

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



**Bc. Pavel Šenkyřík**

Optimalizace digitální polymerázové řetězové reakce pro aplikaci v neinvazivní prenatální diagnostice

Optimization of digital polymerase chain reaction for application in non-invasive prenatal diagnostics

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Marie Korabečná, Ph.D.

Praha, 2022

**Charles University**  
**Faculty of Science**



## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2022

Podpis

## **Poděkování**

Nejdříve bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Marii Korabečné, Ph. D. za podnětné rady a odbornou pomoc, kterou mi poskytovala při zpracování mé diplomové práce a za čas, který mi věnovala. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Aleši Hořínkovi za poskytnutí vzorků krevní plasmy a kolektivu prof. Ing. Pavla Neužila, Dr., DSc. za vyhodnocení vzorků pomocí algoritmů. Současně bych chtěl poděkovat kolektivu naší laboratoře, který mi v začátcích pomohl se seznámit se všemi přístroji a postupy a to především Mgr. Soně Laššákové, Mgr. Alžbětě Zinkové, Ph. D., Mgr. Šárce Šantorové, Ph. D. a Mgr. Leně Obeidové, Ph. D. Nakonec bych chtěl poděkovat své rodině za podporu během studia a psaní této práce.

## **Abstrakt**

Digitální PCR (Polymerase Chain Reaction) je metoda umožňující absolutní kvantifikaci sekvencí DNA a proto nachází uplatnění v mnoha diagnostických disciplínách. Zaměřili jsme se na diagnostiku trisomie 21. chromosomu, která se projevuje jako Downův syndrom. Informace o genomu plodu lze získat z volné fetální DNA, která se během těhotenství uvolňuje do krevního řečiště matky z placenty. V prvním trimestru fetální DNA tvoří přibližně 5–10 % volné DNA a je tudíž vhodným cílem pro neinvazivní prenatalní testování (NIPT). Potřebujeme však techniku, která je schopna rozlišit tuto relativně malou frakci volné fetální DNA a odlišit ji od volné DNA matky. Právě digitální PCR poskytuje díky širokým možnostem multiplexování různé způsoby, jak tohoto cíle dosáhnout. Zaměřili jsme se na optimalizaci multiplex reakce, která v jednom fluorescenčním kanále rozlišuje počet kopií referenčního chromosomu 18 a sledovaného chromosomu 21. Výsledné stanovení tohoto poměru nám poskytuje informaci ohledně rovnováhy mezi chromosomy a může nám tak potvrdit či vyvrátit přítomnost trisomické fetální frakce. Využitelnost navržené metody pro klinickou aplikaci jsme testovali vyšetřením vzorků DNA izolovaných z 25 vzorků plazmy těhotných se zdravými plody a z 15 vzorků plazem od těhotných s plody postiženými Downovým syndromem. Analýza křivky operační charakteristiky přijímače (ROC) získaných dat vedla ke stanovení cut-off hodnoty naměřeného poměru 1,144 pro dosažení senzitivity 73,3 % a specificity 80 %. Vytypovali jsme metodické přístupy s potenciálem dále zlepšit parametry vyvíjeného testu.

**Klíčová slova:** ddPCR, NIPT, duplexing, Downův syndrom, optimalizace, prenatalní diagnostika, aneuploidie

## **Abstract**

Digital PCR (Polymerase Chain Reaction) is a method that enables absolute quantification of DNA sequences and therefore finds application in many diagnostic disciplines. We focused on the diagnosis of trisomy 21, which manifests itself as Down syndrome. Information about the fetal genome can be obtained from free fetal DNA that is released into the mother's bloodstream from the placenta during pregnancy. In the first trimester, fetal DNA constitutes approximately 5-10% of free DNA and is therefore a suitable target for non-invasive prenatal testing (NIPT). However, we need a technique that is able to distinguish this relatively small fraction of free fetal DNA and differentiate it from free maternal DNA. Precisely digital PCR provides various ways to achieve this goal thanks to its wide multiplexing possibilities. We focused on optimizing the multiplex reaction, which in one fluorescence channel distinguishes the number of copies of the reference chromosome 18 and the observed chromosome 21. The resulting determination of this ratio provides us with information regarding the balance between the chromosomes and can thus confirm or refute the presence of a trisomic fetal fraction. We tested the usability of the proposed method for clinical application by examining DNA samples isolated from 25 plasma samples from pregnant women with healthy fetuses and from 15 plasma samples from pregnant women with fetuses affected by Down syndrome. ROC analysis of the obtained data led to the determination of a cut-off value of the measured ratio of 1.144 to achieve a sensitivity of 73.3% and a specificity of 80%. We identified methodological approaches with the potential to further improve the parameters of the developed test.

**Keywords: ddPCR, NIPT, duplexing, Down syndrome, optimization, prenatal diagnostics, aneuploidy**

## Seznam zkratek

6-FAM:	6-karboxyfluorescein.
AFP:	alfa-1 fetoprotein.
<i>AGO1</i> :	argonaut RISC komponenta 1.
APC/C:	anafázi podporující komplex s navázaným cyklinem.
ATP:	adenosintrifosfát.
AUC:	oblast pod křivkou.
BUBR1:	protein 1 spjatý s pučením neinhibovaným benzimidazolem.
CDK1:	cyklin dependentní kináza 1.
cdPCR:	na čipu probíhající digitální polymerázová řetězová reakce.
cfDNA:	volná deoxyribonukleotidová kyselina.
CMA:	chromosomální microarray analýza.
ddPCR:	kapičková digitální polymerázová řetězová reakce.
DIA:	dimerický inhibin A.
DNA:	deoxyribonukleotidová kyselina.
dPCR:	digitální polymerázová řetězová reakce.
FAM:	karboxyfluorescein.
FISH:	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.
HDAC3:	histonová deacetyláza 3.
HPLC:	vysokoúčinná kapalinová chromatografie.
IGF:	inzulinu podobný růstový faktor.
IGFBP-4:	protein vázající inzulinu podobný růstový faktor 4.
LNA:	uzamčená nukleová kyselina.
MPSS:	masivně paralelní shotgun sekvenování.
NGS:	sekvenování nové generace.
NIPT:	neinvazivní prenatální testování.
PAPP-A:	specifický těhotenský protein A.
QF-PCR:	kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce.
qPCR:	kvantitativní polymerázová řetězová reakce.
Rec8:	kleisinová podjednotka rekombinačního proteinu.
Rh:	<i>rhesus</i> .
RhD:	<i>rhesus</i> faktor antigen D.
ROC:	operační charakteristika přijímače.
SAC:	kontrolní bod sestrojení dělicího vřeténka.
Sgo2:	shugoshin 2.
SIRT1:	nikotinamid adenin dinukleotid-dependentní deacytláza sirtuin-1.
SIRT2:	nikotinamid adenin dinukleotid-dependentní proteinová deacetyláza sirtuin-2.
Smc1 $\alpha$ :	alfa podjednotka proteinu udržující strukturu chromosomu 1.
Smc1 $\beta$ :	beta podjednotka proteinu udržující strukturu chromosomu 1.
Smc3:	protein udržující strukturu chromosomu 3.
SNP:	jednonukleotidový polymorfismus.
Taq:	<i>thermus aquaticus</i> .
uE3:	volný estriol.
WHO:	světová zdravotnická organizace.
YakYel:	Yakima Yellow.
<i>ZFY</i> :	gen pro protein zinkového prstu vázaný na chromosom Y.
$\beta$ -hCG:	beta podjednotka lidského chorionového gonadotropinu.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>11</b>
1.1. <i>Prenatální diagnostika</i> .....	11
1.1.1. Invazivní metody.....	12
1.1.1.1. Odběr chorionových klků.....	12
1.1.1.2. Amniocentéza .....	12
1.1.1.3. Kordocentéza .....	13
1.1.1.4. Vyhodnocení materiálu získaných invazivními technikami.....	13
1.1.2. Neinvazivní metody .....	14
1.1.2.1. Screening mateřského séra .....	14
1.1.2.2. Ultrazvukový screening.....	15
1.1.2.3. Volná DNA.....	15
1.1.3. Doporučené postupy prenatální diagnostiky v ČR .....	17
1.2. <i>Aneuploidie</i> .....	18
1.2.1. Princip vzniku aneuploidí.....	19
1.2.2. Aneuploidie oocytů .....	21
1.2.2.1. Na věku závislé příčiny aneuploidie .....	21
1.2.2.2. Na věku nezávislé příčiny aneuploidie.....	26
1.2.3. Aneuploidie spermií .....	28
1.2.3.1. Příčiny vzniku aneuploidie spermií.....	28
1.2.4. Klinické projevy aneuploidie.....	29
1.2.4.1. Trisomie 21. chromosomu.....	30
1.2.4.2. Trisomie 18. chromosomu.....	31
1.2.4.3. Trisomie 13. chromosomu.....	31
1.2.4.4. Aneuploidie pohlavních chromosomů .....	32
1.3. <i>Digitální PCR</i> .....	33
1.3.1. Historie a vývoj digitální polymerázové řetězové reakce .....	33
1.3.2. Princip digitální polymerázové řetězové reakce .....	34
1.3.2.1. Digitální polymerázová řetězová reakce na čipu.....	35
1.3.2.2. Digitální polymerázová řetězová reakce v kapičkách.....	35
1.3.3. Vyhodnocení dat získaných metodou dPCR .....	35
1.3.4. Vlastnosti dPCR.....	36
1.3.4.1. Dynamický rozsah detekce.....	36
1.3.4.2. Přesnost dPCR .....	36
1.3.4.3. Rozdělení reakčního objemu do kompartmentů .....	37



1.3.5.	Multiplexování.....	38
1.3.5.1.	Multiplexy s fluorescenčními sondami .....	38
1.3.5.2.	Multiplexy s interkalačními barvivy .....	40
1.3.5.3.	Duplexování s využitím kombinace interkalačního barviva a fluorescenčně značené sondy .....	41
1.3.6.	Využití dPCR v neinvazivní prenatalní diagnostice .....	42
1.3.6.1.	dPCR pro určení pohlaví plodu a vyšetření RhD inkompatibility matky a plodu .....	42
1.3.6.2.	Aplikace dPCR při neinvazivní prenatalní diagnostice monogenních onemocnění .....	43
1.3.6.3.	Využití dPCR pro neinvazivní detekci aneuploidíí u plodu.....	43
<b>2.</b>	<b>Cíl práce a hypotézy .....</b>	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>Materiál.....</b>	<b>46</b>
3.1.	<i>Optimalizace .....</i>	<i>46</i>
3.1.1.	Mastermix .....	46
3.1.2.	EvaGreen .....	46
3.1.3.	Voda .....	46
3.1.4.	Alexa .....	46
3.1.5.	Fluorescenční sondy.....	46
3.1.6.	Primery .....	47
3.2.	<i>Zdroje DNA.....</i>	<i>50</i>
3.2.1.	Komerčně izolovaná DNA .....	50
3.2.2.	Krevní plasma těhotných žen – zdravé těhotenství.....	50
3.2.3.	Krevní plasma těhotných žen – trisomické těhotenství.....	50
<b>4.</b>	<b>Metody .....</b>	<b>51</b>
4.1.	<i>Práce se Stilla ddPCR.....</i>	<i>51</i>
4.1.1.	Příprava vzorku.....	51
4.1.2.	Práce s Naica Geode a PCR protokol.....	51
4.1.3.	Vyhodnocení výsledků.....	52
4.2.	<i>Optimalizace .....</i>	<i>52</i>
4.2.1.	Izolace DNA .....	52
4.2.1.1.	MagNA (Protokol 1) .....	53
4.2.1.2.	Mag Bind (Protokol 2a a 2b).....	54
4.2.1.3.	MiniMaX (Protokol 3) .....	56
4.2.2.	Výběr primerů.....	58

4.2.3.	Výběr počtu primerů .....	58
4.2.4.	Výběr koncentrace a objemu reaktantů .....	59
4.2.4.1.	Primery .....	59
4.2.4.2.	Vliv koncentrace mastermixu v reakci.....	61
4.2.4.3.	Vliv koncentrace DNA v reakci.....	62
4.2.5.	Konečný design experimentu .....	63
4.2.6.	Nastavení prahových hodnot fluorescence pro interpretaci výsledků.....	64
4.3.	<i>Vyšetření klinických vzorků</i> .....	65
4.4.	<i>Statistická analýza</i> .....	65
<b>5.</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>66</b>
5.1.	<i>Optimalizace</i> .....	66
5.1.1.	Izolace DNA .....	66
5.1.2.	Výběr primerů.....	67
5.1.3.	Výběr počtu primerů .....	68
5.1.4.	Výběr koncentrace a objemu reaktantů.....	70
5.1.4.1.	Primery .....	70
5.1.4.2.	Vliv koncentrace mastermixu v reakci.....	70
5.1.4.3.	Vliv koncentrace DNA v reakci.....	73
5.1.5.	Konečný design experimentu .....	73
5.1.6.	Nastavení prahových hodnot fluorescence .....	74
5.2.	<i>Vyšetření klinických vzorků</i> .....	77
5.2.1.	Vyhodnocení souboru kontrolních vzorků .....	77
5.2.2.	Vyhodnocení souboru vzorků s T21 u plodu.....	78
5.3.	<i>Statistická analýza</i> .....	80
<b>6.</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>85</b>
6.1.	<i>Vznik precipitátů</i> .....	85
6.2.	<i>Nepřesnost dPCR</i> .....	86
6.3.	<i>Rozlišení prahů pro odečet pozitivních částic</i> .....	87
6.4.	<i>Velikost fetální frakce</i> .....	87
6.5.	<i>Využití multiplexu v klinické praxi</i> .....	88
<b>7.</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>90</b>

# 1. Úvod

Digitalní polymerázová řetězová reakce (dPCR) je metoda umožňující absolutní kvantifikaci cílové molekuly s vysokou citlivostí (Kanagal-Shamanna 2016). Pomocí dPCR jsme schopni detekovat a kvantifikovat málo zastoupené sekvence deoxyribonuklotidové kyseliny (DNA) ve směsi DNA. Díky tomu se dPCR stala užitečným nástrojem pro onkologii, studium infekčních chorob, sledování kvality životního prostředí, studium genetického mozaicismu a našla využití i v prenatální diagnostice (Karlin-Neumann a Bizouarn 2018).

## 1.1. Prenatální diagnostika

Prenatální diagnostika je soubor metod a postupů umožňujících diagnostikovat různé choroby a patologie u ještě nenarozeného jedince. Cílem prenatální diagnostiky je zjistit, zda je specifická genetická choroba či vada přítomna u plodu již během těhotenství. Další přístup k problematice nám poskytuje prenatální genetický screening, jež si klade za cíl zjistit, jestli má pacientka zvýšené riziko mít plod s genetickou poruchou (American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins 2016). Znalosti získané těmito disciplínami pak využije lékař a seznámí pacienty s výsledkem vyšetření, vypočítanými riziky a možnými klinickými řešeními.

K provedení prenatálního vyšetření potřebujeme získat vzorek buněk plodu. Metody využívané k získání tohoto vzorku můžeme dělit na invazivní a neinvazivní. Neinvazivní metody nemají dostatečnou přesnost, ke zjištění či vyloučení přítomnosti choroby, proto se zatím využívají jen jako screeningové metody, ale tím, že nezasahují do integrity tkání plodu nesou značně nižší riziko ztráty těhotenství. Invazivní metody se používají pro diagnostiku, protože jsou jejich výsledky přesnější, ale zároveň nesou riziko, že provedení vyšetření může vést ke ztrátě těhotenství nebo k vyvolání jiné nežádoucí komplikace. Proto se k invazivním vyšetřením přistupuje až tehdy, pokud je jednoznačně indikováno (Carlson a Vora 2017).

Nejčastějšími indikacemi pro podstoupení prenatálního diagnostického vyšetření jsou: prekoncepčně definované riziko genetické vady, pozitivní osobní či rodinná anamnéza dědičného onemocnění, pozitivní nález prenatálního screeningu, vystavení teratogennímu riziku a vysoký věk matky. Dále se dá přistoupit k vyšetření, pokud si to pár či matka budou přát (Společnost lékařské genetiky a genomiky 2019).

### **1.1.1. Invazivní metody**

#### **1.1.1.1. Odběr chorionových klků**

Odběr chorionových klků je prováděn mezi 10. a 13. týdnem těhotenství. Jedná se odběr tkáně vnějšího plodového obalu nesoucí genetickou informaci embrya a provádí se zavedením speciální jehly pod ultrazvukovou kontrolou. Odběr může probíhat jak přes stěnu břišní dutiny, tak i přes děložní čípek. Získaný vzorek tkáně je kultivován pro účely cytogenetického vyšetření. Výhodou oproti amniocentéze je možnost časnějšího odběru tkáně a tím pádem dřívější získání výsledků vyšetření. I tato technika nese svá rizika (Jones a Montero 2021). Prvním je riziko přerušování těhotenství, které se pohybuje na úrovních 0,7 % během 14 dní po odběru, 1,3 % v rámci 30 dní a 2 % v jakoukoli dobu těhotenství. Nesmíme ale zapomenout, že odběr probíhá i v dřívějším gestačním týdnu a přirozená hladina potratů je v brzkém stádiu těhotenství vyšší (Mujezinovic a Alfirevic 2007). Druhým rizikem spojeným s odběrem chorionových klků je výskyt placentárního mozaicismu. V 1 – 2 % případů se stává, že karyotyp placenty a plodu nenesou shodné chromosomové aberace, což pak může vést k falešným výsledkům vyšetření. Pokud máme podezření na mozaicismus je potřeba provést v druhém trimestru amniocentézu (Malvestiti et al. 2015). Další rizika, jež jsou spojována s odběrem klků jsou únik plodové vody, následná infekce po odběru a neúspěšnost kultivace s výskytem nižším než 0,5 %.

#### **1.1.1.2. Amniocentéza**

Amniocentéza je odběr plodové vody, který je prováděn během 15. až 20. týdne těhotenství. Odběr probíhá zavedením odběrové jehly pod ultrazvukovou kontrolou. Touto metodou je odebráno 20 – 30 ml plodové vody, která je pak předána k několikadenní kultivaci v ní obsažených buněk (Jindal a Chaudhary 2021). Jedním z rizik amniocentézy je způsobení potratu. Toto riziko se s nabývajícím zkušenostmi lékařů a novými postupy snižuje, ale je stále nenulové. Nyní se pohybuje průměrně na 0,13 % (Jindal a Chaudhary 2021). Riziko potratu během 28 dní po odběru je 0,58 % a 0,09 % během 42 dní (Ghi et al. 2016). Mezi další rizika patří krátkodobý odtok plodové vody (1 – 2 %), krvácení (2 – 3 %) a zavlečení infekce (menší než 0,1 %) (Jindal a Chaudhary 2021).

### **1.1.1.3. Kordocentéza**

Kordocentéza je invazivní metoda, při níž se pomocí jehly za ultrazvukové kontroly odebere vzorek fetální krve z pupečnickové vény. V současnosti se jedná o jedinou metodu, pomocí níž můžeme získat vzorek krve plodu, z tohoto důvodu může být použita nejen k vyšetření karyotypu, ale i k zjištění infekce plodu, diagnóze krve a metabolické analýze. Kordocentéza může být prováděna mezi 17. a 40. týdnem těhotenství (Peddi et al. 2021). Mezi potenciální rizika kordocentézy patří krvácení v místě odběru (20 – 30 %), bradykardie plodu (5 – 10 %) a riziko potracení okolo 1,3 % (Khalek 2017).

### **1.1.1.4. Vyhodnocení materiálu získaných invazivními technikami**

Vyšetření karyotypu je základní technikou pro vyšetření chromosomálních aberací plodu. Jako karyotyp označujeme kompletní set všech chromosomů obsažených v buňce daného organismu. Po získání materiálu invazivními technikami jsou poté buňky po dobu 10 – 11 dní kultivovány a následně za pomoci kolchicinu je jejich dělení zastaveno, abychom mohli buňky zachytit v metafázi mitózy, kdy jsou jasně viditelné všechny chromosomy. Následuje lýze buněk, fixace chromosomů, příprava mikroskopických preparátů a jejich barvení nejčastěji za pomoci barviva Giemsa po krátkém proteolytickém působení trypsinu. Tato technika se nazývá G-pruhování a je spolehlivou metodou k identifikaci aneuploidií plodu, strukturních přestaveb či duplikací a delecí větších než 5 Mb (Simoni et al. 1983).

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je další metodou pro vyšetření karyotypu. Metoda je založena na principu hybridizace fluorescenční sondy s cílovou DNA sekvencí. Pod fluorescenčním mikroskopem jsme pak schopni rozlišit jednotlivé hybridizované úseky podle barev sond (Tsuchiya 2011). Tato metoda umožňuje rychlejší vyšetření vzorků získaných aminocentézou v rámci 24 – 48 hodin, jelikož nevyžaduje dělicí se buňky (Jia Chan-wei et al. 2011). FISH se tak používá k diagnostice trisomií, mutací, translokací (Tsuchiya 2011).

Jako další metodu vyšetření karyotypu můžeme použít chromosomální microarray analýzu (CMA). CMA je technika založená na principu komparativní genomické hybridizace, jedná se o techniku s vysokým rozlišením, která je schopná rozlišit submikroskopické aberace. Za pomoci CMA můžeme rozlišit polymorfismy typu „copy number variations“, jedno nukleotidové polymorfismy, homozygotitu či heterozygotitu pro nalezený

polymorfismus či aberaci, triploidii a uniparentální disomii (Hixson et al. 2015; Levy a Wapner 2018).

Pro vyšetření plodové vody a chorionových klků je možno použít kvantitativní fluorescenční PCR (QF-PCR), kdy za pomoci kapilární elektroforézy detekujeme fluorescenčně značené amplikony (Hulten et al. 2003). Nejběžněji se amplifikují krátké tandemové repetice, jež jsou chromosomálně specifické. Za použití multiplexu s fluorescenčně značenými primery je možno zároveň detekovat aneuploidie chromosomů 13, 18, 21 a pohlavních chromosomů (Mann a Ogilvie 2012).

V neposlední řadě je možno využít k vyšetření vzorků odebraných invazivními metodami sekvenování nové generace (NGS) a detekovat přítomnost mutací u plodu v závislosti na rodinné anamnéze (Hixson et al. 2015).

### **1.1.2. Neinvazivní metody**

#### **1.1.2.1. Screening mateřského séra**

Mateřské sérum se hojně používá pro screening těhotných. Ve vzorku z krve odebrané matce se měří hladiny specifických biomarkerů, jejichž hladiny mohou prozradit velikost rizika výskytu vrozených vývojových vad (Gordon a Langaker 2021). Mezi sledované biomarkery patří specifický těhotenský protein A (PAPP-A), beta podjednotka lidského chorionového gonadotropinu ( $\beta$ -hCG), alfa-1 fetoprotein (AFP), volný estriol (uE3) a dimerický inhibin A (DIA) (Hixson et al. 2015). PAPP-A je placentální glykoprotein, který štěpí protein vázající inzulinu podobný růstový faktor 4 (IGFBP-4) a pozitivně tak reguluje inzulinu podobný růstový faktor (IGF). Snížená koncentrace PAPP-A v mateřském séru v prvním trimestru může být projevem nesprávně fungující placenty, což pak může mít za následek nepříznivý výsledek těhotenství (Morris et al. 2017). Proto je PAPP-A jedním z markerů používaném v prvotrimestrálním kombinovaném screeningu (Eiben a Glaubitz 2005). Dalším biochemickým markerem je  $\beta$ -hCG, což je glykoproteinový hormon produkovaný placentou. Koncentrace této volné beta podjednotky se během těhotenství mění a za rizikovou můžeme považovat nízkou koncentraci během prvního trimestru, a naopak zvýšenou koncentraci v druhém trimestru (Hixson et al. 2015; Sirikunalai et al. 2016). V druhotrimestrálním screeningu se používá jako marker AFP. AFP je glykoprotein z rodiny albuminoidů a je produkován játry plodu a žloutkovým vakem. Zvýšené hodnoty v krvi matky poukazují na poruchy uzavření neurální trubice,

omfalokélu, gastroschisis, ledvinovou agenesi, atresi jícnu a možné neprospívání plodu. Zároveň může být hladina AFP ovlivněna i dalšími faktory nesouvisejícími s průběhem těhotenství (Bartkute et al. 2017). Druhým z markerů používaných v druhotrimestrálním screeningu je uE3, což je steroidní produkt fetoplacentální jednotky, jehož koncentrace odráží její aktivitu (Canick et al. 1988). Proto snížení hodnot uE3 může být signálem pro výskyt Downova syndromu, poruch nervového systému a snížené funkčnosti nadledvin (Sayin et al. 2007). Poslední marker používaný pro druhotrimestrální screening je DIA. DIA je dimerický glykoprotein, jehož zvýšená koncentrace se vyskytuje u těhotenství s Downovým syndromem (Aitken et al. 1996).

### **1.1.2.2. Ultrazvukový screening**

V prvním trimestru se jako jedna z ultrazvukových screeningových metod používá vyšetření tloušťky šíjového projasnění neboli nuchální translucence. Plody s chromosomálními aberacemi mají větší tloušťku šíjového projasnění. Vhodnou dobou pro měření nuchální translucence je 11. – 14. gestační týden (Driscoll a Gross 2008). V tomto intervalu je oblast za krkem plodu již viditelná a můžeme jí pomocí ultrazvuku změřit. Tento prostor je zvětšen u plodů s chromosomálními aberacemi z důvodu zvýšeného množství tekutiny, díky ještě nevyvinutému lymfatickému systému plodu (Maymon et al. 2000). Druhým sledovaným markerem při ultrazvukovém screeningu je stav nasální kůstky. Chybějící či zmenšená nasální kůstka je jedním markerů typických pro Downův syndrom (Singh et al. 2021).

### **1.1.2.3. Volná DNA**

V lidské krvi se běžně nachází takzvaná volná DNA. Jedná se o DNA fragmenty cirkulující krevním řečištěm, které mohou pocházet z mnoha různých zdrojů. Hladina volné DNA (cfDNA) v krvi se mění v závislosti na fyziologickém stavu organismu. Obecně platí, že cfDNA se do krve dostává z buněk a tkání, které prochází nějakým degenerativním procesem, či mají přirozeně vyšší buněčný obrat (Goldwasser a Klugman 2018). Mezi události, jež zvyšují hladinu cfDNA v krvi patří: onkologická onemocnění, těhotenství, transplantace, fyziologická odpověď na cvičení, ale i patologické procesy jako zánět, cukrovka, poranění tkáně, sepse a infarkt myokardu (Kustanovich et al. 2019). Běžná koncentrace cfDNA v krvi u zdravého jedince se pohybuje mezi 0 až 100 ng/ml a u pacientů s rakovinou může dosahovat hodnot přes 1000 ng/ml (Schwarzenbach et al. 2011). Díky uvolňování DNA z placenty do krevního řečiště matky, jsme schopni získat

potřebné informace o DNA plodu z krve matky, bez invazivního zásahu do prostoru dělohy. Nutno ale podotknout, že plod a placenta mohou nést odlišnou genetickou informaci, kvůli placentárnímu mozaicismu. Tento faktor snižuje přesnost odhadu genetické informace plodu (Goldwaser a Klugman 2018). Hladina cfDNA plodu se postupně během těhotenství zvyšuje a rapidní nárůst koncentrace můžeme zaznamenat po 20 týdnech těhotenství (Wang et al. 2013). Růst této koncentrace sledovali v roce 1998 Lo a kolektiv a sestavili tak nomogram sledující koncentraci cfDNA plodu v mateřském séru (Lo et al. 1998). V roce 2011 se tyto objevy začaly používat v klinické praxi jako metoda neinvazivního prenatalního screeningu (Goldwaser a Klugman 2018).

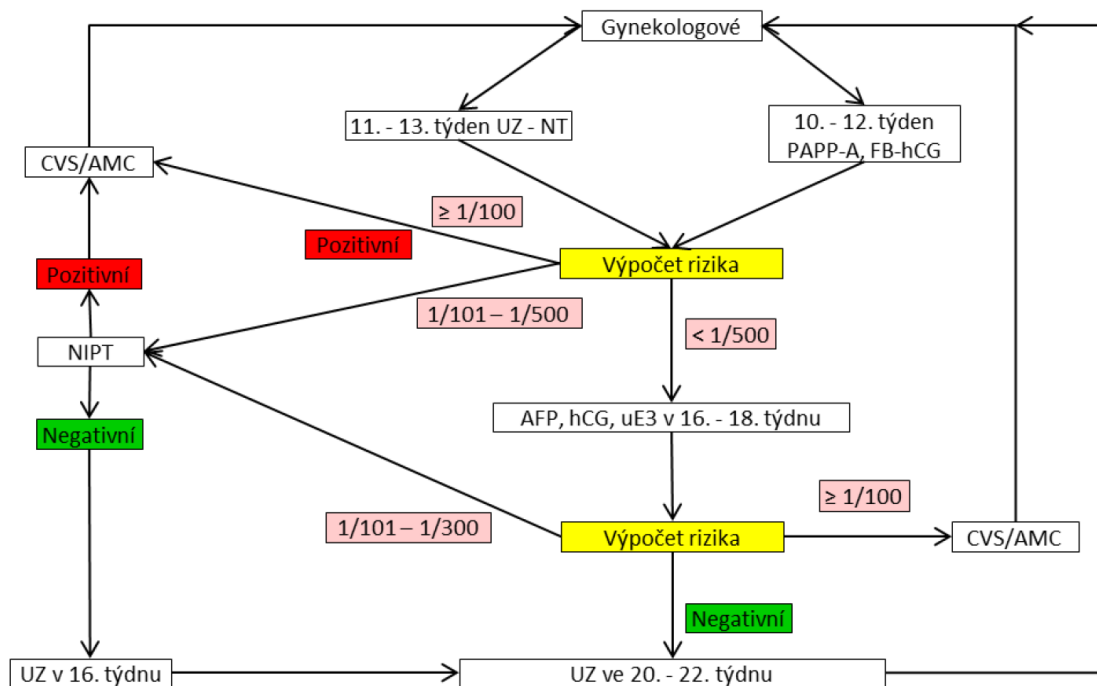
Neinvazivní prenatalní testování (NIPT) je tedy dnes již běžnou metodou užívanou při genetickém screeningu. NIPT můžeme použít pro testování nejčastějších trisomií, abnormality pohlavních chromosomů, vzácných trisomií, mikrodeleci, mikroduplikací, krevních skupin, a dokonce i některých monogenních onemocnění (Suciu et al. 2019). Mezi hlavní metody, které se využívají pro analýzu volné DNA je masivně paralelní shotgun sekvenování (MPSS). MPSS analyzuje miliony fragmentů volné DNA, jak fragmenty matky, tak fragmenty plodu. Tyto fragmenty jsou následně identifikovány určením jejich chromosomálního původu. Posledním krokem je kvantifikace fragmentů a zjištění počtu fragmentů. Trisomické chromosomy budou zastoupeny více fragmenty, než je očekáváno u euploidních těhotenství. Touto metodou analyzujeme celý genom (Chitty a Lo 2015). Také je možné za použití NGS detekovat chromosomové abnormality analýzou alelického poměru vybraných lokusů, které jsou rozlišovány díky jedno nukleotidovým polymorfismům (SNP). V tomto případě hrají roli geny, které mají matka a plod odlišné a dají se tak rozlišit. Díky tomu jsme schopni určit výsledný poměr chromosomů a odhalit tak případné aneuploidie (Hixson et al. 2015). Dalším užívaným způsobem pro analýzu volné DNA je selektivní sekvenování chromosomů. Použitím této metody sekvenujeme pouze specifické regiony chromosomů 21, 18, 13, X a Y. Oproti MPSS je zde výhoda nižší ceny za rizika vyššího selhání (Mersy et al. 2013). Multiplexy PCR umožňují analýzu SNP a rozlišení mezi maternální a fetální frakcí, což se využívá jako samostatná metoda nebo v kombinaci se selektivní sekvenací chromosomů (Gil et al. 2019). Dále také microarray kvantifikace může být užita jako alternativa k selektivnímu sekvenování chromosomů, odstraňující risk kontaminace PCR a variabilitu výsledků (Stokowski et al. 2015). Poslední používanou metodou pro analýzu volné DNA je dPCR,



kteřá je schopna detekovat trisomie, přítomnost chromosomu Y a krevní skupiny (O'Brien et al. 2020). Zatím je ale stále nejvyužívanější metodou pro NIPT masivně paralelní sekvenování (Carbone et al. 2020). Senzitivita odhalení nejčastějších trisomií pomocí NIPT je podle meta-studie Taylora Phillipse 96 % pro trisomii 21. chromosomu, 87 % pro trisomii 18. chromosomu a 77 % pro trisomii 13. chromosomu (Taylor-Phillips et al. 2016). Abnormality týkající se pohlavních chromosomů mají následující míry detekce: monosomie X 89 %, 2 chromosomy Y, Klinefelterův syndrom a 3 chromosomy X od 82 % do 90 % (Mennuti et al. 2015).

