi výsledkami poskytnúť podklady k hodnoteniu kvality starostlivosti v súvisiacich odboroch, ako aj podklady pre zhodnotenie zdravotnej starostlivosti o mladú generáciu. Konkrétne to znamená, že by mala byť zaistená lepšia dostupnosť starostlivosti týkajúca sa reprodukčného zdravia, prenatálneho i perinatálneho života. Súčasne by malo dôjsť k presunu záujmu na skvalitnenie prenatálnej starostlivosti tak, aby sa znížil počet tehotenských strát. Početnosť spontánnych potratov a vrodených porúch sú jedným z dôsledkov nežiadúceho vplyvu okolitého prostredia (vrozene-vady.cz).

### 1.1 Prenatálna diagnostika – prevencia vrodených porúch

Prenatálna diagnostika zahŕňa súbor vyšetrovacích metód a postupov, vďaka ktorým sa dá odhaliť prítomnosť vrodených vývojových porúch u plodu (Roztočil a kol., 2017). Základom prenatálnej starostlivosti sú skriningové vyšetrenia. V dôsledku pozitívneho výsledku skriningu chromozomálnych aberácií v I. alebo II. trimestri (vrodená srdcová porucha, hydroks plodu, tvárové rásštepky, omfalokéla, defekty neurálnej trubice, mnohopočetné malformácie plodu) a prítomnosti rizikových faktorov (diabetes mellitus, ultrazvukové markery, prítomnosť vrodenej poruchy v rodinnej anamnéze, potraty predchádzajúce súčasnému tehotenstvu, hypertenzia, infekcia, prítomnosť onkologického ochorenia alebo expozícia chemickej látky a RTG žiarenia), ošetrojúci gynekológ odporučí pacientke podstúpiť konzultáciu na pracovisku lekárskej genetiky. Lekár – klinický genetik po vyhodnotení stavu plodu ďalej indikuje prenatálnu (invazívnu/neinvazívnu) diagnostiku na základe rodinnej, osobnej, pôrodnickej, sociálnej alebo pracovnej anamnézy. V súčasnosti neexistuje univerzálny skriningový test, ktorým by bolo možné odhaliť všetky typy vrodených porúch. Indikácia metódy by mala byť preto prísne individuálna – s ohľadom na štádium tehotenstva a po zvážení všetkých rizík pre plod a rizík spojených

s odberom a spracovaním vzorky (Hájek, 2014). V praxi sa využívajú tieto skrínigové vyšetrenia, ktoré sa navzájom dopĺňajú:

- skrínig chromozomálnych aberácií v 1. a 2. trimestri
- skrínig otvorených defektov neurálnej trubice (NTD) a brušnej steny (biochemické markery a UZ)
- skrínig ostatných malformácií plodu (UZ skrínig v 18 – 20 tt a 30 – 32 tt)
- imunologický skrínig
- skrínig rastových reštrikcií (Roztočil a kol., 2017).

Ultrazvukové vyšetrenie v prenatalnom období má v komplexnosti prenatalnej diagnostiky jednu z najdôležitejších funkcií. Táto neinvazívna, tradičná a všeobecne dostupná metóda významne dopĺňa vyšetrenia v tehotenstve a poskytuje ucelenejší obraz o zdravotnom stave plodu. Zobrazuje kompaktné aj mäkké tkanivá plodu, placentu, množstvo plodovej vody a vnútornú orgánovú štruktúru a umožňuje zhodnotiť celkovú biometriu plodu (Hájek, 2014).

U skrínigových metód došlo k posunu analýzy z druhého trimestra (tzv. triple test) na koniec prvého trimestra. Najvhodnejšie obdobie na vykonanie ultrazvukového skrínigu pre objasnenie fetálnych aneuploidíí je prvý trimester. Skrínig vrodených vývojových porúch (VVP) pomocou ultrazvukového merania nuchálnej translucencie (NT) a biochemických markerov v krvnom sére matky v 1. trimestri je zameraný na zistenie rizika chromozomálnych aberácií plodu a zistenie rizika prítomnosti morfológických defektov (Norton, 2010, Nicolaides, 2011; Spencer, 2014; Loucky et al., 2015). Najčastejšie sa vyskytujúcimi sú trizomia chromozómu 21 (Downov syndróm), trizomia chromozómu 18 (Edwardsov syndróm) a trizomia chromozómu 13 (Patauov syndróm) a monozómia X chromozómu (Turnerov syndróm) (Hájek et al. 2004).

## **1.2 Prenatálne genetické vyšetrenie plodu**

Prednostne sa na genetické vyšetrenie využíva invazívny odber choriových klkov (CVS – chorionic villus sampling) a plodovej vody (amniocentéza), analýzou ktorých je možné získať najpresnejší genetický profil plodu (Roztočil a kol., 2017). Popri analýze karyotypu,



ktorý je neoddeliteľnou súčasťou celého hodnotiaceho procesu, sú bežne používané molekulárne cytogenetické metódy ako MLPA, mikročipová analýza (CMA), sekvenovanie a kvantitatívna fluorescenčná PCR analýza (QF-PCR). Táto metóda umožní detegovať prítomnosť najčastejšie sa vyskytujúcich aneuploidií autozómov (13, 18, 21) a gonozómov, prostredníctvom vysoko polymorfných krátkych tandemových repetícií tzv. STR markerov, ktoré sú špecifické pre každý chromozóm (Zhang et al., 2023). Podrobnejšiu analýzu jednotlivých génov je možné získať celogenomovým alebo celoexomovým sekvenovaním (WGS/WES) pomocou špeciálnych panelov génov (Lord et al., 2019; Castleman et al., 2021). Metódy MLPA a microarray sú bližšie rozpísané v kapitole 3.

Na základe patologických nálezov zistených v rodine je pre plánovanie ďalšieho tehotenstva vhodné odporučiť genetickú konzultáciu u klinického genetika s možnosťou využiť preimplantačnú genetickú diagnostiku ako prevenciu prítomnej patológie.

### **1.2.1 Preimplantačné genetické vyšetrenie**

Medzi moderné metódy patrí preimplantačné genetické vyšetrenie embrya. Túto metódu je možné použiť ako súčasť asistovanej reprodukcie, pokiaľ sa v rodine vyskytuje monogénne ochorenie s dominantným, recesívnym alebo na X – viazaným typom dedičnosti, kedy sa vyberie embryo bez prítomnosti chromozomálnych aberácií a implantuje sa do maternice matky. Rozlišuje sa preimplantačný genetický skríning, ktorým sa vyšetruje prítomnosť možných aneuploidií u embrya a preimplantačná genetická diagnostika, ktorá umožní vyšetrenie konkrétnej príčiny monogénnej genetickej poruchy alebo chromozomálnej aberácie v rodine. Na genetické vyšetrenie embrya získaného metódami asistovanej reprodukcie sa použije jedna až dve bunky blastoméry vo fáze osembunkového embrya alebo niekoľko buniek trofektodermu blastocysty. Vyšetrenie buniek trofektodermu minimalizuje riziko záchytu mozaicizmu u embrya. Využitie oboch metód zvyšuje šancu úspešného uhniesdenia embrya a narodenie zdravého potomka a minimalizuje možnosť tehotenskej straty (Roztočil a kol. 2017,).

V súčasnosti sa na analýzu získaného genetického materiálu embrya najviac využíva metóda vychádzajúca z techniky mikročipov – array CGH, vďaka ktorej je možné analyzovať

všetkých 24 chromozómov (Fiegler et al., 2007, Wells et al., 2008) a karyomapping (Natesan et al., 2014). Veľmi účinné je sekvenovanie novej generácie, využívajúc platformy MiSeq od firmy Illumina a Personal Genome Machine (PGM) od firmy Thermo-Fisher Scientific (Brezina et al., 2016).

### **1.2.2 NIPT**

V súčasnosti je dôležitou súčasťou skriningového vyšetrenia v tehotenstve neinvazívne genetické testovanie (NIPT) voľnej fetálnej DNA z krvného séra matky. Využíva sa na zistenie prítomnosti najčastejších aneuploidií chromozómov 13, 18, 21, X a Y (Sehnert et al., 2011; Brady et al., 2016), mikrodélií a monogénnych ochorení (Koumbaris et al., 2019). Táto metóda sa vyznačuje vysokou senzitivitou a špecifitou v rozmedzí 92 – 100 % (Koumbaris et al., 2019). V súčasnosti je v Českej republike toto vyšetrenie v plnom rozsahu hrazené pacientom.

### **1.3 Kongenitálne poruchy**

Kongenitálne anomálie označujú vývojové odchýlky od fyziologického prenatálneho vývoja. V celkovej populácii sa vyskytuje 2 – 3 % narodených detí s vrodenu poruchou (Feldkamp et al., 2017). Ak tieto odchýlky prekročia bežnú mieru variability, stávajú sa pre jedinca patologické. Určité vývojové štádiá sú k disrupcii citlivejšie, než ostatné. Frekvencia malformácií pripisovaná environmentálnym faktorom, vrátane vnútromaternicových infekcií, medikamentózne liečbe, vysokým dávkam žiarenia a hypertermie, pozorovaných v prvom roku života je približne 10 % (Brent et al., 2001). V štúdií Feldkamp et al. (2017) boli malformácie spôsobené environmentálnymi faktormi prítomné v 4,1% a v práci Toufaily et al. (2018) v 3,4% prípadov, avšak je pravdepodobné, ako sami autori uvádzajú (Feldkamp et al., 2017; Toufaily et al., 2018), že mnoho novorodencov s fetálnym alkoholovým syndrómom nebolo identifikovaných. Prenatálna analýza vrodenných vývojových porúch sa preto primárne zameriava na odhalenie chromozómových aberácií a štruktúrnych vývojových defektov (Hixson et al. 2015; McLaughlin et al. 2016).

### **1.3.1 Vrodené vývojové poruchy srdca**

Vrodené srdcové poruchy (VSP) predstavujú najväčšiu skupinu morfológických porúch v celkovej populácii a tvoria až 40 % zo všetkých zachytených vrodených malformácií (Šípek et al., 2009; van der Linde et al., 2011; Dolk et al., 2011). Česká republika patrí medzi prvé krajiny, v ktorých bol zavedený celoplošný prenatalný skríning srdcových porúch (Šamánek et Voříšková, 1999). Prenatálny záchyt VSP má narastajúcu tendenciu, u niektorých defektov napr. hypoplázie a výrazné poruchy srdcových komôr je to až 100 % (Pavlíček et al., 2018) a postnatálna prevalencia je 2,36/1000 živonarodených detí a záchyt v tejto skupine je 80 – 90 % (Tomek et al., 2018).

V období od roku 2006 – 2015 došlo v ČR k štatisticky významnému poklesu výskytu väčšiny typov srdcových porúch postnatálne – kompletný AV defekt, syndróm hypoplázie ľavého srdca, dvojtoková pravá komora, Fallotova tetralógia, aortálna stenóza, atrézia pľúcnice, arteriálny trunkus, spoločné komory a Ebsteinova anomália. Toto významné zníženie priamo súvisí s vysokým počtom umelo prerušených tehotenstiev s prítomnou srdcovou poruchou. Naopak ukončenie tehotenstva nemalo významný vplyv na postnatálny výskyt defektu komorového septa, koarktácie aorty, transpozície veľkých tepien a stenózy pľúcnice. Tieto poruchy sú dobre liečiteľné a s dobrou prognózou (Tomek et al., 2018).

### **1.3.2 Vrodené vývojové poruchy CNS**

Štruktúrne vývojové poruchy centrálnej nervovej sústavy zahŕňajú široké spektrum malformácií. Mozgové malformácie predstavujú asi v 1% prípadov na všetky živo narodené deti (Pinar et al., 1998). Poruchy CNS majú variabilný klinický obraz v závislosti od rozsahu anomálie. Asi u 0,61 % detí sa vyskytujú solitárne alebo mnohopočetné malformácie CNS (Hadzagic-Catibusic et al., 2008). Sú častou príčinou vnútromaternicového úmrtia plodu a rovnako aj úmrtia detí do jedného roku života. U perinatálnych autopsií takmer 10 % zo všetkých vrodených porúch tvoria anomálie CNS, pričom v 45,5% prípadov ide o defekty neurálnej trubice (NTD), 12,4% prípadov hydrocefalus a 8,8% prípadov poruchy proliferácie neurónov (Lancaster et Pedisich, 1995; Pinar et al., 1998).

S využívaním genomických technológií, ako sú microarray techniky (Breman et al., 2012; Shaffer et al., 2012; de Wit et al., 2014; Wapner et al., 2012; Wapner et al., 2018), NGS sekvenovanie panelov génov, celogenómové (WGS) a celoexómové sekvenovanie (WES) (Yang et al., 2013; Yang et al., 2014; Van den Veyver 2016; Meng et al., 2017; Best et al., 2018; Normand et al., 2018), sa objavujú nové gény podieľajúce sa na patogenite u syndrómov a vrodených porúch CNS (Mirzaa et al., 2014).

### **1.3.3 Vrodené vývojové poruchy urotraktu**

Vrodené poruchy obličiek a močových ciest sú pomerne častou skupinou porúch a tvoria približne 20 % všetkých vrodených anomálií (Levi et al., 1991, Grandjean et al., 1999). Neskorá diagnostika je spojená s rizikom výskytu komplikácií, ktoré môžu viesť až k vážnemu poškodeniu funkcie obličky. Spoločným dôsledkom vrodenej poruchy obličiek a močových ciest je oligo- alebo anhydramnion, spôsobený buď nedostatočnou tvorbou moču alebo nadprodukciami, v dôsledku obštrukcie močových ciest. Obmedzuje sa pohyblivosť plodu a dochádza k deformáciám dolných končatín (pedes equinovarus), pľúcnej hypoplázii, tvár má charakteristické rysy vzniknuté otláčením (zobákovitý nos, nízko posadené ploché uši a ustupujúca brada). Najčastejšími poruchami sú obštrukcia dolných močových ciest, multicystická dysplázia obličiek a bilaterálna agenéza obličiek. Tieto poruchy sú dnes pomerne presne diagnostikovateľné UZ skríningom okolo 16. týždňa gravidity. Často sa tieto anomálie vyskytujú spoločne s vrodenými poruchami pohlavného ústrojenstva ([https://atlases.muni.cz/atlases/feto/atl\\_cz/vvvedvin.html](https://atlases.muni.cz/atlases/feto/atl_cz/vvvedvin.html)).

## **1.4 Záchyt vrodených defektov v prenatalnom období v ČR**

Prenatálna diagnostika kongenitálnych porúch v Českej republike výrazne ovplyvňuje konečnú početnosť vrodených anomálií v populáciách novorodencov. V súčasnosti je trend vyšetřovať takéto poruchy v čo možno najrannejšom štádiu tehotenstva a zachytiť tak najväčší počet štruktúrnych malformácií. U niektorých typov vrodených porúch sa početnosť v novorodeneckej populácii znižuje vďaka úspešnej prenatalnej diagnostike, niektoré však aj napriek úspešnosti diagnostických postupov vykazujú vyšší záchyt alebo sú

to defekty, ktoré zatiaľ nie je možné prenatalne diagnostikovať a ich početnosť sa v populácii mení (Šípek et al., 2009, Šípek et al., 2019). Podiel vrodených porúch na predčasnej novorodeneckej úmrtnosti v ČR predstavoval v posledných rokoch zhruba 1/3 a na perinatálnej úmrtnosti zhruba 1/5. K ďalším úmrtiam z dôvodu vrodenej poruchy však dochádza v neskoršom novorodeneckom a kojeneckom období. Počas posledných 40 rokov sa intenzita vrodených vývojových porúch v Českej republike menila. Väčšinou dochádzalo v posledných 10-20 rokoch k nárastu početnosti hlásených vrodených porúch. Významný faktor, ktorý tak isto ovplyvňuje početnosti vrodených porúch u narodených detí a rovnako aj u prenatalne diagnostikovaných prípadov, sú určite aj zmeny v registrácii vrodených defektov. Na prelome rokov 1993 a 1994 došlo k dôležitej zmene, kde do roku 1993 vrátane sa evidovali iba určité diagnózy vrodených porúch, od 1. 1. 1994 sa začali registrovať všetky diagnózy uvedené v XVII. kapitole MKN-10. Avšak nie je možné jednoznačne vylúčiť chýbanie hlásení jednotlivých diagnóz (Šípek et al., 2009, Šípek et al., 2019, vrozene-vady.cz). Najčastejšie zastúpenou skupinou bola Q20–Q28 (Vrodené vady obehovej sústavy), ktorá v priemere za sledované obdobie predstavovala 41,8 % prípadov. Druhou najčastejšou skupinou bola skupina Q65–Q79 (Vrodené vady a deformácie svalovej a kostrovej sústavy), ktorá zahŕňala 17,3 % prípadov a treťou najviac zastúpenou je skupina Q50–Q56 (Vrodené vady pohlavných orgánov) - 11,6 % prípadov. S najmenším záchytom abnormalít sú skupiny Q00–Q07 (Vrodené vady nervovej sústavy) a Q90–Q99 (Abnormality chromozómov nezaradené inde), obidve s rovnakým zastúpením prípadov - 1,9 % (Šípek et al., 2019; www.uzis.cz).

## **2. Chromozómové aberácie**

Chromozómové aberácie zastupujú dôležitú skupinu genetických defektov. Sú často príčinou spontánnych potratov a tvoria značný podiel v perinatálnej mortalite a morbidite (Beke et al. 2001). V približne 50% prípadov spontánnych potratov existuje vyššia frekvencia pridružených chromozómových abnormalít, hlavne aneuploidii (Jia et al, 2015).

Najčastejšie nezistenými poruchami sú poruchy srdca, močového traktu a malrotácia čreva (Thomas et al., 2018). Metodika diagnostiky chromozómových porúch výrazne pokročila.

Veľmi dôležitý bol rozvoj čipových technológií, ktoré majú v súčasnosti veľké uplatnenie práve v oblasti prenatalnej diagnostiky (Vanakker et al., 2014). Nezastupiteľné miesto má stále cytogenetické hodnotenie karyotypu, ktoré dokáže odhaliť štruktúrne abnormality (balansované translokácie, inverzie), ktoré nie sú detekovateľné bežne využívanými, molekulárne genetickými metódami (MLPA, CMA, sekvenovanie). Balansované translokácie sa vyskytujú u 0,2% novorodeneckej populácie (Stern et al., 1999) a nebalansované translokácie sa vyskytujú asi u 0,1% plodov rodičiek s pokročilým vekom alebo pozitívnym UZ nálezom (Chang et al., 2013).

### **2.1 CNVs ako príčina genetických porúch**

Zmeny v počte kópií (Copy number variants – CNVs) majú priamu spojitosť s patológiami, vyskytujúcimi sa v ľudskej populácii. Vyskytujú sa v rozsahu chromozómových aneuploidí až po mikroduplikácie a mikrodelecie, vrátane malých štruktúrnych variant, ktoré ovplyvňujú jednotlivé gény a exóny. V ľudskom genóme sa vyskytujú odhadom v 10 % (Zarrei et al., 2015) a patria sem varianty ako populačne špecifické tak individuálnej povahy (Sebat et al., 2004; Conrad et al., 2010; Mills et al., 2011).

Benígne CNVs sú často malé, intergénové alebo zahŕňajú gény, ktoré tolerujú zmeny v počte kópií, zatiaľ čo patogénne CNV sa nachádzajú v dôležitých génoch zapojených do vývoja (Rice et al., 2017). Mnoho CNV variant sa vyznačuje neúplnou penetranciou a variabilnou expresivitou, čo je ovplyvnené ďalšími genetickými, epigenetickými a environmentálnymi faktormi (Torres et al., 2016).

## **3 Metódy analýzy chromozomálnych aberácií u plodov**

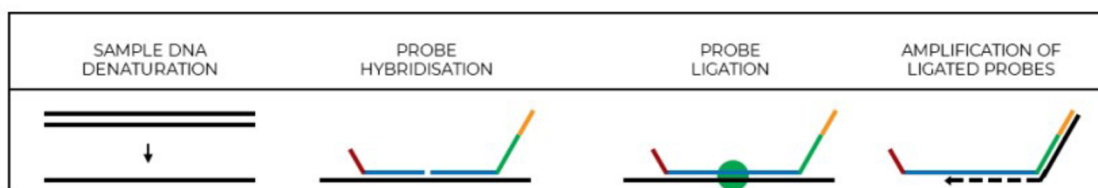
Posledných viac ako 30 rokov sa v prenatalnej diagnostike prvotne využívala cytogenetická analýza karyotypu. Pred 10timi rokmi sa do popredia začala dostávať genetická analýza zmien v počte kópií (CNV) (Wapner et al., 2012; Robson et al., 2017). Využitím moderných molekulárne genetických metód ako MLPA (Multiplex ligation – dependent probe

amplification) (Slater et al., 2003) a mikročipová technológia komparatívnej genomovej hybridizácie (Solinas-Toldo et al., 1997), narástol počet zachytených chromozomálnych abnormalít o 3 – 5 % (Hillman et al. 2011; Wapner et al., 2012; Robson et al., 2017). V súčasnej laboratórnej praxi je na prenatalne hodnotenie prítomnosti CNV najviac rutinne využívaná mikročipová analýza a metóda MLPA. Analýza na mikročipoch (CMA) má oproti konvenčnej cytogenetike svoje významné výhody. Poskytuje oveľa detailnejší obraz karyotypu a navyše, u značnej časti prípadov, sú zaznamenané klinicky významné CNVs nájdené práve u pacientov s fyziologickým karyotypom (Rodriguez-Revenga et al., 2020).

