

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Klára Švachová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004)

Klára Švachová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví (B0914P360004/0 - 2019)

**LABORATORNÍ POSTUPY V PRENATÁLNÍ GENETICKÉ
DIAGNOSTICE**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Sabina Planetová

PLZEŇ 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 31. 3. 2024.

.....

vlastnoruční podpis

ABSTRAKT

Příjmení a jméno: Švachová Klára

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Laboratorní postupy v prenatální genetické diagnostice

Vedoucí práce: Mgr. Sabina Planetová

Počet stran – číslované: 46

Počet stran – nečíslované: 34

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 48

Klíčová slova: metody prenatální genetické diagnostiky, Array-CGH, karyotyp, invazivní diagnostika

Souhrn:

Bakalářská práce je zaměřena zejména na metody invazivní prenatální diagnostiky a srovnávání jejich nálezů chromozomových aberací. V teoretické části se zabývám popisem laboratorních metod, formulováním výhod a nevýhod. Dále popisuji indikace ke genetickému vyšetření, způsoby získávání materiálu, edukace matky ohledně vyšetření. Dále zmiňuji, co je prenatální diagnostika, přínos pro matku a plod, kam se historicky její metody posunuly.

Teoretická část je členěna na dvě poloviny. V první se zabývám metodami klasické cytogenetiky. Druhá část obsahuje metody molekulární cytogenetiky.

Chromozomových aberací bylo v letech 2019-2023 diagnostikováno 335, největší podíl tvořily nebalancované aberace a to 98 % z toho 29 % tvořil Downův syndrom. Materiál pocházel z odběru amniocentézy nebo choriových klků a vzorků bylo za 5 let odebráno 3890.

Velkou chromozomovou aberaci (trizomií) mělo 168 (4,3 %) vzorků vyšetřených karyotypem. Array-CGH zachytila 107 nálezů (2,75 %) z celkových provedených 3890 odběrů.

Nejčastějšími nálezy metody array-CGH bylo: 106 nebalancovaných aberací oblastí 22q11.23 (12 nálezů), 16p13.11 (9) a 1q21.1. (9). Odhalena byla také 1 mozaika +7.

Karyotypové nálezy tvořil z 58,3 % Downův syndrom (98 nálezů), z 14,9 % Edwardsův syndrom (25 nálezů), ze 4,8 % triploidie 69, XXX/XXY- 8 nálezů, a další aberace tvořily 22 % (36 nálezů).

De novo vzniklé balancované aberace se v letech 2014-2018 vyskytly u 3 z 3481 odběrů. Kvůli vyšetření pomocí array-CGH uniká právě 0,09 % de novo balancovaných aberací ze všech odběrů.

Metoda array CGH je sice finančně náročnější, ale dokáže odhalit jak nebalancované aberace, tak velké chromozomové aberace (trizomie). Zvyšuje tedy záchyt o dalších 2,75 % nálezů z celkových 3890 odběrů na konečných 7 % pozitivních nálezů chromozomových aberací.

ABSTRACT

Surname and name: Švachová Klára

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Laboratory procedures in prenatal genetic diagnostics

Consultant: Mgr. Sabina Planetová

Number of pages – numbered: 46

Number of pages – unnumbered: 34

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 48

Keywords: methods of prenatal genetic diagnostics, Array-CGH, karyotype, invasive diagnostics

Summary:

This bachelor thesis focuses mainly on methods of invasive prenatal diagnostics and comparison of their findings of chromosomal aberrations. The theoretical part deals with the description of the laboratory methods and the formulation of their advantages and disadvantages. Furthermore, I describe indications for genetic testing, methods of sample collection, and maternal education regarding testing. I also explain what prenatal diagnostics are, the benefits for the mother and the fetus, how the methods have evolved. The theoretical part is divided into two halves. In the first one I deal with the methods of conventional cytogenetics. The second part contains the methods of molecular cytogenetics.

Chromosome aberrations were diagnosed in 335 cases from 2019 to 2023, with the majority being unbalanced aberrations (98 %), Down syndrome (29 %). The material came from amniocentesis or chorionic villus sampling and 3890 samples were collected over 5 years.

168 (4.3 %) of the karyotyped samples had a large chromosomal aberration (trisomy). Array-CGH detected 107 findings (2.75 %) of the total 3890 samples performed.

The most frequent findings of the array-CGH method were: 106 unbalanced aberrations of regions 22q11.23 (12 findings), 16p13.11 (9) and 1q21.1 (9). One mosaic +7 was also revealed.

Karyotypic findings consisted of 58.3% Down syndrome (98 findings), 14.9% Edwards syndrome (25 findings), 4.8% triploidy (69 findings), XXX/XXY (8 findings), and 22 % other findings (37 findings).

De novo balanced aberrations occurred in 3 of 3481 samples from years 2014 to 2018. Thanks to array-CGH testing, only 0.09% of de novo balanced aberrations go undetected.

Although the array CGH method is more expensive, it is able to detect both balanced aberrations and large chromosomal aberrations. Thus, it increases the detection rate by an additional 2.75 % of the 3890 samples to a final 7 % of positive chromosomal aberrations, although karyotyping may at first sight appear to be a more advantageous method in terms of detection.

PŘEDMLUVA

Toto téma bakalářské práce jsem si zvolila z vlastního zájmu zjistit fungování laboratoře prenatální diagnostiky, jaká vyšetření se zde provádí a jak vypadají výsledky z jednotlivých metod. Cílem práce je porovnání metod invazivní prenatální diagnostiky.

Poděkování

Děkuji Mgr. Sabině Planetové za odborné vedení práce, poskytování rad, podkladů pro práci, a hlavně za věnovaný čas. Dále děkuji celému kolektivu oddělení cytogenetiky na pracovišti Genetika Plzeň za názorné ukázky provádění metod, sdělení informací z praxe, osobní přístup a vřelou atmosféru.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ.....	11
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	12
SEZNAM TABULEK.....	13
SEZNAM ZKRATEK.....	14
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST.....	18
1 PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA.....	18
1.1 Screening vrozených vývojových vad (VVV).....	19
1.1.1 Screeningové strategie.....	19
1.1.2 Biochemické vyšetření.....	20
1.1.3 Ultrazvukové vyšetření.....	20
1.1.4 Vyhodnocení.....	21
1.2 Indikace k invazivnímu genetickému vyšetření.....	23
2 GENETICKÁ PODSTATA ONEMOCNĚNÍ.....	24
2.1 Vrozené chromozomové aberace (VCA).....	24
2.1.1 Početní aberace.....	24
2.1.2 Strukturní aberace.....	26
2.2 Monogenně podmíněná onemocnění.....	27
3 KARYOTYP A ZÍSKÁNÍ MATERIÁLU.....	28
3.1 Kultivace buněk.....	29
3.2 Úloha reagensů v přípravě a zpracování preparátu.....	30
4 MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ METODY.....	31
4.1 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH).....	31
4.2 Array-komparativní genomová hybridizace (A-CGH).....	33
4.3 Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR).....	36
5 NEINVAZIVNÍ PRENATÁLNÍ TESTOVÁNÍ – BEZBUNĚČNÁ DNA (CFDNA) ...	39
PRAKTICKÁ ČÁST.....	40
6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE.....	40
6.1 Hlavní cíl.....	40
6.2 Dílčí cíle.....	40
7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY.....	41
8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU.....	42
9 METODIKA PRÁCE.....	43
9.1 Popis pracovních postupů.....	43
9.1.1 Dlouhodobá kultivace choriových klků.....	43

9.1.2	Pasážování kultury.....	44
9.1.3	Dlouhodobá kultivace plodové vody.....	44
9.1.4	Příprava a zpracování preparátu.....	45
9.1.5	Barvení chromozomů.....	47
9.1.6	Sestavení a hodnocení karyotypu.....	48
9.1.7	Postup FISH.....	50
9.1.8	Postup array-CGH.....	51
9.1.9	Postup QF-PCR.....	54
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ.....	55
10.1	Nejčastější vrozená chromozomová aberace.....	55
10.2	Počet nálezů chromozomových aberací zjištěných metodou array-CGH ve srovnání s klasickým karyotypem.....	55
10.3	Konkrétní nálezy aberací odhalené array-CGH.....	56
10.4	Konkrétní nálezy aberací odhalené vyšetřením karyotypu.....	58
10.5	Počet balancovaných aberací nezjistitelných array-CGH.....	59
	DISKUZE.....	60
	ZÁVĚR.....	62
11	BIBLIOGRAFIE.....	63
	SEZNAM PŘÍLOH.....	69
	PŘÍLOHY.....	70
	Příloha A – Anonymizovaná medicínská data.....	70

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Počet chromozomových aberací z AMC a CVS.....	42
Graf 2: Nálezy jednotlivých chromozomových aberací	55
Graf 4: Počet nálezů jednotlivými metodami	56
Graf 3: Chromozomové aberace nalezené vyšetřením karyotypu	59

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Indikační schéma prenatální péče	22
Obrázek 2: Mikroskopický obraz FISH	32
Obrázek 3: Normální mužský array profil	34
Obrázek 4: Normální výsledek QF PCR	38
Obrázek 5: Normální ženský karyogram	49
Obrázek 6: Porovnání výsledků matky a plodu	58

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Nález balancovaných aberací díky provedení karyotypu	59
Tabulka 2: Počet provedených metod pro prenatální diagnostiku	70
Tabulka 3: Výsledky prenatální diagnostiky	71
Tabulka 4: Počet provedených invazivních odběrů	71
Tabulka 5: Nález chromozomálních aberací po amniocentéze	71
Tabulka 6: Nález chromozomálních aberací po CVS	72
Tabulka 7: Nález z čipů 2023	73
Tabulka 8: Nález z čipů 2022	74
Tabulka 9: Nález z čipů 2021	76
Tabulka 10: Nález z čipů 2020	78
Tabulka 11: Nález z čipů 2019	79

SEZNAM ZKRATEK

ACGH.....	array – komparativní genomová hybridizace na čipu
AFP.....	alfa-fetoprotein
AMC.....	aminocentéza
bp.....	pár bází (z angl. base pair)
BSA.....	sérový hovězí albumin (z angl. bovine serum albumin)
CF-DNA.....	bezbuněčná DNA (z angl. cell-free DNA)
CRL.....	temeno-kostrční délka (z angl. crown-rump lenght)
CNV.....	variace počtu kopií (z angl. copy number variants)
CVS.....	odběr choriových klků (z angl. chorionic villus sampling)
DANSR.....	digitální analýza vybraných regionů (z angl. Digital Analysis of Selected Regions)
DAPI.....	4',6-diamidin-2-fenylindol
DCTP.....	deoxycytidintrifosfát
DGS.....	DiGeorgeův syndrom
DNA.....	deoxyribonukleová kyselina
DNTP.....	deoxyribonukleosidtrifosfát
DR.....	hladina detekce (z angl. detection rate)
DV.....	přítok krve v žilní spojce (ductus venosus)
FISH.....	fluorescenční in situ hybridizace
FITC.....	fluorescein-5-isothiokyanát
FHR.....	srdeční frekvence plodu (z angl. fetal heart rate)

FPR..... míra falešné positivity, (z angl. false positive rate)

F- β hCG..... volná beta podjednotka lidského choriového gonadotropinu,
(z angl. free beta human chorionic gonadotrophin)

CHT..... choriová tkáň

IUGR..... růstová retardace, (z angl. intrauterine growth restriction)

KL..... kultivační lahvička

KM..... kultivační médium

MM..... master mix

mtDNA..... mitochondriální deoxyribonukleová kyselina

NB..... nosní kůstka (z angl. nasal bone)

NIPT..... neinvazivní prenatální testování

NT..... nuchální translucence

PAPP-A..... plazmatický specifický těhotenský protein A (z angl.
pregnancy associated plasma protein)

PHA..... phytohaemagglutinin

PK..... primokultura

PV..... plodová voda

RCA..... replikace rotujícího kruhu (z angl. rolling-circle
amplification)

SNP..... jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide
polymorphism)

SSC..... solný roztok citátu sodného (z angl. saline-sodium citrate)

STR..... krátké tandemové repetice (z angl. short tandem repeats)

sy..... syndrom

TE tris-ethylendiamintetraoctová kyselina

TGF- β receptor receptor transformujícího růstového faktoru beta (z angl. Transforming growth factor beta receptor)

TR trikuspidální regurgitace

tRNA transferová ribonukleová kyselina

TT týden těhotenství

TV trikuspidální chlopeň (z angl. tricuspid valve)

uE₃ nekonjugovaný estriol (z angl. unconjugated estriol)

UZ ultrazvuk

VCA vrožené chromozomové aberace

VVV vrožené vývojové vady

WB odmývací pufr (z angl. washing buffer)

ÚVOD

Genetická laboratorní diagnostika je poměrně mladým a neustále se rozvíjejícím oborem. Dnes mají pracoviště genetiky možnost vyšetřovat různými metodami a práci jim mohou usnadnit také výrobcem připravené sety například pro specifické chromozomy u kvantitativní fluorescenční polymerázové řetězové reakce. Rychlost vydání výsledku je v prenatalní diagnostice klíčová a ovlivňují jí také vyšetřovací strategie a používané metody dané laboratoře.

Každá metoda má své výhody a limitace, odlišné procento záchytů a je různě vhodná pro jednotlivé skupiny chromozomových aberací. Tyto aberace jsou zase zastoupeny v různých poměrech v populaci.

V práci se zabývám porovnáváním metod array-CGH ve srovnání s vyšetřením karyotypu z hlediska jejich schopnosti záchytu chromozomových aberací a jaké jsou jejich nejčastější nálezy. Zhodnotím, zda je případně nutné dále vyšetřovat karyotyp u negativních nálezů po QF-PCR, kvůli záchytu de novo vzniklých balancovaných aberací. Popíšu také jednotlivé metody, jejich výhody, omezení a využití v klinické praxi. Zhodnotím počet pozitivních nálezů k celkově vyšetřeným vzorkům u metod array CGH a karyotyp vyšetřených postupy Genetiky Plzeň. Zvláštní důraz bude kladen schopnost metod poskytovat přesné a komplexní genetické informace relevantní pro prenatalní diagnózu.

TEORETICKÁ ČÁST

1 PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA

S pokrokem vědy a vyvinutím nových diagnostických metod začíná prenatální diagnostika postupně přecházet k méně invazivním postupům. Jedním z cílů je snaha o co nejmenší invazivitu vyšetření, zároveň nízké riziko komplikací při zachování kvality a přesnosti měření. Přestože dnes dokážeme vyšetřit plod neinvazivně například z krve matky, stále je třeba tyto výsledky ověřovat invazivními postupy, které jsou zlatým standardem již desítky let a jejich role zůstává prozatím nenahraditelná.

Přestože je nyní i více možností léčby než dříve, stále zatím zůstává většina vrozených genetických onemocnění nevléčitelná. Diagnostika dává pacientkám potřebné informace o zdravotním stavu plodu a umožňuje jim volbu, zda přistoupit k ukončení těhotenství nebo se připravit na život s dítětem s konkrétními potřebami. Možnost umělého ukončení těhotenství z důvodů zdravotních, jako jsou genetické anomálie plodu nebo vrozené vývojové vady, je možná až do 24. týdne těhotenství. Tento fakt je důležité zohlednit již při nabízení diagnostických vyšetření. Po stanovení diagnózy může být pacientce doporučena pomoc s péčí o novorozence, která zahrnuje jak fyzickou, tak psychickou podporu jak pro ni samotnou, tak i pro její rodinu, poskytovanou v specializovaných centrech.

Důležitou součástí péče je genetické poradenství, jehož prostřednictvím jsou těhotné poskytnuty informace ohledně situace, ve které se nachází. Genetická konzultace se provádí ještě před samotnými invazivními vyšetřeními, protože je vždy na jejím uvážení, zda si přeje konkrétní vyšetření absolvovat a informovanost jí dává možnost uvědomělého rozhodnutí. Na úvodní genetické konzultaci je probíráno riziko postižení plodu, podstata a možné následky daného postižení, rizika a limitace potenciálních postupů, čas potřebný pro vyšetření a vyhodnocení, pravděpodobnost provedení opakování výkonu. V některých případech ani po provedení vyšetření nemusí konkrétní genetický test odhalit příčinu postižení plodu, výsledek tedy není konečný, a mohou být doporučeny jiné další upřesňující metody (Nussbaum et al., 2004).

1.1 Screening vrozeých vývojových vad (VVV)

Screening VVV je doporučený a standardně prováděný všem těhotným ženám, které navštěvují těhotenskou poradnu. Softwarovým výpočtem se následně stanovuje individuální riziko častých aneuploidí u plodu.

1.1.1 Screeningové strategie

Kombinace jednotlivých biochemických a ultrazvukových markerů jsou sestaveny podle screeningové strategie. V ČR se používá zejména kombinovaný test sestávající z biomarkerů a ultrazvukového vyšetření. Dále se může provést tzv. kontingenční test, pokud je výsledek kombinovaného testu se středním rizikem. Ve kterém se na UZ se hodnotí také minormarkery a to: nosní kůstka (NB), trikuspidální regurgitace (TR), průtok krve v žilní spojce (ductus venosus, DV) nebo je těhotné nabídnuta NIPT.

Dříve byla nejvíce používána sekvenční varianta integrovaného testu. Varianta tohoto testu je odvozena od integrovaného testu, který je nejpřesnější z hlediska hladiny detekce (detection rate, DR) a míry falešné positivity (false positive rate, FPR). Samotný integrovaný test se v praxi nikdy nepoužíval. Jeho sekvenční variantu využívají některé země, ČR se k těmto zemím neřadí a využívá test kombinovaný. Problémem samotného integrovaného testu je jeho časová náročnost, jelikož by po jeho první části u rizik nižších než 1:100, neměla být nabízena karyotypizace, ale mělo by se čekat až na výsledky biochemického vyšetření v druhém trimestru. V praxi je ale žádoucí, aby vada byla odhalena co nejdříve i za cenu vyšší falešné positivity. Sekvenční varianta integrovaného testu má několik problémů. Hlavním jsou nejpřesnější výsledky až v 2. trimestru, kdy se musí čekat. Dále se oba screeniny mají provádět v jedné laboratoři, aby byly výsledky integrované. V neposlední řadě se oba výsledky nesmí hodnotit samostatně, což také nebývá vždy dodrženo (Belošovičová, Calda, 2012). Séroum integrace je využívána dodnes, kdy se hodnoty z biochemických markerů 1. trimestru vyšetřované na jiném pracovišti integrují s hodnotami biochemických markerů 2. trimestru na dalším pracovišti.

Kombinovaný screening je nyní prováděn nejčastěji, a to v 1. trimestru gravidity, konkrétně od 10. - 13. týdne. Nejpřesnějších výsledků dosahuje test v 10. nebo 11. týdnu, než při vyšetření ve 13. týdnu (Kagan et al., 2008). Těhotné se na lačno odebírá 3–5 ml srážlivé venózní krve. Ze séra se poté stanovuje plazmatický specifický těhotenský protein A (pregnancy associated plasma protein A, PAPP-A) a volné beta podjednotky lidského choriogonadotropinu (free-beta hCG, f-β hCG) (Musil, 2021).

V 2. trimestru se používal triple test. Byl prováděn v 15-20. týdnu těhotenství. Dnes se používá samostatně jen ve výjimečných případech, pokud těhotná nestihne prvotrimestrální část screeningu nebo pokud jde o sérum integraci. Nevýhodou je ale nižší DR, 65-70 % při použití f-β hCG, při použití intaktního hCG je to ještě o dalších 5 % méně. V ČR se stanovují sérový alfa-fetoprotein (AFP), intaktní hCG a nekonjugovaný estriol (uE₃) (Nicolaidis, 2011). V budoucnu bude triple test nejspíše kompletně nahrazen ultrazvukem (UZ) a neinvazivním prenatalním testováním (NIPT). U NIPT se uvažuje o použití při pozitivním screeningu do rizika 1:500 nebo 300.