### **1.1.3. Doporučené postupy prenatalní diagnostiky v ČR**

Prenatalní diagnostiku mohou provádět pouze akreditované laboratoře pomocí akreditovaných metod dle ČSN EN ISO 15189 dle ustanovení §28-29 zákona 373/2011 Sb. v platném znění. K prenatalnímu vyšetření se přistupuje tehdy, je-li přítomna nějaká indikace. Základním vyšetřením je kombinovaný test dvou biomarkerů PAPP-A a  $\beta$ -hCG v 10. – 12. týdnu společně s ultrazvukovým vyšetřením plodu v 11. – 13. týdnu. Výsledkem tohoto testu je individuální riziko trisomií chromosomů 13, 18 a 21. Pokud je kombinované riziko některé z trisomií vyšší nebo rovné 1/100 nebo je zjištěn pozitivní ultrazvukový nález, je indikován invazivní odběr a získaný materiál je pak podroben kaskádovému genetickému vyšetření. NIPT je indikováno při riziku pohybujícím se mezi 1/101 až 1/500 a při negativním ultrazvukovém nálezu. Pozitivní nález NIPT musí být dále potvrzen přímým vyšetřením tkání plodu získaných invazivní metodou. Dále může být NIPT indikováno podle výsledků prenatalního integrovaného testu, sérum integrovaného testu, případně i testu ve druhém trimestru při riziku v rozmezí 1/101 – 1/300 s negativním ultrazvukovým nálezem. Tento postup je znázorněn v Obrázku 1. (Společnost lékařské genetiky a genomiky 2018).



**Obrázek 1:** Indikační schéma genetické prenatalní péče. Šipky znázorňují postup jednotlivých kroků. Růžová pole ukazují vypočtená rizika z předcházejících vyšetření. UZ = ultrazvuk, NT = nuchální translucence, CVS = odběr chorionových klků, AMC = Amniocentéza, NIPT = Neinvazivní prenatalní test, převzato z (Společnost lékařské genetiky a genomiky 2018).

## 1.2. Aneuploidie

Aneuploidie je situace, při níž má jedinec jiný než standardní počet chromosomů.

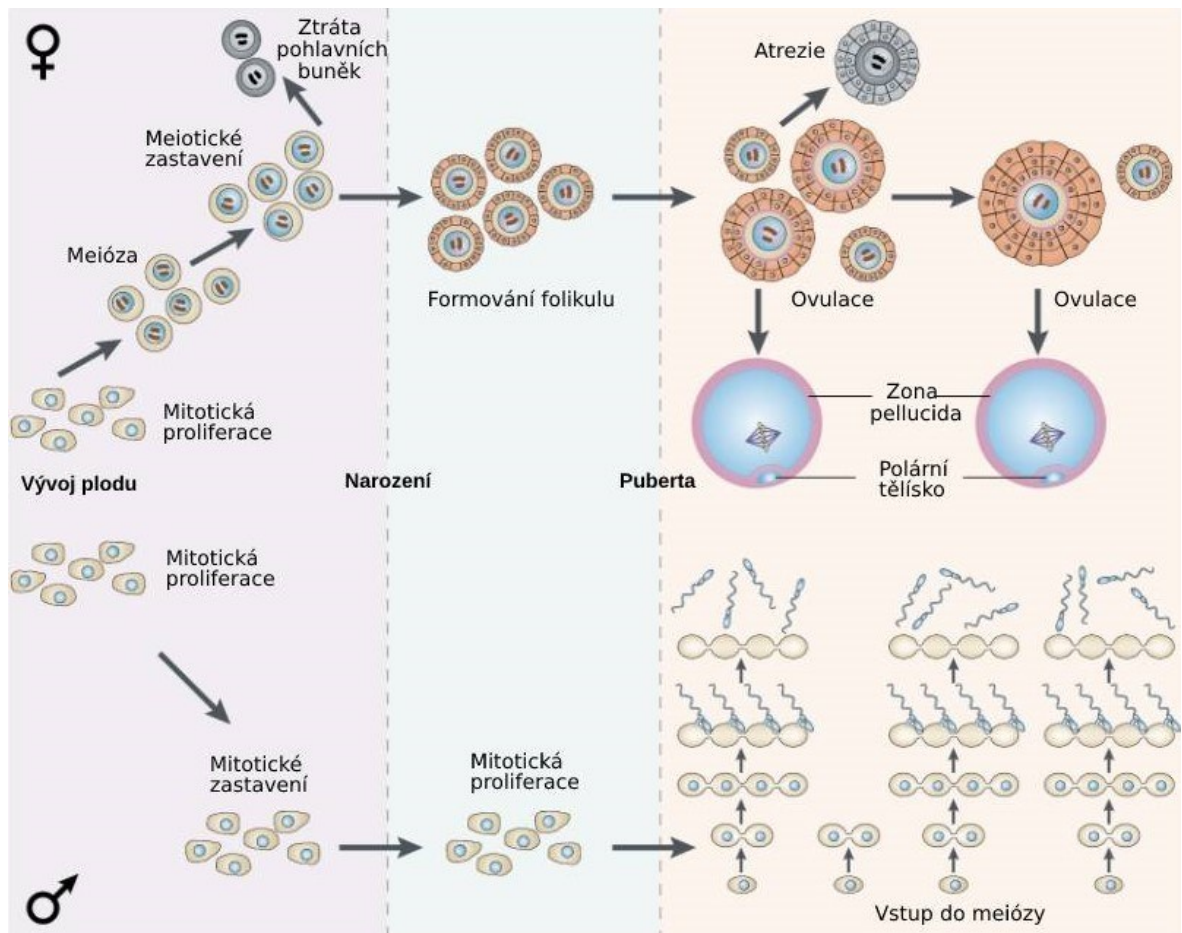
Nejčastějšími odchylkami od standardního počtu jsou monosomie, kdy má jedinec pouze jeden chromosom a trisomie, kdy má naopak 3 homologní chromosomy (Dashe 2016).

U člověka je aneuploidie velice častým jevem, oproti dalším organismům. 10 – 30 % všech oplozených lidských vajíček má patologický počet chromosomů. Aneuploidie tak stojí za přibližně třetinou všech potratů (Hassold a Hunt 2001). Přibližně 0,4 % porodů, ať už se jedná o živě či mrtvě narozené, je postiženo chromosomálními aberacemi. V 50 % se jedná o trisomii chromosomu 21, v 15 % o trisomii chromosomu 18 a v 5 % o trisomii chromosomu 13. Dalších 12 % připadá na aberace pohlavních chromosomů, ať jde o karyotypy 45, X; 47, XXX; 47, XXY a 47, XYY. Zbýlých 18 % zbývá na jiné aberace jako jsou strukturní přetavby, mosaicismy a polyploidie (Wellesley et al. 2012). Mnohem větší spektrum aneuploidií můžeme nalézt u spontánně potracených plodů. Aneuploidie je přítomna u přibližně 35 % plodů. U těchto plodů byly identifikovány trisomie skoro všech chromosomů. Nejčastější aneuploidií spontánně potracených plodů je monosomie chromosomu X, která je přítomna v přibližně v 10 % případů. Mezi nejčastější trisomie

patří v této kategorii trisomie 16., 21. a 22. chromosomu (Hassold a Hunt 2001). Na základě zmíněných incidencí aneuploidií se Hassold a Hunt domnívají, že přibližně 5 % všech lidských počtů nese aneuploidii. Dále ještě upozorňují, že skutečná frekvence aneuploidií může být vyšší, kvůli těhotenstvím, které zaniknou již během několika prvních týdnů. Přibližný odhad incidencí aneuploidií v těchto brzkých týdnech těhotenství můžeme získat ze studií na lidských preimplantačních embryích. Ve studii Jamiesona a kol. se ukázalo, že 19,1 % všech diploidních embryí neslo aneuploidii (Jamieson et al. 1994). Jiná studie Jacobse analyzovala přes 1000 oocytů získaných v centrech asistované reprodukce a přibližná hodnota aneuploidií se pohybovala od 20 do 25 % (Jacobs 1992). Celkově je tedy dost možné, že incidence lidské aneuploidie se pohybuje v rozmezí 5 a 25 %.

### **1.2.1. Princip vzniku aneuploidií**

Vznik aneuploidie je spjat s chybou meiózy. V průběhu meiózy při prvním meiotickém dělení segregují homologní chromosomy. Během druhého dělení dochází k oddělení sesterských chromatid. Pokud tedy nastane někde v těchto procesech chyba, může dojít k chybné segregaci chromosomů, která bude mít za následek aneuploidii. Přestože je základní schéma tohoto procesu stejné u obou pohlaví, tak u meiózy nalezneme důležité pohlavně specifické rozdíly. U mužů začíná meióza v pubertě a všechny důležité změny jsou sekvenční a postupně se buňky dostanou od profáze přes metafázi I do metafáze II bez výrazného zdržení. Zároveň každá buňka, která vstoupí do meiózy vyprodukuje 4 spermie. U žen všechny oocyty iniciují meiózu již během fetálního vývoje. Poté co homologní chromosomy podstoupí rekombinaci v profázi I. meiotického dělení se oocyty v dělení zastaví až do doby pohlavní dospělosti. Meióza pokračuje v momentě těsně před ovulací a následuje další zastavení v metafázi meiózy II. V tomto stádiu zůstává oocyt až do oplození, během něhož dokončí meiózu. Dalším rozdílem je také výsledný produkt meiózy, kdy na rozdíl od 4 spermií vznikne jen 1 funkční vajíčko a 2 až 3 pólová tělíska (Hassold a Hunt 2001). Vývoj pohlavních buněk je znázorněn v Obrázku 2.



**Obrázek 2:** Schéma vývoje pohlavních buněk. V horní polovině vidíme vývoj oocytů a v dolní vývoj spermii. Barevným pozadím jsou odlišeny etapy vývoje od vývoje plodu po narození, od narození po pubertu a od puberty dále do dospělosti. **Vývoj oocytů:** ve vaječniku plodu probíhá krátká fáze mitotické proliferace následována vstupem do meiotické profáze. V tomto období několik buněk spáchá apoptózu a tím redukuje počet vyvíjejících se oocytů. Před narozením všechny oocyty zastaví své dělení a v době porodu jsou již obklopeny somatickými buňkami dávajícími vznik primordiálnímu folikulu. Po pubertě jsou již primordiální folikuly stimulovány, aby vytvořily oocyt, který je každý měsíc ovulován. Několik oocytů může během této fáze odumřít. Tento proces pokračuje, dokud není vyčerpána zásoba oocytů nebo nenastoupí menopauza. **Vývoj spermii:** ve varlatech plodu probíhá krátká fáze mitotické proliferace následována mitotickým zastavením. Po narození obnoví buňky svoji mitotickou proliferaci. S nástupem pohlavní dospělosti začíná meiotické dělení buněk. Spermatogonie se dělí mitoticky a pouze jejich dceřiné buňky vstupují do meiόzy. Spermatogeneze probíhá po zbytek života muže. Během meiotického dělení jsou spermatocyty spojeny cytoplasmatickými mosty. V procesu spermiogeneze jsou tyto mosty ztraceny a dále je sbalen chromatin, redukováno množství cytoplasmy a zahájen vývoj bičíku. Upraveno podle (Hassold a Hunt 2001)

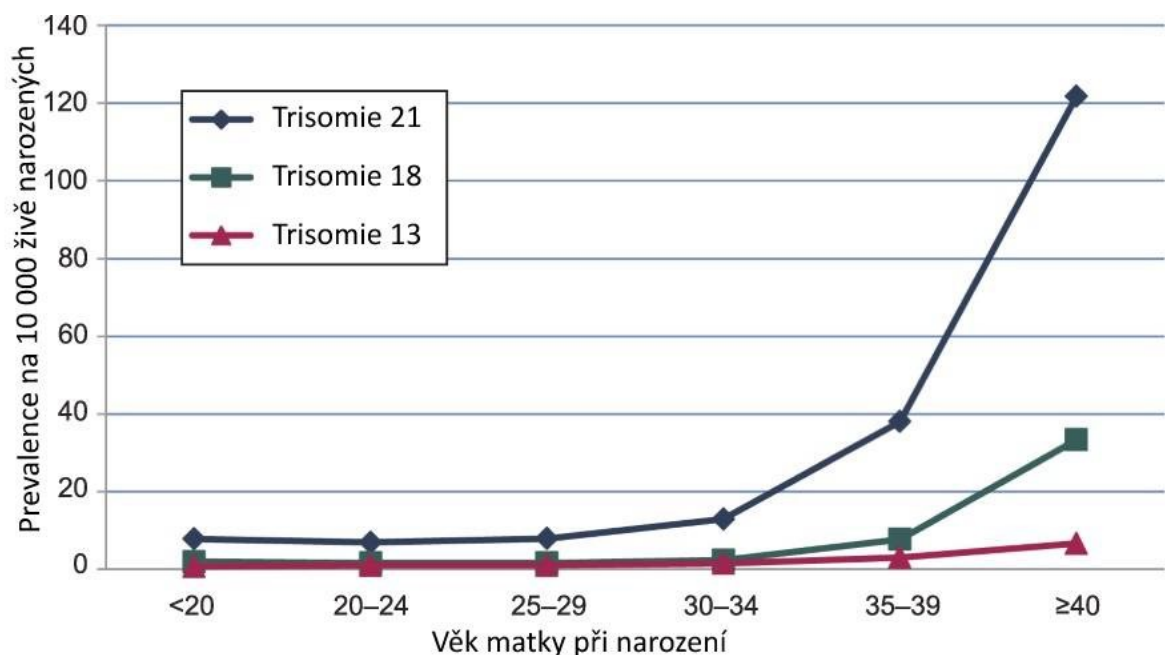
### 1.2.2. Aneuploidie oocytů

Aneuploidie oocytů je poměrně častým jevem. S aneuploidií oocytů se setkáme přibližně v 15–25 % u žen ve věku 30–33 let. U žen přes 40 let je tento poměr značně vysoký přesahující 50 %. Je zde tedy možné sledovat trend přímě úměry věku a procenta aneuploidií oocytů (Webster a Schuh 2017). Aneuploidie oocytů může vznikat dvěma způsoby. Prvním způsobem je nondisjunkce, kdy nedojde k oddělení homologního chromosomu či sesterské chromatidy. Druhým způsobem je předčasný rozchod sesterských chromatid, během něhož se sesterské chromatidy oddělí jedna od druhé, aby nezávisle segregovaly během anafáze I (Webster a Schuh 2017). Četnosti chyb segregace pro meiózu I a meiózu II jsou si podobné, ale někdy se ukazuje, že pro meiózu II jsou hodnoty vyšší. Vysvětlením tohoto jevu může být fakt, že chyby vzniklé během první meiózy se projeví až v meióze druhé. Dalším zajímavým poznatkem je, že předčasný rozchod sesterských chromatid během první meiózy může být ještě napraven balancující chybou v meióze druhé. Pokud mají první i druhá polární tělíska reciproké chyby, tak výsledný oocyt má správný počet chromosomů (Handyside et al. 2012). Genomová analýza polárních tělísek navíc odhalila další alternativní způsob segregace označovaný jako reverzní segregace. Během reverzní segregace dojde k oddělení sesterských chromatid v meióze I. I po meióze I zůstanou rozpojeny, a to může způsobit problémy během metafáze II při připojování k dělicímu vřetenku. Zajímavostí reverzní segregace je, že ve výsledku je zachován správný počet chromosomů a chromatidové páry mají různý rodičovský původ a jsou heterozygotní ve svých centromerách. Ve studii, která tento jev zkoumala, měly všechny dárkyně, ve věku 33 až 41 let, minimálně jeden oocyt, který podstoupil reverzní segregaci (Ottolini et al. 2015). Na druhou stranu v jiné studii, kde byly zkoumány oocyty mladších dárekyně ve věku od 25 do 35 let, nebyly nalezeny žádné oocyty s reverzní segregací (Hou et al. 2013).

#### 1.2.2.1. Na věku závislé příčiny aneuploidie

Věk je jedním z faktorů majících vliv na kvalitu oocytů ženy a tím pádem i na schopnost úspěšně otěhotnět a porodit. Mnohé studie potvrdily, že incidence aneuploidie je vyšší u starších žen, jak se můžeme přesvědčit na Obrázku 3. U žen starších 43 let je údajně již 60 % oocytů postiženo aneuploidií (Kuliev et al. 2011). Jako jednou z příčin vzniku aneuploidie, jež se ve vyšším věku ženy objevují častěji, jsou strukturní defekty bivalentů. Integrita bivalentů je důležitým faktorem pro úspěšnou segregaci chromosomů. Pokud

dojde k velkému oddálení sesterských kinetochorů, může dojít ke konfliktnímu a často i nesprávnému připojení kinetochorů k meiotickému dělicímu vřeténku (Patel et al. 2015). Předčasný rozchod chromatid, jež vede ke vzniku aneuploidii, může být podpořen činností anafázi podporujícího komplexu s navázaným cyklinem (APC/C), který degraduje protein sekurin. Role sekurinu je chránit před degradací kohezin. Naopak protein, který podporuje degradaci kohezinu je separin. Tyto proteiny nepřímo ovládají míru koheze chromatid skrze koncentraci kohezinu (Nabti et al. 2017). Pro meiózu specifické kohezinové komplexy hrají klíčovou roli v udržování spojení mezi sesterskými chromatidami, meiotické rekombinaci a kohezi centromer (Ishiguro 2019). Pokles hladiny kohezinu tak vede k oddálení chromatid či chromosomů. Pro aktivaci APC/C je ještě důležité umlčení proteinů kontrolního bodu sestrogení dělicího vřeténka (SAC), které nastane při správném navázání chromosomů v metafázi. Při nedostatku proteinů SAC může tak dojít k aktivaci APC/C bez správného navázání chromosomů (Nabti et al. 2017).



**Obrázek 3:** Graf ukazující růst výskytu nejčastějších trisomií s ohledem na věk matky v době porodu. Upraveno podle (Dashe 2016).

Další příčina aneuploidie, jejíž pravděpodobnost stoupá s věkem, je častější rozdělení bivalentů do jednotlivých chromosomů. Takto oddělené chromosomy můžeme nazývat univalenty. Pár univalentů je schopen segregovat nekoordinovaně a tím přispět ke vzniku aneuploidie (Sakakibara et al. 2015). V lidských oocytech s narůstajícím věkem ženy klesá míra koheze sesterských chromatid. Díky tomu se mohou kinetochory oddálit až na

vzdálenost 2 um, což může vést k narušení funkčnosti a následnému připojení k dělicímu vřeténku. Oocyty s oddělenými kinetochory mají tendenci vytvářet více merotelických připojení k mikrotubulům dělicího vřeténka (Zielinska et al. 2015). Pokud dojde k extrémnímu oddálení sesterských kinetochorů, začnou bivalenty vytvářet nepravděpodobná spojení s dělicím vřeténkem. Pro tyto bivalenty se přijalo označení invertované bivalenty. Invertované bivalenty jsou otočeny k ose dělicího vřeténka, takže sesterské chromatidy homologních chromosomů jsou špatně orientovány a váží mikrotubuly z protějších pólů dělicích vřetének místo, aby obě směřovaly k pólu jednomu (Zielinska et al. 2015).

Dále se také můžeme setkat s jevem, kdy jeden pár sesterských chromatid je navázán ve správné orientaci, ale druhý pár nikoliv. Tento jev je nazýván jako napůl invertované bivalenty. Výskyt plně invertovaných bivalentů může vést k reverzní segregaci. Dále se také mohou otáčet okolo své osy, kvůli rotaci homologních chromosomů a tím vytvářet další tlak na již oslabenou kohezi (Zielinska et al. 2015). Na věku závislý pokles koheze nemusíme pozorovat jen v okolí kinetochorů. Podobně jako kinetochory je ovlivněno i spojení mezi homologními chromosomy, které jsou v oocytech starších žen častěji v rámci bivalentu odděleny velkými mezerami, což může vést k předčasnému rozdělení na dva univalenty ještě před anafází I (Sakakibara et al. 2015). S univalenty se setkáme v přibližně v 40 % oocytů u žen starších 35 let. Na druhou stranu u žen ve věkovém rozmezí mezi 30 a 35 lety najdeme univalenty pouze v 10 % oocytů (Zielinska et al. 2015). Univalenty se mohou také připojit k prvnímu meiotickému dělicímu vřeténku tak, že sesterské kinetochory směřují k rozdílným pólům dělicího vřeténka (Sakakibara et al. 2015). Výsledkem tohoto napojení může být reverzní segregace, kdy máme správný počet chromosomů v oocytu i polárním tělísku, ale s rozdílným rodičovským původem (Ottolini et al. 2015). Takto rozdělené sesterské chromatidy se ale nemohou správně napojit k dělicímu vřeténku během metafáze II (Webster a Schuh 2017). Přesný molekulární mechanismus, který stojí u lidí za touto věkovou závislostí, není zatím znám. U myši se ale ukazuje, že hlavním důvodem na věku závislé aneuploidie je úbytek kohezinu (Hodges et al. 2005). Důležitou komponentou pro meiózu oocytů je kleisinová podjednotka rekombinačního proteinu (Rec8), která je s koheziny Smc3/Smc1 $\alpha$  a Smc3/Smc1 $\beta$  součástí komplexu zajišťující kohezi. Kohezinové komplexy společně s Rec8 jsou v myších oocytech přítomny již během replikace DNA v brzkých stádiích meiózy. Tyto komplexy

jsou pak doplněny pouze po oplození (Burkhardt et al. 2016). Vzhledem k tomuto faktu musí zůstat po celou dobu meiotického arestu na místě. Hladina Rec8 se ale u starších myší postupně snižovala. Pokud hladina Rec8 klesla tak, že již nebylo možno Rec8 detekovat mikroskopicky, došlo k velkému nárůstu segregačních chyb v oocytech (Chiang et al. 2010). Podobný pokles koncentrace byl pozorován i u pericentromerického proteinu shugoshinu 2 (Sgo2) (Lister et al. 2010). Kvůli tomu bychom se mohli domnívat, že proximální koheziny nejsou chráněné před štěpením separásou během meiózy I (Yun et al. 2014). Tyto poznatky z myších modelů by mohly být dobrým vodítkem pro nalezení podobných procesů u člověka.

Vzhledem k velkému množství dynamických událostí, které probíhají během růstu oocyty a jeho meiózy je zde potřeba dostatek energie. Hlavním zdrojem energie v buňce je molekula adenosin trifosfátu (ATP) vyráběná v mitochondriích, proto je důležité, aby bylo těchto molekul v buňce dostatek. Problém může nastat ve starších oocytech, u kterých se ukázalo, že mitochondriální membránový potenciál se zvyšujícím věkem značně klesá, což může vést k nižší produkci ATP (Wilding et al. 2001). Důsledky tohoto jevu nekončí u oocyty, vzhledem k tomu, že mitochondrie oocyty jsou hlavním původcem mitochondrií embrya, může snížená mitochondriální produkce ATP negativně ovlivnit vývoj embrya (Barbehenn et al. 1974). Při porovnání mladších a starších oocytů se ukázalo, že starší oocyty mají snížený počet, jak mitochondrií, tak počet kopií mitochondriální DNA oproti mladším oocytům (Babayev et al. 2016). Nižší počet kopií mitochondriální DNA ovlivňuje i úspěšnost oplození. Oocyty s nižším počtem kopií mají menší šanci na oplození (Reynier et al. 2001).

Nedávné objevy ukázaly i na souvislost stravy a chování chromosomů v meióze. U myší s vysokým příjmem tuků v potravě se zvýšila frekvence vzniku univalentů v meióze I a předčasné segregace sesterských chromatid v meióze II (Yun et al. 2019). Tento náález naznačuje, že u myší s vysokým příjmem tuku v potravě se zrychluje úbytek kohezinu (Ma et al. 2020). I výskyt metabolických chorob např. diabetu může indukovat aneuploidii, ale i narušovat funkci mitochondrií (Wang et al. 2009).

Další faktor, který by mohl hrát roli při vzniku aneuploidie, je acetylace proteinů. Během studie na myších oocytech, které byly vystaveny deacetylačnímu inhibitoru trichostatinu A, se objevil zvýšený výskyt oocytů s aberantní chromosomální přestavbou a zygot s aneuploidii. Starší myší oocyty ukazují vyšší míru acetylovaných histonů, což může



být klíčovou spojitostí mezi acetylací a stárnutím oocytů (Akiyama et al. 2006). Dalšími důkazy o vlivu acetylace proteinů na aneuploidii oocytů jsou následující poznatky. Koncentrace nikotinamid adenin dinuklotid-dependentní proteinové deacetylázy (SIRT1) a histonové deacetylázy 3 (HDAC3) je výrazně snížena u starších myších oocytů v porovnání s mladšími (Di Emidio et al. 2014; He et al. 2019). Pokud by aktivita SIRT1 byla obnovena jeho aktivátorem nebo kompenzována jeho zvýšenou expresí v již dospělých a starých oocytech, věkem způsobené defekty dělicího vřetenka by mohly být opraveny (Wu et al. 2019). Dále také vyřazení proteinové deacetylázy SIRT2 vede ke zvýšení výskytu aneuploidie u oocytů. (Zhang et al. 2014). Dalšími proteiny, u nichž byla nalezena korelace s maternálním věkem jsou protein 1 spjatý s pučením neinhibovaným benzimidazolem (BUBR1) a tubulin. Při zvýšené expresi jejich neacetylovatelné varianty docházelo k částečným obnovám meiotických defektů u starších oocytů (Qiu et al. 2018; He et al. 2019). Tyto poznatky nasvědčují, že proteinová deacetylace během maturace oocytů je klíčová v udržování chromosomové stability a snížení aktivity deacetyláz ve starých oocytech může být jedna z příčin aneuploidie oocytů (Ma et al. 2020).

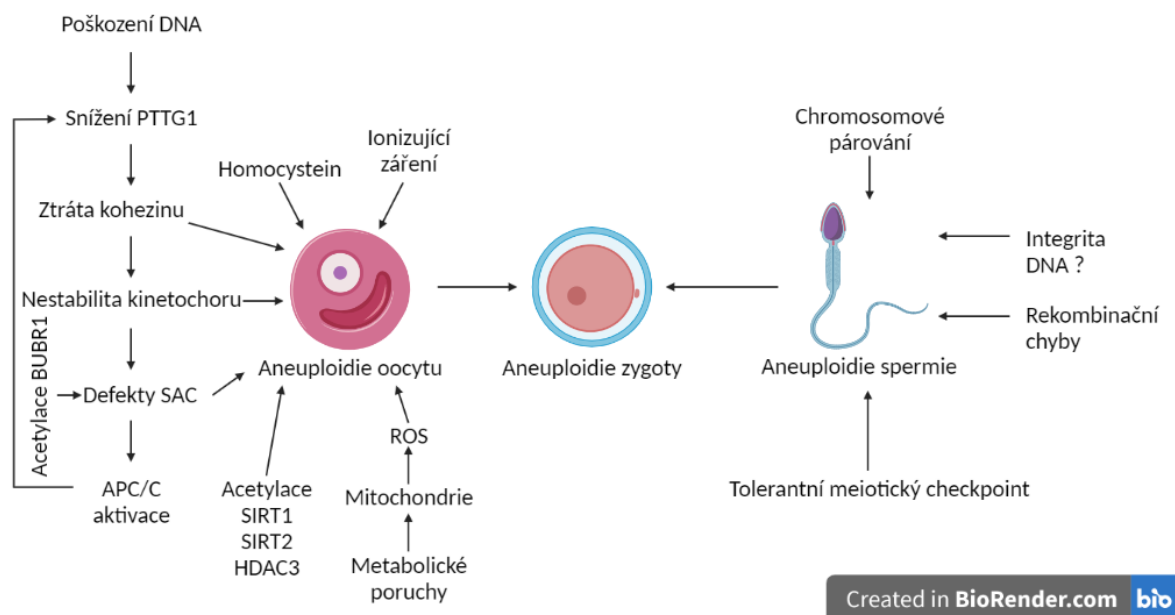
Dlouhodobý arrest oocytů je spjat s vyšším rizikem nahromadění poškození DNA. Existují důkazy, které poukazují na značný nárůst de novo mutací u pohlavních buněk starších žen (Wong et al. 2016). Důvodem vzniku těchto mutací mohou být dvouřetězcové zlomy DNA, které můžeme nalézt v plně narostlých oocytech (Goldmann et al. 2021). Stále nám ale chybí přímé důkazy o vlivu dvouřetězcových zlomů na chybnou segregaci chromosomů během meiózy (Ma et al. 2020). Exogenní dvouřetězcové zlomy jsou schopné u plně vyvinutých oocytů indukovat aneuploidizaci. Zároveň starší oocyty snášejí tyto zlomy hůře a mají častěji špatně přiřazené chromosomy. Oocyty jsou i schopny se se zlomem vypořádat a pokračovat do meiózy II a podstoupit oplodnění (Marangos et al. 2015). Otázkou stále zůstává, jestli endogenní zlomy nahromaděné v oocytech mohou přispívat k vyššímu riziku aneuploidizace oocytů (Ma et al. 2020). Dále jsou zde podklady indikující, že délka telomer je nižší u oocytů a embryí s aneuploidiemi (Treff et al. 2011). Telomery jsou samozřejmě kratší u starších oocytů (Ge et al. 2019). Zajímavým poznatkem je, že délka telomer u vyvinutých oocytů je kratší než u oocytů rostoucích (Turner a Hartshorne 2013). Jaká je ale role telomer v následné meióze a jak jsou telomery v oocytech zkracovány je teprve potřeba zjistit (Ma et al. 2020). Poškození DNA také

může snížit produkci proteinu sekurinu v somatických buňkách, který chrání kohezin před degradací (Hernández et al. 2008).

#### 1.2.2.2. Na věku nezávislé příčiny aneuploidie

S aneuploidií se můžeme setkat i u oocytů žen mladších 35 let. Některá vajíčka darovaná do center asistované reprodukce vykazují aneuploidie a pochází od žen mladších 35 let, zároveň se těmto ženám mohu narodit i jedinci s Downovým syndromem (Webster a Schuh 2017). Abychom dosáhli správné segregace chromosomů je potřeba, aby každý pár sesterských kinetochorů v bivalentu v meioze I byl připojen ke stejnému pólu dělicího vřeténka, kdežto homologní chromatidy v meioze II musí být připojeny k opačným pólům dělicího vřeténka (Kitajima et al. 2011). Pokud se některé kinetochory nepřipojí k dělicímu vřeténku, tak je dělení zastaveno v kontrolním bodě formování dělicího vřeténka. Tato kontrola zajišťuje, aby byly napojeny všechny kinetochory k mikrotubulům vřeténka a až poté se postoupilo do anafáze (Musacchio 2015). Nicméně je možné, aby buňka pokračovala dále do anafáze, přestože nejsou všechny kinetochory správně napojeny (Touati a Wassmann 2016). Důvodem této tolerance může být zvýšená aktivita cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) v komplexu s cyklinem B, který tak stabilizuje mikrotubulové připojení a tím deaktivuje pozastavení kontrolního bodu (Davydenko et al. 2013). Další příčinou aneuploidií může být dočasné vytváření multipolárních intermediátů dělicího vřeténka, jejichž výskyt koreluje s četností segregáčních chyb. V lidských oocytech chybí mikrotubuly organizující centra, a proto mikrotubuly nukleují od chromosomu či kinetochoru a následně vytváří dělicí vřeténko. Vřeténka jsou ale často nestabilní a mají tendenci se rozdělovat na několik pólů. Tyto dočasná multipolární stádia podporují vznik merotelického spojení, které nastane, pokud je kinetochor napojen na několik pólů dělicího vřeténka. Merotelické chromosomy jsou častým jevem a mohou vznikat během reorganizace přechodných multipolárních vřetének (Holubcová et al. 2015). Merotelické připojení může být i upřednostňováno speciálním uspořádáním sesterských kinetochorů lidských oocytů, které jsou často od sebe vzdáleny i v oocytech mladých žen (Sakakibara et al. 2015; Zielinska et al. 2015). Oddělené kinetochory pravděpodobně zvyšují šanci abnormálního připojení mikrotubulů. Běžně v bivalentu vytváří pár kinetochorů jedno spojení s mikrotubuly, pokud ale dojde k oddálení kinetochorů jsou tyto páry rozděleny a kinetochory se začnou chovat jako samostatné jednotky. Pro správné napojení takto oddálených kinetochorů k dělicímu vřeténku je potřeba rozsáhlá oprava

chyb a reorganizace dělicího vřeténka (Webster a Schuh 2017). V neposlední řadě má na aneuploidie vliv umístění crossing-overů. Jejich nevhodné umístění má za následek oslabení asociací mezi chromosomy v bivalentu, což je dělá náchylné k chybám segregace (Hunter 2015). Umístění míst crossing-overu se liší jak mezi druhy, tak i mezi pohlavími. Ženské chromosomy mají větší počet těchto míst oproti chromosomům mužským (Gruhn et al. 2016). Pokud se místa crossing-overu nacházejí poblíž telomer, kvůli sníženému množství kohesinu se mohou spojit homologní chromosomy. Zatímco pokud se místa crossing-overu nacházejí v centromerách, tak mohou kompenzovat kohezi sesterských chromatid nebo zabránit odstranění kohesinu, což způsobuje non-disjunkci (Oliver et al. 2012). Pokud se dvě místa crossing-overu nacházejí blízko sebe, snižují tak kohezi homologních chromosomů. Zároveň některé studie ukazují, že vzájemné bránění crossing-overů mělo za následek větší vzdálenost mezi místy crossing-overu, než bylo očekáváno náhodně (Gruhn et al. 2016). Další faktory, které mají vliv na vznik aneuploidií jsou ionizační záření, zvýšená hladina homocysteinu a obezita (Ma et al. 2020). Přehled příčin vzniku aneuploidií je znázorněn v Obrázku 4.



