

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Diplomová práce**

**Olomouc 2015**

**Bc. Alžbeta Chabroňová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Využití techniky MLPA v prenatální  
diagnostice chromosomálních aberací**

**Diplomová práce**

**Bc. Alžbeta Chabroňová**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2015**

**Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D.**

### **Čestné prehlásenie**

Čestne prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne, s použitím uvedenej literatúry a pod odborným dohľadom RNDr. Pavlíny Čapkovej, Ph.D.

V Olomouci dňa: .....

.....

podpis

### **Pod'akovanie**

Touto cestou by som chcela pod'akovať RNDr. Pavlíne Čapkovej, Ph.D. za cenné rady, konzultácie a odborné vedenie diplomovej práce. Ďalej by som chcela pod'akovať kolektívu Ústavu lekárskej genetiky, predovšetkým Mgr. Andrei Slávikovej za pomoc pri vypracovávaní experimentálnej časti práce.

Zároveň chcem pod'akovať vedeniu Ústavu lekárskej genetiky Fakultnej nemocnice Olomouc, že mi umožnilo vypracovať diplomovú prácu na tomto pracovisku.

## Súhrn

Prenatálna starostlivosť, ako súbor skriningových a diagnostických metód, umožňuje diagnostiku vrodených vývojových väd ešte nenarodených jedincov. Využíva pri tom široké spektrum metód. Od klasickej karyotypizácie, až po moderné molekulárne metódy založené na analýze DNA, medzi ktoré patrí aj metóda MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

Zhrnutie súčasných poznatkov týkajúcich sa chromozomálnych aberácií, ako jednej z častých príčin vrodených vývojových väd a spontánnych potratov, je náplňou teoretickej časti práce. Jej súčasťou je tiež prehľad techník využívaných na ich prenatálnu a postnatálnu detekciu.

Experimentálna časť je zameraná na zhodnotenie využiteľnosti a spoľahlivosti metódy MLPA pri detekcii chromozomálnych aberácií v prenatálnej diagnostike. V rámci 52 testovaných vzoriek DNA (izolovaných z tkaniva získaného biopsiou kože potratených plodov, z amniocytov plodovej vody, alebo choriových klkov), MLPA spoľahlivo detegovala sedem prípadov aneuploidií a tri prípady kryptických delécií. Zatiaľ čo nálezy aneuploidií sa zhodovali s výsledkom cytogenetického vyšetrenia a jedna mikrodelécia bola súčasťou karyotypizáciou identifikovanej komplexnej prestavby, dva prípady kryptických delécií MLPA detegovala u vzoriek s normálnym karyotypom. Na druhej strane MLPA nedetegovala prípady mozaik s nízkym zastúpením aberantných buniek, resp. kontaminované maternálnymi bunkami, prípad intersticiálnej delécie, triploidiu 69,XXY a pôvod marker chromozómu. Na základe týchto výsledkov možno konštatovať, že MLPA predstavuje vhodnú doplnkovú metódu klasickej karyotypizácie, schopnú rýchlo a spoľahlivo detegovať aneuploidie a submikroskopické delécie/duplikácie vybraných chromozomálnych oblastí. Má však určité detekčné limity, ktoré sú dané zastúpením aberantného klonu v prípade mozaik, neschopnosťou odhaliť zmeny mimo testované lokusy a polyploidie.

## Summary

Prenatal care as a complex of screening and diagnostic methods provides a diagnostics of congenital anomalies of even unborn children. It utilizes broad-spectrum of methods, from conventional karyotyping to modern molecular methods based on analysis of DNA. This master thesis is focused on one of those methods known as MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification).

The theoretical part of the thesis is aimed at summarizing actual knowledge about chromosomal aberrations as frequent cause of congenital anomalies and spontaneous abortions, and also about possibilities of their prenatal and postnatal diagnostics.

The experimental part is focused on evaluation of MLPA efficiency and reliability in detection of chromosomal aberrations in prenatal diagnostics. From 52 samples of DNA (isolated from skin biopsy tissue of aborted fetuses, from amniocytes or chorionic villus), MLPA detected seven cases of aneuploidy and three cases of cryptic deletions. While diagnosis of aneuploidies were in conformance with cytogenetic examination results and one microdeletion was part of a complex chromosomal rearrangement identified by karyotyping, two cases of cryptic deletions MLPA detected in samples with normal karyotype. On the other side, MLPA didn't detect cases of mosaicism with low fraction of abnormal cells or contaminated by maternal cells, the case of interstitial deletion, triploidy 69,XXY and the case of marker chromosome identification. Based on these results it is possible to establish, that MLPA is an appropriate supporting method to conventional karyotyping, capable of rapid and reliable detection of aneuploidies and submicroscopic deletions/duplications of selected chromosomal regions. But it has some detection limits, that are depend on the fraction of abnormal cells in mosaicism cases, inability to detect rearrangements outside of tested locuses and polyploidy cases.

## Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	10
<b>2 Ciele práce</b> .....	11
<b>3 Literárny prehľad</b> .....	12
3.1 História .....	13
3.2 Fyziologický karyotyp človeka .....	13
3.3 Význam cytogenetiky v prenatálnej diagnostike .....	14
3.4 Chromozomálne aberácie .....	16
3.4.1 Štruktúrne aberácie .....	17
3.4.1.1 Balancované štruktúrne aberácie .....	18
3.4.1.2 Nebalancované štruktúrne aberácie .....	20
3.4.1.2.1 Submikroskopické delécie, duplikácie.....	21
3.4.1.2.2 Marker chromozómy .....	22
3.4.2 Numerické aberácie .....	23
3.4.2.1 Polyploidie .....	23
3.4.2.2 Aneuploidie .....	24
3.5 Diagnostické metódy .....	25
3.5.1 Karyotypizácia .....	26
3.5.2 Fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia .....	27
3.5.3 Komparatívna genómová hybridizácia .....	27

3.5.4 Komparatívna genómová hybridizácia na čipe .....	28
3.5.5 QF-PCR .....	30
3.5.6 MLPA .....	30
3.5.7 NGS technológie .....	33
<b>4 Materiál .....</b>	<b>34</b>
4.1 Biologický materiál .....	34
4.2 Chemikálie a roztoky .....	35
4.3 Laboratórne vybavenie, prístroje .....	36
4.4 Software .....	36
<b>5 Metodika .....</b>	<b>37</b>
5.1 MLPA .....	37
5.2 Fragmentačná analýza kapilárnou elektroforézou .....	44
5.3 Analýza dát softwarom Coffalyser.Net.....	46
<b>6 Výsledky .....</b>	<b>50</b>
6.1 MLPA analýza vzoriek DNA plodov s neúspešnou kultiváciou.....	50
6.2 MLPA analýza vzoriek DNA plodov s cytogenetickým nálezom.....	50
6.3 MLPA analýza vzoriek DNA bez cytogenetického nálezu .....	60
<b>7 Diskusia .....</b>	<b>64</b>
<b>8 Záver .....</b>	<b>67</b>
<b>9 Zoznam použitej literatúry .....</b>	<b>69</b>



## Zoznam skratiek

<b>AC</b>	amniocentéza
<b>AFP</b>	alfa-fetoproteín
<b>BAC</b>	umelý bakteriálny chromozóm ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )
<b>bp</b>	pár bazí ( <i>base-pair</i> )
<b>CENP</b>	centromerický proteín
<b>CGH</b>	komparatívna genómová hybridizácia ( <i>comparative genomic hybridization</i> )
<b>CMA</b>	chromozomálna mikročipová analýza ( <i>chromosomal microarray analysis</i> )
<b>CNV</b>	<i>copy number variation</i>
<b>CVS</b>	odber choriových klkov ( <i>chorionic villus sampling</i> )
<b>DD</b>	denaturácia DNA ( <i>DNA denaturation</i> )
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DQ</b>	<i>dosage quotient</i>
<b>DUS</b>	dopplerovská ultrasonografia
<b>FISH</b>	fluorescenčná <i>in situ</i> hybridizácia ( <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
<b>FMRS</b>	<i>fragment MLPA reaction score</i>
<b>FN</b>	fakultná nemocnica
<b>FRSS</b>	<i>fragment run separation score</i>
<b>hCG</b>	ľudský choriový gonadotropín ( <i>human chorionic gonadotropin</i> )
<b>HR-CGH</b>	vysokorozlišovacia komparatívna genómová hybridizácia ( <i>high resolution comparative genomic hybridization</i> )
<b>IUGR</b>	intrauterinná rastová retardácia ( <i>intrauterine growth restriction</i> )
<b>IVF</b>	in vitro fertilizácia
<b>kb</b>	kilobáza ( <i>kilobase</i> )
<b>LCR</b>	<i>low copy repeats</i>
<b>LHS</b>	<i>left hybridising sequence</i>
<b>LPO</b>	<i>left probe oligonucleotide</i>
<b>M-FISH</b>	<i>multiplex fluorescence in situ hybridization</i>
<b>Mb</b>	megabáza ( <i>megabase</i> )
<b>MLPA</b>	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
<b>NAHR</b>	nealelická homologická rekombinácia ( <i>non-allelic homologous</i>

	<i>recombination)</i>
<b>NGS</b>	<i>next-generation sequencing</i>
<b>NHEJ</b>	nehomologické spojovanie koncov ( <i>nonhomologous end joining</i> )
<b>NIPT</b>	neinvazívne prenatálne testovanie ( <i>non-invasive prenatal testing</i> )
<b>NT</b>	nuchálna translucencia
<b>nt</b>	nukleotid
<b>p</b>	krátke ramienko chromozómu
<b>PAC</b>	<i>P1-derived artificial chromosome</i>
<b>PAPP-A</b>	<i>pregnancy-associated plasma protein A</i>
<b>PCR</b>	polymerázová reťazová reakcia ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>q</b>	dlhé ramienko chromozómu
<b>QF-PCR</b>	kvantitatívna fluorescenčná polymerázová reťazová reakcia ( <i>quantitative fluorescence-polymerase chain reaction</i> )
<b>RAD</b>	rýchla detekcia aneuploidíí ( <i>rapid aneuploidy detection</i> )
<b>RFU</b>	relatívna fluorescenčná jednotka ( <i>relative fluorescence unit</i> )
<b>RHS</b>	<i>right hybridising sequence</i>
<b>RPO</b>	<i>right probe oligonucleotide</i>
<b>SKY</b>	spektrálna karyotypizácia ( <i>spectral karyotyping</i> )
<b>SNP</b>	<i>single nucleotide polymorphism</i>
<b>SSCP</b>	<i>single-strand chain polymorphism</i>
<b>sSMCs</b>	malé nadpočetné marker chromozómy ( <i>small supernumerary marker chromosomes</i> )
<b>STR</b>	<i>short tandem repeats</i>
<b>STS</b>	<i>sequence tagged site</i>
<b>uE</b>	nekonjugovaný estriol ( <i>unconjugated estriol</i> )
<b>UPT</b>	umelé prerušenie tehotenstva
<b>UZ</b>	ultrazvuk
<b>ÚLG</b>	ústav lekárskej genetiky
<b>VOUS</b>	<i>variants of unknown/uncertain significance</i>
<b>VVV</b>	vrodené vývojové vady

## 1 Úvod

Chromozomálne aberácie sú vrodené alebo v priebehu života získané štruktúrne, či numerické odchýlky fyziologického karyotypu jedinca. Ich dopad na fenotyp nositeľa vo všeobecnosti závisí na rozsahu (zmeny počtu celej haploidnej sady chromozómov, zmeny počtu jednotlivých chromozómov, delécie/duplikácie celých chromozomálnych segmentov, zmeny submikroskopických rozmerov) a v prípade štruktúrnych aberácií, tiež na lokalizácii (esenciálne gény, regulačné oblasti a pozičný efekt).

Vrodené chromozomálne aberácie sú častou príčinou vrodených vývojových väd (ďalej VVV). Tie nie sú vždy zlúčiteľné s prežitím embrya/plodu a vedú k spontánnym potratom alebo mŕtvonarodeným plodom. Nositelia VVV kompatibilných s postnatálnym prežitím vykazujú rôzne závažné klinické príznaky.

Skorá detekcia VVV podmienených chromozomálnymi aberáciami je jedným z hlavných cieľov prenatalnej diagnostiky. Zlatý štandard diagnostiky dodnes predstavuje zostavenie karyotypu jedinca, teda karyotypizácia. Jej detekčný limit je však obmedzený a nedokáže detegovať submikroskopické zmeny chromozómov, ktoré sú tiež často asociované so závažnými fenotypovými zmenami, najmä ak sú lokalizované v subtelomerických oblastiach bohatých na gény. Takéto subtílné zmeny možno detegovať pomocou molekulárnych metód založených na analýze DNA, medzi ktoré patrí napríklad array CGH (Comparative Genomic Hybridization) alebo MLPA.

## 2 Ciele práce

Cieľom teoretickej časti (kapitola Literárny prehľad) bolo vypracovanie literárnej rešerše na tému chromozomálne aberácie a ich diagnostika v prenatalnej praxi.

Cieľom experimentálnej časti práce (kapitoly Materiál, Metodika, Výsledky, Diskusia, Záver) bolo zhodnotenie využiteľnosti a spoľahlivosti metódy MLPA v prenatalnej diagnostike chromozomálnych aberácií u troch skupín vzoriek DNA: (I) plodov bez výsledku karyotypizácie z dôvodu zlyhania kultivácie fetálnych buniek, (II) plodov s patologickým cytogenetickým nálezom identifikovaným karyotypizáciou, (III) plodov s normálnym karyotypom. Výsledky experimentálnej časti boli porovnané s údajmi v literatúre.

## 3 Literárny prehľad

### 3.1 História

Už v polovici 19. storočia vedci chápali, že nové bunky vznikajú delením už existujúcich buniek a tušili tiež, že dedičná informácia je lokalizovaná v bunkovom jadre. Fyzická povaha genetického materiálu však zostávala neznáma. Rozhodujúci objav priniesli pozorovania nemeckého biológa Walthera Flemminga v rokoch 1878 až 1882. Flemming objavil v jadre hmotu farbitelnú bazofilným farbivom anilínom, ktorú nazval chromatín (z gréckeho spojenia farbitelný materiál). Pri bližšom skúmaní pozoroval, že v priebehu delenia jadra sa chromatín formuje do nitkovitých teliesok, podľa ktorých pomenoval toto delenie mitóza (z gréckeho slova niť alebo vlákno). Na základe ďalších pozorovaní buniek v rozličných štádiách mitózy predpovedal postupnosť pohybov a distribúciu chromozómov v priebehu mitózy (Flemming, 1878; Flemming, 1882). Samotný termín chromozóm bol použitý až o pár rokov neskôr a to nemeckým biológom Heinrichom W. G. von Waldeyerom (Waldeyer, 1888).

Začiatkom 20. storočia došlo k výraznému rozvoju mikroskopických a cytologických techník, čo umožnilo vedcom detailnejšie skúmať priebeh bunkového delenia. Na základe výsledkov svojich pozorovaní Sutton a Boveri nezávisle na sebe dospeli k záveru, že Mendelove dedičné faktory (teda gény) sú umiestnené na chromozómoch a formulovali tzv. chromozómovú teóriu dedičnosti (Boveri, 1904; Sutton, 1903). Definitívny dôkaz, potvrdzujúci správnosť chromozómovej teórie, poskytol až americký genetik T. H. Morgan pri svojom výskume dedičnosti znakov viazaných na pohlavie u drozofily (Morgan, 1910).

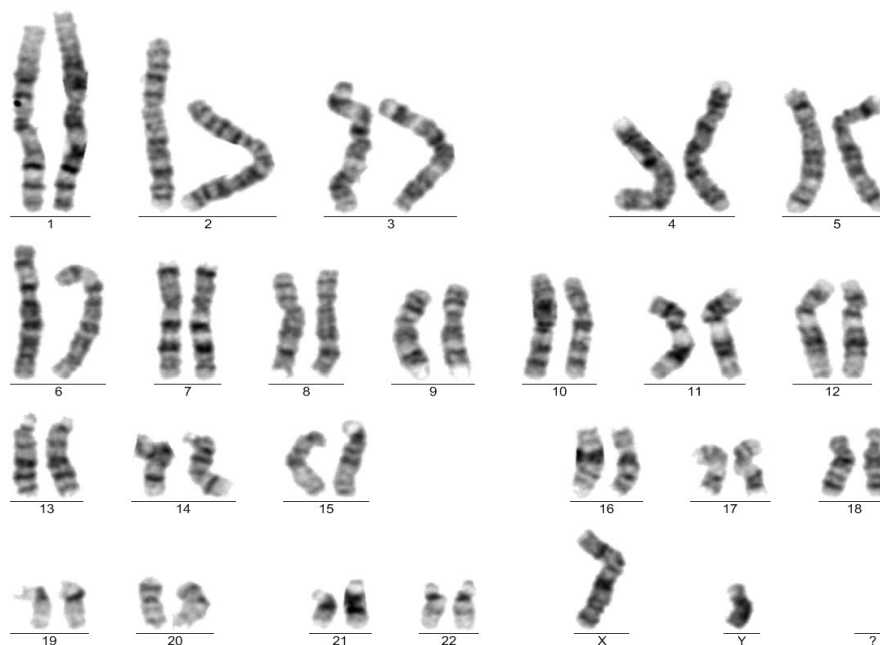
Eukaryotické chromozómy sú vláknité štruktúry tvorené molekulou DNA, ktorá interaguje s proteínmi histónovej a nehistónovej povahy. Vytvárajú tak nukleoproteínový komplex, ktorý v 18. storočí pozoroval Flemming a pomenoval ho chromatín. Samotnú DNA prvý krát izoloval F. Miescher už v roku 1869, avšak jej úloha nositeľky genetickej informácie bola objasnená až v roku 1944 sériou transformačných pokusov Averyho, MacClouda a McCarthyho (Avery *et al.*, 1944). Štruktúra DNA bola popísaná v roku 1953 Watsonom a Crickom, výrazne k tomu prispeli pozorovania Franklinovej, Goslinga a Wilkinsa (Watson *et Crick*, 1953).

V 20. storočí nastal rýchly a mohutný rozvoj cytogenetických a molekulárnych techník, ktoré umožnili rýchlu a spoľahlivú detekciu chromozomálnych aberácií či už v rámci prenatálnej starostlivosti, alebo pre účely diagnostiky a monitorovania liečby určitých nádorových ochorení.

### 3.2 Fyziologický karyotyp človeka

Fyziologický karyotyp somatickej bunky človeka tvorí 46 chromozómov (Tijo *et* Levan, 1956). Tie tvoria 23 homologických párov, z toho 22 párov predstavujú autozómy a jeden pár gonozómy, teda pohlavné chromozómy. U žien je konštitúcia pohlavných chromozómov XX, u mužov XY. Za patologických podmienok môže byť počet či štruktúra chromozómov abnormálna (kapitola 3.4 Chromozomálne aberácie).

Chromozómy ľudského karyotypu sú klasifikované na základe ich veľkosti, tvaru, ktorý je daný umiestnením centroméry, prípadne prítomnosťou sekundárnej konstriktie, a tzv. banding patternu. Takéto systematické usporiadanie chromozómov bunky jedinca sa označuje karyotyp (Obr. 1).



Obrázok 1: Fyziologický karyotyp muža (46, XY)

(Foto poskytl RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D., Ústav lekárskej genetiky FN Olomouc).

### 3.3 Význam cytogenetiky v prenatalnej diagnostike

Základy klinickej cytogenetiky položil Lejeuene, ktorý študoval fibroblastové kultúry pacientov s Downovým syndrómom a v roku 1959 spolu s kolegami dokázal v ich bunkách prítomnosť extra chromozómu (Lejeuene *et al.*, 1959). Trizómia 21 chromozómu sa tak stala prvým popísaným ľudským chromozomálnym syndrómom. Po ňom nasledoval Turnerov syndróm (45,X) (Ford *et al.*, 1959) či Klinefelterov syndróm (47,XXY) (Jacobs *et Strong*, 1959).

Cytogenetické vyšetrenie predstavuje dodnes zlatý štandard prenatalnej diagnostiky. Stanovenie karyotypu plodu umožňuje odhalenie mnohých vrodených chromozómových odchýlok a to ako numerických, tak štruktúrnych. Indikácie pre prenatalnú cytogenetickú diagnostiku sú zhrnuté v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Indikácie pre prenatalnú cytogenetickú diagnostiku  
(upravené podľa Hájek *et al.*, 2000)

Indikácia
Vek matky nad 35 rokov
Nosičstvo balancovanej chromozomálnej prestavby u jedného z rodičov
Chromozómálny mozaicizmus (chromozomálna aberácia v mozaike u jedného z rodičov)
Pozitívny výsledok biochemického skríningu tehotnej ženy v I. a II. trimestri, zvýšenie nuchálnej translucencie (skratka NT) v 10. - 14. týždni gravidity
Patologické nálezy ultrazvukového vyšetrenia v I. - III. trimestri
Patologický priebeh gravidity (gestóza, intrauterinná rastová retardácia - skratka IUGR )
Pôrod dieťaťa s početnými VVV v predchádzajúcej gravidite
Expozícia jedného z rodičov mutagénnym vplyvom

Cieľom prenatalnej cytogenetickej diagnostiky je vyšetrenie karyotypu:

- I. živých plodov s podozrením na prítomnosť vrodenej vývojovej vady podmienenej chromozomálnou aberáciou. Zvýšené riziko VVV sa usudzuje na základe pozitívnych výsledkov skríninových vyšetrení, medzi ktoré patrí:

- ultrazvukové vyšetrenie: abnormálny - spomalený, oneskorený či disproportčný - rast, zvýšené či znížené množstvo plodovej vody, znížená pohyblivosť plodu, morfológické, alebo fyziologické abnormality (anomálie vnútorných orgánov, vrodené vývojové vady srdca a iné) (Nyberg *et Souter*, 2001; Ship *et Benacerraf*, 2002; Stojilkovic-Mikic *et Rodech*, 2003).
- vyšetrenie biochemických markerov v sére matky: skrining v I. trimestri gravidity – PAPP-A (Pregnancy-Associated Plasma Protein A), hCG (ľudský choriový gonadotropin) a skrining v II. trimestri gravidity – AFP (alfa-fetoproteín), hCG, uE (nekonjugovaný estriol) (Huang *et al.*, 2005; McDuffie *et al.*, 1996; Stojilkovic-Mikic *et Rodech*, 2003).

Vyšetrenie je zamerané na detekciu najčastejších aneuploidií (chromozómy 13, 18, 21 a pohlavné chromozómy), marker chromozómov a štruktúrnych aberácií. Po diagnostickom vyšetrení nasleduje porada s lekárskeym genetikom, ktorý stanoví diagnózu a prognózu pre plod i matku a predikuje riziko opakovania daného stavu. Následne môžu byť prijaté špecifické opatrenia týkajúce sa priebehu tehotenstva či pôrodu. Celková škála klinických dopadov chromozomálnych aberácií na jedinca/plod je veľmi široká a závislá na konkrétnom prípade, rozsahu aberácie, chromozómov či lokusoch, ktorých sa týka. V prípade nepriaznivej prognózy, najčastejšie z dôvodu prítomnosti VVV nezlúčiteľnej s postnatálnym prežitím plodu, môže tehotná žena na vlastnú žiadosť podstúpiť umelé prerušenie tehotenstva.

- II. spontánne potratených plodov. V tomto prípade je prvoradé odhalenie príčiny potratu, aby následne mohlo byť predikované riziko jeho budúceho opakovania. V 50 – 70 % prípadov sú príčinou spontánnych potratov práve chromozomálne odchýlky embryí. Z nich sú to najčastejšie numerické odchýlky (95 % prípadov). Najčastejšie sa jedná o trizómie (60 %), po nich nasledujú polyploidie a monozómia X (Fritz *et al.*, 2001; Kalousek *et al.*, 1993; Rai *et Regan*, 2006; Stirrat, 1990).

Potraty (aborty) postihujú až 15 % klinicky spozorovaných tehotenstiev a radia sa tak k najčastejším komplikáciám tehotných žien. Objavujú sa najmä v priebehu prvého trimestra. Rozdeľujeme ich na sporadické a opakované (tri a viac po sebe nasledujúcich potratov). U približne 4 % párov, trpiacich opakovanými potratmi,



cytogenetické vyšetrenie partnerov odhalí, že príčinou je to, že jeden z nich je nositeľom balancovanej reciprokej translokácie alebo Robertsonovej translokácie. Takýto jedinec je fenotypovo normálny, avšak 50 – 70 % jeho gamét je z dôvodu abnormálnej segregácie v priebehu meiózy nebalancovaných (Clifford *et al.*, 1994; Munne *et al.*, 2000).

III. mŕtvonarodených plodov. Podobne ako u spontánnych potratov aj v prípade mŕtvonarodených plodov je hlavným cieľom cytogenetického vyšetrenia zistiť či bola dôvodom chromozomálna aberácia a ak áno, čo najpresnejšie odhadnúť riziko opakovania, prípadne dôvod vzniku.

### 3.4 Chromozomálne aberácie

Termínom chromozomálne aberácie označujeme vrodené alebo v priebehu života získané odchýlky fyziologického karyotypu. Týmito odchýlkami môžu byť zmeny v štruktúre alebo počte chromozómov. V rámci vrodených chromozomálnych aberácií rozlišujeme:

- konštitučné aberácie - aberáciu nesú všetky bunky plodu/pacienta. Vznikajú, ak je jedna z gamét, ktorá dá vzniknúť zygotu aberantná, prípadne, ak dôjde k chybe v priebehu prvého postfertilizačného mitotického delenia zygoty (Shaffer *et al.*, 2000).
- mozaiky - vznikajú v dôsledku chyby v priebehu neskorších mitotických delení a aberáciu nesie len populácia buniek odvodená od bunky, u ktorej aberácia vznikla. Jedinca, u ktorého sú prítomné dve, prípadne viac bunkových línií líšiacich sa karyotypom a pochádzajúcich z jednej zygoty, potom označujeme pojmom chromozomálna mozaika (Wegner *et al.*, 2009). Pomer bunkových línií závisí na tom, kedy v priebehu delenia zygoty došlo k danej mitotickej chybe a tiež na životaschopnosti buniek s abnormálnym karyotypom.
- chiméry - u jedinca sú prítomné dve bunkové línie s odlišným karyotypom, avšak na rozdiel od mozaiky, každá z línií pochádza zo samostatnej zygoty a k ich splynutiu došlo až sekundárne (Van de Laar *et al.*, 2002).

V praxi je veľmi zložitá detegovať a najmä rozlíšiť mozaiky od chimér, preto bol navrhnutý spoločný termín mixoploidia, zastrešujúci oba prípady. Je možné ho použiť kedykoľvek v prípade, že u jedinca sú detegované dve alebo viac odlišných bunkových línií a to nezávisle na ich pôvode (Wegner *et al.*, 2009). Vo väčšine prípadov pritom platí, že u mixoploidných jedincov sú klinické príznaky slabšie, než je tomu u konštitučných chromozomálnych aberácií.

Technika detekcie chromozomálnych aberácií závisí na ich veľkosti. Numerické aberácie a rozsiahlejšie štruktúrne aberácie možno detegovať klasickými cytogenetickými prúžkovacími technikami, subtílnjšie zmeny potom modernejšími a citlivejšími molekulárnocytogenetickými technikami ako sú FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), CGH, alebo technikami DNA analýzy: array CGH, MLPA a ďalšími. Prehľad a vysvetlenie týchto techník je náplňou nasledujúcej kapitoly.

### 3.4.1 Štruktúrne aberácie

Štruktúrnymi aberáciami označujeme prípady, kedy došlo k zmene štruktúry jedného alebo viacerých chromozómov. Konkrétne ide o delécie, duplikácie, inverzie alebo translokácie. Rozdeľujeme ich na nebalancované a balancované, podľa toho či pri nich dochádza, alebo nedochádza k stratám, či prírastkom genetického materiálu. Vznikajú buď *de novo*, alebo sú dedené po rodičoch.

Z hľadiska klinických príznakov majú pre svojho nositeľa oveľa závažnejší dopad nebalancované aberácie (delécie, duplikácie, inverzie). Balancované aberácie (translokácie a inverzie) vo väčšine prípadov nie sú asociované so závažnými klinickými príznakmi a to najmä vtedy, ak ich jedinec zdedil po svojom fenotypovo normálnom rodičovi (Park *et al.*, 2003). U *de novo* vzniknutých balancovaných aberácií je riziko fenotypového prejavu vyššie, avšak presnejší odhad tohto rizika je problematický. Vo všeobecnosti sa odhaduje na 3,7 – 10 % (Van Dyke *et al.*, 1983; Wassman *et al.*, 1989). V prenatalnej diagnostike sú balancované zmeny plodu detegované často náhodne - pôvodná indikácia pre prenatalne vyšetrenie bola založená na inom riziku pre plod (napr. prítomnosti aneuploidie na základe biochemického skríningu u tehotnej ženy).

### 3.4.1.1 Balancované štruktúrne aberácie

K balancovaným štruktúrnym aberáciám patria balancované translokácie a inverzie. Translokáciou označujeme premiestnenie či výmenu segmentov medzi dvoma, alebo viacerými nehomologickými chromozómami, ako dôsledok zlomov týchto chromozómov. U ľudí rozoznávame dva základné typy translokácií: reciprokú a Robertsonovskú.