1.1.2 Biochemické vyšetření

PAPP-A je glykoprotein produkovaný syncytiotrofoblastem a septálními X buňkami odvozenými z trofoblastu. V období gravidity jeho hladina lineárně roste s gestačním stářím až do konce těhotenství. Zatímco u plodů s Downovým syndromem, ale i například Edwardsovým či Patauovým syndromem jsou hladiny nízké. Nižší hladiny byly zjištěny také u nepříznivých výsledků těhotenství jako je růstová retardace (IUGR), spontánní potrat, narození mrtvého dítěte, předčasný porod a preeklampsie. Pokles ale není tak výrazný jako u chromozomálních abnormalit (Kalousová et al., 2014).

Free-beta hCG je jednou z volných, hyperglykosylovaných podjednotek lidského choriového gonadotropinu¹, druhou je alfa-hCG. Před uvolněním do matčina oběhu jsou nekovalentně vázány. Funkcí f-β hCG je blokování apoptózy přes receptor transformujícího růstového faktoru beta TGFβ receptor a tím podpora rakovinného buněčného růstu. Jeho nadbytek byl pozorován u hydatidiformní moly, choriokarcinomu a téměř výhradně u netrofoblastických karcinomů všech primárních onemocnění, jelikož je produkován těmito strukturami (Cole, 2010). Podle Dugoffa et al., 2004, naopak jeho nízké sérové koncentrace naznačují vyšší riziko potratu.

1.1.3 Ultrazvukové vyšetření

Vyšetření pomocí ultrazvuku je jedním z prvních, které je od 90. let minulého století využíváno při diagnostice aneuploidí, zejména trizomie 21, v prvním trimestru. Základním markerem pro posouzení rizika je šířka nuchální translucence (NT)² (Nicolaidis et al., 1992). Dále pak byla potvrzena korelace mezi tloušťkou NT nad 3,5 mm a nepříznivým výsledkem těhotenství v 2-18 % případů (Ville, 2001). Obecně se udává, že

¹ Glykoproteinový hormon, produkovaný placentárním syncytiotrofoblastem.

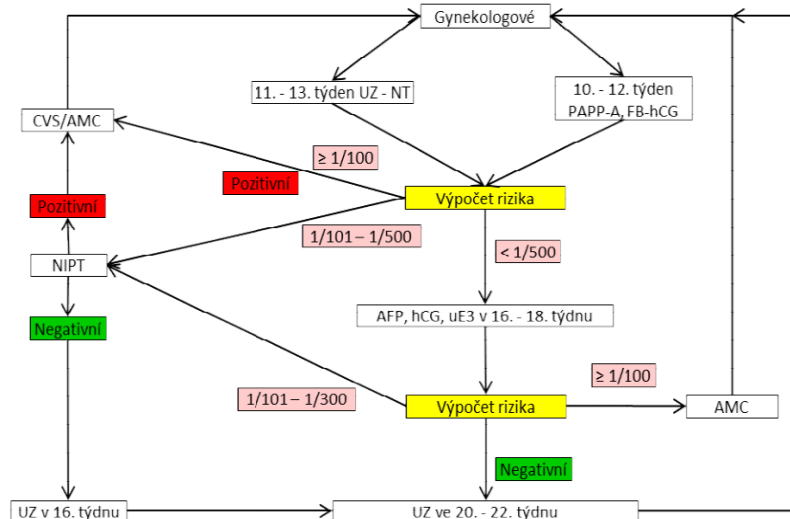
² NT je shluk tekutiny pod kůží za krkem u plodu. Termín se používá pouze v 1. trimestru.

by tloušťka NT neměla přesáhnout 3 mm, přesnou cut-off hodnotu tloušťky NT určuje také temeno – kostrční délka plodu (CRL) a s tím související délka těhotenství. NT se totiž zvyšuje s délkou těhotenství. Dnes se provádí výhradně gynekologem s certifikátem od Fetal Medicine Foundation v 11-13. týdnu těhotenství a CRL plodu je ideálně v rozmezí 45-84 mm. NT není jediným měřeným parametrem. Mohou se hodnotit také přídatné parametry jako je velikost nebo úplná absence NB. Byla totiž zjištěna souvislost absence nebo zkrácení nosní kůstky a chromozomálních abnormalit zejména u Downova syndromu. Do základních parametrů patří ještě měření srdeční frekvence plodu (FHR). U zdravého plodu se zvyšuje frekvence do 10. týdne a od 14. týdne pak začne klesat, zatímco plody s Patauovým nebo Turnerovým syndromem mají FHR trvale vyšší. Naopak FHR s Edwardsovým syndromem a triploidii je trvale nízké (Nicolaidis, 2004). Mezi dalšími přídatnými markery jsou měření průtoku krve přes trikuspidální chlopeč (TV) a ductus venosus (DV) pomocí dopplerometrie. DV i TV by měly být vyšetřovány, pokud má těhotenství střední riziko po NT a biochemii prvního trimestru nebo předpoklad vrozeného srdečního onemocnění. Jedná se totiž o časově i personálně náročné vyšetření. Pro získání spolehlivého tvaru vlny musí mít sonografista letité zkušenosti a je pravidelně kontrolován (Maiz et al., 2009). Průtok krve TV je měřen kvůli trikuspidální regurgitaci, která je velice častá u plodů s trizomií. Hlavně u plodů s trizomií 21, kdy se ve screeningu stanovoval i tento marker byla zachycena více než polovina, konkrétně 56 % (Kagan et al., 2009).

1.1.4 Vyhodnocení

Výsledky biochemie a UZ jsou hodnoceny podle následujícího schématu. Těhotné jsou vždy rozděleny podle rizika do tří hladin na nízké, střední a vysoké riziko. Dále jsou jim na jeho základě doporučována další vyšetření.

Obrázek 1: Indikační schéma prenatalní péče



Zdroj: <https://slg.cz/documents/14/doporuceni-screening-2018.pdf>

Z obrázku je patrné, že screening začíná u registrujícího gynekologa. Ten na začátku screeningu v 10-12.³ týdnu těhotenství (TT) nechá nabrat vzorek žilní krve, zadá požadavek laboratoři a vzorek rovnou odešle do biochemické laboratoře nebo s odběrem a vyšetřením počká až do 13. TT, kdy certifikovaný sonografista provede také UZ. U druhé varianty je v ten samý den vzorek odebrán a vyšetřen na prenatalní klinice, vypočte se riziko na základě UZ a výsledků z krve a těhotná obdrží výsledky prvotrimestrálního screeningu. Takto funguje model One-stop clinic assessment of risk (OSCAR), kde jsou všechna pracoviště zabývající se prenatalní diagnostikou, jakými jsou gynekologie, laboratoř genetiky a klinické biochemie, na jednom místě nebo v těsné blízkosti. Z výzkumu Johnsona et al., 2007 vyplývá, že jsou ženy velice spokojeny nebo spokojeny s tímto modelem. Pokud možno, vyšetřujeme tedy v týdnu 13. i za předpokladu nižší DR.

³ V jiných zdrojích se uvádí až do konce 13.TT.

Pokud je screening v 1. trimestru pozitivní, riziko je rovno nebo větší než 1/100, přistupuje se k invazivní genetické diagnostice a volí se z vyšetření choriových klků (CVS) nebo plodové vody. Při středním riziku, tedy v rozmezí od 1/101-1/500, je doporučena NIPT, která je taktéž screeningovým vyšetřením a rozdělí těhotné do 2 kategorie s pozitivním a negativním výsledkem. U NIPT pozitivních je opět doporučováno invazivní genetické vyšetření -AMC. NIPT negativní pak mohou přijít až na UZ v 16. TT a následně v 20-22. TT. U těchto žen je také možnost provést UZ s hodnocením minomarkerů. Poslední a nejpočetnější skupinou jsou těhotné s negativním výsledkem 1/500 a více. Ty jsou dále vyšetřeny až UZ ve 20.-22. TT.

Veškeré výsledky jsou zasílány gynekologovi, který spolupracuje s jednotlivými laboratořemi, ať už biochemickými nebo genetickými. Výsledky i další postup má možnost konzultovat s kvalifikovanými pracovníky laboratoře. Většinou předává těhotné informace gynekolog. V případě pozitivního výsledku těhotná konzultuje s lékařem se specializovanou způsobilostí v oboru lékařské genetiky.

1.2 Indikace k invazivnímu genetickému vyšetření

Kritéria k invazivnímu prenatalnímu genetickému vyšetření jsou pozitivní prvotrimestrální nebo druhotrimestrální screening či nález dvou z takzvaných měkkých markerů na UZ. Ultrazvukem mohou být odhaleny další vývojové vady například centrální nervové soustavy, jsou také indikací. Dalším kritériem je věk matky nad 38 let nebo pokud jsou úzkostlivé, v souvislosti se zdravím plodu, může být invazivní genetické vyšetření po konzultaci provedeno. Pokud má sourozenec diagnostikovanou de novo vzniklou chromozomální vadu nebo pokud bylo předchozí těhotenství ukončeno z důvodu přítomnosti de novo chromozomální vady. U takto vzniklé chromozomální abnormality v předešlém těhotenství je vyšší pravděpodobnost výskytu těchto abnormalit i v dalším těhotenství. Vyšetření by měly podstoupit také těhotné s rodinným výskytem daného genetického onemocnění. Například pokud má jeden z páru diagnostikovanou některou strukturální chromozomální vadu. Zvláště vysoké riziko 100% přenosu představuje robertsonská translokace 21q21q nebo izochromozom. Dále u monogenních a X – vázaných onemocnění (Nussbaum et al., 2004, s. 346).

2 GENETICKÁ PODSTATA ONEMOCNĚNÍ

Laboratorní diagnostika prenatálních genetických onemocnění se zabývá vyhledáváním změn v genetickém materiálu. Změna (mutace) může nastat na třech úrovních: na úrovni genu, chromozomu nebo genomu a v různých fázích jak vývoje samotného jedince, tak buňky. Jsou známa také takzvaná multifaktoriální onemocnění vznikající nejen na podkladě genetickém, ale na jejich vzniku se podílí i faktory vnějšího prostředí. Pro každou skupinu onemocnění jsou vhodné jiné vyšetřovací metody, jelikož každá má jinou rozlišovací schopnost. Například onemocnění na úrovni genu nerozlišíme pomocí stanovení karyotypu. Zatímco molekulárně genetické metody změnu spolehlivě odhalí.

2.1 Vrozené chromozomové aberace (VCA)

Vrozená chromozomová aberace se může projevovat změnou v počtu nebo struktuře chromozomů. U novorozenců se aberace projevují vrozenými vývojovými vadami, malformacemi, růstovou a mentální retardací. VCA jsou také často nalézány u potracených plodů. Lze je vidět pod mikroskopem na rozdíl od molekulárních aberací, kde dochází ke změnám na úrovni jediného genu.

2.1.1 Početní aberace

Numerické aberace lze rozdělit podle typu změny v chromozomu nebo chromozomech na polyploidie a aneuploidie. Hodnotíme také, na jakých chromozomech k mutaci došlo, zda na autozomech nebo gonozomech. Řadíme je do mutací na úrovni genomu. Při změnách celé chromozomové sady hovoříme o polyploidii. Ta je charakterizována nadbytkem jedné⁴ nebo dvou⁵ sad k normální diploidní sadě. S tímto typem se většinou setkáváme pouze u plodů, jelikož bývají samovolně potraceny.

Pokud má jedinec nadbytek nebo nedostatek jednoho nebo více chromozomů v páru hovoříme o aneuploidii. Nejčastějšími aneuploidii u živě narozených dětí jsou trizomie, monozomie a mozaicismus. Trizomii mají hlavně chromozomy 21 (Downův syndrom), 18 (Edwardsův sy.) a 13 (Patauův sy.). Přežití je dáno relativně nízkou hustotou genových lokusů nebo nejmenší velikostí chromozomů. U všech ostatních autozomálních trizomií dochází k spontánnímu potratu (Passarge, 2019). Monozomii nacházíme u

⁴ Triploidie, 3n,69 chromozomů

⁵ Tetraploidie, 4n,92 chromozomů

gonozomů, autozomální monozomii už jen u potracených plodů. Jediná monozomie slučitelná se životem je monozomie X (Turnerův sy.) všechny ostatní monozomie nejsou slučitelné se životem. I u ní se však předpokládá mozaicistní forma monozomie. Dalšími aneuploidiemi gonozomů jsou nadbytečný chromozom X (u mužů – Klinefelterův sy.) nebo Y. Nadbytečný chromozom X u žen a nadbytečný chromozom Y nejsou spojeny s žádným specifickým fyzicky rozpoznatelným fenotypem.

Mozaicismus rozeznáváme jako pravý a pseudomozaicismus jedné nebo více buněk. Pravý mozaicismus je z laboratorního hlediska definován přítomností více než jedné zárodečné buněčné linie s různým karyotypem u jednoho embrya ve více jeho buněčných kulturách pocházejících z plodové vody nebo choriových klků. Ve formě mozaiky můžeme nalézt i aneuploidie, a to trizomie chromozomů 7, 8, 9, 12, 14, 15, 16, 17, 20, 22 a monozomie 7, 18 a 21. Pravý mozaicismus vzniká dvěma způsoby a stejně jako u monozomie, ho pozorujeme častěji u pohlavních chromozomů. U obou způsobů vzniku dojde k mutaci buňky, dochází k dělení a množení atypického klonu buněk. Mutace může nastat v různých fázích dělení, ovlivňuje tak vývoj a rozsah fenotypového projevu. První možností, jak může vzniknout mozaiková aneuploidie je záchrana meiotické non-disjunkce u zygoty s patologickým počtem chromozomů pomocí postzygotické ztráty nebo duplikace celého chromozomu (Campbell et al., 2015). Může pak vznikat také uniparentální disomie, což je stav, kdy má jedinec oba chromozomy nebo jejich část pouze od jednoho rodiče. Druhá možnost je u zygot s normálním počtem chromozomů a dochází k ní při mitotické non-disjunkci nebo když anafáze probíhá opožděně během somatického dělení (Conlin et al., 2010).

Pseudomozaicismus bývá pouze u jedné buněčné kultury a nemá žádný diagnostický význam. Objevuje se například u dlouhodobých kultur choriových klků s obsahem krve, které jsou kontaminovány mateřskými buňkami (Stojilkovic-Mikic et al., 2005).

2.1.2 Strukturní aberace

Strukturní aberace patří do mutací na úrovni chromozomu. Obvykle se vytvářejí tak, že dojde k nereciproké výměně homologických opakujících se sekvencí mezi identickými nebo různými chromozomy nebo při chromozomální nestabilitě dojde ke zlomům blízko umístěných chromozomů a enzymové reparační mechanismy tyto konce vzájemně spojí. Obecně lze tedy říci, že strukturní aberace mohou vznikat během buněčného cyklu, ať už ve fázi G1 nebo G2 a podle postižení jednoho nebo obou chromozomů lze určit, kdy ke zlomu došlo (Passarge, 2019).

Nejčastěji se vyskytující strukturní aberace jsou delece, duplikace, izochromozom, translokace, inverze, prstencový (ring) chromozom (Pritchard, Korf, 2007). Strukturní aberace jsou rozlišovány na balancované a nebalancované. Translokace, inverze nebo inserce patří mezi balancované strukturní aberace. Nebalancovaných aberací je více a jedná se o delecii, duplikaci, izochromozom, ring chromozom.

Delece je ztráta určité oblasti chromozomu, při které se odstraní část genu nepřipojí k původnímu chromozomu. Může vznikat dvěma způsoby. Tím prvním způsobem je při nerovnoměrném crossing-overu v meióze. Ke špatnému spárování dochází hlavně u chromozomálních oblastí obsahujících tandemové repetice DNA sekvencí. Druhým způsobem je předešlá translokace části některého chromozomu u jednoho z rodičů (Pritchard, Korf, 2007). Podle místa, kde došlo ke zlomu/ům a odstranění úseku na chromozomu dělíme delece na insterstickiální a terminální. Interstickiální je odlomená oblast, mezilehlá na raménku chromozomu a muselo dojít ke dvěma zlomům. Terminální úsek je na konci chromozomu a k jeho ztrátě je třeba pouze jednoho zlomu. Deleční syndromy jsou dále klasifikovány na základě jejich rozsahu na deleční (Cri du chat, Angelmanův, Prader Willi sy.) a mikrodeleční. Nejčastějším mikrodelečním syndromem u plodů je DiGeorgův syndrom (Grati et al., 2015). Deletována je kritická oblast 22q11.2.

Pokud dojde ke dvěma zlomům, delecím konců chromozomu a později k propojení těchto deletovaných konců, hovoříme o prstencovém (ring) chromozomu.

Při duplikaci chromozom získá nový materiál, může jít o malý marker chromozom, který se připojí k původnímu. Často jde o malé chromozomy 15 z důvodu přítomnosti duplikovaných pericentrických úseků DNA, které jsou navíc invertované, tedy přetočené o

180°. Z příkladu vyplývá že, duplikace a delece bývají vidány společně. Z jednoho chromozomu je deletován (chybí) marker chromozom, který přechází na jiný chromozom, ke kterému se připojí a vzniká duplikace (přebývá).

Naopak pokud dojde reciproké k translokaci, dochází k vzájemné, ale na rozdíl od duplikace a delece, vyrovnané výměně genetického materiálu. Existují i Robertsonské translokace, způsobené centrickou fúzí akrocentrických chromozomů. Genetická informace pro tvorbu ribozomální RNA je obsažena právě na raménkách akrocentrických chromozomů. K nebalancované translokaci ale nedochází, jelikož ostatní akrocentrické chromozomy stále informaci přenášejí a jde tedy o změnu balancovanou (Pritchard, Korf, 2007, s. 55).

Izochromozom je metacentrický chromozom tvořený duplikací jednoho raménka chromozomu a delecí raménka druhého chromozomu, tím vznikají dvě identická raménka, z toho je jedno přesnou kopií raménka původního. K této genetické změně může docházet v důsledku nesprávného buněčného dělení, kdy se centromera rozdělí příčně, namísto obvyklého podélného dělení. Dále může dojít k chromozomovým zlomům a fúzi sesterských chromatid pod centromerou. K druhému mechanismu vzniku dochází častěji. Během buněčného dělení se chromozomy dělí normálně, protože jedna centromera z dicentrického chromozomu se stejně stává nefunkční (Ferguson-Smith, Brenner, 2001).

2.2 Monogenně podmíněná onemocnění

Monogenní onemocnění jsou způsobena jedním mutovaným genem. Platí u nich Mendelistická dědičnost, tedy rozlišujeme autozomálně recesivní (Cystická fibróza) nebo dominantní (Marfanův sy.) a vázané na pohlavní chromozomy dominantní (Incontinentia pigmenti) či recesivní (Hemofilie A).

Nejnovější je objevení mitochondriální dědičnosti – matroklinní dědičnost, kdy matka onemocnění přenáší na všechny své potomky. Takovým příkladem může být mitochondriální myopatie, encefalopatie, laktátová acidóza a mozkové příhodě podobné epizody (MELAS), multiorgánové onemocnění s prevalencí 1-9/1 000 000. Dochází k mutaci 3243A>G MT-TL1 genu pro leucin ,v 5. podjednotce komplexu 1, mitochondriální DNA (mtDNA). V této oblasti se nachází mitochondriální transferová RNA (tRNA) a způsobuje její poruchu vedoucí ke špatné tvorbě mitochondriálních proteinů (Orphanet, 2020).