**Obrázek 4:** Přehled příčin vzniků aneuploidií. Šipky znázorňují vliv daného faktoru. DNA = deoxyribonukleotidová kyselina, PTTG1 = sekurin, BUBR1 = protein 1 spjatý s pučením neinhibivaným benzimidazolem, SAC = kontrolní bod sestrojení dělicího vřeténka, APC/C = anafázi podporující komplex s navázaným cyklinem, SIRT = nikotinamid adenin dinukleotid-dependentní deacetyláza sirtuin, HDAC = histonová deacetyláza, ROS = kyslíkové radikály. Vytvořeno v BioRender.com a upraveno podle (Ma et al. 2020).

### 1.2.3. Aneuploidie spermií

Na aneuploidii embrya se mohou samozřejmě podílet i mužské pohlavní buňky – spermie. Zdraví plodní muži s parametry spermatu odpovídajícím referenčním standardům stanovených Světovou zdravotnickou organizací (WHO) mají přibližně 3-5 % spermií vykazující aneuploidii (Lu et al. 2012). Mužští nositelé strukturních chromosomových přestaveb a aneuploidií pohlavních chromosomů mají zvýšené riziko produkce aneuploidní spermie. Mezi další skupiny mužů, kteří mají vyšší incidence aneuploidních spermií patří: neplodní muži (mající oligozoospermie, neobstruktivní azoospermie a teratozoospermie) se zdravým karyotypem; muži z párů, ve kterých opakovaně docházelo k selhání oplození; muži z párů, u kterých bylo předchozí těhotenství aneuploidní; muži podstupující chemoterapeutickou nebo radioterapeutickou léčbu (Rodrigo et al. 2019). Množství aneuploidních spermií je přímo úměrné riziku potratu a nepřímo úměrné šanci na úspěšné početí (Rodrigo 2020). Při porovnání mužů s normálními hladinami aneuploidních spermií s muži se zvýšenou hladinou se ukázalo, že obě skupiny mají podobné šance na úspěšnou reprodukci. Nicméně při reprodukci mužů s vyšším počtem aneuploidních spermií byla zaznamenána nižší úspěšnost početí a vyšší procento potratů (Rubio et al. 2009). Tito muži mají 2,6 krát sníženou šanci pro dosažení těhotenství, 0,4 krát zvýšenou šanci samovolného potratu a 3,7 krát sníženou šanci pro narození živého dítěte (Rodrigo et al. 2019). Zároveň záleží i na typu abnormality daných spermií. Spermie s aneuploidií pohlavního chromosomu jsou častěji asociovány s aneuploidiemi embrya, které jsou kompatibilní se životem, kdežto diploidní spermie jsou asociovány s vyšším rizikem vzniku triploidního embrya, které je většinou potraceno (Rodrigo et al. 2010).

#### 1.2.3.1. Příčiny vzniku aneuploidie spermií

Mezi události, které přispívají vzniku aneuploidií u spermií, patří poruchy chromosomového párování, rekombinační chyby a defekty případného meiotického kontrolního bodu zabraňující aneuploidním spermiím dokončit meiózu. Podkladem pro poslední poznatek byla studie sledující frekvenci aneuploidních spermií u pacientů s karyotypy 47, XXY a 47, XYY. Očekávaná hladina aneuploidních spermií se pohybovala okolo 50 %, ale výsledné hodnoty se pohybovaly od 1 % k 25 % se současným snížením počtu spermií (Harton a Tempest 2012). Tento poznatek nasvědčuje o výskytu mechanismu, který má vysokou míru tolerance, ale snižuje výskyt spermií s aneuploidiemi a přispívá tak k snížení celkovému počtu spermií (Ioannou et al. 2018).

Další faktor, který by mohl mít vliv na výskyt aneuploidie spermií je integrita DNA. Rodrigo shrnul výsledky z několika studií, které porovnávaly míru fragmentace DNA s frekvencí výskytu aneuploidních spermií. U studií zabývajících se porovnáním tohoto vztahu na celém vzorku spermatu se u 2 studií prokázal zřejmý vztah mezi těmito dvěma parametry, další 2 studie žádný vztah mezi sledovanými parametry nepotvrdily. Jiné 2 studie zase sledovaly DNA fragmentaci u nositelů translokací a inverzí, kde míra fragmentace byla skutečně větší u nositelů těchto přestaveb, ale nebyl pozorován žádný nárůst výskytu nebalancovaných přestaveb u gamet. Studie, které se zabývaly jednotlivými spermiemi ukázaly, že velká část aneuploidních spermatozoí má vysoký poměr fragmentované DNA (Rodrigo 2020).

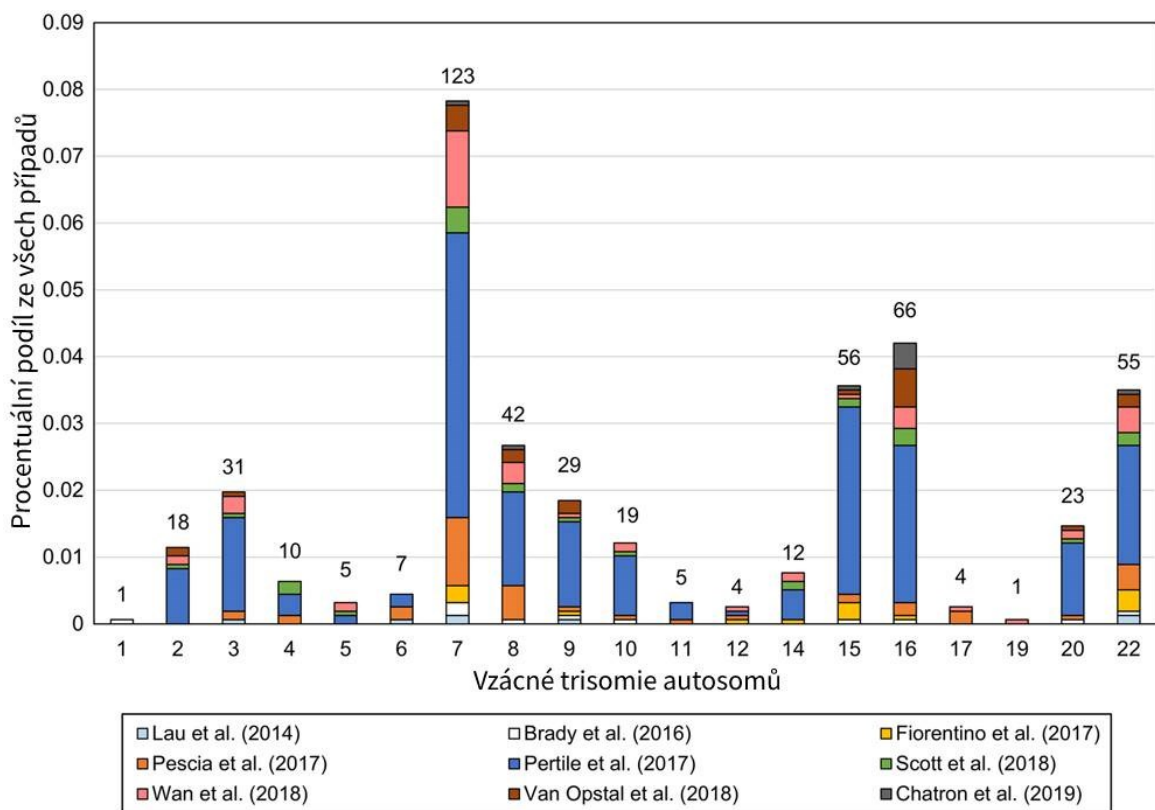
#### 1.2.4. Klinické projevy aneuploidie

Důsledky abnormálního karyotypu embrya se mohou projevit již během těhotenství a vést tak k potratu. Aneuploidie společně s polyploidii jsou nejčastější příčinou potratů. 96 % spontánních abortů v prvním trimestru je způsobeno právě aneuploidii a polyploidii. Aneuploidie chromosomů X, Y, 13, 16, 18, 21 a 22 jsou nejfrekventovanějšími aneuploidii nalezenými u vzorků choriových klků odebraných u spontánních abortů, jak je možno posoudit dle Tabulky 1 (Jia et al. 2015).

**Tabulka 1:** Četnost výskytu chromosomálních aberací u spontánních potratů. Upraveno podle (Jia et al. 2015)

Abnormality	Počet případů
<b>Aneuploidie</b>	310
Monosomie X	57
Monosomie 21	3
Monosomie 22	1
Trisomie 16	121
Trisomie 21	23
Trisomie 13	18
Trisomie 18	11
Trisomie 22	56
XXY	2
Trisomie X	2
Aneuploidie více než 1 chromosomu	16
<b>Polyploidie</b>	58

Závažnost klinických projevů u autosomální aneuploidie koreluje s genovou bohatostí postižených chromosomů. Proto jsou aneuploidie chromosomů, které jsou chudší na geny často spojené s mírnějšími klinickými projevy a bývají i slučitelné se životem (Kuhn et al. 1987). Projevy aneuploidii těchto chromosomů u narozených pacientů jsou charakterizovány jako níže popsané syndromy. Existují i případy, kdy jedinci s běžně letálními trisomiemi či monosomiemi jsou schopni se dožít porodu. Většina těchto pacientů má částečnou mosaikovou formu těchto aneuploidii a tím je zmírněna závažnost projevů (Shaw et al. 2020). V Obrázku 5 můžeme sledovat vzácné trisomie autosomů odhalené za pomoci neinvazivního prenatalního testování.



**Obrázek 5:** Graf prevalence vzácných chromosomálních trisomií identifikovaných v různých studiích. Nad jednotlivými sloupci je uveden celkový počet identifikovaných trisomií daného chromosomu. Celkem bylo vyšetřeno 157 159 pacientů. Upraveno podle (Shaw et al. 2020).

#### 1.2.4.1. Trisomie 21. chromosomu

Trisomie 21. chromosomu (T21) byla první popsanou chromosomovou abnormalitou u člověka (Lejeune et al. 1959). Fenotyp byl popsán Johnem Langdonem Downem již roku 1866 a do dnešních dní je tato choroba označována jako Downův syndrom (Langdon H. Down 1866). Obecná incidence syndromu je přibližně 1 na 700 narozených. Poměr

pacientů s Downovým syndromem je 1,2 mužů na 1 ženu. Příčinou Downova syndromu je z 95 % trisomie chromosomu 21 a z 5 % Robertsonovské translokace a mosaicismus (Gersen a Keagle 2013). Mezi příznaky Downova syndromu se řadí mentální retardace, malý vzrůst a hypotonie. Pacienti s Downovým syndromem mají dále tyto specifické kraniofaciální znaky: vzhůru zešikmené oční štěrbiny, epikantus, plochý kořen nosu, malá ústa, tlusté rty, velký jazyk, ploché záhlaví a malé a pokroucené uši. Další příznaky typické pro Downův syndrom nalezneme na končetinách. Jedná se o jednu palmární rýhu, oddálený palec u nohy, celkově malé ruce a nohy, klinodaktylii a brachydaktylii. Pacienti také trpí častými kardiovaskulárními anomáliemi srdce a mají zvýšené riziko leukémie. Jedinci s mozaikovou formou Downova syndromu mají mírnější projevy onemocnění (Jones et al. 2013; Gersen a Keagle 2013).

#### **1.2.4.2. Trisomie 18. chromosomu**

Trisomie chromosomu 18 byla poprvé popsána skupinou lékařů Johna Hiltona Edwardse v roce 1960 a syndrom, jež je s touto trisomií spjat, je proto pojmenován jako Edwardsův syndrom (Edwards et al. 1960). Incidence se pohybuje mezi 6 000 až 8 000 narozenými na 1 pacienta. Častěji bývají postiženy ženy oproti mužům. Poměr mužských a ženských pacientů je 1:3-4 (Gersen a Keagle 2013). Mezi symptomy patří mentální a růstová retardace, nejprve snížený a následně zvýšený svalový tonus. Kraniofaciálně se syndrom projevuje vyčnívajícím záhlavím, úzkým čelem, krátkými očními štěrbinami, malými ústy, úzkým patrem, nízko posazenými a malformovanými ušima a mikrognacií. Na končetinách můžeme pozorovat sevřené pěsti s překrývajícími se prsty, hypoplastické nehty, kolíbkovitý tvar nohou s krátkými palci. Dalšími projevy jsou časté anomálie kardiovaskulární soustavy, kýly, malá pánev a hrudní kost. Klinické projevy jsou natolik závažné, že medián dožití je 5 dní a méně než 10 % pacientů se dožije 1 roku života. Pacienti s mozaikovou formou mají mnohem lepší prognózu a jsou i evidovány případy s normální mírou inteligence a mírou dožití (Gersen a Keagle 2013; Rosa et al. 2013).

#### **1.2.4.3. Trisomie 13. chromosomu**

Trisomii chromosomu 13 poprvé popsala skupina genetika Klause Patau (Patau et al. 1960). Incidence je 1 na 12 000 narozených. Poměr pacientů dle pohlaví je lehce ve prospěch žen. Do projevů Patauova syndromu řadíme vady holoprosencefalického spektra, mentální a růstovou retardaci. Mezi kraniofaciální znaky patří: mikrocefalie, nadměrné fontanely, hemangiomy na čele, mikroftalmie, kyklopie, vady vlasů a rozštěpové vady rtu

a patra. Na končetinách můžeme nalézt polydaktylii a ohnuté prsty. Dalšími projevy jsou anomálie kardiovaskulární soustavy a polycystické ledviny. Medián dožití se pohybuje mezi 2,5 dne a 7 dny. Půl roku se přitom dožije 5 % jedinců. Podobně jako u předchozích syndromů se mosaikové varianty projevují mírněji (Gersen a Keagle 2013; Williams a Brady 2022).

#### **1.2.4.4. Aneuploidie pohlavních chromosomů**

Abnormální počty pohlavních chromosomů jsou jednou z nejběžnějších chromosomálních aneuploidií, se kterou se setkáme v přibližně v 1 z 500 případů živě narozených. Toto může být zapříčiněno i tím, že aneuploidie gonosomů mají méně závažné projevy na rozdíl od aneuploidií autosomálních a jsou tak více slučitelné se životem.

Turnerův syndrom byl poprvé popsán endokrinologem Henry Turnerem roku 1938 (Turner 1938). Poté o necelých 20 let později bylo odhaleno, že příčinou syndromu je monosomie chromosomu X u žen (Ford et al. 1959). Incidence se udává 1:2 000 (Gravholt et al. 2019). Postižené jsou pouze ženy. Do projevů Turnerova syndromu řadíme nižší porodní hmotnost (průměr 2800 g), s tím, že přibližně polovina pacientů vykazuje normální fenotyp. Obecně dosahují jedinci menšího věku, mají většinou průměrnou inteligenci se zvýšeným rizikem poruch učení. V novorozeneckém věku jsou často dívky diagnostikovány na základě charakteristického vzhledu. Mezi tyto charakteristické projevy patří pterygium colli a edémy horních a dolních končetin. Dále můžeme pozorovat časté vady srdce a cév, poruchy lymfatického systému, nevyvinuté vaječníky a neplodnost. Bez hormonální léčby je tak častá absence sekundárních pohlavních znaků (Gersen a Keagle 2013).

Trisomie chromosomu X byla poprvé popsána roku 1959 a jedná se o nejčastější aneuploidii pohlavních chromosomů týkající se přibližně 1 z 1000 narozených žen (Jacobs et al. 1959; Gersen a Keagle 2013). S touto aneuploidií není asociován žádný syndrom a klinické projevy bývají mírné či žádné. Ženy s tímto karyotypem mívají vyšší věk s průměrnou výškou 172 cm. Malé procento žen trpí ovariální dysfunkcí. Pouze asi u 10 % z celkového odhadovaného počtu žen s trisomií chromosomu X je aneuploidie diagnostikována (Tartaglia et al. 2010; Gersen a Keagle 2013).

Trisomie pohlavních chromosomů 47,XXY, která je příčinou Klinefelterova syndromu, se týká přibližně 1 z 500 – 1 000 narozených mužů. Syndrom je často rozpoznán až



v dospělosti a je tak diagnostikován později (Los a Ford 2022). Jedná se nejběžnější příčinu hypogonadismu a neplodnosti mužů. Projevuje se nadprůměrným vzrůstem postavy, větší délkou končetin. Mezi další projevy patří zmíněný hypogonadismus a je i častá gynekomastie. Takto postižení muži bývají neplodní a mají absenci spermiogeneze. Vyznačují se podprůměrnou inteligencí a mohou je postihovat poruchy učení a opožděný vývoj řeči (Gersen a Keagle 2013; Los a Ford 2022).

Další z trisomií pohlavních chromosomů 47,XYY můžeme najít u přibližně 1 z 800-1000 mužů. Tento genotyp se neprojevuje žádnými závažnými malformacemi a často se na něj nepříjde, zachyceno je údajně jen 12 % případů. Nositelé jsou většinou nadprůměrného vzrůstu s normální inteligencí a častějším výskytem poruch učení. Ve valné většině případů je zachována plodnost (Gersen a Keagle 2013).

### **1.3. Digitální PCR**

#### **1.3.1. Historie a vývoj digitální polymerázové řetězové reakce**

Základním kamenem pro dPCR se stala metoda limitního rozředění. Principem této metody je rozdělení sledovaného roztoku do malých kompartmentů tak, aby se v daném kompartmentu vyskytovala jedna nebo žádná molekula zájmu (McCrary 1915). V roce 1986 přišel Mullis a kol. s první PCR reakcí, která umožňovala exponenciální namnožení konkrétní sekvence DNA určené dvěma primery (Mullis et al. 1986). Značnou nevýhodou, ale bylo, že při každém denaturačním kroku došlo i ke zničení polymerázy. Tento problém vyřešilo využití termostabilní polymerázy z bakterie *Thermophilus aquaticus*, jež byla schopná vydržet teplotu 94 °C bez zničení (Saiki et al. 1988). Tento krok umožnil automatizaci a vznik prvních PCR cyklierů (Bartlett a Stirling 2003). Produktem PCR reakce byly amplifikované úseky DNA, které mohly být po konci PCR analyzovány pomocí různých metod například metodou Southern Blot (Schiffman et al. 1991). Poprvé v roce 1990 byla metoda limitní diluce spojena s PCR. Tímto způsobem byl určen počet provirových molekul viru HIV a o rok později kvantifikovány leukemické buňky při akutní lymfoblastické leukémii (Simmonds et al. 1990; Brisco et al. 1991). První použití této metodiky pro kvantifikaci cílových molekul DNA nastalo v roce 1992, kdy Sykes a kol. určili množství DNA genu kódující těžký řetězec imunoglobulinu u leukemických klonů (Sykes et al. 1992). V roce 1993 přichází další významný objev v oblasti PCR a to vynalezení metody přímého sledování průběhu PCR reakce. Higuchi a kol. využili interkalační fluorescenční barvivo ethidium bromid, jehož fluorescenci sledovali během

průběhu PCR reakce (Higuchi et al. 1993). Tímto objevem přišla na svět technologie kvantitativního PCR (qPCR), jejíž modifikace jsou dodnes zlatým standardem pro analýzu nukleových kyselin (Bustin et al. 2009). V roce 1999 byl poprvé použit termín digitální PCR. Vogelstein a Kinzler pro svůj experiment použili destičku s 384 jamkami a k detekci využili fluorescenční sondy. V této publikaci ukázali, jak převést exponenciální analogový signál PCR na jeho digitální lineární formu, vhodnější pro účely kvantifikace (Vogelstein a Kinzler 1999). Nicméně v tuto chvíli stále nebyla metoda dostatečně praktická, aby mohla konkurovat qPCR. To se změnilo roku 2002 díky technologickému pokroku v oblasti mikrofluidního inženýrství, který umožnil vývoj mikrofluidních čipů, jež se daly jednoduše, rychle, a hlavně masově vyrábět (Thorsen et al. 2002). Od tohoto okamžiku se zvýšil zájem o dPCR a začalo přibývat prací a publikací věnující se rozvoji a aplikaci dPCR (Karlín-Neumann a Bizouarn 2018). Dalším důležitým milníkem je vývoj droplet digital PCR (ddPCR), která přispěla svojí automatizací, levností a vysokou průchodností k používání dPCR pro klinické účely (Mao et al. 2019).

### **1.3.2. Princip digitální polymerázové řetězové reakce**

Připravená reakční směs obsahující nukleové kyseliny našeho zájmu, primery a sondy, pufr, polymerázu a deoxynukleotidtrifosfáty se nanese dle typu zařízení na čip s nanojamkami či do zařízení generujícího emulzi s jednotlivými kapkami jako samostatnými reaktory. Následně dojde k náhodné distribuci reakční směsi do nanoobjemů. Každý kompartment se tak stává malým PCR reaktorem, který by měl obsahovat žádnou, jednu nebo i více molekul sledovaných nukleových kyselin (Mao et al. 2019). Poté následuje amplifikační krok, kdy v každém kompartmentu začne polymerázová řetězová reakce. Po dokončení všech cyklů se změří fluorescence v každém jednotlivém kompartmentu – jamce či kapce. Pokud se v kompartmentu nenacházela sledovaná templátová DNA, můžeme kompartment označit jako negativní. Naopak pokud se sledovaná DNA v kompartmentu vyskytovala, označíme jej jako pozitivní. Díky tomuto binárnímu způsobu kvantifikace nanoobjemů, kdy je pozitivní jednotka označena jako 1 a negativní jako 0 se této technice říká digitální PCR (Kanagal-Shamanna 2016). Tímto způsobem získáme celkové počty pozitivních a negativních nanoobjemů z celé reakce a pomocí Poissonovy statistiky jsme schopni určit původní koncentraci molekul zájmu v měřeném vzorku (Mao et al. 2019).

### 1.3.2.1. Digitální polymerázová řetězová reakce na čipu

Digitální polymerázová řetězová reakce probíhající na čipu (cdPCR) se vyznačuje rozdělením prostoru čipu na mnoho nanolitrových reakčních komůrek. Fluorescence je u této metody měřena pomocí zobrazovacího systému a invertovaného mikroskopu. Počet sledovaných sekvencí je pak počítán v zobrazovacím softwaru. Můžeme rozlišit tři druhy čipů, které se používají pro cdPCR (Mao et al. 2019). Prvním typem je čip s integrovanými kapalinovými okruhy, který je vyroben z polydimethylsiloxanu s vícevrstevnou měkkou litografií. Na tomto čipu jsou integrovány kapalinové linie, chlopně i reakční komůrky, kdy s pomocí chlopní může být reakce rozdělena na několik oddělených nanojednotek (Ramakrishnan et al. 2013). Druhým typem čipu je čip s uspořádanou lipidovou dvouvrstvou tvořící komůrkový systém, který umožňuje pracovat s transmembránovými receptory (Watanabe et al. 2014). Třetí typ čipu je nazýván jako samonasávací kompartmentalizační čip. Tento čip obsahuje dvě skleněná krycí sklíčka jejichž posunem je možno rozdělit reakci na nanojednotky (Song et al. 2015). Kapičky reaktantů rozdělené pomocí cdPCR jsou stejného objemu, stabilní a neodpařují se (Mao et al. 2019).

### 1.3.2.2. Digitální polymerázová řetězová reakce v kapičkách

Kapičková digitální polymerázová řetězová reakce zkráceně ddPCR (digital droplet PCR) pracuje na čipu s nanobjemovými kapkami vodného roztoku v oleji. Do těchto kapiček jsou náhodně rozděleny nukleové kyseliny a následně v nich probíhá PCR reakce. K detekci je použit dvou- a vícebarevný optický detekční systém. Vytvoření vrstvy kapiček je levnější oproti cdPCR. Nicméně tyto kapičky nemají stejný objem. Pro fluorescenční měření jsou tak vybrány jen kapičky, které mají stejný objem. Po změření jsou data upraveny dle Poissonovy statistiky (Mao et al. 2019).

### 1.3.3. Vyhodnocení dat získaných metodou dPCR

Pro určení počtu kopií nukleových kyselin se používá Poissonova statistika, která zohledňuje pravděpodobnost toho, že v daném nanobjemu se nachází žádná, jedna nebo více molekul. K výpočtu počtu cílových molekul v jedné jednotce objemu PCR směsi (jamce na čipu či kapce v emulzi) se používá následující rovnice,

$$[DNA] = -\ln\left(1 - \frac{N_P}{N_T}\right) \frac{1}{V_P}$$

kde  $[DNA]$  je počet molekul v dané jednotce objemu,  $N_p$  je počet pozitivních kompartmentů a  $N_T$  je celkový počet kompartmentů. Jako  $V_p$  je označen průměrný objem kompartmentů. Použití Poissonovy statistiky předpokládá, že všechny partikule mají stejný objem (Karlin-Neumann a Bizouarn 2018)

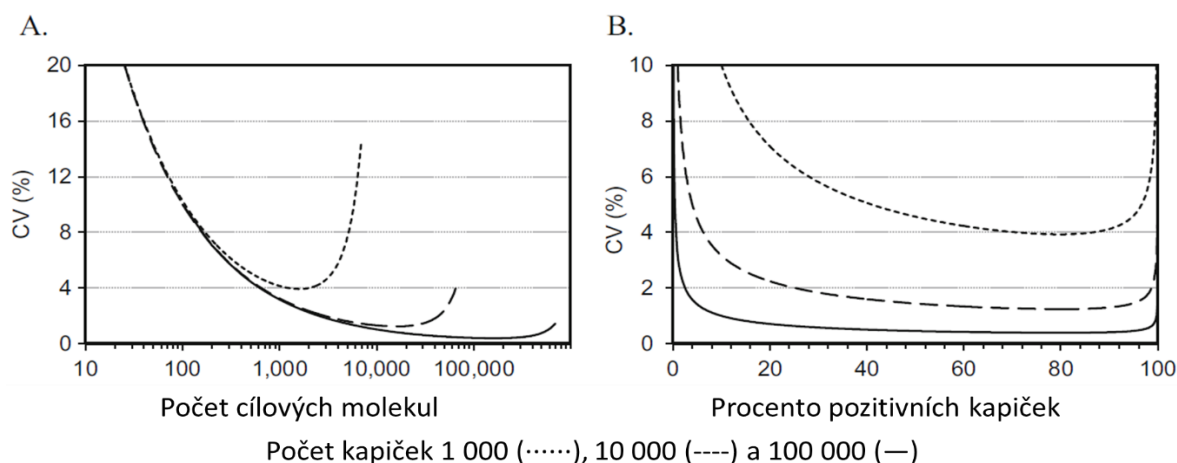
### **1.3.4. Vlastnosti dPCR**

#### **1.3.4.1. Dynamický rozsah detekce**

Dynamický rozsah detekce je definován jako rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší detekovatelnou koncentrací molekuly (Quan et al. 2018). Pro dPCR platí, že počet analyzovaných částic je limitujícím faktorem pro teoretický dynamický rozsah dPCR. Zároveň ale u hranic dynamického rozsahu je ovlivněna přesnost, jak můžeme vidět na Obrázku 6. Dalším faktorem ovlivňující dynamický rozsah je samotná velikost partikulí. Uniformita jednotlivých partikulí má vliv na dynamický rozsah a přesnost dPCR. Pokud nejsou partikule uniformní, tak větší částice mají vyšší šanci obsahovat více sledovaných molekul, než ty menší, což může ovlivnit výsledek měření (Karlin-Neumann a Bizouarn 2018). Zajímavou vlastností dPCR je, že s její pomocí můžeme detekovat mnohem více cílových molekul, než jaký je počet sledovaných partikulí. Za dané přesnosti 12,6 % jsme schopni detekovat počet cílových molekul, který je 5krát větší než počet 20 000 kompartmentů na čipu (Pinheiro et al. 2012).

#### **1.3.4.2. Přesnost dPCR**

Počet kompartmentů v dPCR je jedním z faktorů, které ovlivňují jeho přesnost. S rostoucím počtem kompartmentů se zlepšuje přesnost za předpokladu, že provádíme měření v optimální části dynamického rozsahu. Nicméně teoretická přesnost není vždy v souladu s přesností experimentální, protože Poissonova statistika není jedinou komponentou, která se podílí na výsledku měření. Pokud budeme mít v měření méně než 1000 kompartmentů, tak očekávaná hladina variačního koeficientu bude nejméně 4 % a Poissonova statistika bude tak hlavní příčinou nepřesnosti. V případě, kdy dosáhneme v měření na počet kompartmentů 10000, tak variační koeficient bude menší, než 1,5 % a jiné faktory budou mít značnější vliv na přesnost (Karlin-Neumann a Bizouarn 2018). Vývoj této závislosti můžete sledovat v Obrázku 6.



**Obrázek 6:** Přesnost dPCR. V obou grafech můžeme sledovat 3 linie, každá znázorňuje vztah počtu analyzovaných kompartmentů (kapiček) v jednom dPCR experimentu. **A.** Vývoj koeficientu variance oproti počtu cílových molekul pro 3 různé velikosti experimentu. **B.** Vývoj koeficientu variance oproti procentu pozitivních kompartmentů pro 3 různé velikosti experimentu. Upraveno podle (Karlin-Neumann a Bizouarn 2018)

#### 1.3.4.3. Rozdělení reakčního objemu do kompartmentů

Rozdělením směsi do nanobjemů, které pak následně fungují jako nano PCR reaktory s sebou nese řadu charakteristik. Jednou z nich se snížená náchylnost k inhibičnímu efektu oproti qPCR (Nixon et al. 2014). I střední koncentrace inhibitorů přítomných ve vzorcích může být tolerována, protože při dPCR se měří fluorescence až po proběhnutí všech cyklů reakce a k vyhodnocení stačí pouze rozlišení na pozitivní a negativní kompartmenty, což je většinou možné i přes sníženou účinnost reakce. Rozdělím do kompartmentů je také snížena pravděpodobnost nežádoucích křížových reakcí. Samozřejmě je ale možné, že při dost velkých koncentracích inhibitorů je účinnost reakce snížena natolik, že již není možné zjistit binaritu daného kompartmentu a tím je částice vyřazena z měření, což pak v konečném důsledku sníží přesnost měření (Dingle et al. 2013).

Podmínka náhodné distribuce cílových sekvencí do kompartmentů nemusí být splněna v případě, kdy cílové sekvence jsou spojené nebo v tandemu. V tomto případě dojde k zanesení dvou molekul do jedné částice a následkem bude podhodnocení celkového počtu těchto molekul. Tomuto fenoménu se dá zabránit použitím restričních enzymů, které rozpojí cílové sekvence (Hindson et al. 2011). Druhý případ, kdy bude výsledek naopak nadhodnocován, nastane, když jsou ve vzorku přítomny jednovláknové části cílové DNA. To může vést až ke dvojnásobnému nadhodnocení počtu sledovaných molekul (Bhat et al. 2011).

Jak již bylo zmíněno, objem kompartmentů je jedním z klíčových faktorů pro definování přesnosti dPCR. Celkem tři charakteristiky ovlivňují přesnost dPCR. Jedná se o přesnost tvorby jednotlivých nanoobjemů definovaných výrobcem, variabilita průměrného objemu mezi dvěma replikáty dPCR měření a variabilita objemu kompartmentů v rámci jednoho dPCR replikátu (Karlin-Neumann a Bizouarn 2018). Objemy se u obou dPCR platform (čipových i kapičkových) mohou lišit od hodnoty uvedené výrobcem (Pinheiro et al. 2012). Pokud nezohledníme tento fakt, tak do měření bude vnášena systematická nepřesnost (Corbisier et al. 2015). Přesnost výrobních procesů je tak základním faktorem, jehož zlepšením dokážeme skutečnou přesnost měření pomocí dPCR přiblížit k teoretické přesnosti vypočítané Poissonovou statistikou (Karlin-Neumann a Bizouarn 2018).