- Reciproká translokácia je proces vzájomnej výmeny dvoch chromozomálnych segmentov. Na každom zo zúčastnených chromozómov dôjde k zlomu a segmenty sa vymenia, pričom nedochádza k strate žiadneho genetického materiálu. Môže však dôjsť k narušeniu morfológie zúčastnených chromozómov, čo sa prejaví problémami pri ich párovaní v priebehu meiózy. Jedinci s reciprokou translokáciou môžu mať problémy s reprodukciou, keďže produkujú parciálne trizomické alebo monozomické gaméty. Okrem toho sú ale obvykle bez príznakov (Shaffer *et* Lupski, 2000).
- Pri Robertsonovskej translokácii dochádza k centrickej fúzii dlhých ramien dvoch akrocentrických chromozómov, pri súčasnej strate oboch krátkych ramien. Počet chromozómov jedinca sa tak zníži o jeden. V závislosti na pozícii zlomov môže byť výsledný fúzny chromozóm monocentrický alebo dicentrický. Počas meiotického delenia potom dochádza k problémom párovania homologických chromozómov. Ich nositelia produkujú istý počet monozomických a trizomických gamét a môžu tak plodiť aneuploidné potomstvo.

Inverzie sú výsledkom dvoch zlomov na tom istom chromozóme, prevrátenia segmentu o  $180^\circ$  a následného znovuspojenia chromozómu. Výsledkom je zmena poradia génov daného chromozomálneho segmentu. Rozlišujeme inverzie pericentrické a paracentrické. V prípade pericentrických inverzií invertovaný segment obsahuje centroméru. V dôsledku toho nielenže dochádza k zmene tzv. banding patternu, ale často tiež k zmene tvaru chromozómu. U paracentrických inverzií centroméra nie je súčasťou invertovaného segmentu a tvar chromozómu zostáva zachovaný. Podobne ako u translokácií, ani inverzie nie sú asociované s výraznými fenotypovými prejavmi, výnimkou sú reprodukčné problémy v dôsledku problémov pri párovaní homologických chromozómov a rekombinácii (Kaiser, 1988; Madan,

1988).

Balancované štruktúrne aberácie patria k najčastejšie sa vyskytujúcim genetickým abnormalitám u ľudí. Odhaduje sa, že 0,52 % populácie je nositeľom balancovanej translokácie alebo inverzie (Jacobs *et al.*, 1992). Vo väčšine prípadov nespôsobujú poruchy fenotypu, ostávajú nediagnostikované a môžu byť prenášané na potomstvo. Problémom u nositeľov týchto bezpríznakových balancovaných štruktúrnych prestavieb je riziko produkcie nebalancovaných alebo aneuploidných gamét v dôsledku abnormálneho párovania a segregácie chromozómov v profáze prvého meiotického delenia. V mnohých prípadoch sú tak nositelia odhalení až dodatočne pri ich cytogenetickom vyšetrení, doporučenom na základe dlhodobých problémov dvojice s počatím, po prekonaní viacnásobných spontánnych potratov alebo po splodení postihnutého potomstva (Gorski *et al.*, 1986; Patsalis *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 1985).

Incidencia *de novo* vzniknutých balancovaných recipročných translokácií je 1/2000, u Robertsonovských translokácií 1/10000. V takýchto prípadoch je veľmi ťažké predpovedať riziko fenotypovej abnormality u nositeľa, keďže nevieme či nenastala niektorá z nasledujúcich situácií (Astbury *et al.*, 2004):

- v mieste zlomov na chromozómoch došlo k submikroskopickým mikrodélciám či mikroduplicáciám (Kumar *et al.*, 1998).
- vplyvom zlomu došlo k narušeniu štruktúry esenciálneho génu alebo jeho regulačných oblastí, čo viedlo k tomu, že génový produkt alebo úroveň jeho expresie bola narušená.
- gény na translokovanom či invertovanom segmente sa dostali pod kontrolu iných regulačných oblastí, čím sa pozmenila miera ich expresie. Tento jav sa označuje pozičný efekt (Duba *et al.*, 2002).

Na základe štatistických údajov bolo vypočítané, že riziko fenotypovej abnormality u *de novo* reciprokej translokácie je 6-7 % a u *de novo* Robertsonovskej translokácie 3,7 % (Van Dyke *et al.*, 1983; Warburton, 1991; Wassman *et al.*, 1989). Samotné fenotypové prejavy a ich rozsah sú veľmi rôznorodé a to v závislosti na tom, o aké gény jedinec prišiel a/alebo štruktúra či expresia ktorých génov bola narušená.

### 3.4.1.2 Nebalancované štruktúrne aberácie

U nebalancovaných aberácií dochádza k stratám (parciálna monozómia), alebo prírastkom (parciálna trizómia) genetického materiálu a ich nositelia preto vykazujú závažné klinické príznaky. Vznikajú buď *de novo*, najčastejšie mechanizmom nealelickej homologickej rekombinácie – NAHR (Non-Allelic Homologous Recombination), prípadne mechanizmom nehomologického spojovania koncov - NHEJ (Nonhomologous End Joining), alebo sú výsledkom segregácie vyváženej translokácie v priebehu meiotického delenia u rodiča-nosiča (Shaw *et Lupski*, 2004). Súhrnne nebalancované aberácie označujeme skratkou CNV (Copy Number Variation) (Iafate *et al.*, 2004).

Delécie poznáme terminálne a intersticiálne. Pri terminálnych deléciách dochádza v dôsledku jediného zlomu k strate konca chromozómu. Intersticiálne delécie sú výsledkom dvoch zlomov na tom istom chromozomálnom ramene a následnej straty intersticiálneho segmentu.

Duplikácie rozdeľujeme na priame a invertované. U priamych si duplikovaný segment zachováva svoju orientáciu, v prípade invertovaných duplikácií je segment umiestnený opačne.

Ich rozsah je variabilný, od submikroskopických (kryptických), až po delécie a duplikácie detegovateľné klasickou cytogenetickou metódou prúžkovania. Všeobecne pritom platí, že duplikácie vyvolávajú v porovnaní s deléciami o niečo jemnejšie klinické príznaky, no aj ony môžu byť asociované s určitými fenotypovými abnormalitami a syndrómami (Shaffer *et Lupski*, 2000).

Klasická karyotypizácia umožňuje detekciu iba väčších aberácií – približne 10 Mb v závislosti na kvalite preparátu a polohe deletovaného/duplikovaného segmentu, zatiaľ čo submikroskopické aberácie je možné detegovať iba za pomoci citlivejších, vysoko-rozlišovacích techník ako je napríklad FISH, MLPA alebo array CGH (Monfort *et al.*, 2006; Northrop *et al.*, 2005; Patsalis *et al.*, 2004).

### 3.4.1.2.1 Submikroskopické delécie, duplikácie

Najčastejším mechanizmom *de novo* tvorby mikrodelerií/mikroduplikácií (rozsah pod 5 Mb) je nealelická homologická rekombinácia (ďalej len NAHR) medzi LCR oblasťami (Low Copy Repeats) (Shaw *et Lupski*, 2004). LCR oblasti, nazývané tiež segmentálne duplikácie alebo duplikony, sú dlhé 10 – 500 kb a navzájom sú viac než z 95 % identické. Môžu ich tvoriť gény, génové fragmenty či opakujúce sa génové klastre. V rámci genómu sú distribuované nerovnomerne, s najvyšším percentom výskytu v subtelomerických oblastiach. NAHR môže prebehnúť medzi homologickými chromozómami, vtedy hovoríme o interchromozomálnej rekombinácii, alebo sesterskými chromatidami chromozómu, vtedy ide o intrachromozomálnu rekombináciu (Stankiewicz *et Lupski*, 2002). Ďalším pomerne častým mechanizmom vzniku kryptických CNV je chyba meiotickej segregácie chromozómov u nositeľov balancovaných translokácií, dôsledkom ktorej, fenotypovo normálny jedinec produkuje gaméty s deléciou či duplikáciou vybranej oblasti.

Závažné klinické príznaky vyvolávajú najmä kryptické aberácie v subtelomerických oblastiach, ktoré sú bohaté na gény (Saccone *et al.*, 1992). Frekvencia výskytu subtelomerických mikrodelerií u jednotlivých chromozómov nie je rovnomerná. Niektoré chromozómy sú na prestavby náchylnejšie, než iné (Tab. 2).

Tabuľka 2: Frekvencia výskytu subtelomerických kryptických delécií jednotlivých chromozómov (upravené podľa de Vries *et al.*, 2003)

Počet zaznamenaných prípadov	Telomérová oblasť
> 50	4p, 5p, 9p, 16p, 17p
11 - 50	1p, 2q, 22q
2 - 10	1q, 2p*, 3p*, 4q, 5q, 6q, 7q, 8p, 9q, 10p, 10 q, 11q, 12p, 13q, 14q, 18q, 20p*
1	3q, 6p, 7p, 11p, 16q, 17q
0	8q, 12q, 15q, 18p, 19p, 19q, 20q, 21q
* zaznamenaný viac ako jeden prípad, ale v rámci jednej rodiny	

Variabilita klinických prejavov mikrodélií je veľmi široká a závisí najmä na ich rozsahu a polohe. Medzi najrozšírenejšie príznaky patrí: mentálna, motorická retardácia, rozmanité dysmorfie, vrodené vady srdca a iných orgánov či celých orgánových sústav. Niektoré kryptické delécie sú spojené so špecifickými fenotypovými prejavmi. Príkladom je Cri du Chat syndróm, inak syndróm mačacieho plaču (Lejeune *et al.*, 1964), Duchennova muskulárna dystrofia (Boyd *et al.*, 1988), WAGR syndróm (Nanclares *et al.*, 2003), DiGeorgov syndróm (DiGeorge, 1968). V poslednej dobe výrazne vzrástol počet detekcií mikroduplicácií asociovaných s idiopatickou mentálnou retardáciou. Súvisí to s rozvojom moderných molekulárnych metód schopných detegovať takéto malé zmeny.

#### 3.4.1.2.2 Marker chromozómy

Samostatnou kategóriou nebalancovaných chromozomálnych aberácií sú tzv. marker chromozómy, ktoré definujeme ako malé, nadpočetné chromozómy neznámeho pôvodu. Vyskytujú sa priemerne u 1 z 2500 novorodencov (Buckton *et al.*, 1985; Warburton, 1991). V literatúre sa často označujú skratkou sSMCs (small Supernumery Marker Chromosomes). Marker chromozómy sú nestabilné, no môžu byť prenášané z generácie na generáciu. Vo väčšine prípadov sú tvorené heterochromatínom a nemajú na svojho nositeľa žiadny dopad (Wisniewski *et al.*, 1985). Niektoré z nich ale obsahujú euchromatín, čo vedie k parciálnej trizómii daného chromozomálneho úseku (Gravholt *et al.*, 1995). V takom prípade vzniká riziko, že nositeľ bude vykazovať abnormálny fenotyp (Buckton *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 1997). Preto ak prenatalne diagnostické vyšetrenie odhalí, že plod nesie jeden, prípadne viac marker chromozómov, je odhad rizika klinického dopadu veľmi problematický. Odporúča sa previesť cytogenetické vyšetrenie rodičov, ktoré odhalí či plod nezdedil marker chromozóm po jednom z nich. V takom prípade ak je rodič fenotypovo normálny, je veľká pravdepodobnosť, že dieťa bude takisto bez príznakov. Oproti tomu, riziko abnormality v prípade *de novo* vzniknutého marker chromozómu sa pohybuje v rozmedzí 10,9 – 14,7 % (Warburton, 1991). Miera fenotypových prejavov sa potom predikuje na základe viacerých faktorov. V prvom rade na základe zloženia marker chromozómu (heterochromatín/euchromatín), ďalej na základe veľkosti, pôvodu, prípadne počtu marker chromozómov u probanda (Cheung *et al.*, 1990; Maurer *et al.*, 2001). Informácie o zložení a pôvode získavame pomocou moderných molekulárnych techník, ako sú napríklad FISH alebo MLPA.

Práve MLPA v posledných rokoch nachádza široké uplatnenie pri štúdiu marker chromozómov, pretože v porovnaní s FISH, predstavuje lacnejšiu, jednoduchšiu a rýchlejšiu metódu identifikácie euchromatínových a heterochromatínových marker chromozómov. Euchromatínové marker chromozómy zachytené MLPA skrútingom, sú potom ďalej vyšetrované pomocou cielených FISH analýz alebo mikroarrayí, ktoré odhalia ich chromozomálny pôvod a určia miesta zlomov (Heppell-Parton *et Water*, 1991; van Opstal *et al.*, 2011).

### 3.4.2 Numerické aberácie

V prenatalnej diagnostike sa najčastejšie stretávame s numerickými aberáciami, teda polyploidiami či aneuploidiami. Vo väčšine prípadov sú numerické aberácie neživotné a končia potratom plodu v skorých štádiách tehotenstva (Rai *et Regan*, 2006). Životné sú iba aneuploidie chromozómov 13, 18, 21 a gonozómov. Aj tie však u svojich nositeľov vyvolávajú závažné klinické dopady, súhrnne nazývané syndrómy. Najznámejšou a najčastejšie sa vyskytujúcou aneuploidiou je trizómia 21 chromozómu, teda Downov syndróm.

#### 3.4.2.1 Polyploidie

Termínom polyploidia označujeme stav, kedy došlo k znásobeniu haploidnej sady chromozómov. U ľudí sa stretávame výlučne s triploidiami a tetraploidiami. Triploidiou označujeme stav prítomnosti troch haploidných sád, t.j. 69 chromozómov. Analogicky prítomnosť štyroch haploidných sád chromozómov označujeme pojmom tetraploidia.

Triploidie môžu byť výsledkom: (I) oplodnenia diploidného vajíčka, (II) oplodnenia haploidného vajíčka dvoma spermiami, to je prípad tzv. dispermie, alebo (III) oplodnenia haploidného vajíčka diploidnou spermiou. V prípade, že extra haploidná sada chromozómov je maternálneho pôvodu (možnosť I), nazývame tento stav digynia. Naopak, ak je extra haploidná sada paternálneho pôvodu (možnosti II a III), hovoríme o diandrii (Baumer *et al.*, 2000; McFadden *et Kalousek*, 1991; McFadden *et Langlois*, 2000; Wick *et al.*, 2013).



U tetraploidii prevláda vznik v dôsledku chyby v priebehu prvého postfertilizačného mitotického delenia, výnimočne sa objaví oplodnenie vajíčka tromi spermiami.

Toto boli možnosti vzniku konštitučných polyploidii. V praxi sa však častejšie stretávame s triploidiami a tetraploidiami vo forme  $2n/3n$  alebo  $2n/4n$  mixoploidii, ktoré vznikajú chybou v priebehu mitotického delenia v neskorších fázach delenia zygoty či embrya. Ich častejší výskyt je daný tým, že spôsobujú slabšie, i keď stále závažné klinické príznaky a sú preto kompatibilnejšie s prežitím embrya (Kelly *et al.*, 1974; Kohn *et al.*, 1967; Olgun-Erdemir *et al.*, 2010; Van de Laar *et al.*, 2002).

Dôvod, prečo konštitučné polyploidie nie sú tak často detegované v rámci prenatalnej diagnostiky je fakt, že nie sú zlučiteľné so životom embryí a vedú k potratom vo veľmi skorých štádiách tehotenstva. Iba veľmi výnimočne sa stretávame s prípadmi, kedy polyploidný plod prežije do druhého či dokonca tretieho trimestra. Takéto prípady potom väčšinou končia predčasným pôrodom mŕtveho plodu. Ešte vzácnejšie sú prípady živonarodených polyploidných novorodencov. U triploidii je to približne 1 z 15000 triploidných zárodokov (Baumer *et al.*, 2000; Cassidy *et al.*, 1977) a v prípade tetraploidii bolo doteraz zaznamenaných menej než desať prípadov (Golbus *et al.*, 1976; Guc-Scekic *et al.*, 2002). Dĺžka života dieťaťa je veľmi krátka, zvyčajne niekoľko dní, maximálne pár mesiacov (Guc-Scekic *et al.*, 2002; Wick *et al.*, 2013).

### 3.4.2.2 Aneuploidie

Termín aneuploidia označuje stav, kedy v dôsledku nondisjunkcie došlo k zmene počtu jednotlivých chromozómov. Počet chromozómov jedinca teda nie je celým násobkom haploidného čísla  $n$ . Stav straty jedného alebo viacerých chromozómov sa označuje termínom hypoploidia. Jej príkladom sú monozómie ( $2n - 1$ ) alebo nulizómie ( $2n - 2$ ). Opakom je hyperploidia, kedy je chromozómom navyše. V prípade hyperploidii sa u človeka stretávame výlučne s trizómiami ( $2n + 1$ ).

Aneuploidie vedú u ľudí k zastaveniu vývoja pre-implantovaných embryí, zlyhaniu samotnej implantácie embryí, spontánnym potratom či predčasným pôrodom (Iwarsson *et al.*, 1999; Munne, 2003; Pellestor *et al.*, 1994). Viac než 35 % spontánnych potratov je

spôsobených práve aneuploidiou plodu. Z toho najfrekventovanejšie sú trizómie chromozómov 16, 21, 22 a monozómia X. Kompatibilné s prežitím sú iba aneuploidie chromozómov 13, 18, 21 a pohlavných chromozómov. U svojich nositeľov vyvolávajú závažné klinické dopady, súhrnne označované syndrómy. Z autozomálnych aberácií sú to: Downov syndróm (47,XX/XY,+21), Edwardsov syndróm (47,XX/XY,+18) a Patauov syndróm (47,XX/XY,+13) (Down, 1866; Edwards *et al.*, 1960; Lejeune *et al.*, 1959; Patau *et al.*, 1960). Gonozomálne aberácie vyvolávajú: Turnerov syndróm (45,X0), syndróm XXX (47,XXX), Klinefelterov syndróm (47,XXY) a syndróm XYY (47,XYY) (Jacobs *et al.*, 1959; Jacobs *et al.*, 1959; Turner, 1938). Všeobecne pritom platí, že zmeny počtu pohlavných chromozómov vyvolávajú jemnejšie klinické príznaky než autozomálne trizómie (Egozcue *et al.*, 1998, Egozcue *et al.*, 2000).

Nositelia autozomálnych trizómií vykazujú príznaky, ako sú mentálna a psychomotorická retardácia, rôzne syndrómovo špecifické telesné dysmorfie, tvárové asymetrie, poškodenia vnútorných orgánov i celých orgánových sústav. Príznaky trizómií chromozómov 18 a 13 sú natoľko závažné, že čo sa týka postnatálneho prežitia novorodencov, približne polovica detí neprežije viac ako týždeň po narodení a len 5 – 10 % prežije viac ako rok (Cereda *et al.*, 2012; Lakovschek *et al.*, 2011). Oproti tomu, symptómy Downovho syndrómu sú o poznanie miernejšie a v prípade, že u pacienta nie sú prítomné vrodené anomálie kardiovaskulárneho systému, môže sa dožiť aj viac ako 50 rokov. V prípade gonozomálnych aneuploidií sú príznakmi redukované intelektuálne schopnosti, behaviorálne problémy, anomálie vonkajších i vnútorných genitálií a s tým súvisiace poruchy reprodukcie.

Vzhľadom na závažnosť fenotypových príznakov autozomálnych trizómií a tiež na ich relatívne vysokú incidenciu (najmä v prípade Downovho syndrómu u starších žien) je dôležitý ich skorý záchyt.

### 3.5 Diagnostické metódy

Prenatálna starostlivosť zahŕňa ako skrínigové, tak aj diagnostické vyšetrenia. V rámci prenatálneho skrínigu sa zohľadňuje vek tehotnej ženy, celková anamnéza dvojice (zdravotný stav, výskyt dedičných ochorení v rodine, reprodukčné problémy z minulosti),

výsledky ultrazvukových vyšetrení (miera šijového prejasnenia, morfológia, pohyblivosť, srdcová činnosť plodu, množstvo plodovej vody...) a výsledok vyšetrenia biochemických markerov v sére tehotnej ženy. Úlohou skriningových vyšetrení je identifikovať tehotenstvá so zvýšeným rizikom vrodenej vývojovej vady plodu. V takých prípadoch je navrhnuté diagnostické, genetické vyšetrenie buniek plodu, ktorého výsledok dohady potvrdí alebo vyvráti. Plodové bunky sa získavajú amniocentézou či odberom choriových klkov.

### 3.5.1 Karyotypizácia

Karyotypizácia, teda zostavenie karyotypu jedinca za pomoci prúžkovacích techník, predstavuje štandardnú cytogenetickú techniku, využívanú v prenatalnej diagnostike. Do klinickej praxe bola zavedená pred viac ako 40 rokmi a dodnes patrí k najvyužívanejším metódam genetického vyšetrenia plodu s podozrením na VVV (Arrighi *et al.*, 1971; Arrighi *et Hsu* 1971; Caspersson *et al.*, 1970; Dutrillaux, 1973; Seabright, 1971). Jej výhodami sú vysoká presnosť (99,4 - 99,8 %) a spoľahlivosť detekcie numerických a rozsiahlejších štruktúrnych aberácií (Los *et al.*, 2001).

Podstata metódy spočíva v kultivácii buniek, zisku metafáznych chromozómov a ich systematickom usporiadaní na základe tzv. banding patternu, ktorý je charakteristický pre každý homologický pár. Na základe toho môžeme detegovať nielen numerické aberácie, ale tiež štruktúrne aberácie väčšieho rozsahu. Priemerne sa uvádza rozlíšenie > 10 Mb (Shaffer *et Bejanni*, 2004).

Okrem spomínaných výhod vykazuje ale konvenčná karyotypizácia aj viaceré limitácie a nevýhody. Asi najvýraznejšou z nich je dĺžka trvania analýzy, pohybujúca sa v rozmedzí 7-14 dní, ktorú výrazne predlžuje najmä nutnosť kultivácie buniek (Boormans *et al.*, 2008; Ried *et al.*, 1992). Ďalším problémom je zlyhanie samotnej kultivácie. K tomu dochádza najčastejšie u buniek potratených plodov získaných biopsou (10 - 40 % prípadov) (Benkhalifa *et al.*, 2005; Fritz *et al.*, 2001). Nevýhodou je tiež pomerne nízke rozlíšenie i citlivosť, ktoré sú limitované na detekciu numerických abnormalít a veľkých štruktúrnych prestavieb chromozómov, zatiaľ čo napríklad kryptické aberácie zostávajú nedetegované. Z týchto dôvodov sa v posledných rokoch objavuje iniciatíva nahradenia klasickej karyotypizácie modernejšími molekulárno-cytogenetickými a molekulárnymi technikami, ktoré by mali

vyššiu citlivosť i rozlíšenie a nevyžadovali by kultiváciu buniek.

### 3.5.2 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia

Počiatky tejto metódy siahajú do roku 1986, kedy Pinkel s kolegami vyvinuli metódu vizuálizácie chromozómov pomocou fluorescenčne značených prób, ktorú nazvali FISH (Pinkel *et al.*, 1986). Do prenatálnej klinickej praxe bola zavedená v roku 1992 (Klinger *et al.*, 1992) a odvtedy sa využíva najmä ako doplnková metóda ku konvenčnej karyotypizácii v prípadoch, kedy je vzhľadom na rodinnú históriu alebo zlé výsledky skriningových vyšetrení vysoké riziko výskytu aneuploidie, alebo mikrolečného/mikroduplikačného syndrómu (Faas *et al.*, 2011). Je možné ju prevádzať nielen na metafáznych, ale aj na interfáznych jadrách. V porovnaní s karyotypizáciou, je FISH analýza interfáznych jadier výrazne rýchlejšia, výsledky je možné získať do 24 hodín od dodania vzorky. Spoločne s metódou MLPA a QF-PCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction) sa radí k tzv. RAD technikám (Rapid Aneuploidy Detection). Ďalšou výhodou oproti konvenčnej karyotypizácii je väčšie rozlíšenie, ktoré umožňuje detekciu i kryptických submikroskopických štruktúrnych aberácií.

Metóda je založená na hybridizácii fluorescenčne značených sekvenčne špecifických sond s testovanou DNA. Výsledky hybridizácie potom vyhodnocujeme pomocou fluorescenčného mikroskopu. Určitou nevýhodou tejto metódy je, že detekcia štruktúrnych aberácií je limitovaná výberom prób, ktoré necháme hybridizovať. Vo výsledku tak získame informáciu iba o určitých lokusoch chromozómov a nie komplexnú informáciu o celom genóme. Ďalšou nevýhodou je pomerne vysoká cena.

Celkovo existuje veľmi veľa protokolov a rôznych typov FISH analýz, ktoré nachádzajú široké uplatnenie od nádorovej genetiky až po prenatálnu, postnatálnu a preimplantačnú diagnostiku (Volpi *et Bridger*, 2008).

### 3.5.3 Komparatívna genómová hybridizácia

Komparatívna genómová hybridizácia, skratka CGH je metóda založená na princípe fluorescenčnej *in situ* hybridizácie, ktorá ale na rozdiel od klasickej FISH, umožňuje detekciu

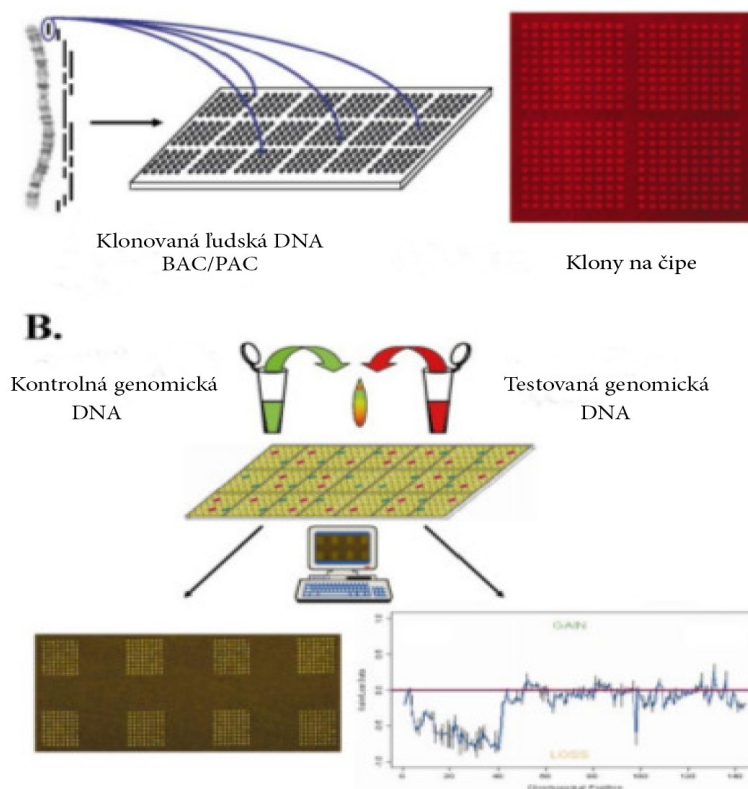
nebalancovaných zmien chromozómov (aneuploidie, delécie a duplikácie) v rámci celého genómu. Z toho dôvodu sa tiež niekedy označuje termínom celogenómová FISH. Rozlíšenie sa pohybuje okolo 10-20 Mb (Kallioniemi *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1999). V prípade použitia vysokorozlišovacej HR-CGH (High Resolution CGH) môžeme dosiahnuť rozlíšenie až 3 Mb (Kirchhoff *et al.*, 2001).

Oproti ostatným moderným molekulárnym technikám má tú výhodu, že v rámci jednej hybridizačnej reakcie zmapuje celý genóm. Na druhú stranu má ale v porovnaní s nimi nižšie rozlíšenie a nedeteguje balancované chromozomálne zmeny. Princíp metódy spočíva vo farbení testovanej a referenčnej vzorky DNA dvoma odlišnými fluorescenčnými farbami, ich následnej hybridizácii na normálne metafázne chromozómy a meraní pomeru fluorescenčných signálov. Tak je možné detegovať nebalancované chromozomálne aberácie.

### **3.5.4 Komparatívna genómová hybridizácia na čipe – array CGH**

Array CGH predstavuje modernejšiu variantu klasickej komparatívnej genómovej hybridizácie. Túto metódu môžeme v literatúre nájsť tiež pod označením molekulárna karyotypizácia, alebo pod skratkou CMA (Chromosomal Microarray Analysis). Jej výhodami sú najmä vysoké rozlíšenie a celogenómový prístup. Môžeme pomocou nej detegovať kryptické delécie, duplikácie i trizómie. Nie však polyplódie a balancované chromozomálne prestavby.

Funguje v podstate na tom istom princípe ako klasická CGH, líši sa len v tom, že normálne „kontrolné“ metafázne chromozómy sú nahradené fragmentami DNA o známej sekvencii (Pinkel *et al.*, 1998; Snijders *et al.*, 2001). Tým sa docieli zvýšenie rozlíšenia, ktoré je dané veľkosťou jednotlivých klonov a ich spacingom (t.j. rozostupom). Môžeme tak detegovať i submikroskopické chromozomálne aberácie a to na celogenómovej úrovni (Shaffer *et Bejjani*, 2004). Na rozdiel od ostatných moderných molekulárnym RAD techník využívaných v prenatalnej diagnostike tak detekcia kryptických aberácií nie je obmedzená len na určité sekvencie DNA, definované použitými prôbami alebo primerami.



Obrázok 2: Schématické znázornenie priebehu array CGH analýzy  
(upravené podľa Schaffer *et* Bejjani, 2004)

Hoci je molekulárna karyotypizácia pomerne často využívaná v postnatálnej diagnostike u detí i dospelých vykazujúcich rôzne stupne mentálnej retardácie, VVV či dysmorfii neznámeho pôvodu (Stankiewicz *et* Beaudet, 2007) a začína pomaly nahrádzať tradičnú karyotypizáciu, jej zavedenie do prenatalnej klinickej praxe je o niečo zložitejšie. Hlavným problémom je interpretácia výsledkov. Predpovedať fenotypový dopad na nositeľa je zložité v dvoch prípadoch. Po prvé, ak detegujeme doposiaľ nepopísanú imbalanciu a po druhé v prípade detekcie tzv. VOUS (Variants Of Unknown/ Uncertain Significance) (Callaway *et al.*, 2013). Týmto termínom označujeme dva stavy: (1) identifikovaná zmena DNA nebola doposiaľ spoľahlivo charakterizovaná ako patogénna alebo benígna, (2) je asociovaná s variabilným fenotypom (variabilná penetrácia).