3 KARYOTYP A ZÍSKÁNÍ MATERIÁLU

Stanovení karyotypu je vhodné vyšetřit zejména při onemocněních na úrovni chromozomu. Chromozomy musí být pro dobré rozeznání v metafázi, jelikož dochází k jejich největší kondenzaci. Materiály používané pro toto stanovení v prenatální diagnostice jsou: buňky choria, plodová voda, pupečnicková krev nebo buňky potraceného plodu. Pro stanovení karyotypu je nutné použít invazivní postupy.

Odběr je vždy ideální provádět v blízkosti laboratoře. Pokud to není možné, vzorky musí být do laboratoře transportovány co nejrychleji, nejdéle 24 hodin po AMC. Vzorky nesmí být vystaveny velkým teplotním výkyvům a mechanickým otřesům. K přepravě jsou používány transportní nádoby s tepelnou izolací.

Nejdříve lze prenatálně provést časnou biopsii choriových klků a to od 10. TT do 13. týdne těhotenství. Pacientka je v poloze na zádech a před vpichem je místo vydezinfikováno. Odběr může být proveden transabdominálně (TA CVS) nebo transcervikálně (TC CVS). Transcervikální přístup je rizikovější z hlediska bezpečnosti. Riziko spontánního abortu je běžně u TA CVS 0,5-1 %, zatímco u TC CVS jsou to 2-4 %. Odběr provádí vždy gynekolog do sterilní stříkačky s punkční jehlou o průměru 0,9 mm nebo 0,77 mm (Hájek et al., 2000, s. 155). Zavede ji přes stěnu břišní za kontroly UZ do choriové tkáně. Buňky choriových klků jsou aspirovány do sterilní heparinové zkumavky o objemu 10 ml. Vždy po odběru proběhne kontrola množství tkáně, avšak vážení se neprovádí. Pro vyšetření je třeba získat minimálně 10-20 mg klků. V prvním trimestru je možné podstoupit i časnou⁶ aminocentézu, která však není doporučována kvůli častějším komplikacím při i po výkonu, příkladem je únik amniové tekutiny, který se u časně AMC zvyšuje z 1,7 % na 3,5 %. Byla nalezena i souvislost vyššího výskytu potracení plodu o 1,7 % u časně AMC než u té klasické. Zvýšené procento je zaznamenáno také u onemocnění pes equinovarus congenitus z 0,1 % na 1,3 % (CEMAT, 1998). Novorozenec trpící tímto onemocněním se potýká s vrozenými deformitami nohou.

⁶ Před 15.TT

V druhém trimestru je možností vyšetření karyotypu více. Od 15. TT se může provádět klasická aminocentéza, obvykle je odebírána v 17. TT, ve 3. trimestru pak pozdní placentární biopsie až do 40. TT. Dále od 18. TT může být provedena kordocentéza, fetoskopie a biopsie fetální tkáně. U klasické amniocentézy (AMC) je odebíráno 30 ml. Rozdíl u časně amniocentézy je v množství odebraného materiálu, kdy se nabírá tolik ml, kolikátý je TT minimálně však 10 ml do 3 sterilních zkumavek bez konzervačních látek nebo do sterilní stříkačky. Odebrání více než 30 ml z celkového množství 150-200 ml v 16. TT není doporučováno. Toto malé množství se rychle doplní a neovlivňuje zdraví plodu (Rejtharová, 2018). Spinální jehly mají průměry 0,9 mm nebo 0,77 mm a jsou bez obsahu kultivačního media, dlouhé jsou 9 nebo 12 cm. První odebraný 1 ml je zlikvidován a není určen k vyšetření z důvodu potenciální kontaminace mateřskými buňkami. Odebíraný materiál je plodová voda (PV) a lze ji získat z plodového vaku pouze transabdominálním vpichem. Plodová voda obsahuje odloučené buňky z kůže plodu, gastrointestinálního, pohlavního, močového, dýchacího traktu a amnionu (Nicolini, 1992). Po klasické aminocentéze odebírané v 2. trimestru je při provedení lege artis odběru udáváno obecné riziko potratu 0,5-1 %.

3.1 Kultivace buněk

V odebraném vzorku je třeba namnožit buňky a postupy jsou pro každý materiál rozdílné. Kultivovat můžeme krátkodobě nebo dlouhodobě. Dlouhodobá kultivace trvá obvykle 7-10 dní, ale může trvat i déle. Zato jsou chromozomy lépe hodnotitelné. Klinická pracoviště genetiky používají uzavřený systém práce s plodovou vodou a CVS v laminárním boxu zajišťující nižší riziko kontaminace. Laboratoře také disponují minimálně dvěma termostaty na kultivace pro případ náhlé nefunkčnosti jednoho z nich.

Při první kontrole po nasazení by se měly první buňky začít přichytávat ke dnu KL a zhruba po týdnu jsou vidět první kolonie za předpokladu odběru do 28.TT, ve 3. trimestru to může být až 13 dní. Plodová voda pokročilého stadia těhotenství obsahuje méně aktivně rostoucích buněk. Po úspěšné finální kultivaci nacházíme v KL 3 typy buněk – fibroblastoidní, plodové vody a fibroepiteloidní (Hájek et al., 2000, s. 180).

Klky nebo placenta získaná z CVS může být zpracována i přímo, krátkodobou kultivací trvající 2 dny. Zásadním krokem je u této metody získání dostatečného množství materiálu z důvodu zhoršené kvality stavby chromozomů. Jsou tedy obtížněji hodnotitelné a pochází z buněk syncytio- a cytotrofoblastu. Důvodem pro volbu této metody je rychlost.

3.2 Úloha reagensů v přípravě a zpracování preparátu

Trypsin pomáhá oddělení buněk ode dna KL u adherentních buněčných kultur plodové vody.

Kolcemid způsobí zastavení buněčného dělení ve fázi mitózy rozrušením mitotického vřeténka. Váže se totiž na protein tubulin, čímž zabraňuje jak tvorbě nových mikrotubulů, tak ničí již vzniklé. Nedojde tedy k anafázi a oddělení sesterských chromatid. Délka působení kolcemidu je odlišná u každého typu materiálu. Při kratší expozici vznikají delší chromozomy, ale není dosaženo velkého množství metafázních chromozomů. Naopak při delším působení je mnoho chromozomů v metafázi, ale nejsou tak kvalitní pro odečet, jelikož jsou kratší.

KCl způsobuje hemolýzu, při které nabobtnají T-lymfocyty, jelikož dojde k přestupu vody do cytoplazmy buňky s vyšším obsahem solí, díky osmóze. To způsobí uvolnění chromozomů od mitotického vřeténka a dochází k jejich rozestoupení v lymfocytech.

Fixační roztok je připravován ze 3 dílů methanolu a 1 dílu kyseliny octové a musí být vždy čerstvý, snadno totiž váže vodu z atmosféry, což ovlivňuje výslednou kvalitu chromozomů i barvení. Jeho úkolem je zastavit účinek hypotonického roztoku.

4 MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ METODY

Molekulární cytogenetiky je využíváno zejména k detekci submikroskopických abnormalit. Její metody dokážou odhalit početní chromozomové aberace v metafázních chromozomech nebo interfázních jádrech, umožňují rozpoznat a upřesnit strukturní chromozomové aberace jako jsou delece, duplikace, inzerce a další, včetně těch jemných. Navíc je z nich umožněno zjistit vznik a původ marker chromozomů. Identifikace úseků genů probíhá pomocí značených sond nebo čipů o odpovídající délce hledaných genů v testovaném vzorku. Molekulární diagnostika je také oproti klasické cytogenetice, více automatizována, což přináší určité výhody například rychlost, citlivost a vyšší reprodukovatelnost výsledků měření. Další výhodou spočívá v tom, že materiál není nutné dlouhodobě kultivovat. Nevýhodou je pak vyšší finanční nákladnost, zejména při využívání komerčně vyráběných sad.

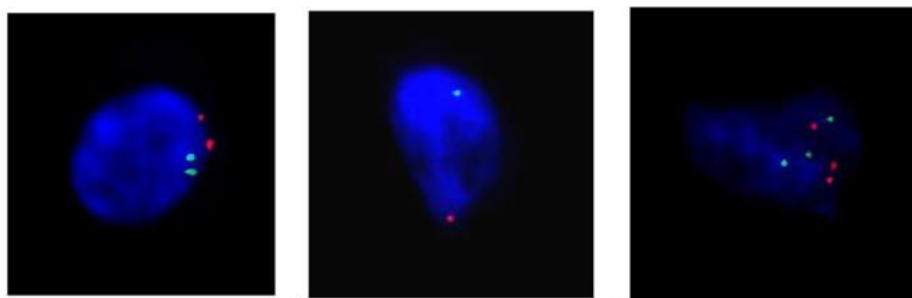
4.1 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

FISH je jednou z metod hybridizací in situ, tedy na podložních sklíčkách s preparátem (chromozomy). Princip spočívá v komplementárním vázání úseků DNA, z čehož je jeden značený – sonda. První sondy vytvořené PARDUEOVOU a GALLEM (1969) byly radioaktivní a jako značku využívaly tritium. V případě nejnovější metody FISH jsou na hybridizované sondy značené neradioaktivně, haptenem (biotinem nebo digoxigeninem) navázány protilátky proti haptenu a na ně jsou zase navázány vybrané fluorochromy, kterými mohou být Fluorescein-5-isothiokyanát (FITC)- v preparátu zelený, rhodamin- červený, kumarin- modrý, texaská červeně- červený nebo cyaniny-červený Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5. Průkaz DNA sondy pak probíhá pozorováním světelných signálů ve fluorescenčním mikroskopu (Hájek et al., 2000, s. 197). Zároveň z této metody nelze zhodnotit celý genom a slouží jako metoda doplňková, při podezření na specifické chromozomové abnormality. Preparát může být pro prenatalní cytogenetiku připravený z plodové vody, choriových klků, fetální krve nebo periferní krve matky.

K denuraci sondy je využíváno zahřátí na vysoké teploty o přibližně 100 °C, při níž zanikají vodíkové vazby, vlákna se od sebe začnou oddělovat a exponovat svá vazebná místa. Každá sonda má však jiné postupy pro denaturaci a tato teplota by u některých typů mohla být příliš vysoká. Denaturace je možno dosáhnout také změnou pH, kdy dochází k ovlivnění náboje na dusíkatých bázích. Při mírnějších teplotách, nebo po přidání labilizujících chemických činidel jako je například formamid nebo močovina může vzniknout jen částečná denaturace. Chemická činidla navíc lépe uchovávají DNA v denaturovaném stavu, jelikož působí na postranní řetězce aminokyselin a peptidové vazby proteinů. Také ionty dokáží ovlivnit stabilitu vodíkových vazeb, snížení nebo zvýšení obsahu určitých solí způsobí ztrátu iontů a destabilizaci proteinu (Michalová, 1999, s. 57-58; Fersht, 2001)

Aby došlo k opětovnému spojení do dvojšroubovice DNA se sondou musí být splněny tyto podmínky: dojde k setkání komplementárních vláken, ve správné teplotě, vlhkosti a molaritě.

U FISH jsou hodnoceny fluorescenční signály použitých sond. Zda se v preparátu vyskytují nebo ne, jejich počet a umístění na chromozomu.



Obrázek 2: Mikroskopický obraz FISH

Zdroj: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1028455923002516?via%3Dihub>

Takto vypadá interfázní FISH. Červené a zelené signály jsou lokus specifické sondy pro oblasti chromozomu X. Pro obarvení chromozomů v celé jejich délce je používán DAPI, barvicí modře. Na obrázku v po levé straně jsou vidět 4 barevné signály, jde tedy o dizomii X. Na obrázku ve prostředku je monozomie X se 2 signály. Trizomii X můžeme vidět na obrázku po pravé straně.

Sondy se dělí podle lokalizace vazby na chromozomu na celochromozomové, lokus specifické, centromerické, subtelomerické. V prenatalní cytogenetické diagnostice jsou často využívány sondy centromerické, které hybridizují na alfa – satelitní DNA (Michalová, 1999, s. 54-55). Jelikož jsou jimi vyhledávány početní aberace, tedy nejčastější prenatalní aberace. Aneuploidie totiž mohou být detekovány jak na metafázních, tak i interfázních buňkách. Nejvíce používanými sondami jsou ale sondy s unikátní sekvencí DNA, tedy lokus specifické (Wolff, 2013).

4.2 Array-komparativní genomová hybridizace (A-CGH)

Principem a-CGH je porovnání vyšetřovaného genomu s normálním referenčním genomem (imobilizovanou sondou na čipu) pomocí odlišného značení DNA fluorofory. Analýza probíhá z hybridizovaných array klonů DNA se známou polohou na chromozomu podle fluorescence jednotlivých spotů. Každé fluorescenční barvivo emituje záření o různých vlnových délkách, kterou následně rozeznají detektory. Pokud je tedy některý materiál v nadbytku, nebo naopak chybí, vykazuje spot fluorescenci podle převažující DNA. Například pokud dojde k delecii, převažující barevný signál má referenční DNA, jelikož ve vzorku druhý fluorofor chybí. Referenční DNA je většinou značena některým z červených chromoforů. Tato metoda se využívá zejména k diagnostice mikrodelecí a mikroduplikací u monogenních onemocnění (Passarge E., 2019, s. 216).

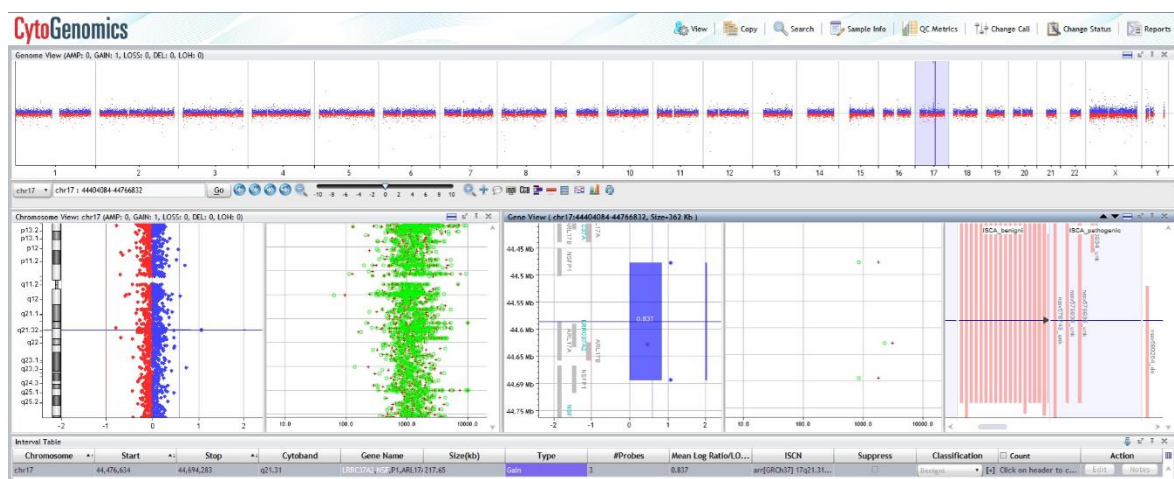
Oproti konvenčnímu karyotypování, stejně jako FISH umožňuje určit změny submikroskopické a nepotřebuje dělit se buňky. Na rozdíl od FISH, ale umí zhodnotit celý genom. Rozlišení je pak dáno počtem a umístěním sond na mikročipu. Výrobce čipu tedy určuje oblasti, které mohou být hybridizovány a následně hodnoceny. Pokud některá oblast neobsahuje sondy, nebude daný spot vykazovat žádnou fluorescenci (Beránek, 2016). Jako každá metoda má i a-CGH své limitace. Nelze z ní detekovat balancované inverze nebo translokace a také určité formy triploidie. Obecně je také dražší oproti klasickému karyotypování i FISH. V klinické praxi jsou používány také cílené arraye detekující chromozomální abnormality spojené s určitými známými genetickými syndromy. Zásadním omezením je ale detekce variací počtu kopií (CNV) nejistého klinického významu a interpretace těchto výsledků, zejména u plodů, kdy není možné přesně určit fenotypové projevy a jediným vodítkem jsou UZ nálezy (Heinrich et al., 2009). Tedy v případě, že je objeveny varianty nejistého významu (VUS), musí být vyšetřeni také biologičtí rodiče. Je ověřována přítomnost CNV v jejich DNA, pokud je u jednoho z nich nalezena také, jde většinou pouze o benigní varianty. De novo vzniklá CNV

má větší potenciál u jedince způsobovat patologie. Avšak problém CNV s nejasným klinickým významem je čím dál méně častý, díky CNV knihovnám obsahujícím informace o zdravých a postižených jedincích. Tato skutečnost umožňuje širší použití celogenomové arraye, která detekuje mnohem větší množství CNV, a zajišťuje snadnější interpretaci výsledků této analýzy (ACOG Committee Opinion No. 446, 2009)

Materiálem může být plodová voda, choriové klky i periferní krev a stejně jako u FISH jde o metodu rychle stanovitelnou, kdy nejdéle z celého procesu trvá hybridizace. K té je obvykle potřeba 24-48 hodin působení. Vzorky se totiž dají zpracovat přímou extrakcí DNA z materiálu a nepotřebují kultivaci (Shaffer, 2013).

Array-CGH využívá pro prenatální diagnostiku umělé bakteriální chromozomy (BAC) čipy/sondy, obsahující bakterií vytvořený specifický úsek DNA, který je následně v testovaném vzorku hledán. BAC mají rozlišení v řádu desítek až stovek kilobází. Další a používanější možností jsou speciálně upravené oligosacharidové čipy pro prenatální použití s ještě větším rozlišením až pod 1 kilobázi (Randolph, 2013; Wicker et al., 2007). Veliké jsou totiž pouze 20-60 párů bází (bp) a čipy obsahují řádově statisíce až miliony sond oproti tisícům sond u BAC. Dalším důvodem většího používání oligonukleotidových čipů jsou menší rozdíly mezi jednotlivými kusy, či šaržemi a také lepší reprodukovatelnost. Navrženy jsou také polymorfní sondy tzv. SNP, které se kromě diagnostiky CNV využívají také pro detekci jednonukleotidových polymorfismů a jsou nejcitlivějším typem čipu s nejmenší délkou přibližně 15-30 bp. Nevýhodou SNP čipů je nízká detekce v repetitivních oblastech, jelikož neobsahují velké množství SNP. Kombinují se tedy sondy jak polymorfní, tak i nepolymorfní oligonukleotidové sondy k pokrytí všech oblastí genomu (Friedman, 2009).

Obrázek 3: Normální mužský array profil



Zdroj: archiv Genetika Plzeň

Hlavním nárokem na vzorky je podobná kvalita referenční a vyšetřované DNA. Jejich rozdíly v kvalitě se projevují odlišným značením specifických oblastí, které následně při hodnocení způsobují šum a falešnou pozitivitu v oblastech subtelomerických a bohatých na GC. Rozdíly v kvalitě se týkají zejména vzorků archivních, například fixovaných ve formalinu a zpracovaných do parafínových bločků (Kim, Pollack, 2009). Ideální vzorek by neměl obsahovat bílkoviny. Žádoucí je relativně neporušená DNA s vysokou molekulovou hmotností ověřenou elektroforézou (Heinrich et al., 2009, s. 258).