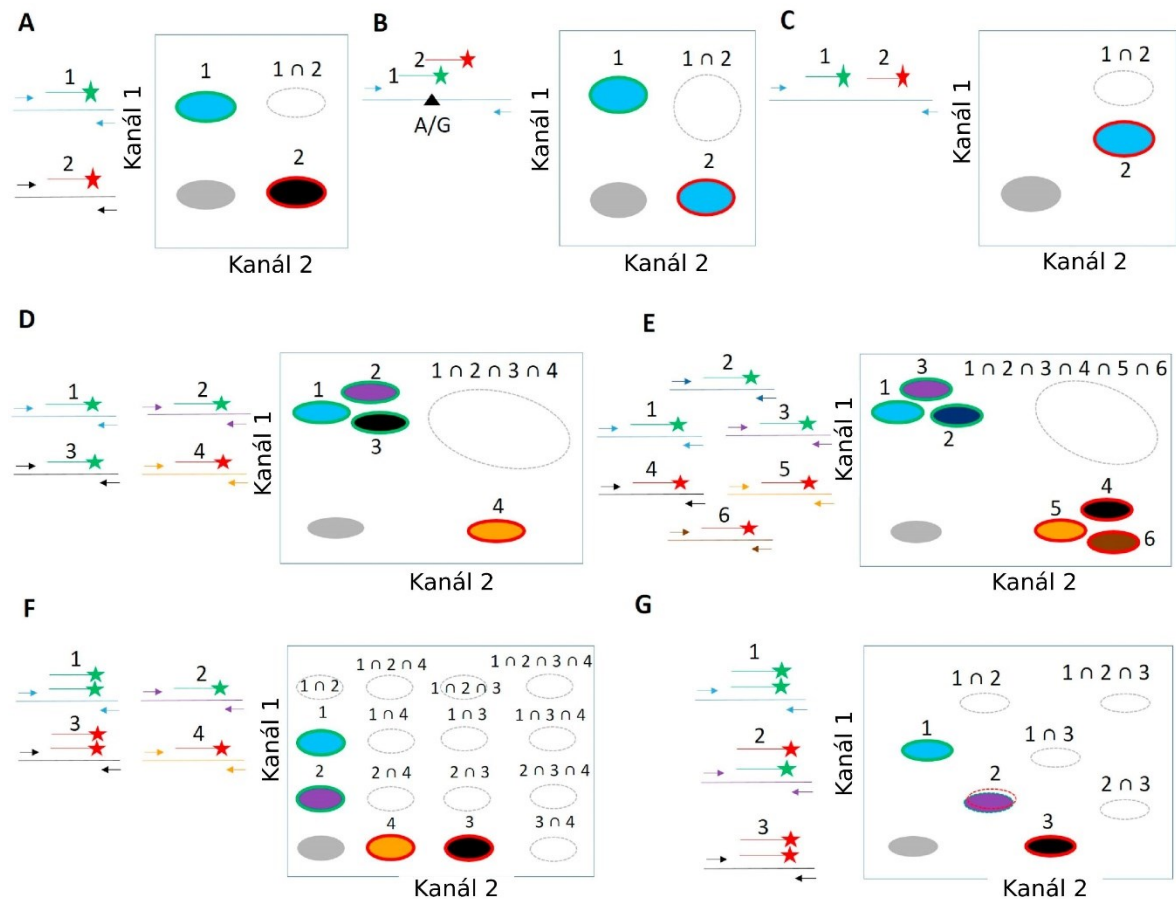
### **1.3.5. Multiplexování**

Pokud máme v jednom PCR experimentu více cílových sekvencí DNA, které amplifikujeme a detekujeme, hovoříme o multiplexování. Digitální PCR je technikou, která umožňuje multiplexování a díky tomu, pokud vybereme více cílových sekvencí, jsme schopni s větší jistotou změřit množství DNA konkrétního chromosomu (Whale et al. 2016). Tan a kol. ve své studii dokázali, že s větším počtem cílových sekvencí lokalizovaných na stejném chromosomu, jsme schopni přesněji změřit množství sekvencí pocházejících z tohoto chromosomu (Tan et al. 2019). Pro multiplexování s digitální PCR můžeme použít různá interkalační DNA barviva nebo fluorescenčně značené sondy různých typů a to jak sondy hydrolyzační, hybridizační, tak i sondy s primery typu Scorpion nebo Amplifluor (Navarro et al. 2015).

#### **1.3.5.1. Multiplexy s fluorescenčními sondami**

Detekce založená na fluorescenčních sondách byla poprvé použita v roce 1991 (Holland et al. 1991). Sondy jsou krátké molekuly DNA, hybridizující s cílovou sekvencí amplifikace, obsahující fluorescenční barvivo jako takzvaný reportér, na druhém konci sondy je jeho zhášec. Po hybridizaci na cílový templát je od sebe oddálen reportér a zhášec sondy a díky tomu jsme schopni sledovat a měřit zvýšenou hladinu fluorescence, což je princip klasických hybridizačních sond (Cardullo et al. 1988). Jiným typem sond jsou sondy hydrolyzační, které potřebují pro svoji aktivaci rozštěpení *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polymerázou. Endonukleázová aktivita Taq polymerázy sondu rozštěpí a tím od sebe oddálí reportér a zhášec a tím dojde k emitaci světla, které můžeme detekovat (Holland et al. 1991). Při použití multiplexu s několika barevnými sondami jsme schopni rozlišit

intenzitu fluorescence jednotlivých fluoroforů, jsme ale omezeni počtem fluorescenčních kanálů přístroje, v současné době je to nejvýše 6 kanálů (Madic et al. 2018). Pro multiplex můžeme použít sondy o stejné koncentraci nebo o jiné koncentraci či rozdílně efektivitě amplifikace. Přehled typů multiplexů je dostupný v Obrázku 7.



**Obrázek 7:** Základní principy multiplexů s fluorescenčními sondami. **(A-E):** Multiplexy se stejnou koncentrací sond. **A:** Nekompetitivní duplex. **B:** Kompetitivní duplex. **C:** Nekompetitivní hybridní duplex. **D:** Nerozlišující multiplex pro tři vzácné mutace oproti wild-type alele. **E:** Nerozlišující multiplex pro prenatální diagnostiku určený pro nízký počet kopií. **(F-G):** Multiplexy s rozdílnou koncentrací sond. **F:** Multiplex založený na rozdílu amplitud. **G:** Multiplex založený na poměru mezi amplicony. V schématech jsou jednotlivé sondy znázorněny šipkami s hvězdičkou. Barva odpovídá fluorescenčnímu kanálu. Na grafech jsou poté jako ovály zobrazeny jednotlivé klastry. Ohraničení klastrů odpovídá fluorescenci. Upraveno podle (Gaňová et al. 2021)

Metody se stejnou koncentrací sond můžeme dále ještě rozdělit na kompetitivní, nekompetitivní a nekompetitivní hybridní (Whale et al. 2016). Při kompetitivním multiplexingu máme několik sond mířících na jeden amplicon, které se se odlišují svou sekvencí. Díky tomu hybridizují pouze se sekvencemi vykazující konkrétní typ jednonukleotidových polymorfismů a díky tomu dokážeme jednotlivé polymorfismy

fluorescenčně odlišit a následně kvantifikovat (Oxnard et al. 2014). Při nekompetitivním multiplexování používáme sondy, kdy je každá z nich cílená na jiný amplikon a tím mezi nimi nedochází ke kompetici. Typickým výsledkem tohoto měření je poměr mezi sledovanými amplikony (Heredia et al. 2013). Třetí metodou je nekompetitivní hybridní multiplex. Při tomto designu máme jeden amplikon na který jsou cíleny dvě fluorescenční sondy. Jedna je cílená na nevariabilní úsek amplikonu a jejím účelem bude označit všechny naše hledané amplikony. Druhá sonda je cílena na úsek amplikonu, u kterého se očekává určitá míra variability. Tento design můžeme použít k zjištění počtu wild-type kopií oproti úsekům vykazující variabilitu (Oxnard et al. 2014). Posledním případem použití sond je nerozlišující multiplex, který používá jednu sondu mířenou na wild-type konkrétního genu s jednou fluorescenční barvou. A set několika sond o jiné barvě, které rozlišují alely sledovaného genu. Toto uspořádání se používá v situacích, kdy chceme pouze zjistit, je-li přítomná nějaká mutace a nezáleží nám na tom, kterého konkrétního typu (Whale et al. 2016).

Metody s rozdílnou koncentrací sond můžeme dále rozlišit na metody založené na rozdílu amplitud a metody rozlišující klastry dle jejich poměru. Multiplexy založené na amplitudách používají sondy konjugované s jedním barvivem, které má jinou finální intenzitu fluorescence ve sledovaném kanálu. Toho je dosaženo právě rozdílem koncentrací v posledním kroku reakce. Sondy jsou pak cíleny na rozdílné amplikony. Výsledkem měření je několik klastrů, které jsou kombinacemi sledovaných amplikonů (Didelot et al. 2013). U druhého typu designu pracujícího s poměry jsou některé amplikony měřeny jednou sondou s barvivem o normální intenzitě. Další amplikony pak používají kombinace sond s jejich sníženou koncentrací v různých poměrech. Tím docílíme vzniku klastrů, které se budou pohybovat mezi klastry s plnou intenzitou (Vannitamby et al. 2019).

### **1.3.5.2. Multiplexy s interkalačními barvivy**

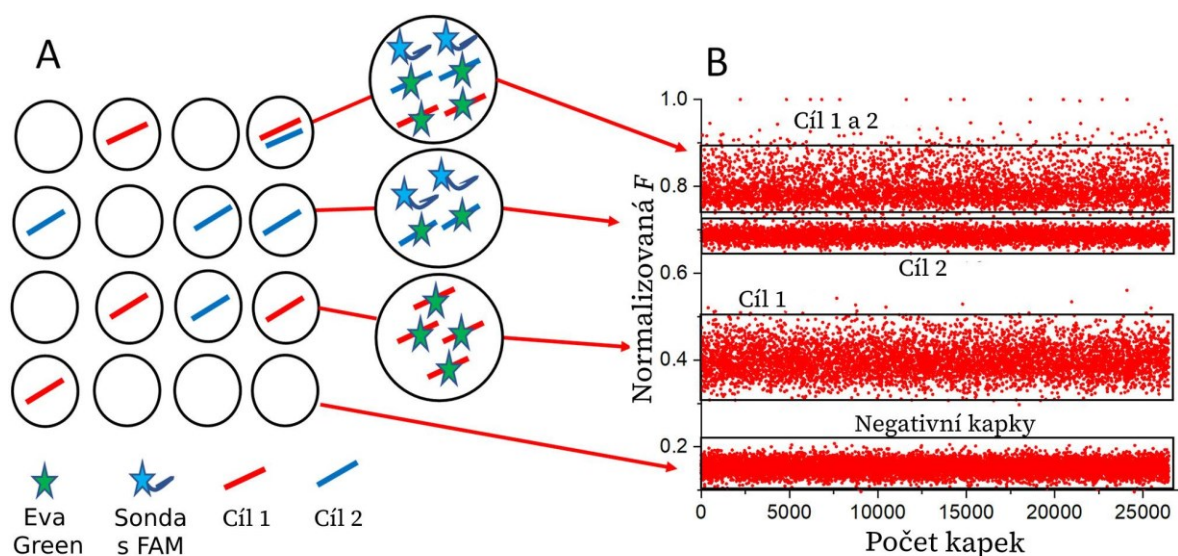
Druhou velkou skupinou multiplexů jsou multiplexy využívající interkalační barviva jako je třeba SYBR Green nebo Eva Green. Interkalační barviva se nespecificky vážou na dvoušroubovici DNA a poté jsou schopna fluorescence. Při rozdílné délce několika amplikonů, tak intenzita fluorescence je přímo úměrná délce amplikonů. Tímto způsobem můžeme zjistit zastoupení jednotlivých amplikonů o různých délkách (McDermott et al. 2013). Dalším designem je použití rozdílných koncentrací primerů na přibližně stejně



dlouhé amplikony. Takto jsme schopni vypočítat poměr mezi sledovanými úseky (Nyaruaba et al. 2020). Jiný přístup můžeme zvolit, pokud zkombinujeme multiplex s interkalačním barvivem s analýzou křivek tání. Při analýze křivek tání jsme schopni sledovat pokles fluorescence v momentě, kdy dochází k denaturaci dvoušroubovice DNA na dvě vlákna. K tomu ale potřebujeme kontinuálně zahřívat vzorek a měřit při tom jeho fluorescenci (Wittwer et al. 2010). Tento přístup můžeme využít pro zjištění specifity amplikonu, genotyping a detekci jednonuklotidových polymorfismů (Robinson et al. 2006; Zhou et al. 2004; Liew et al. 2004).

### 1.3.5.3. Duplexování s využitím kombinace interkalačního barviva a fluorescenčně značené sondy

Naše laboratoř ve spolupráci se skupinou profesora Pavla Neužila vyvinula novou metodu duplexování využívající fluorescenci jen v jednom kanále. Duplex využívá kombinaci interkalačního barviva EvaGreen a specifické karboxyfluoresceinové (FAM) sondy. Oba tyto fluorofory sdílejí stejný fluorescenční kanál. Výsledkem je rozdělení cílových sekvencí do skupin podle hladiny fluorescence (Zhang et al. 2022). Princip metody je znázorněn na Obrázku 8.



**Obrázek 8:** Princip metody kombinující interkalační barvivo a specifickou fluorescenční sondu. A: Emise fluorescence v jednotlivých kapkách s žádnou cílovou molekulou, cílovou molekulou 1 vázající pouze EvaGreen, cílovou molekulou 2 vázající EvaGreen a FAM sondu a oběma molekulami vázající EvaGreen a specifickou FAM sondu na cíl 2. B: Odpovídající hladiny fluorescence k jednotlivým situacím. Upraveno podle (Zhang et al. 2022)

### 1.3.6. Využití dPCR v neinvazivní prenatalní diagnostice

dPCR je metoda se širokou škálou využití a možností, jak designovat konkrétní experiment. Její uplatnění najdeme v široké škále lékařských oborů a disciplín jako je onkologie, infektologie, prenatalní diagnostika, cytogenetika a transplantologie, ale i v nelékařských oborech jako jsou environmentální studie, forenzní genetika, potravinářství a studie geneticky modifikovaných organismů (Karlin-Neumann a Bizouarn 2018). Vzhledem k zaměření této práce se podíváme především na použití dPCR v prenatalní diagnostice. Pro účely prenatalní diagnostiky se dPCR používá k především k analýze volné fetální DNA, kdy dPCR poskytuje potřebnou citlivost k zachycení malé části fetální frakce v krevním řečišti matky (Hudecova 2015).

#### 1.3.6.1. dPCR pro určení pohlaví plodu a vyšetření RhD inkompatibility matky a plodu

Vyšetření pohlaví plodu je v některých případech klinicky důležitou informací zejména pokud je matka přenašečkou X-vázaných chorob jako Ducheneova svalová dystrofie nebo hemofilie (Breveglieri et al. 2019). Zde se využívá detekce X-chromosomálních sekvencí v plazmě těhotné. Dalším prenatalním vyšetřením, které se běžně nabízí těhotným ženám, je vyšetření variant genů pro Rh faktor. Homozygoti nesoucí nefunkční variantu genu *RHD*, která je způsobena nejčastěji delecí, mají tzv. RhD negativní fenotyp, který je náchylný k maternální imunizaci vůči fetálním D antigenům (Gardener et al. 2012). Oběma problematikami se zabývala skupina Sillence a kolektiv, která vyvinula multiplexy pro určení pohlaví a RhD faktoru. Pro určení pohlaví si jako referenci zvolili část chromosomu 22, kterou porovnávali s dvěma Y specifickými lokusy. Pro determinaci Rh faktoru si jako referenci zvolili gen *AGOI*, který porovnávali s 2 exony v genu *RHD* (Sillence et al. 2015). Další skupina se zabývala problematikou rozlišení volné DNA plodu ženského pozadí od volné DNA matky. K rozlišení těchto dvou druhů DNA použili inzerčně-deleční polymorfismy na chromosomu X. Tato metoda byla následně použita k prenatalní diagnostice Rh inkompatibility mezi matkou a plodem a Wiscott-Aldrich syndromu (Zednikova et al. 2020). Vyšetření *RHD* genu je rutinně prováděno z volné DNA izolované z plazmy RhD negativních těhotných s cílem zabránit RhD inkompatibilitě mezi matkou a plodem (Pazourkova et al. 2021).

### **1.3.6.2. Aplikace dPCR při neinvazivní prenatalní diagnostice monogenních onemocnění**

Digitální PCR je aplikováno i pro účely diagnostiky monogenních onemocnění. Pro vyšetření monogenních onemocnění můžeme použít několik přístupů. Jednou cestou je porovnání zastoupení jednotlivých mutací ve vzorku volné DNA. Tímto přístupem zvládli Lum a kolektiv určit přítomnost mutovaných alel plodu způsobujících beta-thalasémii (Lun et al. 2008b). Mimo jiné se tato metoda ukázala účinnou pro vyšetření hemofilie, která se klinicky projevuje u plodů mužského pohlaví (Tsui et al. 2011). Barrett a kolektiv dále optimalizovali tuto metodu za pomoci série bialelických inzerčně-delečních markerů s kratšími amplikony a díky tomu dokázali za pomoci dPCR diagnostikovat srpkovitou anémii (Barrett et al. 2012). Další strategií pro diagnostiku je využití setu několika jednonukleotidových polymorfismů k zjištění velikosti fetální frakce. Poté jsme schopni přímo cílit na konkrétní mutace nebo je hodnotit nepřímo s využitím setu SNP spjatými s mutacemi. Tímto způsobem byla již diagnostikována například methylmalonická acidémie (Gu et al. 2014). Dalším pokrokem ve využití dPCR pro diagnózu monogenních onemocnění bylo sestavení eseje, který byl schopen diagnostikovat 8 mutací způsobující různá monogenní onemocnění (Camunas-Soler et al. 2018).

### **1.3.6.3. Využití dPCR pro neinvazivní detekci aneuploidií u plodu**

Neinvazivní prenatalní testování aneuploidií je jedním z vyšetření, ke kterým lze použít dPCR. Základním principem vyšetření je stanovení poměru sledovaného chromosomu oproti referenční sekvenci na jiném chromosomu ve volné DNA. Pokud se tento poměr bude lišit od 1, můžeme mít podezření, že je u plodu přítomna aneuploidie. Bude-li se jednat o trisomii, bude poměr mezi sledovaným a referenčním chromosomem vyšší a v případě monosomie bychom měli sledovat poměr nižší než 1 (Lo et al. 2007). Výsledný poměr závisí i na velikosti fetální frakce v krevním řečišti matky. V prvním trimestru, kdy se provádí neinvazivní vyšetření se fetální frakce pohybuje okolo 10 % (Lun et al. 2008a). Pokud budeme mít malou fetální frakci, naměřený poměr se bude lišit velmi málo a k měření budeme potřebovat extrémně velký počet kompartmentů, abychom s jistotou mohli říct, že naměřený poměr odpovídá skutečnosti (Evans et al. 2012). S nárůstem trisomické fetální frakce bude lineárně růst i sledovaný poměr (El Khattabi et al. 2016). Tento základní princip vyšetření na základě poměru dvou chromosomů nastínily dvě vědecké skupiny již v roce 2007, kdy porovnávali poměr mezi chromosomem 21

a referenčním chromosomem (Lo et al. 2007; Fan a Quake 2007). Další přístup zvolila později vědecká skupina, která se zaměřila na porovnání poměru mezi hypermetylovaným fetálním markerem na chromosomu 21 a *ZFY* genem na chromosomu Y (Tong et al. 2010b, s.). Alternativou nezávislou na pohlaví se pak zabývala jiná vědecká skupina, která místo genu na chromosomu Y zvolila jednonukleotidové polymorfismy plodu zděděné od otce (Tong et al. 2010a). S rozvojem multiplexování pak mohlo dojít ke zlepšení přesnosti měření dPCR. El Khattabi a kolektiv použili k odhalení trisomie chromosomu 21 oktaplex, kde použili set 4 sond svítících ve shodném kanále hybridizujícími se 4 úseky na chromosomu 21 a druhý set 4 sond s jiným fluoroforem, které hybridizovali s 4 úseky na chromosomu 18. Díky tomu dosáhli zvýšení podílu pozitivních částic a docílili větší přesnosti bez nutnosti zajistit obrovský počet kompartmentů (El Khattabi et al. 2016). Tan a kolektiv poté designovali obdobný multiplex, jen navýšili počet amplikonů na každém chromosomu na 20 a tím dosáhli ještě vyšší přesnosti (Tan et al. 2019).

## 2. Cíl práce a hypotézy

Cílem této práce je optimalizovat digitální polymerázovou řetězovou reakci pro využití v neinvazivní prenatální diagnostice. Zlepšení a zjednodušení designu experimentů dPCR by mohlo vést k jeho menší nákladnosti a zpřístupnění pro širší použití k detekci trisomií chromosomů. V rámci této práce jsme si stanovili následující cíle:

- Optimalizovat metodu izolace volné DNA z plazmy těhotných tak, aby vedla k co nejvyšším výtěžkům potřebným pro neinvazivní prenatální vyšetření metodou dPCR
- Optimalizovat novou metodu multiplexování dPCR využívající kombinace interkalačního barviva a fluorescenčně značené sondy pro využití v neinvazivní prenatální diagnostice
- Optimalizovat experiment tak, aby byl schopen rozlišit hladiny fluorescence 18. a 21. chromosomu v jednom kanále na základě rozdílů fluorescence.
- Otestovat vyvinutou metodu na souboru klinických vzorků obsahujícím euploidní i trisomická těhotenství, stanovit cut-off hodnoty a charakterizovat parametry této metody.

Dle znalostí z literatury očekáváme následující výsledky:

- Vzorky zdravých kontrol budou mít chromosomový poměr roven 1,0.
- Plně trisomické vzorky budou mít chromosomový poměr roven 1,5.
- Vzorky volné DNA z plazmy těhotných s euploidními plody budou vykazovat chromosomový poměr roven 1,0, kdežto vzorky volné DNA z plazmy žen s trisomickými těhotenstvími budou mít tento poměr vyšší v závislosti na velikosti fetální frakce volné DNA (1,025 pro 5% fetální frakci, 1,05 pro 10% fetální frakci).
- Žádná z dosud popsaných metod nevykazuje 100% sensitivitu a 100% specificitu.

Dále jsme si stanovili následující hypotézy:

Optimalizovaná metodika bude schopna odhalit existenci určité frakce trisomických plodů, bude možné nastavit cut-off hodnotu vedoucí k jejímu optimálnímu fungování.

### 3. Materiál

#### 3.1. Optimalizace

Jako materiál pro optimalizaci nám sloužily jednotlivé reaktanty používané v ddPCR reakcích v reakci. Během optimalizace bylo potřeba najít vhodné množství a koncentrace jednotlivých reaktantů tak, aby byl získán platný výsledek měření.

##### 3.1.1. Mastermix

Základem reakční směsi je PerfeCTa® qPCR ToughMix™ od firmy Quantabio. Jedná se o připravený mastermix obsahující optimalizované koncentrace chloridu hořečnatého, deoxynukleotidtrifosfátů, hot-start DNA polymerázu, AccuVue modré qPCR barvivo (slouží k zvýraznění roztoku pro lepší přehled při jeho pipetování), a stabilizátory.

##### 3.1.2. EvaGreen

Jako interkalační barvivo byla používána EvaGreen® Dye, 20X in Water od společnosti Biotium. Jedná se o fluorescenční barvivo, které je aktivní po navázání na DNA, jeho emisní spektrum se pohybuje okolo 530 nm.

##### 3.1.3. Voda

Jako rozpouštědlo slouží voda. Byla použita sterilizovaná voda pro injekce od firmy Kabi.

##### 3.1.4. Alexa

K fluorescenčnímu označení všech kapek v dPCR byla použita látka AlexaFluor® 647 (ThermoFisher Scientific). Jedná se o dextran o molekulové hmotnosti 10 000 s emisním spektrem 668 nm.

##### 3.1.5. Fluorescenční sondy

Dále budeme používat fluorescenční sondu vyrobenou firmou Integrated DNA Technology cílenou na chromosom 21. Sonda je ošetřena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) purifikací a na 5' konci je umístěno fluorescenční barvivo 6-karboxyfluorescein (6-FAM) s emisní vlnovou délkou 517 nm a na 3' konci je zhášec Iowa Black® FQ s vrcholem absorpčního spektra 531 nm. Celková sekvence sondy je následující:

5'-/6-FAM/C+C+C T+G+C CT+C T/IowaBlackFQ/-3'

Dále byla použita sonda pro chromosom 18, taktéž vyrobená firmou Integrated DNA Technology. Sonda byla ošetřena HPLC a na 5' konci se nachází fluorescenční barvivo Yakima Yellow® (YakYel) s emisní vlnovou délkou 551 nm a na 3' konci je zhášec Iowa

Black® FQ s vrcholem absorpčního spektra 531 nm. Celková sekvence sondy je následující:



Jedná se locked nucleic acid (LNA) sondy, jejichž nukleotidy obsahují mezi 2'-O a 4'-C metylenový můstek, který vhodně orientuje nukleotid ve vhodné prostorové orientaci pro Watson-Crickovo párování. Díky tomu dosahují sondy lepší tepelné stability a specifity (Tan et al. 2019).

### 3.1.6. Primery

Pro náš experiment používáme stejný set primerů jako Tan a kol., primery jsou cíleny na nevariabilní sekvence na chromosomech 18 a 21 (Tan et al. 2019). Primery byly vyrobeny společností Generi Biotech a jejich sekvence jsou uvedeny v Tabulkách 2 a 3.

**Tabulka 2:** Sekvence primerů pro chromosom 18

Chromosom 18			
Pár primerů	Genová lokalizace	Sekvence	Délka amplikonu
A	1248496- 1248575	F: 5'-CCATCTCCATAACCCAAATACC-3' R: 5'-CCTTGCAAACCTCATGTTGA-3'	80
B	5147229- 5147324	F: 5'-AATGACCAAGAAGCCACCAT-3' R: 5'-GCAGTTGCCTTAAACAAGGTATATTA-3'	96
C	8473597- 8473674	F: 5'-GAGAAACCTGCCACAAGAT-3' R: 5'-TCTCCTGTTCGGTTATAATGTCC-3'	78
D	8870993- 8871084	F: 5'-CCTGTTTGTTCCTTAATAGCCTCAT-3' R: 5'-TGGCAAATTTCAATGATGTCAC-3'	92
E	13150636- 13150721	F: 5'-GCATCATCGGATGGTTTTG-3' R: 5'-CCTTGCTACTTCTAGGCTAACCA-3'	86
F	21382385- 21382445	F: 5'-TCAGAAGGGTAGGGTCTTGG-3' R: 5'-TGGCTAATGATACTCAAAGGGTCT-3'	61
G	23485174- 23485251	F: 5'-GGAGCAAAGGGAAAACAGG-3' R: 5'-TGCCAATTAAACATGCTAGACAA-3'	78
H	24943949- 24944019	F: 5'-TGACCAGAGGAGCCTGGTAG-3' R: 5'-TTCATCTTCAAAGAGCTCCAGA-3'	71
I	37487343- 37487441	F: 5'-CCTGGGAGACAGAACTCTCAG-3' R: 5'-GGAGAGAGATTTCTCCGAAGC-3'	99

Chromosom 18			
Pár primerů	Genová lokalizace	Sekvence	Délka amplikonu
J	37782135- 37782224	F: 5'-GGGTCTCCACTCTGATGATTTG-3' R: 5'-TGGGAACTTAATCCCAAATTAAC-3'	90
K	48190141- 48190240	F: 5'-TGGGAGTGCAGTGTCTGTCT-3' R: 5'-ACACTTAGTCTTCTTCTTGCTCCTG-3'	100
L	48852421- 48852513	F: 5'-CATGACTCAGGTAGGCTTGCT-3' R: 5'-CAAGAGGCCGGGATAAAGAT-3'	93
M	50208031- 50208106	F: 5'-AACTTGCAAGGTTTTCACTGG-3' R: 5'-TGGGCCATGCTGTATTCAT-3'	76
N	51129532- 51129592	F: 5'-TGAGCTCAGGGTGGAAAGAG-3' R: 5'-CAAGGGATTACGCATGCAC-3'	61
O	51295343- 51295441	F: 5'-CATGGTTCTGCAGGCTATACAA-3' R: 5'-TTGTCCCCTCCAAATGTCAG-3'	99
P	51951491- 51951550	F: 5'-AAGACAGGAGAGCGAGGTGA-3' R: 5'-TTCTGTTAATAAGGCCCATGC-3'	60
Q	52280540- 52280623	F: 5'-AAACATTGGAATCAGACTGAGGTAG-3' R: 5'-AGAAGTTACAATTACCCACGCTTA-3'	84
R	56126533- 56126611	F: 5'-CCCTCACATCCCTTCCAAC-3' R: 5'-CCCTGCATTAACCCCTCAG-3'	79
S	56554079- 56554149	F: 5'-TTTCTGACTCTGCAATCTGCTTA-3' R: 5'-CACAGAGGTGAAGGCACAAA-3'	71
T	61875811- 61875887	F: 5'-CAAGGGCTCAGGTCTTCATT-3' R: 5'-CAGGAAGGGACGAAGGTG-3'	77

**Tabulka 3:** Sekvence primerů pro chromosom 21.

Chromosom 21			
Pár primerů	Genová lokalizace	Sekvence	Délka amplikonu
A	14099141- 14099218	F: 5'-CTAGGAGACTGTCCCTGAGCTT-3' R: 5'-AGGGGGAACATAGAGGCTTG-3'	78
B	15634475- 15634559	F: 5'-GGGATAGTTGAATGGGGATGT-3' R: 5'-AGGGATTGTGGAGTTTGGTG-3'	85
C	16912895- 16912966	F: 5'-GCTTCTGGGATGACACACG-3' R: 5'-CACATGATATTGTGAAAAGCAAGTT-3'	72



Chromosom 21			
Pár primerů	Genová lokalizace	Sekvence	Délka amplikonu
D	18597570- 18597636	F: 5'-TGAATTAGTTGCAAGGTGGTTCT-3' R: 5'-CCGAGAAGAAGAAGGATTGACA-3'	67
E	23717711- 23717786	F: 5'-TCTTCCCTCCCCTTGGA-3' R: 5'-GCCTGGTTTCTCCATAGAATCA-3'	76
F	24207756- 24207825	F: 5'-CATAATTCCCCTGTGGTGGTAT-3' R: 5'-GCAGAGCCCCCATGAATTA-3'	70
G	25698963- 25699026	F: 5'-AGAGCATGATACCATTGCTTGC-3' R: 5'-AAGTGCTGCCATCTTTCCTG-3'	64
H	25988208- 25988278	F: 5'-GGCCAGAGCTAAAGAAGCAA-3' R: 5'-CTGTACATGATGTCCCCCATT-3'	71
I	26492402- 26492463	F: 5'-TGAGGGAAATAGAGGTGCTCA-3' R: 5'-TGTGTCATTGTTTGCCAATTC-3'	62
J	27800999- 27801086	F: 5'-ACGCCACCATGCCTAGTTA-3' R: 5'-TGAGGTCGGGAATTCAAGG-3'	88
K	29174833- 29174909	F: 5'-TGTGTGGAACAACCTGGAGAAA-3' R: 5'-CACTGAAAAATTTAAAGTTAGGACGA-3'	77
L	31033224- 31033289	F: 5'-TCCCTTAGCCTAGGTTATCTAGCA-3' R: 5'-CCATCAAGCATTAGAGACAAAGG-3'	66
M	31509622- 31509681	F: 5'-GCATCAAGGACCCACAGAG-3' R: 5'-CAGGGCATTGGAAGTGTCTT-3'	60
N	36205063- 36205124	F: 5'-ACAGGGTGCTGTTGTCCTG-3' R: 5'-AGCACCGCTTTGGTACAATC-3'	62
O	37959129- 37959206	F: 5'-AGACTTCTTCGAGAATTGTGTAATTG-3' R: 5'-AATTGATGTCTGTTTGAGTTGATTTTA-3'	78
P	41284470- 41284545	F: 5'-CCACTGAAATTATTCTAACTAGCCAAA-3' R: 5'-TGTGGTTTCTGTAGGAAAGAAGG-3'	76
R	42234238- 42234310	F: 5'-CTTAACACCTGGAGTCCCAACT-3' R: 5'-TCTGAGCGATTGCAAAGAGA-3'	73
Q	42923863- 42923928	F: 5'-TGGGTGAGGTACTGAACTCTCT-3' R: 5'-CAAAGACTCGGTTTATTCCAG-3'	66
T	44441621- 44441686	F: 5'-GCAGTCCGTAGGGCTCAG-3' R: 5'-AGAACAAGGGCACAGCTGAC-3'	66
U	45098547- 45098621	F: 5'-CCCTGGAACAAAAGTGTGAG-3' R: 5'-GAAACTGAGGCCAGCACT-3'	75

## **3.2.Zdroje DNA**

### **3.2.1. Komerčně izolovaná DNA**

Pro účely optimalizace jsme pracovali s „Human Genomic DNA: Female“ od firmy Promega. Jedná se o DNA od mnoha anonymních dárců purifikovanou a následně rozpuštěnou v 10mM Tris-HCL s pH 8 a 1mM EDTA. Výrobce dále uvádí, že 90 % je delších než 50 kb.