### **3.1 MLPA (Multiplex ligation – dependent probe amplification)**

Technika MLPA je využívaná ako rutinná diagnostická technika v prenatalnej diagnostike (Willis et al., 2012) pre cieleú detekciu rekurentných patogénnych variant u pacientov s monogénnymi dedičnými chorobami, v subtelomerických oblastiach u pacientov s mentálnou retardáciou alebo autizmom a využíva sa pre overovanie výsledkov získaných microarray metódou (Koolen et al., 2009). Na analýzu genetického materiálu sa začala využívať už od roku 2002. Technika vznikla odvodením od multiplexnej PCR reakcie (Schouten et al., 2002) a je založená na amplifikácii špecifických oligonukleotidových sond spolu s univerzálnym párom primerov (Schouten et al., 2002). Táto technika je schopná detegovať zmeny v počte kópií (CNV) v podobe duplikácií, delécií a jednonukleotidové polymorfizmy (SNP). Analýza genetického materiálu je veľmi rýchla a jednoduchá na prevedenie a nevyžaduje nákladné prístrojové vybavenie laboratória. Limitujúcim faktorom tejto metódy je nemožnosť zistiť prítomnosť balansovaných chromozómových aberácií a nízkopercentých mozaík.

**Obrázok č. 1** Priebieh MLPA reakcie – denaturácia DNA vzorky, nahybridizovanie prób, ligácia prób a PCR amplifikácia prób.



(Zdroj [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com))

K analýze dát je doporučené použiť software Coffalyser.Net v kombinácii s príslušným Coffalyser dokumentom špecifickým pre každú používanú šaržu. Vždy by mala byť použitá najnovšia verzia. Referenčná príručka *Coffalyser.Net Reference Manual* obsahuje podrobné pokyny a odporúčenia pre analýzu získaných dát. Software aj manuál sú dostupné na internetových stránkach [www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com).

### 3.2 Použité platformy na microarray analýzu

Technika microarray pôvodne vychádza z metódy komparatívnej genómovej hybridizácie (CGH) (Kallioniemi et al., 1992). Rozvojom mikročipových technológií v roku 1997 vzniká metóda array CGH (Solinas-Toldo et al., 1997). V súčasnosti má táto metóda významné postavenie v prenatalnej diagnostike.

Princíp tejto metódy spočíva v kvantitatívnom zhodnotení analyzovanej (pacientskej) DNA s kontrolnou (komerčnou) DNA. Pacientska a kontrolná DNA sú naštiepené a následne označené špecifickými fluorochromami (Cy3 a Cy5). Takto pripravené vzorky sú potom zmiešané a nanosené na čip, kde dochádza ku kompetitívnej hybridizácii s oligonukleotidovými sondami naviazanými na tomto čipe. Vyhodnotí sa intenzita fluorescence a je možné zhodnotiť chromozómové zmeny. Doplnením tejto metódy je možnosť analyzovať jednonukleotidové polymorfizmy (Gunderson et al., 2005; McCarroll, 2008) – SNP mikročipy. Momentálne sú na trhu dostupné čipy od firiem Agilent Technologies, Affymetrix a Illumina®. Každá z týchto platforiem využíva iný typ syntézy sond. Potreba rozsiahlejších genomických analýz viedla k nahradeniu dovtedy používaných BAC



klonov, za sondy tvorené oligonukleotidovými sekvenciami (Conlin et al., 2010; de Leeuw et al., 2011).

Prednosťou microarray techniky je možnosť analyzovať celý genóm iba v jednej hybridizačnej reakcii s vysokým rozlíšením a nie je nutné dopredu poznať presné umiestnenie aberácie. Využitie SNP mikročipov poskytuje pridanú hodnotu celej analýze vďaka schopnosti zachytiť stratu heterozygoty (LOH) a zistiť tak prítomnosť uniparentálnej dizómie (Gunderson et al., 2005; McCarroll, 2008). Oboma technikami aCGH a SNP array je možné zachytiť nebalansované chromozómové prestavby – duplikácie a delécie, avšak pri náleze duplikácie nie je možné bližšie špecifikovať, či ide o tandemovú duplikáciu. Mechanizmus vzniku aberácie je preto niekedy vhodné doplniť ďalšími metódami, ako napríklad FISH (Magri et al., 2015; Bonaglia et al., 2018). Nie je možné zachytiť balansované prestavby, Robertsonské translokácie a inverzie. Navyše neposkytujú informáciu zahŕňajúcu umiestnenie rozsiahlej inzercie, ani jej orientáciu (South et al., 2013; Martin et al., 2015). Asi jedinými nevýhodami tejto techniky je náročnosť na technické vybavenie, manipulácia a precíznosť pri príprave mikročipu.

#### **4. Ciele práce**

- Určenie pridanej hodnoty pre záchyt patogénnych variant v prenatálnej diagnostike pomocou metód MLPA a CMA. Určenie podielu nezachytených variant týmito metódami (balansované prestavby). Určenie podielu VOUS variant.
- Efektivita metód CMA a MLPA pre záchyt patogénnych variant v jednotlivých skupinách vrodených vývojových porúch u plodov. Izolované poruchy vs. mnohopočetné poruchy.

## 5. Materiál a metodika

### 5.1 Vybraný súbor pacientov

V tejto dizertačnej práci boli na analýzu DNA použité prenatálne vzorky choriových klkov, plodovej vody alebo potratového tkaniva, od tehotných pacientiek vyšetrených na Ústave lekárskej genetiky vo Fakultnej nemocnici v Olomouci alebo externých pacientiek, ktorých vzorky boli poslané na Ústav lekárskej genetiky na genetickú analýzu. Všetky pacientky podpísali informovaný súhlas s výskumom. Odber vzoriek genetického materiálu prebehol za spolupráce s Centrom pre fetálnu medicínu vo Fakultnej nemocnici v Olomouci a analýza genetického materiálu a vyhodnotenie dát prebiehala od roku 2015 do roku 2020 (Tabuľka č. 1) na Ústave lekárskej genetiky vo Fakultnej nemocnici v Olomouci a vybrané vzorky na pracoviskách Gennet (Praha) a Ústave molekulárnej a translačnej medicíny (ÚMTM UP Olomouc).

V tejto práci bolo celkovo 1029 analyzovaných vzoriek DNA plodov. Na základe indikácie genetického vyšetrenia, bol u všetkých plodov indikované vyšetrenie karyotypu a analýza metódou QF - PCR. U 103 vzoriek plodov a 4 vzoriek potratového tkaniva boli zistené aneuploidie autozómov a gonozómov (9, 13, 18, 20, 21, X) a neboli ďalej vyšetrované cytogenomickými metódami.

Molekulárne cytogenetickému vyšetreniu metódami MLPA (Ústav lekárskej genetiky, FN Olomouc), microarray a/alebo SNP array (ÚMTM, UP Olomouc; Gennet, Praha), (použité čipy od firiem Illumina San Diego, CA, USA; Affymetrix Santa Clara, CA, USA), bolo podrobených 272 prenatálnych vzoriek, na základe indikácie od lekára, vrátane verifikačných testov (Tabuľka č. 10). U metódy MLPA boli prvotne použité probemixy P036, P070, P245, P297. Ostatné probemixy boli použité na cielenú analýzu napr. srdcových porúch (P250, P311) a pri ďalších typoch aberácií (P424, ME028, ME030, ME032).

V súbore vyšetrovaných plodov bolo 441 ženského pohlavia, 581 mužského pohlavia, u 4 vzoriek z potratového tkaniva došlo k zlyhaniu kultivácie buniek, preto nebolo možné určiť pohlavie a ďalšia genetická analýza už nebola vykonaná. U 2 vzoriek potratového tkaniva došlo ku kontaminácii primárnej vzorky a nebolo možné stanoviť karyotyp. U 1 vzorky bola prítomná genetická diskordancia pohlavia s fenotypom.

**Tabuľka č. 1** Celkový počet vyšetrených vzoriek cytogenetickými a cytogenomickými metódami od 2015 do 2020 (nie sú zahrnuté vzorky, u ktorých boli zistené aneuploidie autozómov a gonozómov).

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	SPOLU
CVS	58	53	81	80	91	85	448
PV	77	63	67	73	60	60	400
BIO	13	17	13	5	11	15	74
<b>Celkom</b>	<b>148</b>	<b>133</b>	<b>161</b>	<b>158</b>	<b>162</b>	<b>160</b>	<b>922</b>

## 5.2 Cytogenetická analýza karyotypu

Pre cytogenetickú analýzu karyotypu boli použité nakultivované fibroblasty (CVS, potratové tkanivo, plodová voda). Získané mitotické chromozómy boli po príslušnej fixácii ofarbené roztokom Giemsa – G pruhovanie, nasnímané a hodnotené svetelnými mikroskopmi Olympus BX41 a Olympus BX60 a vyhodnotené v programe Lucia Cytogenetics.

## 5.3 MLPA (Multiplex ligation - dependent probe amplification)

### MLPA pracovný postup

- **Denaturácia DNA a hybridizácia sond**
  - a) Nariediť vzorku DNA v TE 0.1 (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,1 mM EDTA) do koncového objemu 5µL, o výslednej koncentrácii 50-250ng DNA.
  - b) Vzorku denaturovať 5 minút pri 98°
  - c) Pripraviť hybridizačný master mix. Pre každú reakciu zmiešať: 1,5 µl MLPA pufu + 1,5 µl probemixu (Tabuľka č. 2). Dôkladne premiešať pipetovaním alebo vortexovaním.
  - d) Po denaturácii DNA pridať do každej reakcie 3 µl hybridizačného master mixu. Dôkladne premiešať jemným pipetovaním.
  - e) Inkubovať v termocykleri podľa návodu od výrobcu (Tabuľka č. 3).

**Tabuľka č. 2** Hybridizačný master mix (pre 1. vzorku)

MLPA SALSA Probe-mix	1,5 µl
MLPA pufor	1,5 µl
Konečný objem	3 µl

**Tabuľka č. 3** Teplotný profil hybridizačnej reakcie

95°C	1 minúta
60°C	16-20 hodín

**• Ligácia**

- a) Teplotu termocykléru znížiť na 54°C, otvoriť skúmavky a pridať 32 µl master mixu s Ligázou-65\*(Tabuľka č. 4), inkubovať 17 minút pri 54°C
- b) Enzým sa inaktivuje teplom: 5 minút pri 98°C
- c) Vzorky inkubovať v termocykléri podľa návodu od výrobcu (Tabuľka č. 5).

**Tabuľka č. 4** Ligačný master mix (pre 1. vzorku)

ddH <sub>2</sub> O	25 µl
Ligase pufor A	3 µl
Ligase pufor B	3 µl
Ligáza 65	1 µl
Konečný objem	32 µl

**Tabuľka č. 5** Teplotný profil ligačnej reakcie

54°C	pauza
54°C	17 minút
98°C	5 minút
20°C	pauza

- **PCR reakcia**

- a) Pripraviť master mix s polymerázou (Tabuľka č. 6). Dôkladne premiešať jemným pipetovaním.
- b) Pri izbovej teplote, pridať ku každej vzorke reakcie 10 µl master mixu s polymerázou. Dôkladne premiešať jemným pipetovaním a pokračovať na termocycleri podľa teplotného profilu uvedeného v Tabuľke č. 7.
- c) PCR produkty skladovať chránené pred svetlom pri 4°C po dobu 1 týždňa. Ďalšia doba skladovania vyžaduje teploty medzi -25°C a -15°C.

**Tabuľka č. 6** PCR mix (pre 1. vzorku)

ddH <sub>2</sub> O	7,5 µl
Salsa mix	2 µl
Polymeráza	0,5 µl
Konečný objem	10 µl

**Tabuľka č. 7** Teplotný profil PCR reakcie

35 cyklov	95°C	30 sekúnd
	60°C	30 sekúnd
	72°C	60 sekúnd
72°C		20 minút
15°C		pauza

#### **5.4 Kapilárna elektroforéza**

Kapilárna elektroforéza vzoriek prebiehala na prístrojoch ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA) a SeqStudio (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) podľa doporučeného postupu v protokole od firmy MRC-Holand. Podmienky elektroforetickej separácie vzoriek oboma prístrojmi sú uvedené v Tabuľke č. 8.

Do 96 – jamkových strippov pripraviť roztok formamidu s hmotnostným štandardom GeneScan™ 500 LIZ® (14,5µL) a PCR produkt (0,5 µL). Dáta získané kapilárnou

elektroforézou boli hodnotené v komerčne dostupnom programe Coffalyser (www.mlpa.com).

**Tabuľka č. 8** Separačné podmienky v prístroji ABI 3130 (Applied Biosystems) a Seq Studio (Thermofischer Scientific)

	<b>ABI 3130</b>	<b>Seq Studio</b>
Teplota počas separácie	60°C	60°C
Elektrické napätie pri nástreku vzorky	1,2kV	1,2kV
Elektrické napätie pri separácii vzorky	15kV	9kV
Čas nástreku vzorky	12s	2s
Čas separácie vzorky	1000s	1150s

## 5.5 Microarray analýza

Analýza vybraných vzoriek metódou microarray a SNP microarray, prebiehala na externých pracoviskách – na Ústave molekulárnej a translačnej medicíny v Olomouci (ÚMTM, UP Olomouc) a Gennet v Prahe. Použité boli čipy od firiem Affymetrix a Illumina. Firma Gennet pracuje s platformou Illumina na prístroji CytoSNP-12 (Illumina, San Diego, CA, USA). Pracovisko ÚMTM pracuje s platformou Affymetrix na prístroji Cytoscan HD (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Na vyhodnotenie výsledkov boli použité programy Illumina KaryoStudio 1.3 (Genome Studio v2011.1) a CHAS v1.2.2 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Vzorky boli oboma pracoviskami analyzované na základe doporučených postupov od výrobcov.

## 6. Výsledky

V tejto dizertačnej práci bolo celkovo analyzovaných 1029 prenatalných vzoriek. Z analyzovaného súboru plodov, po odčítaní aneuploidíí – 107 (10,40 % N=1029) bolo analýzou karyotypu zachytených 22 štruktúrnych aberácií (2,39 % N=922) – 9 nebalansovaných zmien (0,98 %), 10 balansovaných zmien (1,08 %), 1 prípad nejasnej mozaiky (0,11 %), 1 prípad prítomnosti marker chromozómu (0,11 %) a 1 prípad diskordancie pohlavia (0,11 %), kde analyzovaný karyotyp bol 46,XX, ale fenotyp novorodenca bol mužský. Všetky nebalansované zmeny boli potvrdené metódou MLPA alebo metódou CMA.

U 255 vzoriek s fyziologickým karyotypom, indikovaných k molekulárne cytogenetickému vyšetreniu (MLPA – 144 plodov, CMA – 111 plodov) na základe prevažne ultrasonografických nálezov u plodu, bolo zachytených celkom 8 (N=111, 7,21 %) patologických variant metódou CMA. Metódou MLPA bolo z týchto 8 patogénnych variant zachytených iba 5 variant (N=144, 3,47 %).

Celkový záchyt patogénnych variant metódami MLPA a CMA vrátane konfirmačných vyšetrení (N=17) patologického karyotypu je 14 (5,14 %) a 17 (6,25 %) (N=272). V jednom prípade bola patogenita určená až dodatočne po pôrode podľa fenotypu novorodenca (viz vyššie). V Tabuľke č. 9. nie je tento prípad započítaný ako patologický, ale ako nejasný nález. Celková efektivita záchytu aberácií klasickou karyotypizáciou pri nezapočítaných aneuploidiach je 2,39 %, vrátane balansovaných zmien (N=922).

Molekulárne cytogenetickým hodnotením vzoriek s fyziologickým karyotypom (alebo neúspešným chromozomálnym vyšetrením – zlyhanie kultivácie), boli spolu s patogénnymi variantami zachytené i varianty neznámeho významu (VOUS) – metódou MLPA boli zachytené dve VOUS varianty u jednej vzorky a po jednej VOUS variante u 5 vzoriek (N=144), metódou CMA u jednej vzorky 4 VOUS varianty a po jednej VOUS variante u 7 vzoriek (N=111). Z týchto zachytených variant, v troch prípadoch bola VOUS varianta zaznamenaná oboma metódami (podrobný zoznam zachytených VOUS variant u jednotlivých plodov viz Tab. III v prílohe).



**Tabuľka č. 9** Porovnanie celkového záchytu patologických a VOUS variant vrátane konfirmačných vyšetrení u plodov pacientiek v rokoch 2015–2020 cytogenetickými a cytogenomickými metódami (tabuľka neobsahuje záznamy odhalených aneuploidii).

Cytogenetická analýza			Molekulárne cytogenetická analýza							
	Patologický karyotyp	%	Konfirmačné testy metódami MLPA a microarray	Fyziologický karyotyp (N=255)	Patologický nález	%	VOUS	%	Patologické nálezy vrátane konfirmačných testov (N=272)	%
Karyotyp (N=922)	9*	0,98	9	MLPA (N=144)	5	<b>3,47</b>	6	4,17	14	5,15
Balansované aberácie	10	1,08		Microarray (N=111)	8	<b>7,21</b>	8	7,21	17	6,25
Nejasné	2+1*	0,33		8						
<b>Celkom</b>	<b>22</b>	<b>2,39</b>	<b>17</b>	<b>255</b>	8/(5) <sup>°</sup>	3,14	11/(3) <sup>°</sup>	4,31	17/(14) <sup>°</sup>	6,25

\*prípád diskordancie pohlavia zaradený ako nejasný, °počet variant zachytených oboma metódami (MLPA,CMA)

Zastúpenie všetkých objavených variant spolu s fenotypom sú uvedené v jednotlivých tabuľkách v prílohe – varianty patologického významu sú uvedené v tabuľke II., varianty nejasného významu sú uvedené v tabuľke III. Údaje záchytu štruktúrnych aberácií sú v tabuľke IV. a V.

**Tabuľka č. 10** Počet plodov analyzovaný cytogenomickými metódami (MLPA, CMA) s fyziologickým karyotypom plus doplnená konfirmačná analýza u plodov s patologickým karyotypom, za obdobie 2015 - 2020.

Fyziologický karyotyp (255)	MLPA	CMA	MLPA+CMA+ Patol.karyotyp	CELKOM
SPOLU	144	111	17	272

### 6.1 Efektivita UZ vyšetrenia pre záchyt CNV variant

Z analyzovaného súboru tehotenstiev (N=922) (Tabuľka č.11) bolo UZ vyšetrením zachytených 2,39 % (22/922) plodov s mnohopočetnými vývojovými poruchami. V tejto skupine boli zachytené patogénne varianty u 21,42 % plodov (3/14), indikovaných ku cytogenomickému vyšetreniu a VOUS variantu u 1. plodu (1/14; 7,14 %).

Izolované poruchy v jednej orgánovej sústave boli zachytené u 11 % plodov (101/922), z ktorých bolo 59 indikovaných ku ďalšiemu molekulárne cytogenetickému vyšetreniu. V súbore plodov s izolovanými poruchami v jednej orgánovej sústave boli patogénne varianty zaznamenané u 5,08 % plodov (3/59), indikovaných k cytogenetickému vyšetreniu a 1 VOUS variantu (1/59; 1,69 %).

Efektivita záchytu použitých metód v jednotlivých indikačných skupinách je uvedená v Tabuľke č. 9 a č.11 spolu so zistenými variantami u konkrétneho typu UZ nálezu. Cytogenomickou analýzou (MLPA a CMA) bolo najviac patogénnych variant zistených v skupine s izolovanými poruchami CNS 14,29 % (2/14), jedna varianta v skupine s izolovanými poruchami srdca (1/20; 5 %) a v rovnakej skupine jedna VOUS varianta (1/20; 5 %).

**Tabuľka č. 11** Počet plodov indikovaných ku genetickému vyšetreniu podľa patologického nálezu, počet patologických a VOUS CNV variant zistených klasickým karyotypovaním a cytogenomickými metódami (MLPA, CMA) u vybraných 255 plodov s fyziologickým karyotypom. Nie sú zahrnuté vzorky s nálezom aneuploidiií autozómov a gonozómov.