4.3 Kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (QF-PCR)

QF-PCR je v prenatalní diagnostice využívána k rychlé detekci nejčastějších aneuploidií autozomálních i pohlavních chromozomů. Principem metody je amplifikace repetitivních sekvencí ve vybraných polymorfních lokusech za přítomnosti fluorescenčních primerů (markerů) umožňujících vznik fluorescenčně značených produktů, následně separovaných pomocí gelové elektroforézy, vizualizovaných automatickými DNA skenery a hodnocených počítačově, po ukončení reakce. Při hodnocení se tyto krátké tandemové repetice (STR) jeví jako píky na elektroforeogramu. Běžně se tedy vyskytují 2 píky se stejným poměrem velikostí (intenzitou fluorescence) pro 1 měřenou STR sekvenci z daného chromozomu. Abnormální nálezy se projevují chybějícími nebo nadbytečnými píky, či odlišnými poměry intenzit píků (Nicolini et al., 2004; Mann, Ogilvie, 2012). Například při analýze trizomie, ta může být trialelická- 3 píky, dialelická – jeden pík je vyšší v poměru 2:1, nebo monoalelická, kdy má jeden pík trojnásobnou výšku. Poslední zmíněný musí být ověřen odlišným typem STR pro potvrzení trizomie (Hájek et al., 2000, s. 202-203).

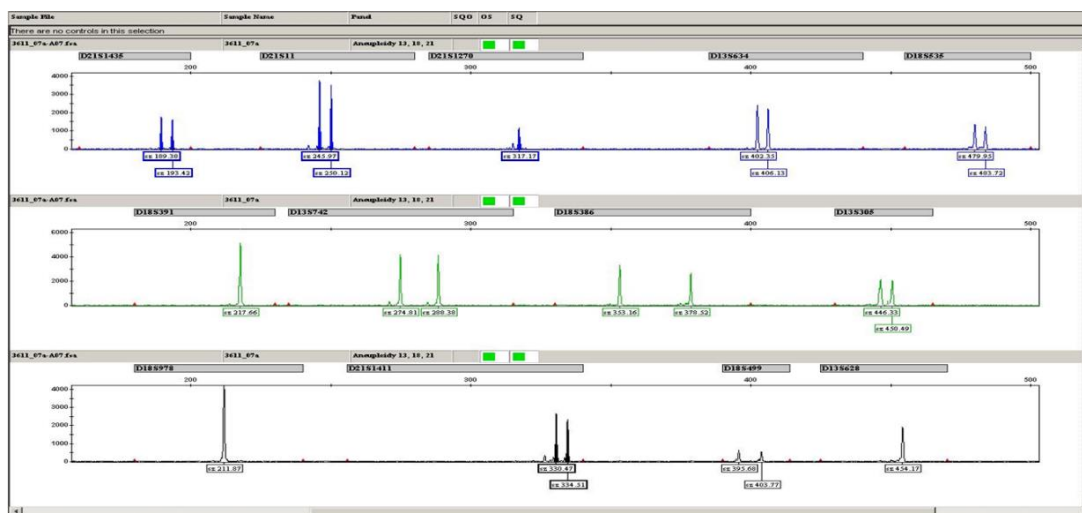
Vhodnými materiály s obsahem DNA k analýze pomocí QF-PCR jsou: plodová voda kultivovaná i nekultivovaná, choriové klky kultivované i nekultivované a fetální krev. Rodičovská DNA může být získána buď ze stěru bukalní sliznice, nebo ze vzorku periferní krve. Prenatální materiál získaný před 12. TT dává informaci pouze o vyšetřovaných chromozomech 21, 18, 13 a o zjištěném pohlaví je poskytnuta pouze v případě, že je relevantní k diagnóze.

Stejně jako u FISH, jde o metodu rychle stanovitelnou, obvykle během 24-48 hodin. Oproti FISH má ale řadu výhod, kterými jsou: menší finanční náklady, pracnost i časová náročnost, dále je tato metoda výkonnější díky automatizaci. Tyto výhody tak umožňují lepší dostupnost pro všechny rodičky podstupující invazivní prenatalní odběr. Pro klinické použití byly vytvořeny komerční multiplexy zahrnující testování více lokusů v jedné analýze z jednoho vzorku nebo separátní sady pro jednotlivé chromozomy (Nicolini et al., 2004).

QF-PCR může být vyšetřována samostatně nebo slouží jako doplňující metoda před výsledkem z klasického karyotypování. Avšak při provedení obou metod v některých případech nastává rozdíl ve výsledcích mezi těmito metodami. Například jedna metoda detekuje trizomii a druhá mozaiku. Tyto rozdíly jsou nejspíše způsobeny odlišným vyšetřovaným materiálem, kdy u jedné metody byly buňky kultivovány a u druhé nikoliv. Větším problémem při interpretaci je ale existence úplných neshod ve výsledcích vyskytující se nejčastěji u vzorků pocházejících z choriových klků odebíraných ve více vpiších a v různých oblastech placenty, jelikož u nich může být přítomný částečný placentární mozaicismus následně způsobující nepřesnosti. Pomocí QF-PCR ale lze odhalit 20% a vyšší mozaicismus, stejně jako alespoň 10% kontaminaci mateřskými buňkami (Mann, Ogilvie, 2012). Donaghue et al., 2005 uvádí míru detekce mozaicismu dokonce u 15% zastoupené buněčné populace pocházející z meioticky abnormální buněčné linie. Choriové klky totiž obsahují jak buňky cytotrofoblastu, tak i buňky mezenchymové. Pro QF-PCR by izolovaná DNA měla obsahovat buněčné linie z obou vrstev získaných z 5-15 mg vyčištěných choriových klků. Kultivované mezenchymové buňky lépe odrážejí karyotyp plodu při klasickém karyotypování. Buňky cytotrofoblastu jsou novější vrstvou. Větší obezřetnost by tedy měla být při interpretaci trizomií z CVS, kdy není prokázán meiotický původ trizomické buněčné linie. Pro přesnější interpretaci pravděpodobnosti mozaicismu je na místě vyžádání dalších materiálů, plodové vody nebo fetální krve, k ověření přítomnosti nebo nepřítomnosti dalších buněčných linií u plodu (Mann et al., 2008; Donaghue et al., 2005). Mozaicismus nižší než 15% a balancované přestavby metoda nedetekuje (Mann et al., 2018).

Výrazná kontaminace mateřskými buňkami v plodové vodě ovlivňuje hodnocení a v malém procentu případů znemožňuje vydání spolehlivého výsledku. V těchto případech je vzorek označen jako nehodnotitelný a je doporučeno PV kultivovat, a z ní hodnotit karyotyp (Mann, Ogilvie, 2012).

Obrázek 4: Normální výsledek QF PCR



Zdroj: Archiv Genetika Plzeň

5 NEINVAZIVNÍ PRENATÁLNÍ TESTOVÁNÍ – BEZBUNĚČNÁ DNA (CFDNA)

V současnosti nejvíce studovanou genetickou metodou je stanovení bezbuněčné fetální DNA z periferní krve matky. Matčina krev totiž obsahuje fetální buňky, a to lymfocyty, granulocyty, trombocyty, buňky trofoblastu a jaderné erytroblasty (Hájek et al., 2000, s. 247). Z nich se poté zjišťuje riziko aneuploidii. Obsah fetálních buněk v mateřské krvi tzv. fetální frakce je ovlivněna týdnem těhotenství a váhou matky. Nižší hladiny bývají nalézány u dvojčat a těhotenství započatých in vitro fertilizací, taktéž u aneuploidii 18 a 13. Rozeznávají jsou díky odlišnému obsahu a velikosti fragmentů. Mateřská cfDNA má vrchol ~166 bp, oproti fetální ~142 bp, je nemožné jí kompletně vyseparovat ze vzorku a vždy způsobuje pozadí. Detekuje zejména trizomie 21, 18 a 13, ale také subchromozomální změny například mikrolece, mikroduplikace. Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1.3. v ČR mají možnost vyšetření podstoupit ženy se středně vysokým rizikem na vlastní náklady, které se pohybují v rozmezí zhruba 10 000-20 000 Kč (White et al., Di Renzo, 2023).

Ke stanovení cfDNA jsou uplatňovány různé typy metod, některé patří mezi celogenomové, jiné zase cíleně zkoumají vybrané SNP. V klinické praxi jsou nyní používány spíše cílené, a to nejen SNP analýza, ale také digitální analýza vybraných regionů (DANSR) nebo amplifikace otáčivou kružnicí (RCA). Dílčí postupy jsou u obou typů i jednotlivých metod různé, vyjma sekvenování. V základním rámci jsou ale obecné kroky v procesu stejné, a to: extrakce cfDNA, příprava knihovny, sekvenování a analýza.

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

6.1 Hlavní cíl

Hodnocení přínosu jednotlivých metod pro prenatální diagnostiku.

6.2 Dílčí cíle

1. Studium a popis jednotlivých genetických metod používaných v invazivní prenatální diagnostice a jejich pracovních protokolů.
2. Porovnání výhod a nevýhod jednotlivých prenatálně diagnostických metod.
3. Porovnání zachytu VCA jednotlivými metodami.

7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

Výzkumná otázka č. 1: Která vrozená chromozomová aberace se objevuje nejčastěji?

Výzkumná otázka č. 2: Kolik nálezů je zjištěno díky array-CGH ve srovnání se stanovením klasického karyotypu?

Výzkumná otázka č. 3: Jaké konkrétní nálezy onemocnění lze zachytit, pokud udělám stanovení pomocí array-CGH?

Výzkumná otázka č. 4: Jaké konkrétní nálezy onemocnění lze zachytit, pokud udělám stanovení pomocí klasického karyotypu?

Výzkumná otázka č. 5: Kolik případů de novo balancovaných aberací není odhaleno při použití metody array-CGH?

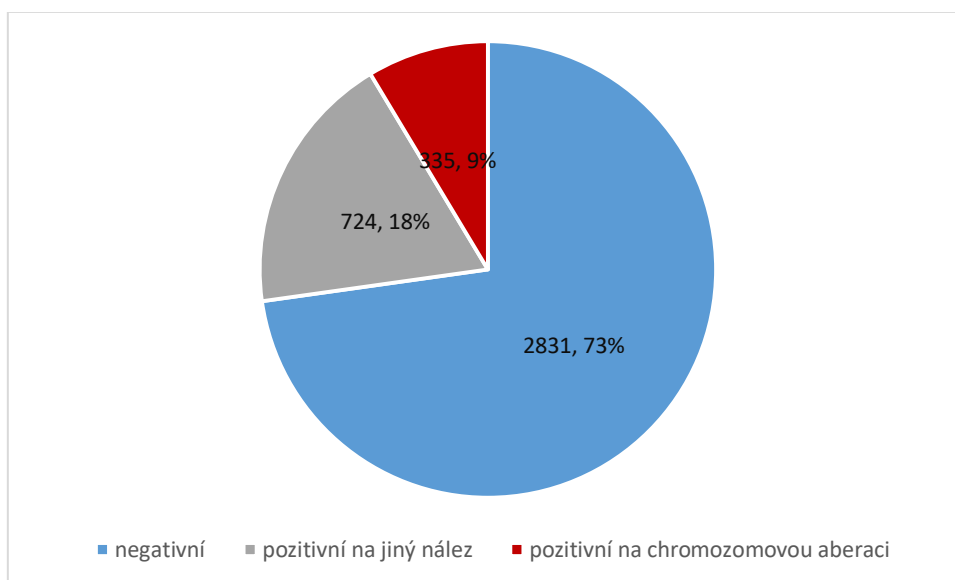
8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Sledovala jsem výskyt chromozomových aberací u plodů těhotných žen, indikovaných ke genetickému prenatalnímu vyšetření, odebraných AMC nebo CVS a zpracovaných jednou z metod– array-CGH nebo klasický karyotyp. Tato data byla získána na pracovištích Genetika Plzeň a Genetika West v letech 2019-2023 převážně u pacientek z Plzeňského a Karlovarského kraje.

Při zjišťování balancovaných aberací byla použita data z let 2014-2018.

Z celkového počtu 3890 odběrů mělo 1059 pozitivní nález z toho 335 (9 %) vzorků bylo pozitivní na některou chromozomovou aberaci.

Graf 1: Počet chromozomových aberací z AMC a CVS



Zdroj: vlastní

9 METODIKA PRÁCE

9.1 Popis pracovních postupů

Postupy vychází z pracovních protokolů používaných na pracovišti Genetika Plzeň, které jsou navrženy optimálně podle doporučení výrobců jednotlivých vyšetřovacích sad a s ohledem na zkušenosti při práci.

9.1.1 Dlouhodobá kultivace choriových klků

Z označeného vzorku choriové tkáně (CHT) jsou vytvořeny 2 primokultury (PK) označené I, II při dostatku materiálu. Ke štítkům s informacemi o pacientce⁷ je do záznamového archu připsán datum nasazení CHT bez roku, laboratorní číslo a označení dané kultury. V každém kroku při manipulaci s reagensy a materiálem jsou hrdla a uzávěry předem opáleny nad kahanem pro zajištění sterility.

Aspirované klky ze zkumavky jsou ve sterilním boxu přeneseny do sterilní Petriho misky propláchnutím zkumavky s přehřátým médiem a následně jsou klky očištěny od krevních koagul, odděleny od mateřské tkáně a možné příměsi deciduy pomocí sterilních jehel. Dále jsou klky přeneseny do další Petriho misky a mechanicky pomocí sterilních injekčních jehel a skalpelu je CHT rozmělněna na nejmenší fragmenty. Část fragmentů je rozdělena i pro molekulárně genetické metody. Zbytek je přenesen jednorázovou plastovou Pasteurovo pipetou do kultivačních lahvíček (KL) a následně je přidáno minimální množství kultivačního média⁸ přehřátého v termostatu na 37 °C takovým způsobem, aby byly fragmenty ponořeny, zároveň neplavaly a byly přichyceny ke dnu KL. Každá PK má své oddělené kultivační médium. Poté jsou KL uzavřeny do ventilační polohy, tedy ani úplně utěsněné ale ani úplně otevřené. Na závěr jsou KL označeny štítkem a uloženy ve vodorovné poloze na 5-6 dnů do termostatu nastaveném na 37 °C s 5% CO₂ atmosférou.

Po uplynutí potřebné doby v termostatu je nutné vyměnit kultivační médium (KM). Další výměny jsou prováděny každé 2 dny. Celkový počet výměn média je individuální pro každou kulturu a odvíjí se od růstu kolonií, obvykle jsou potřeba 3-4 výměny.

⁷ Jméno, příjmení, rodné číslo

⁸ Kultivační médium je bohaté na živiny, vitamíny, aminokyseliny (například L-Glutamin), obsahují pufr, někdy antibiotika (například Gentamycin) a růstové faktory umožňující buněčnou proliferaci. Nejdůležitější složkou je sérum. V praxi je běžně používané fetální hovězí. Média se složením liší, v každé fázi růstu mají buňky jiné potřeby.

Provedená výměna musí být vždy zdokumentována v Laboratorní knize Karyotyp v ENVIS LIMS⁹. Médium je poté opět vráceno do termostatu za stejných podmínek.

Výměna média opět probíhá ve sterilním boxu a začíná promícháním obsahu KL. Během prvních 3 výměn placentární tkáň neprobíhá slévání do odpadní kádinky s desinfekcí, pouze je přidán 1 ml čerstvého KM. V dalších výměnách média z kultivačních lahvíček buněk choria je médium odsáto Pasteurovo pipetou. V další kroku jsou dávkovačem přidány 3 ml čerstvého přehřátého KM se záznamem čísla šarže v Laboratorní knize. KL je uzavřena do ventilační polohy a po několika hodinách od výměny média je zkontrolován růst buněk pod inverzním mikroskopem nastaveným na 10× zvětšení okuláru a 4× zvětšení objektivu. Stav je poté zapsán do Laboratorní knihy a probíhá výběr kultur dostatečně narostlých a vhodných k přípravě preparátu.

9.1.2 Pasážování kultury

V některých případech může docházet k situaci, kdy se tvoří jen malý počet velkých kolonií nebo je vyžadováno více materiálu například pro dovyšetření molekulárně genetickými metodami. Řešením těchto situací je provedení pasáže kultury.

Před pasážováním je vyměněno médium. Ze dna KL jsou Pasteurovo pipetou seškrábnuty a nasáty buňky jedné nebo více kolonií včetně KM. Ty jsou dále přeneseny do nové KL a do původní KL je znovu doplněno čerstvé KM v celém objemu 3 ml. Obě jsou umístěny do termostatu. Chceme-li získat mnoho malých kolonií, Pasteurovo pipetou seškrábneme ze dna KL buňky jedné velké kolonie a opět je necháme přichytit ke dnu v té samé KL, kterou vrátíme do termostatu.

9.1.3 Dlouhodobá kultivace plodové vody

Dalším dlouhodobě kultivovaným materiálem je plodová voda. Postup kultivace je podobný jako u choriové tkáň. V prvním kroku jsou z primárního vzorku, označeného v elektronické Laboratorní knize Karyotyp, vytvořeny 3 PK. U časného stadia těhotenství může být sediment malý, jsou tedy nasazeny pouze 2 kultury a třetí je dodělána pomocí pasážování lépe rostoucí PK z dvojice. Stejným způsobem jako u CHT. Do archu jsou také zaznamenány stejné identifikační a laboratorní údaje. Plodovou vodu je třeba zcentrifugovat na 1000 otáček/ 15 minut. U PV odebrané do sterilních zkumavek můžeme stáčet ihned, při odběru do sterilních stříkaček je třeba PV nejprve rozdělit do 3 sterilních

⁹ Laboratorní informační systém

centrifugačních zkumavek s řádným označením a až poté stáčet. Ke kultivaci jsou potřebné 2 zkumavky a třetí je použita pro metodu QF PCR. Po stočení je oddělen supernatant Pasteurovo pipetou a zlikvidován do kádinky na odpad. Potřebná buněčná suspenze je převedena Pasteurovo pipetou do KL. Z jedné zkumavky vznikne jedna KL a z druhé je suspenze rozdělena do dvou KL stejným dílem. Do všech je přidáno predehřáté 37 °C KM v objemu 3 ml, u 16. a nižšího gestačního týdne pouze 2 ml. Všechny kultivační lahvičky jsou do termostatu vkládány ve vodorovné a ventilační poloze s označením. KM I je pro PK I, KM II je pro PK II a u PK III jsou média I a II po týdnu střídána.

Výměny média probíhají s jediným rozdílem oproti CHT a to tak, že je obsah KL homogenizován a médium je rovnou sléváno do odpadní kádinky s desinfekcí. Nehledí se na počet výměn média.

9.1.4 Příprava a zpracování preparátu

Postup zpracování CHT i PV je stejný, jelikož jsou to dlouhodobé kultury. Běžně jsou zpracovány 2 PK. Třetí je skladována v lednici, pro případná další vyšetření. Po ukončení 24. TT se PK likviduje. Do vybrané KL jsou přidány 3 kapky kolcemidu, které jsou přeneseny jehlou 18G×1¹/₂, následně je PK inkubována v termostatu při 37 °C s 5% CO₂ atmosférou přes noc. Druhý den je zkumavka označena štítkem a přiřazeným laboratorním číslem PV a následně je do ní obsah KL přelit. KL je ještě propláchnuta roztokem trypsinu a opět přelita do zkumavky. 2 ml trypsinu je do KL znovu přidáno a ponecháno působit v termostatu při 37 °C po dobu 15 minut. Mezi inkubací trypsinu v KL je zkumavka stočena při 1000 ot. /15 min a poté je odsát supernatant. Dále se pokračuje seškrábnutím dna KL škrabkou zvlášť určenou pro každou KL a získaný obsah je přidán k sedimentu do zkumavky. Po každém přelití je obsah homogenizován pomocí pipety a zkumavka je ponechána 25 minut v termostatu při 37°C. Po uběhnutí této doby je přidáno 3-5 kapek vychlazené fixace a plastovou pipetou je obsah zkumavky promíchán. Následuje centrifugace při 1000 ot. / 10 min. Vzorek je zbaven supernatantu a resuspendován na třepačce. V dalších krocích je vzorek fixován vychlazeným fixačním roztokem, nejprve po kapkách a dále přibližně do ¾ zkumavky. Průběžně se nechává odstát na 10 minut za pokojové teploty a je opět centrifugován při stejných otáčkách a supernatant je sléván. U konečného sedimentu je vzorek resuspendován v malém množství fixáže, jelikož by měla vzniknout mírná opalescence.