### **3.2.2. Krevní plasma těhotných žen – zdravé těhotenství**

K dispozici jsme měli 25 vzorků krevní plasmy, které byly odebrány v rámci prenatalní diagnostiky s informovaným souhlasem pacientek v prvním trimestru těhotenství. Následně bylo potvrzeno, že došlo k porodu zdravého plodu. Vzorky byly skladovány v mrazáku s teplotou -80 °C. Z těchto krevních plasem byla pak následně izolována DNA.

Informovaný souhlas dovolující využití těchto vzorků pro výzkum v oblasti neinvazivní diagnostiky byl schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v rámci výzkumného projektu RVO – VFN 64165 Ministerstva zdravotnictví ČR.

### **3.2.3. Krevní plasma těhotných žen – trisomické těhotenství**

K dispozici jsme měli 15 vzorků krevní plasmy, které byly odebrány v rámci prenatalní diagnostiky s informovaným souhlasem pacientek v prvním trimestru těhotenství. Následně bylo potvrzeno cytogenetickým vyšetřením, že se jedná o těhotenství s trisomií 21. chromosomu. Vzorky byly skladovány v mrazáku s teplotou -80 °C. Z těchto krevních plasem byla pak následně izolována DNA.

Informovaný souhlas dovolující využití těchto vzorků pro výzkum v oblasti neinvazivní diagnostiky byl schválen Etickou komisí 1. lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze v rámci výzkumného projektu RVO – VFN 64165 Ministerstva zdravotnictví ČR.

## 4. Metody

### 4.1. Práce se Stilla ddPCR

Pro práci byl použit systém Naica na digital droplet PCR společnosti Stilla Technologies. Systém obsahuje cykler Naica Geode a skener Naica Prism3. Spotřebním materiálem každé reakce jsou čipy Sapphire chip.

#### 4.1.1. Příprava vzorku

Před namícháním reakční směsi je potřeba nejprve všechny komponenty roztoku rozmrazit, zamíchat pomocí vortexu a krátce stočit na mikrocentrifuze. V průběhu celé práce byl k míchání používán Vortex V-3 od společnosti ELMi nastavený na 3 500 otáček za minutu po dobu 5 vteřin. Dále byly k stáčení používány mikrocentrifuga MiniSpin plus od společnosti Eppendorf pro zkumavky větší než 1,5 ml, který po 7 vteřinách v programu short spin dosahoval 5 000 otáček za minutu, což odpovídá 1620 g. Druhou mikrocentrifugou pro zkumavky o objemu 0,2 ml byla centrifuga CD-1008 od firmy Phoenix Instrument, která po 5 vteřinách dosáhla 7 000 otáček za minutu a vyvinula 2 680 g. Poté mohou být všechny komponenty smíchány a po smíchání musí být ještě jednou reakční směs zamíchána na vortexu. Dalším krokem je nanesení reakční směsi na Sapphire chip. Každý Sapphire chip má 4 pozice s maximálním reakčním objemem 25  $\mu$ l. Čip je před použitím potřeba ze spodní strany očistit od prachu a nečistot a poté může být přistoupeno k plnění čipu. Nejprve je potřeba odkrýt z čipu bílou čepičku pečetící pozici. Poté pipetou nanést do pozice nad olejovou fázi reakční směs. Vždy je potřeba si před pipetováním nové pozice vyměnit špičku. Po napipetování je nutnost pozice uzavřít za pomoci bílých PCR čepiček.

#### 4.1.2. Práce s Naica Geode a PCR protokol

Pro práci na přístroji Naica Geode, je potřeba mít zapnutý kompresor a nastavit jej tak, aby vyvíjel tlak mezi 1300 mbar. Poté lze otevřít víko přístroje a vložit do pozic čipy. Po zavření víka je nastaven v menu přístroje PCR protokol a začne PCR reakce. Pokud není uvedeno jinak, byl použit pro multiplex PCR následující protokol:

1. Při 40 °C probíhá rozdělení reakční směsi do jednotlivých kapiček dle nastavení Sapphire V1.
2. Následuje úvodních 5 minut při teplotě 95 °C.
3. Poté začne 40 cyklů, kdy se střídá 94 °C po dobu 30 vteřin a 62 °C po dobu 1 minuty.
4. Posledním krokem je uvolnění čipů dle nastavení Sapphire V1.

### **4.1.3. Vyhodnocení výsledků**

Vyhodnocení dat probíhá s pomocí skeneru Naica Prism3, který je ovládán za pomoci programu Crystal Reader z připojeného počítače. Po otevření programu Crystal Reader je v něm potřeba založit nový experiment, kde se nastavují parametry skenování jako je doba expozice jednotlivých barevných kanálů, určení skenovaných pozic, typ vzorků a pojmenování. Následně mohou být do přístroje Naica Prism3 vloženy Sapphire čipy a může být zahájeno skenování. Po dokončení skenování program informuje o kvalitě jednotlivých skenů. Finální odečet výsledků se provádí v programu Crystal Miner™, který dle umístěného prahu spočítá koncentrace měřených sekvencí. Crystal Miner také umí generovat grafické výstupy reprezentující výsledek experimentu a tabulky s konkrétními číselnými výsledky.

## **4.2. Optimalizace**

### **4.2.1. Izolace DNA**

Prvním přípravným krokem pro analýzu DNA je její izolace. Proto je potřeba zvolit vhodný způsob izolace DNA z krevní plasmy, který bude mít dostatečný výtěžek a nebude snižovat účinnost ddPCR. Nejprve byly porovnány 3 metody izolace DNA z krevní plasmy. Pro vyzkoušení izolace byly připraveny směsné vzorky krevní plasmy. Vždy budou porovnány 2 měření z jednoho vzorku. První vzorek byl izolován pomocí automatické izolace MagNa (Roche) (označen jako protokol 1) a kitu Mag-Bind (Omega Bio-Tek) dle modifikovaného protokolu 1 (označen jako protokol 2a). Druhý vzorek byl izolován automatickou izolací MagNa (protokol 1) a kitem MiniMax (Apostle) (označen jako protokol 3). Pro jistotu byl proveden ještě třetí experiment, který porovnával izolaci MagNa (protokol 1) a izolaci s kitem Mag-Bind, jenomže byl zvolen modifikovaný protokol 2 (označen jako protokol 2b). Před začátkem každé izolace byly v pokojové teplotě rozmrazeny vzorky krevní plasmy a následně s pomocí vortexu byly zamíchány. Po izolaci DNA z krevní plasmy byla připravena následující reakční směs do 11 pozic na 3 čípech a do jedné pozice byla umístěna negativní kontrola bez DNA. Jedná se o již využívaný multiplex se dvěma fluorescenčními sondami dle Tan a kol., optimalizovaný pro stejnou platformu ddPCR, takže se výsledek o účinnosti izolace a vlivu na chování ddPCR dá aplikovat i na vyvíjený multiplex (Tan et al. 2019). Reakční směs byla připravena dle Tabulky 4.

**Tabulka 4:** Objemy a koncentrace reaktantů pro experiment s izolací DNA. Ve směsi bylo použito 16 párů primerů pro oba chromosomy. Z celého setu 20 primerů pro chromosom 18 byly vynechány páry F, I, L, T a pro chromosom 21 byly vynechány páry A, B, E, Q.

Reaktant	Objem	Koncentrace
Mastermix	10 $\mu$ l	
Fluorescein	2,5 $\mu$ l	1 $\mu$ M
Páry primerů 18 (vše bez F, I, L, T)	2,5 $\mu$ l	50 $\mu$ M
Páry primerů 21 (vše bez A, B, E, Q)	2,5 $\mu$ l	50 $\mu$ M
Sonda 18	0,4 $\mu$ l	6,25 $\mu$ M
Sonda 21	0,9 $\mu$ l	6,25 $\mu$ M
Voda	1,2 $\mu$ l	
DNA	5 $\mu$ l	neznámá

PCR protokol měl níže uvedené parametry.

1. Při 40 °C probíhá rozdělení reakční směsi do jednotlivých kapiček dle firemního nastavení Sapphire V1.
2. Následuje úvodních 10 minut při teplotě 95 °C.
3. Poté začne 35 cyklů, kdy se střídá 95 °C po dobu 30 vteřin a 63 °C po dobu 1 minuty a 30 vteřin
4. Dále následuje 15 cyklů, kdy se střídá 95 °C po dobu 30 °C a 56 °C po dobu 1 minuty a 30 vteřin.
5. Posledním krokem je uvolnění čipů dle nastavení Sapphire V1.

#### 4.2.1.1. MagNA (Protokol 1)

První zkoušenou metodou byla automatická izolace na přístroji MagNA Pure od firmy Roche. Po zapnutí přístroje je nastaven izolační program pro izolaci volné DNA z krevní plasmy o objemu 1 ml a je dále pokračováno dle instrukcí na displeji.

1. Po otevření víka přístroje, s pomocí čtečky čárových kódů byly načteny cartridge a vysunuta kolejnice, do kterých byla vložena cartridge MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume, které obsahují proteinázu K, guanidium thiokyanát, Triton X-100, Isopropanol a guanidium chlorid.
2. Na displeji je potřeba potvrdit vložení cartridge do přístroje.

3. Je nastaven protokol na izolaci nukleových kyselin z 1 ml krevní plasmy a určen eluční objem na 50  $\mu$ l.
4. Po rozbalení jsou špičky MagNA Pure Compact Tip Tray vloženy do přístroje do doku pro špičky.
5. Na displeji je potřeba potvrdit vložení špiček do přístroje.
6. Do zkumavky MagNA Tube 2 ml bylo napipetováno 1 ml krevní plasmy.
7. Zkumavka se vzorkem byla vložena do stojanu do řady S a stojan umístěn do přístroje.
8. Na displeji byly vzorky pojmenovány a bylo potvrzeno jejich vložení.
9. Do menšího stojanu byla umístěna prázdná zkumavka MagNA Tube 2 ml do řady E a stojan byl vložen do přístroje.
10. Na displeji bylo potvrzeno vložení eluční zkumavky.
11. Po provedení kontroly údajů na displeji je možno spustit izolaci.

#### **4.2.1.2. Mag Bind (Protokol 2a a 2b)**

Další zkoušenou metodou byla izolace s pomocí kitu Mag-Bind® cfDNA od firmy Omega Bio-Tek. Izolační kit Mag Bind umožňuje si zvolit modifikované protokoly dle velikosti fragmentů. Modifikovaný protokol 1 (protokol 2a) je pro fragmenty menší než 50 párů bází. Modifikovaný protokol 2 (protokol 2b) je pro fragmenty menší než 75 párů bází. Protokoly se liší množstvím použitého JSB pufru a 100% isopropanolu. Více v bodě 7. Prvním přípravným krokem je naředění SPW pufru 100% etanolem. SPW pufr byl naředěn 100 ml 100% etanolu a poté na vortexu zamíchán. Druhým přípravným krokem je resuspendování magnetických částic Mag-Bind® pomocí vortexování. Před izolací inkubujeme v inkubátoru na 60 °C. Nyní lze pokračovat podle následujících kroků:

1. Bylo přidáno 500 – 1000  $\mu$ l plasmy do 15 ml centrifugační zkumavky.
2. Bylo přidáno 15  $\mu$ l roztoku s proteinázou K.
3. Bylo přidáno 67  $\mu$ l DS pufru.
4. Směs byla míchána na vortexu na maximální rychlost.
5. Zkumavka se směsí byla vložena na 20 minut do inkubátoru při teplotě 60 °C. Každých 10 minut byla zkumavka míchána.
6. Po dobu 10 minut zkumavka chladla v pokojové teplotě.

7. Byl přidán 1 ml JSB pufru a 1 ml 100% isopropanolu pro modifikovaný protokol 1 (protokol 2a) nebo byly přidány 2 ml JSB pufru pro modifikovaný protokol 2 (protokol 2b) a směs zamíchána na vortexu na nejvyšší rychlost po dobu 30 vteřin.
8. Bylo přidáno 5 µl magnetických částic Mag-Bind ®. Za pomoci pipety promícháno a necháno po dobu 10 minut v třepačce.
9. Byl převeden 1 ml lysátu do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky.
10. Zkumavka byla vložena do magnetického separátoru a ponechána v pokojové teplotě, než bude roztok čirý.
11. Po nasátí byl odpipetován supernatant, tak aby nedošlo ke kontaktu s magnetickými kuličkami na stěně zkumavky.
12. Zbylý lysát z kroku 8 byl přenesen do zkumavky a bylo počkáno, dokud roztok nebude čirý.
13. Po vložení zkumavky do magnetického separátoru v pokojové teplotě je třeba počkat, než bude roztok čirý.
14. Po nasátí byl odpipetován supernatant, tak aby nedošlo ke kontaktu s magnetickými kuličkami na stěně zkumavky.
15. Zkumavka byla sundána z magnetického separátoru.
16. Bylo přidáno 500 µl GT7 pufru v1.1.
17. Směs byla zamíchána po dobu 2 minut na vortexu.
18. Po vložení zkumavky do magnetického separátoru v pokojové teplotě je třeba počkat, než bude roztok čirý.
19. Po nasátí byl odpipetován supernatant, tak aby nedošlo ke kontaktu s magnetickými kuličkami na stěně zkumavky.
20. Byly zopakovány kroky 15-19.
21. Zkumavka byla sundána z magnetického separátoru.
22. Bylo přidáno 500 µl SPW pufru.
23. Směs byla zamíchána po dobu 2 minut na vortexu.
24. Po vložení zkumavky do magnetického separátoru v pokojové teplotě je třeba počkat, než bude roztok čirý.
25. Po nasátí byl odpipetován supernatant, tak aby nedošlo ke kontaktu s magnetickými kuličkami na stěně zkumavky.
26. Byly zopakovány kroky 21-25.
27. Zkumavka byla sundána z magnetického separátoru na přibližně 30 vteřin.

28. Zkumavka byla znovu umístěna na magnetický separátor.
29. Byl odpipetován zbylý SPW pufr.
30. Po dobu 25 minut byly ponechány magnetické kuličky k vyschnutí.
31. Zkumavka byla sundána z magnetického separátoru.
32. Bylo přidáno 20-60  $\mu$ l elučňního pufru.
33. Směs byla po dobu 5 minut míchána na vortexu.
34. Po vložení zkumavky do magnetického separátoru v pokojové teplotě je třeba počkat, než bude roztok čirý.
35. Čirý supernatant obsahující izolovanou DNA byl přesunut do čisté 1,5 ml zkumavky.

#### **4.2.1.3. MiniMaX (Protokol 3)**

Poslední zkoušenou izolační metodou byla izolace s pomocí kitu MiniMax™ High Efficiency cfDNA od firmy Apostle. Před izolací byl zapnut inkubátor na 60°C. Nyní lze pokračovat dle následujících kroků:

1. Do 15 ml zkumavky bylo přidáno 40  $\mu$ l proteinázy K, 1 ml krevní plasmy a 100  $\mu$ l lyzačního pufru.
2. Za pomoci vortexu byla reakční směs promíchána a následně vložena do inkubátoru na 20 minut při teplotě 60°C.
3. Po skončení inkubace byla zkumavka zchlazena na pokojovou teplotu.
4. Bylo smícháno 1,25 ml cfDNA Lysis/Binding roztoku a 15  $\mu$ l magnetických nanočástic.
5. Připravený roztok byl přidán do směsi s plasmou a zamíchán na vortexu.
6. Na 10 minut byla směs vložena do třepačky.
7. Na 5 minut byla zkumavka s reakční směsí umístěna na magnet, dokud roztok nebude čirý.
8. Opatrně byl odpipetován supernatant.
9. Zkumavka byla sundána z magnetu a bylo přidáno 1 ml Apostle MiniMax™ cfDNA Wash Solution a zamíchán za pomoci vortexu.
10. Roztok s vzorkem byl přesunut do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a původní zkumavka byla ponechána stranou.
11. 1,5 ml zkumavka byla umístěna na magnet na 1 minutu.



12. Supernatant z 1,5 ml zkumavky byl použit k vypláchnutí 15 ml zkumavky a všechny zbývající nanočástice byly přeneseny do 1,5 ml zkumavky. 15 ml zkumavka byla vyhozena.
13. 1,5 ml zkumavka byla umístěna na magnet po dobu 2 minut nebo dokud nebude roztok čirý.
14. Supernatant byl opatrně odstraněn.
15. 1,5 ml zkumavka byla sundána z magnetu a byl přidán 1 ml Apostle MiniMax™ cfDNA Wash Solution a s pomocí vortexu byla směs míchána po dobu 30 vteřin.
16. 1,5 ml zkumavka byla míchána, než se roztok usadí u dna a poté byla umístěna na magnet po dobu 2 minut nebo dokud nebude roztok čirý.
17. Supernatant byl opatrně odstraněn.
18. Apostle MiniMax™ cfDNA 2nd Wash Solution byl naředěn s etanolem v poměru 1:4. Celkem budou potřeba 2 ml tohoto roztoku.
19. 1,5 ml zkumavka byla sundána z magnetu a bylo přidáno 1 ml roztoku připraveného v bodě 18 a poté byl roztok zamíchán na vortexu po dobu 30 vteřin.
20. 1,5 ml zkumavka byla centrifugována a poté umístěna na magnet po dobu 2 minut nebo dokud nebude roztok čirý.
21. Supernatant byl opatrně odstraněn.
22. Byly zopakovány kroky 19-21.
23. 1,5 ml zkumavka byla sundána z magnetu a centrifugována. Poté byla umístěna po dobu 2 minut na magnet nebo dokud nebude roztok čirý.
24. Veškerá zbylá tekutina z 1,5 ml zkumavky byla odstraněna.
25. 1,5 ml zkumavka byla ponechána na magnetu a po dobu 3 minut dokud nanočástice nevyschnuly.
26. 1,5 ml zkumavka byla sundána z magnetu a bylo přidáno 20 µl Apostle MiniMax™ cfDNA Elution Solution.
27. Za pomoci vortexu byla zamíchána 1,5 ml zkumavka s roztokem, dokud se neresuspendují magnetické částice a poté byla ještě déle míchána po dobu 5 minut.
28. 1,5 ml zkumavka byla centrifugována a umístěna na magnet po dobu 2 minut nebo dokud roztok nebude čirý.
29. Supernatant obsahující cfDNA byl přenesen do čisté zkumavky.

#### 4.2.2. Výběr primerů

Pro zjištění chování jednotlivých primerů v reakční směsi, byly provedeny experimenty, kde nebylo měněno složení reakční směsi a do každé pozice byl vložen vždy jiný pár primerů. Namíchaná reakční směs pro jednu pozici čipu je popsána v Tabulce 5.

**Tabulka 5:** Tabulka objemu a koncentrací reaktantů pro experiment s výběrem primerů.

Reaktant	Objem	Koncentrace
Mastermix	12,5 $\mu\text{l}$	
Evagreen	1,9 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{M}$
Voda	1,6 $\mu\text{l}$	
Alexa	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
Sonda 21	1 $\mu\text{l}$	6,25 $\mu\text{M}$
Pár primerů 18	1 $\mu\text{l}$	3,125 $\mu\text{M}$
Pár primerů 21	1 $\mu\text{l}$	3,125 $\mu\text{M}$
DNA	5 $\mu\text{l}$	2 ng/ $\mu\text{l}$

Pro test primerů chromosomu 18 byly jako referenční primery pro chromosom 21 použit pár primerů D. Pro test primerů chromosomu 21 byly jako referenční primery pro chromosomu 18 použit pár primerů A. (Tabulky 2 a 3) Referenční páry primerů byly vybrány dle předchozích zkušeností laboratoře. Reakční směs byla připravena vždy s referenčním párem primerů a následně rozpipetována do 2 ml zkumavek ve kterých byl do směsi přidán testovaný pár primerů a následně DNA. Po vortexování a stočení byla směs rozpipetována do jednotlivých pozic na čipu.

#### 4.2.3. Výběr počtu primerů

Pro získání co nejvyššího počtu pozitivních signálů je žádoucí optimalizovat reakci tak, aby docházelo k tvorbě co nejvyššího množství různých ampliconů z obou chromosomů. Postupně byly přidány do reakční směsi páry primerů a bylo zjišťováno, jak to ovlivní výsledek měření. Nejprve byla namíchaná reakční směs bez primerů v následujícím složení dle Tabulky 6.

**Tabulka 6:** Objemy a koncentrace reaktantů pro experiment s výběrem počtu primerů.

Reaktant	Objem	Koncentrace
Mastermix	12,5 $\mu\text{l}$	
Evagreen	1,9 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{M}$
Voda	1,6 $\mu\text{l}$	
Alexa	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
Sonda 21	1 $\mu\text{l}$	6,25 $\mu\text{M}$
DNA	5 $\mu\text{l}$	1 ng/ $\mu\text{l}$

Poté byly páry primerů přidány do směsi tak, aby vždy jejich celkový objem se rovnal 1  $\mu\text{l}$  a byla zachována koncentrace jednotlivých primerů 3,125  $\mu\text{M}$ . Primery byly vybrány dle výsledků předchozího experimentu – viz Tabulka 7.

**Tabulka 7:** Postupné přidávání párů primerů do směsi.

Pozice	Páry primerů 18	Páry primerů 21
1	A	D
2	AB	DH
3	ABD	DHK
4	ABDH	DHKL
5	ABDHJ	DHKLM
6	ABDHJM	DHKLMP
7	ABDHJMR	DHKLMPR

#### 4.2.4. Výběr koncentrace a objemu reaktantů

##### 4.2.4.1. Primery

Pro zjištění vlivu koncentrace primerů na výsledek měření bylo připraveno několik sad experimentů. Nejprve byla vyzkoušena následující ředící řada:

1. pozice čipu: 3,125  $\mu\text{M}$  primerů
2. pozice čipu: 1,56  $\mu\text{M}$  primerů
3. pozice čipu: 0,78  $\mu\text{M}$  primerů
4. pozice čipu: 0,20  $\mu\text{M}$  primerů

Pro chromosom 18 byly použity páry primerů ABDH a pro chromosom 21 DHKL. Poté byla připravena níže uvedená reakční směs a rozpipetována. V tomto složení byly provedeny dva experimenty, v nichž byl rovněž porovnáván vliv množství DNA na výsledek experimentu. Bylo porovnáváno množství DNA 0,2 ng/μl oproti 1 ng/μl. Směs byla připravena dle Tabulky 8.

**Tabulka 8:** Objemy a koncentrace reaktantů pro experiment s různými koncentracemi primerů.

Reaktant	Objem	Koncentrace
Mastermix	12,5 μl	
Evagreen	1,9 μl	25 μM
Voda	1,6 μl	
Alexa	1 μl	0,2 μM
Sonda 21	1 μl	6,25 μM
Páry primerů 18 (A, B, D, H)	1 μl	Viz ředící řada
Páry primerů 21 (D, H, K, L)	1 μl	Viz ředící řada
DNA	5 μl	0,2 ng/μl nebo 1 ng/ul

V další sadě experimentů již bylo ponecháno testovací množství DNA na 1 ng/μl a byly vyzkoušeny ještě vyšší koncentrace primerů. Kromě množství DNA a koncentrace primerů se složení reakční směsi neměnilo. Vyzkoušeny byly následující koncentrace primerů:

1. čip

1. pozice čipu: 2,37 μM primerů
2. pozice čipu: 3,55 μM primerů
3. pozice čipu: 5,33 μM primerů
4. pozice čipu: 8 μM primerů

2. čip

1. pozice čipu: 8,9 μM primerů
2. pozice čipu: 22,2 μM primerů
3. pozice čipu: 33,3 μM primerů
4. pozice čipu: 50 μM primerů

#### 4.2.4.2. Vliv koncentrace mastermixu v reakci

Dále byly vyzkoušeny experimenty, ve kterých bylo upravováno množství mastermixu v reakční směsi. S cílem odhalit, jak množství mastermixu ovlivňuje rozdíly fluorescence a možnost jednoznačného nastavení jednotlivých prahů fluorescence. Pozice na jednotlivých čípech byly připraveny takto:

1. pozice 12,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a 1,6  $\mu\text{l}$  vody.
2. pozice 10,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a 3,6  $\mu\text{l}$  vody
3. pozice 8,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a 5,6  $\mu\text{l}$  vody
4. pozice 6,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a 7,6  $\mu\text{l}$  vody

Další reaktanty byly přidány v uvedeném množství podle Tabulky 9.

**Tabulka 9:** Objemy a koncentrace reaktantů pro experiment s variabilním množstvím mastermixu.

Reaktant	Objem	Koncentrace
Evagreen	1,9 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{M}$
Alexa	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
Sonda 21	1 $\mu\text{l}$	6,25 $\mu\text{M}$
Páry primerů 18 (A, B, D, H)	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{M}$
Páry primerů 21 (D, H, K, L)	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{M}$
DNA	5 $\mu\text{l}$	1 ng/ $\mu\text{l}$

Druhý experiment zužitkoval poznatky z pokusů ohledně koncentrace primerů. Byly připraveny dva čipy. Do prvního čipu byly vloženy primery o koncentraci 8  $\mu\text{M}$  a do druhého o koncentraci 5  $\mu\text{M}$ . A podobně jako v předchozím experimentu byly čipy naplněny různým množstvím mastermixu a dalšími reaktanty podle Tabulky 10.

1. pozice 12,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a 1,6  $\mu\text{l}$  vody.
2. pozice 10,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a 3,6  $\mu\text{l}$  vody
3. pozice 8,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a 5,6  $\mu\text{l}$  vody
4. pozice 12,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a 1,6  $\mu\text{l}$  vody jako negativní kontrola bez DNA

**Tabulka 10:** Objemy a koncentrace reaktantů pro experimenty s variabilním množstvím mastermixu.

Reaktant	Objem	Koncentrace
Evagreen	1,9 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{M}$
Alexa	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
Sonda 21	1 $\mu\text{l}$	6,25 $\mu\text{M}$
Páry primerů 18 (A, B, D, H)	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{M}$
Páry primerů 21 (D, H, K, L)	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{M}$
DNA	5 $\mu\text{l}$	1 ng/ $\mu\text{l}$

#### 4.2.4.3. Vliv koncentrace DNA v reakci

Posledním krokem optimalizace bylo nalezení vhodného množství DNA, které po izolaci z krevní plasmy budeme přidávat do reakční směsi. Po izolaci z krevní plasmy nebyla známá koncentrace DNA ve vzorku, je ale možnost se rozhodnout, z kolika ml krevní plasmy bude vzorek DNA izolován, či zda nebude po izolaci DNA odparem vody vzorek ještě více koncentrován. V této sérii experimentů nebyly měněny objemy DNA vzorku v reakční směsi s cílem zjistit, jak koncentrování DNA pomáhá k získání lepších výsledků. V těchto experimentech již bylo pracováno s DNA izolovanou z krevní plasmy kontrolních pacientů. V prvních třech experimentech bylo ponecháno následující složení reakční směsi, jak je uvedeno v Tabulce 11.

**Tabulka 11:** Objemy a koncentrace reaktantů pro experiment s množstvím DNA.

Reaktant	Objem	Koncentrace
Mastermix	10,5 $\mu\text{l}$	
Evagreen	1,9 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{M}$
Voda	3,6 $\mu\text{l}$	
Alexa	1 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{M}$
Sonda 21	1 $\mu\text{l}$	6,25 $\mu\text{M}$
Páry primerů 18 (A, B, D, H)	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{M}$
Páry primerů 21 (D, H, K, L)	1 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{M}$
DNA	5 $\mu\text{l}$	Neznámá

DNA pro první experiment byla získána z 1 ml krevní plasmy a získaných 50  $\mu$ l DNA bylo ještě odparem zakoncentrováno na 22,5  $\mu$ l DNA. K odparu byl použit stroj IR MICRO-CERVAC model NB-503CIR od společnosti N-BIOTEK nastavený na teplotu 37 °C po dobu 25 minut a 1700 otáčkami za minutu. Reakční směs poté naplnila 4 pozice na 1 čipu.

Pro druhý experiment bylo z 1 ml krevní plasmy izolováno 50  $\mu$ l DNA a ty byly doplněny vodou na 62  $\mu$ l. Reakční směs poté naplnila 12 pozic na 3 čipech.

Pro třetí experiment byla izolována DNA z 2 ml krevní plasmy a výsledných 50  $\mu$ l z obou mililitrů krevní plasmy bylo na stroji IR MICRO-CERVAC odparem zakoncentrováno po dobu 18 minut při teplotě 37 °C, aby byl získán finální objem 62  $\mu$ l DNA.

Ve čtvrtém experimentu bylo izolováno z 2 ml krevní plasmy a získaných 100  $\mu$ l již nebylo dále koncentrováno. Ve čtvrtém experimentu bylo změněno složení reakční směsi a to tak, že místo 3,6  $\mu$ l vody bylo použito jen 0,6  $\mu$ l a místo 5  $\mu$ l DNA bylo do každé pozice dáno 8  $\mu$ l DNA.

#### 4.2.5. Konečný design experimentu

Po dokončení optimalizace byly vzorky zpracovány následujícím způsobem. Nejprve byla z 1 ml krevní plasmy izolována DNA v celkovém množství 55  $\mu$ l pomocí MagNa, která bylo ještě naředěna destilovanou vodou na 65  $\mu$ l. Dále byla připravena reakční směs v nadbytku dle Tabulky 12.

**Tabulka 12:** Objemy a koncentrace reaktantů konečného designu multiplexu.

Reaktant	Objem	Koncentrace
Mastermix	10,5 $\mu$ l	
Evagreen	1,9 $\mu$ l	25 $\mu$ M
Voda	3,6 $\mu$ l	
Alexa	1 $\mu$ l	0,2 $\mu$ M
Sonda 21	1 $\mu$ l	6,25 $\mu$ M
Páry primerů 18 (A, B, D, H)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ M
Páry primerů 21 (D, H, K, L)	1 $\mu$ l	5 $\mu$ M
DNA	5 $\mu$ l	Neznámá

Všechny reaktanty byly nejprve rozmrazeny v pokojové teplotě a poté centrifugovány a stočeny. Poté bylo až přistoupeno k pipetování. Reakční směs byla připravována v nadbytku pro celkem 13 pozic. Po namíchání směsi ve zkumavce na chladící podložce byla směs ještě jednou vortexována a zcentrifugována. Poté byla směs po 25 µl rozpipetována do 12 pozic na třech čípech. Bylo tedy vytvořeno 12 technických replikátů z jednoho vzorku. Pozice na čipu byla vždy uzavřena po 2 minutách od napipetování reakční směsi, po obsazení všech čtyřech pozic byl čip vložen do PCR cyklu.