INDIKÁCIA	CELKOM	Karyotyp (N=922)		Počet indikácií na MLPA a aCGH (N=255)	Počet zachytených CNV - MLPA (fyziologický karyotyp)		Počet zachytených CNV - CMA (fyziologický karyotyp + negatívna MLPA)		Celkom patologické CNV (MLPA+aCGH)		Celkom VOUS CNV (MLPA+aCGH)		CELKOM
		Patologické	VOUS+BAL•		Patologické	VOUS	Patologické	VOUS		%		%	
I.trimestrálny skrining+NT nad 95. percentil)	542	1 (0,18 %)~	3 (0,55 %)	122	2 (1,64 %)	5 (4,1 %)	0	3 (2,46 %)	2	1,64	8	6,56	14
II.trimestrálny skrining	56	0	2 (3,6 %)	6	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Rodinná anamnéza	91	3 (3,3 %)	3 (3,3 %)	25	0	0	0	0	0	0	0	0	6
Izolované poruchy v orgánovej sústave													
Vady srdca	27	0	0	20	1 (5 %)	0	0	1 (5 %)	1	5	1	5	2
Vady skeletu	6	2 (33,3 %)	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Vady CNS	23	1 (4,35 %)	1 (4,35 %)	14	1 (7,14 %)	0	1 (7,14 %)	0	2	14,28	0	0	4
Vady urotraktu	20	1 (5 %)	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Vady GIT	16	0	1 (6,25 %)	6	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Vady dýchacej sústavy	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vady obehovej sústavy	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rázštepové poruchy tváre	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Súčet izolovaných porúch*</i>	<i>101</i>	<i>4 (3,96 %)</i>	<i>2 (1,98 %)</i>	<i>59</i>	<i>2 (3,38 %)</i>	<i>0</i>	<i>1 (1,69 %)</i>	<i>1 (1,69 %)</i>	<i>3</i>	<i>5,08</i>	<i>1</i>	<i>1,69</i>	<i>4</i>
Mnohopočetné VVP	22	0	0	14	1 (7,14 %)	0	2 (14,29 %)	1 (7,14 %)	3	21,42	1	7,14	4
Missed+spontánny abort	13	2(15,4 %)	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Fetus mortus	16	0	0	9	0	1 (11,1 %)	0	0	0	0	1	11,1	1
Iné*	81	0	2 (2,5 %)	12	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<b>SPOLU</b>	<b>922</b>	<b>10~</b>	<b>12</b>	<b>255</b>	<b>5</b>	<b>6#</b>	<b>3</b>	<b>5#</b>	<b>8</b>		<b>11</b>		<b>41</b>

\* vek matky, neskorý záchyt tehotenstva, aktívna infek. v tehotenstve, psycholog.indikácia, •balans. translokácie, ~ zahrnutý prípad diskordancie pohlavia, × súčet izolov. porúch je uvedený len pre jednoduchšie porovnanie s mnohopočetnými poruchami a nie je započítaný v celkových číslach, # u VOUS variant je uvedený počet vyšetrených plodov s touto variantou nie počet zistených variant, CNV zmena v počte kópií, N počet analyzovaných vzoriek, NT nuchálna translucencia, CNS centrálna nervová sústava, GIT gastrointestinálny trakt, VVP vrodené vývojové poruchy

## 7. Diskusia

Najväčšiu diagnostickú výťažnosť vo vyšetrovanom súbore pacientov, mala metóda CMA (Tabuľka č. 9), čo potvrdzujú aj skúsenosti zaznamenané v dostupnej literatúre (Tabuľka č. 12). Tieto výsledky len podporujú odporúčenie, používať techniku microarray ako prvotný testovací krok v prenatalnej diagnostike.

Rozdiel medzi záchytnou metódou MLPA a metódou aCGH tvoril 3,73 %. Pridaná hodnota analýzy metódou MLPA voči karyotypu je 3,47 % (N=144) a u CMA 7,21 % (N=111). Výhodou karyotypizácie je záchyt balansovaných zmien, ktorých v tomto súbore bolo 1,08 %. Porovnanie výsledkov tejto práce s dostupnými literárnymi zdrojmi uvedených v Tabuľke č. 12.

### ***Využitie jednotlivých metód pri záchytní variant podľa indikácie k vyšetreniu***

#### **Konvenčná cytogenetika**

Najviac zachytených patologických variant v indikačnej skupine s podozrením na prenášačstvo chromozomálnej aberácie v rodine boli zaznamenané 3 prípadyologickej aberácie (3,3% 3/91) a v skupine potratených plodov – 2 patologické aberácie (15,4% 2/13), ktoré boli potvrdené metódami MLPA a microarray. U týchto indikačných skupín sa diagnostika už dlhodobo opiera o štandardnú karyotypizáciu. V prípadoch overovania chromozomálnej konštitúcie u plodov, kde jeden s rodičov je nositeľom balansovanej translokácie, je analýza karyotypu plodu jediným možným nástrojom, ako zistiť prítomnosť balansovanej translokácie u potomka a poskytnúť tak rodine relevantné genetické poradenstvo.

V analyzovanom súbore (N=922) bolo odhalených celkom 10 balansovaných aberácií (1,08 %). Frekvencia recipročných balansovaných translokácií v populácii novorodencov sa uvádza 1:2000 a frekvencia balansovaných Robertsonských translokácií 1:10 000 novorodencov (Warburton et al., 1991). Často je detekcia balansovanej alebo nebalansovanej translokácie jediným vodítkom k odhaleniu prípadného prenášačstva balansovanej translokácie v rodine.

V skupine s indikáciou izolovanej poruchy v jednej orgánovej sústave, bol záchyt patogénnych variant najväčší u skeletálnych abnormalít u plodu 33,3% (2/6) a jednalo sa však o veľké štruktúrne chromozomálne zmeny. Toto číslo je skreslené celkovou veľkosťou indikačnej skupiny. V literatúre sa v súčasnosti uvádzajú nálezy z panelov génov z celoexómového sekvenovania. V práci Lord et al., (2019) exómovým sekvenovaním zistili patologickú variantu v súvislosti s vrodenou poruchou skeletu u 15 % plodov (10/65) a v práci Petrovski et al., (2019) sa exómovým sekvenovaním zistila u 24 % plodov patologická varianta (8/34).

U indikovaných pacientiek s pozitívnym 1. trimestrálnym skríningom, bol analýzou karyotypu zachytený jeden karyotyp (0,18 % 1/542), ktorý sa prvotne javil ako fyziologický ženský karyotyp. Avšak z tohto tehotenstva sa narodil fyziologický chlapec, ale so ženským karyotypom. Táto porucha je spojená so vzácnym syndrómom la Chapell. Prvý krát bol syndróm publikovaný v roku 1964 a v populácii je výskyt 1:20 000 novorodencov (Chapelle et al., 1964). Fenotypový prejav u týchto chlapcov je rôzny a v dospelosti sú spravidla neplodní (Chapelle et al., 1964; Li et al., 2014; Wu et al., 2014).

### ***Záchyt patologických aberácií v skupine s mnohopočetnými a izolovanými vrodenými poruchami u plodov s fyziologickým karyotypom***

#### **MLPA a CMA**

Najväčší benefit priniesla analýza cytogenomickými metódami (MLPA, CMA) v indikačnej skupine s mnohopočetnými vrodenými poruchami – 21,42 %, v porovnaní so záchytom u izolovaných porúch (5,08 %).

Na základe zistení z retrospektívnych analýz sa v 4,5 % – 15 % prípadov zistila prítomnosť chromozómových abnormalít u izolovaných porúch (Lord et al., 2019; Dap et al., 2022; Meng et al., 2022) a 15 % – 38 % prípadov s mnohopočetnými poruchami (Normand et al., 2018; Lord et al., 2019; Vora et al., 2020; Diderich et al., 2021).

### Izolované vrodené poruchy

Najvyššia frekvencia záchytu patogénnych CNV v tejto práci bola v skupine u plodov so zistenými abnormalitami CNS 14,28 % (2/14) a fyziologickým karyotypom, na druhom mieste potom u plodov s vrodenou poruchou srdca 5 % (1/20). V práci Zhu et al., (2016) zo skupiny plodov s izolovanými vrodenými poruchami srdca, prostredníctvom microarray analýzy, zistili 8,2 % patologických CNV variant (6/73).

### Patologické varianty u plodov s pozitívnym I. trimestrálnym skríningom

Cytogenomickými metódami boli v tejto skupine zachytené 2 patogénne varianty (1,64 % N=122). U oboch plodov bola hodnota nuchálnej translucencie nad 95. percentil. V skupine plodov s prítomnosťou patologickej nuchálnej translucencie, sa všeobecne udáva relatívne nízky záchyt CNV variant a to približne 1% (Souka et al., 2005; Petersen et al., 2020, Coello-Cahuao et al., 2022). Prakticky ide o náhodné nálezy patologických variant, pretože tento skríning je prednostne zameraný na odhalenie aneuploidii.

Kombinácia všetkých troch diagnostických metodík genetickej analýzy sa v tejto práci ukázala ako najúčinnějšía na odhalenie čo možno najväčšieho percenta patologických aberácií spolu s konfirmačnými vyšetreniami (Tabuľka č. 9).

Porovnanie výsledkov z tejto práce s dostupnými publikovanými údajmi je uvedené v Tabuľke č. 12. Z týchto štúdií je jasné, že technika microarray je vhodná na skríning celého genómu, vďaka čomu sa zvyšuje záchyt patologických CNV variant. Avšak aj napriek všetkým vyššie uvedeným zisteniam, má klasické cytogenetické hodnotenie karyotypu momentálne nenahraditeľné miesto v celom hodnotiacom procese diagnostiky. A to hlavne pri detekcii balansovaných prestavieb (Wilch et al., 2018), mozaik (Zhang et al., 2021) a polyploidii (Christofolini et al., 2021), ktoré sú molekulárne cytogenetickými metódami (MLPA, CMA) náročne identifikovateľné a častokrát nezistiteľné.

**Tabuľka č. 12** Súhrn prenatalne detegovaných abnormalít metódami klasického cytogenetického hodnotenia a molekulárne cytogenetickej analýzy (MLPA, microarray).

Porovnanie s dostupnou literatúrou

Literatúra	N	Karyotyp*	MLPA°	Microarray~	
				Patogénne	VOUS
Van den Veyver et al., (2009)	300	8 (2,6 %)	-	15 (5 %)	3 (1 %)
Goumy et al., (2010)	61	0	4 (6,5 %)	-	-
Kjaergaard et al., (2010)	530	-	9 (5,7 %)	-	-
Mademont-Soler et al., (2010)	234	5 (2,1 %)	8 (3,4 %)	-	-
Konialis et al., (2011)	1550	3 (0,2 %)	8 (0,5 %)	-	-
Xu et al., (2014)	54	7 (12,9)	6 (11,1 %)	8 (14,8 %)	0
Srebniak et al., (2016) <sup>®</sup>	1033	19 (1,84 %)	-	57 (5,5 %)	-
Chau et al., (2019)	1510	47 (3,1 %)	-	61 (4 %)	66 (4,37 %)
Wang et al., (2020)	5003	188 (3,8 %)	-	50 (1 %)	85
Xia et al., (2020)	447	2 (0,4 %)	-	17 (3,8 %)	31 (6,9 %)
Lou et al., (2022)	247		9 (3,6 %)	22 (8,9 %)	11 (4,45 %)
Súčasná práca	922/144°/111~	10 (1,1 %) <sup>a</sup>	5 (3,47 %) <sup>°</sup>	8 (7,21 %) <sup>~</sup>	11 (4,31 %) <sup>°~</sup>

N celkový počet testovaných vzoriek, \*nálezy aneuploidii a polyploidii neboli započítané, <sup>®</sup>SNP array (Illumina©), <sup>°</sup> analýza metódou MLPA, <sup>~</sup> analýza metódou microarray, a karyotyp analyzovaný so súboru 922 vzoriek

### 7.1 Prínos a problematické hodnotenie VOUS variant

Významnou súčasťou výsledkov prenatalneho testovania sú varianty s neznámym významom (VOUS). Nález týchto variant je častý u genetických testov, ktoré zahŕňajú podrobnejšiu a komplexnú analýzu genómu (Westerfield et al., 2014). Nálezy nejasnej mozaiky majú nejasný význam pre svojho nositeľa, ktorý sa prenatalne dá len veľmi ťažko zhodnotiť (Hultén et al., 2008; Hultén et al., 2010), aj keď nové štúdie ukazujú, že nízko percentuálne somatické mozaiky, ktoré majú spojitosť s neurologickými poruchami, vrodenými srdcovými poruchami a autizmom, sú oveľa častejšie než sa predpokladalo (Freed et al., 2016; Lim et al., 2017; Jónsson et al., 2018; Manheimer et al., 2018; Breuss et al., 2020; Shu et al., 2021). Metódou MLPA je takisto možné zachytiť súbor nejasných variant prípadne polymorfizmov, ktoré ovplyvňujú napríklad miesto nasadenia príslušnej sondy (Stuppia et al., 2012).

V tejto práci z uvedených troch diagnostických metodík, má najväčší záchyt VOUS variant metóda microarray. Aplikácia microarray analýzy u plodu sa pre tieto nálezy stretáva so značnými výhradami a to hlavne pre problematickú klinickú interpretáciu VOUS variant. U niektorých variant, ktoré boli hodnotené ako patogénne sa ukazuje, že ich výskyt je aj u zdravej populácie. Jedná sa o varianty, ktorých klinický dopad je veľmi variabilný a penetrancia neúplná. Často sú takéto varianty zdedené od zdravých rodičov. Jedným z príkladov je delécia v oblasti 15q11.2 zahŕňajúca 4 gény – NIPA1, NIPA2, TUBGCP5, CYFIP1, známa ako mikrodelečný syndróm (OMIM \*615656 – Chromosome 15q11.2 deletion „syndrome“) (von der Lippe et al., 2011, Burnside et al., 2011). Dopady tejto CNV nie sú jednoznačné a v súčasnosti sa odborná verejnosť prikláňa ku klasifikácii „vysoko frekventná varianta s nízkou penetranciou“ (high-frequency low-penetrant variant). Predpokladá sa však, že prítomnosť tejto delécie dopĺňa ďalšie genetické (model *second-hit*, polygénna dedičnosť) a environmentálne faktory (Jønch et al., 2019, Maya et al., 2020). Efekty delécií v oblasti 15q11.2 môžu smerovať k pochopeniu dôležitých biologických mechanizmov, ale ich veľkosť je príliš malá na to, aby samostatne mohli vypovedať o relevantnosti hodnotenia klinického dopadu u jednotlivca (Štolfa et al., 2022). V tejto dizertačnej práci bola rovnako zistená delécia v tejto oblasti, ale s väčším rozsahom (+3 gény, 451,887 kb), zdedená od zdravej matky. Rovnako sa to týka aj nálezu mikroduplicácie 16p11.2 (Liu et al., 2023), ktorá v tejto práci bola klasifikovaná ako patogénna varianta, ale v súvislosti s prenatalnou diagnostikou sa odborná verejnosť začína prikláňať ku klasifikácii VOUS varianty, práve z dôvodu neúplnej penetrancie tejto varianty, častokrát zdedenej od zdravého rodiča.

Aj napriek nejednoznačnému významu, sú tieto varianty určite dôležité pre ďalší výskum a možnú spojitosť s procesmi, podieľajúcimi sa na vzniku vrodených vývojových porúch (Slavotinek et al., 2008).



## 8. Záver

V tejto dizertačnej práci sa potvrdila vyššia úspešnosť záchytu patologických CNV variant metódou microarray než metódou MLPA. Metóda MLPA nezachytila 3 patogénne varianty, ktoré však boli zachytené CMA. Firma MRC Holland síce ponúka probemixy, ktorými by tieto varianty boli zachytené, ale v čase prebiehajúcich analýz Ústav lekárskej genetiky týmito probemixami nedisponoval, keďže by bolo finančne a časovo veľmi náročné disponovať všetkými dostupnými probemixami a ich následná molekulárne genetická analýza. Táto metóda je na druhej strane vhodná na overovanie patologických nálezov zistených microarray technikou.

Cytogenetickým hodnotením karyotypu bolo v tejto práci zachytených 10 balansovaných aberácií (1,08 %), z ktorých však ani jedna nebola zachytená použitými cytogenomickými metódami, čo je pochopiteľné, keďže je to limitujúci technologický faktor oboch metód (MLPA a CMA). Vynechaním konvenčnej cytogenetiky by tak uniklo až 1 % aberácií, vďaka ktorým bolo možné určiť riziko genetickej nestability v rodine a ďalšie kroky z toho vyplývajúce.

V neposlednom rade má microarray vyšší podiel záchytu VOUS variant, ktoré do značnej miery komplikujú klinickú interpretáciu avšak na druhej strane sú zdrojom nového poznania. V tejto práci sa cytogenomickými metódami podarilo celkovo zachytiť 15 takýchto variant u 11 plodov (N=255). Záchyt patologických variant v skupine s izolovanými poruchami je nižší než v skupine s mnohopočetnými vrodenými poruchami (5,08 % x 21,42 %).

Aj napriek moderným medicínskym a laboratórnym diagnostickým technikám je pre mnoho vrodených defektov spôsob dedičnosti a príčina zatiaľ stále neznáma, ale rovnako sa mení aj klasifikácia už známych variant a doporučenia na ich interpretáciu, špeciálne v prenatalnej diagnostike.

## 9. Použité skratky

°C stupne Celzia

ABI Applied Biosystem

aCGH array komparatívna genomová hybridizácia

AV atrio-ventrikulárny

BAC umelý bakteriálny chromozóm

CA Kalifornia

cDNA jadrová deoxyribonukleová kyselina

CNS centrálny nervový systém

CNV copy number variant

CMA chromosomal microarray

CVS choriové klky

ČR Česká republika

DNA deoxyribonukleová kyselina

EDTA kyselina etyléndiaminotetraoctová

FISH Fluorescent in situ hybridisation

FN OL Fakultní nemocnice Olomouc

GIT gastrointestinálny trakt

HCl kyselina chlorovodíková

kb kilo báza

kV kilovolt

LOH Lost of heterozygosity

Mb mega báza

MKN Mezinárodní klasifikace nemocí

MLPA Multiplex ligation-dependent probe amplification

μl mikroliter

mm milimeter

MS-MLPA Methylation-specific Multiplex ligation-dependent probe amplification

N celkový počet vzoriek

ng nanogram

NGS next generation sequencing

NIPT neinvazívne prenatalne genetické testovanie

NT nuchálna translucencia

NTD poruchy nervovej trubice

OMIM Online Mendelian Inheritance in Man

ph kyslosť a zásaditosť roztoku

PCR polymerázová reťazová reakcia

QF-PCR kvantitatívne fluorescenčná PCR

RTG rentgenové žiarenie

s sekunda

SNP single nucleotide polymorfism

STR short tandem repeat

TE Tris EDTA

Tt týždeň tehotenstva

UP Univerzita Palackého

UZ ultrazvuk

VOUS varianta s neznámym významom

VSP vrodené srdcové poruchy

VVP vrodené vývojové poruchy

WHO Svetová zdravotnícka organizácia

WGS celogenómové sekvenovanie

WES celoexomové sekvenovanie

ÚMTM Ústav molekulární a translační medicíny

USA Spojené štáty americké

## 10. Zoznam použitej literatúry

[https://atlases.muni.cz/atlases/feto/atl\\_cz/vvvedvin.html](https://atlases.muni.cz/atlases/feto/atl_cz/vvvedvin.html) navštívené 20.12.2021, 21:00).

<https://genetics.pediatrics.med.ufl.edu/teaching-resources/chromosome-ideagrams/> - ideogramy chromozomov (24.6.2021 12:30)

[www.mrcholland.com](http://www.mrcholland.com) (17.8.2021, 9:00)

<https://www.uzis.cz/index.php?pg=registry-sber-dat--narodni-zdravotni-registry--narodni-registr-reprodukciho-zdravi--modul-vrozenych-vad> (24.6.2021 18:00)

<http://www.vrozene-vady.cz/vrozene-vady/> (23.6.2021 15:00)

**Beke A**, Papp Z. Genetic components of perinatal morbidity and mortality. *J Perinat Med.* 2001;29(3):230-4. doi: 10.1515/JPM.2001.032.

**Best S**, Wou K, Vora N, Van der Veyver IB, Wapner R, Chitty LS. Promises, pitfalls and practicalities of prenatal whole exome sequencing. *Prenat Diagn.* 2018 Jan;38(1):10-19. doi: 10.1002/pd.5102.

**Bonaglia MC**, Kurtas NE, Errichiello E, Bertuzzo S, Beri S, Mehrjouy MM, Provenzano A, Vergani D, Pecile V, Novara F, Reho P, Di Giacomo MC, Discepoli G, Giorda R, Aldred MA, Santos-Rebouças CB, Goncalves AP, Abuelo DN, Giglio S, Ricca I, Franchi F, Patsalis P, Sismani C, Morí MA, Nevado J, Tommerup N, Zuffardi O. De novo unbalanced translocations have a complex history/aetiology. *Hum Genet.* 2018 Oct;137(10):817-829. doi: 10.1007/s00439-018-1941-9.