Zpracování periferní/fetální krve začíná přidáním 4 kapek kolcemidu 1-2 hodiny ukončením kultivace jehlou 18G $\times 1 \frac{1}{2}$ a protřepáním. Dalším krokem je inkubace v termostatu obvykle 1 hodinu, výjimečně 2 při 37 °C. Poté je třeba vzorek zcentrifugovat při 1000 otáčkách/15 minut. Obsah kontejneru je tedy přelit do centrifugační zkumavky a stočen. Stáčením vznikne sediment obsahující krvinky a supernatant obsahující kolchicin s kultivačním médiem. K vyšetření potřebujeme pouze sediment a supernatant je tedy odstraněn pomocí Pasteurovy pipety. Sediment je resuspendován na vortexové třepačce a za stálého třepání je pomalu přidáván předeřhátý hypotonický roztok 0,075M chloridu draselného až do poloviny zkumavky. Ten se nechá ve směsi působit 35 minut v termostatu při 37 °C. Hypotonický roztok nesmí být ve vzorku ponechán dlouho, jelikož by mohlo dojít k prasknutí buněk. Krátká expozice by zase dostatečně nenabobtnala lymfocyty a nemusely by se oddělit od mitotického vřeténka a správně rozestoupit. Po inkubaci je napipetováno 3-5 kapek vychlazeného fixačního roztoku a vzorek je řádně v celém objemu promíchán. Fixace probíhá několikrát¹⁰ a v dalších krocích je materiál stáčen při stejných otáčkách pouze 10 minut. Fixačního roztoku se postupně přidává více a konečný sediment je resuspendován v malém objemu fixáže. Cílem je mírně opalescentní buněčná suspenze připravená na kapání na podložní sklíčka (Keagle, Gersen, 2013).

Kapání sklíček se až na málo detailů provádí u PV, CHT i krve stejně. U krve se na sklo kape méně kapek, obvykle 2-3 a u dlouhotrvajících kultur to je 3-6 kapek a vytváříme 2-3 preparáty z každého vzorku a PK. Skla vždy musí být předem vychlazená a fixací opláchnutá. Po nakapání suspenze se skla nechávají vysušit buďto v digestoři při pokojové teplotě nebo na plotýnce při 50-70 °C, další variantou je přidání navlhčené buni na plotýnku. Skla jsou popsána laboratorním číslem, číslem preparátu a v případě dlouhodobé kultury i označena z které PK pochází. Volba postupu se odvíjí od rozložení mitóz při hodnocení prvního toho dne kapaného skla pod fázovým kontrastem.

¹⁰ Přibližně 4×

9.1.5 Barvení chromozomů

Aby bylo možné pod mikroskopem sledovat a rozeznat chromozomy z preparátu, musí být obarveny. Mezi základní metody barvení patří G, Q, C, R, T pruhování. Všechny techniky pruhování, kromě Q, obsahují Giemsovo barvivo (Michalová, 1999). Také se používá samotné, při hodnocení strukturních odchylek chromozomů. Každá metoda pruhování barví specifické oblasti chromozomu, má jiný postup a používaná činidla. Chromozom může být nabarven celý, při G- nebo R-pruhování nebo jen některá jeho část například C-pruhování barvicí centromerickou oblast. Kvalita barvení, tedy počet proužků, se odvíjí od kondenzace chromozomů, použité barvicí metody a záleží také na fázi mitózy, ve které byly zastaveny. Přibližně 350-500 pruhů budou mít chromozomy v pozdní metafázi a ve vysokém rozlišení jsou považovány chromozomy okolo 850 pruhů získávané uprostřed profáze (Huang, Chen, 2017). Rozlišovací schopnost je určena počtem pozorovaných pruhů v haploidní sadě.

G-pruhování je nejčastěji používaným barvením v prenatalní cytogenetice. Hlavním činidlem je Giemsovo barvivo, od kterého je odvozen název tohoto barvení. Nejprve je ale třeba enzymatického štěpení proteinů na povrchu chromozomu trypsinem. Na chromozomech se pak vytvoří světlejší a tmavší různě široké příčné pruhy. Je také vhodné pro co nejlepší kvalitu pruhování krátkodobě vystavit preparáty vysoké teplotě, která způsobí urychlení procesu stárnutí. U G-pruhování jsou tmavší pruhy bohaté na adenin a thymin, heterochromatin. Ve světlých oblastech zase převažují cytosin s guaninem a jsou aktivními oblastmi chromozomu, jedná se tedy o euchromatin.

Q-pruhování zvyrazňuje stejně jako G-pruhování úseky s adeninem a thyminem. Jen se používá chinakrin, chinakrindyhydrochlorid nebo roztok akridinové oranže. Jde o šetrnější barvení s lepší schopností zachovávat morfologii chromozomů. Využíváno bylo hlavně dříve při prenatalní diagnóze pohlaví, jelikož chromozom Y svítí jako intenzivní bod (Hájek et al., 2000, s. 195-196). Záporom je potřeba fluorescenčního mikroskopu a související finanční nákladnost vyšetření. Preparáty ztrácejí svou fluorescenci a nelze je tedy prohlížet opakovaně, pouze z digitální fotografie. Chinakrin je navíc toxický a personál musí být při manipulaci a práci s ním obezřetnější. Dnes tuto metodu nahradila fluorescenční in situ hybridizace (FISH).

C-pruhování značí konstitutivní heterochromatin v oblastech centromer chromozomů a v distální části Y chromozomu. Před barvením je aplikován zahřátý roztok hydroxidu barnatého a poté, jsou oddělené fragmenty odmyty inkubací v teplém solném roztoku a zbylý heterochromatin je obarven Giemsovým činidlem nebo 4', 6-diamidin-2-fenylindol (DAPI). Dochází k reakci v kyselém a zásaditém prostředí, které způsobí depurinaci, denaturaci části deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Používá se k detekci pericentrických inverzí chromozomů 1, 9, 16, u dicentrických chromozomů, k spolehlivé identifikaci Y chromozomu v případě nejistoty po vyšetření G-pruhováním a ke studiu polymorfismů.

R-pruhování je reverzní ke G-pruhování. Jsou zvýrazněny oblasti bohaté na cytosin a guanin, zatímco DNA s adeninem a thyminem je denaturována. Barví tedy euchromatin a dobře znázorňuje terminální části chromozomů – telomery. Běžně se provádí buďto tepelnou denaturací pomocí fosfátového pufru – dihydrogenfosforečnanu sodného (NaH_2PO_4) nebo v solném roztoku citátu sodného (SSC) při 87 °C nebo akridinovou oranží. Další možností, jak pruhy vytvořit je přidání 3, 5-bromodeoxyuridinu do kultivačního media na posledních 6-8 hodin kultivace. Poslední zmíněná možnost se používá pouze ke studiu pozdně replikujícího chromozomu X, jelikož dochází k mírnému posunu pruhů.

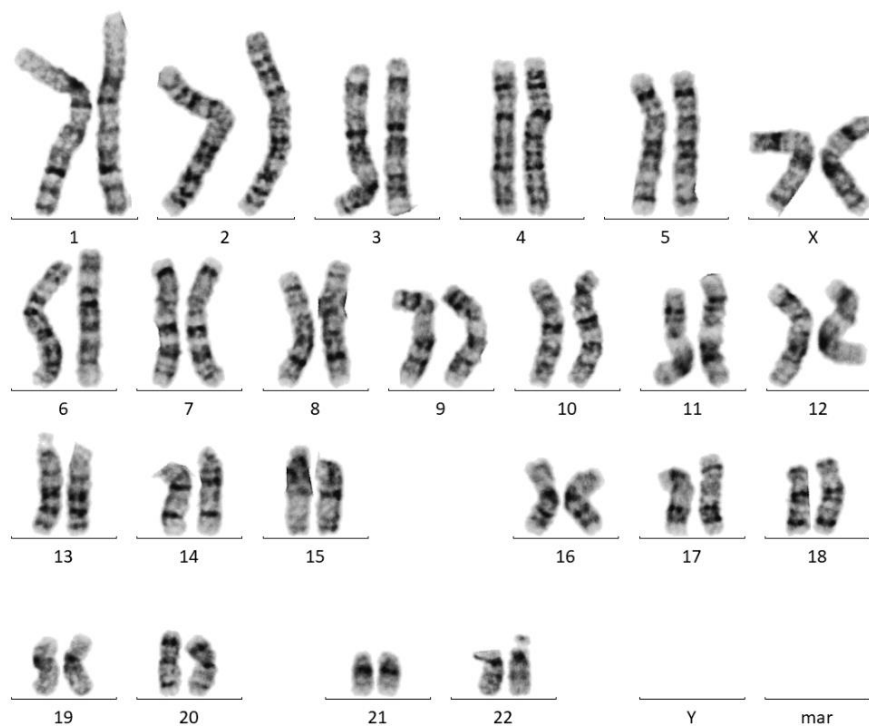
Po obarvení je preparát vysušen na plotýnce a přikryt krycím sklíčkem.

9.1.6 Sestavení a hodnocení karyotypu

Základem každé analýzy chromozomů je správně nastavený a vhodně zvolený mikroskop. U každého vzorku je třeba najít mitózu vhodnou k odečítání, spočítat celkový počet a pruhování chromozomů, určit pohlaví jedince. Mitóza se hledá ve 100-200× zvětšení, pro hodnocení je zvoleno 1000x zvětšení a je třeba vyhodnotit minimálně 15 pruhovaných mitóz. Z plodové vody a buněk choria by mělo být hodnoceno 20 metafází ze dvou oddělených kultur, minimální potřebné rozlišení je 450 pruhů a sestaveny mají být alespoň 2 karyogramy. V případě přítomnosti více než jedné buněčné linie u mozaiky je nutné z ní jeden karyogram připravit. Karyogram získáme seřazením chromozomů pomocí počítačového zobrazení propojeného s mikroskopem v softwaru umožňujícím úpravu obrazu. Lze v softwaru chromozomy rozstříhat, otáčet s nimi, zvýraznit barvením upravením jasu, kontrastu a předběžně chromozomy klasifikuje. K rozeznání chromozomu se sleduje jeho velikost, pruhování a poloha centromery. Hotový karyogram je uložen do digitální

složky a může se zálohovat do externího úložiště. Také je možno v případě potřeby vytisknout kopii v papírové podobě.

Obrázek 5: Normální ženský karyogram



Zdroj: Archiv Genetika Plzeň

Hodnocení karyogramu provádějí alespoň 2 genetici. Mohou z něj vyčíst celkový počet chromozomů, pohlaví, strukturní přestavby, početní odchylky, zlomy chromozomů a na základě těchto údajů pomáhají stanovit diagnózu. Výsledky vyšetření jsou u dlouhodobě kultivovaných materiálů k dispozici obvykle do 3 týdnů.

9.1.7 Postup FISH

Nejprve je třeba připravit preparát k denaturaci. To se provádí jejich inkubací 2 minuty 2× ve SSC, následně jsou preparáty dehydratovány ve vzestupné alkoholové řadě s obsahu ethanolu- 70%, 85% a 100%. V každém 1 minutu. Pak jsou ponechány schnout na vzduchu. Po odpaření ethanolu přibližně za 15 minut je na suchý preparát aplikována hybridizační směs.

Dále je nutné denaturovat chromozomy na jednovláknovou DNA, před samotnou hybridizací se specifickou jednořetězcovou komplementární sondou, která musí být denaturována také. K denaturaci sondy je využíváno zahřátí na vysoké teploty o přibližně 100 °C.

Aplikace hybridizační směsi se provádí napipetováním přesného objemu automatickou mikropipetou na daná krycí sklíčka. Ta mají různou velikost, a proto se objem mění podle ní. Například sklíčko o velikosti 12×12 mm potřebuje alespoň 2,5 µl směsi. Krycí sklo se na podložní pokládá takovým způsobem, aby nevznikly vzduchové bubliny. Popřípadě jsou bubliny odstraněny vyvinutím mírného tlaku na krycí sklo. V dalším kroku je třeba zalepit okraje krycího skla lepidlem a poté je ponecháno zaschnout. Preparát je dále ponechán na předehřáté plotýnce po dobu a teplotu určenou výrobcem specifické sondy, kde dochází ke kodenaturaci pacientovy DNA a sondy. Teplota hybridizace při použití formamidu je nižší, jen 37-42 °C. Preparát se poté z vlhké komůrky, kde proběhla hybridizace, přesouvá do termostatu. Dnes se k denaturaci a hybridizaci standardně používá přístroj ThermoBrite, který kombinuje plotýnku a vlhkou komůrku, kdy sklo zůstává na místě a mění se teplota podle zvoleného programu.

Před podbarvením je ještě třeba vymýt přebytečnou nenavázanou sondu. Preparát je tedy vyjmut z termostatu a z rubové strany podložního skla jsou diamantovým perem označeny okraje krycího sklíčka, což slouží jako značka k rozpoznání hybridizační plochy. Dále je krycí sklíčko opatrně odstraněno z podložního skla a když jde odstranit těžko, doporučuje se preparát ještě ponořit do odmyvacího roztoku. V dalších krocích je preparát vkládán do kyvet s odmyvacími roztoky s různými poměry SSC a Nonidetu P-40¹¹. Po posledním ponoření se zbytek roztoku na preparátu nechá odkapat přes jeho roh, rubová

¹¹ Jedná se o neiontový detergent používaný pro rozpuštění membránově vázaných proteinů – lyzační činidlo (Carolinabiosystems.cz, 2016).

strana je otřena a sklo se nechá sušit ve svislé poloze a tmě. Takto ošetřený preparát je připraven k podbarvení. Barvit se ale začíná až po vytemperování DAPI na pokojovou teplotu, jelikož je za nižších teplot příliš viskózní pro pipetování. Když má DAPI správnou teplotu, začíná se s vlastním barvením a je nanášeno pomocí automatické pipety na hybridizační plochu. Objem se opět řídí dle velikosti krycího sklíčka, které je v dalším kroku vráceno na preparát. Ani v tomto případě nesmí obsahovat žádné vzduchové bubliny, zároveň při jejich vytlačování musí krycí sklíčko zůstat na stejném místě. Přebytečné barvivo je pak odsáto ubrouskem nebo filtračním papírem přiloženým k okraji krycího skla.

9.1.8 Postup array-CGH

Nejdříve musí být izolována DNA a zkontrolována její čistota. V dalším kroku je třeba restriktivně rozštěpit DNA pro hybridizaci. To zajistí štěpící master mix (MM), který je třeba ještě připravit. MM se skládá z 1 μ l vody bez obsahu nukleáz, kterou lze také naředit DNA vzorků na správnou koncentraci. Dále je přidáno 1,3 μ l 10 \times pufru pro restriktivní enzym, 0,1 μ l sérového hovězího albuminu (BSA), 0,25 μ l restriktivního enzymu Alu I, 0,25 μ l restriktivního enzymu Rsa I. Popsaná množství jsou pro jeden vzorek. Všechny reagenty jsou během používání stále udržovány chladné, pomocí chladicího stojánu. Štěpení probíhá v 0,2 ml mikrozkušnicích, uspořádaných do stripů a popsaných čísly vzorků a symboly pohlaví. Hotový master mix (MM) je jemně promíchán a zcentrifugován na pár minut. Do mikrozkušnic je pak napipetováno 2,9 μ l MM a následně 10,1 μ l vyšetřované DNA a referenčních vzorků. Vzniklá směs je promíchána pipetováním a stočena v centrifuze. Poté jsou vzorky vloženy do termocykléru nastaveného na odpovídající program. V prvním kroku programu dochází k denaturaci dvojšroubovice DNA při 37 °C po dobu 2 hodin. Ve 2. kroku probíhá 20 minut inaktivace enzymů při 65 °C, a nakonec je vzorek ochlazen až na 4 °C a takto zchlazený se udržuje v chladícím stojánu. Při této teplotě nedochází k nechtěným reakcím a vzorek je stabilní.

Na začátku jsou stripy vyjmuty ze cykléru a jsou ponechány se stočit po dobu jedné minuty při 2000 \times g. Dále jsou ke každému naštěpenému vzorku přidány primery obsažené v roztoku Random Primers, kterého je napipetováno 2,5 μ l a řádně také promícháno pipetováním. Vzorek je opět krátce stočen v centrifuze a vložen do termocykléru na 98 °C na 3 minuty, kde dojde k denaturaci DNA teplem, a poté je zchlazen na 4 °C, ve kterých je udržován. U periferní krve probíhá fragmentace pouze teplotou, a proto je vzorek v tomto kroku v cykléru 10 minut. Po uběhnutí potřebné doby jsou stripy neprodleně přemístěny do

zmrazeného stojánku a následně do mrazáku o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 5 minut. Poté jsou vloženy do lednice o teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ponechány po dobu přípravy MM s fluorofory. Takto připravené vzorky jsou připraveny ke značení.

Příprava master mixů pro značení je následovná. Jsou připraveny 2 mikrozkušavky o objemu 1,5 ml a nadepsány podle používaných fluoroforů Cy3 – deoxycytidintrifosfát (dCTP) a Cy5-dCTP. Cy3 (červený) je pro vyšetřované vzorky a Cy5 (zelený) je pro referenční vzorky. Mastermix pro jeden vzorek obsahuje: 5 μl $5\times$ reakčního pufru s 2,5 μl $10\times$ deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTPs), 0,5 μl DNA polymerázy Exo-Klenowu a 1,5 μl příslušné barvy na vzorek. Připravené mastermixy jsou krátce stočeny a stripy vyndány z lednice a také stočeny 1 minutu při $2000\times\text{ g}$. Do každého vzorku je napipetováno 9,5 μl příslušného MM s Cy 3 nebo 5. V tuto chvíli má každý vzorek objem 25 μl , je stočen a společně s ostatními přemístěn do termocykléru na program: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 hodiny, poté $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 minut a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, ve kterých je dále udržován.

Značená DNA je v následujících krocích přečištěna pomocí kolonek s filtrem. Z termocykléru jsou vyjmuty stripy se vzorky a stočeny 1 minutu při $2000\times\text{ g}$. Značená DNA je přidána do 430 μl Tris-ethylendiamintetraoctového (TE) pufru o pH 8. Do nových popsaných mikrozkušavek jsou umístěny kolonky a je napipetován celý obsah značených a naředěných DNA vzorků a referencí. Vzorky jsou centrifugovány 10 minut při $14000\times\text{ g}$ a po stočení je odstraněn eluát, přidán $1\times\text{TE}$ v objemu 480 μl a vzorky jsou znovu stočeny při stejných otáčkách i čase. Dále je opět odstraněn eluát i s mikrozkušavkou, kolonky se následně přetočí dnem vzhůru do nové popsané mikrozkušavky a zcentrifugují se při menších otáčkách i čase na 2 minuty při $1000\times\text{ g}$ (Cheung, Patel, Li, 2016). Takto je získána přečištěná fluorescenčně značená DNA. U všech vzorků je tedy třeba stanovit výtěžek a specifickou aktivitu. Tímto postupem jsou ověřeny koncentrace, inkorporace barviv ve vzorcích a referencích pomocí spektrofotometru. Na základě získaných dat je ze vzorce vypočtena míra značení a specifická aktivita. Zásadní je znalost specifické aktivity, jejíž hodnota nesmí být pod 20 pmol/ μg u Cy3 a 15 pmol/ μg u Cy5.