#### **4.2.6. Nastavení prahových hodnot fluorescence pro interpretaci výsledků**

S pomocí softwaru Crystal Miner je uživatel schopen manuálně nastavit prahové hodnoty na výsledných 1D či 2D grafech. Práh nemusí být vždy jednoznačný a člověk obsluhující přístroj může tak snadno ovlivnit výsledek. Všechny skeny vzorků proto byly hodnoceny třikrát tak, aby bylo možné vyhodnotit míru shody jednotlivých setů měření. Nastavení jednotlivých prahů je popsáno v Obrázku 9. Program Crystal Miner vypočítá počet kopií na µl podle nastavených prahů. Vše, co se nachází nad určeným prahem zahrne program do výpočtu. Pro naměření počtu kopií jednotlivých chromosomů, je potřeba určit celkem tři prahy a až po jejich vzájemném odečtení získáme konkrétní počet kopií na µl. Zelený práh z Obrázku 9, tak určí počet kopií na µl chromosomů 18 a 21 dohromady i včetně dvojité pozitivní (18+21+DP). Červený práh vypočítá počet kopií na µl pro chromosom 21 a dvojité pozitivní (21+DP). Poslední žlutý práh vypočítá počet kopií na µl pro dvojité pozitivní (DP). Pro výpočet počtu kopií na µl chromosomu 18 platí tedy následující vztah:

$$Chr. 18 = (18 + 21 + DP) - (21 + DP) + (DP)$$

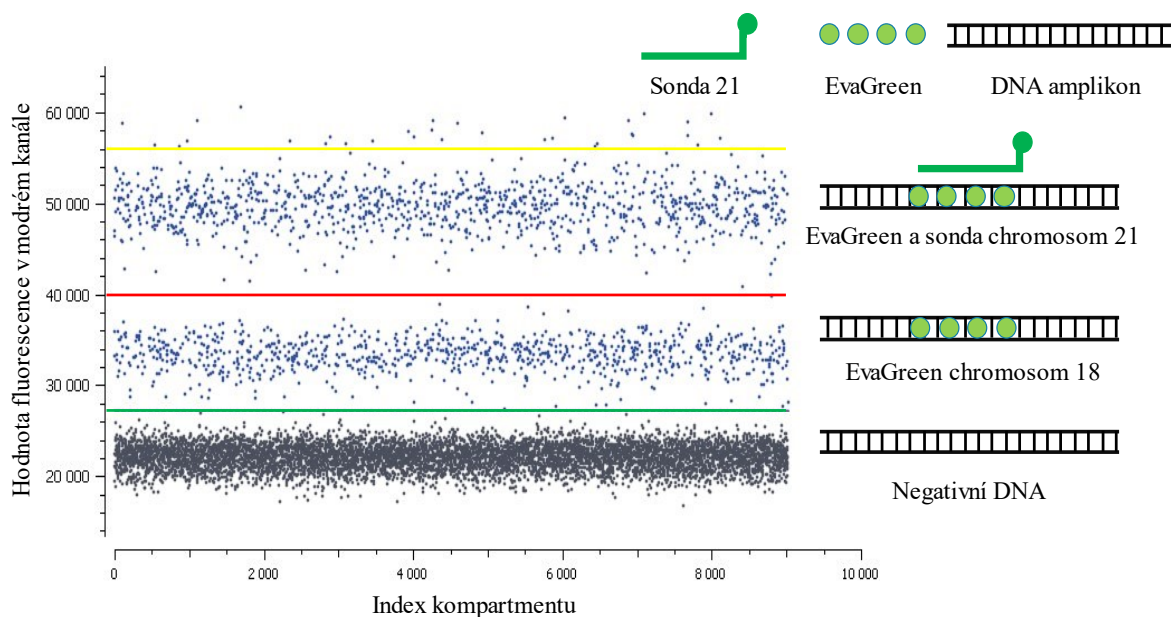
Pro počet kopií na µl pro chromosom 21 platí následující vztah:

$$Chr. 21 = (21 + DP)$$

Z těchto hodnot poté je vypočten jejich vzájemný poměr počtu kopií na µl chromosomů 18 a 21, který je předmětem zájmu celého měření.

$$Výsledný\ poměr = \frac{Chr. 21}{Chr. 18}$$





**Obrázek 9:** Princip hodnocení výsledků. Graf znázorňuje hladiny fluorescence jednotlivých kompartmentů. Pod zelenou čarou se nachází kompartmenty bez cílové DNA. Mezi červenou a zelenou čarou se nachází kompartmenty, ve kterých je DNA z chromosomu 18 s navázaným barvivem EvaGreen. Mezi žlutou a červenou čarou se nachází kompartmenty s DNA z chromosomu 21 jak s navázaným barvivem EvaGreen, tak i aktivovanou fluorescenční sondou. Nad žlutou čarou se nachází kompartmenty s DNA jak z 18., tak i z 21. chromosomu.

### 4.3. Vyšetření klinických vzorků

Obě skupiny klinických vzorků byly vyšetřeny podle optimalizovaného protokolu s množstvím reaktantů dle Tabulky 12 v předchozí kapitole. Vzorky byly zpracovány v 12 technických replikátech pro zajištění co největší přesnosti. Následně v programu Crystal Miner byl z výsledných dat vypočítán počet kopií sledovaných sekvencí chromosomů 18 a 21 na  $\mu\text{l}$ . Z těchto údajů byl následně vypočítán vzájemný poměr chromosomu 21 ku chromosomu 18.

### 4.4. Statistická analýza

Pro stanovení specifity a senzitivity našeho multiplexu jsme naměřená data statisticky zpracovali v programu MedCalc, který po určení prevalence sledované choroby (Downův syndrom 1/800) a importování naměřených dat dokáže vygenerovat ROC křivky a vypočítat právě hledanou specifitu a senzitivitu. Přesnost metody byla vypočtena v programu Excel společnosti Microsoft v souladu s publikací (Majumdar et al. 2015). Mann-Whitneyův test byl proveden v online kalkulatoru na webu [www.socscistatistics.com](http://www.socscistatistics.com).

## 5. Výsledky

### 5.1. Optimalizace

#### 5.1.1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA z krevní plasmy jsme vyzkoušeli celkem 3 metody. Automatickou izolaci MagNa (Roche), izolační kit Mag-Bind® (Omega) a izolační kit MiniMax (Apostle).

**Tabulka 13:** Tabulka porovnávající výsledky izolace MagNa (protokol 1) a MiniMax (protokol 3).

Metoda izolace	Počet analyzovatelných kapek celkem	Počet kapek pozitivních pro chromosom 18	Počet kapek pozitivních pro chromosom 21
MagNA (protkol 1)	250792	36313	39854
MiniMax (protokol 3)	266551	36309	40852

**Tabulka 14:** Tabulka porovnávající výsledky izolace MagNa (protokol 1) a MagBind (protokol 2a).

Metoda izolace	Počet analyzovatelných kapek celkem	Počet kapek pozitivních pro chromosom 18	Počet kapek pozitivních pro chromosom 21
MagNA (protokol 1)	277410	32570	31203
MagBind (protokol 2a)	280343	1137	1037

**Tabulka 15:** Tabulka porovnávající výsledky izolace MagNa (protkol 1) a MagBind (protokol 2b).

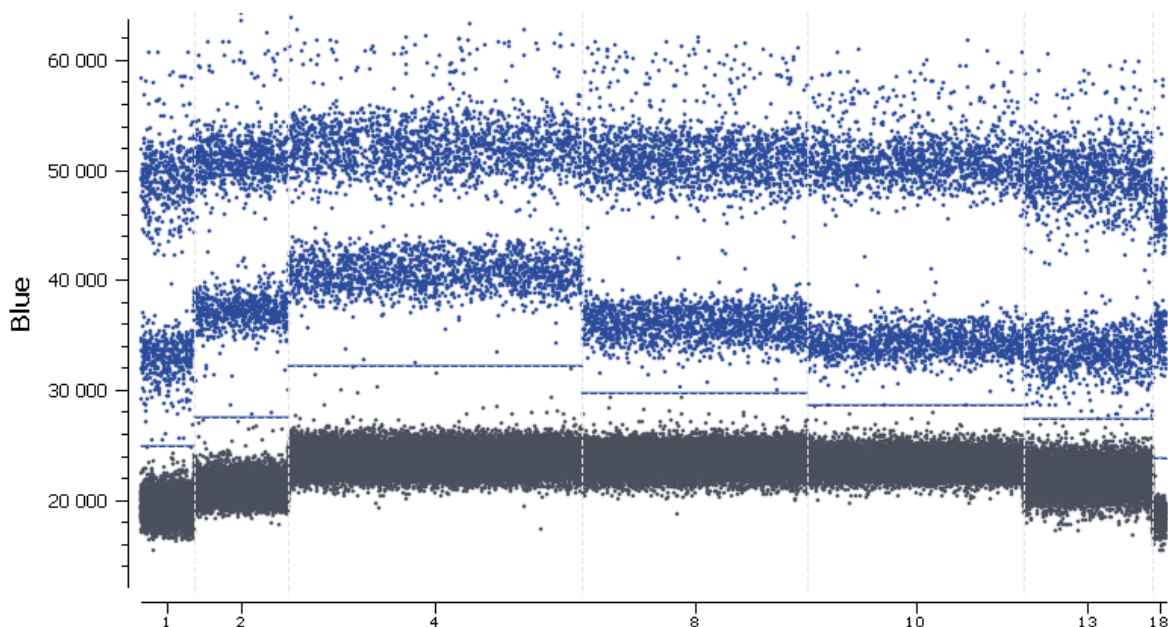
Metoda izolace	Počet analyzovatelných kapek celkem	Počet kapek pozitivních pro chromosom 18	Počet kapek pozitivních pro chromosom 21
MagNA (protokol 1)	218673	137358	135156
MagBind (protokol 2b)	258594	15530	16642

Jako hlavní hodnotící kritéria jsme určili počet analyzovatelných kompartmentů (kapek) a počet pozitivních kapek. Izolační kit MiniMax má srovnatelné výsledky izolace jako automatická izolace MagNa, znázorněno v Tabulce 13. Naopak izolační kit MagBind

nedosahuje ani v jednom případě takových hodnot, jako automatická izolace MagNa, jak se lze přesvědčit v Tabulkách 14 a 15. Jako hlavní metoda izolace byla zvolena automatická izolace MagNa. MagNa oproti kitu MagBind dosahovala lepších výsledků a oproti kitu MiniMax je její jednoznačnou výhodou automatice a možnost si v průběhu izolace připravit navazující PCR experiment.

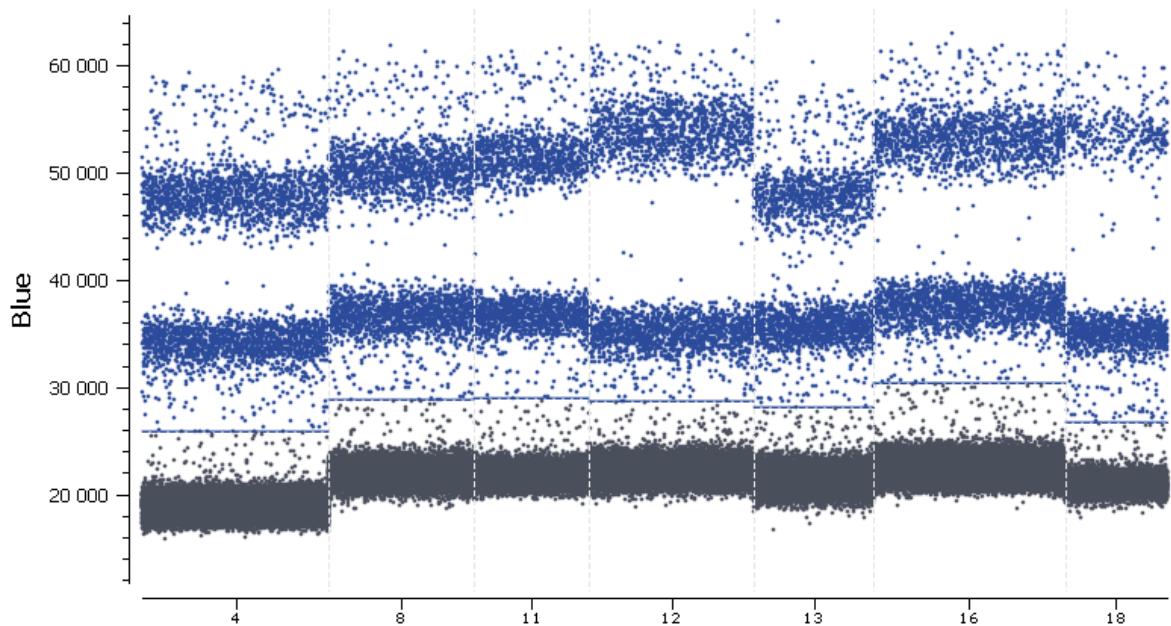
### 5.1.2. Výběr primerů

Vyzkoušeli jsme 20 párů primerů pro chromosom 18 a 20 párů primerů pro chromosom 21, které použili Tan a kolektiv (Tan et al. 2019). Jednotlivé páry primerů jsme vybírali podle toho, jak dobře mají odděleny negativní hladinu fluorescence od hladiny fluorescence chromosomu 18 a zároveň jak jsou odděleny hladiny fluorescence chromosomů 18 a 21. Vybírané primery pro každý chromosom musí mít také hladiny fluorescence v podobné výši, aby nedocházelo k překryvu fluorescenčních hladin. Pro chromosom 18 byly vytypovány primery A, B, D, H, J, M, R jejichž společný graf je prezentován v Obrázku 10.



**Obrázek 10:** Graf párů primerů pro chromosom 18 vybraných pro další experimenty. Na ose X jsou popsány jednotlivé pozice čipu. Pozice odpovídají následujícím párům primerů: 1=A, 2=B, 4=D, 8=H, 10=J, 13=M, 18=R. Nejnižší šedá vrstva odpovídá negativní DNA, nejnižší modrá vrstva odpovídá kompartmentům s amplikony z chromosomu 18, střední modrá vrstva odpovídá kompartmentům s amplikony získanými za využití páru primerů 21D a nejvyšší modrá vrstva odpovídá dvojitě pozitivním kompartmentům s amplikony z obou chromosomů.

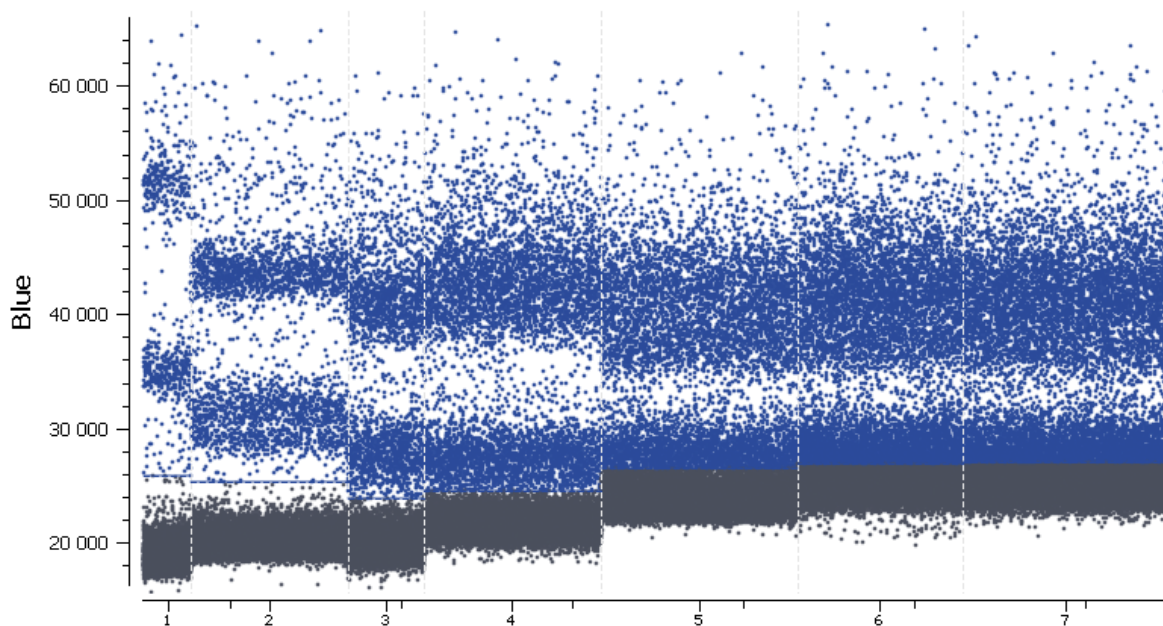
Pro chromosom 21 byly vytipovány primery D, H, K, L, M, P, R jejichž společný graf je na Obrázku 11.



**Obrázek 11:** Graf párů primerů pro chromosom 21 vybraných pro další experimenty. Na ose X jsou popsány jednotlivé pozice čipu. Pozice odpovídají následujícím primerům: 4=D, 8=H, 11=K, 12=L, 13=M, 16=P, 18=R. Nejnižší šedá vrstva odpovídá negativní DNA, nejnižší modrá vrstva odpovídá amplikonům získaným pomocí páru primerů 18A, střední modrá vrstva odpovídá amplikonům z chromosomu 21 a nejvyšší modrá vrstva odpovídá dvojitě pozitivním kompartmentům s amplikony z obou chromosomů.

### 5.1.3. Výběr počtu primerů

Výsledek experimentu nás přesvědčil o tom, že nejvhodnější počet primerů budou 4 primery pro chromosom 18 a 4 primery pro chromosom 21. Při vyšším počtu primerů již nelze jednoznačně určit rozhraní mezi hodnotami fluorescence pro jednotlivé chromosomy a tím pádem není možné vzorky vyhodnotit. Vlivu počtu primerů v multiplexu je dokumentován v Obrázku 12.



**Obrázek 12:** Výsledný graf vlivu počtu párů primerů na měření. Popisky na ose X odpovídají počtu primerů pro jednotlivé chromosomy.

Zároveň jsme se i přesvědčili dle Tabulky 16, že více primerů znamená více pozitivních částic, což je pro přesnost měření důležité.

**Tabulka 16:** Výsledné počty částic v závislosti na počtu primerů.

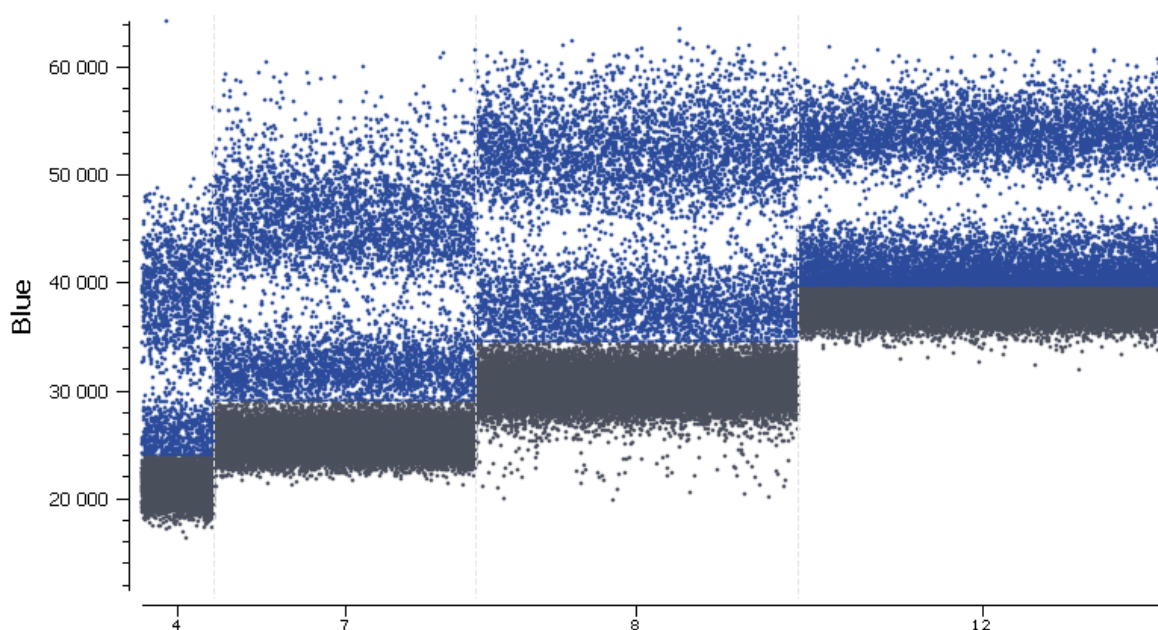
Pozice	Primery 18	Primery 21	Počet pozitivních částic
1	A	D	1065
2	AB	DH	1495
3	ABD	DHK	2572
4	ABDH	DHKL	2789
5	ABDHJ	DHKLM	Neurčitelné
6	ABDHJM	DHKLMP	Neurčitelné
7	ABDHJMR	DHKLMPR	Neurčitelné



## 5.1.4. Výběr koncentrace a objemu reaktantů

### 5.1.4.1. Primery

Výsledky experimentů zaměřených na koncentraci primerů ukázaly, že vhodná koncentrace pro vybranou sadu primerů se bude pohybovat někde okolo 5  $\mu\text{M}$  maximálně 8  $\mu\text{M}$ . Při této koncentraci lze ještě rozlišit jednotlivé hladiny fluorescence, jak je dokumentováno v Obrázku 13. Při vyšších koncentracích začnou tyto hladiny splývat. Zároveň s vyšší koncentrací primerů roste i počet pozitivních částic. Pro další práci byla tedy vybrána koncentrace primerů 5  $\mu\text{M}$ .



**Obrázek 13:** Výsledný graf pro experiment s koncentrací primerů. V pozici 4 je koncentrace 2,37  $\mu\text{M}$ , v pozici 7 je koncentrace 5,33  $\mu\text{M}$ , v pozici 8 je koncentrace 8  $\mu\text{M}$  a v pozici 12 je koncentrac 50  $\mu\text{M}$ .

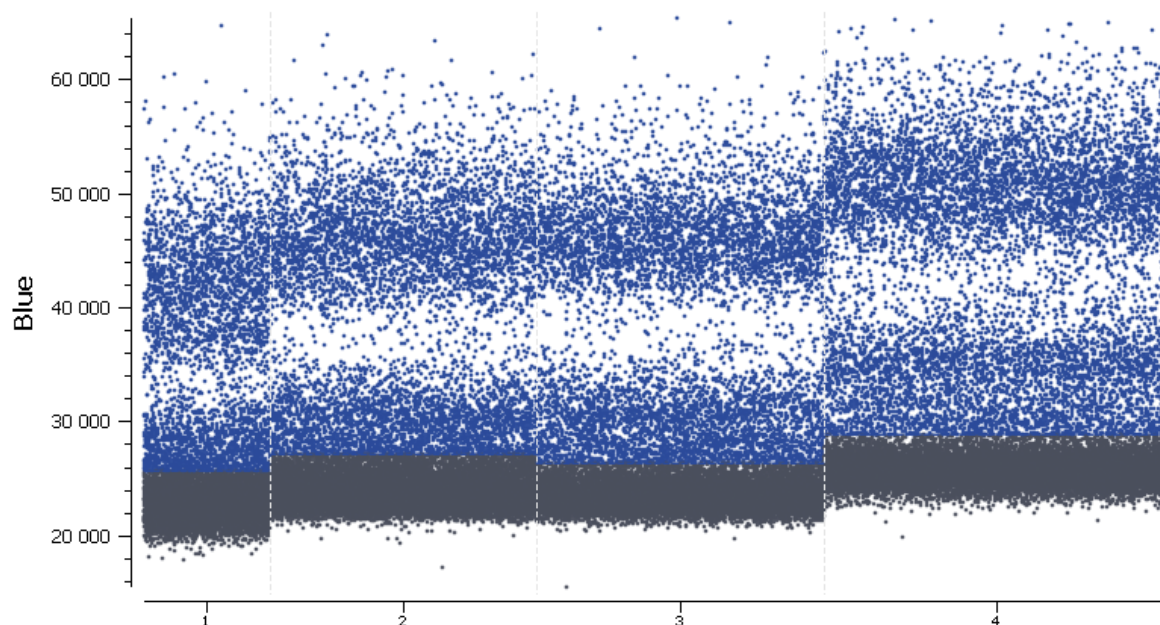
### 5.1.4.2. Vliv koncentrace mastermixu v reakci

Experiment s ředěním mastermixu nám ukázal, že pokud snížíme jeho množství v reakci, dostaneme více pozitivních částic, ovšem za cenu horší kvality, protože se ve vzorcích objevovalo více saturovaných objektů. Jediný vzorek, který byl softwarem vyhodnocen jako dostatečně kvalitní, byl ten s 10,5  $\mu\text{l}$  mastermixu v reakci. Výsledné hodnoty optimalizačních experimentů shrnuje Tabulka 17.

**Tabulka 17:** Tabulka porovnávající kvalitu jednotlivých měření.

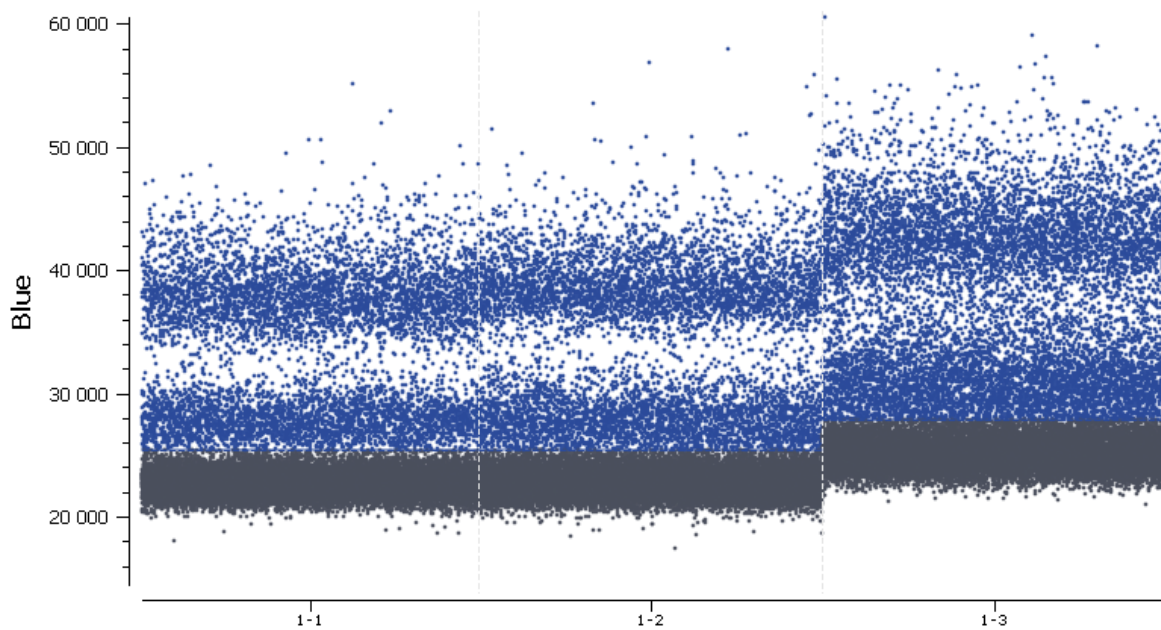
Množství mastermixu	Počet platných částic	Počet pozitivních částic	Počet saturovaných objektů
12,5 $\mu$ l	9555	3376	67
10,5 $\mu$ l	20344	6627	85
8,5 $\mu$ l	21918	6694	107
6,5 $\mu$ l	26356	8620	298

Co se týče možností interpretace, vzorky s 10,5  $\mu$ l a 8,5  $\mu$ l mastermixu mají nejlépe oddělené rozhraní mezi kompartmenty obsahujícími amplikony z jednotlivých chromosomů. Mezi fluorescencí negativních kapek a fluorescencí kapek s amplikony z chromosomu 18. chromosomu nejsou vidět výrazné rozdíly u všech vzorků, jak dokumentuje Obrázek 14.

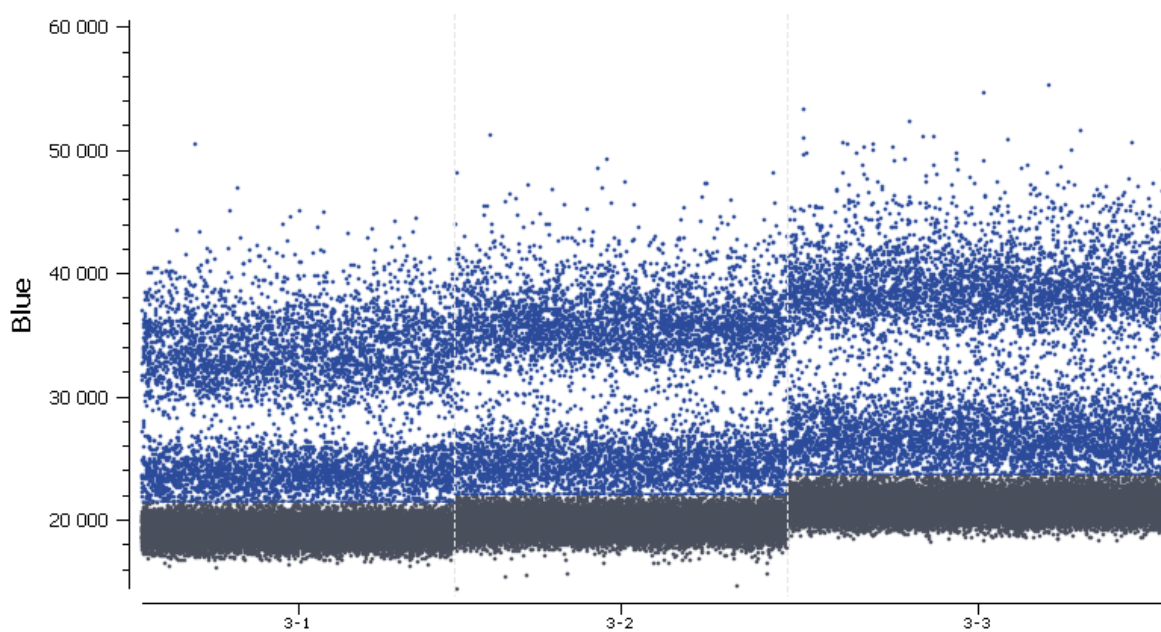


**Obrázek 14:** Výsledný graf pro různý objem mastermixu v reakci. V pozici 1 je 12,5  $\mu$ l mastermixu, v pozici 2 je 10,5  $\mu$ l mastermixu, v pozici 3 je 8,5  $\mu$ l mastermixu a v pozici 4 je 6,5  $\mu$ l mastermixu.

Druhý experiment kromě množství mastermixu operoval ještě s koncentrací primerů. Na Obrázcích 15 a 16 si můžeme všimnout, že lépe čitelnější rozhraní se nachází u vzorků, v nichž byly primery o koncentraci 5  $\mu$ M. Zvolili jsme tedy jako konečnou koncentraci primerů 5  $\mu$ M a množství mastermixu 10,5  $\mu$ l.



**Obrázek 15:** Výsledný graf pro experiment s koncentrací primerů 5  $\mu\text{M}$ . V pozici 1-1 je 12,5  $\mu\text{l}$  mastermixu, v pozici 1-2 je 10,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a v pozici 1-3 je 8,5  $\mu\text{l}$  mastermixu.

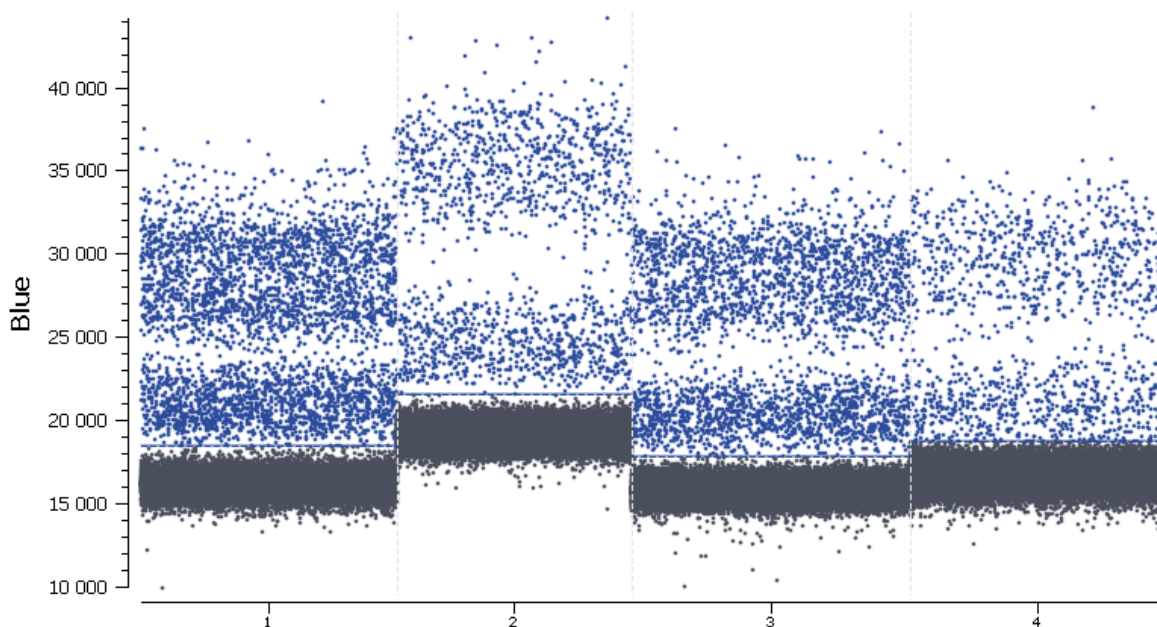


**Obrázek 16:** Výsledný graf pro experiment s koncentrací primerů 8  $\mu\text{M}$ . V pozici 3-1 je 12,5  $\mu\text{l}$  mastermixu, v pozici 3-2 je 10,5  $\mu\text{l}$  mastermixu a v pozici 3-3 je 8,5  $\mu\text{l}$  mastermixu.