**Brady P**, Brison N, Van Den Bogaert K, de Ravel T, Peeters H, Van Esch H, Devriendt K, Legius E, Vermeesch JR. Clinical implementation of NIPT - technical and biological challenges. *Clin Genet.* 2016 May;89(5):523-30. doi: 10.1111/cge.12598.

**Breman A**, Pursley AN, Hixson P, Bi W, Ward P, Bacino CA, Shaw C, Lupski JR, Beaudet A, Patel A, Cheung SW, Van den Veyver I. Prenatal chromosomal microarray analysis in a

diagnostic laboratory; experience with >1000 cases and review of the literature. *Prenat Diagn.* 2012 Apr;32(4):351-61. doi: 10.1002/pd.3861.

**Brent RL.** The cause and prevention of human birth defects: What have we learned in the past 50 years?. *Congenital Anomalies*, 2001, 41: 3-21. doi.org/10.1111/j.1741-4520.2001.tb00869.x.

**Breuss MW,** Antaki D, George RD, Kleiber M, James KN, Ball LL, Hong O, Mitra I, Yang X, Wirth SA, Gu J, Garcia CAB, Gujral M, Brandler WM, Musaev D, Nguyen A, McEvoy-Venneri J, Knox R, Sticca E, Botello MCC, Uribe Fenner J, Pérez MC, Arranz M, Moffitt AB, Wang Z, Hervás A, Devinsky O, Gymrek M, Sebat J, Gleeson JG. Autism risk in offspring can be assessed through quantification of male sperm mosaicism. *Nat Med.* 2020 Jan;26(1):143-150. doi: 10.1038/s41591-019-0711-0.

**Brezina PR,** Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet.* 2016 Jul;33(7):823-32. doi: 10.1007/s10815-016-0740-2.

**Burnside RD,** Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR, Potluri VR, Risheg H, Rush B, Smith JL, Schwartz S, Tepperberg JH, Butler MG. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet.* 2011 Oct;130(4):517-28. doi: 10.1007/s00439-011-0970-4.

**Capkova P,** Santava A, Markova I, Stefekova A, Srovnal J, Staffova K, Durdová V. Haploinsufficiency of *BMP4* and *OTX2* in the Foetus with an abnormal facial profile detected in the first trimester of pregnancy. *Mol Cytogenet.* 2017 Dec 28;10:47. doi: 10.1186/s13039-017-0351-3.

**Castleman JS,** Wall E, Allen S et al. The prenatal exome - a door to prenatal diagnostics? *Expert Rev Mol Diagn* 2021; 21(5):465-474. doi: 10.1080/14737159.2021.1920398.

**Coello-Cahuao E**, Sánchez-Durán MÁ, Calero I, Higuera MT, García MA, Rodó C, Maiz N, Plaja Rustein A, Castells-Sarret N, Mediano-Vizueté C, Carreras E. Array study in fetuses with nuchal translucency above the 95th percentile: a 4-year observational single-centre study. *Arch Gynecol Obstet*. 2022 Apr 29. doi: 10.1007/s00404-022-06564-7.

**Conlin LK**, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, Deardorff MA, Krantz ID, Hakonarson H, Spinner NB. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 1;19(7):1263-75. doi: 10.1093/hmg/ddq003.

**Conrad DF**, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, Fitzgerald T, Hu M, Ihm CH, Kristiansson K, Macarthur DG, Macdonald JR, Onyiah I, Pang AW, Robson S, Stirrups K, Valsesia A, Walter K, Wei J; Wellcome Trust Case Control Consortium, Tyler-Smith C, Carter NP, Lee C, Scherer SW, Hurles ME. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010 Apr 1;464(7289):704-12. doi: 10.1038/nature08516.

**Dap M**, Gicquel F, Lambert L, Perdriolle-Galet E, Bonnet C, Morel O. Utility of chromosomal microarray analysis for the exploration of isolated and severe fetal growth restriction diagnosed before 24 weeks' gestation. *Prenat Diagn*. 2022 Sep;42(10):1281-1287. doi: 10.1002/pd.6149.

**Diderich KEM**, Romijn K, Joosten M, Govaerts LCP, Polak M, Bruggenwirth HT, Wilke M, van Slegtenhorst MA, van Bever Y, Brooks AS, Mancini GMS, van de Laar IMBH, Kromosoeto JNR, Knapen MFCM, Go ATJI, Van Opstal D, Hoefsloot LH, Galjaard RH, Srebniak MI. The potential diagnostic yield of whole exome sequencing in pregnancies complicated by fetal ultrasound anomalies. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2021 Jun;100(6):1106-1115. doi: 10.1111/aogs.14053.

**Dolk H**, Loane M, Garne E; European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) Working Group. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation*. 2011 Mar 1;123(8):841-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958405.

**Feldkamp ML**, Carey JC, Byrne JLB, Krikov S, Botto LD. Etiology and clinical presentation of birth defects: population based study. *BMJ*. 2017 May 30;357:j2249. doi: 10.1136/bmj.j2249.

**Fiegler H**, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, Carter NP, Speicher MR. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(3):e15. doi: 10.1093/nar/gkl1030.

**Freed D**, Pevsner J. The Contribution of Mosaic Variants to Autism Spectrum Disorder. *PLoS Genet*. 2016 Sep 15;12(9):e1006245. doi: 10.1371/journal.pgen.1006245.

**Goumy C**, Gouas L, Pebrel-Richard C, Véronèse L, Eymard-Pierre E, Debost-Legrand A, Haoud K, Tchirkov A, Vago P. Prenatal detection of cryptic rearrangements by multiplex ligation probe amplification in fetuses with ultrasound abnormalities. *Genet Med*. 2010 Jun;12(6):376-80. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181e074c6.

**Grandjean H**, Larroque D, Levi S. The performance of routine ultrasonographic screening of pregnancies in the Eurofetus Study. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 Aug;181(2):446-54. doi: 10.1016/s0002-9378(99)70577-6.

**Gunderson KL**, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):549-54. doi: 10.1038/ng1547.

**Hadzagić-Catibusić F**, Maksić H, Uzicanin S, Heljić S, Zubcević S, Merhemić Z, Cengić A, Kulenović E. Congenital malformations of the central nervous system: clinical approach. *Bosn J Basic Med Sci*. 2008 Nov;8(4):356-60. doi: 10.17305/bjbms.2008.2897.

**Hájek Z** a kolektiv. Rizikové a patologické tehotenství, Garda Publishing a.s., str. 53-54, 2004, ISBN 80-247-0418-8.

**Hájek Z**, Čech E, Maršál K a kolektiv. Porodnictví: 3., zcela přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing a.s., strana 104, 2014, ISBN: 9788024794273.



**Hillman SC**, Pretlove S, Coomarasamy A, McMullan DJ, Davison EV, Maher ER, Kilby MD. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011 Jan;37(1):6-14. doi: 10.1002/uog.7754.

**Hixson L**, Goel S, Schuber P, Faltas V, Lee J, Narayakkadan A, Leung H, Osborne J. An Overview on Prenatal Screening for Chromosomal Aberrations. *J Lab Autom.* 2015 Oct;20(5):562-73. doi: 10.1177/2211068214564595.

**Hultén MA**, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Iwarsson E. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet.* 2008 Sep 18;1:21. doi: 10.1186/1755-8166-1-21.

**Hultén MA**, Patel SD, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Jonasson J, Iwarsson E. On the paternal origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet.* 2010 Feb 23;3:4. doi: 10.1186/1755-8166-3-4.

**Chang YW**, Wang PH, Li WH, Chen LC, Chang CM, Sung PL, Yang MJ, Cheng LY, Lai YL, Cheng YY, Yeh CC, Chang WH, Wang SY, Chen SR, Yen MS, Chao KC. Balanced and unbalanced reciprocal translocation: an overview of a 30-year experience in a single tertiary medical center in Taiwan. *J Chin Med Assoc.* 2013 Mar;76(3):153-7. doi: 10.1016/j.jcma.2012.11.002.

**Chapelle A**, Hortling H, Niemi M, Wennström J. XX sex chromosomes in a human male. First case. *Acta Medica Scandinavica* 1964;175:suppl 412:25-8. doi: 10.1111/j.0954-6820.1964.tb04630.x.

**Chau MHK**, Cao Y, Kwok YKY, Chan S, Chan YM, Wang H, Yang Z, Wong HK, Leung TY, Choy KW. Characteristics and mode of inheritance of pathogenic copy number variants in prenatal diagnosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2019 Nov;221(5):493.e1-493.e11. doi: 10.1016/j.ajog.2019.06.007.

**Christofolini DM**, Bevilacqua LB, Mafra FA, Kulikowski LD, Bianco B, Barbosa CP. Genetic analysis of products of conception. Should we abandon classic karyotyping methodology? *Einstein* (Sao Paulo). 2021 Jun 18;19:eAO5945. doi: 10.31744/einstein\_journal/2021AO5945.

**Jia CW**, Wang L, Lan YL, Song R, Zhou LY, Yu L, Yang Y, Liang Y, Li Y, Ma YM, Wang SY. Aneuploidy in Early Miscarriage and its Related Factors. *Chin Med J (Engl)*. 2015 Oct 20;128(20):2772-6. doi: 10.4103/0366-6999.167352.

**Jørch AE**, Douard E, Moreau C, Van Dijck A, Passeggeri M, Kooy F, Puechberty J, Campbell C, Sanlaville D, Lefroy H, Richetin S, Pain A, Geneviève D, Kini U, Le Caignec C, Lespinasse J, Skytte AB, Isidor B, Zweier C, Caberg JH, Delrue MA, Møller RS, Bojesen A, Hjalgrim H, Brasch-Andersen C, Lemyre E, Ousager LB, Jacquemont S; 15q11.2 Working Group. Estimating the effect size of the 15Q11.2 BP1-BP2 deletion and its contribution to neurodevelopmental symptoms: recommendations for practice. *J Med Genet*. 2019 Oct;56(10):701-710. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105879.

**Jónsson H**, Sulem P, Arnadóttir GA, Pálsson G, Eggertsson HP, Kristmundsdóttir S, Zink F, Kehr B, Hjorleifsson KE, Jensson BÖ, Jonsdóttir I, Marelsson SE, Gudjonsson SA, Gylfason A, Jonasdóttir A, Jonasdóttir A, Stacey SN, Magnusson OT, Thorsteinsdóttir U, Masson G, Kong A, Halldorsson BV, Helgason A, Gudbjartsson DF, Stefansson K. Multiple transmissions of de novo mutations in families. *Nat Genet*. 2018 Dec;50(12):1674-1680. doi: 10.1038/s41588-018-0259-9.

**Kallioniemi A**, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21. doi: 10.1126/science.1359641.

**Kishimoto K**, Nomura J, Ellegood J, Fukumoto K, Lerch JP, Moreno-De-Luca D, Bourgeron T, Tamada K, Takumi T. Behavioral and neuroanatomical analyses in a genetic mouse model of 2q13 duplication. *Genes Cells*. 2017 May;22(5):436-451. doi: 10.1111/gtc.12487.

**Kjaergaard S**, Sundberg K, Jørgensen FS, Rohde MD, Lind AM, Gerdes T, Tabor A, Kirchhoff M. Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for

microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenat. Diagn.* (2010), 30: 995-999. doi.org/10.1002/pd.2604.

**Konialis C**, Hagnefelt B, Sevastidou S, Karapanou S, Pispili K, Markaki A, Pangalos C. Uncovering recurrent microdeletion syndromes and subtelomeric deletions/duplications through non-selective application of a MLPA-based extended prenatal panel in routine prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2011 Jun;31(6):571-7. doi: 10.1002/pd.2750.

**Koolen DA**, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Siermans E, Smeets D, Brunner HG, van Kessel AG, Veltman JA, de Vries BB. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat.* 2009 Mar;30(3):283-92. doi: 10.1002/humu.20883.

**Koumbaris G**, Achilleos A, Nicolaou M, Loizides C, Tsangaras K, Kypri E, Mina P, Sismani C, Velissariou V, Christopoulou G, Constantoulakis P, Manolakos E, Papoulidis I, Stambouli D, Ioannides M, Patsalis P. Targeted capture enrichment followed by NGS: development and validation of a single comprehensive NIPT for chromosomal aneuploidies, microdeletion syndromes and monogenic diseases. *Mol Cytogenet.* 2019 Nov 21;12:48. doi: 10.1186/s13039-019-0459-8.

**Lancaster P**, Pedisich E. *Congenital malformations Australia 1981-1992*. Sydney: AIHW National Perinatal Statistics Unit, 1995.

**de Leeuw N**, Hehir-Kwa JY, Simons A, Geurts van Kessel A, Smeets DF, Faas BH, Pfundt R. SNP array analysis in constitutional and cancer genome diagnostics--copy number variants, genotyping and quality control. *Cytogenet Genome Res.* 2011;135(3-4):212-21. doi: 10.1159/000331273.

**Levi S**, Hyjazi Y, Schaapst JP, Defoort P, Coulon R, Buekens P. Sensitivity and specificity of routine antenatal screening for congenital anomalies by ultrasound: the Belgian Multicentric Study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1991 Mar 1;1(2):102-10. doi: 10.1046/j.1469-0705.1991.01020102.x.

**Li TF**, Wu QY, Zhang C, Li WW, Zhou Q, Jiang WJ, Cui YX, Xia XY, Shi YC. 46,XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC Urol*. 2014 Dec 22;14:104. doi: 10.1186/1471-2490-14-104.

**Lim ET**, Uddin M, De Rubeis S, Chan Y, Kamumbu AS, Zhang X, D'Gama AM, Kim SN, Hill RS, Goldberg AP, Poultney C, Minshew NJ, Kushima I, Aleksic B, Ozaki N, Parellada M, Arango C, Penzol MJ, Carracedo A, Kolevzon A, Hultman CM, Weiss LA, Fromer M, Chiocchetti AG, Freitag CM; Autism Sequencing Consortium, Church GM, Scherer SW, Buxbaum JD, Walsh CA. Rates, distribution and implications of postzygotic mosaic mutations in autism spectrum disorder. *Nat Neurosci*. 2017 Sep;20(9):1217-1224. doi: 10.1038/nn.4598.

**van der Linde D**, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, Roos-Hesselink JW. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov 15;58(21):2241-7. doi: 10.1016/j.jacc.2011.08.025.

**von der Lippe C**, Rustad C, Heimdal K, Rødningen OK. 15q11.2 microdeletion – Seven new patients with delayed development and/or behavioural problems. *European Journal of Medical Genetics*, 2011, 54(3):357-360. doi.org/10.1016/j.ejmg.2010.12.008.

**Liu N**, Li H, Li M, Gao Y, Yan H. Prenatally diagnosed 16p11.2 copy number variations by SNP Array: A retrospective case series. *Clin Chim Acta*. 2023 Jan 1;538:15-21. doi: 10.1016/j.cca.2022.10.016.

**Lord J**, McMullan DJ, Eberhardt RY, Rinck G, Hamilton SJ, Quinlan-Jones E, Prigmore E, Keelagher R, Best SK, Carey GK, Mellis R, Robart S, Berry IR, Chandler KE, Cilliers D, Cresswell L, Edwards SL, Gardiner C, Henderson A, Holden ST, Homfray T, Lester T, Lewis RA, Newbury-Ecob R, Prescott K, Quarrell OW, Ramsden SC, Roberts E, Tapon D, Tooley MJ, Vasudevan PC, Weber AP, Wellesley DG, Westwood P, White H, Parker M, Williams D, Jenkins L, Scott RH, Kilby MD, Chitty LS, Hurles ME, Maher ER; Prenatal Assessment of Genomes and Exomes Consortium. Prenatal exome sequencing

analysis in fetal structural anomalies detected by ultrasonography (PAGE): a cohort study. *Lancet*. 2019 Feb 23;393(10173):747-757. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31940-8.

**Lou J**, Sun M, Zhao Y, Fu Y, Yuan H, Dai Y, Liang F, He Y, Liu Y. Analysis of tissue from pregnancy loss and aborted fetus with ultrasound anomaly using subtelomeric MLPA and chromosomal array analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2022 Aug;35(16):3064-3069. doi: 10.1080/14767058.2020.1808612.

**Loucky J**, Springer D, Šubrt I. Doporučení o laboratorním screeningu vrozených vývojových vad v prvním a druhém trimestru těhotenství. *Klin biochemie a metabolismus* 2015; 23(44): 27–30.

**Mademont-Soler I**, Morales C, Bruguera J, Madrigal I, Clusellas N, Margarit E, Sánchez A, Soler A. Subtelomeric MLPA: is it really useful in prenatal diagnosis? *Prenat Diagn*. 2010 Dec;30(12-13):1165-9. doi: 10.1002/pd.2635.

**Magri C**, Marchina E, Bertini V, Traversa M, Savio G, Pilotta A, Piovani G. SNP array and FISH analysis of a proband with a 22q13.2- 22qter duplication shed light on the molecular origin of the rearrangement. *BMC Med Genet*. 2015 Jul 7;16:47. doi: 10.1186/s12881-015-0193-y.

**Manheimer KB**, Richter F, Edelmann LJ, D'Souza SL, Shi L, Shen Y, Homsy J, Boskovski MT, Tai AC, Gorham J, Yasso C, Goldmuntz E, Brueckner M, Lifton RP, Chung WK, Seidman CE, Seidman JG, Gelb BD. Robust identification of mosaic variants in congenital heart disease. *Hum Genet*. 2018 Feb;137(2):183-193. doi: 10.1007/s00439-018-1871-6.

**Martin CL**, Warburton D. Detection of Chromosomal Aberrations in Clinical Practice: From Karyotype to Genome Sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2015;16:309-26. doi: 10.1146/annurev-genom-090413-025346.

**Maya I**, Perlman S, Shohat M, Kahana S, Yacobson S, Tenne T, Agmon-Fishman I, Tomashov Matar R, Basel-Salmon L, Sukenik-Halevy R. Should We Report 15q11.2 BP1-BP2 Deletions and Duplications in the Prenatal Setting? *J Clin Med*. 2020 Aug 11;9(8):2602. doi: 10.3390/jcm9082602.

**McCarroll SA.** Extending genome-wide association studies to copy-number variation. *Hum Mol Genet.* 2008 Oct 15;17(R2):R135-42. doi: 10.1093/hmg/ddn282.

**McLaughlin ES,** Schlosser BA, Border WL. Fetal Diagnostics and Fetal Intervention. *Clin Perinatol.* 2016 Mar;43(1):23-38. doi: 10.1016/j.clp.2015.11.003.

**Meng L,** Pammi M, Saronwala A, Magoulas P, Ghazi AR, Vetrini F, Zhang J, He W, Dharmadhikari AV, Qu C, Ward P, Braxton A, Narayanan S, Ge X, Tokita MJ, Santiago-Sim T, Dai H, Chiang T, Smith H, Azamian MS, Robak L, Bostwick BL, Schaaf CP, Potocki L, Scaglia F, Bacino CA, Hanchard NA, Wangler MF, Scott D, Brown C, Hu J, Belmont JW, Burrage LC, Graham BH, Sutton VR, Craigen WJ, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Muzny DM, Miller MJ, Wang X, Leduc MS, Xiao R, Liu P, Shaw C, Walkiewicz M, Bi W, Xia F, Lee B, Eng CM, Yang Y, Lalani SR. Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management. *JAMA Pediatr.* 2017 Dec 4;171(12):e173438. doi: 10.1001/jamapediatrics.2017.3438.

**Meng X,** Jiang L. Prenatal detection of chromosomal abnormalities and copy number variants in fetuses with congenital gastrointestinal obstruction. *BMC Pregnancy Childbirth* 2022; 22(1):50. doi: 10.1186/s12884-022-04401-y.

**Mills RE,** Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, Abyzov A, Yoon SC, Ye K, Cheetham RK, Chinwalla A, Conrad DF, Fu Y, Grubert F, Hajirasouliha I, Hormozdiari F, Iakoucheva LM, Iqbal Z, Kang S, Kidd JM, Konkel MK, Korn J, Khurana E, Kural D, Lam HY, Leng J, Li R, Li Y, Lin CY, Luo R, Mu XJ, Nemes J, Peckham HE, Rausch T, Scally A, Shi X, Stromberg MP, Stütz AM, Urban AE, Walker JA, Wu J, Zhang Y, Zhang ZD, Batzer MA, Ding L, Marth GT, McVean G, Sebat J, Snyder M, Wang J, Ye K, Eichler EE, Gerstein MB, Hurles ME, Lee C, McCarroll SA, Korbelt JO; 1000 Genomes Project. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature.* 2011 Feb 3;470(7332):59-65. doi: 10.1038/nature09708.

**Mirzaa GM**, Paciorkowski AR. Introduction: Brain malformations. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2014 Jun;166C(2):117-23. doi: 10.1002/ajmg.c.31404.