Bolo vykonaných mnoho retrospektívnych štúdií porovnávajúcich detekciu chromozomálnych abnormalít pomocou klasickej karyotypizácie a array CGH. Výsledky dopadli podľa očakávaní a array CGH identifikovala u plodov vykazujúcich pozitívne UZ náklady viac abnormalít. Okrem toho však detegovala určité abnormality aj u plodov

s normálnym karyotypom, bez abnormálnych UZ nálezov, ktoré sa narodili bez VVV (Reddy *et al.*, 2012a; Wapner *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2014). Z toho dôvodu sa odporúča prevádzať toto vyšetrenie iba v prípade pozitívnych UZ nálezov (Callaway *et al.*, 2013). Určité riešenie problému ponúka použitie tzv. cielených čipov (targeted arrays), ktoré sú navrhnuté tak, že namiesto testovania celého genómu testujú iba sekvencie DNA u ktorých je známe, že ich zmeny spôsobujú u nositeľa fenotypové dopady.

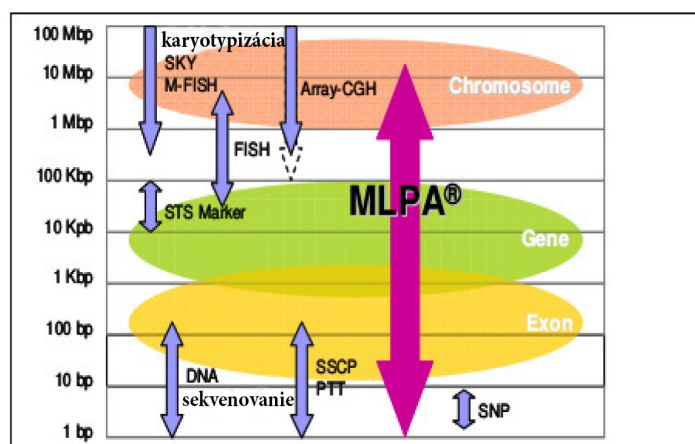
### 3.5.5 QF-PCR

QF-PCR je veľmi rýchlou a presnou metódou detekcie trizomií autozómov 13, 18, 21 a aneuploidií pohlavných chromozómov, popríp. triploidií. Je založená na amplifikácii vybraných polymorfných STR markerov (Short Tandem Repeats) za pomoci fluorescenčne značených primerov a ich relatívnej kvantifikácii. Senzitivita tejto metódy je 95,65 % a špecificita 99,97 % (Grimshaw *et al.*, 2003). Okrem rýchlosti (výsledky do 24-48 hodín) má i ďalšie výhody, medzi ktoré patrí jednoduchosť prevedenia analýzy, technická nenáročnosť, malé množstvo vstupnej testovanej DNA, možnosť automatizácie, s čím súvisí tiež nižšia cena. Istým mínusom je, že touto metódou nemožno detegovať aneuploidie iných ako vybraných chromozómov (Cirigliano *et al.*, 2001; Hultén *et al.*, 2003; Pertl *et al.*, 1999).

### 3.5.6 MLPA

Metóda MLPA bola prvý krát publikovaná v roku 2002, kedy Schouten s kolegami vydali článok popisujúci princíp a využitie novej techniky relatívnej kvantifikácie až 40 vybraných DNA sekvencií za pomoci jedinej PCR reakcie, ktorej predchádza hybridizácia a ligácia sekvenčne špecifických prôb (Schouten *et al.*, 2002).

Veľkou výhodou tejto metódy je široký rozptyl zmien, ktoré je schopná detegovať – od bežných trizómií či monozómií, až po detekciu známych bodových mutácií, či SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Obr. 3) (Schouten *et al.*, 2002).



Obrázok 3: Rozsah zmien, ktoré je možné detegovať rozličnými cytogenetickými a molekulárnymi metódami (upravené podľa MRC-Holland: MLPA, 2012a)

Je to rýchla (výsledky môžeme obdržať do 48 hodín), lacná metóda, ktorá vykazuje vysokú citlivosť a presnosť. Ako ostatné molekulárne metódy ani ona nevyžaduje kultiváciu buniek a na jej prevedenie stačí iba malé množstvo vstupnej testovanej DNA (okolo 20 ng). Je veľmi jednoduchá na prevedenie, vystačíme si s komerčne dostupným MLPA SALSA kitom (firma MRC-Holland), termocyklérom a kapilárnou elektroforézou, pričom celý experiment prevádzame v podstate v jedinej skúmavke. Na porovnanie parametrov detekcie aneuploidíí pomocou metódy MLPA, FISH a QF-PCR uvádzam Tabuľku 3.

Istý problém predstavuje neschopnosť detekcie kontaminácie vzorky materskými bunkami či mozaicizmu s úrovňou zastúpenia abnormálnej bunkovej línie menšou než 30 % (Kooper *et al.*, 2009). Okrem toho sú tu limitácie týkajúce sa detekcie polyploidíí, balancovaných štruktúrnych prestavieb a keďže sa nejedná o celogenómovú analýzu, tak aj zmien sekvencií mimo použitého mixu prób.



Tabuľka 3: Porovnanie parametrov detekcie aneuploidií tromi molekulárnymi metódami  
(upravené podľa Hochstenbach *et al.*, 2005)

Metóda	MLPA	QF-PCR	FISH
Počet prób pre každý z chromozómov 13,18,21	8	3-4	1
Počet prób pre každý z chromozómov X a Y	4	1	1
Dĺžka testovanej cieľovej sekvencie DNA	50-70 nt	2 x 25 nt	Niekoľko kb
Počet testovaných sekvencií v jednej vzorke	40	13	~5
Objem potrebnej amniónovej tekutiny	1-2 ml	1-2 ml	1-2 ml
Počet vzoriek, ktoré možno analyzovať v rámci jednej analýzy	96	96	~10
Možnosť automatizácie	Áno	Áno	Nie
Cena analýzy jednej vzorky (euro)	12	14	50
Doba trvania analýzy	< 48 h	< 24 h	< 24 h
Senzitivita	100 %	95,65 %	99,7 %
Špecificita	99,8 %	99,97 %	97,6 %
Zlyhanie analýzy	1,9 %	< 1 %	7 %
Detekcia mozaicizmu	Áno (ak je zastúpenie aberantných buniek vyššie než 30 %)	Áno (ak je zastúpenie aberantných buniek vyššie než 10 %)	Áno (v závislosti na počte hodnotených jadier a miere zastúpenia aberantných buniek)
Detekcia triploidii	Nie	Áno	Áno

Využitie MLPA analýzy v rámci postnatálnej a prenatalnej diagnostiky vrodenej a dedičných ochorení je široké. V postnatálnej klinickej praxi sa využíva najmä u pacientov s idiopatickou mentálnou retardáciou (ktorí môžu, no nemusia vykazovať tiež rôzne dysmorfie či trpieť vrodenejmi anomáliami), kedy slúži k skúmaniu subtelomerických regiónov. Tie sú bohaté na gény a už submikroskopické zmeny, najčastejšie delécie, spôsobujú u nositeľov závažné fenotypové poruchy. V praxi sa doteraz na ich identifikáciu využívala najmä FISH. Tá je však pomerne drahá a v jednom experimente pokryje len malý počet cieľových oblastí. V posledných rokoch sa preto čoraz častejšie na skrining aberácií

v subtelomerických oblastiach využíva MLPA, ktorá je rýchla, citlivá, v porovnaní s FISH lacnejšia a v rámci jednej reakcie pokryje oveľa väčší počet sekvencií (Kirchhoff *et al.*, 2007; Lam *et al.*, 2006; Monfort *et al.*, 2006; Northrop *et al.*, 2005; Pohovski *et al.*, 2013; Rooms *et al.*, 2004; Stegman *et al.*, 2008).

V rámci prenatalnej diagnostiky sa MLPA využíva na detekciu bežných aneuploidii (Gerdes *et al.*, 2005; Gerdes *et al.*, 2008; Hochstenbach *et al.*, 2005; Kooper *et al.*, 2008; Kooper *et al.*, 2009; van Opstal *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2014), mikrodelečných, mikroduplikačných syndrómov a to najmä v subtelomerických oblastiach (Chen *et al.*, 2014; Kjaergaard *et al.*, 2010; Konialis *et al.*, 2011; Willis *et al.*, 2012), ale tiež pri štúdiu marker chromozómov (van Opstal *et al.*, 2011), či príčin spontánnych potratov (Bruno *et al.*, 2006; Diego-Alvarez *et al.*, 2007).

Štúdie zaoberajúce sa zavedením metódy MLPA do klinickej praxe, odporúčajú využívať túto metódu v kombinácii s klasickou karyotypizáciou. Tým sa dosiahne maximálny možný záchyt širokého spektra numerických, štruktúrnych, balancovaných i nebalancovaných prestavieb veľkého i malého rozsahu, ako aj prípadov mozaicizmov či kontaminácií vzoriek materskými bunkami (Hochstenbach *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2014).

### 3.5.7 NGS technológie

Vyššie uvedené diagnostické metódy sú spojené s invazívnymi technikami odberu plodových buniek (amniocentéza, choriocentéza), ktoré so sebou prinášajú určitú mieru rizika pre plod i matku. Riziko potratu sa pohybuje priemerne od 0,5 – 1 %.

Snahou lekárskeho výskumu je eliminovať toto riziko, čo je umožnené práve využitím NGS (Next-Generation Sequencing) technológií využívajúcich fragmenty fetálnej DNA, cirkulujúce v periférnej krvi tehotných žien. Takáto neinvazívna prenatalná diagnostika, v literatúre označovaná tiež skratkou NIPT (Non-Invasive Prenatal Testing), ponúka bezrizikovú, veľmi presnú a citlivú detekciu aneuploidii vo veľmi skorých štádiách tehotenstva. Jej zavedenie do klinickej praxe by výrazne znížilo počet žien zbytočne podstupujúcich rizikové invazívne vyšetrenia (Chiu *et al.*, 2008; Lo *et al.*, 1997; Nepomnyashchaya *et al.*, 2013; Sehnert *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2013).

## 4 Materiál

### 4.1 Biologický materiál

Biologickým materiálom boli vzorky DNA izolované z tkaniva získaného kožnou biopsiou u potratených plodov, z amniocytov plodovej vody získanej amniocentézou alebo choriových klkov získaných choriocentézou pacientiek ÚLG Fakultnej nemocnice Olomouc a pracovísk spádovej oblasti.

Celkovo bolo analyzovaných 52 vzoriek DNA (Tab. 4 - Prílohy):

- 4 vzorky DNA plodov pokračujúcich tehotenstiev s UZ nálezmi
- 28 vzoriek DNA umelo prerušených tehotenstiev (ďalej UPT) z dôvodu prítomnosti závažných VVV plodov
- 17 vzoriek DNA spontánne potratených plodov
- 3 vzorky DNA mŕtvonarodených plodov

Ako negatívne kontroly boli použité referenčné vzorky DNA preukázateľne zdravých jedincov (genomický profil bol testovaný pomocou SNP array).

Izolácia DNA pomocou izolačného QIAamp DNA Mini Kitu bola vykonaná laborantkami Ústavu lekárskej genetiky Fakultnej nemocnice Olomouc.

Testovaná a referenčná DNA bola riedená TE pufrom na pracovnú koncentráciu 10 ng/μl, aby 5 μl nariedenej vzorky obsahovalo 50 ng DNA – čo je optimálne množstvo DNA na prevádzanie MLPA analýzy.

Časť plodových buniek, ktorá nebola použitá k izolácii DNA a následnej MLPA analýze, bola kultivovaná pre účely karyotypizácie (karyotypizácia nebola náplňou experimentálnej časti práce a bola prevedená pracovníkmi ÚLG, výsledky poskytla RNDr. P. Čapková, Ph.D.). Na základe jej výsledkov boli vyšetrované vzorky DNA rozdelené do troch skupín:

1. skupina vzoriek DNA plodov bez výsledku karyotypizácie z dôvodu zlyhania kultivácie
2. vzorky DNA plodov s patologickým cytogenetickým nálezom
3. vzorky DNA plodov s normálnym karyotypom.

## 4.2 Chemikálie a roztoky

- SALSA® MLPA® probemix P036 Subtelomeres Mix 1 (MRC Holland)
- SALSA® MLPA® probemix P070 Subtelomeres Mix 2B (MRC Holland)
- SALSA® MLPA® probemix P245 Microdeletion Syndromes-1 (MRC Holland)
- SALSA® MLPA® probemix P182 Centromere (MRC Holland)
- SALSA® MLPA® P250 DiGeorge probemix (MRC-Holland)
- SALSA® MLPA® P311 Congenital Heart Disease probemixe (MRC-Holland)

Chemické zloženie SALSA® MLPA® reakčných kitov je uvedené v Tabuľke 5.

Tabuľka 5 : Chemické zloženie SALSA® MLPA® reakčných kitov  
(upravené podľa MRC-Holland: MLPA, 2014a)

Zložka kitu	Zloženie
SALSA MLPA pufoer	KCl, Tris- HCL, EDTA, PEG-6000; pH 8.5
SALSA MLPA probemix *	Syntetické oligonukleotidy, oligonukleotidy purifikované z baktérií, Tris-HCl, EDTA; pH 8.0
SALSA ligáza-65	Glycerol, BRIJ (0,05%), EDTA, beta-mercaptoetanol (0,1%), KCl, Tris-HCl; pH 7,5, ligáza-65 bakteriálneho pôvodu
Ligačný pufoer A	NAD bakteriálneho pôvodu; pH 3,5
Ligačný pufoer B	Tris-HCl, neionogénne detergenty, MgCl <sub>2</sub> ; pH 8.5
SALSA mix PCR primerov	Syntetické oligonukleotidy značené fluorescenčnou značkou FAM, dNTPs, Tris-HCl, KCl, EDTA, BRIJ; pH 8
SALSA polymeráza	Glycerol, neionogénne detergenty, EDTA, DTT (0,1 %), KCl, Tris-HCl, polymeráza bakteriálneho pôvodu; pH 7.5

\* Zoznam prób probemixov jednotlivých použitých SALSA® MLPA® reakčných kitov, spolu so špecifikáciou lokusov s ktorým hybridizujú, dĺžkou výsledného amplifikačného produktu a ďalšími informáciami sú uvedené v Tab. 6 - 11 - Prílohy.

- sterilný TE pufoer (10 mM TRIS-HCl + 0,1 mM EDTA; pH 8,2)  
(Lekárne FN Olomouc)
- PCR Ultra H<sub>2</sub>O (Top-Bio)
- deionizovaný Hi-Di formamid (Applied Biosystems)

- GeneScan™ 500 LIZ® značený veľkostný štandard (Applied Biosystems)
- POP-4® polymér pre 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- ABI PRISM® 3130 10X Running pufor s obsahom EDTA (Applied Biosystems)
- deionizovaná voda (Lekáreň FN Olomouc)

### 4.3 Laboratórne vybavenie, prístroje

- sada automatických pipiet LabMate (HTL)
- jednorázové sterilné špičky
- latexové bezprašné rukavice Sempercure® nitrile skin<sup>2</sup>
- skúmavky typu Eppendorf (1,7ml) (Golden Gate Bioscience)
- skúmavky typu PCR (0,2ml) (Thermo Scientific)
- chladnička, mrazák (Electrolux)
- alobal, popisovač, kontajnery na infekčný odpad, nádoba na ľad, stojan na skúmavky
- 96-jamková platnička na kapilárnu elektroforézu (VWR International)
- minicentrifúga Combi-Spin, FVL-2400N (Biosan)
- centrifúga Mikro 200 (Hettich)
- PCR termocyklér C1000 Touch™ (BioRad)
- automatický genetický analyzátor ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- laminárny box Mini-V/PCR (TELSTAR)

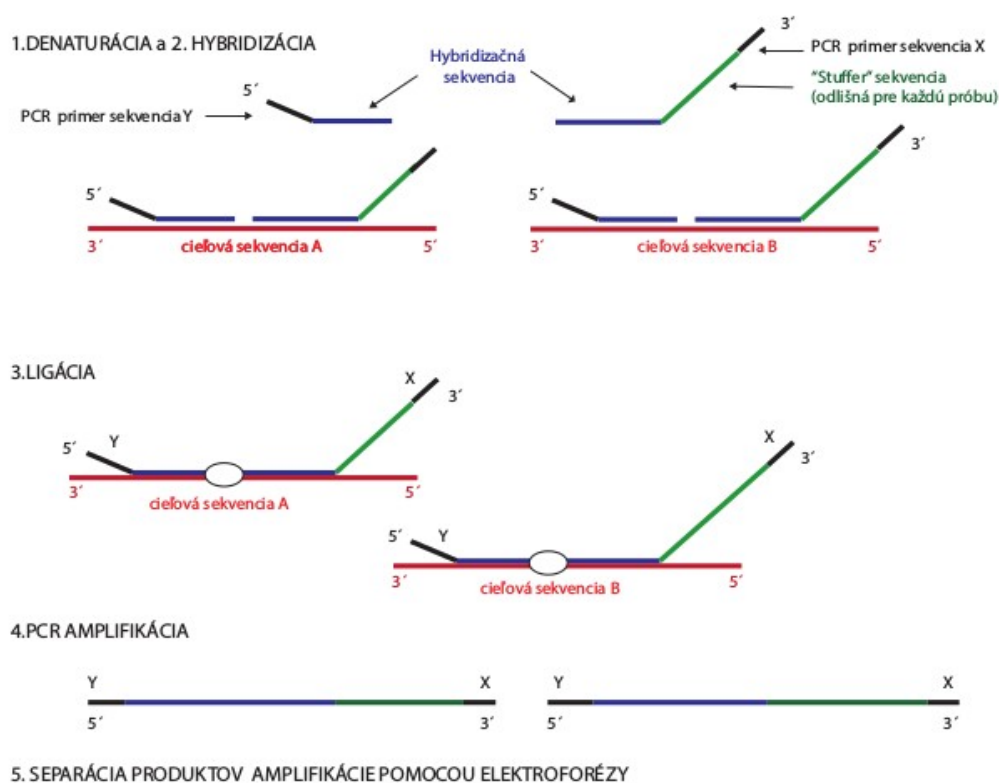
### 4.4 Software

- Foundation Data Collection Software Version 3.1.1 (Applied Biosystems)
- GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems)
- Coffalyser.Net (MRC-Holland)

## 5 Metodika

### 5.1 MLPA

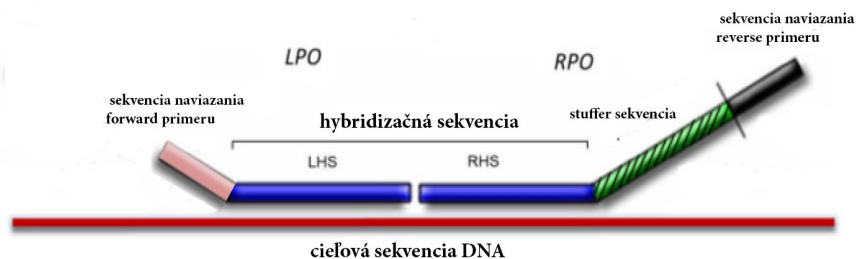
Priebeh MLPA reakcie je znázornený na Obrázku 4 a možno ho zhrnúť do piatich krokov: denaturácia testovanej DNA, hybridizácia oligonukleotidov s komplementárnymi cieľovými sekvenciami DNA, ligácia nahybridizovaných oligonukleotidov, ich PCR amplifikácia, separácia a detekcia amplifikovaných fragmentov kapilárnou elektroforézou a ich konečná analýza pomocou špecializovaných softwarov.



Obrázok 4: Schématické znázornenie priebehu MLPA reakcie (upravené podľa Schouten *et al.*, 2012).

Zvláštnosťou metódy je, že neamplifikuje a následne nekvantifikuje testovanú DNA, ale próby, ktoré s ňou hybridizujú. Každá zo 40-50 prôb konkrétneho probemixu pozostáva z dvoch oligonukleotidov, ktoré označujeme skratkami LPO (Left Probe Oligonucleotide) a RPO (Right Probe Oligonucleotide) (Obr. 5). LPO má na svojom 5' konci univerzálnu sekvenciu na nasadenie forward PCR primeru a na 3' konci hybridizačnú sekvenciu dlhú 21-30 nt, ktorú označujeme skratkou LHS (Left Hybridising Sequence). RPO má univerzálnu sekvenciu na nasadenie reverse PCR primeru na 3' konci, 25-43 nt dlhú hybridizačnú

sekvenciu RHS (Right Hybridising Sequence) na 5' konci a medzi nimi tzv. stuffer sekvenciu. Jej veľkosť je u každej próby odlišná a pohybuje sa v rozmedzí 19 – 370 nt. Tak sa docieli to, že každá próba dá vzniknúť amplifikačnému produktu unikátnej veľkosti (od 130 po 480 bp).



Obrázok 5: Schématické znázornenie MLPA próby (upravené podľa MRC-Holland: MLPA, 2014b).

Po ligácii nahybridizovaných oligonukleotidov majú všetky próby na svojich 5' a 3' koncoch rovnaké univerzálne sekvencie, čo umožňuje ich amplifikáciu pomocou jediného páru primerov pričom jeden z nich je fluorescenčne značený. Použitie jediného páru primerov zabezpečí simultánnu a rovnomernú amplifikáciu všetkých lokusov (Schouten *et al.*, 2002).

Každý probemix obsahuje aj kontrolné próby, ktorých amplifikačné produkty vypovedajú o množstve DNA či úspešnosti denaturačnej a ligačnej reakcie (Tab. 12). Ich interpretácii sa bližšie venujem v podkapitole 5.2 Fragmentačná analýza kapilárnou elektroforézou.

Tabuľka 12: Interné kontrolné fragmenty MLPA reakcie (upravené podľa MRC-Holland: MLPA, 2014a)

Kontrolný fragment	Dĺžka [nt]	Interpretácia
92nt štandardný/porovnávací fragment	92	Slúži na porovnávanie s ostatnými kontrolnými fragmentami
Q-fragmenty	64, 70, 76, 82	Vypovedajú o množstve DNA a úspešnosti ligácie
D-fragmenty	88, 96	Vypovedajú o úspešnosti denaturácie

Kontrolný fragment	Dĺžka [nt]	Interpretácia
X fragment	100	Prítomnosť X chromozómu
Y fragmenty	105, 118	Prítomnosť Y chromozómu

Pozitívny nález (najmä ak ho deteguje iba jediná próba) je potrebné overiť, aby bola vylúčená možnosť falošnej pozitivity nálezu. K overovaniu môže slúžiť iný kit, alebo iná metóda (FISH, QF-PCR, ...). Dôvodom výskytu falošne pozitívnych nálezu môže byť prítomnosť polymorfizmov či bodových mutácií v miestach hybridizácie prôb, alebo tiež nedostatočná denaturácia testovanej DNA. Tá je problémom najmä u prôb, ktoré hybridizujú so sekvenciami DNA nachádzajúcimi sa v blízkosti CpG ostrovčekov. Tieto oblasti sú citlivé na kvalitu denaturácie DNA a v prípade, že tá nie je dostatočná, napríklad z dôvodu prítomnosti solí, nasadenie próby je znemožnené, výsledkom čoho je falošne pozitívny nález naznačujúci deléciu daného lokusu. Z toho dôvodu sú informácie upozorňujúce na blízkosť testovaných sekvencií a CpG ostrovčekov súčasťou materiálov dodávaných k jednotlivým kitom. Okrem toho každý kit obsahuje vyššie spomínané kontrolné D-próby, ktoré hybridizujú práve so sekvenciami silných CpG ostrovčekov. Nízka intenzita fluorescenčného signálu D-fragmentov potom vypovedá o nedostatočnej úrovni denaturácie vzorky DNA.

V rámci experimentálnej časti práce boli vzorky DNA testované rôznymi kombináciami SALSA MLPA kitov P036, P070, P182, P245, P311 a v dvoch prípadoch i kitom P250. Kombinácie boli volené individuálne na základe výsledkov karyotypizácie, resp. v prípade zlyhania kultivácie, na základe konkrétnych indikácií k prenatalnému vyšetreniu a teda najpravdepodobnejšej chromozomálnej aberácii. V prípade detekcie patologického nálezu sa prevádzalo overovanie nálezu iným kitom a výsledok sa porovnával s výsledkom FISH, QF-PCR, alebo array CGH analýzy (prevádzanie FISH, QF-PCR a array CGH analýz nebolo súčasťou praktickej časti diplomovej práce, výsledky poskytla RNDr. P. Čapková, Ph.D.).

Kity P036 a P070 sú subtelomerické kity, využívané k detekcii nebalancovaných zmien v subtelomerických oblastiach, ako aj k detekcii početných zmien celých chromozómov. Obsahujú po jednej próbe pre obe subtelomerické oblasti každého chromozómu, výnimkou



sú akrocentrické chromozómy, pre ktoré nie je v kitoch prítomná próba pre p ramienko. Namiesto toho obsahujú extra próbu pre q ramienko v tesnej blízkosti centroméry. Zoznam prôb probemixov kitov P036 a P070, spolu so špecifikáciou lokusov s ktorými hybridizujú a dĺžkou výsledného amplifikačného produktu je uvedený v Tab. 9 a 10 - Prílohy.

Kit P182 je zameraný na sekvencie v tesnej blízkosti centroméry a využíva sa k detekcii početných zmien chromozómov a k charakterizácii pôvodu marker chromozómov. Probemix obsahuje jednu próbu pre každé chromozomálne ramienko. Výnimkou sú opäť akrocentrické chromozómy, pre ktoré sú v danom kite prítomné dve próby pre p ramienko. Zoznam prôb probemixu kitu P182, spolu so špecifikáciou lokusov s ktorými hybridizujú a dĺžkou výsledného amplifikačného produktu je uvedený v Tab. 11 - Prílohy.

Kit P245 je špecializovaný na detekciu najfrekvencovanejších mikródelečných syndrómov. Zoznam prôb probemixu kitu P245, spolu so špecifikáciou lokusov s ktorými hybridizujú a syndrómami, ktoré sú s danými lokusmi asociované, je uvedený v Tab. 12 - Prílohy.

Kit P311 je zameraný na testovanie lokusov asociovaných s VVV srdca. Konkrétne ide o päť génov (*GATA4*, *NKX2-5*, *TBX5*, *BMP4*, *CRELD1*) a lokus 22q11.2 asociovaný s DiGeorgovým syndrómom. Zoznam prôb probemixu kitu P311 je uvedený v Tab. 13 - Prílohy.

Na podrobnú analýzu lokusu 22q11 je špecializovaný kit P250. Mikródelécie/mikroduplicácie v tomto regióne sú asociované s viacerými závažnými klinickými príznakmi, najčastejším a najznámejším z ktorých je DiGeorgov syndróm. Tento kit obsahuje 48 prôb hybridizujúcich s rôznymi sekvenciami oblasti 22q11. Ich zoznam je uvedený v Tab. 14 - Prílohy.

Všetky vzorky boli testované subtelomerickými kitmi P036 a P070. Vo väčšine prípadov nasledovala ich analýza mikródelečným kitom P245. Výnimkou boli prípady, kedy subtelomerické kity detegovali prítomnosť aneuploidie. Takéto vzorky boli z dôvodu verifikácie aneuploidie testované centromerickým kitom P182. Tento kit bol použitý tiež v prípade overovania pôvodu marker chromozómu. Kit P311 bol použitý pre účel dovýšetrenia detegovaných mikródelécií a kit P250 bol použitý len v dvoch prípadoch, pričom v oboch slúžil k verifikácii a určeniu rozsahu detegovaných mikródelécií v oblasti 22q11.2.

## Pracovný postup

### 1. deň

#### Denaturácia DNA:

Do označených 0,2ml PCR skúmaviek bolo napipetovaných 5  $\mu$ l testovanej/referenčnej DNA o koncentrácii 10 ng/ $\mu$ l. Skúmavky boli následne umiestnené do termocykléra, kde bol spustený príslušný denaturačný program (5 minút, 98°C). Profil programu denaturácie ako aj ostatných programov využitých v rámci MLPA analýzy je uvedený v Schéme 1 na konci pracovného postupu.

#### Hybridizačná reakcia:

Reagencie na prípravu hybridizačného mixu boli rozmrazené a zvortexované. Následne bol pripravený MLPA hybridizačný mix (Tab. 13). K vzorkám po denaturácii schladeným na 25 °C, boli pripipetované 3  $\mu$ l pripraveného hybridizačného mixu. Následne bol spustený program hybridizácie. Ten pozostával z minútovej inkubácie vzoriek pri 95 °C, aby došlo k denaturácii prób i DNA, po ktorej nasledovala 16 hodinová hybridizačná reakcia pri 60°C.

Tabuľka 13: Schéma prípravy ligačného mixu

Reagencia	Pre 1 vzorku [ $\mu$ l]
SALSA MLPA pufor	1,5
SALSA MLPA probemix	1,5

### 2. deň

#### Ligačná reakcia

Reagencie na prípravu ligačného mixu boli rozmrazené, ligačné pufre A, B zvortexované. Bol pripravený ligačný mix (Tab. 14), ktorý bolo po pridaní enzýmu ligázy-65 potrebné skladovať na ľade. Po skončení 16 hodinovej hybridizačnej reakcie bol okamžite spustený program ligácie. Akonáhle teplota

vzoriek klesla zo 60 °C na 54 °C, program ligácie bol pozastavený, termocyklér otvorený a priamo v ňom bolo do skúmaviek napipetovaných po 32 µl pripraveného ligačného mixu. Po napipetovaní sme veko termocykléru uzavreli a pokračovali v programe ligácie. Ten pozostával z 15 minútovej inkubácie vzoriek pri teplote 54 °C, počas ktorej došlo k ligácii oligonukleotidov jednotlivých prób. Po nich nasledovala 5 minútová inkubácia vzoriek pri 98 °C, kedy došlo k inaktivácii ligázy-65.