### 5.1.4.3. Vliv koncentrace DNA v reakci

Získané výsledky byly přibližně dle očekávání. Vzorky, kde jsme DNA koncentrovali, měly vyšší podíl pozitivních částic než vzorky, které jsme nechali s původním objemem či ředili. Nevýhodou ale je, že při vyšší koncentraci DNA se nám hůře rozlišují jednotlivé hladiny fluorescence, což by mohla být komplikace. Vše je znázorněno v Obrázku 17

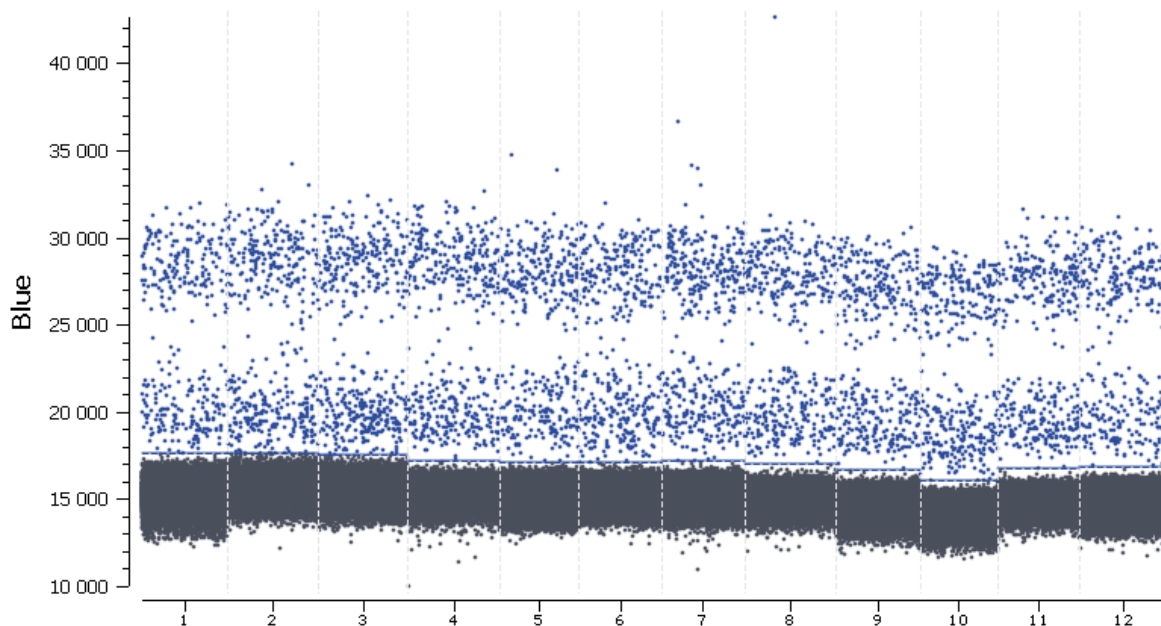


**Obrázek 17:** Graf porovnávající vliv množství a koncentrování DNA. Na obrázku byla pro zachování přehlednosti vybrána vždy jedna pozice z 12. Na ose X jsou označeny pozice jednotlivých experimentů. 1 = 22  $\mu$ l DNA z 1 ml plasmy (odpařováno), 2 = 62  $\mu$ l DNA z 1 ml plasmy, 3 = 62  $\mu$ l z 2 ml plasmy (odpařováno), 4 = 100  $\mu$ l DNA z 2 ml plasmy

Nejlépe rozlišitelná byla situace číslo 2, kde byla DNA vyizolovaná z 1 ml krevní plasmy a bez ředění a odpařování byla rozpipetována do jednotlivých pozic.

### 5.1.5. Konečný design experimentu

Po dokončení optimalizace byly vzorky zpracovávány dle optimalizovaného protokolu. Z jednoho vzorku bylo vytvořeno 12 technických replikátů, které byly pro finální výpočet koncentrace v programu Crystal Miner spojeny. Ukázkou naměřeného vzorku můžete vidět v Obrázku 18.



**Obrázek 18:** Ukázka konečného designu experimentu. Na ose X jsou čísla jednotlivých technických replikátů. Šedivě jsou označeny negativní kompartmenty. Dále lze rozlišit dvě výrazné modré hladiny, nižší pro amplikony z chromosomu 18 a vyšší pro amplikony z chromosomu 21. Nad hladinou pro chromosomu 21 se občas vyskytují dvojitě pozitivní kompartmenty obsahující amplikony jak z chromosomu 18, tak z chromosomu 21.

Po vypočítání počtu kopií na  $\mu\text{l}$  sekvencí ze sledovaných chromosomů je pak možno přistoupit k výpočtu jejich poměru. Vždy je počítán poměr počtu kopií/ $\mu\text{l}$  amplikonů z chromosomu 21 ku počtu kopií/ $\mu\text{l}$  amplikonů z chromosomu 18. Tyto naměřené poměry jsou pak výsledkem naší diagnostické metody

### 5.1.6. Nastavení prahových hodnot fluorescence

Prahy mezi hodnotami fluorescence jednotlivých typů částic jsme v programu Crystal Miner stanovovali celkem třikrát a poté byl z jednotlivých měření vypočten průměr a směrodatná odchylka. Viz Obrázek 9 v metodách.

V některých případech jsou výsledky měření téměř identické, ale v některých si můžeme všimnout velké směrodatné odchylky. Většina vzorků s velkou směrodatnou odchylkou nemá jasně viditelná rozhraní a v některých případech se klastry částic překrývají. Proto se naměřené výsledky tolik liší. Výsledky jednotlivých poměrů ze třech opakovaných měření jsou k nahlédnutí v Tabulce 18 pro trisomie a v Tabulce 19 pro zdravé kontroly.

**Tabulka 18:** Výsledky 3 sérií měření pro soubor vzorků s trisomií chromosomu 21 u plodu. Jedná se o naměřené poměry počtu kopií/μl ampliconů z chromosomu 21 ku počtu kopií/μl ampliconů z chromosomu 18.  $\sigma$  = směrodatná odchylka.

T21, číslo vzorku	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr	$\sigma$
1	1,2058	1,1925	1,2120	1,2035	0,0081
2	1,3360	1,3229	1,3457	1,3349	0,0094
3	1,2099	1,2246	1,2483	1,2276	0,0158
4	1,1735	1,1600	1,1930	1,1755	0,0135
5	1,2463	1,2381	1,2419	1,2421	0,0033
6	1,2084	1,2099	1,2052	1,2078	0,0019
7	1,1635	1,1222	1,1752	1,1536	0,0227
8	1,1006	1,0923	1,1038	1,0989	0,0049
9	1,1548	1,1400	1,1156	1,1368	0,0162
10	1,1507	1,1431	1,1566	1,1501	0,0055
11	1,0591	1,1022	1,1106	1,0907	0,0225
12	1,1612	1,2042	1,1932	1,1862	0,0182
13	1,0598	1,0739	1,0899	1,0745	0,0123
14	1,1612	1,1881	1,1946	1,1813	0,0144
15	1,1247	1,1416	1,1400	1,1354	0,0076
Průměr	1,1677	1,1704	1,1817	1,1733	0,0061

**Tabulka 19:** Výsledky 3 sérií měření pro soubor euploidních těhotenství. Jedná se o naměřené poměry počtu kopií/ $\mu$ l amplikonů z chromosomu 21 ku počtu kopií/ $\mu$ l amplikonů z chromosomu 18.  $\sigma$  = směrodatná odchylka.

Kontrola, číslo vzorku	1. měření	2. měření	3. měření	Průměr	$\sigma$
1	1,1731	1,1746	1,1829	1,1769	0,0043
2	1,1228	1,1289	1,1047	1,1188	0,0103
3	1,0717	1,0915	1,0866	1,0833	0,0084
4	1,0391	1,0704	1,0578	1,0558	0,0129
5	1,0515	1,0714	1,0617	1,0615	0,0081
6	1,0381	1,0678	1,0701	1,0587	0,0146
7	1,1685	1,1747	1,1685	1,1706	0,0029
8	1,1795	1,2336	1,2184	1,2105	0,0228
9	1,0691	1,0736	1,0819	1,0749	0,0053
10	1,1439	1,1834	1,1695	1,1656	0,0164
11	1,1356	1,1417	1,1456	1,1410	0,0041
12	1,0786	1,0754	1,0748	1,0763	0,0017
13	1,1628	1,1664	1,1584	1,1625	0,0033
14	1,0905	1,1097	1,1079	1,1027	0,0087
15	1,1371	1,1244	1,1528	1,1381	0,0116
16	1,0311	1,0223	1,0244	1,0259	0,0037
17	1,0998	1,0980	1,1024	1,1001	0,0018
18	1,0342	1,0416	1,0356	1,0371	0,0032
19	1,0785	1,0738	1,0820	1,0781	0,0034
20	1,0526	1,0413	1,0331	1,0423	0,0080
21	1,0347	1,0313	1,0270	1,0310	0,0032
22	1,0374	1,0327	1,0408	1,0370	0,0034
23	1,0383	1,0476	1,0432	1,0430	0,0038
24	1,1076	1,1171	1,1103	1,1117	0,0040
25	1,1569	1,1349	1,1384	1,1434	0,0097
Průměr	1,0933	1,1011	1,0992	1,0979	0,0033

## 5.2. Vyšetření klinických vzorků

### 5.2.1. Vyhodnocení souboru kontrolních vzorků

Výše popsaným způsobem jsme jako průměr ze třech měření získali poměry počtu kopií/ $\mu$ l amplikonů z chromosomu 21 ku počtu kopií/ $\mu$ l amplikonů z chromosomu 18 u všech analyzovaných vzorků. Pro soubor euploidních těhotenství jsme získali průměr 1,0978 se směrodatnou odchylkou 0,523. Od této hodnoty jsme pak následně určily prahy spolehlivosti, kdy pro 95% hladinu spolehlivosti (1,96 násobek směrodatné odchylky) poměry vyšší než 1,2004 nespádají mezi euploidní vzorky a pro 99% hladinu spolehlivosti (2,56 násobek směrodatné odchylky) vzorky s poměrem nad 1,2328 jsou suspektní z trisomie 21. chromosomu (Dekking 2005). Výsledky jsou znázorněny v Tabulce 20.

**Tabulka 20:** Výsledky naměřených poměrů pro kontrolní vzorky.  $\sigma$  = směrodatná odchylka. Gestační věk T1 = 1. trimestr těhotenství. Poč. kap. = počet analyzovatelných kapiček, Další tři sloupce udávají také počet kapiček (negativní, pozitivní pro amplikony z chromosomu 18 a pozitivní pro amplikony z chromosomu 21).

Kontrola, číslo vzorku	Gestační věk	Poč.kap.	Negativní	Pozitivní	Pozitivní	Počet kopií / $\mu$ l		Poměr 21/18
				Chr. 18	Chr. 21	Chr. 18	Chr. 21	
1	T1	298729	280520	8149	10060	248,29	292,20	1,1769
2	T1	290566	285316	2459	2791	73,75	82,50	1,1187
3	T1	294286	283371	5200	5715	154,47	167,33	1,0833
4	T1	292621	287887	2303	2431	67,48	71,23	1,0556
5	T1	236745	221821	7116	7808	269,48	286,03	1,0614
6	T1	257870	252767	2481	2622	82,38	87,20	1,0585
7	T1	273814	265001	4011	4802	129,00	151,00	1,1706
8	T1	217102	210210	3107	3785	124,01	150,07	1,2101
9	T1	249838	244459	2575	2804	89,47	96,17	1,0748
10	T1	256639	249094	3471	4074	117,19	136,57	1,1654
11	T1	268682	264733	1831	2118	59,19	67,53	1,1410
12	T1	295362	291515	1851	1996	54,08	58,20	1,0762
13	T1	312227	307369	2232	2626	62,11	72,20	1,1625
14	T1	292490	288447	1915	2128	56,47	62,27	1,1027
15	T1	197778	194199	1661	1918	73,05	83,13	1,1380
16	T1	300244	295460	2337	2447	67,94	69,70	1,0259
17	T1	242346	239842	1186	1318	42,27	46,50	1,1001
18	T1	281288	273573	3784	3931	116,51	120,83	1,0371
19	T1	262612	254918	3650	4044	122,62	132,20	1,0781
20	T1	229659	226263	1648	1748	62,65	65,30	1,0423
21	T1	287873	281368	3179	3326	96,32	99,30	1,0310
22	T1	285895	272857	6347	6691	195,76	203,00	1,0370
23	T1	225369	218726	3224	3419	124,89	130,27	1,0430
24	T1	274874	269416	2569	2889	82,07	91,23	1,1117
25	T1	270669	265659	2301	2709	74,87	85,60	1,1433
Průměr								1,0978
$\sigma$								0,0523
95%								1,2004
99%								1,2328

## 5.2.2. Vyhodnocení souboru vzorků s T21 u plodu

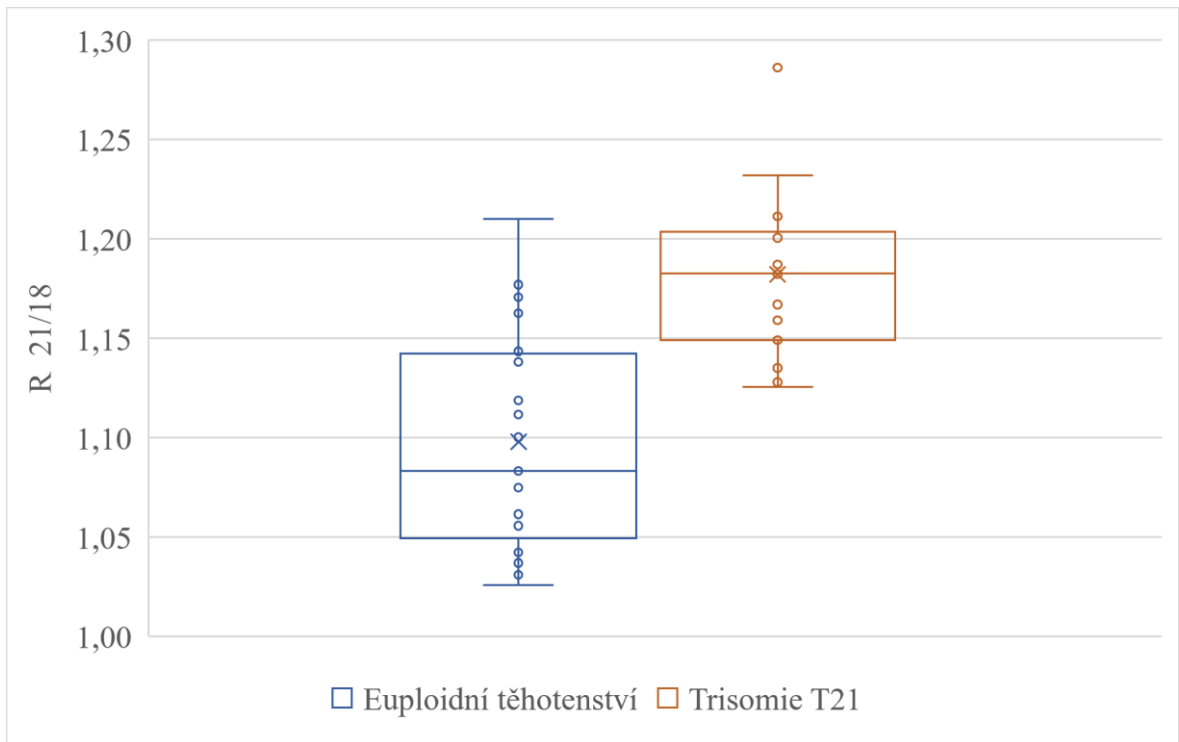
Pro soubor vzorků s T21 u plodu jsme získali jako průměr ze třech měření poměry počtu kopií/ $\mu$ l amplikonů z chromosomu 21 ku počtu kopií/ $\mu$ l amplikonů z chromosomu 18.

Výsledné poměry jsme poté hodnotili oproti datům získaným z měření zdravých kontrol.

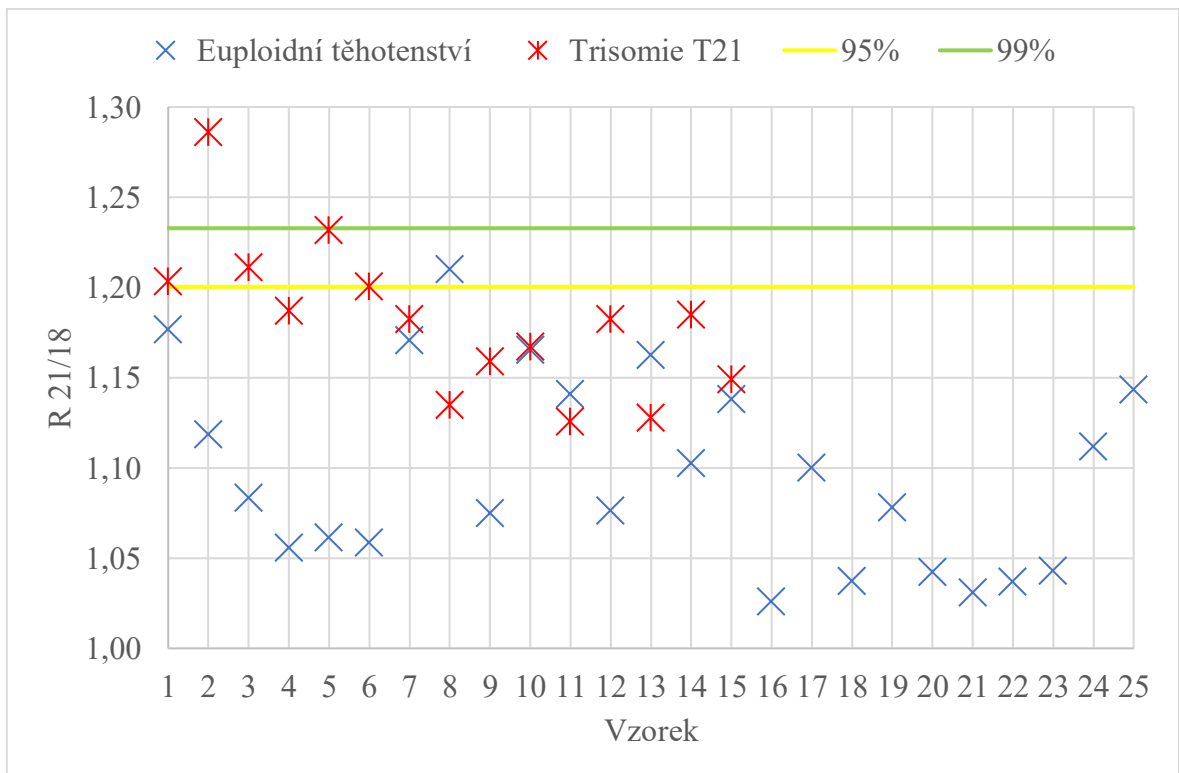
**Tabulka 21:** Tabulka s naměřenými výsledky vzorků od těhotných s T21. T1 = 1. trimestr těhotenství, T2 = 2. trimestr těhotenství, Poč. kap. = počet analyzovatelných kapiček, Další tři sloupce udávají také počet kapiček (negativní, pozitivní pro amplikony z chromosomu 18 a pozitivní pro amplikony z chromosomu 21). N = Negativní výsledek na trisomii 21, P 95 = pozitivní výsledek s 95% jistotou, P 99 = pozitivní výsledek s 99% jistotou.

T21, číslo vzorku	Gestační věk	Poč.kap.	Negativní	Pozitivní		Počet kopií / $\mu$ l		Poměr 21/18	Výsledek vyšetření
				Chr. 18	Chr. 21	Chr. 18	Chr. 21		
1	T1	256567	247001	4278	5288	147,55	177,57	1,2034	P 95
2	T1	222140	214513	3237	4390	134,56	173,07	1,2861	P 99
3	T1	246596	241481	2297	2818	102,87	124,60	1,2113	P 95
4	T2	221952	216133	2628	3191	118,39	140,53	1,1871	N
5	T1	192789	180994	5177	6618	209,95	258,63	1,2319	P 95
6	T1	241273	235574	2559	3140	111,38	133,70	1,2004	P 95
7	T1	227674	224005	1690	1979	88,73	104,90	1,1823	N
8	T2	262030	253592	4024	4414	136,50	154,93	1,1350	N
9	T1	204209	198623	2125	3461	120,93	140,17	1,1591	N
10	T2	292768	282822	4376	5570	144,39	168,50	1,1670	N
11	T1	239527	232564	3335	3628	130,04	146,37	1,1256	N
12	T1	278692	269009	4409	5274	141,74	167,60	1,1824	N
13	T1	278629	272529	2943	3157	109,97	124,03	1,1278	N
14	T2	229120	224752	2009	2359	99,80	118,27	1,1850	N
15	T2	277242	264104	6078	7060	178,97	205,63	1,1490	N

S pomocí našeho multiplexu jsme 4 vzorky určili jako trisomické s 95 % jistotou a 1 vzorek se nám podařilo určit s 99% jistotou. Zbýlých 10 vzorků se pohybovalo pod 95 % hladinou spolehlivosti, jak je znázorněno v Tabulce 21. S jistotou ale můžeme tvrdit, že všechny naměřené hodnoty trisomií se pohybují nad průměrnou hodnotou kontrol, jak je patrné na Obrázku 19. Při porovnání hodnot poměrů získaných u kontrolních euploidních těhotenství a těhotenství s T21 byl jednostranným Mann-Whitneyovým testem nalezen na hladině významnosti alfa = 0,05 signifikantní rozdíl ( $p=0,00066$ ). Na Obrázku 20 jsou znázorněna všechny měření oproti vypočítaným hladinám spolehlivosti pro určení trisomie 21. chromosomu.



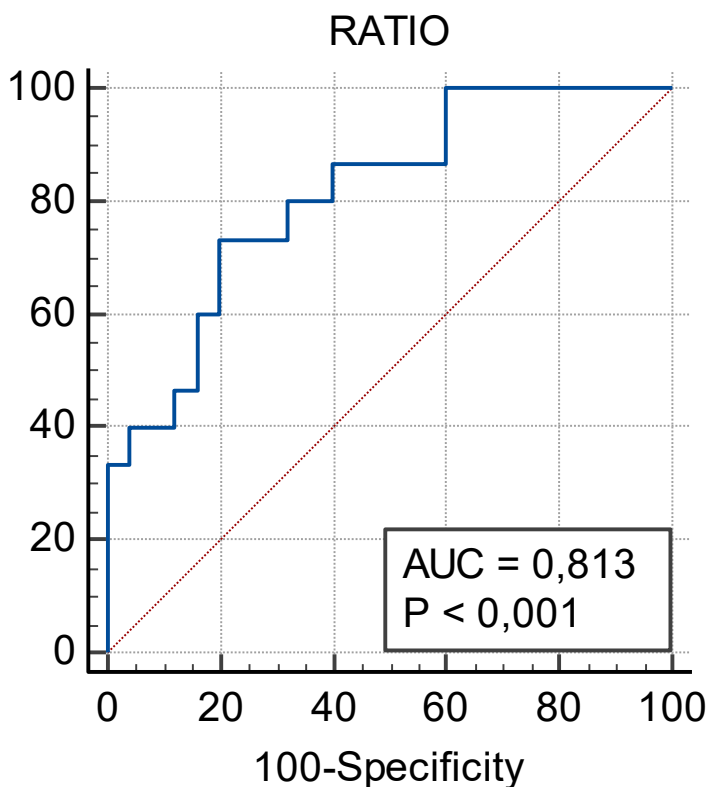
**Obrázek 19:** Krabicový diagram z naměřených dat souborů těhotenství s euploidními plody a s plody s T21  $R_{21/18}$  = naměřený poměr amplikonů z 21. a z 18. chromosomu.



**Obrázek 20:** Porovnání naměřených hodnot souborů těhotenství s euploidními plody a plody trisomií T21 oproti prahům spolehlivosti pro 95% (žlutá čára) a 99% (zelená čára).  $R_{21/18}$  = naměřený poměr amplikonů z 21. a z 18. chromosomu.

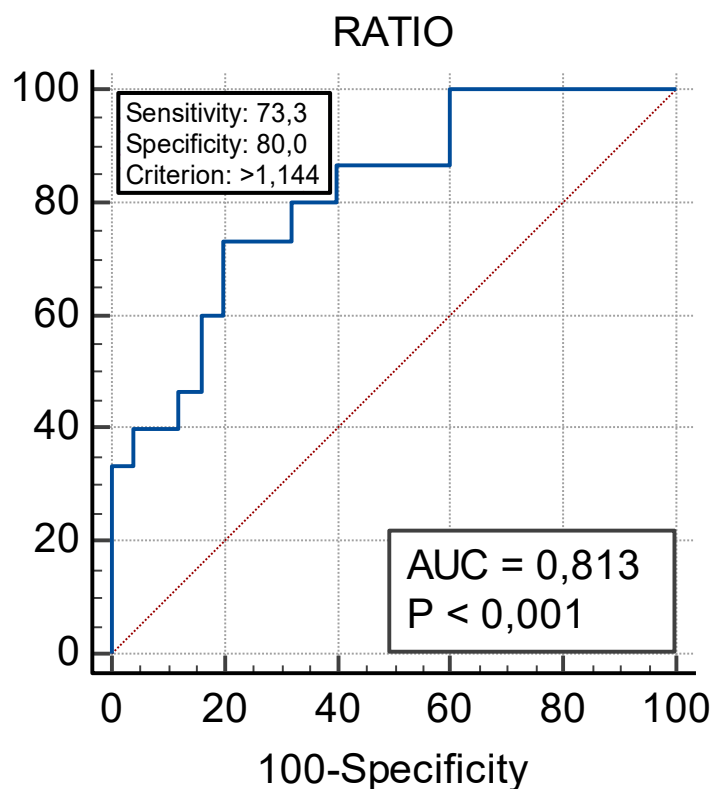
### 5.3. Statistická analýza

Po podrobení našich dat statistické analýze jsme získali následující výsledky: Při nastavení cut-off hodnoty naměřeného poměru na 1,144 dosáhla naše metoda senzitivity 73,3 % a specificity 80 %, jak je znázorněno v Obrázku



**Obrázek 21.** V tomto případě z 25 zdravých těhotenství budeme mít 5 falešně pozitivních a z 15 diagnostikovaných T21 těhotenství 4 falešně negativní. Při cut-off hodnotě 1,21 bychom dosáhli 100 % specificity, ale jen 20 % senzitivity. Při tomto prahu bychom měli 1 falešně pozitivní výsledek a 12 falešně negativních. Při nejpřísnějším navrhnutém prahu 1,084 bychom dostali senzitivitu 93,3 % a specificitu 56 %, což znamená 12 falešně pozitivních a 2 falešně negativní výsledky.





**Obrázek 21:** ROC křivky pro námi naměřená data pro cut-off hodnotu 1,144. Na ose X je vynesena specifita v % odečtená od 100, na ose Y je vynesena senzitivita v %. AUC = oblast pod křivkou, P = hladina spolehlivosti.

Dalším důležitým statistickým kritériem je přesnost. U ddPCR je pro přesnost podstatný počet analyzovaných kompartmentů – kapek. Použitím 12 technických replikátů a jejich sjednocením zvyšujeme, tak přesnost našeho měření. Sjednocení nemá vliv na procento pozitivních kompartmentů. Vliv sjednocení 12 technických replikátů na přesnost je k nahlédnutí v Tabulce 22.

**Tabulka 22:** Vliv sjednocení 12 pozic na čipu na přesnost měření.

Pozice	Počet kapek	Poz. % kapek	Chyba měření
1	26 307	4,43%	4,65%
2	26 907	4,73%	4,49%
3	26 534	4,36%	4,68%
4	27 345	4,70%	4,51%
5	22 868	4,45%	4,65%
6	22 617	4,96%	4,41%
7	20 306	4,73%	4,52%
8	24 582	4,61%	4,56%
9	22 817	4,20%	4,79%
10	21 411	4,47%	4,64%
11	21 729	4,44%	4,66%
12	22 472	4,57%	4,59%
Sjednocení	285 895	4,56%	1,30%

Průměrně jsme během 40 měření dosáhli počtu 259 170 kompartmentů na analýzu jednoho vzorku a po sjednocení 12 technických replikátů jsme dosáhli průměrné chyby měření 1,80 %, jak dokumentuje Tabulka 23.

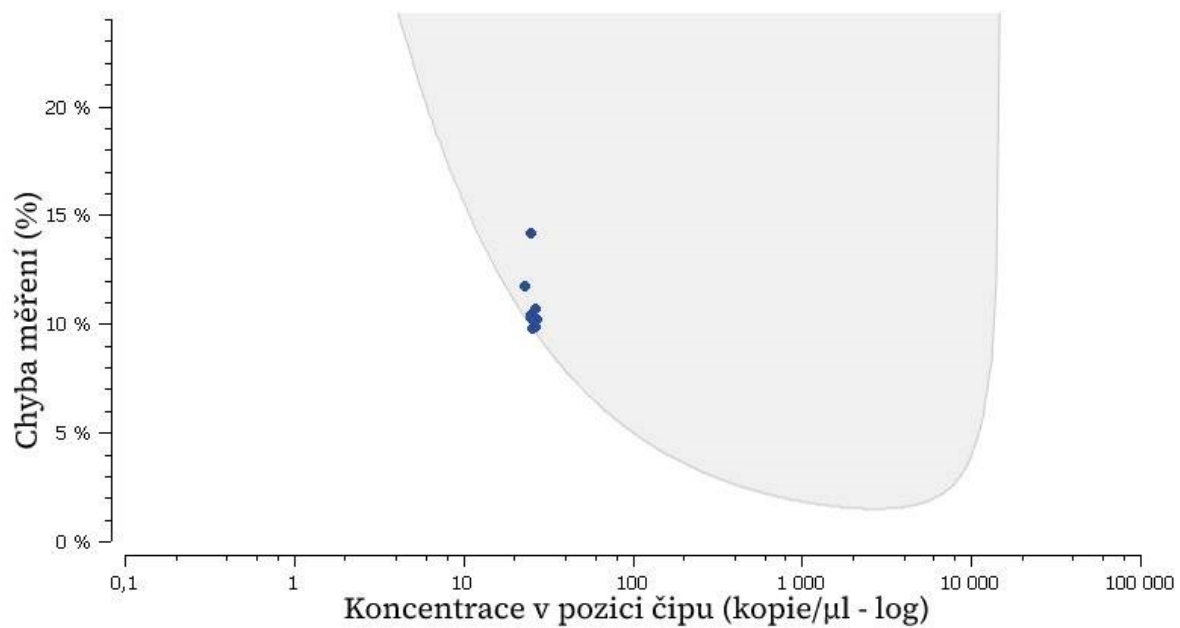
**Tabulka 23:** Tabulka počtu analyzovaných kapek v jednotlivých měřeních a chyby měření. K = kontrola, T = trisomie,  $\sigma$  = směrodatná odchylka.