**Natesan SA**, Bladon AJ, Coskun S, Qubbaj W, Prates R, Munne S, Coonen E, Dreesen JC, Stevens SJ, Paulussen AD, Stock-Myer SE, Wilton LJ, Jaroudi S, Wells D, Brown AP, Handyside AH. Genome-wide karyomapping accurately identifies the inheritance of single-gene defects in human preimplantation embryos in vitro. *Genet Med.* 2014 Nov;16(11):838-45. doi: 10.1038/gim.2014.45.

**Nicolaidis KH**. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011 Jan;31(1):7-15. doi: 10.1002/pd.2637.

**Normand EA**, Braxton A, Nassef S, Ward PA, Vetrini F, He W, Patel V, Qu C, Westerfield LE, Stover S, Dharmadhikari AV, Muzny DM, Gibbs RA, Dai H, Meng L, Wang X, Xiao R, Liu P, Bi W, Xia F, Walkiewicz M, Van den Veyver IB, Eng CM, Yang Y. Clinical exome sequencing for fetuses with ultrasound abnormalities and a suspected Mendelian disorder. *Genome Med.* 2018 Sep 28;10(1):74. doi: 10.1186/s13073-018-0582-x.

**Norton ME**. First-trimester screening for chromosomal abnormalities: advantages of an instant results approach. *Clin Lab Med.* 2010 Sep;30(3):565-71. doi: 10.1016/j.cll.2010.04.015.

**Pavlíček J**, Klásková E, Doležálková E, Matura D, Špaček R, Gruszka T, Polanská S, Procházka M. Vývoj prenatální diagnostiky vrozených srdečních vad, zisk z jednotlivých ultrazvukových projekcí. *Ceska Gynekol* 2018; 83(1): 17 – 23.

**Petersen OB**, Smith E, Van Opstal D, Polak M, Knapen MFCM, Diderich KEM, Bilardo CM, Arends LR, Vogel I, Srebniak MI. Nuchal translucency of 3.0-3.4 mm an indication for NIPT or microarray? Cohort analysis and literature review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2020 Jun;99(6):765-774. doi: 10.1111/aogs.13877.

**Petrovski S**, Aggarwal V, Giordano JL, Stosic M, Wou K, Bier L, Spiegel E, Brennan K, Stong N, Jobanputra V, Ren Z, Zhu X, Mebane C, Nahum O, Wang Q, Kamalakaran S, Malone C, Anyane-Yeboah K, Miller R, Levy B, Goldstein DB, Wapner RJ. Whole-exome sequencing in the evaluation of fetal structural anomalies: a prospective cohort study. *Lancet*. 2019 Feb 23;393(10173):758-767. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32042-7.

**Pinar H**, Tatevosyants N, Singer DB. Central nervous system malformations in a perinatal/neonatal autopsy series. *Pediatr Dev Pathol*. 1998 Jan-Feb;1(1):42-8. doi: 10.1007/s100249900005.

**Rice AM**, McLysaght A. Dosage sensitivity is a major determinant of human copy number variant pathogenicity. *Nat Commun*. 2017 Feb 8;8:14366. doi: 10.1038/ncomms14366.

**Roberts JL**, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene*. 2014 Feb 1;535(1):70-8. doi: 10.1016/j.gene.2013.10.020.

**Robson SC**, Chitty LS, Morris S, Verhoef T, Ambler G, Wellesley DG, Graham R, Leader C, Fisher J, Crolla JA. Evaluation of Array Comparative genomic Hybridisation in prenatal diagnosis of fetal anomalies: a multicentre cohort study with cost analysis and assessment of patient, health professional and commissioner preferences for array comparative genomic hybridisation. Southampton (UK): NIHR Journals Library; 2017 Feb. PMID: 28182369.

**Rodriguez-Revenga L**, Madrigal I, Borrell A, Martinez JM, Sabria J, Martin L, Jimenez W, Mira A, Badenas C, Milà M. Chromosome microarray analysis should be offered to all invasive prenatal diagnostic testing following a normal rapid aneuploidy test result. *Clin Genet*. 2020 Oct;98(4):379-383. doi: 10.1111/cge.13810.

**Roztočil** a kolektiv. *Moderní porodnictví*, Grada Publishing a.s, str 136 – 140, 2017, ISBN:978-80-247-5753-7.



**Sebat J**, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004 Jul 23;305(5683):525-8. doi: 10.1126/science.1098918

**Sehnert AJ**, Rhee B, Comstock D, de Feo E, Heilek G, Burke J, Rava RP. Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clin Chem*. 2011 Jul;57(7):1042-9. doi: 10.1373/clinchem.2011.165910.

**Sha Y**, Liu W, Li L, Serafimovski M, Isachenko V, Li Y, Chen J, Zhao B, Wang Y, Wei X. Pathogenic Variants in *ACTRT1* Cause Acephalic Spermatozoa Syndrome. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Aug 6;9:676246. doi: 10.3389/fcell.2021.676246.

**Shaffer LG**, Rosenfeld JA, Dabell MP, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW, Ravnan JB, Torchia BS, Ballif BC, Fisher AJ. Detection rates of clinically significant genomic alterations by microarray analysis for specific anomalies detected by ultrasound. *Prenat Diagn*. 2012 Oct;32(10):986-95. doi: 10.1002/pd.3943.

**Schouten JP**, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57. doi: 10.1093/nar/gnf056.

**Shu L**, Zhang Q, Tian Q, Yang S, Peng X, Mao X, Yang L, Du J, Wang H. Parental mosaicism in de novo neurodevelopmental diseases. *Am J Med Genet A*. 2021 Jul;185(7):2119-2125. doi: 10.1002/ajmg.a.62174.

**Slater SJ**, Cook AC, Seiz JL, Malinowski SA, Stagliano BA, Stubbs CD. Effects of ethanol on protein kinase C alpha activity induced by association with Rho GTPases. *Biochemistry*. 2003 Oct 21;42(41):12105-14. doi: 10.1021/bi034860e.

**Slavotinek AM**. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet*. 2008 Aug;124(1):1-17. doi: 10.1007/s00439-008-0513-9.

**Solinas-Toldo S**, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997 Dec;20(4):399-407. PMID: 9408757.

**Souka AP**, Von Kaisenberg CS, Hyett JA, Sonek JD, Nicolaidis KH. Increased nuchal translucency with normal karyotype. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Apr;192(4):1005-21. doi: 10.1016/j.ajog.2004.12.093.

**South ST**, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM; Working Group for the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med*. 2013 Nov;15(11):901-9. doi: 10.1038/gim.2013.129.

**Spencer K**. Screening for Down syndrome. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2014;244:41-7. doi: 10.3109/00365513.2014.936680.

**Srebniak MI**, Diderich KE, Joosten M, Govaerts LC, Knijnenburg J, de Vries FA, Boter M, Lont D, Knapen MF, de Wit MC, Go AT, Galjaard RJ, Van Opstal D. Prenatal SNP array testing in 1000 fetuses with ultrasound anomalies: causative, unexpected and susceptibility CNVs. *Eur J Hum Genet*. 2016 May;24(5):645-51. doi: 10.1038/ejhg.2015.193.

**Stern C**, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW. Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod*. 1999 Aug;14(8):2097-101. doi: 10.1093/humrep/14.8.2097.

**Stuppia L**, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci*. 2012;13(3):3245-3276. doi: 10.3390/ijms13033245.

**Šamánek M**, Vorísková M. Congenital heart disease among 815,569 children born between 1980 and 1990 and their 15-year survival: a prospective Bohemia survival study. *Pediatr Cardiol*. 1999 Nov-Dec;20(6):411-7. doi: 10.1007/s002469900502.

**Šípek A**, Gregor V, Šípek A jr. et al. Vrozené vady v České republice v období 1994–2007. *Česká Gynekol* 2009; 74(1): 31–44.

**Šípek A**, Gregor V, Šípek A jr., Klaschka J, Malý M, Jírová J. Vrozené vady u dětí narozených v České republice v období 1994–2015, *Čas. Lék. čes.* 2019; 158: 9–14.

**Štolfa M**, Zůnová H, Slámová Z, Vosecká T, Kutilová T, Drábová J, Novotná D. „High-frequency low-penetrant variants“ Nový klasifikační stupeň pro hodnocení rekurentních variant genomu s vysokou frekvencí, ale nízkou penetrance? Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP a 55. Výroční cytogenetické conference, 2022, Praha.

**Thomas EG**, Higgins C, Westgate MN, Lin AE, Anderka M, Holmes LB. Malformations Surveillance: Comparison between Findings at Birth and Age 1 Year. *Birth Defects Res.* 2018 Jan;110(2):142-147. doi: 10.1002/bdr2.1096.

**Tomek V**, Gilík J, Jičínská H, Pavlíček J, Navrátil J, Čutka D, Vlašín P, Lacinová M, Marek J, Škovránek J. Prenatální detekce srdečních vad a její důsledky. *Česko-slovenská Pediatrie* 2018; 73 (5): 284–290.

**Torres F**, Barbosa M, Maciel P. Recurrent copy number variations as risk factors for neurodevelopmental disorders: critical overview and analysis of clinical implications. *J Med Genet.* 2016 Feb;53(2):73-90. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103366.

**Toufaily MH**, Westgate MN, Lin AE, Holmes LB. Causes of Congenital Malformations. *Birth Defects Res.* 2018 Jan;110(2):87-91. doi: 10.1002/bdr2.1105.

**Valduga M**, Philippe C, Bach Segura P, Thiebaugeorges O, Miton A, Beri M, Bonnet C, Nemos C, Foliguet B, Jonveaux P. A retrospective study by oligonucleotide array-CGH analysis in 50 fetuses with multiple malformations. *Prenat Diagn.* 2010 Apr;30(4):333-41. doi: 10.1002/pd.2460.

**Vanakker O**, Vilain C, Janssens K, Van der Aa N, Smits G, Bandelier C, Blaumeiser B, Bulk S, Caberg JH, De Leener A, De Rademaeker M, de Ravel T, Desir J, Destree A, Dheedene A, Gaillez S, Grisart B, Hellin AC, Janssens S, Keymolen K, Menten B, Pichon B, Ravoet M, Revencu N, Rombout S, Staessens C, Van Den Bogaert A, Van Den Bogaert K, Vermeesch JR, Kooy F, Sznajer Y, Devriendt K. Implementation of genomic arrays in prenatal diagnosis: the Belgian approach to meet the challenges. *Eur J Med Genet.* 2014 Mar;57(4):151-6. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.02.002.

**Van den Veyver IB**, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ, Ward PA, Darilek S, Johnson A, Neill SE, Bi W, White LD, Eng CM, Lupski JR, Cheung SW, Beaudet AL. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn.* 2009 Jan;29(1):29-39. doi: 10.1002/pd.2127.

**Van den Veyver IB**. Recent advances in prenatal genetic screening and testing. *F1000Res.* 2016 Oct 28;5:2591. doi: 10.12688/f1000research.9215.1.

**Vora NL**, Gilmore K, Brandt A et al. An approach to integrating exome sequencing for fetal structural anomalies into clinical practice. *Genet Med* 2020; 22(5):954-961. doi: 10.1038/s41436-020-0750-4.

**Wang Y**, Li Y, Chen Y, Zhou R, Sang Z, Meng L, Tan J, Qiao F, Bao Q, Luo D, Peng C, Wang YS, Luo C, Hu P, Xu Z. Systematic analysis of copy-number variations associated with early pregnancy loss. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2020 Jan;55(1):96-104. doi: 10.1002/uog.20412.

**Wapner RJ**, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Patel A, Lamb AN, Thom EA, Beaudet AL, Ledbetter DH, Shaffer LG, Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med.* 2012 Dec 6;367(23):2175-84. doi: 10.1056/NEJMoa1203382.

**Wapner RJ**, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, Savage M, Platt LD, Saltzman D, Grobman WA, Klugman S, Scholl T, Simpson JL, McCall K, Aggarwal VS, Bunke B, Nahum O, Wiszniewski W, Gawlinski P, Gambin T, Bekiesinska-Figatowska M, Obersztyn E, Antczak-Marach D, Akdemir ZHC, Harel T, Karaca E, Jurek M, Sobocka K, Nowakowska B, Kruk M, Terczynska I, Goszczanska-Ciuchta A, Rudzka-Dybala M, Jamroz E, Pyrkosz A, Jakubiuk-Tomaszuk A, Iwanowski P, Gieruszczak-Bialek D, Piotrowicz M, Sasiadek M, Kochanowska I, Gurda B, Steinborn B, Dawidziuk M, Castaneda J, Wlasienko P, Bezniakow N, Jhangiani SN, Hoffman-Zacharska D, Bal J, Szczepanik E, Boerwinkle E, Gibbs RA, Lupski JR. Comprehensive genomic analysis of patients with disorders of cerebral cortical development. *Eur J Hum Genet.* 2018 Aug;26(8):1121-1131. doi: 10.1038/s41431-018-0137-z.

**Warburton D.** De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 1991 Nov;49(5):995-1013.

**Wells D**, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod.* 2008 Dec;14(12):703-10. doi: 10.1093/molehr/gan062.

**Westerfield L**, Darilek S, van den Veyver IB. Counseling Challenges with Variants of Uncertain Significance and Incidental Findings in Prenatal Genetic Screening and Diagnosis. *J Clin Med.* 2014 Sep 12;3(3):1018-32. doi: 10.3390/jcm3031018.

**Wilch ES**, Morton CC. Historical and Clinical Perspectives on Chromosomal Translocations. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1044:1-14. doi: 10.1007/978-981-13-0593-1\_1.

**Willis AS**, van den Veyver I, Eng CM. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2012 Apr;32(4):315-20. doi: 10.1002/pd.3860.

**de Wit MC**, Srebniak MI, Govaerts LC, Van Opstal D, Galjaard RJ, Go AT. Additional value of prenatal genomic array testing in fetuses with isolated structural ultrasound abnormalities and a normal karyotype: a systematic review of the literature. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014 Feb;43(2):139-46. doi: 10.1002/uog.12575.

**Wu QY**, Li N, Li WW, Li TF, Zhang C, Cui YX, Xia XY, Zhai JS. Clinical, molecular and cytogenetic analysis of 46, XX testicular disorder of sex development with SRY-positive. *BMC Urol.* 2014 Aug 28;14:70. doi: 10.1186/1471-2490-14-70.

**Xia M**, Yang X, Fu J, Teng Z, Lv Y, Yu L. Application of chromosome microarray analysis in prenatal diagnosis. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2020 Nov 16;20(1):696. doi: 10.1186/s12884-020-03368-y.

**Xu Z**, Geng Q, Luo F, Xu F, Li P, Xie J. Multiplex ligation-dependent probe amplification and array comparative genomic hybridization analyses for prenatal diagnosis of cytogenomic abnormalities. *Mol Cytogenet.* 2014 Dec 9;7(1):84. doi: 10.1186/s13039-014-0084-5.

**Yang Y**, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, Braxton A, Beuten J, Xia F, Niu Z, Hardison M, Person R, Bekheirnia MR, Leduc MS, Kirby A, Pham P, Scull J, Wang M, Ding Y, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Eng CM. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2013 Oct 17;369(16):1502-11. doi: 10.1056/NEJMoa1306555.

**Yang Y**, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, Ward P, Braxton A, Wang M, Buhay C, Veeraraghavan N, Hawes A, Chiang T, Leduc M, Beuten J, Zhang J, He W, Scull J, Willis A, Landsverk M, Craigen WJ, Bekheirnia MR, Stray-Pedersen A, Liu P, Wen S, Alcaraz W, Cui H, Walkiewicz M, Reid J, Bainbridge M, Patel A, Boerwinkle E, Beaudet AL, Lupski JR, Plon SE, Gibbs RA, Eng CM. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA.* 2014 Nov 12;312(18):1870-9. doi: 10.1001/jama.2014.14601.

**Zarrei M**, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet* 2015; 16(3):172-83. doi: 10.1038/nrg3871.

**Zhang Y**, Zhong M, Zheng D. Chromosomal mosaicism detected by karyotyping and chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *J Cell Mol Med.* 2021 Jan;25(1):358-366. doi: 10.1111/jcmm.16080.

**Zhang H**, Xu Z, Chen Q et al. Comparison of the combined use of CNV-seq and karyotyping or QF-PCR in prenatal diagnosis: a retrospective study. *Sci Rep* 2023; 13, 1862. doi.org/10.1038/s41598-023-29053-6

**Zhu X**, Li J, Ru T, Wang Y, Xu Y, Yang Y, Wu X, Cram DS, Hu Y. Identification of copy number variations associated with congenital heart disease by chromosomal microarray analysis and next-generation sequencing. *Prenat Diagn.* 2016 Apr;36(4):321-7. doi: 10.1002/pd.4782.

**Yasuda Y**, Hashimoto R, Fukai R, Okamoto N, Hiraki Y, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Taniike M, Mohri I, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N, Takeda M. Duplication of the NPHP1 gene in patients with autism spectrum disorder and normal intellectual ability: a case series. *Ann Gen Psychiatry.* 2014 Aug 6;13:22. doi: 10.1186/s12991-014-0022-2.

## 11. Prílohy

- I. Patogénne varianty objavené metódami MLPA a microarray, Obrázok č. 2
- II. Varianty neznámeho významu objavené metódami MLPA a microarray
- III. Štruktúrne zmeny na chromozómoch odhalené klasickým cytogenetickým hodnotením karyotypu, Obrázok č. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11.
- IV. Tabuľky
  - Tabuľka č.I
  - Tabuľka č.II
  - Tabuľka č.III
  - Tabuľka č.IV
  - Tabuľka č.V
  - Tabuľka č.VI



## **I. Patogénne varianty objavené metódami MLPA a microarray**

V tejto skupine sa nachádzajú zistené CNV varianty s patologickým a nejasným významom získané DNA analýzou metódami MLPA a microarray. U 8 plodov boli zistené patogénne varianty (7x mužské a 1x ženské pohlavie) a u 11 plodov varianty neznámeho významu (8x mužské a 3x ženské pohlavie). Kompletné údaje k jednotlivým prípadom sa nachádzajú v prílohe v Tabuľke II a III. Výsledky analýzy sú rozdelené do podskupín podľa indikácie ku genetickému vyšetreniu.

### ***Pacientky s pozitívnym skríningom v 1. trimestri***

U plodov pacientiek z číslom 16, 19 a 33 bolo indikované genetické vyšetrenie na základe pozitívneho skríningu v 1. trimestri, bez morfológických zmien. U všetkých 3 pacientiek bola odobratá vzorka choriových klkov, analyzovaná metódou MLPA a microarray.

U plodov mužského pohlavia pacientiek č. 16 a 19 bola zistená metódou MLPA (probemixy P250 a P311) duplikácia na chromozóme 22 v oblasti q11.2 (gény CLTCL1, HIRA, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29, LZTR1), metódou microarray bola určená veľkosť mikroduplikácie na 2,585 Mb a doplnené gény, ktoré boli v oblasti duplikované. Táto varianta je pre oba plody patologická, označuje sa ako Mikroduplikačný syndróm (OMIM #608363).

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 33 bola metódou microarray na krátkom ramienku chromozómu X v oblasti 22.31 nájdená delécia, ktorá zahŕňala 4 gény (PUDP, STS, VCX, PNPLA4). Delécia je u jedincov mužského pohlavia spojená so vznikom X – viazanej ichthyózy (OMIM #308100). U matky plodu sa ďalšou analýzou zistila prítomnosť heterozygotnej delécie v tejto oblasti, čo znamená, že je prenášačkou X – viazanej ichthyózy.

### ***Pacientky s indikáciou izolovanej vrodenej poruchy u plodu***

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 2 bolo genetické vyšetrenie indikované z dôvodu nálezu Fallotovej tetralógie. Cytogenetickým hodnotením sa v karyotype našla iba benígna varianta pericentrickej inverzie na 9 chromozóme. Následne analýzou MLPA – probemix P250 a P311, bola zistená delécia na dlhom ramienku chromozómu 22 v oblasti 11.2 o veľkosti cca 2 Mb, zasahujúca gény CLTCL1, HIRA25, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29, LZTR1. Táto delécia odpovedá DiGeorgeovmu syndrómu (OMIM #188400).

Genetické vyšetrenie u plodu mužského pohlavia pacientky č. 13 bolo indikované z dôvodu prítomnosti cýst choroidálneho plexu, po ultrazvukovom vyšetrení v 23 týždni tehotenstva. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa prítomnosť aberácie nezistila. Analýzou MLPA (probemix P297 a P343) bola odhalená duplikácia na krátkom ramienku chromozómu 16 v oblasti 11.2 o veľkosti 542 kb a zahŕňala gény SPN, MAZ, MVP, SEZ6L2, HIRIP3, HIRIP3, DOC2A, MAPK3, zdedená od matky – mikroduplikačný syndróm (OMIM # 614671). Analýzou microarray technikou bol presne stanovený rozsah aberácie a doplnené zdublikované gény. Maternálne zdedená varianta bude mať pravdepodobne patologický dopad na fenotyp plodu.