S přečištěnou značenou DNA následuje příprava hybridizační směsi a samotná hybridizace. Nejprve je ke každému vzorku přiřazena vhodná reference s ohledem na pohlaví a koncentrace po značení. Mikrozkušavky jsou popsány číslem vzorku a hybridizační MM je připraven napipetováním 22,5 μl hybridizačního pufru s 4,5 μl $10\times$ aCGH blokujícího činidla a 2 μl lidské Cot-1 DNA pro každý vzorek. Dále je sloučeno 12

μl od přiřazeného referenčního i testovaného vzorku, dohromady má tedy vzorek 24 μl . Při rozdílných koncentracích daného páru může být upraven poměr přidávaných množství pro lepší kompatibilitu. V tento moment je přidán připravený hybridizační MM v objemu 43.5 μl , vzorek je homogenizován pipetováním, krátce stočen a vložen do termocykléru s vysokou teplotou v první fázi: 95 °C na krátké působení 3 minuty. Následuje fáze ochlazení na 37 °C půl hodiny a s touto teplotou je vzorek zpracován dále. V průběhu zpracování vzorku v termocykléru je připravována hybridizační pec, aby byla její výsledná teplota 67 °C. Po uběhnutí programu termocykléru jsou vzorky krátce stočeny a neprodleně je napipetováno 44 μl vzorku do příslušného políčka na těsnícím sklíčku (gasket slidu) umístěném ve vytemperovaném, otevřeném držáku, takovou technikou, aby vzorek nevzlínal na gumičky, kterými je políčko ohraničeno. Na těsnící sklíčko je přiloženo čipové sklo obsahující oligonukleotidové sondy. Posledním krokem hybridizace je utáhnutí držáku, kontrola hladin polí, správné rozprostření tekutiny po celé hybridizační ploše, aby nebyla vynechána žádná sonda, takového stavu je dosaženo otáčivým pohybem. Držák s čipem je umístěn do vytemperované pece a vyvážen. Hybridizován je po dobu 24 hodin při 67 °C a rotaci 20 rpm.

Na závěr je třeba odmýt zbytky nenavázané hybridizační směsi. K tomu jsou určeny 2 odmývací pufry (WB). Odmývací pufir 1 je nalit do 2 nádob, do 3. nádoby je nalit odmývací pufir 2 a ten ponechán ve vodní lázni temperovat na 37 °C. Z kovového držáku je odebrán horní díl a čip je vložen do nádoby s WB1, kde je pinzetou provedeno jemné oddělení těsnícího sklíčka od zbytku čipu. Čip je pak vyprán opakovanými pohyby pod hladinou pufiru. Dále je přemístěn do druhé nádoby, opět s WB1, a je odmýván magnetickou míchačkou po dobu 5 minut. Nakonec je vložen do posledního pufiru WB2, kde stráví 1 minutu a je používaný roztok je promícháván otáčením zkumavky. Před skenováním je čip uložen v ozónové bariéře a musí být zabráněno jeho vystavení světlu.

9.1.9 Postup QF-PCR

Před samotnou analýzou probíhá příprava vzorku, DNA a PCR. Nejprve musí být připraven vzorek. Z PV je získán stočením, odsátím přebytečné tekutiny a vznikem 1 ml buněčného peletu, který je resuspendován Pasteurovo pipetou a převeden v objemu 100 μ l do Eppendorfky. U choriových klků jsou očištěné klky naštěpeny kolagenázou a poté trypsinem při 37 °C. Kolegenáza se nechá působit 35 minut, trypsin pouze 25 minut. Štěpení je zastaveno přidáním 2 ml media. K analýze je třeba jen 100 μ l vytvořené buněčné suspenze (Mann et al., 2008).

Příprava DNA probíhá centrifugací při 12 000 g na 1 minutu, odsátím a získáním peletu bez obsahu krve. V případě, že obsahuje krev z více jak 40 %, je vzorek promyt 200 μ l deionizované vody, která způsobí lýzu erytrocytů, zvortexován a je odstraněn přebytečný promývací roztok. Dále je pipetou přidáno v rozmezí 100-400 μ l InstaGene matrice (chelex pryskyřice), která vychtá inhibitory PCR vzniklé buněčnou lýzou a směs je následně inkubována na 100 °C po dobu 8 minut. Zvortexována při vysokých otáčkách na 10 s a pelet je zcentrifugován 3 minuty na 12 000 g. Hotová DNA je přemístěna na led a může být skladována při – 20 °C (Mann et al., 2008; BIORAD, 2024).

Příprava PCR spočívá ve vytvoření master mixů o objemu 20 μ l, do kterých bude následně přidána DNA. MM obsahuje vybrané fluorescenčně značené primery, *Thermus aquaticus* DNA polymerázu (Taq), dNTPs a oligonukleotidové neznačené primery. K připravenému MM je tedy přidáno 5 μ l suspenze DNA a 1 kapka minerálního oleje. Tato směs je umístěna do termocykléru nastaveného na denaturaci a aktivaci Taq polymerázy při 95 °C na 15 minut. Dále proběhne 25 cyklů. Prvně dochází k mírnému zchlazení (94 °C/ 30 s), které způsobí rozdělení DNA na jednotlivé řetězce. Následující zchlazení (58 °C/ 90 s) umožňující vazbu primerů a třetí je ohřátí na nižší, než původní teplotu (71 °C/ 90 s) kdy jsou nasyntetizovány nové fluorescenčně značené DNA řetězce. V konečné syntéze je vzorek 20 minut při 72 °C a uskladněn může být při 10 °C. Na rozdíl od a-CGH není čištění přebytečných primerů nutné (Mann et al., 2008).

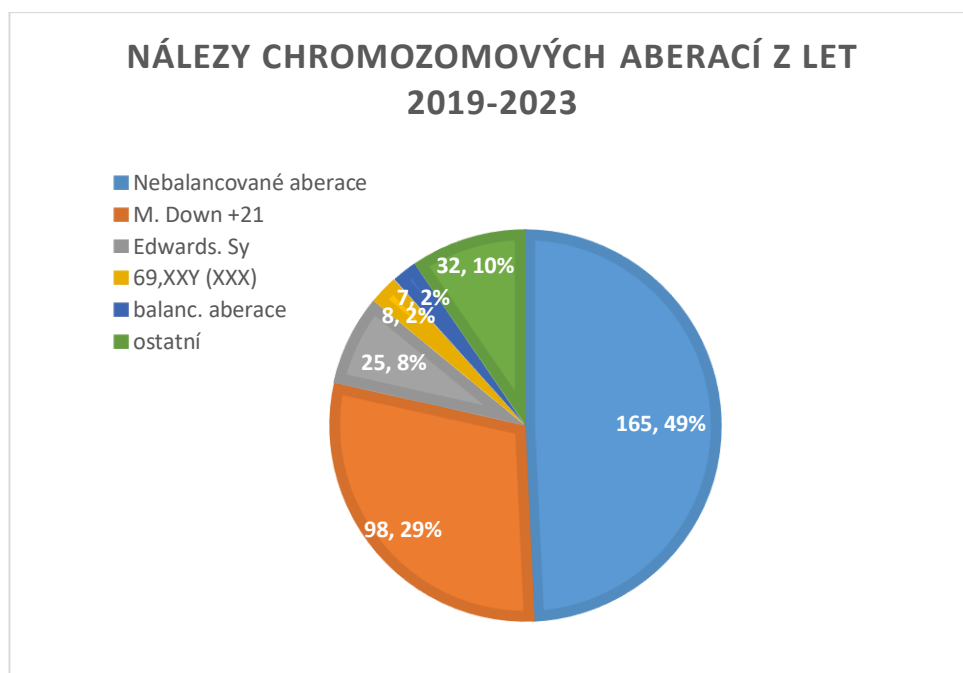
Na závěr jsou do každé jamky PCR destičky přidány 3 μ l produktu PCR s 15 μ l vysoce deionizovaného formamidu, který neničí fluorescenční značku. Poté proběhne denaturace při 95 °C po dobu 2 minut a destička je okamžitě přemístěna na led (Mann et al., 2008).

10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

10.1 Nejčastější vrozená chromozomová aberace

Následující graf zobrazuje rozložení všech 335 odhalených nálezů chromozomových aberací získaných odběrem AMC a CVS v letech 2019-2023 vyšetřených všemi dostupnými metodami včetně molekulárně genetických. Část ostatní zahrnuje další nalezené chromozomové aberace popsané v Tabulkách 5 a 6 přílohy.

Graf 2: Nálezy jednotlivých chromozomových aberací

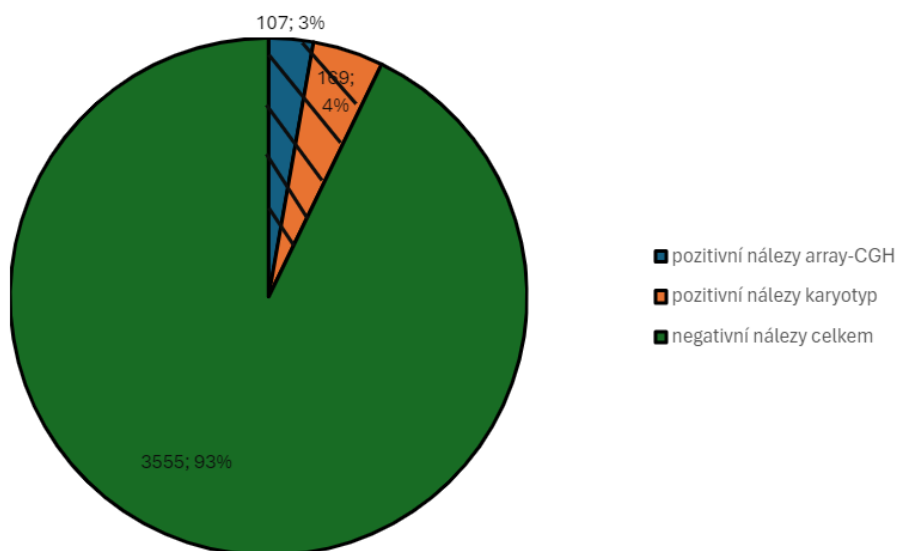


Zdroj: vlastní

10.2 Počet nálezů chromozomových aberací zjištěných metodou array-CGH ve srovnání s klasickým karyotypem

Metodou array-CGH bylo zjištěno 107 chromozomových aberací, karyotypem pak 169, další metody molekulární genetiky (například SNP) jich odhalily 59. Mřížkou jsou označeny nálezy, které by array-CGH odhalila také. Do negativních jsou započítány také nálezy molekulární genetiky a jiné nálezy než chromozomové aberace, jelikož nebyly vyšetřeny ani jednou ze sledovaných metod.

Graf 3: Počet nálezů jednotlivými metodami



Zdroj: vlastní

10.3 Konkrétní nálezy aberací odhalené array-CGH

Array-CGH odhalila 106 bodových mutací (nebalancovaných aberací) popsanych v tabulkách přílohy (Tabulka 7-11) a 1 mozaiku +7. Z celkových 3890 odběrů byl záchyt touto metodou 2,75 %. Nejčastěji se objevovaly nebalancované aberace v oblasti 22q11.23 a to ve 12 nálezech. Dále pak v oblastech: 16p13.11- 9 nálezů, 1q21.1- 9 nálezů a 15q11.2- 7 nálezů.

Kazuistika – Prenatální analýza s pozitivním screeningem 1. trimestru nalezená pomocí array-CGH

Těhotenské stáří: 16

Anamnéza těhotné:

- Gravidita: 3.
- Primipara
- Rodinná anamnéza její i partnera bez genetické zátěže
- Subjektivně bez obtíží

Výsledky:

- Screening 1. trimestru: Riziko Downova syndromu 1 z 252
- Mikrodelece 90 kb v oblasti **22q11.21** (18,894,835-18,984,519)
- Neobsahuje oblast genů kauzálních pro DiGeorgeův syndrom (DGS), avšak sousedí s danou oblastí.

Ultrazvukové vyšetření:

- Drobná cysta v oblasti krku (4 mm) - pravděpodobně branchiogenní cysta
- Regrese nálezu oproti 1. trimestru
- Plod zhodnocen jako normální bez zjištěných morfoloických abnormalit s ohledem na gestační stáří

Postup genetického laboratorního vyšetření:

- Metodou QF PCR ve vzorku plodové vody nebyly prokázány aneuploidie chromozomů 13, 18, 21, X a Y.
- Molekulárně cytogenetické vyšetření počtu kopií CNV metodou a-CGH:
5 - arr[GRCh37] 22q11.21(18706001_21505417)×1 - patologická odchylka počtu kopií (CNV)

Závěr:

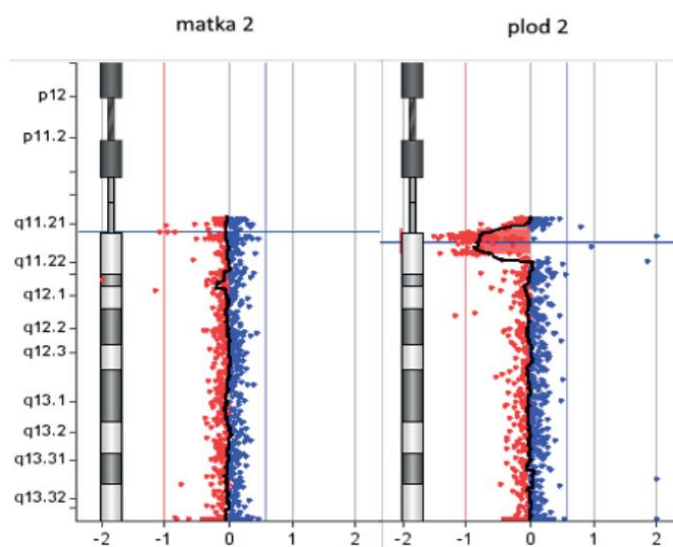
- V array profilu plodu mužského pohlaví byla ve vzorku plodové vody nalezena 2,8 Mbp heterozygotní mikrodelece chromozomu 22q11.21 (18,706,001-21,505,417).
- Mikrodelece zahrnuje zejména geny DGCR2, PRODH, SLC25A1, HIRA, GP1BB, TBX1, COMT, PI4KA, SERPIND1, NAP29, LZTR1.
- Význam aberace je patologický, popisovaný jako „DiGeorge/Velokardiofaciální (DGS/VCFS) syndrom“. Dědičnost autozomálně dominantní.

Fenotypový projev onemocnění DGS:

- Srdeční vady
- Faciální dysmorfie
- Anomálie čelisti

- Vývojové zaostávání
- Deficit imunity
- Hypokalcemie

Obrázek 6: Porovnání výsledků matky a plodu

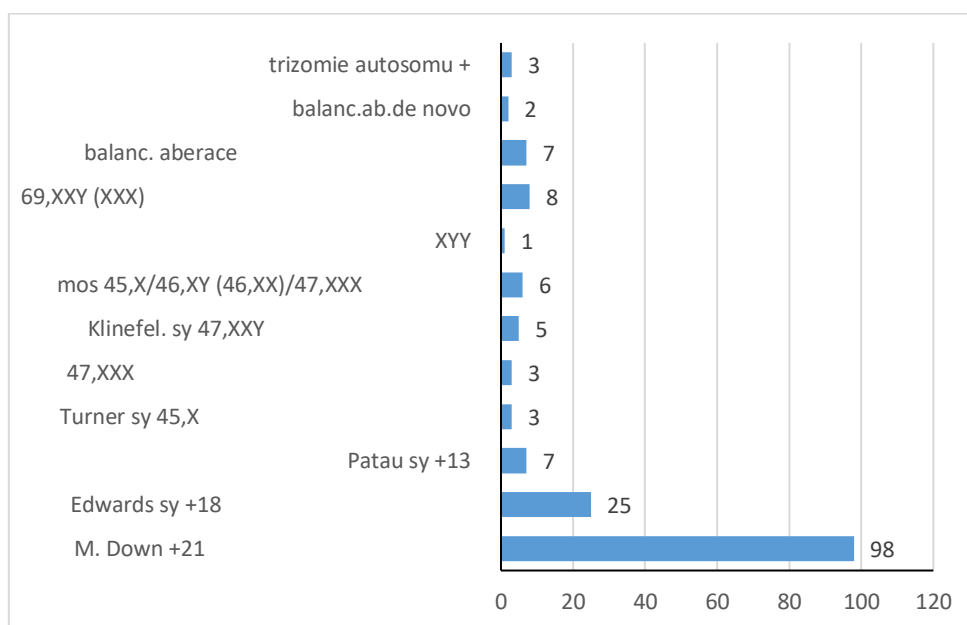


Zdroj: archiv Genetika Plzeň

10.4 Konkrétní nálezy aberací odhalené vyšetřením karyotypu

Vyšetření karyotypu odhalilo 169 (4,3 %) chromozomových aberací z 3890 odběrů. Konkrétní rozložení nálezů je znázorněno v Grafu 3. Největší část nálezů tvoří Downův syndrom s 98 nálezů (58,3 %), dále pak Edwardsův syndrom 25 nálezů (14,9 %), triploidie 69, XXX/XXY-8 nálezů (4,8 %), Patauův syndrom- 7 nálezů, balancované aberace- 7 nálezů, mozaiek 45, X/46, XY/46, XX, 47, XXX- 6 nálezů, Klinefelterův syndrom- 5 nálezů, trizomie autozomu- 3, 47 XXX- 3, Turnerův syndrom- 3, dvě balancované aberace vzniklé de novo a 1× XYY.

Graf 4: Chromozomové aberace nalezené vyšetřením karyotypu



Zdroj: vlastní

10.5 Počet balancovaných aberací nezjistitelných array-CGH

Tabulka zobrazuje počet zjištěných balancovaných aberací v letech 2014-2018, které by nemohly být zjištěny metodou a-CGH. Z celkových 3481 odběrů bylo karyotypem nalezeno 7 balancovaných aberací, tedy 0,2 % z toho 3 vznikly de novo. Array-CGH neodhalí 0,09 % de novo vzniklých balancovaných aberací.

Tabulka 1: Nálezy balancovaných aberací díky provedení karyotypu

Nálezy balancovaných aberací	
1	<i>45,XY,rob(14;22)(q10;q10)dn</i>
2	46,X,inv(Y)(p11.2q11.23)pat
3	46,XX,inv(3)(p23p13)mat parac. inv.
4	46,XY,inv(2)(p11q13)pat
5	<i>46,XY,inv(2)(p13q14.2)dn</i>
6	<i>46,XY,t(3;13)(q23;q14.1)dn</i>
7	46,XY,t(4;11)(q33;p13)pat

Zdroj: vlastní

DISKUZE

Z analýzy 335 vzorků pozitivních na chromozomovou aberaci bylo zjištěno, že nejčastějšími VCA zjištěnými arrayí nebo karyotypem jsou nebalancované aberace, které byly zastoupeny v počtu 328 a tvořily 98 % nálezů VCA. Z toho 107 bodových mutací bylo zjištěno metodou array-CGH a 59 metodami molekulární genetiky. Array-CGH tedy odhalila většinu těchto bodových mutací- 64 %. Skupina bodových mutací však zahrnuje více různých menších aberací, které mohou, ale nemusí mít fenotypový dopad na jedince. Na rozdíl od jasného patologického nálezu Downova syndromu s danými fenotypovými projevy, který je druhým nejčastějším nálezem v naší vybrané skupině těhotných- 98 případů (29 %) a je nejčastěji vyšetřován stanovením karyotypu. Array by však jakožto metoda 1. volby po vyšetření QF-PCR, tento nález odhalila také. Jelikož jsou nebalancované aberace skupina více potencionálních onemocnění, tak pokud bychom měli určit konkrétní nejčastější onemocnění, bude jím Downův syndrom.