Tabuľka 14: Schéma prípravy hybridizačného mixu

Reagencia	Pre 1 vzorku [µl]
dH <sub>2</sub> O	25
Ligačný pufor A	3
Ligačný pufor B	3
Ligáza-65	1

### PCR reakcia

Po ukončení ligačnej reakcie a schladení vzoriek na 20 °C boli skúmavky vybrané z termocykléra a za izbovej teploty k nim bolo napipetovaných 10 µl pripraveného PCR mixu (Tab. 15). Keďže jeden z primerov bol fluorescenčne značený, bolo potrebné skúmavku s namiešaným PCR mixom obaliť alobalom. Po pripipetovaní PCR mixu boli vzorky umiestnené do termocykléra a bol spustený program PCR.

Tabuľka 15: Schéma prípravy PCR mixu

Reagencia	Pre 1 vzorku [µl]
dH <sub>2</sub> O	7,5
SALSA PCR mix primerov	2
SALSA polymeráza	0,5

Po ukončení PCR boli skúmavky označené, zabalené do alobalu a umiestnené do mrazničky, kde boli uchované pri teplote -25 °C až do vykonania separácie amplifikovaných fragmentov pomocou kapilárnej elektroforézy.

Schéma 1: Profily programov použitých v rámci MLPA analýzy

1. Denaturácia DNA

98 °C 5 minút

25 °C 1 minúta

2. Hybridizačná reakcia

95 °C 1 minúta

60 °C 16 hodín

3. Ligačná reakcia

54 °C 1 minúta, pozastavenie programu

54 °C 15 minút

98 °C 5 minút

20 °C 1 minúta

4. PCR reakcia

95 °C 30 sekúnd (35 cyklov)

60 °C 30 sekúnd (35 cyklov)

72 °C 60 sekúnd (35 cyklov)

72 °C 20 minút

15 °C 1 minúta

## 5.2 Fragmentačná analýza kapilárnou elektroforézou

Výsledkom prevedenej MLPA analýzy sú fluorescenčne značené amplifikované fragmenty unikátnych veľkostí (130 – 480 bp), ktoré je potrebné rozdeliť, detegovať a analyzovať. Na fragmentačnú analýzu bol použitý automatický genetický analyzátor ABI-PRISM 3130 Genetic Analyzer pracujúci na princípe kapilárnej elektroforézy laserom detegovaných fluorescenčne značených fragmentov DNA. Technické parametre ABI-PRISM 3130 genetického analyzátora:

Počet kapilár: 16  
Dĺžka kapiláry: 36 cm  
Polymér: POP4  
Veľkostný štandard: 500 LIZ<sup>®</sup>  
Sada filtrov: G5

### **Pracovný postup**

#### Príprava vzoriek pre kapilárnu elektroforézu:

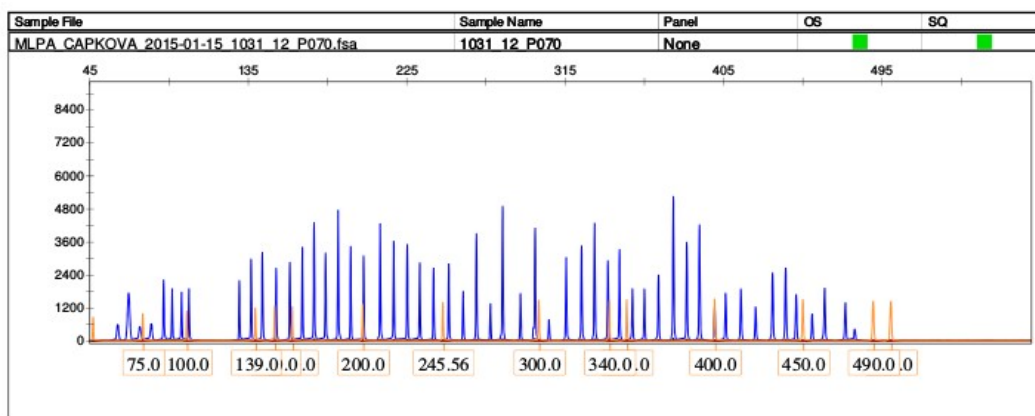
Do jednotlivých jamiek umytej, vysušenej a UV svetlom vysvietenej 96-jamkovej platničky bolo napipetovaných po 14  $\mu$ l vopred pripraveného mixu formamidu a značeného veľkostného štandardu 500 LIZ<sup>®</sup> (1 ml formamidu + 40  $\mu$ l LIZ štandardu). Následne boli pipetované rozmrazené MLPA amplifikačné produkty, po 1  $\mu$ l do každej jamky. Po dopipetovaní (treba dávať pozor na prítomnosť bublín), bola platnička stočená na centrifúge, následne umiestnená do termocykléra na denaturáciu (95 °C po dobu 2 minút), po uplynutí ktorej, boli vzorky ochladené v ľadovom kúpeli.

#### Fragmentačná analýza:

Platnička po denaturácii a schladení bola vložená do prístroja ABI-PRISM 3130 a bola spustená fragmentačná analýza. Podmienky elektroforézy:

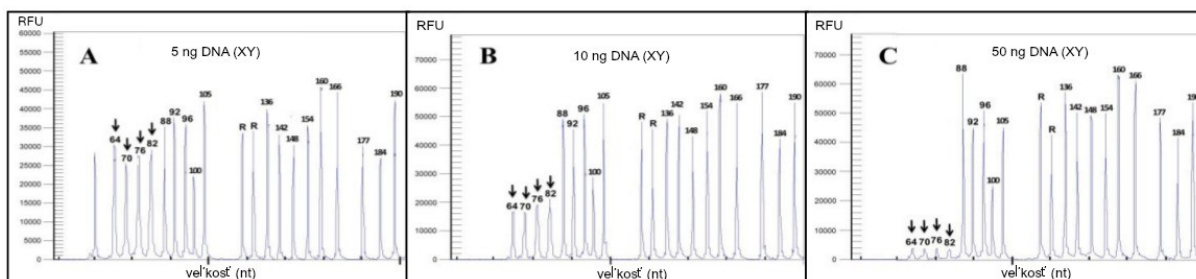
Počiatkové napätie vstrekovania: 1,6 kV  
Načasovanie vstrekovania: 15 sekúnd  
Doba trvania analýzy: 28 minút  
Priemerné napätie: 15 kV  
Teplota: 60 °C

Výstupné dáta digitalizované Foundation Data Collection softwarom 3.1.1 boli spracované programom GeneMapper 4.1, čím boli získané elektroforetogramy prislúchajúce jednotlivým vzorkám. Príklad takto získaného elektroforetogramu vid' Obrázok 6.



Obrázok 6: Príklad elektroforetogramu získaného analýzou dát MLPA softwarom GeneMapper 4.1. Ose x - detegované fragmenty usporiadané podľa veľkosti (nt), osa y - relatívna fluorescencia (RFU).

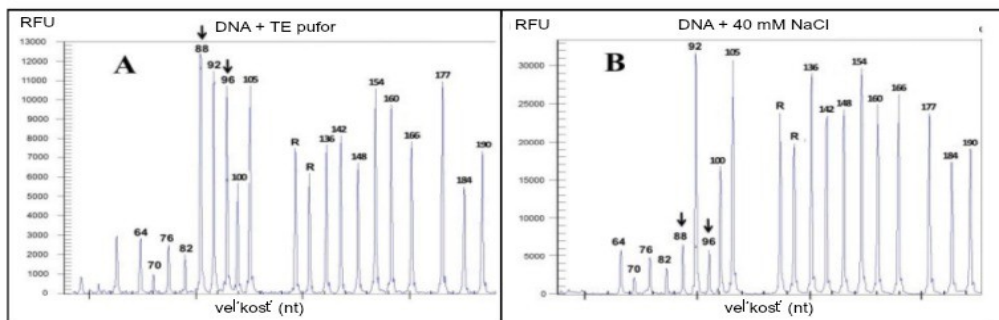
Získané elektroforetogramy umožňujú tiež vizuálne hodnotenie kontrolných fragmentov. Štyri Q fragmenty (Quantity) vypovedajú o tom, či bolo k MLPA analýze použité dostatočné množstvo DNA a tiež, či ligácia prebehla úspešne. Čím viac DNA je vo vzorke, tým slabšie sa Q-próby amplifikujú a tým slabší fluorescenčný signál je detegovaný (Obr. 7). Q-fragmenty sú nízke aj v prípade zlyhania ligačnej reakcie.



Obrázok 7: Vplyv množstva DNA na intenzitu signálu Q-fragmentov.

A. 5 ng DNA, B. 10 ng DNA, C. odporúčaných 50 ng (upravené podľa MRC-Holland: MLPA, 2014a)

Dva D-fragmenty (Denaturation) vypovedajú o denaturácii DNA. D-próby hybridizujú so sekvenciami lokalizovanými v CpG ostrovčekoch DNA, ktoré z dôvodu vysokého obsahu CG bazí ťažko denaturujú. Preto ak denaturácia nie je dostatočná, D-próby vôbec, alebo len obmedzene hybridizujú s cieľovou sekvenciou a D-fragmenty vykazujú nízku intenzitu detegovanej fluorescencie (Obr. 8).

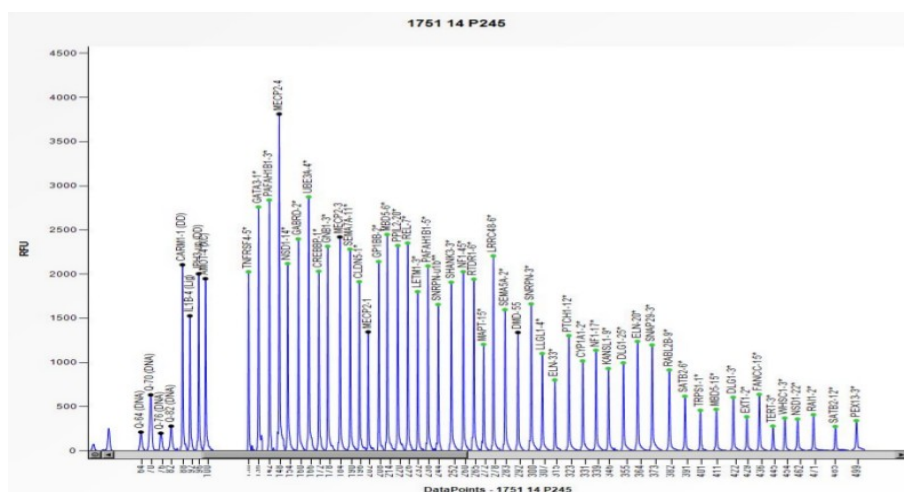


Obrázok 8: Efekt úrovne denaturácie DNA na intenzitu signálov D-fragmentov.  
 A. Kompletná, B. nekompletná denaturácia (indukovaná pridaním 100 mM NaCl)  
 (upravené podľa MRC-Holland: MLPA, 2014a)

### 5.3 Analýza dát softwarom Coffalyser.Net

Dáta boli ďalej analyzované špecializovaným softwarom Coffalyser.Net, ktorý bol vyvinutý firmou MRC-Holland špeciálne na analýzu MLPA dát. Táto analýza pozostáva z fragmentačnej a komparatívnej analýzy.

Cieľom fragmentačnej analýzy je identifikovať jednotlivé fragmenty na základe ich veľkostí a následne ich priradiť jednotlivým testovaným sekvenciám. Výsledkom je tzv. fragmentačný profil vzorky (Obr. 9). V neposlednej rade je vykonaná kontrola kvality analýzy, ktorá hodnotí jednotlivé kroky, od prípravy vzorky DNA, MLPA reakcie, separácie fragmentov kapilárnou elektroforézou až po identifikáciu fragmentov (Obr. 10).



Obrázok 9: Fragmentačný profil vzorky DNA. Na ose x sú fragmenty usporiadané na základe ich veľkosti (nt), osa y zobrazuje namerané intenzity fluorescence (RFU).

	sample name	sample type	digest	FRSS	FMRS	probes	DNA	DD	X	Y
1	Promega-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
2	R202-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
3	R203-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
4	R204-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
5	R205-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
6	R207-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
7	R208-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
8	R209-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
9	R210-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
10	R211-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			44/45				
11	R212-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
12	R213-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
13	R214-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
14	R215-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				
15	R216-P034-A2-0508-VR...	sample	<input type="checkbox"/>			45/45				

Obrázok 10: Snímka obrazovky zobrazujúca výsledky kontroly kvality analýzy softwarom Coffalyser.Net (obrázok prevzatý z Coffa *et van den Berg*, 2011). Parameter FRSS (Fragment Run Separation Score) vypovedá o kvalite separácie fragmentov kapilárnou elektroforézou, parameter FMRS (Fragment MLPA Reaction Score) o kvalite prevedenej MLPA reakcie. Kolónka Probes zobrazuje počet identifikovaných a očakávaných signálov, kolónka DNA vypovedá o koncentrácii DNA, DD o kvalite denaturácie DNA. Posledné dva stĺpce (X, Y) vypovedajú o prítomnosti X a Y fragmentov.

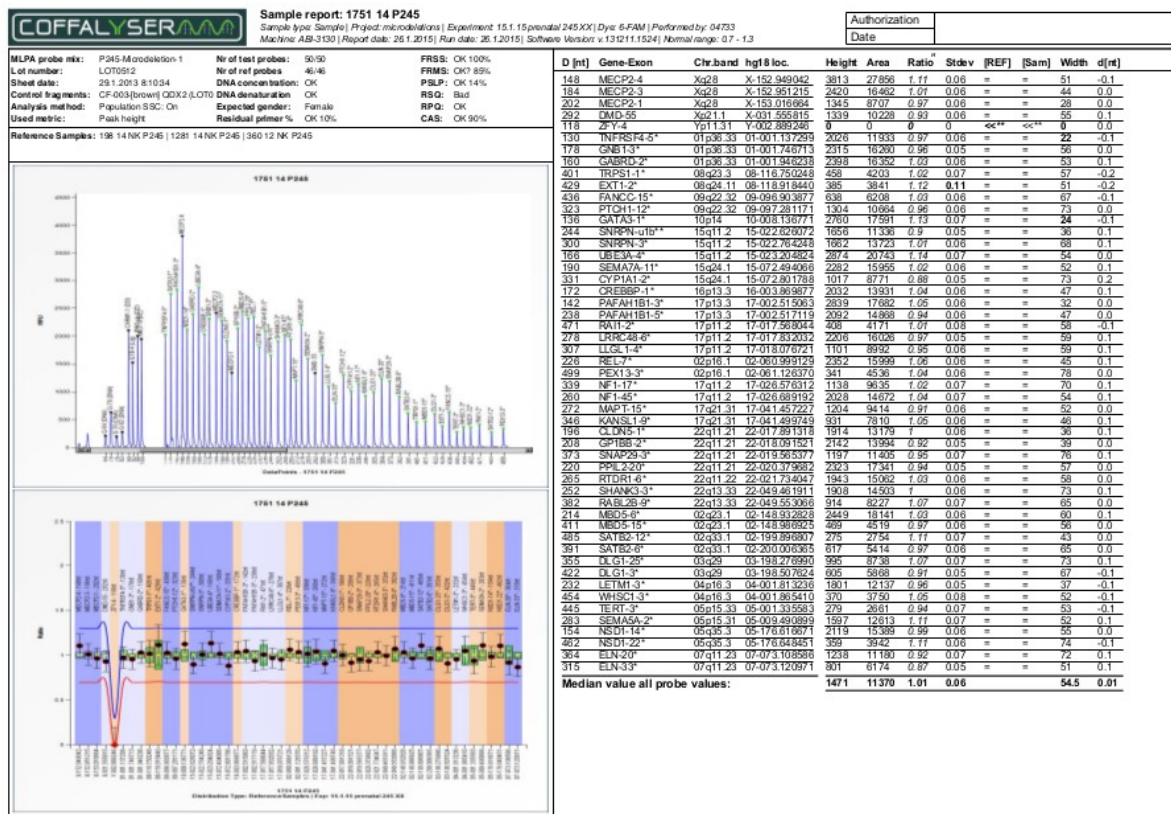
Komparatívna časť analýzy zahŕňa dva normalizačné kroky, výsledkom ktorých je výpočet tzv. dosage quotient (DQ) jednotlivých prób, ktorý vyjadruje pomer nameranej intenzity fluorescenčného signálu (vypovedá o prítomnosti cieľovej sekvencie) u testovanej a referenčnej vzorky. Referenčné vzorky vyberáme tak, aby boli diploidné pre všetky testované cieľové sekvencie. Ich kvalita je pre výsledok celej analýzy kľúčová. Okrem toho sa odporúča, aby DNA referenčných vzoriek bola izolovaná z toho istého biologického materiálu, aký bol použitý pri izolácii DNA testovaných vzoriek. Hodnoty DQ jednotlivých prób v rozmedzí 0,7 – 1,3 sú považované za normálne (odpovedajú diploidnému stavu). Hodnoty nad 1,3 zodpovedajú znásobeniu, teda duplikácii cieľových sekvencií, hodnoty pod 0,7 naopak ich delácii (Tab. 16) (MRC-Holland: MLPA, 2010).



Tabuľka 16: Interpretácia hodnôt DQ  
(upravené podľa MRC-Holland: MLPA, 2010)

Hodnota DQ	Interpretácia
0,7 – 1,3	Normálny diploidný stav
0	Homozygotná delécia
0,4 – 0,65	Heterozygotná delécia
1,35 – 1,65	Heterozygotná duplikácia
1,7 – 2,15	Homozygotná duplikácia

Finálny výstup analýzy je možné zobrazit' vo forme súhrnnej správy (Obr. 11).



Obrazok 11: Výsledná súhrnná správa získaná analýzou dát programom Coffalyser.Net.

Záhlavie obsahuje informácie o čísle a type vzorky (testovaná / referenčná), použitom probemixe, kvalite prevedenia analýzy a zoznam referenčných vzoriek využitých v rámci komparatívnej analýzy. Správa obsahuje fragmentačný profil vzorky a tiež graf zobrazujúci

hodnoty DQ prób jednotlivých lokusov a nakoniec súhrnnú tabuľku s informáciami o veľkosti produktov amplifikácie jednotlivých prób, lokusoch, ktorým zodpovedajú, nameranej intenzite fluorescencie (veľkosť a plocha pík) a vypočítaných hodnotách DQ.

Analýzu dát softwarom GeneMapper 4.1 a Coffalyser.Net prevádzala RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D.

## 6 Výsledky

### 6.1 MLPA analýza vzoriek DNA plodov s neúspešnou kultiváciou

V rámci tejto skupiny bolo testovaných 17 vzoriek DNA plodov, ktorých kultivácia pre účely karyotypizácie zlyhala (Tab. 17 - Prílohy). U žiadnej z týchto vzoriek MLPA nedetegovala prítomnosť chromozomálnej aberácie (Tab. 18).

Tabuľka 18: Súhrnná tabuľka výsledkov MLPA analýz vzoriek DNA plodov, ktorých kultivácia zlyhala

Číslo vzorky	Výsledok MLPA analýzy				
	P036	P070	P182	P311	P245
1751/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
2217/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	-
1031/12	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
1538/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
71/12	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
1043/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	-
1/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
16/13	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
17/13	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
2201/14	bez nálezu	bez nálezu	bez nálezu	-	-
2202/14	bez nálezu	bez nálezu	bez nálezu	-	-
221/13	bez nálezu	bez nálezu	-	-	-
1703/13	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
2009/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
1970/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
930/13	bez nálezu	bez nálezu	-	-	bez nálezu
1462/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	bez nálezu

### 6.2 MLPA analýza vzoriek DNA plodov s patologickým cytogenetickým nálezom

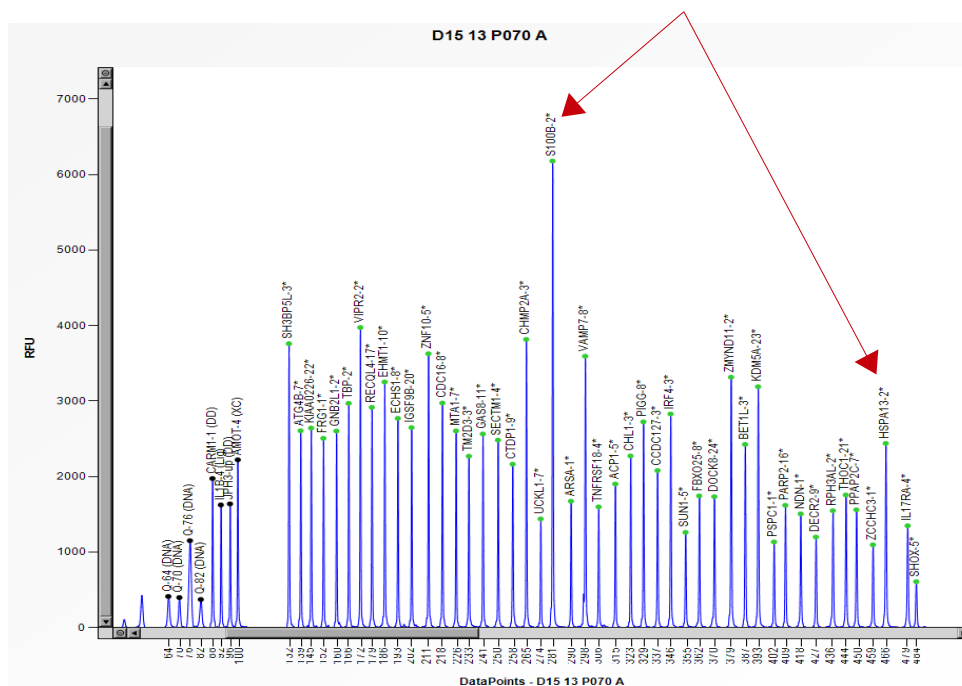
V tejto skupine bolo testovaných 14 vzoriek DNA plodov, u ktorých karyotypizácia detegovala aberantné cytogenetické nálezy (Tab. 19 - Prílohy). MLPA bola v týchto prípadoch verifikovaná a v troch prípadoch bola použitá k dovyšetreniu cytogenetického nálezu.

MLPA úspešne detegovala všetky prípady aneuploidii (6) (Obr. 12 - 18), u mozaik (4) bola úspešnosť detekcie závislá na zastúpení aberantného klonu, popr. kontaminácii maternálnou DNA (Obr. 19 a 20). Nepodarilo sa jej detegovať prípad triploidie (69,XXY) (Obr. 21 a 22). V rámci dovyšetrovania patologických cytogenetických nálezov, bola MLPA použitá k zisťovaniu pôvodu marker chromozómu (Obr. 23), testovaniu vzorky s deléciou 13, u ktorej upravila nález z terminálnej delécie na intersticiálnu a v prípade inverznej duplikácie detegovala deléciu terminálnej časti 8p23.3 a zároveň odhalila, že gén *GATA4* nie je do prestavby zahrnutý (Obr. 24-27). Prehľad výsledkov MLPA analýz vzoriek vid' Tab. 20. Všetky výsledky boli overené inými metódami (FISH, QF-PCR, alebo array CGH) a výsledok bol v zhode s výsledkami metódy MLPA.

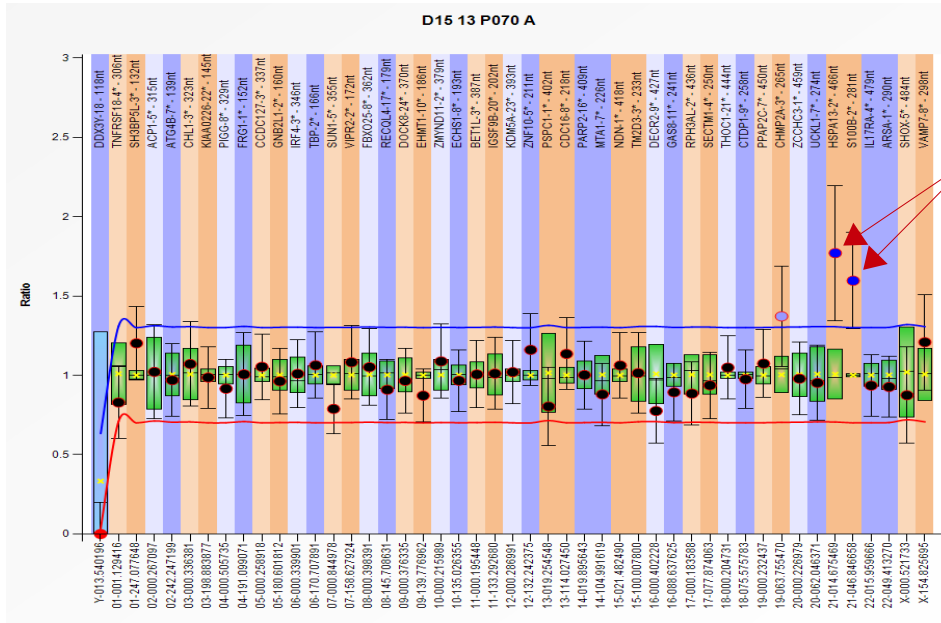
Tabuľka 20: Súhrnná tabuľka výsledkov MLPA analýzy vzoriek DNA plodov s cytogenetickým nálezom

Číslo vzorky	Karyotypizácia	Výsledok MLPA analýzy				Poznámka - prečo MLPA nedetegovala patologický nález
		P036	P070	P182	P311	
15/13	47, XX,+21	<b>nález</b> (trizómia 21)	<b>nález</b> (trizómia 21)	<b>nález</b> (trizómia 21)	-	-
273/14	47, XX,+21	<b>nález</b> (trizómia 21)	<b>nález</b> (trizómia 21)	<b>nález</b> (trizómia 21)	-	-
1135/13	47, XX,+21	<b>nález</b> (trizómia 21)	<b>nález</b> (trizómia 21)	<b>nález</b> (trizómia 21)	-	-
1548/13	47, XX,+18	<b>nález</b> (trizómia 18)	<b>nález</b> (trizómia 18)	<b>nález</b> (trizómia 18)	-	-
212/13	47, XX,+15 [12]/46,XX[2]	<b>nález</b> (trizómia 15)	<b>nález</b> (trizómia 15)	<b>nález</b> (trizómia 15)	-	-
741/12	45,X	<b>nález</b> (monozómia X)	<b>nález</b> (monozómia X)	-	-	-
1046/14	46, XX,i(5p)/ 46,XX 30 % mozaika	bez nálezu	bez nálezu	-	-	kontaminácia maternálnou DNA
59/13	47,XX,+22/ 46,XX 25% mozaika	náznak prítomnosti mozaiky trizómie 22	bez nálezu	bez nálezu	-	malá mozaika
1329/13	47,XX,+18[2]/ 46,XX[20]	bez nálezu	bez nálezu	bez nálezu	-	malá mozaika

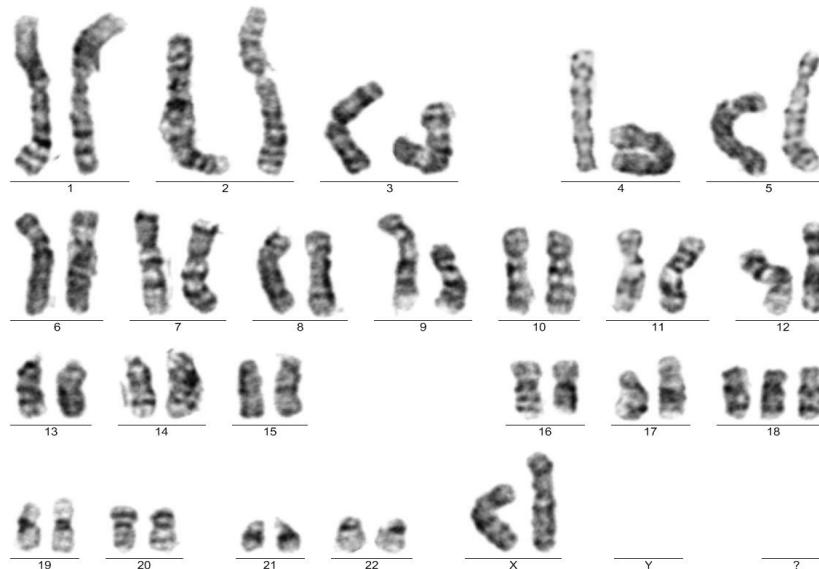
Číslo vzorky	Karyotypizácia	Výsledok MLPA analýzy				Poznámka - prečo MLPA nedetegovala patologický nález
		P036	P070	P182	P311	
1406/14	46,XX,der(1)[4]/46,XX[9]	bez nálezu	bez nálezu	bez nálezu	-	kultivačný artefakt (potvrdilo aj vyšetrenie FISH)
890/11	69,XXY	bez nálezu	bez nálezu	-	-	MLPA neschopná detekcie polyploidíí
1379/13	46,X,+ marker chromozóm	<b>nález</b> (monozómia X)	<b>nález</b> (monozómia X)	<b>nález</b> (monozómia X)	-	-
506/14	46,XY, del(13) (q31.13 q33.3)	bez nálezu	bez nálezu	-	-	MLPA nedeteguje interstiálne prestavby
735/12	46,XX, inv.dup(8) (p23.1p21.2)	<b>nález</b> <b>del(8)(p23.3)</b>	<b>nález</b> <b>del(8)(p23.3)</b>	-	bez nálezu	P311 nezachytila del(8)(p23.3), pretože testovaný lokus GATA4 nie je zakomponovaný do prestavby



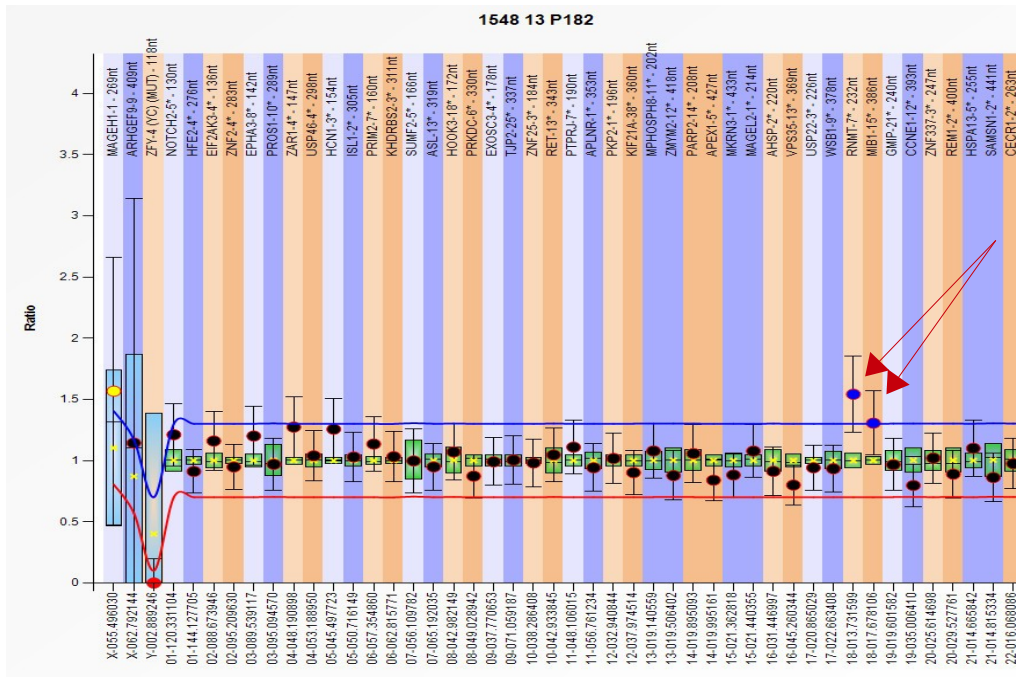
Obrázok 12: Fragmentačný profil (Coffalyser.Net) vzorky 15/13 testovanej kitom P070. Šípky označujú píky prób chromozómu 21. Obe próby vykazujú v porovnaní s referenčnými vzorkami zvýšenú úroveň detegovanej fluorescence (RFU), čo odpovedá trizómii 21 chromozómu.