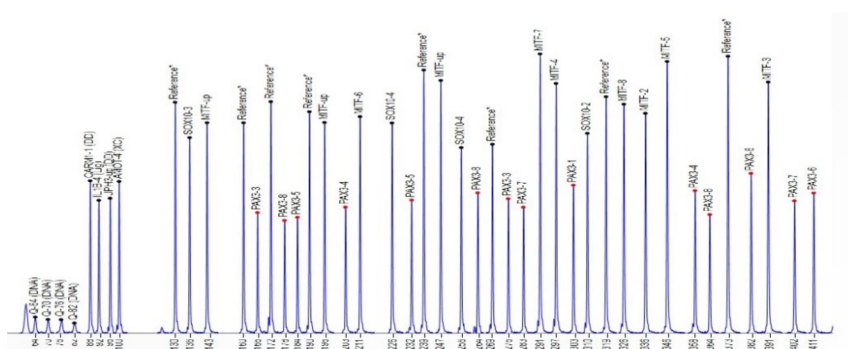
### ***Pacientky s indikáciou mnohopočetných vrodených porúch u plodu***

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 6 bolo ultrazvukovým vyšetrením v 17. týždni tehotenstva zistené ekvinovárózne postavenie dolných končatín, defekt komorového septa (VSD) a megavesica. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa nenašla žiadna aberácia. Metódou MLPA (probemix P250 a P311) sa zistila prítomnosť delécie na dlhom ramienku chromozómu 22 s chýbajúcimi génmi CLTCL1, HIRA25, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29 a LZTR2. Na základe tohto výsledky bol u plodu preukázaný DiGeorgov syndróm (OMIM #188400), ktorý zdedil od matky.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 37 boli ultrazvukovým a MRI vyšetrením zistené mnohopočetné vývojové poruchy – dextropozícia srdca v dôsledku ľavostrannej bráničnej hernie, Arnold – Chiariho malformácia, výrazná dilatácia postranných komôr, mozočkové tonzily sú zostúpené do chrbticového kanálu a lumbálna meningomyelokéla. V 21. týždni tehotenstva došlo k umelému prerušeniu tehotenstva. Cytogenetickým hodnotením sa nezistila prítomnosť aberácie, metafázne chromozómy na preparáte mali nižšiu kvalitu. Následne sa metódou MLPA – probemixy P036, P070, P245, P311, P250 rovnako nezistila prítomnosť aberácie. Až technikou microarray bola zistená prítomnosť parciálnej mozaicistnej trizómie na dlhom ramienku chromozómu 12 v oblasti q24.32 - q24.33 o veľkosti 7,476 Mb zasahujúca 23 OMIM génov. Mozaika bola zastúpená asi v 32% buniek a má patologický význam pre plod.

U plodu ženského pohlavia pacientky č. 38 bolo UZ vyšetrením v 21 týždni abnormálny nález v oblasti zadnej jamy lebečnej, mozoček v tvare banánu, rozšírenie ľavej postrannej komory, rúžštep v oblasti sakrálnej časti chrbtice v rozsahu asi 2 cm, deformita ľavej nohy pes calcaneus, skrining v prvom trimestri bol negatívny. Došlo k umelému prerušeniu tehotenstva. Karyotyp analyzovaného potratového tkaniva bol negatívny. Microarray technikou sa zistila prítomnosť delécie na dlhom ramienku chromozómu 2 v oblasti q35 - q36.1 o veľkosti cca 3 Mb, zasahujúca 7 OMIM génov medzi ktorými bol OMIM morbídny gén PAX3. Analýzou genetického materiálu metódou MLPA bol nález potvrdený (Obrázok č. 2). Táto varianta vysvetľuje fenotyp plodu a má patologický význam.

**Obrázok č. 2** Elektroforetický záznam MLPA analýzy (probemix P186) vzorky potratového tkaniva plodu pacientky č. 38. Červené body predstavujú heterozygotnú deléciu génu PAX3.



## II. Varianty neznámeho významu objavené metódami MLPA a microarray

### *Pacientky s pozitívnym skríningom v 1. trimestri*

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 7 bola UZ vyšetrením zistená zvýšená hodnota nuchálnej translucencie 4,6 mm. Technikami MLPA (probemixy P250, P311, P036, P070 a P297) a microarray bola nájdená mikrodélcia na dlhom ramienku chromozómu 7 v oblasti 35 o veľkosti 792 kb. V tejto oblasti sa nachádza gén CNTNAP2 a táto varianta je momentálne uvádzaná s nejasným významom. Mutácie v tomto géne sú v databáze OMIM spájané s CDFES (# 610042) alebo PTHSL1 syndrómom (# 610042).

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 9 bola UZ vyšetrením zistená zvýšená hodnota nuchálnej translucencie 5 mm. Technikami MLPA a aCGH bola zistená prítomnosť mikroduplicácie na dlhom ramienku chromozómu 13 v oblasti 12.11 o veľkosti 832 kb zo zdublikovanými génmi TPTE2, MPHOSPH8, PSPC1, ZMYM5, ZMYM2, GJA3 a GJB2. Táto varianta bola zdedená od otca a má pre plod nejasný význam.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 15 UZ vyšetrením zistená zvýšená hodnota nuchálnej translucencie 3,4 mm. Metódou MLPA (probemixy P036, P070, P250, P245 a P311) bola zistená prítomnosť mikroduplicácie o veľkosti 500 kb obsahujúca OMIM gén RPH3AL, ktorý sa nachádza na krátkom ramienku 17 chromozómu v oblasti 13.3, zdedený maternálne. Môže sa jednať o SNP variantu, ktorá ovplyvňuje nasadenie sondy. Pre plod má varianta neznámy význam. Analýzou génu FMR1 na chromozóme X sa zistila prítomnosť opakovaní CGG nad 200, čo pre plod znamená syndróm Fragilného chromozómu X, matka je prenášačkou premutovanej varianty.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 17 sa UZ vyšetrením zistila zvýšená hodnota nuchálneho prejasnenia 3,5 mm. Zlyhala kultivácia buniek z choriových klkov, preto nebolo možné cytogenetické vyšetrenie karyotypu. Metódou MLPA (probemixy P036, P070, P245, P311, P250 a P096) sa v genóme zistila prítomnosť mikroduplicácie na krátkom ramienku chromozómu 12 v oblasti 13.33, kde sa nachádza gén KDM5A. Túto variantu plod zdedil od svojej matky a v databázach je uvedená s nejasným významom.

U plodu ženského pohlavia pacientky č.26 bola metódou MLPA (probemix ME028) zaznamenaná delécia v dvoch génoch (TUBGCP5, NIPA1) na 15 chromozóme v oblasti q11.2, metódou microarray bola určená presná veľkosť 451,887 kb a doplnené gény (WHAMMP3, PDCD6IPP1, NIPA2, CYFIP1, ELMO2P1), ktoré boli v oblasti deletované. Zistený profil nezodpovedá syndrómu Prader-Willi. Delécia týchto génov je v databázach uvádzaná v spojitosti s 15q11.2 delečným syndrómom (OMIM # 615656), u ktorého sú prítomné poruchy správania a neuropsychické poruchy. Avšak tým, že je delécia zdedená od zdravej matky, má pre plod nejasný význam. Ďalej sa technikou microarray zistila prítomnosť troch aberácií s neznámym významom, ktoré plod zdedil od otca. Mikroduplikácia na dlhom ramienku chromozómu 2q13 o veľkosti 102,261 kb s dvoma duplikovanými génmi MALL a NPHP1 – tento gén v duplikovanej forme je spojený s neurovývojovými poruchami vrátane poruchy autistického spektra (Roberts et al., 2014; Yasuda et al., 2014, Kishimoto et al., 2017; OMIM \* 607100) a dve mikrodelécie na chromozóme 7q36 o veľkosti 42,421 kb s deletovaným génom CNTNAP2 (OMIM # 610042) a chromozóme 21q22.11 - q22.12 o veľkosti 170,515 kb s deletovanými génmi KCNE2, SMIM11A, SMIM34A, FAM243A, KCNE1 a RCAN1.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 29 sa UZ vyšetrením zistilo zvýšené šijové prejasnenie 2,6 mm. Vďaka nižšej kvalite metafáz pri cytogenetickom hodnotení bola doporučená microarray analýza, ktorou sa našla mikrodélécia na chromozóme Xq25 o veľkosti 391 kb zasahujúca gén ACTRT1, ktorý plod zdedil od matky a v databázach je táto varianta popisovaná ako nejasná. Avšak objavujú sa možné spojitosti mutácií v tomto géne s mužskou neplodnosťou (OMIM # 617187, Sha et al., 2021).

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 34 bol cytogenetickým hodnotením stanovený fyziologický karyotyp, technikou microarray sa zistila prítomnosť mikroduplikácie na chromozóme Xq21, zasahujúcej gén PCDH11X. V databázach je táto varianta popisovaná s nejasným významom pre svojho nositeľa. Sú však prítomné dohady o možnej spojitosti s Alzheimerovou chorobou (OMIM \* 300246, OMIM \* 300756).

U plodov (geminy) pacientky č. 36 došlo v 35. týždni tehotenstva k odumretiu. U plodu B sa technikou MLPA (probemixy P036, P070, P245 a P096) zistila prítomnosť dvoch terminálnych mikrodélécií na chromozóme 19q13.43 (CHMP2A) a chromozóme 20p13

(SOX12, ZCCHC3). Veľkosť mikrodélií sa touto technikou stanoviť nepodarilo. Karyotyp sa vyšetriť nepodarilo lebo zlyhala kultivácia. U druhého plodu sa tieto mikrodélacie nezistili. CMA metóda nebola indikovaná, lebo materiál bol zaslaný z externého pracoviska a matka nebola dostupná pre ďalšiu genetickú konzultáciu. Príčina spontánneho úmrtia plodov sa neobjasnila.

U plodu ženského pohlavia pacientky č. 42 na vyšetrením pomocou ultrazvuku objavilo zvýšenie šijového prejasnenia 4,1 mm. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa nezistila prítomnosť aberácie, ale technikou SNP microarray sa našla heterozygotná delécia génov NPHP1 a MALL na chromozóme 2q13 (OMIM # 256100) o veľkosti 93,174 kb. V databázach je tento typ varianty uvádzaný s neznámym významom pre svojho nositeľa. V takomto prípade sa však môže jednať o prenášačstvo nefronoftýzy a v prípade ultrazvukom detegovanej poruchy urotraktu je určite vhodné urobiť sekvenáciu druhej kópie génu.

#### ***Pacientky s indikáciou izolovanej vrodenej poruchy u plodu***

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 10 sa ultrazvukovým vyšetrením v 13. týždni tehotenstva zistila patológia na všetkých 4 končatinách, presiaknutie šije až 15 mm, nízko postavený ľavý ušný lalok. Analýzou genetického materiálu technikou microarray sa zistila prítomnosť mikrodélií na dlhom ramienku 3 chromozómu o veľkosti 8,3 kb, zasahujúca gén TP63. Variantu plod zdedil od matky a v databázach je popisovaná ako nejasná. Delécia tohto samotného génu s fenotypom nesúvisí. Tento gén vystupuje ako izoformická varianta tumor supresorového génu TP53. V databázach sú popisované rozsiahlejšie delécie v tejto oblasti ako patologické.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. 30 sa fetálnym echokardiografickým vyšetrením zistila prítomnosť rozvíjajúcej sa aortálnej stenózy. Zhodnotením karyotypu a metódou MLPA (probemix P250 a P311) sa prítomnosť aberácie v genóme nenašla. Metódou SNP array sa našla na dlhom ramienku 11. chromozómu prítomnosť maternálne zdedenej mikrodélií o veľkosti 284 kb, zasahujúca gén DYNC2H1. Tento gén je spojený so

syndrómom krátkeho rebra a polydaktýlie, čomu fenotyp plodu nezodpovedá. Varianta je v databázach popisovaná ako nejasná.

### **III. Štruktúrne zmeny na chromozómoch odhalené klasickým cytogenetickým hodnotením karyotypu**

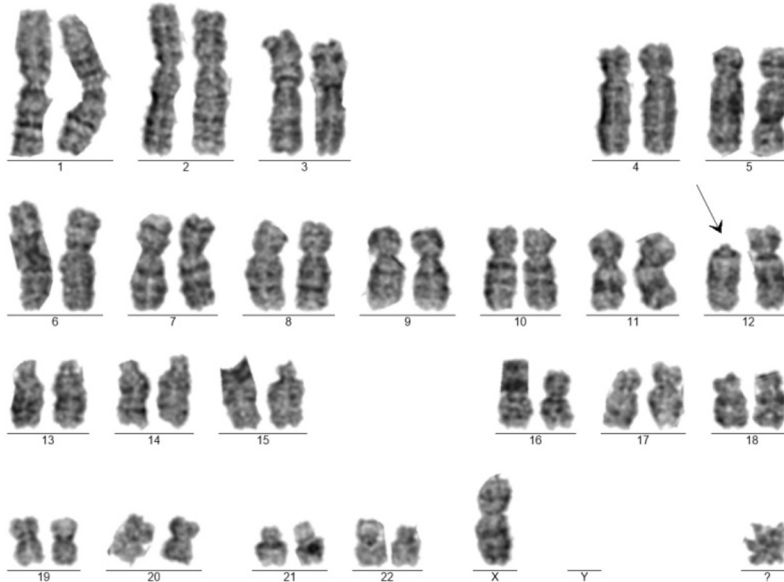
Do tejto kategórie bolo zaradených 22 plodov, u ktorých boli cytogenetickým hodnotením karyotypu zistené chromozómové aberácie. Nálezy sú rozdelené podľa indikácie ku genetickému vyšetreniu. Podrobné výsledky štrukturálnych chromozomálnych aberácií sú uvedené v tabuľke č. VI.

#### ***Pacientky s pozitívnym skríningom v 1. trimestri***

U plodu ženského pohlavia pacientky č. A3 bol ultrazvukovým vyšetrením v 11. týždni tehotenstva v brušnej dutine viditeľný cystický dvojkomorový anechogénny útvar veľkosti cca 8x8x6mm, začínajúci celkový hydrops a zvýšená hodnota NT=2,8 mm. V 14. týždni bolo UZ vyšetrenie s normálnym nálezom. Cytogenetickým hodnotením sa zistila v karyotype v dvoch bunkách prítomnosť marker chromozómu a v jednej bunke trizómia 7. chromozómu. Analýzou DNA metódou MLPA (probemixy P036, P245, P311 a P250) sa prítomnosť abnormality nenašla. V tomto prípade sa môže jednať o sekundárne vzniknutý kultivačný artefakt.

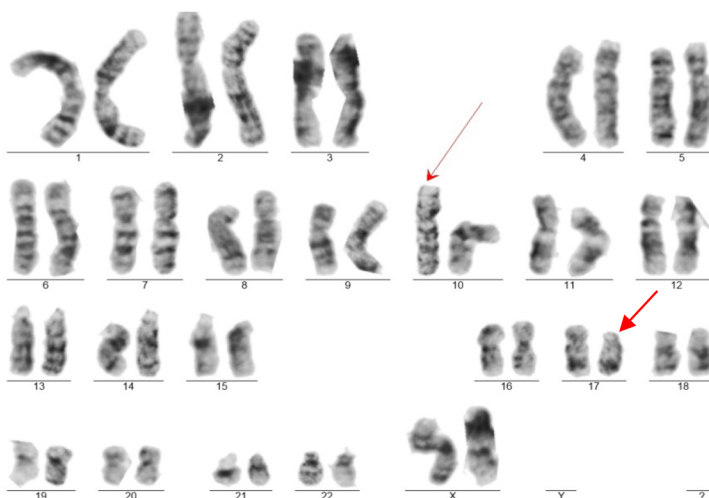
U plodu ženského pohlavia pacientky č. A7 bolo indikované genetické vyšetrenie na základe pozitívneho skríningu v 1. trimestri a zvýšenej hodnote NT=8. Podľa UZ vyšetrenia bol plod v poriadku. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa zistila v dvoch bunkách strata krátkeho ramienka chromozómu 12 a v dvoch bunkách monozómia chromozómu X, 47,XX+mar[2]/47,-12,+fis(12)(q10),+fis(12)(q10)[1]/46,XX,del(12)(p10)[1]/45,X,del(12)(p10)[1],45,X[1]/chrb(5)(p?13)[1]/46,XX[26] (Obrázok č. 3). Analýzou DNA technikou microarray sa žiadne aberácie nenašli. Pravdepodobne sa jedná o kultivačný artefakt alebo syndróm chromozomálnej nestability.

**Obrázok č. 3** Záznam karyotypu z cytogenetického hodnotenia plodu pacientky A7 (Autor: RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D, Ústav lekárskej genetiky FN OL). Šípkou je vyznačená strata krátkeho ramienka chromozómu 12.



U plodu ženského pohlavia pacientky č. A10 bolo indikované genetické vyšetrenie na základe pozitívneho skríningu v 1. trimestri. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa odhalila balansovaná translokácia medzi chromozómami 10 a 17 (Obrázok č. 4).

**Obrázok č. 4** Záznam karyotypu z cytogenetického hodnotenia plodu pacientky A10 (Autor: Jana Křepská, Ústav lekárskej genetiky FN OL)





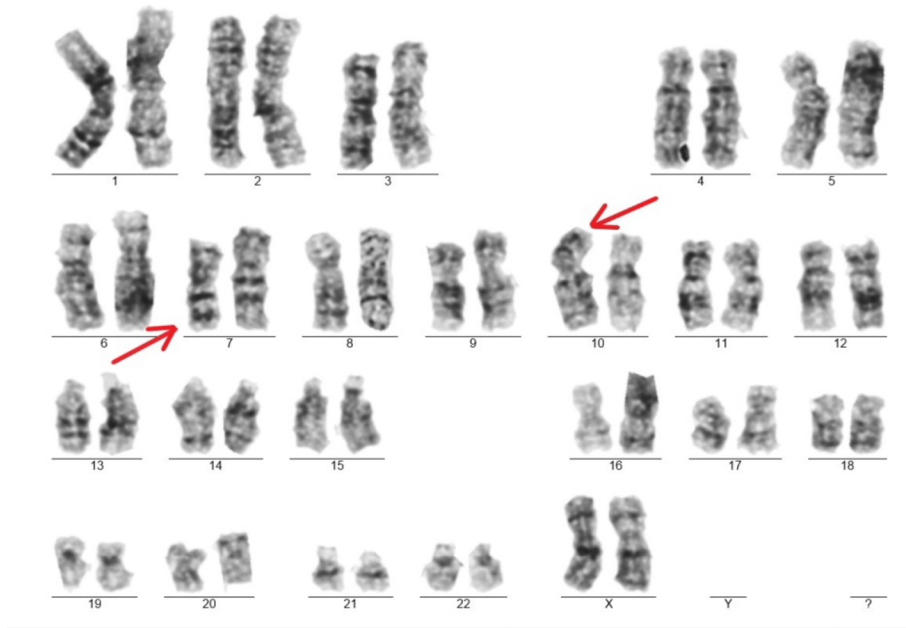
U plodu mužského pohlavia pacientky č. A13 bolo indikované genetické vyšetrenie na základe pozitívneho skríningu v 1. trimestri a veku matky. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa zistilo, že plod má chromozómovú konštitúciu 46,XX. Pacientke sa narodil zdravý chlapec. Opakovaným vyšetrením DNA z plodovej vody sa rovnako zistila prítomnosť konštitúcie 46,XX a neprítomnosť chromozómu Y. Postnatálnym genetickým vyšetrením buniek z periférnej krvi a buniek s bukálneho steru sa cytogenetickým vyšetrením (karyotyp, FISH) potvrdila konštitúcia 46,XX. Momentálne prebieha celoexómové vyšetrenie DNA v Prahe na Ústave biologie a lekárskej genetiky v Motole.

### ***Pacientky s pozitívnym triple testom***

U plodu ženského pohlavia pacientky č. A6 bolo indikované genetické vyšetrenie na základe pozitívneho triple testu v II. trimestri. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa odhalila balansovaná translokácia medzi chromozómami 5 a 11 [46,XX,t(5;?11)(p?15;p?15)mat]. Aberáciu plod zdedil od matky. MLPA analýza bola negatívna (P036, P070).

U plodu ženského pohlavia pacientky č. A11 bolo indikované genetické vyšetrenie na základe pozitívneho triple testu v II. trimestri. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa zistila prítomnosť balansovanej translokácie medzi chromozómami 7 a 10 (Obrázok č 5). Analýza technikou microarray bola negatívna.