Metodou Array-CGH bylo zachyceno o 2,75 % chromozomových aberací více (107 pozitivních nálezů z 3890 odběrů) než pokud bychom vyšetřovali pouze karyotyp, který zachytil celkem 169 aberací (4,3 % z 3890 odběrů). Slabinou arraye je například její finanční náročnost oproti karyotypu.

Jak již bylo zmíněno výše array má svou nezastupitelnou roli při vyhledávání bodových mutací. Využívána je také často pro postnatální diagnostiku. Nejčastější oblastí s chromozomální aberací u ní byla 22q11.23 s 12 prenatalními nálezy. Dalšími oblastmi byly 16p13.11- 9 nálezů, 1q21.1- 9 nálezů a 15q11.2- 7 nálezů. Tyto nálezy odpovídají náchylným chromozomům s vysokým podílem oblastí konstitutivního heterochromatinu (1, 9, 6) a akrocentrické chromozomy (13, 14, 15, 21, 22).

Přestože je vyšetření karyotypu čím dál méně používané oproti historii, kdy byly omezenější možnosti diagnostiky, zachycuje nejčastější genetická onemocnění se známým fenotypovým projevem. Stále je jeho vyšetřování nejvíce efektivní pro stanovení velkých chromozomových aberací (trizomií), kvůli menší finanční zátěži. Jeho nálezy by však array odhalila také a nyní se již podle doporučení odborné společnosti od roku 2018 vyšetřuje pouze dodatečně k arrayi. Svůj význam má nyní hlavně kvůli odhalení balancovaných aberací, které array nezachytí. U této metody hraje více než v kterékoliv jiné lidský faktor. Karyotyp totiž není automatizován oproti jiným metodám. Jeho hodnocení je také náročnější než u jiných metod a je třeba dlouholeté praxe pro rozeznání hlavně velikostně

menších aberací a rozeznání jednotlivých chromozomů a jejich pruhů. Také je třeba více zaměstnanců kvůli hodnocení. Rozložení našich nálezů odpovídá častým chromozomálním onemocněním získaným prostřednictvím stanovení karyotypu. Downův syndrom byl v 98 vzorcích, Edwardsův syndrom v 25 vzorcích, triploidie 69, XXX/XXY v 8 vzorcích, Patauův syndrom v 7 vzorcích, balancované aberace také v 7 vzorcích, mozaika 45, X/46, XY/46, XX, 47, XXX v 6 vzorcích, Klinefelterův syndrom v 5, trizomie autozomu ve 3, 47 XXX ve 3, Turnerův syndrom ve 3, balancované aberace vzniklé de novo ve 2 vzorcích a jeden vzorek s XYY.

Metodou array-CGH není od roku 2019 na Genetice Plzeň detekováno přibližně 0,09 % de novo balancovaných aberací. Z dat v letech 2014-2018, kdy nebyla pro ověření po QF-PCR používána array, ale karyotyp byly zaznamenány 3 takto vzniklé aberace. Balancované aberace sice array neodhalí, ale vadu zděděnou od otce nebo matky bychom přesto dnes díky jejich porovnání s potomkem odhalili a karyotyp by tedy nebyl třeba vyšetřit. Z hlediska finančního i zatížení pracovníků se nevyplatí kvůli 3 nálezům za 4 roky vyšetřovat karyotypem místo čipu.

ZÁVĚR

Práce se zabývala popisem jednotlivých zejména invazivních prenatalně genetických metod a postupů vyšetření. V kontextu indikace ke genetickému vyšetření byly zmíněny i další metody z jiných oborů – biochemické markery, ultrazvukové markery. Hodnoceny byly ale pouze metody genetické a jejich výhody a nevýhody. Pro porozumění získaných nálezů byly popsány také principy vzniku nejčastějších genetických onemocnění. Zjištěno bylo procento diagnostikovaných vzorků s pozitivním nálezem některé vrozené chromozomové aberace vyšetřených metodami array-CGH a karyotyp. Hodnocena je také problematika vyšetření de novo vzniklých balancovaných aberací.

Metoda array-CGH je sice finančně náročnější, ale dokáže odhalit jak bodové mutace, tak velké chromozomové aberace. Zvyšuje tedy záchyt o dalších 2,75 % nálezů z celkových 3890 odběrů na konečných 7 % pozitivních nálezů chromozomových aberací. Od roku 2018 je v ČR odbornou společností array-CGH upřednostňována před vyšetřením karyotypu u prenatalních vzorků. Po jejím zavedení se zvýšil záchyt patologií. Ideální variantou je po vyšetření arrayí dodělat také karyotyp kvůli balancovaným aberacím, které array neodhalí. Množství záchytu balancovaných aberací je však tak malé (7 z 3481 vzorků; 0,2 %), že od roku 2019 Genetika Plzeň vyšetření karyotypu po arrayi neprovádí. Navíc pro probíhající těhotenství není neznalost karyotypu problémem.

Dále bych chtěla dodat, že poměry pozitivních zachycených nálezů ku dané vyšetřovací metodě se mohou na jiných pracovištích výrazně lišit při použití jiné diagnostické strategie, výběru jiné skupiny vzorků, například postnatální tkáňe a také existují nepatrné rozdíly mezi kraji České republiky. Tyto rozdíly mohou být porovnávány s našimi zjištěnými výsledky v dalších výzkumných pracích.

11 BIBLIOGRAFIE

ACOG Committee Opinion No. 446: Array Comparative Genomic Hybridization in Prenatal Diagnosis, 2009. Online. *Obstetrics & Gynecology*. Vol. 114, no. 5, s. 1161-1163. ISSN 0029-7844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181c33cad>. [cit. 2023-12-16].

BELOŠOVIČOVÁ, H. a CALDA, P., 2012. Screening Downova syndromu v prvním, druhém nebo obou trimestrech?. online. *Actual Gyn*. roč. 4, č. 1, s. 14-21. ISSN 1803-9588. Dostupné z: https://www.actualgyn.com/pdf/cz_2012_67.pdf. [cit. 2023-10-02].

BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetiky pro bioanalytiky*. online. 1. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7. Dostupné z: <https://www.bookport.cz/kniha/molekularni-genetika-pro-bioanalytiky-5652/>. [cit. 2023-12-16].

BIORAD, Laboratories, 2024. InstaGene Matrix. online. In: *Bio-rad.com*. Dostupné z: <https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT544.pdf>. [cit. 2024-01-03].

CAMPBELL, I.; SHAW, Ch.; STANKIEWICZ, P. a LUPSKI, J., 2015. Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. online. *Trends in Genetics*. roč. 31, č. 7, s. 382-392. ISSN 01689525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.013>. [cit. 2023-11-02].

Carolinabiosystems.cz, c2016. Online. Dostupné z: <https://www.carolinabiosystems.cz/cs/524-triton-x-100-25-roztok.html>. [cit. 2023-12-13].

COLE, Laurence A., 2010. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. online. In: *BioMed Central*. 8. Reproductive Biology and Endocrinology, s. 1-14. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-102>. [cit. 2023-10-02].

CONLIN, L.; THIEL, B.; BONNEMANN, C.; MEDNE, L.; ERNST, L. et al., 2010. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. online. *Human Molecular Genetics*. roč. 19, č. 7,

s. 1263-1275. ISSN 0964-6906. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq003>. [cit. 2023-11-02].

DONAGHUE, C.; MANN, K.; DOCHERTY, Z. a MACKIE OGILVIE, C., 2005. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. online. *Prenatal Diagnosis*. roč. 25, č. 1, s. 71. ISSN 0197-3851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pd.1086>. [cit. 2023-12-23].

DUGOFF, L.; HOBBS, J. C.; MALONE, F. D.; PORTER, T. F.; LUTHY, D. et al., 2004. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: A population-based screening study (The FASTER Trial). online. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. roč. 191, č. 4, s. 1446-1451. ISSN 00029378. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.06.052>. [cit. 2023-10-07].

FERGUSON-SMITH, M. a BRENNER, S. (ed.), 2001. In: *Encyclopedia of genetics*. 1. Academic Press, s. 1054. ISBN 9780122270802.

FERHST, A. R.; BRENNER, S. (ed.), 2001. Denaturation: Proteins. In: *Encyclopedia of genetics*. 1. Academic Press, s. 529. ISBN 9780122270802.

FRIEDMAN, J. M., 2009. High-resolution array genomic hybridization in prenatal diagnosis. online. *Prenatal Diagnosis*. roč. 29, č. 1, s. 20-28. ISSN 0197-3851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pd.2129>. [cit. 2024-01-31].

GRATI, F.; MOLINA GOMES, D.; FERREIRA, J.; DUPONT, C.; ALESI, V. et al., 2015. Prevalence of recurrent pathogenic microdeletions and microduplications in over 9500 pregnancies | Signed in. online. *Prenatal Diagnosis*. roč. 35, č. 8, s. 801-809. Dostupné z: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-84938570204&origin=inward&txGid=25ac053a03456d815d89047af2541154>. [cit. 2023-11-07].

HÁJEK, Z.; MACEK, M. a KULOVANÝ, E., 2000. *Základy prenatální diagnostiky*. 1. Praha: Grada. ISBN 80-716-9391-X.

HEINRICH, U.; ROST, I.; BROWN, A.; GORDON, T.; HAAN, N. et al., 2009. Array comparative genomic hybridisation in clinical diagnostics: principles and applications / Array-CGH in der klinischen Diagnostik. online. *LaboratoriumsMedizin*. roč. 33, č. 5, s.

255-266. ISSN 0342-3026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/JLM.2009.045>. [cit. 2023-12-18].

HUANG, H. a CHEN, J., 2017. Chromosome Bandings. In: WAN, T. S. K. (ed.); WAN, T. *Cancer cytogenetics: Methods and Protocols*. 1. Methods in Molecular Biology, 1541. Humana Press, s. 59-66. ISBN 978-1-4939-6701-8.

CHEUNG, S. W. a PATEL, A. (ed.); LI, P., 2016. Application of DNA Microarray to Clinical Diagnostics. In: *Microarray Technology: Methods and Applications*. 1. Methods in Molecular Biology: Springer Protocols, 1386. Humana, s. 111-131. ISBN 978-1-4939-3135-4.

JOHNSON, J. M.; KOHUT, R.; SIMROSE, R.; DEWEY, D.; CONNORS, G. et al., 2007. OC31: Women's satisfaction with the OSCAR (One-Stop Clinic Assessment of Risk) model of first-trimester combined screening. online. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. roč. 30, č. 4, s. 377-377. ISSN 0960-7692. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/uog.4137>. [cit. 2023-10-23].

KAGAN, K.; VALENCIA, C.; LIVANOS, P.; WRIGHT, D. a NICOLAIDES, K., 2009. Tricuspid regurgitation in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation. online. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. roč. 33, č. 1, s. 18-22. ISSN 0960-7692. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/uog.6264>. [cit. 2023-10-23].

KAGAN, K.; WRIGHT, D.; BAKER, A.; SAHOTA, D. a NICOLAIDES, K., 2008. Screening for trisomy 21 by maternal age, fetal nuchal translucency thickness, free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. online. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. roč. 31, č. 6, s. 618-624. ISSN 09607692. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/uog.5331>. [cit. 2023-10-07].

KALOUSOVÁ, M.; MURAVSKÁ, A. a ZIMA, T., 2014. Pregnancy-Associated Plasma Protein A (PAPP-A) and Preeclampsia. online. In: *Advances in Clinical Chemistry*. 63. Advances in Clinical Chemistry. Elsevier, s. 169-209. ISBN 9780128000946. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800094-6.00005-4>. [cit. 2023-09-30].

KEAGLE, M. a GERSEN, S., 2013. Basic Cytogenetics Laboratory Procedures. In: *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 3. New York: Springer, s. 53-65. ISBN 978-1-4419-1687-7.

KIM, Y. a POLLACK, J., 2009. Comparative Genomic Hybridization on Spotted Oligonucleotide Microarrays. In: *Microarray Analysis of the Physical Genome*. 1. Springer Protocols: Methods i molecular biology, 556. New York: Humana, s. 29. ISBN 978-1-60327-191-2.

MAIZ, N.; VALENCIA, C.; KAGAN, K.; WRIGHT, D. a NICOLAIDES, K., 2009. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11–13 weeks of gestation. online. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*. roč. 33, č. 5, s. 512-517. ISSN 0960-7692. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/uog.6330>. [cit. 2023-10-23].

MANN, K.; HAMILTON, S.; EVANS, J.; SIBBRING, J. a DORE, J., 2018. *ACGS best practice guidelines for use of Quantitative Fluorescence-PCR for the detection of aneuploidy*. online. In: ACGS. Dostupné z: <https://www.acgs.uk.com/media/11402/qf-pcr-bpg-2018.pdf>. [cit. 2024-02-01].

MANN, K. a OGILVIE, C. M., 2012. QF-PCR: application, overview and review of the literature. online. *Prenatal Diagnosis*. roč. 32, č. 4, s. 309-314. ISSN 0197-3851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pd.2945>. [cit. 2023-12-21].

MANN, K.; PETEK, E. a PERTL, B.; HAHN, S. (ed.), 2008. Prenatal Detection of Chromosome Aneuploidy by Quantitative Fluorescence PCR. In: *Prenatal Diagnosis*. 1. Methods in Molecular Biology, 444. Humana, s. 79-84. ISBN 978-1-58829-803-4.

MICHALOVÁ, K., 1999. Úvod do klinické cytogenetiky. In: *Úvod do lidské cytogenetiky*. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, s. 34-40. ISBN 8070132817.

MUSIL, F., 2021. Laboratorní metodika PAPP-A. online. In: *Nextlab.cz*. Dostupné z: https://www.nextlab.cz/biolabkt-laboratorni-metodiky/_start.htm. [cit. 2023-09-16].

NICOLAIDES, K. H., 2004. *UZ screening v 11.-13. gestačním týdnu*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 80-244-0885-6.

NICOLAIDES, K. H., 2011. Screening for fetal aneuploidies at 11 to 13 weeks. online. *Prenatal Diagnosis*. roč. 31, č. 1, s. 7-15. ISSN 0197-3851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pd.2637>. [cit. 2023-10-06].

NICOLAIDES, K. H.; AZAR, G.; BYRNE, D.; MANSUR, C. a MARKS, K., 1992. Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. online. *BMJ*. roč. 304, č. 6831, s. 867-869. ISSN 0959-8138. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/bmj.304.6831.867>. [cit. 2023-10-16].

NICOLINI, U., 1992. Invasive techniques of prenatal diagnosis. online. *Current Obstetrics & Gynaecology*. roč. 2, č. 2, s. 77-84. ISSN 09575847. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0957-5847\(05\)80020-4](https://doi.org/10.1016/S0957-5847(05)80020-4). [cit. 2023-11-19].

NICOLINI, U.; LALATTA, F.; NATACCI, F.; CURCIO, C. a BUI, T.-H., 2004. The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of fetal aneuploidies: time for reconsideration. online. *Human Reproduction Update*. roč. 10, č. 6, s. 541-548. ISSN 1460-2369. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh046>. [cit. 2023-12-23].

NUSSBAUM, R.; MCINNES, R. a WILLARD, H., 2004. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton, s. 346. ISBN 80-7254-475-6.

ORPHANET, 2020. *MELAS*. online. In: ORPHANET. Orphanet. Dostupné z: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=63. [cit. 2023-11-16].

PARDUE, M. L. a GALL, J. G., 1969. MOLECULAR HYBRIDIZATION OF RADIOACTIVE DNA TO THE DNA OF CYTOLOGICAL PREPARATIONS. online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 64, č. 2, s. 600-604. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.64.2.600>. [cit. 2023-12-11].

PASSARGE, E., 2019. *Barevný atlas genetiky*. 1. české vydání. Ilustroval Jürgen WIRTH, přeložil Milada KOHOUTOVÁ. Praha: Grada. ISBN 9788024730998.

PRITCHARD, D. a KORF, B., 2007. *Základy lékařské genetiky*. 1. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-449-2.

RANDOLPH, L. M., 2013. Prenatal cytogenetics. In: *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 3. New York: Springer, s. 263-264. ISBN 978-1-4419-1687-7.

REJTHAROVÁ, J., 2018. *Laboratorní příručka*. 12. Plzeň: Genetika Plzeň. Dostupné také z: https://www.nextlab.cz/media/editor/files/Genetika_Plzen_Laboratorni_priru.pdf.

SHAFFER, L. G., 2013. Microarray-Based Cytogenetics. In: *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 3. New York: Springer, s. 445-448. ISBN 978-1-4419-1687-7.

STOJILKOVIC-MIKIC, T.; MANN, K.; DOCHERTY, Z. a MACKIE OGILVIE, C., 2005. Maternal cell contamination of prenatal samples assessed by QF-PCR genotyping. online. *Prenatal Diagnosis*. roč. 25, č. 1, s. 79-83. ISSN 0197-3851. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pd.1089>. [cit. 2023-10-30].

VILLE, Y., 2001. Nuchal translucency in the first trimester of pregnancy: ten years on and still a pain in the neck?. online. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. roč. 18, č. 1, s. 5-8. ISSN 09607692. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.2001.00483.x>. [cit. 2023-10-21].

WHITE, K; BOWDOIN, S.; JONES, R.; KOSTENKO, E. a GRATI, F. R.; DI RENZO, G. C. (ed.), 2023. The Technology of Cell-Free Fetal DNA-Based NIPT. In: *Prenatal Diagnostic Testing for Genetic Disorders: The revolution of the Non-Invasive Prenatal Test*. 1. Cham (Switzerland): Springer, s. 165-176. ISBN 978-3-031-31757-6.

WICKER, N.; CARLES, A.; MILLS, I. G.; WOLF, M.; VEERAKUMARASIVAM, A. et al., 2007. A new look towards BAC-based array CGH through a comprehensive comparison with oligo-based array CGH. online. *BMC Genomics*. roč. 8, č. 84, s. 1-10. Dostupné z: <https://doi.org/1471-2164-8-84>. [cit. 2023-12-16].

WOLFF, D. J., 2013. Fluorescence in situ hybridization (FISH). In: *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 3. New York: Springer, s. 415-417. ISBN 978-1-4419-1687-7.