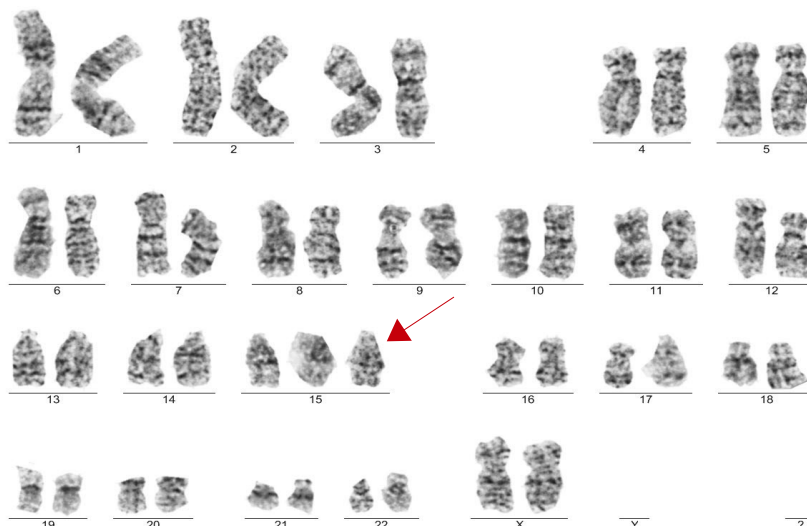
Obrázok 13: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prôb získaných testovaním vzorky 15/13 kitom P070. Šípkami sú označené prôby chromozómu 21, ktorých hodnoty DQ odpovedajú trizómii chromozómu 21.



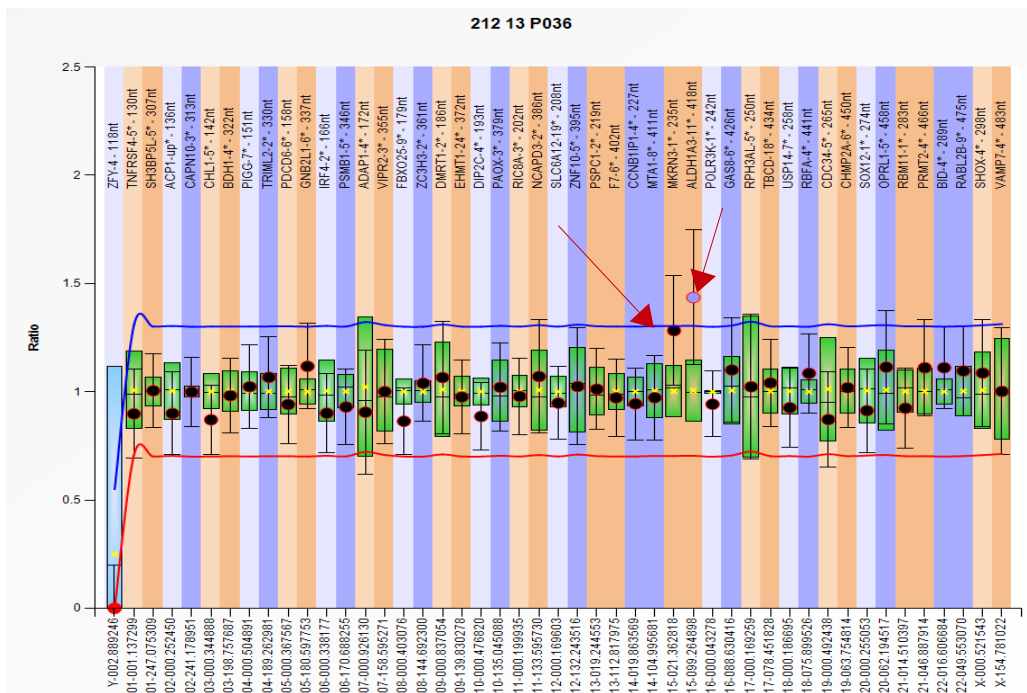
Obrázok 14: Karyotyp vzorky 1548/13. Šípka označuje detegovanú trizómiu 18 (Foto poskytla RNDr. Pavlína Čápková, Ph.D., Ústav lekárskej genetiky FN Olomouc).



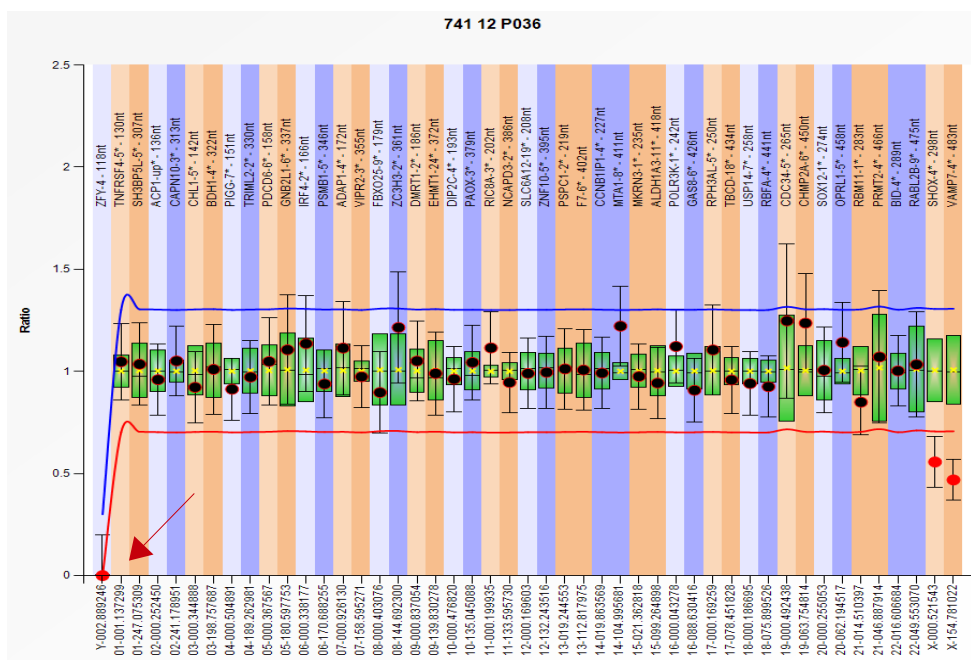
Obrázok 15: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaných testovaním vzorky 1548/13 kitom P182. Hodnoty DQ prób testujúcich centromerickú oblasť chromozómu 18 (vyznačené šípkami) potvrdzujú prítomnosť troch kópií tohto chromozómu.



Obrázok 16: Karyotyp vzorky 212/13. Šípka označuje detegovanú trizómiu chromozómu 15. (Foto poskytla RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D., Ústav lekárskej genetiky FN Olomouc).

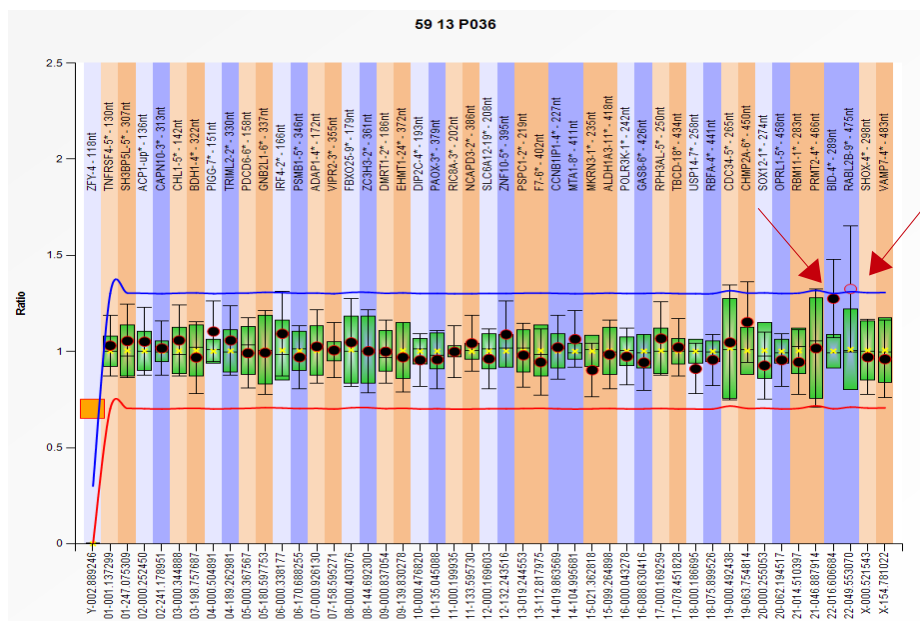


Obrázok 17: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaných testovaním vzorky 212/13 kitom P036. Hodnoty DQ prób chromozómu 15 (označené šípkami) potvrdzujú prítomnosť troch kópií tohto chromozómu.

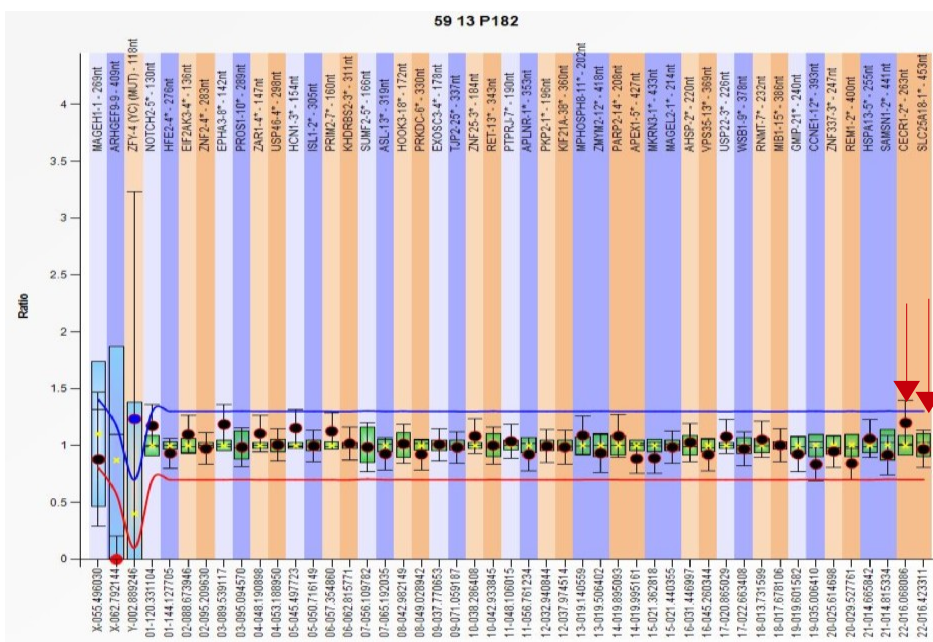


Obrázok 18: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaných testovaním vzorky 741/12 kitom P036. Hodnoty DQ prób chromozómu X (vyznačené červené) potvrdzujú prítomnosť iba jednej kópie tohto chromozómu. Prôba pre chromozóm Y (označená šípkou) vykazuje nulovú hodnotu DQ. Z toho vyplýva, že ide o prípad monozómie X.

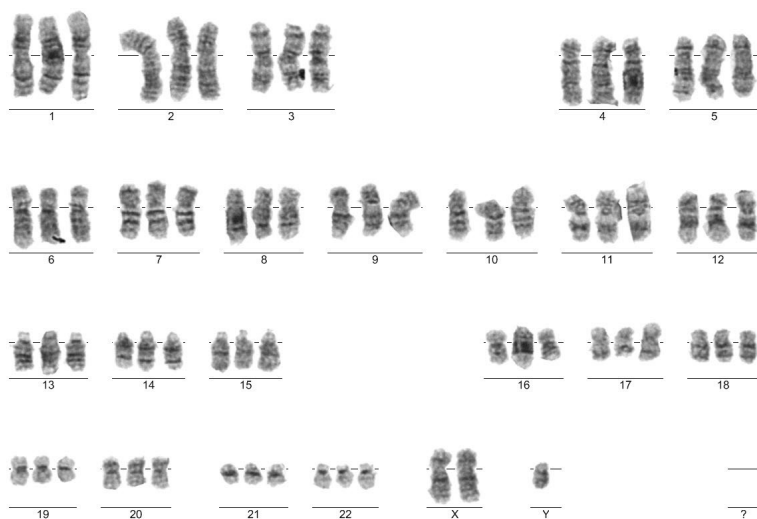




Obrázok 19: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaných testovaním vzorky 59/13 kitom P036. Hodnoty DQ prób chromozómu 22 (označené šípkou) sú mierne zvýšené (náznak mozaiky trizómie 22).

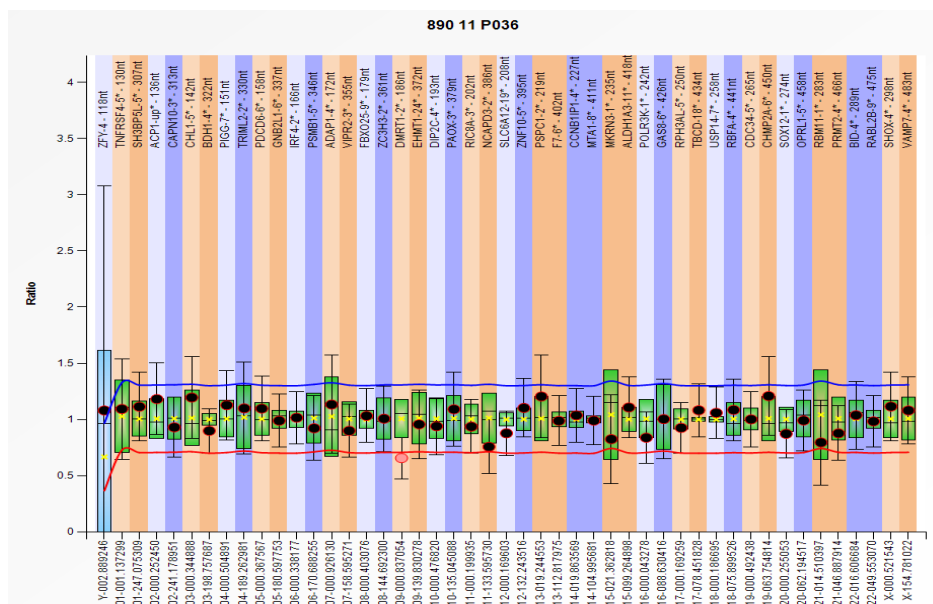


Obrázok 20: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaných testovaním vzorky 59/13 kitom P182. Hodnoty DQ prób chromozómu 22 (označené šípkou) sú v norme, nevytvádzajú o prítomnosti mozaiky trizómie 22.



Obrázok 21: Karyotyp vzorky 890/11 - detekcia triploidie 69,XXY.

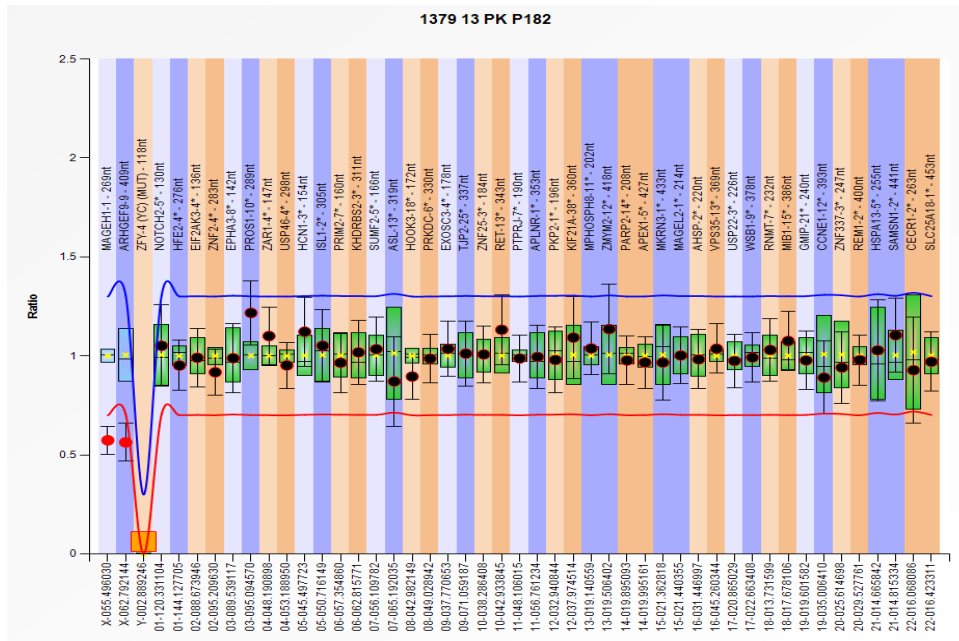
(Foto poskytla RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D., Ústav lekárskej genetiky FN Olomouc).



Obrázok 22: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prôb získaných testovaním vzorky 890/11 kitom P036. Žiadna z prôb nedosahuje hodnoty DQ mimo rozmedzie odpovedajúce fyziologickému stavu.

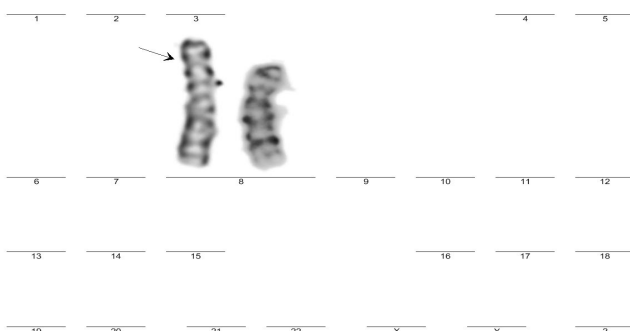
V prípade vzorky 1379/13 s cytogenetickým nálezom (46,X,+ marker chromozóm) bola MLPA použitá k zisťovaniu pôvodu marker chromozómu. Vzorka bola testovaná subtelomerickými kitmi P036, P070 a centromerickým kitom P182 (Obr. 23), pričom všetky detegovali monozómiu X. Nepotvrdila sa tak hypotéza o X-pôvode marker chromozómu a

výsledok analýzy vzorky kítom P181 zároveň naznačil, že by sa mohlo jednať o prípad neocentromerického marker chromozómu.



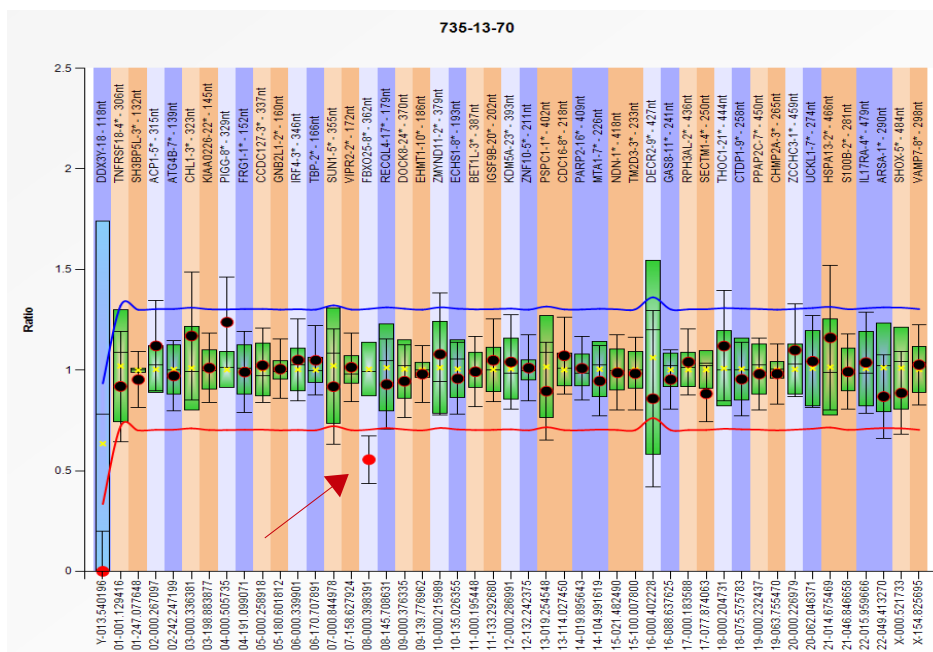
Obrázok 23: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získané testovaním vzorky 1379/13 kítom P070. Hodnota DQ próby chromozómu Y (oranžový štvorec) vykazuje nulovú hodnotu. DQ prób centromerickej oblasti chromozómu X (vyznačené červene) zodpovedajú prítomnosti iba jednej kópie X chromozómu.

U vzorky 735/15 s patologickým cytogenetickým nálezom inv.dup(8)(p23.1p21.2) (Obr. 24) MLPA analýza kítmi P036 a P070 detegovala mikrodélcú oblasti 8p23.3 (Obr. 25). Následná analýza vzorky kítom P311, ktorý obsahuje próby testujúce sekvencie génu *GATA4* nachádzajúcom sa v oblasti 8p23.3, ale zmenu tohto génu nezachytila. Prítomnosť *GATA4* bola potvrdená aj FISH vyšetrením na metafáznych chromozómoch. Z toho vyplýva, že tento gén nebol do prestavby zahrnutý. Schéma možného vzniku inv.dup(8)(p23.1p21.2) je zachytená na Obr. 26.

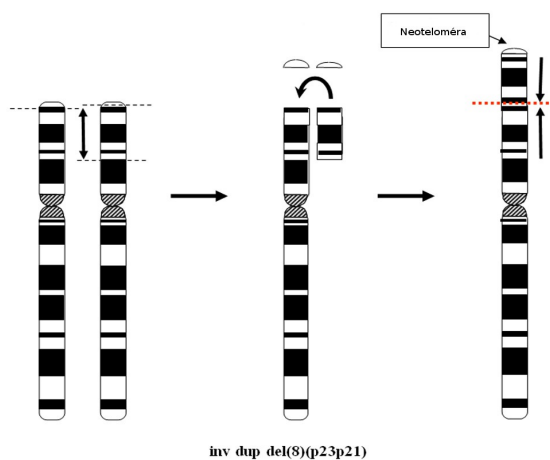


Obrázok 24: Cytogenetický nález inverznej duplikácie na chromozóme 8 inv.dup(8)(p23.1p21.2)

(Foto poskytl RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D., Ústav lekárskej genetiky FN Olomouc).

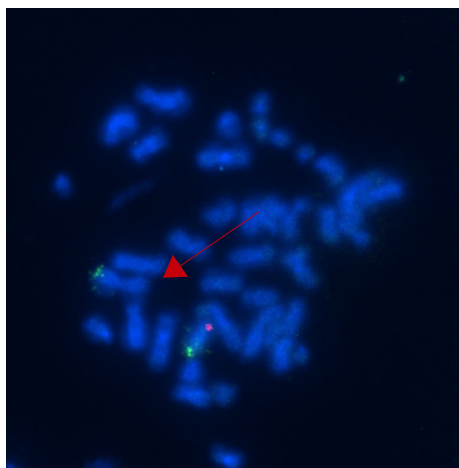


Obrázok 25: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaných testovaním vzorky 735/15 kítom P070. Hodnota DQ prírody regiónu 8p23.3 (vyznačená šípkou) vypovedá o heterozygotnej mikrodélcii tejto oblasti.



Obrázok 26: Schéma možného vzniku inv.dup(8)(p23.1p21.2) (upravené podľa Campus Génétique médicale, 2012).

Nález delécie del(8)(p23.3) bol potvrdený FISH analýzou na metafáznych chromozómoch (Obr. 27) (výsledok FISH analýzy poskytla RNDr. P. Čapková, Ph.D.).



Obrázok 27: Snímka FISH vyšetrenia vzorky 735/13 za použitia subtelomerických prôb pre chromozóm 8. Chýbanie signálu v subtelomerickej oblasti 8p23.3 (šípka) potvrdzuje prítomnosť delécie v tejto oblasti.

(Foto poskytla RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D.,  
Ústav lekárskej genetiky FN Olomouc).

### 6.3 MLPA analýza vzoriek DNA plodov s normálnym karyotypom

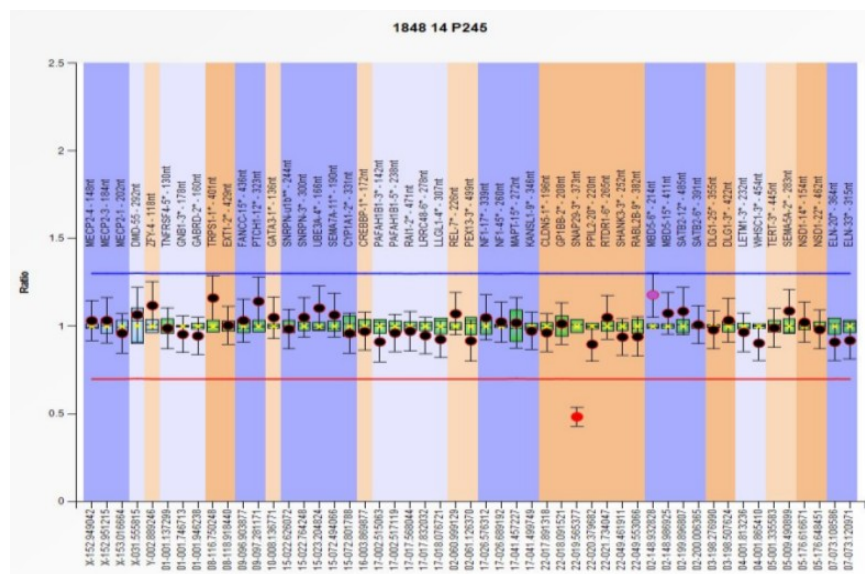
V tejto skupine bolo analyzovaných 21 vzoriek (Tab. 21 - Prílohy). U 19 z nich MLPA analýza, rovnako ako karyotypizácia, nedetegovala žiadne chromozomálne aberácie, u dvoch vzoriek bola kitom P245 zaznamenaná delécia v oblasti 22q11.2 (Tab. 22).

Tabuľka 22: Súhrnná tabuľka výsledkov MLPA analýzy vzoriek DNA plodov s normálnym karyotypom

Číslo vzorky	Výsledok MLPA analýzy				
	P036	P070	P311	P245	P250
350/15	bez nálezu	bez nálezu	<b>nález del(22)(q11.2)</b>	<b>nález del(22)(q11.2)</b>	<b>nález del(22)(q11.2)</b>
1848/14	bez nálezu	bez nálezu	-	<b>nález delSNAP29</b>	<b>nález delSNAP29</b>
1818/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
1783/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
236/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	-
1507/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	-
1856/14	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
287/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
911/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
1910/14	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
294/14	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-

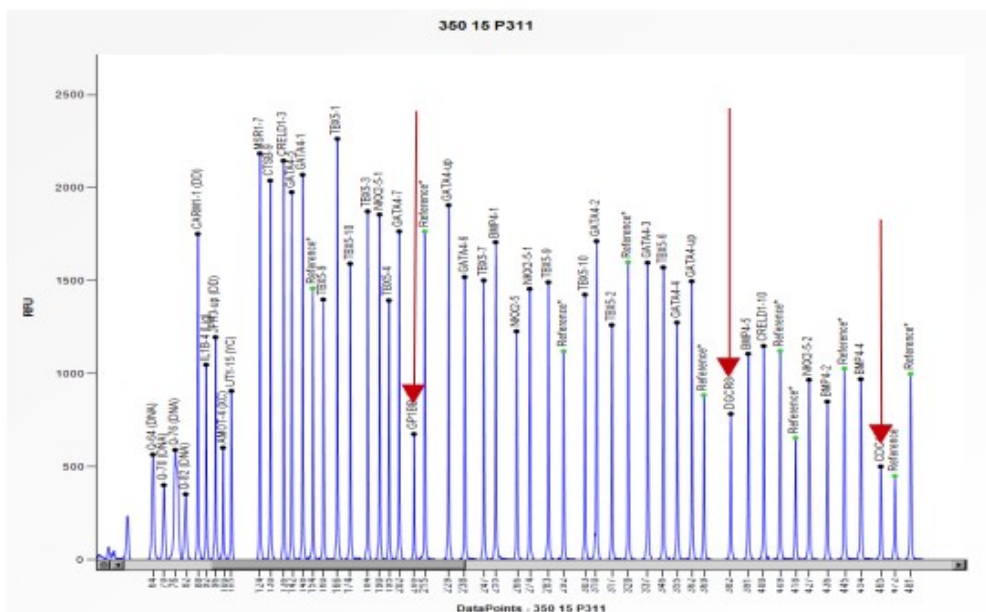
Číslo vzorky	Výsledok MLPA analýzy				
	P036	P070	P311	P245	P250
685/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
1790/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
963/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
1596/14	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
33/14	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
501/14	bez nálezu	bez nálezu	-	-	-
1293/14	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
367/13	bez nálezu	bez nálezu	bez nálezu	bez nálezu	-
161/13	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-
141/15	bez nálezu	bez nálezu	-	bez nálezu	-

Delécia v oblasti 22q11.2, konkrétne v géne *SNAP29* bola detegovaná u vzorky 1848/14 pri jej analýze kitom P245 (Obr. 28). Prítomnosť delécie bola overená kitom P250.