**Obrázok č. 5** Záznam karyotypu z cytogenetického hodnotenia plodu pacientky A11  
(Autor: Jana Křepská, Ústav lékařské genetiky FN OL)

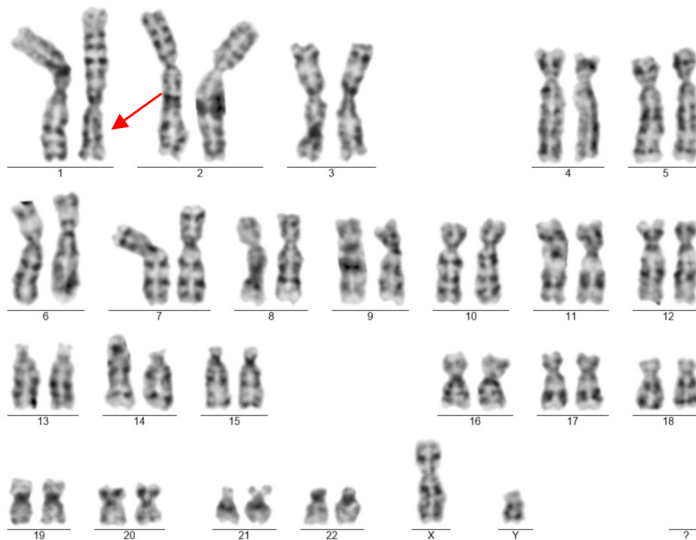


***Pacientky s indikáciou prenosu štruktúrnej chromozomálnej anomálie v rodine, bez prítomnosti morfolologickej poruchy na UZ***

U plodu ženského pohlavia pacientky č. A4 bolo indikované genetické vyšetrenie na základe prítomnosti balansovanej translokácie medzi chromozómami 5 a 11 u matky plodu. Táto balansovaná translokácia bola potvrdená aj u plodu. Analýza MLPA metódou bola negatívna.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. A5 sa cytogenetickým hodnotením karyotypu odhalila inverzia na chromozóme 1 [46,XY,inv(1)(p33q44)pat] (Obrázok č. 6). Túto aberáciu plod zdedil od svojho otca.

**Obrázok č. 6** Záznam karyotypu z cytogenetického hodnotenia plodu pacientky A5 (Autor: Markéta Řoutilová, Ústav lékařské genetiky FN OL)



U plodu ženského pohlavia pacientky č. A8 na základe indikácie diabetes melitus II. typu u pacientky, sa cytogenetickým hodnotením zistila prítomnosť Robertsonskej translokácie medzi chromozómami 13 a 14 [45,XX,t(13,14)(q10;q10)] (Obr. č. 7).

**Obrázok č. 7** Záznam karyotypu z cytogenetického hodnotenia plodu pacientky A8 (autor: Markéta Řoutilová, Ústav lékařské genetiky FN OL)



U plodu mužského pohlavia pacientky č. A9 bola na základe prítomnosti Robertsonskej translokácie medzi chromozómami 14 a 21 u pacientky indikované genetické vyšetrenie.

Cytogenetickým hodnotením karyotypu plodu sa zistila prítomnosť rovnakej Robertsovej translokácie ako u matky [45,XY,der(14;21)(q10;q10)mat], ktorá je bez klinického dopadu pre svojho nositeľa.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. A1 bolo indikované genetické vyšetrenie z dôvodu prítomnosti inverzie na 10. chromozóme u pacientky [46,XX,inv(10)(q23.3q25.1)]. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa potvrdila prítomnosť tejto inverzie u plodu [46, XY, inv (10)(q2?2q2?5)mat]. Analýzou SNP array sa nenašla žiadna abnormalita.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. A12 sa ultrazvukovým vyšetrením v 22. Týždni tehotenstva zistila prítomnosť agenézy corpus callosum. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa odhalila prítomnosť balansovanej translokácie medzi chromozómami 5 a 19 [46,XY,t(5;19)(q?12;p?13.2)]. Analýzou SNP array sa nenašla žiadna abnormalita.

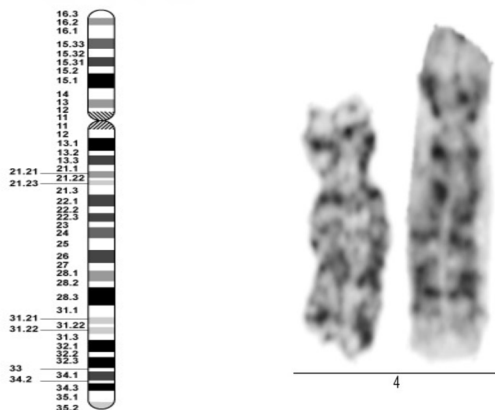
U plodu ženského pohlavia pacientky č. A14 bolo indikované genetické vyšetrenie na základe prenášačstva balansovanej translokácie medzi chromozómami 13 a 20 u otca plodu. Plod zdedil túto aberáciu od otca vo forme balansovanej translokácie [46,XX,t(13,20)(q32,q13.3)pat], čo by nemalo mať výrazný dopad na fenotyp plodu.

U plodu mužského pohlavia pacientky č. A16 bola cytogenetickým hodnotením zistená prítomnosť nebalansovanej translokácie medzi chromozómami 7 a 10 - 46,XY,der(7)t(7;10)(q36.1;q25.1)pat. Plod túto variantu zdedil od otca, ktorý bol nositeľom balansovanej translokácie medzi týmito chromozómami. Microarray technikou boli špecifikované miesta zlomu na chromozóme 7. Išlo o deléciu v oblasti 7q36.1-q36.3 (9,761 Mb) a na chromozóme 10 duplikácia v oblasti q24.31 - q26.3 (32,673 Mb). Zdedenie takéhoto nebalansovaného chromozómu má pre plod patologický význam.

U plodu ženského pohlavia pacientky č. A18 bola cytogenetickým hodnotením (Obrázok č. 8) zistená prítomnosť nebalansovanej translokácie rekombinantného chromozómu 4 - 46,XX,rec(4)dup(4p)inv(4)(p14q33)pat. Metódou MLPA bola použitými próbami P245 a P070 zistená duplikácia v oblasti 4p16.3 a prôbou P070 delécia v oblasti 4q35.2.

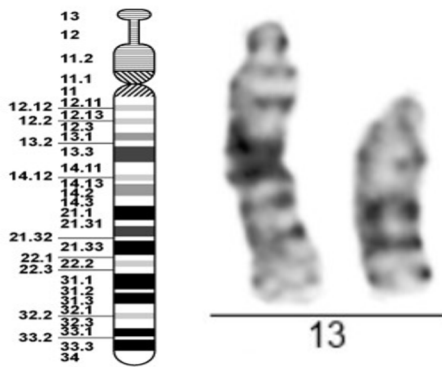
Varianta bola zdedená od otca 46,XY,inv(4)(p14,q33). Táto aberácia bude u plodu s najväčšou pravdepodobnosťou asociovaná s abnormálnym fenotypom.

**Obrázok č. 8** Cytogenetický nález u plodu pacientky A18 na chromozóme 4 – nebalansovaná translokácia rekombinantného chromozómu. (Autor: Jana Křepská, Ústav lekárskej genetiky, FNOL, ideogram <https://genetics.pediatrics.med.ufl.edu/teaching-resources/chromosome-ideograms/>)



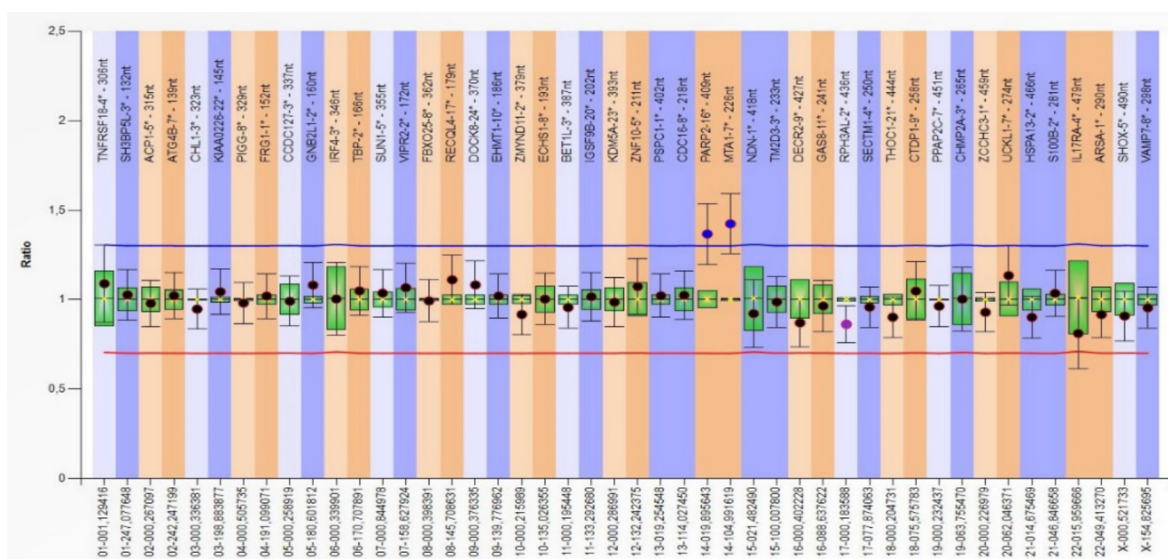
U plodu ženského pohlavia pacientky č. A19 bola cytogenetickým hodnotením zistená prítomnosť nebalansovanej translokácie medzi chromozómami 6 a 13 (Obrázok č. 9) Použitím MLPA prób P036 a P070 bola zistená duplikácia na dlhom ramienku chromozómu 6 a delécia na dlhom ramienku chromozómu 13 [46,XXder(13)t(6;13)(q?24;q34)pat]. Túto nebalansovanú konštitúciu plod zdedil od svojho otca. Pre plod má varianta patologický charakter.

**Obrázok č. 9** Cytogenetický nález u plodu pacientky A19 na chromozóme 13 – nebalansovaná translokácia medzi chromozómami 6 a 13. (Autor: Jana Křepská., Ústav lekárskej genetiky, FNOL, zdroj ideogram <https://genetics.pediatrics.med.ufl.edu/teaching-resources/chromosome-ideograms/>).



U plodu mužského pohlavia pacientky. U pacientky č. A20 po IVF došlo k spontánnemu potratu v 7-8 týždni tehotenstva. Z analýzy potratového tkaniva bola cytogenetickým hodnotením zistená prítomnosť nebalansovanej translokácie trizómie chromozómu 14 [46,XY,der(13;14),+14mat]. Nález bol overený probemixami P036 a P070 (Obrázok č. 10). U matky plodu bola zistená Robertsonská translokácia medzi chromozómami 13 a 14.

**Obrázok č. 10** Záznam z analýzy metódou MLPA – próba P070. Na obrázku je zachytená prítomnosť duplikácie (modré body) na chromozóme 14.



U pacientky č. A21 došlo v 17. týždni tehotenstva k spontánnemu abortu. V prvotrimestrálnom skríningu bola zistená zvýšená hodnota NT 4,8 mm. Cytogenetickou analýzou tkaniva plodu bola zistená nebalansovaná translokácia 46,XY,der 16t(16;21) - parciálna duplikácia terminálnej časti krátkeho ramienka chromozómu 16 o veľkosti 19,116 Mb a parciálna delécia terminálnej časti dlhého ramienka chromozómu 21 o veľkosti 4,492 Mb, rozsah aberácie bol špecifikovaný technikou microarray. Aberáciu plod zdedil od matky, ktorá mala balansovanú translokáciu 46,XX, t(16;21)(p13.2;q22.3?). Chromozomálna aberácia bola s vysokou pravdepodobnosťou príčinou intrauterinneho úmrtia plodu.

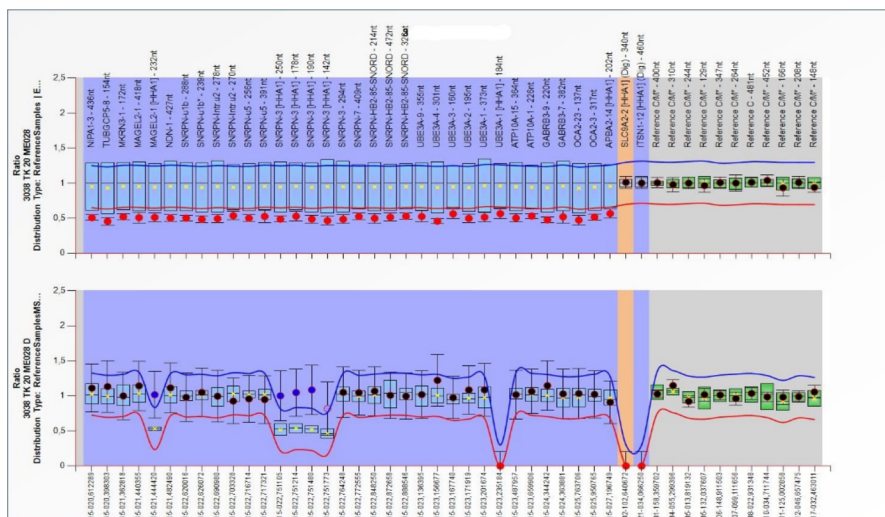
### ***Pacientky s indikáciou izolovanej vrodenej poruchy u plodu***

U plodu mužského pohlavia pacientky č. A15 bolo ultrazvukovým vyšetrením v 13. týždni tehotenstva zistené skrátenie femurov na oboch dolných končatinách plodu a NT 4 mm. Cytogenetickým hodnotením sa v karyotype nezistila prítomnosť aberácie. Metódou FISH sa zistila prítomnosť nebalansovanej prestavby medzi chromozómami 10 a 18 46,XY,ish der(18)t(10;18)(pter+;pter-) MLPA – probemixy P311, P250 a P245, sa zistila prítomnosť duplikácie na dlhom ramienku chromozómu 22 v oblasti 11.2. Postnatálne bol chlapček dovyšetrený microarray technikou a nález sa potvrdil arr[GRCh37]10p15.3p14(130,294-11,771,542)x3,18p11.32p11.23(136,226,057-8,057,394)x1,22q11.31(18,649,166-21,465,659)x3. Varianta bola pre plod patologická, čo možno pozorovať na fenotype narodeného chlapca. Od 3 mesiacov má epileptické záchvaty, ktoré ustúpili po medikácii. Psychomotorický vývoj je oneskorený, prítomné sú dysmorfické rysy – nezostúpený semenník, ploché záhlavie, preaurikulárne fistuly a protrúzia jazyka.

U plodu ženského pohlavia pacientky č. A22 podrobným ultrazvukovým vyšetrením v 21 týždni tehotenstva bol zistený anhydramnion a nezobraziteľný urotrakt. Podľa MRI vyšetrenia na žiadnej z vyhotovených sekvencií neboli prítomné obličky plodu. Nález bol uzavretý ako bilaterálna agenéza obličiek. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa zistila prítomnosť nebalansovanej prestavby chromozómov 9 a 15, ktorá viedla

k parciálnej monozómii chromozómu 15 [45,XX,-15,der(15)t(9;15)(q34;q?14)]. Molekulárne cytogenetickými metódami sa zistila prítomnosť heterozygotnej delécie na dlhom ramienku chromozómu 15 v oblasti 11.2 – 14 (metylačne špecifický probemix ME028) (Obrázok č. 11). Táto delécia zahŕňa 13 OMIM morbídnych génov, ktoré sú kauzálne u syndrómu Prader-Willi (OMIM #176270). Na základe výsledku metylačného profilu je delécia paternálneho pôvodu.

**Obrázok č. 11** Záznam z analýzy metódou MLPA - metylačne špecifický probemix ME028. Na hornej polovici obrázku je viditeľná delécia na 15. chromozóme (červené body) a na spodnej polovici obrázku je prítomný metylačný profil = prítomnosť len paternálnej alely (modré body).



**Pacientky s indikáciou mnohopočetných vrodených porúch u plodu**

U plodu mužského pohlavia pacientky č. A2 bola ultrazvukovým vyšetrením v 13. týždni tehotenstva zistená polydaktylia (6 prstov) na hornej končatine, mikromandibula a mikrognatia. Cytogenetickým vyšetrením sa v karyotype zistila prítomnosť aberácie na dlhom ramienku chromozómu 14 [46,XY,del(14)(q22q23)]. Technikami MLPA a microarray bola upresnená veľkosť delécie na 7,733 Mb, v tejto oblasti bolo deletovaných 40 OMIM génov (Capkova et al., 2017). Uvádzaná delécia je v databázach popisovaná ako pravdepodobne patogénna.



U plodu mužského pohlavia pacientky č. A17 bolo podrobným ultrazvukovým vyšetrením v 13. týždni tehotenstva zistená prítomnosť agenézy corpus callosum, colpocefálie, miernej bilaterálnej ventrikulomegálie a dve cievy v pupočníku. Cytogenetickým hodnotením karyotypu sa zistila prítomnosť terminálnej delécie na dlhom ramienku chromozómu 18 od oblasti 21.1. Metódou microarray bol určený rozsah delécie na 30,788 Mb a v tejto oblasti chýbalo 65 OMIM génov. Táto varianta má pre plod patologický význam.

#### IV. Tabuľky

**Tabuľka č. I** Výsledky cytogenetickej analýzy karyotypu - údaje zaznamenávajú nálezy aneuploidii autozómov a gonozómov, ktoré už neboli zahrnuté do analýzy molekulárne cytogenetickými metódami (MLPA, microarray).

		2015		2016		2017		2018		2019		2020		CELKOM
		XX	XY	XX	XY	XX	XY	XX	XY	XX	XY	XX	XY	
<b>Patau syndróm</b>	Voľná trizómia	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	-	-	6
	Translokačná forma	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2
	Mozaika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<b>Edwards syndróm</b>	Voľná trizómia	2	1	-	1	-	2	3	2	1	3	2	3	20
	Mozaika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<b>Down syndróm</b>	Voľná trizómia	4	8	5	2	9	9	4	4	5	3	3	3	59
	Translokačná forma	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	Mozaika	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<b>Turner syndróm</b>	Voľná trizómia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
	Mozaika	1	-	-	-	-	1	-	-	2	-	1	-	5
<b>Klinefelter syndróm</b>	Mozaika	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<b>Triploidie</b>		-	-	-	2(XXY)	-	-	-	-	-	1(XXY)	-	-	3
<b>Trizómia 18+21</b>		-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1 (mozaika chr.18)	2
<b>Trizómia chr. 9</b>		-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Trizómia chr. 20</b>		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
														<b>107</b>

**Tabuľka č. II** Podrobný súhrn výsledkov z analýzy molekulárne cytogenetickými technikami (MLPA, microarray) u plodov z fyziologickým karyotypom, za obdobie od roku 2015 - 2020. Zaznamenané sú varianty s patologickým významom, uvedené sú len OMIM gény.