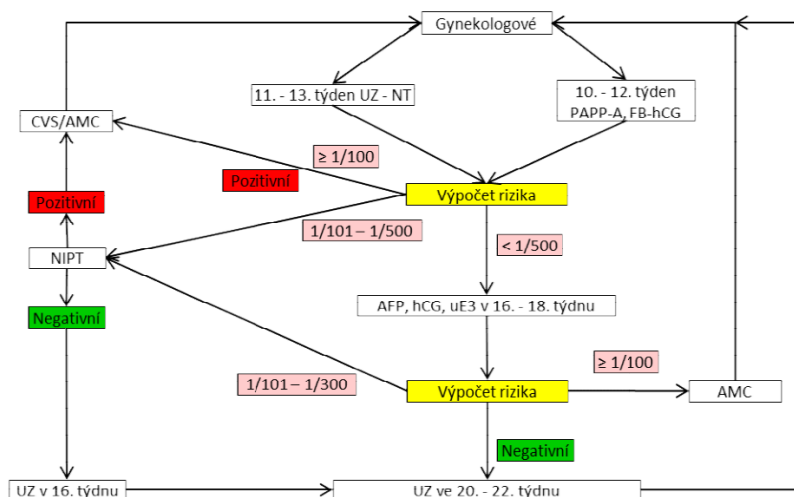
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Anonymizovaná medicínská data

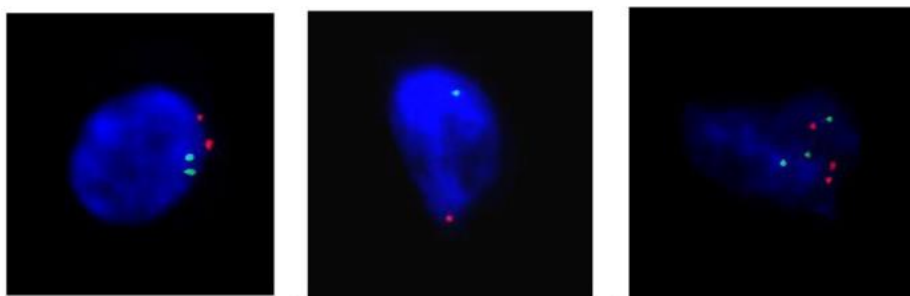
PŘÍLOHY

Příloha A – Anonymizovaná medicínská data

Obrázek 1.



Obrázek 2.



Tabulka 2: Počet provedených metod pro prenatalní diagnostiku

rok	2023	2022	2021	2020	2019
metoda	celkem				
karyotyp	42	70	403	387	325
a-CGH	668	723	651	683	406

Zdroj: vlastní

Tabulka 3: Výsledky prenatalní diagnostiky

rok	2023	2022	2021	2020	2019
Nálezů celkem	177	194	225	243	220
Chromozomální aberace	63	67	79	58	68

Zdroj: vlastní

Tabulka 4: Počet provedených invazivních odběrů

Invazivní výkony	r. 2023	r. 2022	r. 2021	r. 2020	r. 2019
AMC	615	644	723	808	756
CVS	48	61	61	78	84
celkem	663	705	784	898	840

Zdroj: Genetika Plzeň

Tabulka 5: Nálezy chromozomálních aberací po amniocentéze

Nálezy chromozomálních aberací po AMC	2023	2022	2021	2020	2019
Chromozomální aberace	Počet (PLZEŇ+GW)				
M. Down +21	10+1	10	6	5	10
Edwards sy +18	1	1	2	1	1
Patau sy +13	0	0	1	0	0
Turner sy 45,X	0	0	0	0	1
47,XXX	0	0	0	0	1
Klinefel. sy 47,XXY	1+1	0	2	0	1
mos 45,X/46,XY (46,XX)/47,XXX	1	0	1	0	0
XYY	0	1	0	0	0
mos +7	0	0	0	1	0
69,XXY (XXX)	0	0	0	1	1
nebalanc. aberace (karyotyp + čip)	25+2	27	37	28	23
balanc. aberace	1	2	1	1	1
balanc.ab.de novo	0	0	0	0	2
celkem	43	41	50	37	41
	7%	6,4%	6,9%	4,5%	5,40%

Zdroj: Genetika Plzeň

Tabulka 6: Nálezů chromozomálních aberací po CVS

Nálezů chromozomálních aberací po CVS	2023	2022	2021	2020	2019
Chromozomální aberace	Počet (PLZEŇ+GW)				
M. Down +21	4	12	16	13	11
Edwards sy +18	3+1	2	3	4	7
Patau sy +13	2	0	3	0	1
Turnerův sy 45,X	1	0	1	0	1
47,XXX	1	0	0	0	1
Klinefel. sy 47,XXY / 48,XXYY	0	0	0	0	0
mos 45,X/46,XY (46,XX)/47,XXX XYY	1+1 0	1 0	0 0	0 0	0 0
trizomie autosomu + 69,XXY (XXX)	2 1	1 3	0 1	0 1	0 0
nebalancovaná aberace (karyotyp + čip)	3	6	5	3	6
balancovaná aberace	0	1	0	0	0
balancovaná aberace de novo	0	0	0	0	0
celkem	20	26	29	21	27
	42%	43%	47%	27%	32%

Zdroj: Genetika Plzeň

Tabulka 7: Nález z čipů 2023

Pacientka	Nález	Velikost (kbp)	Geny	Třída
1	arr[GRCh37] Xq27.1(139178537_139587647)×2 mat	409	SOX3	4
2	arr[GRCh37] 16p13.12p13.11(14762239_16194578)×1 mat	1400	NTAN1, MARF1, NDE1, MYH11	4
3	arr[GRCh37] Xq13.2(72947546_73096113)×3	150	XIST, TSIX	4
4	arr[GRCh37] 1q21.1(145415190_145799602)×3 mat	384	HFE2, RBM8A, PEX11B	4
5	arr[GRCh37] 15q11.2q13.1(23707452_28691460)×1 dmat	5000	SNRPN a UBE3A	5
6	arr[GRCh37] 12p13.31(6097657_6219587)×1 pat	122	VWF	5
7	arr[GRCh37] 18q22.3(69711229_72488411)×1 pat	2800	CYB5A, ZNF407	2
8	arr[GRCh37] 11p15.1(16324829_16404828)×1 pat	80	SOX6	5
9	arr[GRCh37] 2q31.2(178718748_178869261)×1 mat	150	PDE11A	3
10	arr[GRCh37] 16p12.2(21348901_21837551)×1	360	OTOA	4
11	arr[GRCh37] 8q24.22q24.23(136328739_139272868)×3 dn	3900	KHDRBS3	2,3
12	arr[GRCh37] 16p13.11(14910205_16525348)×1 pat	1600	NTAN1, MARF1, NDE1, MYH11, ABCC6	4,5
13	arr[GRCh37] 10p15.3(136361_1649194)×1	1500	ZMYND11, DIP2C, LARP4B, IDI2, IDI1, ADARB2	5
14	arr[GRCh37] 3p26.1p25.3(7028124_11712047)×1 dn	4700		5
15	arr[GRCh37] 1q21.1q21.2(145415190_148545520)×1	3100	GJA5, GJA8, RBM8A	4
16	arr[GRCh37] Xq28(154118643_154469537)×3 mat	350	MTCP1, BRCC3, VBP1+ část F8	4
17	arr[GRCh37] 1q21.1q21.2(146507518_147824207)×1	1300	FMO5, CHD1L, BCL9, GJA5, GJA8, GPR89B	4
18	arr[GRCh37] 10q11.22-q11.23(46949255_51780909)×3 pat	4800	více než 20 genů	4
19	arr[GRCh37] 22q11.21(21025654_21561514)×1 mat	530	PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, P2RX6, SLC7A4	4
20	arr[GRCh37] 13q21.2(60314191_60541046)×1 pat	227	DIAPH3	3
21	arr[GRCh37] 16p11.2(29592783_30190568)×1 dn	598	KIF22, PRRT2, ALDOA, TBX6	4

Zdroj: vlastní

Tabulka 8: Nález z čipů 2022

Pacientka	Nález	Velikost (kbp)	Geny	Třída
1	arr[GRCh37] 3p26.1(7543602_7876315)×3	332	GRM7	4
2	arr[GRCh37] 8p23.1(7239491_12404062)×1	5200	GATA4, MFHAS1, RP1L1, BLK	5
3	arr[GRCh37] Xp22.33(602488_1212563)×1 pat	610	SHOX	5
4	arr[GRCh37] 22q11.21(19058829_21561514)×3 mat	2500	více než 40 genů, zejména DGCR a TBX1	4
5	arr[GRCh37] 15q11.2(22765628_23300287)×1 dn	535	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1	3
6	arr[GRCh37] 15q26.2(94,634,225-94,899,346)×1	265	MCTP2	4
7	arr[GRCh37] 17p12(14111772_15442066)×1 mat	1300	PMP22	5
8	arr[GRCh37] 22q11.21(18661724_21505417)×3 mat	2800	více než 40 genů, zejména DGCR a TBX1	4
9	arr[GRCh37] 16p13.11(14910205_16194578)×3	1500	více než 10 genů (NDE1, MYH11)	3
10	arr[GRCh37] 2q12.2q13(107132950_113065779)×3 pat	5900	BUB1, BCL2L11, MERTK, SLC5A7, RANBP2, EDAR, NPHP1	4
11	arr[GRCh37] 1q21.1q21.2(145415190_148545520)×3 mat	3100	více než 20 genů (významné GJA5, GJA8, FMO5, CHD1L, BCL9, GPR89B, RBM8A, HFE2, PEX11B)	4
12	arr[GRCh37] 5q35.2(173143371_174261924)×1 pat	1120	CPEB4, NSG2, MSX2	5
13	arr[GRCh37] 14q11.2q12(20608216_26101656)×3[0.45]	5500		5
14	arr[GRCh37] 22q11.21 (18894835_21505417)×3	2600	více než 40 genů, zejména DGCR a TBX1	4
15	arr[GRCh37] 4q35.2 (189703193_190896674)×1 mat	1100	FRG1	3
16	arr[GRCh37] 3q21.3(127754164_128267067)×1 dn	513	SEC61A1, GATA2, RUVBL1, EEFSEC, DNAJB8	5
17	arr[GRCh37] 17q12 (34856055_36248918)×3 mat	1400	CCL3L1, ZNHIT3, PIGW, ACACA, HNF1B	4
18	arr[GRCh37] 22q11.21(18706001_21505417)×1	2800	DGCR2, PRODH, SLC25A1, HIRA, GP1BB, TBX1, COMT, PI4KA, SERPIND1, NAP29, LZTR1	5
19	arr[GRCh37] 16p13.11(14968855_16586915)×3 mat	1600	více než 10 genů (NDE1, MYH11)	3
20	arr[GRCh37] 17q12(34856055_36248918)×3 mat	1400	CCL3L1, ZNHIT3, PIGW, ACACA, HNF1B	4
21	arr[GRCh37] 22q11.23(23720171_24959827)×3 mat	1200	více než 15 genů (IGLL1, CHCHD10, SMARCB1, MIF, SPECC1L, UPB1)	4
22	arr[GRCh37] 16p11.2(28503803_29331350)×1 mat	800	ATXN2L, TUFM, ATP2A1, RABEP2, CD19, NFATC2IP, SPNS1, LAT	4

23	arr[GRCh37] 4q22.1(88144971_92883746)×1 mat	4700	DSPP, DMP1, PKD2, ABCG2, PPM1K, PIGY, SNCA	4
24	arr[GRCh37] 2q13(111368832_113065779)×1	1600	MERTK, BCL2L11, MIR4435-2HG, ANAPC1, TMEM87B, FBLN7	4

Zdroj: vlastní

Tabulka 9: Nález z čipů 2021

Pacientka	Nález	Velikost (kbp)	Geny	Třída
1	arr[GRCh37] 15q15.3(43916972_43950720)x1	33	STRC, CATSPER2	
2	arr[GRCh37] 22q11.21(20754422_21505417)x1	750	PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, P2RX6, SLC7A4	5
3	arr[GRCh37] 15q11.2(22765628_23217514)x1	451	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1	4
4	arr[GRCh37] 10q22.3q23.2(81641918_88828018)x3 mat	7100	více než 20 genů (kauzální BMPR1A)	4
5	arr[GRCh37] 16p13.11(15148956_16525348)x3 mat	1300	více než 10 genů (NDE1, MYH11)	4
6	arr[GRCh37] 16p11.2(29592783_30190568)x1 mat	598	KIF22, PRRT2, ALDOA a TBX6	4
7	arr[GRCh37] 1q21.1(145415190_146507577)x3 pat	1100	více než 20 genů, HFE2, RBM8A, PEX11B	4
8	arr[GRCh37] Xp22.33(505649_598832)x3 mat	93	SHOX	5
9	arr[GRCh37] 16p13.11(14910205_16194578)x3	1300	více než 10 genů (NDE1, MYH11)	4
10	arr[GRCh37] 11p14.2(26330690_26490621)x1	160	ANO3	4
11	arr[GRCh37] 17p12(14111772_15442066)x1	1300	PMP22	5
12	arr[GRCh37] 22q11.21(18919942_21505417)x3	2600	více než 40 genů, zejména DGCR a TBX1	4
13	arr[GRCh37] 1q21.1q21.2(145415190_148545520)x3 mat	3100	více než 20 genů (významné GJA5, GJA8, FMO5, CHD1L, BCL9, GPR89B, RBM8A, HFE2, PEX11B)	4
14	arr[GRCh37] 1q21.1q21.2(146507518_148545520)x3 pat	2100	13 genů (GJA5, GJA8, FMO5, CHD1L, BCL9, GPR89B)	4
15	arr[GRCh37] 16p13.11p12.3(15404452_18306854)x3 mat	3200	více než 10 genů (OMIM: NDE1, MYH11)	4
16	arr[GRCh37] 22q11.21(20402633_21440514)x1	1000	PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, P2RX6, SLC7A4	5
17	arr[GRCh37] Xp28(153731421_154091669)x3	360	F8, G6PD, IKBKG, DKC1, FAM3A, CTGx, MPP1	5
18	arr[GRCh37] 22q11.21(21025654_21440514)x1 mat	414	PI4KA, SERPIND1, SNAP29, CRKL, AIFM3, LZTR1, THAP7, P2RX6, SLC7A4	4
19	arr[GRCh37] Xq13.1 (67906844_68617563)x3 pat	710	EFNB1	4
20	arr[GRCh37] 7q11.23(72766313_74285345)x3 mat	1500		5

21	arr[GRCh37] 16p11.2(29592783_30122538)×3	530	KIF22, PRRT2, ALDOA a TBX6	4
22	arr[GRCh37]Xq27.3q28(146977059_147272946)×1 mat	296	FMR1	4
23	arr[GRCh37] Xp22.31(6570937_7885155)×1 mat	1300	STS, VCX	4
24	arr[GRCh37] 2q13(111368832_113065779)×1 mat	1600	MERTK, BCL2L11, MIR4435-2HG, ANAPC1, TMEM87B, FBLN7	4
25	arr[GRCh37] 15q11.2(22765628_23300287)×1 pat	534	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1	4
26	arr[GRCh37] 2p16.3(51212279_51446873)×1	234	NRXN1	4
27	arr[GRCh37] 22q13.2q13.33(42711036_51063485)×3,22q13.33(51152845_51178264)×1	8400, 25	SHANK3	5
28	arr[GRCh37] Yp11.32p11.2(10701_60000amp,60001_2699520amp,2699521_8875193amp)×3, Yq11.222q11.23(20826207_28609977) ×0,15q13.2q13.3(30954726_32635959) ×1	1600	ARHGAP11B, FAN1, TRPM1, MIR211, KLF13, OTUD7A, CHRNA7	5
29	arr[GRCh37] 2p21(43559726_44586952)×1 mat	1000	THADA, PLEKHH2, DYNC2LI1, ABCG5, ABCG8, LRPPRC, PPM1B, SLC3A1, PREPL	4

Zdroj: vlastní

Tabulka 10: Nález z čipů 2020

Pacientka	Nález	Velikost (kbp)	Geny	Třída
1	arr[GRCh37] 1q21.1(145415190_145799602)x3 mat	385	20 genů (geny HFE2, RBM8A, PEX11B)	4
2	arr[GRCh37] 8q21.3q22.1(92851454_94050462)x1 mat	1200	RUNX1T1	5
3	arr[GRCh37] 10q11.22q11.23(46949255_51911085)x1	5000	RBP3, GDF2, ERCC6, CHAT, SLC18A3, MSMB	5
4	arr[GRCh37] 9q22.33(101661436_102042338)x3 mat	380	COL15A1, TGFBR1, ALG2, SEC61B	3
5	arr[GRCh37] 22q11.23(23720171_24959827)x3	1200	více než 15 genů (IGLL1, CHCHD10, SMARCB1, MIF, SPECC1L, UPB1)	4
6	arr[GRCh37] 18q12.1(29064917_29988495)x3 dn	920	B4GALT6, SLC25A52, TRAPPC8, RNF128, MEP1B, DSG2, TTR, RNF125	3
7	arr[GRCh37] 8p11.21p11.1(42970273_43529733)x3 mat	560	GSNA, POTEA, POMK	5
8	arr[GRCh37] 16p13.11p12.3(15279997_18853085)x3 mat	3500	více než 10 genů (NDE1, MYH11)	4
9	arr[GRCh37] 15q11.2(22765628_23300287)x1 mat	534	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1	4
10	arr[GRCh37] 17p12(14111772_15442066)x1	1300	PMP22	5
11	arr[GRCh37] 3p26.3(93949_2599012)x1,3p26.3p26.2(2610464_3161076)x3 mat	2500, 550	CNTN4	3
12	arr[GRCh37] 16p13.11(14968855_16525348)x3	1500	10 genů (NDE1, MYH11)	4
13	arr[GRCh37] 8q21.3q22.1(92851454_94050462)x1 mat	1200	6 genů, významný RUNX1T1	5
14	arr[GRCh37] 1q21.1q21.2(146507518_147824207)x1 mat	1300	FMO5, CHD1L, BCL9, GJA5, GJA8, GPR89B	4
15	arr[GRCh37] 15q11.2(22765628_23300287)x1	535	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1	4
16	arr[GRCh37] 11q23.3q25(120083628_134868407)x1, 12p13.33p11.1(230421_34091162)x4 [0,48],18q21.2q23(51163377_78012829)x3	17700, 26800, 34000		5

Zdroj: vlastní

Tabulka 11: Nález z čipů 2019

Pacientka	Nález	Velikost (kbp)	Geny	Třída
1	arr[GRCh37] 1q41(216191211_216408493)x1 mat	217	USH2A	4
2	arr[GRCh37] 22q11.21(18661724_21505417)x3 mat	2800	více než 40 genů, zejména DGCR a TBX1	4
3	arr[GRCh37] 22q11.21(18894835_18984519)x1	90	DGCR6, PRODH, DGCR5	2
4	arr[GRCh37] 16p12.2(21728367_22407931)x1	680	OTOA	1
5	arr[GRCh37] 6q22.1(116329632_116542553)x1 mat	212	FRK, COL10A1	5
6	arr[GRCh37] 3p26.3(1197623_2399464)x3 mat	1200	CNTN4, CNTN6	3
7	arr[GRCh37] 15q13.2q13.3(30819465_32509926)x1	1600	ARHGAP11B, FAN1, TRPM1, MIR211, KLF13, OTUD7A, CHRNA7	5
8	arr[GRCh37] 15q11.2(22765628_23300287)x1	535	TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1	5
9	arr[GRCh37] 1p36.32(2761325_3235959)x3 mat	470	PRDM16	3
10	arr[GRCh37] 22q13.2(42160470_42556331)x3 pat	400	TNFRSF13C, NAGA a CYP2D6	3
11	arr[GRCh37] 22q11.21(18894835_18984519)x1 pat	90	DGCR6, PRODH, DGCR5	3
12	arr[GRCh37] Xp22.33(452148_1217076)x1	765	SHOX	5
13	arr[GRCh37] 2p16.3(51128857_51251557)x1	120	NRXN1	5
14	arr[GRCh37] 3q29(195740357_197420612)x1 dn	1700	RNF168, FBXO45, PAK2, DLG1 de novo	5
15	arr[GRCh37]3q29(195623819_197317103)x3	1700	TNK2, TFRC, SLC51A, PCYT1A, TCTEX1D2, UBXN7, RNF168, WDR53, FBXO45, NRROS, CEP19, PIGX, PAK2, SENP5, NCBP2, PIGZ, MELTF, DLG1, BDH1	4

16 arr[GRCh37]
16p13.12p13.11(14762239_16674321)x1 mat

1900

NTAN1, MARF1, NDE1, MYH11

5

Zdroj: vlastní