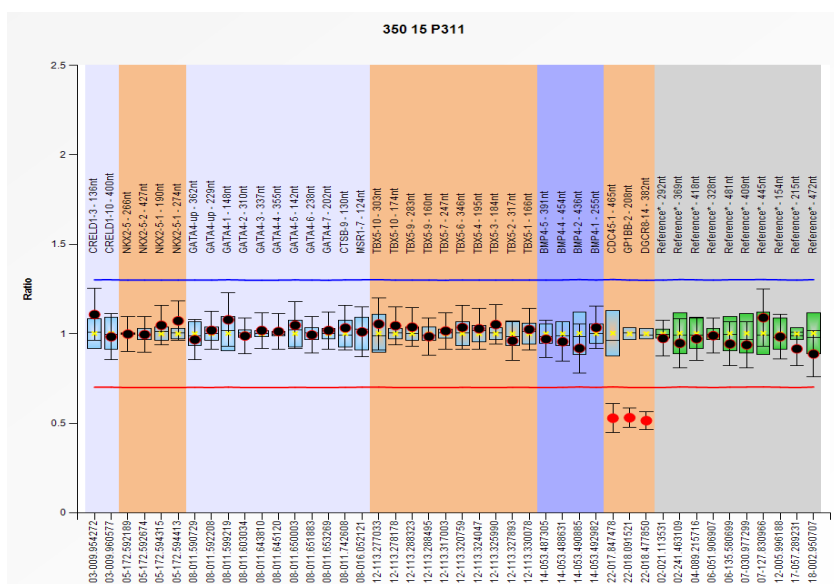


Obrázok 28: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaných testovaním vzorky 1848/14 kitom P245. Hodnota DQ prôby pre gén *SNAP29* v oblasti 22q11.21 (vyznačená červene), vypovedá o heterozygotnej delécii tohto génu.

Aj v prípade vzorky 350/15 bola delécia v oblasti 22q11.2 detegovaná kitom P245. Táto delécia bola o niečo rozsiahlejšia a zasiahla väčší počet génov. Rozsah delécie bol upresňovaný kitmi P311 (Obr. 29, 30) a P250 (Obr. 31).

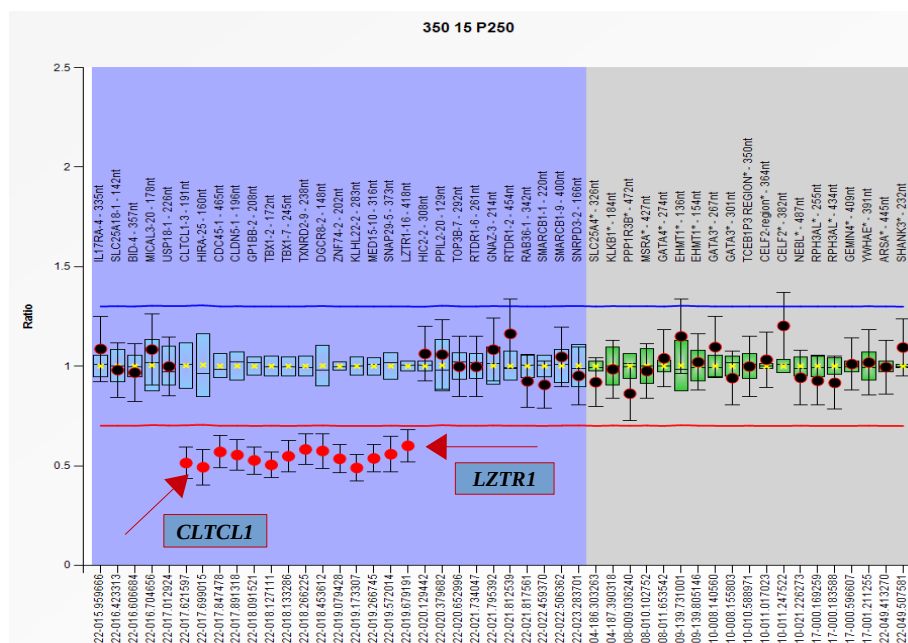


Obrázok 29: Fragmentačný profil (Coffalyser.Net) vzorky 350/15 testovanej kítom P311. Šípky označujú píky prób testujúcich gény (*CDC45*, *GP1BB*, *DGCRB*) oblasti 22q11.21. Všetky vykazujú v porovnaní s referenčnými vzorkami zníženú intenzitu fluorescence (RFU), ktorá zodpovedá heterozygotnej delécii.



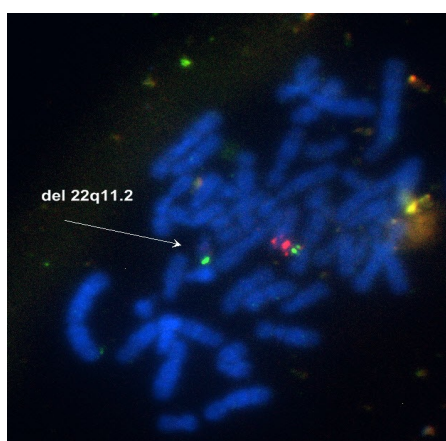
Obrázok 30: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaný testovaním vzorky 350/15 kítom P311. Próby pre gény (*CDC45*, *GP1BB*, *DGCRB*) oblasti 22q11.21 sú označené červene a ich DQ sa pohybuje okolo hodnoty 0,5, čo odpovedá heterozygotnej delécii.

Analýzou vzorky 350/15 kitom P250 bolo určené, že rozsah danej delécie je vymedzený génmi *CLTCL1* až *LZTR1* (Obr. 31).



Obrázok 31: Graf (Coffalyser.Net) zobrazujúci hodnoty DQ jednotlivých prób získaných testovaním vzorky 350/15 kitom P250. Hodnoty DQ prób testujúcich oblasť 22q11.21, ktoré potvrdzujú prítomnosť heterozygotnej delécie tejto oblasti sú označené červene.

Nález delécie v oblasti 22q11.2 bol overovaný FISH analýzou na metafáznych chromozómoch (Obr. 32) (výsledok FISH analýzy poskytla RNDr. P. Čapková, Ph.D.).



Obrázok 32: Snímka FISH vyšetrenia vzorky 350/15, chýbajúci červený signál FISH próby TUPLE1 pre oblasť 22q11.2 potvrdzuje prítomnosť mikrodélécie v tejto oblasti.

(Foto poskytla RNDr. Pavlína Čapková, Ph.D., Ústav lekárskej genetiky FN Olomouc).



## 7 Diskusia

Z celkového počtu 52 testovaných vzoriek DNA, u 17 z nich došlo k zlyhaniu kultivácie fetálnych buniek pre účely karyotypizácie, ktorá predchádzala samotnej DNA analýze vzoriek metódou MLPA. Zo zlyhaním kultivácie sa najčastejšie stretávame u vzoriek získaných biopsiou tkanív spontánne potratených, alebo mŕtvonarodených plodov. U týchto typov vzoriek sa objavuje v 20 - 60 % prípadov (Fritz *et al.*, 2001; Raca *et al.*, 2009; Reddy *et al.*, 2012b). Vplyv na úspešnosť kultivácie majú viaceré faktory: kvalita prevedenia biopsie, kontaminácia vzorky materskými bunkami či miera znehodnotenia tkaniva plodu v prípade, kedy medzi spontánnym potratom, resp. úmrtím plodu a samotným odberom prebehla určitá doba. Prítomnosť maternálnych buniek vo vzorke, z ktorej bola izolovaná DNA na MLPA analýzu, predstavuje riziko falošne negatívneho výsledku, prípadne detekcie zdanlivej mozaiky. U bioptického materiálu, ktorý sa získava kyretážou dutiny maternice po spontánnom, alebo umelom ukončení gravidity nie je možné overiť fetálny pôvod získaného materiálu pokiaľ nie je k dispozícii vzorka DNA matky. Vzorky potratových biopsií využité v rámci tejto diplomovej práce boli odoberané z rôznych pracovísk spádovej oblasti, medzi ktorými sa kvalita odberu líši a mohla byť preto dôvodom zlyhania kultivácie. Príčinou zlyhania kultivácie môžu byť ale tiež rozsiahle chromozomálne abnormality plodu, v dôsledku ktorých sú fetálne bunky prakticky neživotné a na médiu nerastú, alebo rastú len veľmi málo. Ak navyše pri odbere plodových buniek došlo ku kontaminácii vzorky materskými bunkami, budú tie na médiu rásť podstatne lepšie a to až do takej miery, že môžu prerásť plodové bunky (Bell *et al.*, 1999).

MLPA analýza vzoriek s neúspešnou kultiváciou neidentifikovala chromozomálnu aberáciu u žiadnej zo vzoriek. U všetkých vzoriek bola prevedená QF-PCR so zameraním na aneuploidie 13, 18, 21, gonozómov a triploidie (výsledky poskytla RNDr. P. Čapková, Ph.D.), výsledky ktorej boli v zhode s výsledkami MLPA analýzy. Navyše tri zo vzoriek boli podrobené celogenómovej array CGH analýze (výsledky poskytla RNDr. P. Čapková, Ph.D.) s nálezom odpovedajúcim normálnemu karyotypu, čím sa potvrdila správnosť výsledku MLPA analýzy. Avšak vzhľadom na to, že ani jedna z týchto metód nie je schopná detegovať balancované prestavby, (Bruno *et al.*, 2006; Caramins *et al.*, 2011; Diego-Alvarez *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2001) nemožno celkom vylúčiť možnosť ich prítomnosti v bunkách plodov. Okrem toho u vzoriek testovaných iba metódou MLPA (bez potvrdenia výsledku array CGH

analýzou) nemožno vylúčiť ani to, že mimo použitého súboru prób neleží chromozomálna aberácia.

V skupine vzoriek s patologickým cytogenetickým nálezom identifikovaným karyotypizáciou, bolo testovaných 14 vzoriek DNA. Presnosť detekcie aneuploidií metódou MLPA bola potvrdená mnohými štúdiami (Gerdes *et al.*, 2005; Gerdes *et al.*, 2008; Hochstenbach *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2014; Chitty *et al.*, 2012; Kooper *et al.*, 2009; van Opstal *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013) a aj v rámci tejto práce MLPA správne detegovala všetkých 6 jej prípadov. Nepodarilo sa jej ale spoľahlivo identifikovať ani jeden z prípadov chromozomálnych mozaik, resp. vzoriek kontaminovaných maternálnou DNA. Pri detekcii prípadov mozaicizmu pritom platí, že úspešnosť ich detekcie metódou MLPA je závislá na zastúpení aberantného klonu, ktoré musí byť vyššie než 30 % (Hochstenbach *et al.*, 2005; Kooper *et al.*, 2009). Okrem toho zlyhala pri detekcii triploidie (69,XXY). Na neschopnosť detekcie polyploidií metódou MLPA poukázali už mnohé štúdie (Bruno *et al.*, 2006; Caramins *et al.*, 2011; Diego-Alvarez *et al.*, 2007; Donaghue *et al.*, 2010; Hochstenbach *et al.*, 2005; Chitty *et al.*, 2012). Dôvodom je to, že sa jedná o metódu relatívnej kvantifikácie sekvencií DNA a preto nie je možné rozlíšiť diploidné XX a triploidné XXX bunky. U triploidií XXY a XYY existuje teoretická šanca ich záchytu, avšak prakticky k ich detekciám dochádza len veľmi zriedka (van Opstal *et al.*, 2009) a nepodarilo sa to ani v rámci tejto práce. U vzorky s monozómiou X spojenou s prítomnosťou marker chromozómu, MLPA správne detegovala prítomnosť jednej kópie chromozómu X, avšak pôvod marker chromozómu sa jej odhaliť nepodarilo. Okrem toho výsledok analýzy vzorky centromerickým kitom naznačil, že by sa mohlo jednať o prípad neocentromerického marker chromozómu. Tie definujeme ako malé nadpočetné marker chromozómy, u ktorých došlo vplyvom straty pôvodnej centroméry k *de novo* vzniku neocentroméry, pričom tá nie je definovaná  $\alpha$ -satelitnou DNA (Amor *et al.*, 2002). Takéto neocentroméry sú potom spoľahlivo detegovateľné pomocou značených protilátok proti centromerickým proteínom (napr. CENP-C, CENP-A,...) (Yu *et al.*, 2007). V prípade vzorky s cytogenetickým nálezom terminálnej delécie 13, jej dovyšetrenie metódou MLPA, ktorá nebola schopná túto deléciu zachytiť subtelomerickými kitmi, viedlo k oprave a upresneniu nálezu z terminálnej na intersticiálnu deléciu. Prítomnosť delécie 13 bola potvrdená aj array CGH analýzou (výsledky poskytla RNDr. P. Čapková, Ph.D.). Pri dovyšetrovaní vzorky s patologickým nálezom inv.dup(8) (p23.1p21.2) MLPA analýza detegovala mikrodeléciu v oblasti 8p23.3, zároveň však odhalila,

že gén *GATA4*, asociovaný s VVV srdca, lokalizovaný v tomto regióne deletovaný nie je a teda nie je zahrnutý ani do prestavby.

Poslednú testovanú skupinu tvorilo 20 vzoriek DNA plodov, ktorých vyšetrenie karyotypu neidentifikovalo žiadnu aberantnú chromozomálnu zmenu. Úlohou MLPA DNA analýzy bolo odhalenie prípadných kryptických nebalancovaných aberácií, ktoré sú mimo detekčného limitu štandardnej karyotypizácie. Vo vyšetrovanom súbore vzoriek odhalila MLPA prítomnosť aberácie v dvoch prípadoch. V oboch prípadoch sa jednalo o delécie v oblasti 22q11.2 (DiGeorgov syndróm), ktoré boli zachytené kitom P245. V prípade jednej vzorky išlo o deléciu jediného génu *SNAP29*, v druhom prípade o rozsiahlejšiu deléciu, ktorej presný rozsah (delécia v oblasti 22q11.2 ohraničená génmi *CLTCL1* - *LZTR1*) bol určený dovyšetrovaním vzorky kitom P250. Výskyt delécií v tejto oblasti je pomerne častý. Príčinou je niekoľko kópií LCR, ktoré sa v tu nachádzajú a medzi ktorými dochádza v priebehu meiotického delenia k nealelickej homologickej rekombinácii (Jalali *et al.*, 2008).

V súbore 52 testovaných vzoriek, MLPA spoľahlivo detegovala 7 prípadov aneuploidíí (tri trizómie 21, jednu trizómiu 15, jednu trizómiu 18 a dve monozómie X) a tri prípady kryptických delécií, z toho jednu subtelomerickú (8p23.3) a dve intersticiálne (22q11.2). Zatiaľ čo nálezy aneuploidíí sa zhodovali s výsledkom karyotypizácie, oba prípady kryptických intersticiálnych delécií boli identifikované u vzoriek s normálnym karyotypom. U vzorky s detegovanou subtelomerickou deléciou bola MLPA použitá k dovyšetrovaniu patologického cytogenetického nálezu inv.dup(8)(p23.1p21.2). Tieto výsledky korešpondujú s literárnymi údajmi vypovedajúcimi o veľmi citlivej a presnej detekcii aneuploidíí (Gerdes *et al.*, 2008; Hochstenbach *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2014; Chitty *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013) a tiež mikrodelécií vybraných chromozomálnych oblastí (submikroskopické oblasti, lokusy asociované s mikrodelečnými syndrómami, VVV srdca...), ktoré sú nedetegovateľné klasickou karyotypizáciou (Fernandez *et al.*, 2005; Jalali *et al.*, 2008; Northrop *et al.*, 2005; Roselló *et al.*, 2010; Stachon *et al.*, 2007). V súlade s literárnymi údajmi sú tiež nedetegované prípady mozaik s nízkym zastúpením abnormálnych buniek, resp. kontaminované maternálnou DNA, prípad triploidie a intersticiálnej delécie na chromozóme 13 (Kim *et al.*, 2015).

## 8 Záver

Štruktúrne, či numerické chromozomálne aberácie sú častou príčinou vrodených vývojových väd plodov, spontánnych potratov alebo mŕtvonarodených plodov. Zhrnutie základných poznatkov týkajúcich sa chromozomálnych aberácií s ktorými sa stretávame v rámci prenatalnej diagnostiky, ako aj prehľad metód využívaných k ich detekcii bol cieľom teoretickej časti tejto práce.

Experimentálna časť bola zameraná na metódu MLPA a potenciál jej využitia v rámci prenatalnej diagnostiky chromozomálnych aberácií. Analyzovaných bolo 52 vzoriek DNA, ktoré boli rozdelené do troch skupín: (I) vzorky plodov bez výsledku karyotypizácie z dôvodu zlyhania kultivácie fetálnych buniek, (II) vzorky s patologickým cytogenetickým nálezom identifikovaným karyotypizáciou a (III) vzorky s normálnym karyotypom.

MLPA analýza vzoriek (I) skupiny nepreukázala prítomnosť chromozomálnej aberácie ani u jednej zo vzoriek. V (II) skupine MLPA detegovala všetkých sedem prípadov aneuploidií a u dvoch vzoriek prispela k upresneniu cytogenetického nálezu. Prvým bol prípad komplexnej prestavby na krátkom ramienku chromozómu 8 kedy detegovala subtelomerickú del8p23.3 a druhým bola delécia na chromozóme 13, ktorá bola použitím metódy MLPA potvrdená ako intersticiálna. Nedetegované ostali prípady mozaik s nízkym zastúpením aberantných buniek, resp. kontaminované maternálnymi bunkami, prípad intersticiálnej delécie na chromozóme 13, triploidia 69,XXY a overenie pôvodu marker chromozómu. Tieto zlyhania metódy MLPA len dokazujú nenahraditeľnosť konvenčnej karyotypizácie v prenatalnej diagnostike. V (III) skupine vzoriek MLPA odhalila dva prípady kryptických delécií v oblasti 22q11.2, ktoré karyotypizácia nemohla identifikovať z dôvodu nízkeho rozlíšenia.

Celkovo teda metóda MLPA vo vyšetrovanom súbore vzoriek detegovala sedem prípadov aneuploidií a tri prípady kryptických aberácií, jednej subtelomerickej a dvoch intersticiálnych, ktoré neboli identifikované klasickou karyotypizáciou. Tieto výsledky sú v súlade s publikovanými literárnymi údajmi a potvrdzujú využiteľnosť techniky MLPA ako vhodnej doplnkovej metódy klasickej karyotypizácie, schopnej rýchlo a spoľahlivo detegovať submikroskopické delécie/duplikácie vybraných chromozomálnych oblastí a v prípade zlyhania kultivácie vylúčiť prítomnosť aneuploidií, či nebalancovaných prestavieb

zahŕňajúcich terminálne časti chromozómov. Jej detekčné limity sú však dané zastúpením aberantného klonu v prípade mozaiok, nemožnosťou odhaliť zmeny mimo testované lokusy a polyploidie.

## 9 Zoznam použitej literatúry

- Amor, D.J., Choo, K.A. (2002): Neocentromeres: role in human disease, evolution, and centromere study. *The American Journal of Human Genetics* 71: 695-714.
- Arrighi, F.E., Hsu, T.C. (1971): Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86.
- Arrighi, F.E., Saunders, P.P., Saunders, G.F., Hsu, T.C. (1971): Distribution of repetitive DNA in human chromosomes. *Experientia* 27: 964-966.
- Astbury, C., Christ, A.A., Aughton, D.J., Cassidy, S.B., Kumar, A., Eichler, E.E., Schwartz, S. (2004): Detection of deletions in *de novo* „balanced“ chromosome rearrangements: Further evidence for their role in phenotypic abnormalities. *Genetics in Medicine* 6: 81-89.
- Avery, Q.T., MacLeod, M.C., McCarty, M. (1944): Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of Experimental Medicine* 79: 137-158.
- Baumer, A., Balmer, D., Binkert, F., Schinzel, A. (2000): Parental origin and mechanisms of formation of triploidy: a study of 25 cases. *European Journal of Human Genetics* 8: 911–917.
- Bell, K., Van Deerlin, P., Haddad, B., Feinberg, R. (1999): Cytogenetic diagnosis of “normal 46,XX” karyotypes in spontaneous abortions frequently may be misleading. *Fertility and Sterility* 71: 334– 341.
- Benkhalifa, M., Kasakyan, S., Clement, P., Baldi, M., Tachdjian, G., Demiroglu, A., Gurgan, T., Fiorentino, F., Mohammed, M., Qumsiyeh, M.B. (2005): Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro. *Prenatal Diagnosis* 25: 894–900.
- Boormans, E.M., Birnie, E., Wildschut, H.I., Schuring-Blom, H.G., Oepkes, D., van Oppen, C.A., Nijhuis, J.G., Macville, M.V., Kooper, A.J., Huijsdens, K., Hoffer, M.V., Go, A., Creemers, J., Bhola, S.L., Bilardo, K.M., Suijkerbuijk, R., Bouman, K., Galjaard, R.J., Bonsel, G.J. van Lith, J. M. (2008): Multiplex ligation-dependent probe amplification versus

karyotyping in prenatal diagnosis: the MAKE study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 8: 18-21.

Boveri, T.H. (1904): Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. Gustav Fisher, Jena.

Boyd, Y., Cockburn, D., Holt, S., Munro, E., Van Ommen, G.J., Gillard, B., Affara, N., Ferguson-Smith, M., Craig, I.(1988): Mapping of 12 translocation breakpoints in the Xp21 region with respect to the locus for Duchenne muscular dystrophy. *Cytogenetics and Cell Genetics* 48: 28–34.

Bruno, D.L., Burgess, T., Ren, H., Nouri, S., Pertile, M.D., Francis, D.I., Norris, F., Kenney, B.K., Schouten, J., Choo, K.H., Slater, H.R.. (2006): High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using an MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for polyploidy. *American Journal of Medical Genetics* 140: 2786 – 2793.

Buckton, K.E., Spowart, G., Newton, M.S., Evans, H.J. (1985): Forty-four probands with an additional “marker” chromosome. *Human Genetics* 69: 353–370.

Callaway, J.L., Shaffer, L.G., Chitty, L.S., Rosenfeld, J.A., Crolla, J.A. (2013): The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype:a review of the literature. *Prenatal Diagnosis* 33: 1119-1123.

Caramins, M.C., Saville, T., Shakeshaft, R., Mullan, G.L., Miller, B., Yip, M.Y., Buckley, M.F. (2011): A comparison of molecular and cytogenetic techniques for the diagnosis of pregnancy loss. *Genetics in Medicine* 13: 46-51.

Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C. (1970): Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental Cell Research* 60: 315-319.

Cassidy, A.B., Whitworth, T., Sanders, D., Larber, C.A., Engel, E. (1977): Five month extrauterine survival in afemale triploid (69,XXX) child. *Annales de Génétique* 20: 277–279.

Cereda, A., Carey, J. C. (2012): The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 7: 81-83.

- Cirigliano, V., Lewin, P., Szpiro-Tapies, S., Fuster, C., Adinolfi, M. (2001): Assessment of new markers for the rapid detection of aneuploidies by quantitative fluorescent PCR (QF-PCR). *Annals of Human Genetics* 65: 421-427.
- Clifford, K., Rai, R., Watson, H., Regan, L. (1994): An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Human Reproduction* 9: 1328–1332.
- Coffa, J., van den Berg, J. (2011): Analysis of MLPA Data Using Novel Software Coffalyser.NET by MRC-Holland. INTECH Open Access Publisher.
- De Vries, B.B.A., Winter, R., Schinzel, A., Van Ravenswaaij-Arts, C. (2003): Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *Journal of Medical Genetics* 40: 385-398.
- Diego-Alvarez, D., de Alba, M.R., Cardero-Merlo, R., Diaz-Recasens, J., Ayuso, C., Ramos, C., Lorda-Sanchez, I. (2007): MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages. *Prenatal Diagnosis* 27: 765-771.
- DiGeorge, A.M. (1968): Congenital absence of the thymus and its immunologic consequences: concurrence with congenital hypoparathyroidism. *Birth Defects* 1: 116-121.
- Donaghue, C., Mann, K., Docherty, Z., Mazzaschi, R., Fear, C., Ogilvie, C. (2010): Combined QF-PCR and MLPA molecular analysis of miscarriage products: an efficient and robust alternative to karyotype analysis. *Prenatal diagnosis* 30: 133-137.
- Down, J.L.H. (1866): Observations on an ethnic classification of idiots. *London Clinical Lectures and Reports* 3: 259-262.
- Duba, H.C., Doll, A., Neyer, M., Erdel, M., Mann, C., Hammerer, I., Utermann, G., Grzeschik, K.H. (2002): The elastin gene is disrupted in a family with a balanced translocation t(7;16)(q11.23;q13) associated with a variable expression of the Williams Beuren syndrome. *European Journal of Human Genetics* 10: 352–361.
- Dutrillaux, B. (1973): New system of chromosome banding: the T bands. *Chromosoma* 41: 395-402.
- Edwards, J.H., Harnden, D.G., Cameron, A.H., Crosse, W.M., Wolff, O.H. (1960): A new



trisomic syndrome. *Lancet* 1: 787-790.

Egozcue, S., Blanco, J., Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Barri, P.N., Vidal, F., Egozcue, J. (2000): Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Human Reproduction* 6: 93–105.

Egozcue, J., Blanco, J., Vidal, F. (1998): Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Human Reproduction* 3: 441–452.

Faas, B.H.W., Cirigliano, V., Bui, T.H. (2011): Rapid methods for targeted prenatal diagnosis of common chromosome aneuploidies. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 16: 81-87.

Fernandez, L., Lapunzina, P., Arjona, D., López Pajares, I., García-Guereta, L., Elorza, D., Burgueros, M., De Torres, M.L., Mori, M.A., Palomares, M., García-Alix, A., Delicado, A. (2005): Comparative study of three diagnostic approaches (FISH, STRs and MLPA) in 30 patients with 22q11. 2 deletion syndrome. *Clinical genetics* 68: 373-378.

Flemming, W. (1878): Zur Kenntniss der Zelle und ihrer Theilungs-Erscheinungen. *Schriften des Naturwissenschaftlichen Vereins für Schleswig-Holstein* 3: 23–27.

Flemming, W. (1882): *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*. Leipzig, W.C Vogel, Germany.

Ford, C.E., Miller, O.J., Polani, P.E., Almeida, J.C., Briggs, J.H. (1959): A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1: 711–713.

Fritz, B., Hallermann, C., Olert, J., Fuchs, B., Bruns, M., Aslan, M., Schmidt, S., Coerdts, W., Müntefering, H., Rehder, H. (2001): Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH)– Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *European Journal of Human Genetics* 9: 539–547.

Gerdes, T., Kirchhoff, M., Bryndorf, T. (2005): Automatic analysis of multiplex ligation-dependent probe amplification products (exemplified by a commercial kit for prenatal aneuploidy detection). *Electrophoresis* 26: 4327-4332.

Gerdes, T., Kirchhoff, M., Lind, A.M., Vestergaard Larsen, G., Kjaergaard, S. (2008): Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis a experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21 X, and Y. *Prenatal*

Diagnosis 28: 1119 - 1125.

Golbus, M.S., Bachman, R., Wiltse, S., Hall, B.D. (1976): Tetraploidy in a liveborn infant. *Journal of Medical Genetics* 13: 329–332.

Gorski, J.L., Emanuel, B.S., Zackai, E.H., Mennuti, M. (1986): Complex chromosomal rearrangement and multiple spontaneous abortions. *Human Genetics* 74: 326 – 329.

Gravholt, C.H., Friedrich, U. (1995): Molecular cytogenetic study of supernumerary marker chromosomes in an unselected group of children. *The American Journal of Medical Genetics* 56: 106–111.

Grimshaw, G.M., Szczepura, A., Hulten, M., MacDonald, F., Nevin, N.C., Sutton, F. (2003): Evaluation of molecular tests for prenatal diagnosis of chromosome abnormalities. *Health Technol Assess* 7 : 1–146.

Guc-Scekic, M., Milasin, J., Stevanovic, M., Stojanov, L.J., Djordjevic, M. (2002): Tetraploidy in a 26-month-old girl (cytogenetic and molecular studies). *Clinical Genetics* 6: 62–65.

Hájek, Z., Kulovaný, E., Macek., M. : *Základy prenatální diagnostiky*. Praha: Grada, 2000, s. 179-246. ISBN 80-7169-391-X.

Heppell-Parton, A.C., Water, J.J. (1991): Robertsonian translocation and an extra microchromosome: Independent origin identified by in situ hybridization. *Clinical Genetics* 39: 93–96.

Hochstenbach, R., Meijer, J., Van de Brug, J., Vosseveld-Hoff, I., Jansen, R., Van der Luijt, R.B., Sinke, R.J., Page-Christiaens, G.C.M.L., Ploos van Amstel, J.K., de Pater, J. M. (2005): Rapid detection of chromosomal aneuploidies in uncultured amniocytes by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Prenatal Diagnosis* 25: 1032-1039.