N	TT	Fenotyp	Materiál	Karyotyp	MLPA	Microarray	Rozsah aberácie	OMIM Gény	Syndróm
2.	-	Fallotova tetralógia	pv	46,XY,inv(9)	rsa 22q11.(P250-B2, P311-A2)x1	-	2,1 Mb	CLTCL1, HIRA25, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29, LZTR1	22q11.2 Mikrodelečný syndróm
6.	16+4	Megavesica, equinovárožne postavenie DK, VSD	pv	46,XY	rsa 22q11.2(P245-B1, P250-B2,P311-A2)x1 mat	-	2,1 Mb	CLTCL1, HIRA25, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29, LZTR1	22q11.2 Mikrodelečný syndróm
13.	23	Cysty chorioidálneho plexu	pv	46,XY	rsa 16p11.2(P297-C1, P343-C3)x3	arr[GRCh37]16p11.2(29,6 22,813_30,165,725)x3 mat	0,542 Mb	SLC7A5P1, SPN, QPRT, C16orf54, KIF22, MAZ, PRRT2, PAGR1, MVP, CDIPT, SEZ6L2, ASPHD1, KCTD13, TAOK2, HIRIP3, DOC2A, ALDOA, PPP4C, TBX6, YPEL3, GDDP3, MAPK3	16p11.2 Mikroduplikačný syndróm
16.	13	Pozitívny I.trim.skríning, NT 3,3	cvs	46,XY	rsa 22q11.2(P250-B2)x3	arr[GRCh37]22q11.21(18 919942_21505417)x3 mat	2,585 Mb	PRODH, DGCR2, DGCR14, TSSK2, GSC2, SLC25A1, CLTCL1, DVL1P1, HIRA, MRPL40, UFD1L, CDC45, CLDN5, SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, TXNRD2, COMT, ARVCF, DGCR8, TRMT2A, RANBP1, ZDHH8, RTN4R, DGCR6L, GGTL3, RIMBP3, ZNF74, SCARF2, MED15, PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, P2RX6, SLC7A4, BCRP2, E2F6P2	22q11.21 Duplikačný syndróm
19.	-	Pozitívny I.trim.skríning, NT 3,5	cvs	46,XY	rsa 22q11.(P250-B2, P311-B1)x3	arr[GRCh37]22q11.21(18 919942_21505417)x3	2,585 Mb	PRODH, DGCR2, DGCR14, TSSK2, GSC2, SLC25A1, CLTCL1, DVL1P1, HIRA, MRPL40, UFD1L, CDC45, CLDN5, SEPT5, GP1BB, TBX1, GNB1L, TXNRD2, COMT, ARVCF, DGCR8, TRMT2A, RANBP1, ZDHH8, RTN4R, DGCR6L, GGTL3, RIMBP3, ZNF74, SCARF2, MED15, PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, P2RX6, SLC7A4, BCRP2, E2F6P2	22q11.21 Duplikačný syndróm
33.	12+5	Ventrikulomegália, pozit. 1 trim.skríning, NT 1,6	cvs	46,XY	-	arr[GRCh37]Xp22.31(6,48 8,721_8,097,511)x0 mat	1,608 Mb	PUDP, STS, VCX, PNPLA4	X viazaná ichtyóza
37.	-	Mnohopočetné vývojové poruchy*	tk	46,XY	-	arr[GRCh37]12q24.32q24.33(126,301,886_133,777,902)x2-3[0.32] dn	7,476 Mb	TMEM132D, FZD10, PIWIL1, RIMBP2, STX2, RAN, GPR133, SFSWAP, MMP17, ULK1, PUS1, EP400, NOC4L, GALNT9, P2RX2, POLE, PGAM5, GOLGA3, CHFR, ZNF26, ZNF140, ZNF10, ZNF268	Patologická mozaika
38.	20+5	NB chýba, spina bifida s meningomyelokélou, pes calcaneus na ĽDK, NT 1,5	tk	46,XX	-	arr[GRCh37]2q35q36.1(2 21,148,359_224,433,293) x1 dn	3,284 Mb	EPHA4, PAX3, SGPP2, FARSB, MOGAT1, ACSL3, KCNE4	Waandenburgov syndróm

N číslo pacienta, \* Dextropozícia srdca, ľavostranná bráničná hernia ChM, HM, HVm, HPM, lumbálna meningomyelokéla, v hrudnej dutine žalúdok, slezina a celé tenké črevo. ľavá časť pľúc výrazne hypoplastická a uložená v stredovej čiare, srdce a pravá časť pľúc dislokované doprava hore a dozadu, pečeň pod bránicou. NT 2,7, - Analýza príslušnou metódou nebola vykonaná, neznámy údaj o tt, TT týždeň tehotenstva, NT nuchálna translucencia, ĽDK ľavá dolná končatina, NB nosná kosť, DK dolná končatina, VSD defekt komorového septa

**Tabuľka č. III** Podrobný súhrn výsledkov z analýzy molekulárne cytogenetickými technikami (MLPA, microarray) u plodov, za obdobie od roku 2015 - 2020. Zaznamenané sú varianty s nejasným významom, uvedené sú len OMIM gény.

N	TT	Fenotyp	Materiál	Karyotyp	MLPA	Rozsah aberácie	Microarray	OMIM Gény
7.	13+0	Pozitívny I.trim.skríning NT 4,6	cvś	46,XY	rsa 7q35(CNTNAP2)x1	0,792 Mb	arr [GRCh37]7q35(146,079,235_146,872,072)x1	CNTNAP2
9.	12+6	Pozitívny I.trim.skríning, NT 5	cvś	46,XY,	rsa 13q12.11(MPHOSPH8,PSPC1,ZMYM2)x3	0,832 Mb	arr[GRCh37]13q12.11(19,972,233_20,804,712)x3 pat	TPTE2, MPHOSPH8, PSPC1, ZMYM5, ZMYM2, GJA3, GJB2
10.	12+5	Mnohopoččetné vývojové poruchy *	cvś	46,XY	-	8,3 kb	arr[GRCh37]3q28(189,363,665_189,371,964)x1 mat	TP63
15.	13	Pozitívny I.trim.skríning, VVP srdca v predch. grav., NT 3,4	cvś	46,XY	rsa 17p13.3(RPH3AL)x3 mat	500 kb	-	RPH3AL
17.	13+1	Pozitívny I.trim.skríning, NT 3,5	cvś	nevyšetrený - zlyhala kultivácia	rsa 12p13.33(KDM5A)x3 mat	-	-	KDM5A
26.	12+5	Tachykardia, Pozitívny I.trim.skríning, NT 2,2	cvś	46,XX - nízka kvalita metafáz	rsa 15q11.2(TUBGCP5, NIPA1)x1 mat	451,887 kb	arr[GRCh37]15q11.2(22,765,628-23,217,514)x1mat	WHAMMP3, PDCD6IPP1, NIPA1, NIPA2, CYFIP1, TUBGCP5, ELMO2P1
					-	102,261 kb	arr[GRCh37]2q13(110,862,477_110,964,737)x3 pat	MALL, NPHP1
					-	42,421 kb	arr[GRCh37]7q36(147,970,857_148,013,277)x1 pat	CNTNAP2
					-	170,515 kb	arr[GRCh37]21q22.11q22.12(35,734,654_35,905,168)x1 pat	KCNE2, SMIM11A, SMIM34A, FAM243A, KCNE1, RCAN1
29.	13+2	Pozitívny I.trim.skríning, NT 2,6	cvś	nízky mitotický index (3 metafázy)	-	0,391 Mb	arr[GRCh37]Xq25(127,050,472_127,441,794)x0 mat	ACTRT1
30.	12+6 20+4	Stenóza aorty, NT 1,8	pv	46,XY	-	0,284 Mb	arr[GRCh37]11q22.3(102,983,567_103,268,313)x1 mat	DYNC2H1
34.	13+4	Pozitívny I.trim.skríning	cvś	46,XY	-	0,581 Mb	arr[GRCh37]Xq21.32(91,811,409_92,392,650)x2	PCDH11X
36.	-	Gemini monochooriales biamniales mortui gr. h. 35, plod B	tk	nevyšetrený - zlyhala kultivácia	rsa 19q13.43(CHMP2A)x1	-	-	CHMP2A
					rsa 20p13(SOX12)x1	-	-	SOX12
42.	13+2	Pozitívny kombinovaný skríning 1. trimestru, NT 4,1	cvś	46,XX	-	93,174kb	arr[GRCh37]2q13(110,874,326_110,967,499)x1	NPHP1, MALL

N číslo pacienta, \* nízko postavený ľavý ušný lalok, šijové presiaknutie (šírka 15 mm), patológia všetkých 4 končatín: bērec silne deformovaný a skrātený na 7 mm, noha výrazne hypoplastická - 4 prsty (ektrodaktília), v kolennom kĺbe flekčná kontraktúra, talus (členková kosť) v supinácii, NT 15, - Analýza príslušnou metódou nebola vykonaná, neznámy údaj o tt, TT týždeň tehotenstva, NT nuchálna translucencia, VVP vrodená vývojová porucha

**Tabuľka č. IV** Zistené štruktúrne aberácie u 13. plodov. Aberácie zistené cytogeneticky, časť potvrdená technikami MLPA a microarray.

N	TT	Materiál	Indikácia	Karyotyp/FISH	MLPA	Microarray	Aberácia
A1	-	pv	Pozitívny skrining v I. trimestri	46,XY,inv(10)(q2?2q2?5)mat	-	Negatívna	Inverzia
A3	10+6	cvs	Hydrops plodu, cystický útvar v brušnej dutine, NT 2,8	47,XX,+mar[2]/47,XX,+7[1]/46,XX[40]	Negatívna (P036,P245, P311,P250)	-	Marker chromozóm
A4	12+6	cvs	Susp. Cri du chat syndróm	46,XX,t(5;11)(p15.1;p15?2)mat	Negatívna (P036, P070, P245)	-	Balansovaná translokácia zdedená od matky
A5	20+0	pv	Otec dieťaťa prenášač 46,XY, inv(1)(q33.3,q44), NT 2	46,XY,inv(1)(p33q44)pat	-	-	Inverzia zdedená od otca
A6	21+5	pv	Pozitívny Triple test	46,XX,t(5;?11)(p?15;p?15)mat	Negatívna (P036, P070, ME030)	-	Balansovaná translokácia zdedená od matky
A7	-	pv	Pozitívny skrining v I. trimestri, NT 8	47,XX,+mar[2]/47,-12p,+fis(12)(q10),+fis(12)(q10)[1]/46,XX,del(12)(p10)[1]/45,X,del(12)(p10)[1],45,X[1]/chrb(5)(p?13)[1]/46,XX[26]	-	Negatívna	Nešpecifická mozaika
A8	-	pv	Matka plodu DM II. Typu	45,XX,t(13,14)(q10;q10)	-	-	Robertsonská translokácia
A9	-	cvs	Matka prenášačka 45,XX,der,t(14;21)(q10;q10)	45,XY,der(14;21)(q10;q10)mat	Negatívna (ME032)	-	Robertsonská translokácia zdedená od matky
A10	-	cvs	Pozitívny skrining v I. trimestri	46,XX,t(10,17)	-	-	Balansovaná translokácia
A11	-	pv	Pozitívny Triple test	46,XX,t(7;10)(q31.2;p?14)	-	Negatívna	Balansovaná translokácia
A12	21+3	pv	Agenéza c. callosum	46,XY,t(5;19)(q?12;p?13.2)	-	Negatívna	Balansovaná translokácia
A13	-	cvs	Pozitívny skrining v I. trimestri	46,XX	-	-	UZ vyšetrením zistený chlapec - de la Chapell syndróm
A14	-	pv	Mierna hydronefróza, otec prenášač 46,XY,t(13;20)(q32;q13.3)	46,XX,t(13,20)(q32,q13.3)pat	-	-	Balansovaná translokácia zdedená od otca

N číslo pacienta, -Analýza príslušnou metódou nebola vykonaná, neznámy údaj o tt, TT týždeň tehotenstva, DM diabetes melitus, NT nuchálna translucencia

**Tabuľka č. V** Patogénne štruktúrne chromozomálne aberácie zachytené cytogenetickou analýzou karyotypu u 9. plodov a overené metódami MLPA a microarray.

N	TT	Materiál	Indikácia	Karyotyp	MLPA	Microarray	Rozsah aberácie	OMIM Gény
A2(3)	13	pv	Polydaktýlia (6X) na HK, micromandibula, micrognatia	46,XY,del(14)(q22q23)	rsa 14q22.2(P311-A2,P424-B2)x1	arr[GRCh37] 14q22.2(52,468,517-60,202,293)x1	7,733 Mb	BMP4
A15(5)	12+2	pv	Kratšie femury, nuchálna riasa 6,20 mm, NT 4	46,XY,der(18)t(10;18)(pter+;pter-)	rsa 10p15(P036-E2,P070-B3,P311-A2,P245-B1)x3, 18p11.3(P036-E2,P070-B3,P311-A2)x1	-	3 Mb	GATA3, CELF2, ZMYND11
					rsa22q11.2(P245-B1,P250-B2,P311-A2)x3	-	11 Mb	CLTCL1, HIRA, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8, ZNF74, KLHL22, MED15, SNAP29, LZTR1
A16(8)	12+2	cvb	Prenášačstvo balansovanej chromozomálnej aberácie u otca plodu t(7,10), UZ v poriadku	46,XY,der(7)t(7;10)(q36.1;q25.1)	rsa 7q36.3(P036-E2,P070-B3)x1 pat, 10q26.3(P036-E2,P070-B3)x3 pat	arr[GRCh37] 7q36.1-q36.3(149,364,045-159,125,464)x1	9,761 Mb	VIPR2
						arr[GRCh37] 10q24.31q26.3(102,760,989-135,434,178)x3	32,673 Mb	ECHS1, PAOX
A17(12)	12+3	pv	Agenéza corpus callosum, colpocefália, mierna bilat. ventrikulomegália, 2 cievy v pupočníku	46,XY,del(18)(q21.1)	rsa 18q21.2q23(P036-E2, P070-B3, P297-C1)x1	arr[GRCh37] 18q21.1q23(47223998-78012829)x1	30,788 Mb	RBFA, TCF4, CTDP1
A18(23)	20+2	pv	inv(4) u partnera, UZ v poriadku	46,XX, rec(4)dup(4p)inv(4)(p14q33)pat	rsa 4p16.3(P070-B3, P245-B1)x3, 4q35.2(P070-B3)x1	-		PIGG/FRG1
A19(25)	-	cvb	U partnera balansovaná translokácia t(6;13)	46,XX,der(13)t(6;13)(q?24;q34)pat	rsa 6q27(P036-E2, P070-B3)x3,13q34(P036-E2,P070-B3)x1	-	100 kb	PSMB1, TBP
					13q34x1		1,3 Mb	F7, CDC16
A20(39)	-	tk	Missed abort in g.h. 7-8, garv po IVF u matky 45,XX, der(13;14)(q10,q10)	46,XY,der(13;14),+ 14 mat	rsa 14q(P036-E2, P070-B3)x3	-		CCNB1IP1, MTA1, PARP2
A21(40)	-	tk	Spont. abort 17+1, retroplacentárny hematóm, akútna deciduitis, NT 4,8	46,XY,t(16;21)(p13.2;q22.3?)	rsa 16p13.3(P036-E2, P070-B3,P245-B1)x3, 21q22.3(P036-E2,P070-B3)x1	arr[GRCh37]16p13.3p12.3 (105444-19222095)x3, 21q22.3(43592014-4808415)x1	19,116 Mb	POLR3K, CREBBP,
					21q22.3x1		4,492 Mb	PRMT2, S100B, DECR2
A22(41)	-	tk	UUT pre agenézu obličiek v 22.g.h, anhydramnion. Močový mechúr nenaplnený, v žalúdku malé množstvo tekutiny	45,XX,- 15,der(15)t(9;15)(q34;q?14)	rsa15q11.2-q13(ME028-C1)x1het	arr[GRCh37] 15q11.2q14(22765628-34498589)x1	11,732 Mb	TUBGCP5, NIPA1, MKRN3, MAGEL2, NDN, SNRPN, SNRPN, ATP10A, GABRB3, OCA2, APBA2

N číslo pacienta, TT týždeň tehotenstva, -Analýza príslušnou metódou nebola vykonaná, neznámy údaj o tt, NT nuchálna translucencia, UUT umelé ukončenie tehotenstva, HK horná končatina, UZ ultrazvuk

**Tabuľka č. VI** Zoznam všetkých odhalených patologických a vous aberácií a balansovaných aberácií v súbore analyzovaných plodov. Zaznamenaná je metóda, ktorou bola varianta zachytená a význam aberácie pre plod.

ISCN	Metóda záchytu aberácie	Význam CNV
46,XY,inv(9) rsa 22q11.(P250-B2, P311-A2)x1	MLPA	Patologické
46,XY,rsa 22q11.2(P245-B1, P250-B2,P311-A2)x1 mat	MLPA	Patologické
46,XY, rsa 16p11.2(P297-C1, P343-C3)x3 arr[GRCh37]16p11.2(29,622,813_30,165,725)x3 mat	MLPA, aCGH	Patologické
46,XY, rsa 22q11.2(P250-B2)x3, arr[GRCh37]22q11.21(18919942_21505417)x3 mat	MLPA, aCGH	Patologické
46,XY, rsa 22q11.(P250-B2, P311-B1)x3, arr[GRCh37]22q11.21(18919942_21505417)x3	MLPA, aCGH	Patologické
46,XY,arr[GRCh37]Xp22.31(6,488,721_8,097,511)x0 mat	aCGH	Patologické
46,XY,arr[GRCh37]12q24.32q24.33(126,301,886_133,777,902)x2-3[0.32] dn	aCGH	Patologické
46,XX,arr[GRCh37]2q35q36.1(221,148,359_224,433,293)x1 dn	aCGH	Patologické
46,XY,del(14)(q22q23), rsa 14q22.2(P311-A2,P424-B2)x1 46,XY,arr[GRCh37]14q22.2(52,468,517_60,202,293)x1	Karyotyp, MLPA, aCGH	Patologické
46,XY,der(18)t(10;18)(pter+;pter-) 46,XY,rsa10p15(P036,P070,P311,P245)x3;18p11.3(P070,P036,P311)x1, 22q11.2(P311,P250,P245)x3	Karyotyp, MLPA, aCGH*	Patologické
46,XY,der(7)t(7;10)(q36.1;q25.1), rsa 7q36.3(P036-E2,P070-B3)x1 pat, 10q26.3(P036-E2,P070-B3)x3 pat 46,XY,arr[GRCh37]7q36.1-q36.3(149,364,045_159,125,464)x1 10q24.31q26.3(102,760,989_135,434,178)x3	Karyotyp, MLPA, aCGH	Patologické
46,XY,del(18)(q21.1), rsa 18q21.2q23(P036-E2, P070-B3, P297-C1)x1 46,XY, arr[GRCh37] 18q21.1q23(47223998_78012829)x1	Karyotyp, MLPA, aCGH	Patologické
46,XX, rec(4)dup(4p)inv(4)(p14q33)pat rsa4p16.3(P070, P245)x3, 4q35.2(P070)x1	Karyotyp, MLPA	Patologické
46,XXder(13)t(6;13)(q?24;q34)pat. rsa6q27(P036, P070)x3;13q34(P070,P036)x1	Karyotyp, MLPA	Patologické
46,XY, der(13;14),+ 14 mat rsa14q(P036, P070)x3	Karyotyp, MLPA	Patologické
46,XY,t(16;21) (p13.2?q22.3?), rsa 16p13.3(P036-E2, P070-B3,P245-B1)x3, 21q22.3(P036-E2,P070-B3)x1 arr[GRCh37]16p13.3p12.3(105444_19222095)x3, 21q22.3(43592014_4808415)x1	Karyotyp, MLPA, aCGH	Patologické
45,XX,-15,der(15)t(9;15)(q34;q?14), rsa15q11.2-q13(ME028-C1)x1het, arr[GRCh37] 15q11.2q14(22765628_34498589)x1	Karyotyp, MLPA, aCGH	Patologické
46,XX**	Karyotyp, aCGH*	Patologické

\* microarray postnatálne

\*\* narodený chlapec

## Pokračovanie tabuľky č. VI

ISCN	Metóda záchytu aberácie	Význam CNV
46,XY,rsa 7q35(CNTNAP2)x1, arr [GRCh38]7q35(146,079,235_146,872,072)x1	MLPA, aCGH	VOUS
46,XY,rsa 13q12.11(MPHOSPH8,PSPC1,ZMYM2)x3, arr[GRCh37]13q12.11(19,972,233_20,804,712)x3 pat	MLPA, aCGH	VOUS
46,XY,arr[GRCh37]3q28(189,363,665_189,371,964)x1 mat	aCGH	VOUS
46,XY,rsa[GRCh37]17p13.3(169,259_183,588)x3 mat	MLPA	VOUS
rsa 12p13.33(KDM5A)x3 mat	MLPA	VOUS
46,XX,rsa 15q11.2(TUBGCP5,NIPA1)x1 mat 46,XX,arr[GRCh37]2q13(110,862,477_110,964,737)x3 pat, 7q36(147,970,857_148,013,277)x1 pat, 21q22.11q22.12 (35,734,654_35,905,168)x1 pat	MLPA, aCGH	VOUS
46,XY,arr[GRCh37]Xq25(127,050,472_127,441,794)x0 mat	aCGH	VOUS
46,XY,arr[GRCh37]11q22.3(102,983,567_103,268,313)x1 mat	aCGH	VOUS
46,XY,arr[GRCh37]Xq21.32(91,811,409_92,392,650)x2	aCGH	VOUS
46,rsa19q13.43(CHMP2A)x1, 20p13(SOX12)x1	MLPA	VOUS
46,XX,arr[GRCh37]2q13(110,874,326_110,967,499)x1	aCGH	VOUS
46,XY,inv(10)(q2?2q2?5)mat	Karyotyp, (aCGH neg)	VOUS
47,XX,+mar[2]/47,XX,+7[1]/46,XX[40]	Karyotyp, (MLPA neg)	VOUS
46,XX,t(5;11)(p15.1;p15?2)mat	Karyotyp, (MLPA neg)	BAL VOUS
46,XY,inv(1)(p33q44)pat	Karyotyp	VOUS
46,XX,t(5;?11)(p?15;p?15)mat	Karyotyp, (MLPA neg)	BAL VOUS
47,XX,+mar[2]/47,-12p,+fis(12)(q10),+fis(12)(q10)[1]/ 46,XX,del(12)(p10)[1]/ 45,X,del(12)(p10)[1],45,X[1]/chrb(5)(p?13)[1]/46,XX[26]	Karyotyp, (aCGH neg)	VOUS
45,XX,t(13,14)(q10;q10)	Karyotyp	BAL VOUS
45,XY,der(14;21)(q10;q10)mat	Karyotyp, (MS MLPA neg)	VOUS
46,XX,t(10,17)	Karyotyp	BAL VOUS
46,XX,t(7;10)(q31.2;p?14)	Karyotyp, (aCGH neg)	BAL VOUS
46,XY,t(5;19)(q?12;p?13.2)	Karyotyp, (aCGH neg)	BAL VOUS
46,XX,t(13,20)(q32,q13.3)pat	Karyotyp	BAL VOUS