Huang, T., Alberman, E., Wald, N., Summers, A.M. (2005): Triploidy identified through second-trimester serum screening. *Prenatal diagnosis* 25: 229-233.

Hultén, M.A., Dhanjal, S., Pertl, B. (2003): Rapid and simple prenatal diagnostic of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and

QF-PCR. *Reproduction* 126: 279- 297.

Chen, X., Li, H., Mao, Y., Xu, X., Lv, J., Zhou, L., Lin, X., Tang, S. (2014): Subtelomeric multiplex ligation-dependent probe amplification as a supplement for rapid prenatal detection of fetal chromosomal aberrations. *Molecular cytogenetics* 7: 96 – 102.

Cheung, S.W., Crane, J.P., Beaver, H. (1990): Correlation between phenotypic expression of de-novo marker chromosomes and genomic organization using replicational banding. *Prenatal Diagnosis* 10: 717–724.

Chitty, L.S., Kistler, J., Akolekar, R., Liddle, S., Nicolaides, K., Levett, L. (2012): Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA): a reliable alternative for fetal chromosome analysis? *Journal of Maternal, Fetal and Neonatal Medicine* 25: 1383-1386.

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

Iafraite, A.J., Feuk, L., Rivera, M.N., Listewnik, M.L., Donahoe, P.K., Qi, Y., Scherer, S.W., Lee, C. (2004): Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature genetics* 36: 949-951.

Iwarsson, E., Lundqvist, M., Inzunza, J., Ahrlund-Richter, L., Sjoblom, P., Lundkvist, O., Simberg, N., Nordenskjold, M., Blennow, E. (1999): A high degree of aneuploidy in frozen-thawed human preimplantation embryos. *Human Genetics* 104: 376–382.

Jacobs, P.A., Baikie, A.G., Brown, W.M., Macgregor, T.N., Maclean, N., Harnden, D.G. (1959): Evidence for the existence of the human “super female”. *Lancet* 2: 423-425.

Jacobs, P.A., Browne, C., Gregson, N., Joyce, C., White, A. (1992): Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *Journal of Medical Genetics* 29: 103–108.

Jacobs, P.A., Strong, J.A. (1959): A case of human intersexuality having a possible XXY sex-

determining mechanism. *Nature* 183: 302–303.

Jalali, G.R., Vorstman, J.A.S., Errami, A.B., Vijzelaar, R., Biegel, J., Shaikh, T., Emanuel, B.S. (2008): Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Human mutation* 29: 433-440.

Kaiser, P. (1988): Pericentric inversions: their problems and clinical significance. *Human Genetics* 68: 1-47.

Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818 – 821.

Kalousek, D.K., Pantzar, T., Tsai, M., Paradice, B. (1993): Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3912 cases. *Birth Defects Original Article Series* 29: 53–61.

Kelly, T.E., Rary, J.M. (1974): Mosaic tetraploidy in a two-year-old female. *Clinical Genetics* 6: 221–224.

Kim, J.W., Lyu, S.W., Sung, S.R., Park, J.E., Cha, D.H., Yoon, T.K., Ko, J.J., Shim, S.H. (2015): Molecular analysis of miscarriage products using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA): alternative to conventional karyotype analysis. *Archives of gynecology and obstetrics* 291: 347-354.

Kirchhoff, M., Bisgaard, A.M., Bryndorf, T., Gerdes, T. (2007): MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5,8 % patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams Beuren syndrome regions. *European Journal of Medical Genetics* 50: 33-42.

Kirchhoff, M., Rose, H., Lundsteen, C. (2001): High resolution comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Journal of Medical Genetics* 38: 740-744.

Kjaergaard, S., Sundberg, K., Jørgensen, F.S., Rohde, M.D., Lind, A.M., Gerdes, T., Tabor, A., Kirchhoff, M. (2010): Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenatal Diagnosis* 30:

995-999.

Klinger, K., Landes, G., Shook, D., Harvey, R., Lopez, L., Locke, P., Lerner, T., Osathanondh, R., Leverone, B., Houseal, T., Pavelka, K., Dackowski, W. (1992): Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH). *American Journal of Human Genetics* 51: 55–65.

Kohn, G., Mayall, B.H., Miller, M.E., Mellman, W.J. (1967): Teraphloid-diploid mosaicism in a surviving infant. *Pediatric Research* 1: 461–469.

Konialis, C., Hagnefelt, B., Sevastidou, S., Karapanou, S., Pispili, K., Markaki, A., Pangalos, C. (2011): Uncovering recurrent microdeletion syndromes and subtelomeric deletions/duplications through non-selective application of a MLPA-based extended prenatal panel in routine prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 31: 571-577.

Kooper, A.J., Faas, B.H., Feuth, T., Creemers, J.W., Zondervan, H.H., Boekkooi, P.F., Quaetero, R.W.P., Rjinders, R.J.P., van der Burgt, I., van Kessel, A.G., Smits, A.P. (2009): Detection of chromosome aneuploidies in chorionic villus samples by multiplex ligation-dependent probe amplification. *The Journal of Molecular Diagnostics* 11: 17-24.

Kooper, A.J., Faas, B.H., Kater-Baats, E., Feuth, T., Janssen, J.C., van der Burgt, I., Lotgering, F.K., van Kessel, A.G., Smits, A. (2008): Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells. *Prenatal Diagnosis* 28: 1004-1010.

Kumar, A., Becker, L.A., Depinet, T.W., Haren, J.M., Kurtz, C.L., Robin, N.H., Cassidy, S.B., Wolff, D.J., Schwartz, S. (1998): Molecular characterization and delineation of subtle deletions in *de novo* ‘balanced’ chromosomal rearrangements. *Human Genetics* 103: 173–178.

Kumar, C., Kleyman, S.M., Samonte, R.V., Verma, R.S. (1997): Marker chromosomes in fetal loss. *Human Reproduction* 12: 1321-1324.

Lakovschek, I.C., Streubel, B., Ulm, B. (2011): Natural outcome of trisomy 13, trisomy 18, and triploidy after prenatal diagnosis. *American Journal of Medical Genetics* 155: 2626–2633.

Lam, A.C.F., Lam, S.T.S., Lai, K.K.S., Tong, T.M.F., Chau, T.C. (2006): High rate of

detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clinical Biochemistry* 39: 196-202.

Lejeune, J., Gautier, M., Turpin, R. (1959): Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 248: 1721–1722.

Lejeune, J., Lafourcade, J., de Grouchy, J., Berger, R., Gautier, M., Salmon, C. (1964): Délétion partielle du bras court du chromosome 5. Individualisation d'un nouvel état morbide. *Seminars Hôp. Paris* 18: 1069–1079.

Lo, Y. D., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., Wainscoat, J. S. (1997): Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350: 485-487.

Lomax, B., Tang, S., Separovic, E., Phillips, D., Hillard, E., Thomson, T., Kalousek, D.K. (2000): Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *American Journal of Human Genetics* 66:1516–1521.

Los, F.J., van den Berg, C., Wildschut, H.I., Brandenburg, H., den Hollander, N.S., Schoonderwaldt, E.M., Pijpers, L., Jan, H.G., Van Opstal, D. (2001): The diagnostic performance of cytogenetic investigation in amniotic fluid cells and chorionic villi. *Prenat Diagnosis* 21: 1150-1158.

Madan, K. (1988): Paracentric inversions a review. *Human Genetics* 96: 503-515.

Malvestiti, F., De Toffol, S., Grimi, B., Chinetti, S., Marcato, L., Agrati, C., Di Meco, A.M., Frascoli, G., Trotta, A., Malvestini, B., Ruggeri, A., Dulcetti, F., Maggi, F., Simoni, G., Grati, F.R. (2014): De novo small supernumerary marker chromosomes detected on 143 000 consecutive prenatal diagnoses: chromosomal distribution, frequencies, and characterization combining molecular cytogenetics approaches. *Prenatal diagnosis* 34: 460-468.

Maurer, B., Haaf, T., Stout, K., Reissmann, N., Steinlein, C., Schmid, M. (2001): Two supernumerary marker chromosomes, originating from chromosomes 6 and 11, in a child with developmental delay and craniofacial dysmorphism. *Cytogenetics and Cell Genetics* 93: 182-187.

- McDuffie, R.S., Haverkamp, A.D., Stark, C.F., Haverkamp, C., Barth, C.K. (1996): Prenatal screening using maternal serum alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin, and unconjugated estriol: two-year experience in a health maintenance organization. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 5: 70-73.
- McFadden, D.E., Kalousek, D.K. (1991): Two different phenotypes of fetuses with chromosomal triploidy: correlation with parental origin of the extra haploid set. *American Journal of Medical Genetics* 38: 535–538.
- McFadden, D.E., Langlois, S. (2000): Parental and meiotic origin of triploidy in the embryonic and fetal periods. *Clinical Genetics* 58: 192–200.
- Monfort, S., Orellana, C., Oltra, S., Roselló, M., Guitart, M., Martínez, F. (2006): Evaluation of MLPA for detection of cryptic subtelomeric rearrangements. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 147: 295-300.
- Morgan, T. H. (1910): Sex-limited inheritance in *Drosophila*. *Science* 32: 120-122.
- Munne, S. (2003): Preimplantation genetic diagnosis and human implantation—a review. *Placenta* 24: 70–76.
- Munne, S., Escudero, T., Sandalinas, M., Sable, D., Cohen, J. (2000): Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics* 90: 303–308.
- Nanclares, G.P., Martínez, F., Bilbao, J.R., Navajas, A., Martínez, R., López-Arístegui, M.A., Castaño, L. (2003): A Submicroscopic deletion of 11p13 associated with the WAGR syndrome. *Clinical Genetics* 4: 319-322.
- Nepomnyashchaya, Y.N., Artemov, A.V., Roumiantsev, S.A., Roumyantsev, A.G., Zhavoronkov, A. (2013): Non-invasive prenatal diagnostics of aneuploidy using next-generation DNA sequencing technologies, and clinical considerations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51: 1141-1154.
- Northrop, E.L., Ren, H., Bruno, D.L., McGhie, J.D., Coffa, J., Schouten, J., Choo, K.H., Slater, H.R. (2005): Detection of cryptic subtelomeric chromosome abnormalities and identification of anonymous chromatin using a quantitative multiplex ligation-dependent

probe amplification (MLPA) assay. *Human Mutation* 26: 477–486.

Nyberg, D.A., Souter, V.L. (2001): Sonographic markers of fetal trisomies: second trimester. *Journal of Ultrasound Medicine* 20: 655-674.

Olgun-Erdemir, E., Yıldırım, M.S., Karıyaka, M. (2010): Generalized aggressive periodontitis in a child with 92,XXYY / 46,XY mosaicism: report of a second case. *The Turkish Journal of Pediatrics* 52: 94-96.

Park, S., Lee, B.Y., Kim, Y.M., Kim, J.M., Lee, M.H., Kim, J.W., Cho, E.H., Park, J.Y., Lee, Y.H., Yang, J.H., Kim, M.Y., Han, J.Y., Ryu, H.M. (2003): *De novo* chromosomal aberrations in the fetus; genetic counseling and clinical outcome. *Journal of Korean Medical Science* 18: 397-401.

Patau, K., Smith, D.W., Therman, E., Inhorn, S.L., Wagner, H.P. (1960): Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet* 1: 790–793.

Patsalis, P.C., Evangelidou, P., Charalambous, S., Sismani, C. (2004): Fluorescence in situ hybridization characterization of apparently balanced translocation reveals cryptic complex chromosomal rearrangements with unexpected level of complexity. *European Journal of Human Genetics* 12: 647-653.

Pellestor, F., Girardet, A., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C. (1994): Relationship between morphology and chromosomal constitution in human preimplantation embryo. *Molecular Reproduction and Development* 39: 141–146.

Pertl, B., Kopp, S., Kroisel, P.M., Tului, L., Brambati, B., Adinolfi, M. (1999): Rapid detection of chromosome aneuploidies by quantitative fluorescence PCR: first application on 247 chorionic villus samples. *Journal of Medical Genetics* 36: 300-303.

Pinkel, D., Gray, J.W., Trask, B., van den Engh, G., Fuscoe, J., van Dekken, H. (1986): Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51: 151-157.

Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S.H., Ljung, B.M., Gray, J.W., Albertson, D.G. (1998): High



resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics* 20: 207–211.

Pohovski, L.M., Dunic, K.K., Odak, L., Barisic, I. (2013): Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability. *Molecular Cytogenetics* 6: 7- 11.

Raca, G., Artzer, A., Thorson, L., Huber, S., Modaff, P., Laffin, J., Pauli, R. M. (2009): Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) in the genetic evaluation of stillbirth. *American Journal of Medical Genetics* 149: 2437-2443.

Rai, R., Regan, L. (2006): Recurrent miscarriage. *Lancet* 368: 601-611.

Reddy, U.M., Page, G.P., Saade, G.R., Silver, R.M., Thorsten, V.R., Parker, C.B., Pinar, H., Willinger, M., Stoll, B.J., Heim-Hall, J., Varner, M.W., Goldenberg, R.L., Bukowski, R., Wapner, R.J., Drews-Botsch, C.D., O'Brien, B.M., Dudley, D.J., Levy, B. (2012a): Karyotype versus microarray testing for genetic abnormalities after stillbirth. NICHD Stillbirth Collaborative Research Network. *The New England Journal of Medicine* 367: 2185 –2193.

Reddy, U.M., Page, G.P., Saade, G.R. (2012b): The role of DNA microarrays in the evaluation of fetal death. *Prenatal diagnosis* 32: 371-375.

Ried, T., Landes, G., Dackowski, W., Klinger, K., Ward, D.C. (1992): Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X, and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Human Molecular Genetics* 1: 307-313.

Robberecht, C., Schuddinck, V., Fryns, J.P., Vermeesch, J.R. (2009): Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls. *Genetics in Medicine* 11: 646-654.

Rodriguez, M.T., Martin, M.J., Abrisqueta, J.A. (1985): A complex balanced rearrangement involving four chromosomes in an azoospermic man. *Journal of Medical Genetics* 22: 66-67.

Rooms, L., Reyniers, E., van Luijk, R., Scheers, S., Wauters, J., Ceulemans, B., Van Den Ende, J., Van Bever, Y., Kooy, R.F. (2004): Subtelomeric deletions detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation- dependent probe amplification

(MLPA). *Human Mutation* 23: 17–21.

Roselló, M., Ferrer-Bolufer, I., Monfort, S., Oltra, S., Quiroga, R., Martínez, F., Gonzalvo, M., Benac, A., Perales, A., Orellana, C. (2010): Prenatal study of common submicroscopic “genomic disorders” using MLPA with subtelomeric/microdeletion syndrome probe mixes, among gestations with ultrasound abnormalities in the first trimester. *European Journal of Medical Genetics* 53: 76-79.

Saccone, S., De Sario, A., Della Valle, G., Bernardi, G. (1992): The highest gene concentration in the human genome are in the telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 4913-4917.

Seabright, M. (1991): A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-972.

Sehnert, A.J., Rhees, B., Comstock, D., de Feo, E., Heilek, G., Burke, J., Rava, R.P. (2011): Optimal detection of fetal chromosomal abnormalities by massively parallel DNA sequencing of cell-free fetal DNA from maternal blood. *Clinical Chemistry* 57: 1042-1049.

Shaffer, L.G., Bejjani, B.A. (2004): A cytogeneticist’s perspective on genomic microarrays. *Human Reproduction Update* 10: 221-226.

Shaffer, L.G., Lupski, J.R. (2000): Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. *The Annual Review of Genetics* 34: 297–329.

Shaw, C.J., Lupski, J.R. (2004): Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human Molecular Genetics* 13: 57– 64.

Shipp, T.D., Benacerraf, B.R. (2002): Second trimester ultrasound screening for chromosomal abnormalities. *Prenatal diagnosis* 22: 296-307.

Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwiijnenburg, D., Diepvens, F., Pals, G. (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 30: e57.

Snijders, A.M., Nowak, N., Segraves, R., Blackwood, S., Brown, N., Conroy, J., Hamilton, G., Hindle, A.K., Huey, B., Kimura, K., Law, S., Myambo, K., Palmer, J., Ylstra, B., Yue, J.P.,

- Gray, J.W., Jain, A.N., Pinkel, D., Albertson, D.G. (2001): Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nature Genetics* 29: 263–264.
- Song, Y., Liu, C., Qi, H., Zhang, Y., Bian, X., Liu, J. (2013): Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenatal Diagnosis* 33: 700-706.
- Stachon, A.C., Baskin, B., Smith, A.C., Shugar, A., Cytrynbaum, C., Fishman, L., Mendoza-Londono, R., Klatt, R., Teebi, A., Ray, P.N., Weksberg, R. (2007): Molecular diagnosis of 22q11. 2 deletion and duplication by multiplex ligation dependent probe amplification. *American Journal of Medical Genetics Part A* 143: 2924-2930.
- Stankiewicz, P., Beaudet, A.L. (2007): Use of array CGH in the evaluation of dysmorphology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Current Opinion in Genetics & Development* 17: 182–192.
- Stankiewicz, P., Lupski, J.R. (2002): Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in Genetics* 18: 74–82.
- Stegman, A.P.A., Jonker, L.M.H., Engelen, J.J.M. (2008): Prospective screening of patients with unexplained mental retardation using subtelomeric MLPA strongly increases the detection rate of cryptic unbalanced chromosomal rearrangements. *European Journal of Medical Genetics* 51: 93-105.
- Stirrat, G.M. (1990): Recurrent miscarriage. *Lancet* 336: 673–675.
- Stojilkovic-Mikic, T., Rodeck, C.H. (2003): Screening for chromosomal anomalies: first or second trimester, biochemical or ultrasound. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 32: 583-589.
- Sutton, W.S. (1903): The chromosomes in heredity. *Biological Bulletin* 5: 231 – 251.
- Tijo, H.J., Levan, A. (1956): The chromosome numbers of man. *Hereditas* 42: 1–6.
- Turner, H.H. (1938): A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus. *Endocrinology* 23: 566– 574.
- Van de Laar, I., Rabelink, G., Hochstenbach, R., Tuerlings, J., Hoogeboom, J., Giltay, J.

- (2002): Diploid/triploid mosaicism in dysmorphic patients. *Clinical Genetics* 62: 376-382.
- Van Dyke, D.L., Weiss, L., Roberson, J.R., Babu, V.R. (1983): The frequency and mutation rate of balanced autosomal rearrangements in man estimated from prenatal genetic studies for advanced maternal age. *The American Journal of Human Genetic* 35: 301-308.
- Van Opstal, D., Boter, M., de Jong, D., van den Berg, C., Brüggewirth, H.T., Wildschut, H.I., de Klein, A., Galjaard, R.J.H. (2009): Rapid aneuploidy detection with multiplex ligation-dependent probe amplification: a prospective study of 4000 amniotic fluid samples. *European Journal of Human Genetics* 17: 112-121.
- Van Opstal, D., Boter, M., Noomen, P., Srebniak, M., Hamers, G., Galjaard, R.J. (2011): Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) for rapid distinction between unique sequence positive and negative marker chromosomes in prenatal diagnosis. *Molecular Cytogenetics* 4: e2.
- Volpi, E.V., Bridger, J.M. (2008): FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques* 45: 385-386.
- Waldeyer, W. (1888): Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 32: 1-122.
- Wang, J., Liu, Z. H. E. N., Liu, H., Li, N., Li, S., Chen, X., Lin, I., Wang, H., Zhu, J., Liu, S. (2013): Rapid detection of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements by subtelomeric multiplex ligation-dependent probe amplification in fetuses with congenital heart disease. *Fetal diagnosis and therapy* 34: 110-115.
- Wapner, R.J., Martin, C.L., Levy, B., Ballif, B.C., Eng, C.M., Zachary, J.M., Savage, M., Platt, L.D., Saltzman, D., Grobman, W.A., Klugman, S., Scholl, T., Simpson, J.L., McCall, K., Aggarwal, V.S., Bunke, B., Nahum, O., Patel, A., Lamb, A.N., Thom, E.A., Beaudet, A.L., Ledbetter, D.H., Shaffer, L.G., Jackson, L. (2012): Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *The New England Journal of Medicine* 367: 2175 – 2178.
- Warburton, D. (1991): *De novo* balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *American Journal of Medical Genetics* 49: 995–1013.

- Wassman, E.R., Cheyovich, D.L., Nakahara, Y. (1989): “Possibly” *de novo* translocations: prenatal risk counselling. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161: 698-702.
- Watson, J.D., Crick, F.H. (1953): Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171: 737-738.
- Wegner, R.D., Kistner, G., Becker, R., Stumm, M., Knoll, U., Entezami, M., Trimborn, M. (2009): Fetal 46,XX/69,XXY mixoploidy: origin and confirmation by analysis of fetal urine cells. *Prenatal Diagnosis* 3: 287 – 289.
- Weiss, M.M., Hermesen, M.A.J.A., Meijer, G.A., van Grieken, N.C.T., Baak, J.P.A., Kuipers, E.J., van Diest, P.J. (1999): Demystified...Comparative genomic hybridization. *Journal of Clinical Pathology* 52: 243-251.
- Wick, J.B., Johnson, K.J., O'Brien, J., Wick, M.J. (2013): Second-Trimester diagnosis of triploidy: A series of four cases. *American Journal of Perinatology* 3: 37–40.
- Willis, A.S., van den Veyver, I., Eng, C.M. (2012): Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis* 32: 325-320.
- Wisniewski, L.P., Doherty, R.A. (1985): Supernumerary microchromosomes identified inverted duplications of chromosome 15: A report of three cases. *Human Genetics* 69: 161-163.
- Xu, Z., Geng, Q., Luo, F., Xu, F., Li, P., Xie, J. (2014): Multiplex ligation-dependent probe amplification and array comparative genomic hybridization analyses for prenatal diagnosis of cytogenomic abnormalities. *Molecular Cytogenetics* 7: e84.
- Yu, S., Barbouth, D., Benke, P.J., Warburton, P.E., Fan, Y.S. (2007): Characterization of a neocentric supernumerary marker chromosome originating from the Xp distal region by FISH, CENP-C staining, and array CGH. *Cytogenetic and Genome Research* 116: 141-145.

## Internetové zdroje

Campus Génétique médicale (2012): Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques [cit. 2015-04-19]. Dostupné z: [http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique\\_19/site/html/1\\_5.html](http://campus.cerimes.fr/genetique-medicale/enseignement/genetique_19/site/html/1_5.html)

MRC-Holland: MLPA (2010): Interpretation of MLPA results [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= wl2zCji-rCGANQgZPuTixrMkcAVITxSUI1uxaJsuta9GGaLIE8p67Q..>

MRC-Holland: MLPA (2012a): MLPA Folder [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= wl2zCji-rCGANQgZPuTixsEyIW1MscfzuKj2NDFYc-g.>

MRC-Holland: MLPA (2012b): SALSA MLPA P311 Congenital Heart Disease probemix [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= DJkuK12csnU.>

MRC-Holland: MLPA (2014a): MLPA DNA Protocol version MDP-005 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= wl2zCji-rCGANQgZPuTixtCplCA1mmwJoFo xHPnTgc.>

MRC-Holland: MLPA (2014b): Synthetic probe design [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag= zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhAPz9QEm7akikAm7AOEGw1vtZvffaZPOiSig8uqel7Yd>

MRC-Holland: MLPA (2014c): SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 probemix [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= Q8 3 dVQP-g.>

MRC-Holland: MLPA (2014d): SALSA MLPA P070 Subtelomeres Mix 2B probemix [cit.2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= qQ8oLJrSaVc.>

MRC-Holland: MLPA (2014e): SALSA MLPA P245 Microdeletion Syndromes-1 probemix

[cit. 2015-03 24]. Dostupné z:

[http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= rpaFvT21Qb8)

[Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= rpaFvT21Qb8.](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= rpaFvT21Qb8)

MRC-Holland: MLPA (2014f): SALSA MLPA P250 DiGeorge probemix [cit. 2015-03 24].

Dostupné z: [http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= 0DLzOd5tLZ0)

[Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= 0DLzOd5tLZ0.](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= 0DLzOd5tLZ0)

MRC-Holland: MLPA (2015): SALSA MLPA P182 Centromere mix 2 probemix (2015) [cit.

2015-03-24]. Dostupné z: [http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= dkuVp4iyCkI)

[Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= dkuVp4iyCkI.](http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag= tz2fAPIAupKyMjaDF-E-t9bmuxqlhe Lgqfk8Hkjuss.&ProductOID= dkuVp4iyCkI)

## Prílohy

Tabuľka 4: Zoznam vzoriek analyzovaných metódou MLPA v rámci experimentálnej časti diplomovej práce

Číslo vzorky	Indikácia	Materiál	Výška gravidity
236/14	agenéza corpus callosum, tehotenstvo pokračuje	plodová voda	II. trimester
1783/13	NT 4 mm, tehotenstvo pokračuje	choriové klky	I. trimester
1818/13	NT 3,7 mm, tehotenstvo pokračuje	plodová voda	II. trimester
1751/14	NT 3,2 mm, umbikálna artéria, tehotenstvo pokračuje	choriové klky	I. trimester
1031/12	VVV srdca, patologický výsledok DUS, IUGR, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
2217/14	hygroma colli cysticum, UPT	tkanivo z biopsie	I. trimester
350/15	VVV srdca, UPT	plodová voda	II. trimester
1538/14	VVV urotraktu, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
71/12	hydrops plodu, NT 2,2 mm, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
1043/14	hydrocefalus, spina bifida, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
1/14	hydrocefalus, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
890/11	makrocefália, ventrikulomegália, UPT	tkanivo z biopsie	I. trimester
15/13	hydrops plodu, NT 5,1 mm, UPT	tkanivo z biopsie	I. trimester
273/14	VVV srdca, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
1548/13	rázštep rtu a patra, spina bifida, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
506/14	NT 4,8 mm, UPT	choriové klky	I. trimester
1379/13	NT 4,8 mm, absencia jednej pupočníkovej artérie, UPT	plodová voda	II. trimester



Číslo vzorky	Indikácia	Materiál	Výška gravidity
735/12	pozitívny skrining I. trimestra, UPT	choriové klky	I. trimester
1329/13	VVV srdca, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
1406/14	hydrocefalus, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
1507/14	anencefália, omfalokéla, UPT	tkanivo z biopsie	I. trimester
1856/14	holoprezencefália, UPT	choriové klky	I. trimester
1848/14	agenéza obličiek, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
287/13	megavesica, artrézia uretry, oligohydramnion,UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
911/13	agenéza corpus calosum, hydrocefalus, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
1910/14	Fallotova tetralógia, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
294/14	difragmatická hernia, NT 3 mm, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
685/13	malformácie plodu, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
1790/13	VVV srdca, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester
963/13	IUGR, oligohydramnion	choriové klky	II. trimester
33/14	hydrocefalus, UPT	plodová voda	II. trimester
1596/14	VVV srdca, UPT	plodová voda	II. trimester
16/13	spontánny potrat dvojčiat NT 9 mm, po IVF	choriové klky	I.trimester
17/13	spontánny potrat dvojčiat, NT 9 mm, po IVF	choriové klky	I.trimester
2201/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I.trimester
2202/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I.trimester
221/13	opakovaný spontánny potrat (ôsmy v poradí)	tkanivo z biopsie	I.trimester
1703/13	zúžený pupočník, kraniofaciálna stigmatizácia, spontánny potrat	tkanivo z biopsie	II.trimester

Číslo vzorky	Indikácia	Materiál	Výška gravidity
2009/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	II.trimester
1970/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	II.trimester
1135/13	hydrops plodu, spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I.trimester
212/13	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I.trimester
741/12	hydrops, hygroma colli cysticum, spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I.trimester
1046/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I.trimester
501/14	hygroma colli cysticum, spontánny potrat	choriové klky	I. trimester
59/13	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I. trimester
1293/14	spontánny potrat	choriové klky	I.trimester
367/13	spontánny potrat	plodová voda	II.trimester
161/13	opakovaný spontánny portat, VVV, defekty tváre	tkanivo z biopsie	II.trimester
141/15	mŕtvonarodený plod (s rázštepovou vadou)	plodová voda	II. trimester
930/13	mŕtvonarodený plod	tkanivo z biopsie	-
1462/13	mŕtvonarodený plod	tkanivo z biopsie	-

Tabuľka 6: Zoznam prób SALSA MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 probemixu  
(prevzaté z MRC-Holland: MLPA, 2014c)

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	O-fragments: DNA quantity: only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene)			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene)			
118	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (ZFY gene)			
130 «	1p	TNFRSF4	02269-L01761	01-001.14
136	2p	ACP1	02274-L08758	02-000.25
142	3p	CHL1	01721-L01329	03-000.34
151	4p	PIGG (FLJ20265)	02005-L02047	04-000.50
158	5p	PDCD6	01723-L01327	05-000.37
166	6p	IRF4	01724-L02048	06-000.34
172	7p	ADAP1 (CENTA1)	02275-L02049	07-000.93
179	8p	FBXO25	02397-L01845	08-000.40
186	9p	DMRT1	01727-L02050	09-000.84
193	10p	DIP2C (KIAA0934)	02277-L01768	10-000.48
202	11p	RIC8A (RIC-8)	03315-L02733	11-000.20
208 «	12p	SLC6A12	02276-L01767	12-000.17
219 + «	13q-cen	PSPC1	02399-L01847	13-019.24 (Acrocentric chromosome)
227 +	14q-cen	CCNB1IP1 (HEI10)	01732-L01318	14-019.86 (Acrocentric chromosome)
235 +	15q-cen	MKRN3	07291-L08858	15-021.36 (Acrocentric chromosome)
242	16p	POLR3K	01734-L01316	16-000.04
250	17p	RPH3AL	01735-L01315	17-000.17
258	18p	USP14	01736-L02051	18-000.19
265 «	19p	CDC34	01737-L01313	19-000.49
274	20p	SOX12	02396-L01844	20-000.26
283 ¥ +	21q-cen	RBM11	18223-L23852	21-014.51 (Acrocentric chromosome)
289 +	22q-cen	BID	01740-L01310	22-016.61 (Acrocentric chromosome)
298	Xp/Yp (PAR1)	SHOX	01148-L01331	X/Y-000.52 (PAR1 region)
307	1q	SH3BP5L (KIAA1720)	02392-L02149	01-247.08 (0.2 Mb from telomere)
313	2q	CAPN10	01742-L01308	02-241.18 (1.6 Mb from telomere)
322	3q	BDH1	02013-L02052	03-198.76 (0.7 Mb from telomere)
330	4q	TRIML2	12050-L11446	04-189.26 (2.0 Mb from telomere)
337	5q	GNB2L1	03319-L02737	05-180.60 (0.2 Mb from telomere)
346	6q	PSMB1	01746-L01304	06-170.69 (0.5 Mb from telomere)
355	7q	VIPR2	01747-L01303	07-158.60 (0.3 Mb from telomere)
361	8q	ZC3H3 (KIAA0150)	01748-L01302	08-144.69 (1.6 Mb from telomere)
372	9q	EHMT1	08205-L08170	09-139.83 (0.2 Mb from telomere)
379	10q	PAOX (PAO)	09142-L09953	10-135.05 (0.2 Mb from telomere)
386	11q	NCAPD3 (KIAA0056)	01751-L01299	11-133.60 (1.2 Mb from telomere)
395	12q	ZNF10	02687-L02154	12-132.24 (0.2 Mb from telomere)
402	13q	F7	01753-L01297	13-112.82 (1.3 Mb from telomere)
411 «	14q	MTA1	02778-L02201	14-105.00 (1.3 Mb from telomere)
418 «	15q	ALDH1A3	01755-L01295	15-099.26 (1.0 Mb from telomere)
426	16q	GAS8 (GAS11)	03201-L02669	16-088.63 (0.2 Mb from telomere)
434	17q	TBCD	01757-L01293	17-078.45 (0.5 Mb from telomere)
441	18q	RBFA (C18orf22)	01758-L01292	18-075.90 (0.2 Mb from telomere)
450 «	19q	CHMP2A (BC-2)	09143-L10626	19-063.75 (0.9 Mb from telomere)
458 «	20q	OPRL1	02688-L02884	20-062.19 (0.2 Mb from telomere)
466	21q	PRMT2 (HMT1)	02586-L02059	21-046.89 (0.1 Mb from telomere)
475	22q	RABL2B	01762-L08761	22-049.55 (0.1 Mb from telomere)
483	Xq/Yq (PAR2)	VAMP7 (SYBL1)	01763-L02150	X/Y-154.78 (PAR2; 0.1 Mb from telom.)

Tabuľka 7: Zoznam prób SALSA MLPA P070 Subtelomeres Mix 2B probemixu  
(prevzaté z MRC-Holland: MLPA, 2014d)

Length (nt)	Chromosomal position	Gene detected	SALSA MLPA probe	MapView build 36 position
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity: only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation (autosomal)			
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (AMOT gene ; X-111.95)			
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (UTY gene ; Y-013.98)			
121 *	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (ZFY gene ; Y-002.89)			
132	1q	SH3BP5L	04084-L03605	01-247.08
139	2q	ATG4B	02781-L03168	02-242.25
145	3q	KIAA0226	02690-L02842	03-198.88
152	4q	FRG1	02691-L02843	04-191.10
160	5q	GNB2L1	02790-L02232	05-180.60
166	6q	TBP	02694-L02844	06-170.71
172	7q	VIPR2	02793-L03167	07-158.63
179 ±	8q	RECQL4	02695-L00610	08-145.71
186	9q	EHMT1	02792-L02846	09-139.78
193	10q	ECHS1	02696-L02847	10-135.03
202	11q	IGSF9B	02697-L02848	11-133.29
211	12q	ZNF10	02686-L02849	12-132.24
218	13q	CDC16	02698-L00753	13-114.03
226	14q	MTA1	02699-L02850	14-104.99
233 Y	15q	TM2D3	18224-L23503	15-100.01
241	16q	GAS8	02702-L00734	16-088.64
250	17q	SECTM1	02703-L03169	17-077.87
258	18q	CTDP1	02704-L03607	18-075.58
265 ±	19q	CHMP2A	02705-L02853	19-063.76
274	20q	UCKL1	02706-L00642	20-062.05
281	21q	S100B	02587-L02854	21-046.85
290 ±	22q	ARSA	02707-L00661	22-049.41
298	X/Yq (PAR2)	VAMP7	02708-L02855	X-154.83 + Y-057.68 (PAR region)
306	1p	TNFRSF18	02270-L01762	01-000.13
315	2p	ACP1	02709-L02856	02-000.27
323	3p	CHL1	02896-L02363	03-000.34
329	4p	PIGG	14440-L16146	04-000.51
337	5p	CCDC127	02791-L02233	05-000.26
346	6p	IRF4	04077-L03462	06-000.34
355	7p	SUN1	02780-L02857	07-000.84
362	8p	FBXO25	02715-L00973	08-000.40
370	9p	DOCK8	02716-L00688	09-000.38
379	10p	ZMYND11	05180-L16343	10-000.22
387	11p	BET1L	02784-L02226	11-000.20
393	12p	KDM5A	02787-L02229	12-000.29
402 + ± Y	"13p"	PSPC1	02717-L27468	13-019.25 (Acrocentric)
409 + Y	"14p"	PARP2	02718-L27469	14-019.90 (Acrocentric)
418 + ±	"15p"	NDN	04026-L01542	15-021.48 (Acrocentric)
427	16p	DECR2	02720-L00648	16-000.40
436	17p	RPH3AL	04081-L03465	17-000.18
444	18p	THOC1	02789-L02231	18-000.20
451 Y	19p	PPAP2C	03501-L23504	19-000.23
459	20p	ZCCHC3	02723-L00641	20-000.23
466 +	"21p"	HSPA13	02724-L00334	21-014.68 (Acrocentric)
479 +	"22p"	IL17RA	02725-L16344	22-015.96 (Acrocentric)
490 Y	X/Yp (PAR1)	SHOX	03714-L27631	X/Y-000.52 (PAR region)

Tabuľka 8: Zoznam prôb SALSA MLPA P182 Centromere-1 probemixu  
(prevzaté z MRC-Holland: MLPA, 2015)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Gene	Chromosomal position	Chr.# + kb to p-telomere (hg18)
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA			
88-92-96 *	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation			
100 *	X-fragment: Specific for the X chromosome			
105 *	Y-fragment: Specific for the Y chromosome			
118 *	Y-fragment: S0135-L16766 probe specific for the ZFY gene on the Y chromosome; Y-002.889			
130	05745-L05183	NOTCH2	1p12	1-120.331
136	05747-L05185	EIF2AK3	2p11.2	2-088.674
142	05917-L05362	EPHA3	3p11.1	3-089.539
147 *	15147-L16921	ZAR1	4p11	4-048.191
154	05751-L05189	HCN1	5p12	5-045.498
160	06497-L06037	PRIM2	6p11.2	6-057.355
166	05755-L06276	SUMF2	7p11.2	7-056.110
172	06244-L06278	HOOK3	8p11.21	8-042.982
178	05758-L05196	EXOSC3	9p13.2	9-037.771
184	05760-L06666	ZNF25	10p11.1	10-038.286
190	05918-L05363	PTPRJ	11p11.2	11-048.106
196	05655-L04781	PKP2	12p11.21	12-032.941
202	05763-L05201	HSMPP8 (MPHOSPH8)	13q12.11	13-019.141
208	05765-L05203	PARP2 (ADPRTL2)	14q11.2	14-019.895
214 *	15148-L11839	MAGEL2	15q11.2	15-021.440
220	05769-L05207	ERAF	16p11.2	16-031.447
226 *	15144-L16919	USP22	17p11.2	17-020.865
232	05772-L05210	RNMT	18p11.21	18-013.732
240	05774-L05212	GMIP	19p13.11	19-019.602
247	05775-L05720	ZNF337	20p11.21	20-025.615
255	05919-L05364	STCH (HSPA13)	21q11.2	21-014.666
263 ¥	05777-L10758	CECR1	22q11.1	22-016.068
269	05779-L05217	MAGEH1	Xp11.21	X-055.496
276	05746-L05184	HFE2	1q21.1	1-144.128
283	05748-L05186	ZNF2	2q11.1	2-095.210
289	06238-L04687	PROS1	3q11.1	3-095.095
298	05750-L05188	USP46	4q12	4-053.189
305	05752-L05190	ISL1	5q11.1	5-050.716
311	06246-L05752	KHDRBS2	6q11.1	6-062.816
319	06805-L06400	ASL	7q11.21	7-065.192
330	05757-L05195	PRKDC	8q11.21	8-049.029
337	05759-L06281	TJP2	9q21.11	9-071.059
343	06218-L04930	RET	10q11.21	10-042.934
353	05761-L05721	AGTRL1 (APLNR)	11q12.1	11-056.761
360	05762-L05200	KIF21A	12q12	12-037.975
369	05770-L05208	VPS35	16q11.2	16-045.260
378	05921-L05366	WSB1	17q11.1	17-022.663
386	05773-L05211	MIB1	18q11.2	18-017.678
393 *	15145-L17579	CCNE1	19q12	19-035.006
400	05781-L01485	REM1	20q11.21	20-029.528
409	05780-L05218	ARHGEP9	Xq11.1	X-062.792
418	05764-L05202	ZMYM2 (ZNF198)	13q12.11	13-019.506
427 ¥	06493-L17676	APEX1	14q11.2	14-019.995
433	06219-L01539	MKRN3	15q11.2	15-021.363
441	05776-L05723	SAMSN1	21q11.2	21-014.815
453	06220-L04860	SLC25A18	22q11.21	22-016.423

Tabuľka 9: Zoznam prób SALSA MLPA P245 Microdeletion Syndromes-1 probemixu  
(prevzaté z MRC-Holland: MLPA, 2014e)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	Syndrome
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome (new from lot 1008 onwards)		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome (new from lot 1008 onwards)		
118 *	Y-fragment S0135-L16766: Specific for the Y chromosome		
130 ±	<b>TNFRSF4</b> probe 02269-L01761	1p36.33	1p36 deletion syndrome
136	<b>GATA3</b> probe 07632-L07317	10p14	DiGeorge region 2 (10p)
142	<b>PAFAH1B1</b> probe 04120-L03532	17p13.3	Miller-Dieker syndrome
148 ¥	<b>MECP2</b> probe 09310-L13824	<b>Xq28</b>	RETT syndrome / Xq28 duplication
154 ¥	<b>NSD1</b> probe 02595-L23366	5q35.3	Sotos syndrome
160 ± ¥	<b>GABRD</b> probe 04690-L04068	1p36.33	1p36 deletion syndrome
166 *	<b>UBE3A</b> probe 10877-L11547	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
172 ±	<b>CREBBP</b> probe 03087-L02487	16p13.3	Rubinstein-Taybi gene
178 ¥	<b>GNB1</b> probe 02890-L02511	1p36.33	1p36 deletion syndrome
184 *	<b>MECP2</b> probe 15319-L17592	<b>Xq28</b>	RETT syndrome, Xq28 duplication
190 *	<b>SEMA7A</b> probe 18316-L23369	15q24	15q24 microdeletion syndrome
196	<b>CLDN5</b> probe 01218-L06270	22q11.21	DiGeorge syndrome
202 ± ¥	<b>MECP2</b> probe 03409-L16570	<b>Xq28</b>	RETT syndrome, Xq28 duplication
208 ± ¥	<b>GP1BB</b> probe 05464-L15184	22q11.21	DiGeorge syndrome
214 *	<b>MBD5</b> probe 15311-L17110	2q23.1	2q23.1 microdeletion syndrome
220 *	<b>PPIL2</b> probe 07530-L22697	22q11.21	Distal 22q11 syndrome
226 *	<b>REL</b> probe 17474-L22693	2p16.1	2p16.1 microdeletion syndrome
232 ±	<b>LETM1</b> probe 04190-L05920	4p16.3	Wolf-Hirschhorn syndrome
238	<b>PAFAH1B1</b> probe 16348-L22830	17p13.3	Miller-Dieker syndrome / Lissencephaly
244 *	<b>SNRPN</b> probe 12178-L13826	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
252 *±	<b>SHANK3</b> probe 12031-L13828	22q13.33	Phelan-McDermid syndrome
260 *	<b>NF1</b> probe 11732-L13830	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
265 *±	<b>RTDR1</b> probe 08484-L22698	22q11.22	Distal 22q11 syndrome
272 *	<b>MAPT</b> probe 08365-L22699	17q21.31	17q21.31 microdeletion syndrome
278 ¥	<b>LRRC48</b> probe 01452-L20745	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
283 *	<b>SEMA5A</b> probe 14265-L22700	5p15.31	Cri du Chat syndrome
292 *	<b>DMD</b> probe 01411-L23371	<b>Xp21.1</b>	X chromosome copy number
300 ¥	<b>SNRPN</b> probe 01318-L23196	15q11.2	Prader-Willi-Angelman syndrome
307 ± ¥	<b>LLGL1</b> probe 01453-L22689	17p11.2	Smith-Magenis syndrome
315 *	<b>ELN</b> probe 16349-L22813	7q11.23	Williams-Beuren syndrome
323 *	<b>PTCH1</b> probe 03702-L22814	9q22.32	9q22.3 microdeletion syndrome
331 ¥	<b>CYP1A1</b> probe 06811-L22815	15q24.1	15q24 microdeletion syndrome
339 *	<b>NF1</b> probe 02507-L22694	17q11.2	NF1 microdeletion syndrome
346 *	<b>KANSL1</b> probe 18172-L22729	17q21.31	17q21.31 microdeletion syndrome
355	<b>DLG1</b> probe 08395-L08249	3q29	3q29 microdeletion syndrome
364	<b>ELN</b> probe 01336-L00878	7q11.23	Williams-Beuren syndrome
373 *	<b>SNAP29</b> probe 16748-L19368	22q11.21	DiGeorge syndrome
382 *	<b>RABL2B</b> probe 06734-L05558	22q13.33	Phelan-McDermid syndrome
391 *	<b>SATB2</b> probe 15315-L17114	2q33.1	2q33.1 microdeletion syndrome
401 ±	<b>TRPS1</b> probe 03081-L07411	8q23.3	Langer-Giedion syndrome
411 *	<b>MBD5</b> probe 15313-L22691	2q23.1	2q23.1 microdeletion syndrome
422 ± ¥	<b>DLG1</b> probe 08401-L15187	3q29	3q29 microdeletion syndrome
429 *	<b>EXT1</b> probe 15322-L17698	8q24.11	Langer-Giedion syndrome
436 *	<b>FANCC</b> probe 04460-L22816	9q22.32	9q22.3 microdeletion syndrome
445 ¥	<b>TERT</b> probe 03761-L22817	5p15.33	Cri du Chat syndrome
454 *	<b>WHSC1</b> probe 10633-L14379	4p16.3	Wolf-Hirschhorn syndrome
462 ¥	<b>NSD1</b> probe 02600-L15191	5q35.3	Sotos syndrome
471 *	<b>RAI1</b> probe 11730-L15192	17p11.2	Smith-Magenis syndrome

Tabuľka 10: Zoznam prb SALSA MLPA P311 probemixu  
(prevzat z MRC-Holland: MLPA, 2012b)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position					
		reference	GATA4	TBX5	NKX2-5	22q11	BMP4 CRELD1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA						
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation						
100	X-fragment: Specific for the X chromosome						
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome						
124 ~	<b>MSR1 probe</b> 04235-L08770	8p22					
130	<b>CTSB probe</b> 01212-L00766	Downstream GATA4					
136	<b>CRELD1 probe</b> 02141-L01620	Exon 3					
142	<b>GATA4 probe</b> 07641-L07326	Exon 5					
148	<b>GATA4 probe</b> 08309-L08282	Exon 1					
154	Reference probe 11356-L12081	12p13					
160	<b>TBX5 probe</b> 05694-L05136	Exon 9a					
166	<b>TBX5 probe</b> 06207-L05127	Exon 1					
174	<b>TBX5 probe</b> 05696-L05138	Exon 10					
184	<b>TBX5 probe</b> 05687-L05129	Exon 3a					
190	<b>NKX2-5 probe</b> 12465-L13480	Exon 1					
195	<b>TBX5 probe</b> 05688-L05130	Exon 4					
202	<b>GATA4 probe</b> 07643-L07328	Exon 7					
208 ±	<b>GP1BB probe</b> 05464-L10114	22q11					
215	Reference probe 08570-L08571	17q23					
229	<b>GATA4 probe</b> 07697-L07414	Upstream GATA4					
238	<b>GATA4 probe</b> 07642-L07327	Exon 6					
247	<b>TBX5 probe</b> 05691-L05133	Exon 7					
255	<b>BMP4 probe</b> 12467-L14521	Exon 1b					
266	<b>NKX2-5 probe</b> 11629-L12386	Exon 2c					
274	<b>NKX2-5 probe</b> 12468-L13483	Exon 1					
283	<b>TBX5 probe</b> 05695-L05137	Exon 9a					
292 ±	Reference probe 11087-L11770	2p24					
303	<b>TBX5 probe</b> 05697-L05139	Exon 10					
310	<b>GATA4 probe</b> 07638-L07323	Exon 2					
317	<b>TBX5 probe</b> 05686-L05128	Exon 2					
328	Reference probe 10682-L11264	6p12					
337	<b>GATA4 probe</b> 07639-L07324	Exon 3					
346	<b>TBX5 probe</b> 06209-L05132	Exon 6					
355	<b>GATA4 probe</b> 07640-L07325	Exon 4					
362	<b>GATA4 probe</b> 07696-L07413	Upstream GATA4					
369	Reference probe 12377-L13386	2q37					
382	<b>DGCR8 probe</b> 08476-L10765	22q11					
391	<b>BMP4 probe</b> 12469-L13484	Exon 5					
400	<b>CRELD1 probe</b> 12470-L13485	Exon 10					
409	Reference probe 07208-L06858	7p14					
418	Reference probe 11008-L11679	4q22					
427	<b>NKX2-5 probe</b> 12471-L13486	Exon 2c					
436	<b>BMP4 probe</b> 12472-L13487	Exon 2					
445	Reference probe 11010-L11680	7q32					
454	<b>BMP4 probe</b> 12473-L13488	Exon 4					
465	<b>CDC45 probe</b> 05463-L05808	22q11					
472	Reference probe 09205-L14667	18p11					
481	Reference probe 12530-L13580	6q23					

Tabuľka 11: Zoznam prôb SALSA MLPA P250 DiGeorge probemixu  
(prevzaté z MRC-Holland: MLPA, 2014f)

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		other	22q11
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
129	<b>PPIL2 probe</b> 07529-L04870		<b>22q11 D-E</b>
136	Reference probe 05059-L07380	EHMT1, 9q34.3	
142	<b>SLC25A18 probe</b> 05457-L07613		<b>22q11 CES</b>
148 ✕	<b>DGCR8 probe</b> 08475-L08486		<b>22q11 A-B</b>
154	Reference probe 05058-L07382	EHMT1, 9q34.3	
160 ✕	<b>HIRA probe</b> 01214-L02328		<b>22q11 A-B</b>
166	<b>SNRPD3 probe</b> 08481-L08492		<b>22q11 G-H</b>
172 ✕ †	<b>TBX1 probe</b> 05408-L07614		<b>22q11 A-B</b>
178	<b>MICAL3 probe</b> 05458-L04861		<b>22q11 CES</b>
184 ∅	Reference probe 01217-L00694	KLKB1, 4q35.2	
191 ✕	<b>CLTCL1 probe</b> 05462-L05809		<b>22q11 A-B</b>
196 ✕	<b>CLDN5 probe</b> 01218-L06270		<b>22q11 A-B</b>
202 ✕	<b>ZNF74 probe</b> 05927-L07395		<b>22q11 B-C</b>
208 ✕ †	<b>GP1BB probe</b> 05464-L10114		<b>22q11 A-B</b>
214 ¥	<b>GNAZ probe</b> 08478-L08489		<b>22q11 E-F</b>
220	<b>SMARCB1 probe</b> 05928-L07969		<b>22q11 F-G</b>
226	<b>USP18 probe</b> 07528-L04863		<b>22q11 CES</b>
232 †	Reference probe 06787-L07383	SHANK3, 22q13	
238 ✕	<b>TXNRD2 probe</b> 01223-L05814		<b>22q11 A-B</b>
245 ✕ †	<b>TBX1 probe</b> 10810-L14347		<b>22q11 A-B</b>
255	Reference probe 01735-L07385	RPH3AL, 17p13.3	
261	<b>RTDR1 probe</b> 08484-L09139		<b>22q11 E-F</b>
267	Reference probe 01225-L09140	GATA3, 10p14, DGR2	
274	Reference probe 01226-L03844	GATA4, 8p23.1	
283 ✕	<b>KLHL22 probe</b> 01227-L05815		<b>22q11 B-C</b>
292 ~	<b>TOP3B probe</b> 13299-L14649		<b>22q11 D-E</b>
301	Reference probe 07636-L07321	GATA3, 10p14, DGR2	
308	<b>HIC2 probe</b> 13302-L15009		<b>22q11 D-E</b>
316 ✕	<b>MED15 probe</b> 01231-L15877		<b>22q11 B-C</b>
326	Reference probe 12093-L15011	SLC25A4, 4q35.1	
335	<b>IL17RA probe</b> 01082-L15012		<b>22q11 CES</b>
342	<b>RAB36 probe</b> 05932-L04872		<b>22q11 E-F</b>
350	Reference probe 01232-L17068	TCEB1P3, 10p14, DGR2	
357	<b>BID probe</b> 01767-L07389		<b>22q11 CES</b>
364	Reference probe 01234-L00781	CELF2, 10p14	
373 ✕ ±	<b>SNAP29 probe</b> 01235-L00773		<b>22q11 C-D</b>
382	Reference probe 01522-L00952	CELF2, 10p14	
391	Reference probe 13603-L03531	YWHAE, 17p13.3	
400	<b>SMARCB1 probe</b> 05933-L05812		<b>22q11 F-G</b>
409	Reference probe 01238-L07390	GEMIN4, 17p13.3	
418 ✕ ±	<b>LZTR1 probe</b> 01521-L00951		<b>22q11 C-D</b>
427	Reference probe 01240-L00787	MSRA, 8p23.1	
434 ¥	Reference probe 04081-L25903	RPH3AL, 17p13.3	
445	Reference probe 01093-L00661	ARSA, 22q13	
454	<b>RTDR1 probe</b> 08479-L08490		<b>22q11 E-F</b>
465 ✕	<b>CDC45L probe</b> 05463-L05808		<b>22q11 A-B</b>
472	Reference probe 01243-L07392	PPP1R3B, 8p23.1	
487	Reference probe 08480-L15878	NEBL, 10p12.31, DGR2	



Tabuľka 17: Súhrnný zoznam vzoriek DNA plodov bez výsledku karyotypizácie z dôvodu zlyhania kultivácie, spolu s celkovým výsledkom MLPA analýzy

Číslo vzorky	Indikácia	Materiál	Výška gravidity	Karyotypizácia	Výsledok MLPA analýzy
1751/14	NT 3,2 mm, umbikálna artéria, tehotenstvo pokračuje	choriové klky	I. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
2217/14	hygroma colli cysticum, UPT	tkanivo z biopsie	I. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
1031/12	VVV srdca, patologický výsledok DUS, IUGR, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
1538/14	VVV urotraktu, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
71/12	hydrops plodu, NT 2,2 mm, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
1043/14	hydrocefalus, spina bifida, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
1/14	hydrocefalus, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
16/13	NT 9 mm, spontánny potrat dvojčiat po IVF	choriové klky	I. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
17/13	NT 9 mm, spontánny potrat dvojčiat po IVF	choriové klky	I. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
2201/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I. trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu

<b>Číslo vzorky</b>	<b>Indikácia</b>	<b>Materiál</b>	<b>Výška gravidity</b>	<b>Karyotypizácia</b>	<b>Výsledok MLPA analýzy</b>
2202/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I.trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
221/13	opakovaný spontánny potrat (ôsmy v poradí)	tkanivo z biopsie	I.trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
1703/13	zúžený pupočník, kraniofaciálna stigmatizácia, spontánny potrat	tkanivo z biopsie	II.trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
2009/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	II.trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
1970/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	II.trimester	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
930/13	mŕtvonarodený plod	tkanivo z biopsie	-	zlyhanie kultivácie	bez nálezu
1462/13	mŕtvonarodený plod	tkanivo z biopsie	-	zlyhanie kultivácie	bez nálezu

Tabuľka 19: Súhrnný zoznam vzoriek DNA plodov, ktorých karyotypizácia odhalila patologický cytogenetický nálež, spolu s celkovým výsledkom MLPA analýzy

Číslo vzorky	Indikácia	Materiál	Výška gravidity	Karyotypizácia	Výsledok MLPA analýzy
15/13	hydrops plodu, NT 5,1 mm, UPT	tkanivo z biopsie	I. trimester	47,XX,+21	<b>nález:</b> <b>potvrdil trizómiu 21</b>
273/14	VVV srdca, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	47,XX,+21	<b>nález:</b> <b>potvrdil trizómiu 21</b>
1135/13	hydrops plodu, spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I. trimester	47,XX,+21	<b>nález:</b> <b>potvrdil trizómiu 21</b>
1548/13	rázštep rtu a patra, spina bifida, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	47,XX,+18	<b>nález:</b> <b>potvrdil trizómiu 18</b>
212/13	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I. trimester	47,XX,+15[12]/ 46, XX [2]	<b>nález:</b> <b>potvrdil trizómiu 15</b> mierna maternálna kontaminácia
741/12	hydrops, hygroma colli cysticum, spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I. trimester	45,X	<b>nález:</b> <b>potvrdil monozómiu X</b>
1046/14	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I. trimester	46, XX,i(5p)/46,XX 30 % mozaika	bez nálezu: pravdepodobne maternálna kontaminácia
59/13	spontánny potrat	tkanivo z biopsie	I. trimester	47,XX,+22/46,XX 25% mozaika	bez nálezu: malá mozaika
1329/13	VVV srdca, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	47,XX,+18[2]/ 46,XX[20]	bez nálezu: malá mozaika

Číslo vzorky	Indikácia	Materiál	Výška gravidity	Karyotypizácia	Výsledok MLPA analýzy
1406/14	hydrocefalus, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XX,der(1)[4]/ 46,XX[9]	bez nálezu: kultivačný artefakt
890/11	makrocefália,ventrikulomegália, UPT	tkanivo z biopsie	I. trimester	69,XXY	bez nálezu
<b>1379/13</b>	NT 4,8 mm, absencia jednej pupočnikovej artérie, UPT	plodová voda	II. trimester	46,X,+ marker chromozóm	<b>nález: monozómia X</b>
506/14	NT 4,8 mm, UPT	choriové klky	I. trimester	46,XY, del(13)(q31.13 q33.3)	bez nálezu
<b>735/12</b>	pozitívny skríning I. trimestra, UPT	choriové klky	I. trimester	46,XX,inv.dup(8) (p23.1p21.2)	<b>nález: del(8)(p23.3)</b>

Tabuľka 21: Súhrnný zoznam vzoriek DNA plodov s normálnym karyotypom, spolu s celkovým výsledkom MLPA analýzy

Číslo vzorky	Indikácia	Materiál	Výška gravidity	Karyotypizácia	Výsledok MLPA analýzy
350/15	VVV srdca, UPT	plodová voda	II. trimester	46,XY	<b>nález: del(22)(q11.2)</b>
1848/14	agenéza obličiek, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XY	<b>nález: delSNAP29</b>
1818/13	NT 3,7 mm, tehotenstvo pokračuje	plodová voda	I. trimester	46,XX	bez nálezu
1783/13	NT 4 mm,tehotenstvo pokračuje	choriové klky	I. trimester	46,XY	bez nálezu
236/14	agenéza corpus callosum, tehotenstvo pokračuje	plodová voda	II. trimester	46,XY	bez nálezu
1507/14	anencefália, omfalokéla, UPT	tkanivo z biopsie	I. trimester	46,XY	bez nálezu
1856/14	holoprezencefália, UPT	choriové klky	I. trimester	46,XX	bez nálezu
287/13	megavesica, artrézia uretry, oligohydramnion,UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XY	bez nálezu
911/13	agenéza corpus callosum, hydrocefalus, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XX	bez nálezu
1910/14	Fallotova tetralógia, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XX	bez nálezu
294/14	difragmatická hernia, NT 3 mm, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XX	bez nálezu

Číslo vzorky	Indikácia	Materiál	Výška gravidity	Karyotypizácia	Výsledok MLPA analýzy
685/13	malformácie plodu, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XY	bez nálezu
1790/13	VVV srdca, UPT	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XY	bez nálezu
963/13	IUGR, oligohydramnion, UPT	choriové klky	II. trimester	46,XX	bez nálezu
33/14	hydrocefalus, UPT	plodová voda	II. trimester	46,XY	bez nálezu
1596/14	VVV srdca, UPT	plodová voda	II. trimester	46,XY	bez nálezu
501/14	hygroma colli cysticum, spontánny potrat	choriové kloky	I. trimester	46,XX	bez nálezu
1293/14	spontánny potrat	choriové klky	I. trimester	46,XY	bez nálezu
367/13	spontánny potrat	plodová voda	II. trimester	46,XX	bez nálezu
161/13	opakovaný spontánny potrat, VVV, defekty tváre	tkanivo z biopsie	II. trimester	46,XX	bez nálezu
141/15	mŕtvonarodený plod (s rázštepovou vadou)	plodová voda	II. trimester	46,XX	bez nálezu