Vzorek	Poč. část.	Chyba měření	Vzorek	Poč. část.	Chyba měření	Vzorek	Poč. část.	Chyba měření
K1	298 729	1,13%	K16	300 244	2,20%	T6	241 273	1,81%
K2	290 566	2,07%	K17	242 346	2,74%	T7	227 674	2,29%
K3	294 286	1,44%	K18	281 288	1,68%	T8	262 030	1,57%
K4	292 621	2,18%	K19	262 612	1,62%	T9	204 209	1,69%
K5	236 745	1,12%	K20	229 659	2,29%	T10	292 768	1,48%
K6	257 870	1,98%	K21	287 873	1,85%	T11	239 527	1,63%
K7	273 814	1,55%	K22	285 895	1,30%	T12	278 692	1,49%
K8	217 102	1,57%	K23	225 369	1,62%	T13	278 629	1,88%
K9	249 838	1,90%	K24	274 874	1,96%	T14	229 120	2,02%
K10	256 639	1,62%	K25	270 669	2,04%	T15	277 242	1,28%
K11	268 682	2,29%	T1	256 567	1,44%	Průměr	259 170	1,80%
K12	295 362	2,43%	T2	222 140	1,51%	SD	30 884	0,38%
K13	312 227	2,22%	T3	246 596	1,93%	Min.	192 789	1,12%
K14	292 490	2,36%	T4	221 952	1,72%	Max.	312 227	2,74%
K15	197 778	2,07%	T5	192 789	1,14%	Medián	262 321	1,77%

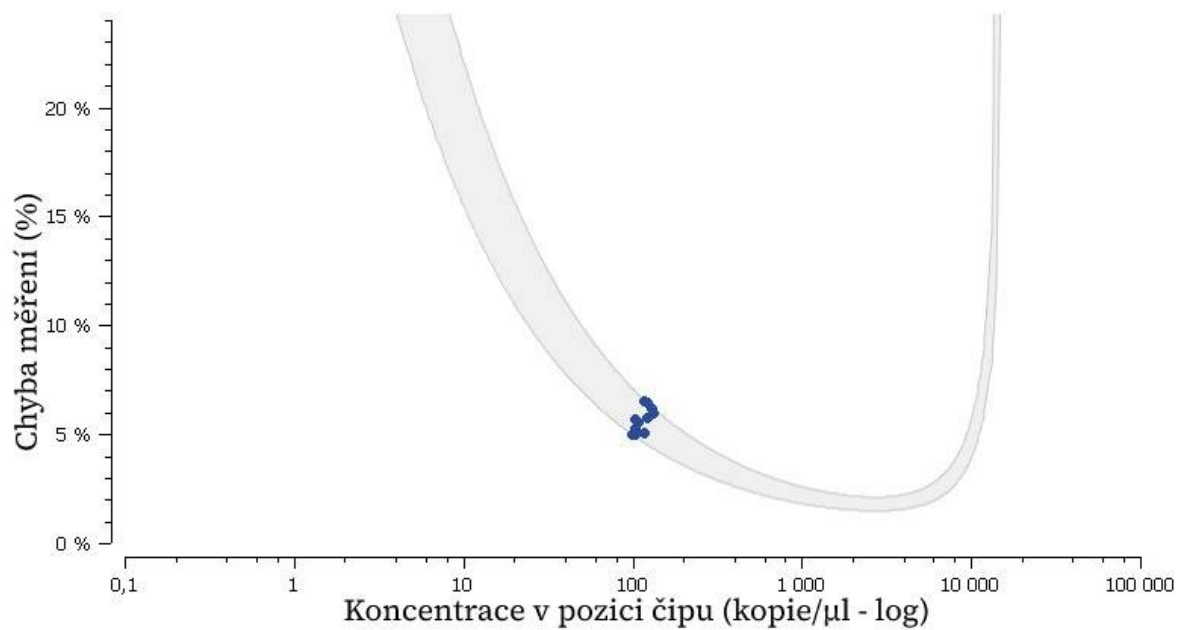
Druhý parametr ovládající přesnost dPCR je procento pozitivních částic, v tomto ohledu nedosahujeme zdaleka takových výsledků, jak je uvedeno v Tabulce 24. Procento pozitivních částic se u našich vzorků pohybuje od 0,8 % do 6,3 %. Na Obrázcích 22 a 23 si můžete všimnout, jakou konkrétní chybu měření pro nás tyto hodnoty představují. Tyto hodnoty vyznačené v grafech poskytnutých softwarem Stilla Miner odpovídají jednotlivým pozicím na čipu.

**Tabulka 24:** Tabulka procentuálního zastoupení pozitivních kapek v analýzách jednotlivých vzorků. K = kontrola, T = Trisomie,  $\sigma$  = směrodatná odchylka

Vzorek	Poz. %. kapek	Vzorek	Poz. %. kapek	Vzorek	Poz. %. kapek
K1	6,09549	K16	1,59337	T6	2,36205
K2	1,80682	K17	1,03323	T7	1,61151
K3	3,70898	K18	2,74274	T8	3,22024
K4	1,61779	K19	2,92980	T9	2,73543
K5	6,30383	K20	1,47871	T10	3,39723
K6	1,97890	K21	2,25968	T11	2,90698
K7	3,21861	K22	4,56042	T12	3,47444
K8	3,17454	K23	2,94761	T13	2,18929
K9	2,15300	K24	1,98564	T14	1,90642
K10	2,93993	K25	1,85097	T15	4,73882
K11	1,46977	T1	3,72846	Průměr	2,76046
K12	1,30247	T2	3,43342	$\sigma$	1,30339
K13	1,55592	T3	2,07424	Minimum	1,03323
K14	1,38227	T4	2,62174	Maximum	6,30383
K15	1,80960	T5	6,11809	Medián	2,49190



Obrázek 22: Graf nejistoty pro 0,8 % pozitivních částic.



Obrázek 23: Graf nejistoty pro 6,3 % pozitivních částic.

## 6. Diskuse

Vyvinuli jsme multiplex, který zkombinoval dvě techniky fluorescenčního značení amplikonů využitím interkalačního barviva EvaGreen a fluorescenční sondy značené 6-FAM. Vyvinutá metoda dále rozšiřuje portfolio metod mutiplexování využitelných pro analýzu pomocí dPCR. Po optimalizaci protokolu byl touto metodou vyšetřen soubor vzorků plazem získaných od těhotných s euploidními těhotenstvími a těhotenstvími s trisomií 21. chromosomu. Cílem bylo zjištění, zda tato metoda má potenciál uplatnit se jako alternativa pro neinvazivní prenatální screening trisomie 21. Zde budou charakterizovány zjištěné limity testované metody a diskutovány cesty vedoucí k jejich posunutí či odstranění.

### 6.1. Vznik precipitátů

V některých případech docházelo v kapkách ke vzniku precipitátů, které mohou pak ovlivnit kvalitu měření. Pokud se v kapičce vyskytne precipitát, software kontroly kvality ji vyřadí jako neplatnou, což při velkém množství precipitátů dokáže snížit počet analyzovatelných kapiček o několik tisíc. Výrobce systému Stilla Technologies, doporučuje pro EvaGreen a fluorescenční sondy použít 2 odlišné mastermixy. Používali jsme mastermix doporučený pro EvaGreen ve kterém se ukázalo, že je fluorescenční sonda schopna fungovat. Po konzultaci s techniky Stilly Technologies se domníváme, že precipitáty mohou vznikat z několika důvodů. Prvním důvodem by mohlo být právě používání mastermixu neoptimalizovaného pro reakci se sondami. Řešením toho problému by mohlo být použití upraveného mastermixu s vlastními parametry. Tato procedura by si ale žádala další rozsáhlou optimalizaci. Stilla Technologies po konzultaci dále navrhuje použití PCR protokolu s úvodní denaturací kratší než 3 minuty, kdyby se mělo množství precipitátů snížit. Dalšími důvody vzniku precipitátů mohou být podmínky během PCR eseje a způsob izolace DNA. Jiné řešení se nám naskýtá z hlediska používaného softwaru pro kontrolu kvality. V softwaru můžeme nastavit jiný templát pro kontrolu kvality, který na základě analýzy fluorescence AlexaFluor647 v červeném kanále spočítá celkový počet analyzovaných kapiček a upraví tak kontrolu kvality. Tento postup je možný pouze, pokud má přístroj k dispozici systém pro detekci v červeném kanále.

## 6.2. Nepřesnost dPCR

Na přesnost dPCR má vliv několik faktorů. Hlavními faktory ale jsou počet analyzovaných částic a procento pozitivních částic (Kanagal-Shamanna 2016).

Zvýšením procenta pozitivních částic bychom mohli dosáhnout několika způsoby, jak na danou problematiku upozorňuje Tan a kolektiv (Tan et al. 2019). Jednou z cest je přidání více párů primerů, což bohužel design našeho multiplexu neumožňuje. Při přidání další dvojice primerů již nejsme schopni určit hranici mezi negativními a pozitivními částicemi, což celkově znemožňuje měření. Schůdnější cestou by bylo využít pro náš multiplex více krevní plasmy, kterou po izolaci ještě budeme koncentrovat. Tento postup jsme bohužel nemohli aplikovat, vzhledem k dostupnému množství krevní plasmy. Další způsob, kterým bychom mohli zlepšit kvalitu našeho měření je využití ještě lepší metody izolace DNA z krevní plasmy s větším výtěžkem. Tímto způsobem bychom ze stejné množství krevní plasmy získali více analyzovatelné DNA, což by nám mohlo pomoci s navýšením počtu pozitivních částic.

Jako druhý důvod pro nepřesnosti dPCR se uvádí nedostatečný počet analyzovatelných částic. V našem případě na jeden vzorek používáme celkem 3 čipy o 4 pozicích. Tímto rozložením vzorků do několika čipů jsme schopni dosahovat průměrně 250 000 analyzovatelných částic a využíváme maximální potenciál cykleru a skenovacího přístroje, bez nutnosti rozložit si měření do několika experimentů. V tomto ohledu si proto myslíme, že jsme dosáhli vhodných podmínek, pro minimalizaci nepřesnosti pramenící z nízkého počtu analyzovaných kompartmentů - kapiček. Konkrétní počty analyzovaných kapiček jsou k dispozici v Tabulce **Tabulka 23**: Tabulka počtu analyzovaných kapek v jednotlivých měřeních a chyby měření. K = kontrola, T = trisomie,  $\sigma$  = směrodatná odchylka.23.

Podstatným faktem ddPCR od společnosti Stilla je, že ne všechna pracně vyizolovaná DNA se dostane do reakce. Čip má relativně velký mrtvý objem. Do jedné komory čipu se vkládá 25  $\mu$ l reakční směsi. Reakční směs se pak musí rozčlenit do kompartmentů, aby mohla proběhnout reakce. Kvalitní sken jedné komory začíná od 25 000 analyzovatelných kompartmentů. Přibližná velikost jednoho kompartmentu je dle výrobce 0,59 nl. Do reakce se tak dostává 14,75  $\mu$ l reakční směsi a zbylých 10,25 zůstává nevyužitých. Poměr reaktantů by měl v kompartmentech zachován, jen velká část vzorku zůstává nevyužita.

### **6.3. Rozlišení prahů pro odečet pozitivních částic**

Pro vypočítání poměru amplikonů z chromosomů 18 a 21 musíme vždy manuálně v softwaru určit práh, od kterého bude vypočítávat koncentraci pozitivních částic. Vzhledem k tomu, že je náš multiplex založen na měření amplitud fluorescence, máme v našem měření několik skupin pozitivních částic. Tyto skupiny musíme od sebe odlišit. Při nastavování prahu positivity se můžeme setkat s výsledky měření, u kterých je často obtížné pro pozorovatele stanovit toto rozhraní, čímž může být ovlivněn vypočtený poměr. Větších rozdílů ve fluorescenci jednotlivých klastrů odpovídajících sledovaným chromosomům jsme dosahovali při použití menšího množství párů primerů, což ale není optimálním řešením, protože se tím snižuje přesnost měření (Tan et al. 2019). Řešením tohoto problému by mohlo být vyhodnocování jednotlivých fluorescenčních amplitud na základně normální distribuce fluorescence jednotlivých kapiček. Společně se skupinou profesora Pavla Neužila byl vyvinut algoritmus, který je schopen z exportovaných dat vypočítat poměry mezi počten kopií amplikonů z chromosomu 21 a chromosomu 18 a tím snížit chybu měření způsobenou lidským faktorem. (Zhang et al. 2022) Aplikace této metody by zajisté pomohla s rozlišováním problémových hranic a zároveň by dovolila vložit do reakce více DNA či párů primerů, protože by se zlepšila schopnost rozlišit jednotlivé klastry kompartmentů. Zvýšení vstupního množství DNA či přidání další skupiny primerů je jedna z cest, kterou se dá zvýšit přesnost multiplexu.

### **6.4. Velikost fetální frakce**

Obecným problémem diagnostiky z volné DNA je stanovení velikosti fetální frakce DNA. Tento poměr je obtížné změřit zejména u plodů ženského pohlaví, protože nemůžeme použít k porovnání sekvence z chromosomu Y, které nejsou přítomné ve volné DNA matky. Znalost velikosti fetální frakce je pak zásadní, abychom věděli, vůči které hodnotě máme naměřený poměr porovnávat. Další problém nastává, pokud je fetální frakce velmi malá, a tak nejsme schopni ve vzorku spolehlivě určit, zda se například zvýšená hodnota sledovaného poměru nedá přičíst běžné odchylce měření. Pokud bychom tedy znali přesnou velikost fetální frakce, měli bychom další vodítko, které můžeme použít ke stanovení diagnózy. Již samozřejmě existují některé metody, které umí určit procento fetální frakce DNA matky, ale vyžadují druhé měření, které vyžaduje větší objem krevní plasmy. Zajímavým řešením této situace by bylo vyvinutí systému, který by dokázal rozlišit fetální a maternální DNA a analyzovat tak jen fetální frakce ve volné DNA.

V tomto ohledu by nám mohla pomoci analýza fragmentů DNA, fragmentomika. Fragmentační vzorce se mohou lišit dle epigenetických modifikací maternální a fetální volné DNA. Při aplikaci tohoto objevu bychom mohli být schopni rozlišit fetální a maternální volnou DNA. Při ještě optimističtější představě rovnou při tomto rozlišení identifikovat počty konkrétních chromosomů ve volné fetální DNA (Liu 2022).

### **6.5. Využití multiplexu v klinické praxi**

Vyvinutý multiplex dle analýzy oblasti pod křivkou (AUC) dosahuje senzitivity 73,3 % a specifity 80 %, což je srovnatelné s dalšími běžně používanými technikami neinvazivní prenatalní diagnostiky. Například biochemický test se třemi markery má senzitivitu 69 %, ultrazvukový marker jako je absence nasální kůstky má senzitivitu 49 % (American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics et al. 2020). Existují však další metody, které v těchto ohledech dosahují lepších výsledků, ať jsou to již jinak designované multiplex dPCR využívající dvě fluorescenční sondy (Tan et al), qPCR rovněž s více fluorescenčními sondami (Khatabbi et al.) nebo sekvenování příští generace (NGS)- sem nějakou citaci.

NGS je rozhodně užitečným nástrojem a často se NGS panely používají k screeningu monogenních onemocnění, existují ale i panely pro vyšetření aneuploidií (Mellis et al. 2018). Tyto panely vykazují vysokou senzitivitu pro odhalení nejčastějších trisomií. Pro trisomii chromosomu 21 je to 99 %, pro trisomii chromosomu 18 je to 97,4 % a pro trisomii chromosomu 13 je to 93,8 % (Stokowski et al. 2015). Možnou nevýhodou NGS oproti dPCR je náročnější příprava pro jednotlivá měření, časová, přístrojová a finanční náročnost.

Námi testovaný multiplex je nezávislý na počtu fluorescenčních kanálů, kterým dané přístrojové vybavení pro ddPCR disponuje. Využívá pouze jednoho kanálu a dále rozvíjí nově popsanou metodu duplexování dPCR (citace našeho přijatého článku). Ve srovnání s metodami NGS je výrazně levnější a rychlejší, kompletní analýza je proveditelná během jednoho pracovního dne na běžně zařízeném pracovišti. Tyto výhody jsou však zatím kompenzovány nižší senzitivitou a specificitou, vtypovali jsme však přístupy, jejichž aplikace povede ke zlepšení těchto parametrů.



## 7. Závěr

Podářilo se nám optimalizovat metodu založenou na multiplex ddPCR, která je schopna na základě rozdílu fluorescenčních hladin ampliconů detekovaných jen pomocí interkalačního barviva EvaGreen a ampliconů detekovaných současně pomocí EvaGreen i sondy s FAM analyzovat poměr zastoupení sekvencí pocházejících z 18. a 21. chromosomu. Tímto multiplexem jsme stanovili referenční hodnotu poměru mezi chromosomy z 25 vzorků kontrol s euploidním těhotenstvím. Z naměřených poměrů u euploidních těhotenství jsme určili průměrnou hodnotu jako 1,0978 se směrodatnou odchylkou 0,0523. Z těchto údajů byly určeny cut off hodnoty pro 95% spolehlivost (1,2004) a pro 99% spolehlivost (1,2328). Dále jsme měřili 15 trisomických T21 vzorků, které jsme oproti této kontrolní populaci porovnávali. Jako trisomické se nám podařilo určit 5 z 15 vzorků, z toho jeden s 99% jistotou a čtyři s 95% jistotou. Zbylé naměřené vzorky se pohybovaly pod cut off hranicí 1,2004. ROC analýza získaných dat vedla ke stanovení cut-off hodnoty naměřeného poměru 1,144 pro dosažení senzitivity 73,3 % a specificity 80 %. Při aplikaci takto zjištěné cut-off hodnoty by z námi analyzovaných 25 zdravých těhotenství bylo 5 falešně pozitivních a z 15 diagnostikovaných T21 těhotenství by byly 4 vzorky falešně negativní. Interpretace výsledků je u některých vzorků ztěžována nejasným rozhraním mezi klastrem negativních kapek a a klastrem obsahujícím kapky s amplicony sekvencí z chromosomu 18. Při použití 12 technických replikátů dokážeme zlepšit přesnost našeho měření díky využití velkého počtu kompartmentů přesahujícímu 250 000. Dále se ukázalo, že pokud je vzorek vyhodnocen manuálně vzniká zde v některých případech výrazná chyba měření, která může ovlivnit celkový výsledek testu. Této chyby bychom se mohli zbavit aplikací výpočetních algoritmů, které nám pomohou s hodnocením výsledků. Limitací našeho designu je občasný výskyt precipitátů, které mohou snížit kvalitu měření a vést k poměrně nízkému procentu pozitivních částic, které by ale mohlo být navýšeno při koncentrování vzorků. Dalším krokem k lepším výsledkům by mohlo také být použití mastermixu, který by byl optimalizován pro použití interkalačních barviv a fluorescenčních sond zároveň. Po vyřešení všech těchto problémů by se mohlo jednat o spolehlivou, rychlou a nenáročnou metodu k neinvazivní prenatalní diagnostice trisomie chromosomu 21 u plodu.

## 8. Seznam použité literatury

AITKEN, David A., Euan M. WALLACE, Jennifer A. CROSSLEY, Ian A. SWANSTON, Yvonne VAN PAREREN, Merel VAN MAARLE, Nigel P. GROOME, James N. MACRI a J. Michael CONNOR. Dimeric Inhibin A as a Marker for Down's Syndrome in Early Pregnancy. *New England Journal of Medicine* [online]. 1996, **334**(19) [cit. 2022-08-09].

AKIYAMA, Tomohiko, Masao NAGATA a Fugaku AOKI. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2006, **103**(19), 7339–7344 [cit. 2022-08-09].

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS' COMMITTEE ON PRACTICE BULLETINS. Practice Bulletin No. 162: Prenatal Diagnostic Testing for Genetic Disorders. *Obstetrics & Gynecology* [online]. 2016, **127**(5), e108–e122. [cit. 2022-08-09].

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS' COMMITTEE ON PRACTICE BULLETINS—OBSTETRICS, COMMITTEE ON GENETICS, a SOCIETY FOR MATERNAL-FETAL MEDICINE. Screening for Fetal Chromosomal Abnormalities: ACOG Practice Bulletin, Number 226. *Obstetrics & Gynecology* [online]. 2020, **136**(4), e48–e69. [cit. 2022-08-09].

BABAYEV, Elnur, Tianren WANG, Klara SZIGETI-BUCK, Katie LOWTHER, Hugh S. TAYLOR, Tamas HORVATH a Emre SELI. Reproductive aging is associated with changes in oocyte mitochondrial dynamics, function, and mtDNA quantity. *Maturitas* [online]. 2016, **93**, 121–130. [cit. 2022-08-09].

BARBEHENN, Elizabeth K., Raymond G. WALES a Oliver H. LOWRY. The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1974, **71**(4), 1056–1060. [cit. 2022-08-09].

BARRETT, Angela N., Thomas C. R. MCDONNELL, K. C. Allen CHAN a Lyn S. CHITTY. Digital PCR Analysis of Maternal Plasma for Noninvasive Detection of Sickle Cell Anemia. *Clinical Chemistry* [online]. 2012, **58**(6), 1026–1032. [cit. 2022-08-09].

BARTKUTE, Karolina, Dalia BALSYTE, Josef WISSER a Juozas KURMANAVICIUS. Pregnancy outcomes regarding maternal serum AFP value in second trimester screening. *Journal of Perinatal Medicine* [online]. 2017, **45**(7), 817–820. [cit. 2022-08-09].

BARTLETT, John M. S. a David STIRLING. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. V: John M.S. BARTLETT a David STIRLING *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology* [online]. 2003, (226) New Jersey: Humana Press, s. 3–6 [cit. 2022-08-09].

BHAT, Somanath, Jacob L. H. MCLAUGHLIN a Kerry R. EMSLIE. Effect of sustained elevated temperature prior to amplification on template copy number estimation using digital polymerase chain reaction. *The Analyst* [online]. 2011, **136**(4), 724–732. [cit. 2022-08-09].

BREVEGLIERI, Giulia, Elisabetta D'AVERSA, Alessia FINOTTI a Monica BORGATTI. Non-invasive Prenatal Testing Using Fetal DNA. *Molecular Diagnosis & Therapy* [online]. 2019, **23**(2), 291–299. [cit. 2022-08-09].

BRISCO, M. J., J. CONDON, P. J. SYKES, S. H. NEOH a A. A. MORLEY. Detection and quantitation of neoplastic cells in acute lymphoblastic leukaemia, by use of the polymerase chain reaction. *British Journal of Haematology* [online]. 1991, **79**(2), 211–217. [cit. 2022-08-09].

BURKHARDT, Sabrina, Máté BORSOS, Anna SZYDLOWSKA, Jonathan GODWIN, Suzannah A. WILLIAMS, Paula E. COHEN, Takayuki HIROTA, Mitinori SAITOU a Kikuë TACHIBANA-KONWALSKI. Chromosome Cohesion Established by Rec8-Cohesin in Fetal Oocytes Is Maintained without Detectable Turnover in Oocytes Arrested for Months in Mice. *Current biology: CB* [online]. 2016, **26**(5), 678–685. [cit. 2022-08-09].

BUSTIN, Stephen A., Vladimir BENES, Jeremy A. GARSON, Jan HELLEMANS, Jim HUGGETT, Mikael KUBISTA, Reinhold MUELLER, Tania NOLAN, Michael W. PFAFFL, Gregory L. SHIPLEY, Jo VANDESOMPELE a Carl T. WITTEW. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* [online]. 2009, **55**(4), 611–622. [cit. 2022-08-09].

CAMUNAS-SOLER, Joan, Hojae LEE, Louanne HUDGINS, Susan R. HINTZ, Yair J. BLUMENFELD, Yasser Y. EL-SAYED a Stephen R. QUAKE. Noninvasive Prenatal Diagnosis of Single-Gene Disorders by Use of Droplet Digital PCR. *Clinical Chemistry* [online]. 2018, **64**(2), 336–345. [cit. 2022-08-09].

CANICK, J. A., G. J. KNIGHT, G. E. PALOMAKI, J. E. HADDOW, H. S. CUCKLE a N. J. WALD. Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* [online]. 1988, **95**(4), 330–333. [cit. 2022-08-09].

CARBONE, Luigi, Federica CARIATI, Laura SARNO, Alessandro CONFORTI, Francesca BAGNULO, Ida STRINA, Lucio PASTORE, Giuseppe Maria MARUOTTI a Carlo ALVIGGI. Non-Invasive Prenatal Testing: Current Perspectives and Future Challenges. *Genes* [online]. 2020, **12**(1), E15. [cit. 2022-08-09].

CARDULLO, R. A., S. AGRAWAL, C. FLORES, P. C. ZAMECNIK a D. E. WOLF. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1988, **85**(23), 8790–8794. [cit. 2022-08-09].

CARLSON, Laura M. a Neeta L. VORA. Prenatal Diagnosis: Screening and Diagnostic Tools. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* [online]. 2017, **44**(2), 245–256. [cit. 2022-08-09].

CORBISIER, Philippe, Leonardo PINHEIRO, Stéphane MAZOUA, Anne-Marie KORTEKAAS, Pui Yan Jenny CHUNG, Tsvetelina GERGANOVA, Gert ROEBBEN, Hendrik EMONS a Kerry EMSLIE. DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(7), 1831–1840. [cit. 2022-08-09].

DASHE, Jodi S. Aneuploidy Screening in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology* [online]. 2016, **128**(1), 181–194. [cit. 2022-08-09].

DAVYDENKO, Olga, Richard M. SCHULTZ a Michael A. LAMPSON. Increased CDK1 activity determines the timing of kinetochore-microtubule attachments in meiosis I. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2013 **202**(2), 221–229. [cit. 2022-08-09].

DEKKING, Michel. *A modern introduction to probability and statistics: understanding why and how* [online]. London: Springer, 2005 [cit. 2022-08-09].

DI EMIDIO, Giovanna, Stefano FALONE, Maurizio VITTI, Anna Maria D’ALESSANDRO, Marilena VENTO, Cinzia DI PIETRO, Fernanda AMICARELLI a Carla TATONE. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Human Reproduction (Oxford, England)* [online]. 2014, **29**(9), 2006–2017. [cit. 2022-08-09].

DIDELOT, Audrey, Steve K. KOTSOPOULOS, Audrey LUPO, Deniz PEKIN, Xinyu LI, Ivan ATOCHIN, Preethi SRINIVASAN, Qun ZHONG, Jeff OLSON, Darren R. LINK, Pierre LAURENT-PUIG, Hélène BLONS, J. Brian HUTCHISON a Valerie TALY. Multiplex Picoliter-Droplet Digital PCR for Quantitative Assessment of DNA Integrity in Clinical Samples. *Clinical Chemistry* [online]. 2013, **59**(5), 815–823. [cit. 2022-08-09].

DINGLE, Tanis C., Ruth Hall SEDLAK, Linda COOK a Keith R. JEROME. Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances. *Clinical Chemistry* [online]. 2013, **59**(11), 1670–1672. [cit. 2022-08-09].

DRISCOLL, Deborah A. a Susan J. GROSS. First trimester diagnosis and screening for fetal aneuploidy. *Genetics in Medicine* [online]. 2008, **10**(1), 73–75. [cit. 2022-08-09].

EDWARDS, J. H., D. G. HARNDEN, A. H. CAMERON, V. M. CROSSE a O. H. WOLFF. A new trisomic syndrome. *Lancet (London, England)* [online]. 1960, **1**(7128), 787–790. [cit. 2022-08-09].

EIBEN, Bernd a Ralf GLAUBITZ. First-trimester screening: an overview. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* [online]. 2005, **53**(3), 281–283. [cit. 2022-08-09].

EL KHATTABI, Laïla Allach, Christelle ROUILLAC-LE SCIELLOUR, Dominique LE TESSIER, Armelle LUSCAN, Audrey COUSTIER, Raphael PORCHER, Rakia BHOURI, Juliette NECTOUX, Valérie S ERAZIN, Thibaut QUIBEL, Laurent MANDELBROT, Vassilis TSATSARIS, François VIALARD a Jean-Michel DUPONT. Could Digital PCR Be an Alternative as a Non-Invasive Prenatal Test for Trisomy 21: A Proof of Concept Study. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(5), e0155009. [cit. 2022-08-09].

EVANS, Mark I., David A. WRIGHT, Eugene PERGAMENT, Howard S. CUCKLE a Kypros H. NICOLAIDES. Digital PCR for Noninvasive Detection of Aneuploidy: Power Analysis Equations for Feasibility. *Fetal Diagnosis and Therapy* [online]. 2012, **31**(4), 244–247. [cit. 2022-08-09].

FAN, H. Christina a Stephen R. QUAKE. Detection of Aneuploidy with Digital Polymerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, **79**(19), 7576–7579. [cit. 2022-08-09].

FORD, C. E., K. W. JONES, P. E. POLANI, J. C. DE ALMEIDA a J. H. BRIGGS. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner’s syndrome). *Lancet (London, England)* [online]. 1959, **1**(7075), 711–713. [cit. 2022-08-09].

GAŇOVÁ, Martina, Haoqing ZHANG, Hanliang ZHU, Marie KORABEČNÁ a Pavel NEUŽIL. Multiplexed digital polymerase chain reaction as a powerful diagnostic tool. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2021, **181**, 113155. [cit. 2022-08-09].

GARDENER, Glenn J., Tobias J. LEGLER, Jonathan A. HYETT, Yew-Wah LIEW, Robert L. FLOWER a Catherine A. HYLAND. Anti-D in pregnant women with the RHD(IVS3+1G>A)-associated DEL phenotype: DEL PHENOTYPE AND ANTI-D IN PREGNANCY. *Transfusion* [online]. 2012, **52**(9), 2016–2019. [cit. 2022-08-09].

GE, Juan, Congyang LI, Chunling LI, Zhenyue HUANG, Juan ZENG, Longsen HAN a Qiang WANG. SIRT6 participates in the quality control of aged oocytes via modulating telomere function. *Aging* [online]. 2019, **11**(7), 1965–1976. [cit. 2022-08-09].

GERSEN, Steven L. a Martha B. KEAGLE, 2013. *The principles of clinical cytogenetics*. [online] 3d edition. New York: Springer. [cit. 2022-08-09].

GHI, T., A. SOTIRIADIS, P. CALDA, F. DA SILVA COSTA, N. RAINE-FENNING, Z. ALFIREVIC, G. MCGILLIVRAY, a INTERNATIONAL SOCIETY OF ULTRASOUND IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY (ISUOG). ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis: ISUOG Guidelines. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* [online]. 2016, **48**(2), 256–268. [cit. 2022-08-09].

GIL, M. M., S. GALEVA, J. JANI, L. KONSTANTINIDOU, R. AKOLEKAR, M. N. PLANA a K. H. NICOLAIDES. Screening for trisomies by cfDNA testing of maternal blood in twin pregnancy: update of The Fetal Medicine Foundation results and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* [online]. 2019, **53**(6), 734–742. [cit. 2022-08-09].

GOLDMANN, Jakob M., Vladimir B. SEPLYARSKIY, Wendy S. W. WONG, Thierry VILBOUX, Pieter B. NEERINCX, Dale L. BODIAN, Benjamin D. SOLOMON, Joris A. VELTMAN, John F. DEEKEN, Christian GILISSEN a John E. NIEDERHUBER. Publisher Correction: Germline de novo mutation clusters arise during oocyte aging in genomic regions with high double-strand-break incidence. *Nature Genetics* [online]. 2021, **53**(8), 1270. [cit. 2022-08-09].

GOLDWASER, Tamar a Susan KLUGMAN. Cell-free DNA for the detection of fetal aneuploidy. *Fertility and Sterility* [online]. 2018, **109**(2), 195–200. [cit. 2022-08-09].

GORDON, Shaina a Michelle D. LANGAKER. Prenatal Genetic Screening. In: *StatPearls* [online]. 2021 Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2022-08-09].

GRAVHOLT, Claus H., Mette H. VIUFF, Sara BRUN, Kirstine STOCHHOLM a Niels H. ANDERSEN. Turner syndrome: mechanisms and management. *Nature Reviews Endocrinology* [online]. 2019, **15**(10), 601–614. [cit. 2022-08-09].

GRUHN, Jennifer R., Nasser AL-ASMAR, Rachael FASNACHT, Heather MAYLOR-HAGEN, Vanessa PEINADO, Carmen RUBIO, Karl W. BROMAN, Patricia A. HUNT a Terry HASSOLD. Correlations between Synaptic Initiation and Meiotic Recombination: A Study of Humans and Mice. *American Journal of Human Genetics* [online]. 2016, **98**(1), 102–115. [cit. 2022-08-09].

GU, Wei, Winston KOH, Yair J. BLUMENFELD, Yasser Y. EL-SAYED, Louanne HUDGINS, Susan R. HINTZ a Stephen R. QUAKE. Noninvasive prenatal diagnosis in a

fetus at risk for methylmalonic acidemia. *Genetics in Medicine* [online]. 2014, **16**(7), 564–567. [cit. 2022-08-09].

HANDYSIDE, Alan H., Markus MONTAG, M. Cristina MAGLI, Sjoerd REPPING, Joyce HARPER, Andreas SCHMUTZLER, Katerina VESELA, Luca GIANAROLI a Joep GERAEDTS. Multiple meiotic errors caused by predivision of chromatids in women of advanced maternal age undergoing in vitro fertilisation. *European Journal of Human Genetics* [online]. 2012, **20**(7), 742–747. [cit. 2022-08-09].

HARTON, Gary L. a Helen G. TEMPEST. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian Journal of Andrology* [online]. 2012, **14**(1), 32–39. [cit. 2022-08-09].

HASSOLD, Terry a Patricia HUNT. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2001, **2**(4), 280–291. [cit. 2022-08-09].

HE, Yongfu, Xiaoyan LI, Min GAO, Honglin LIU a Ling GU. Loss of HDAC3 contributes to meiotic defects in aged oocytes. *Aging Cell* [online]. 2019, **18**(6), e13036. [cit. 2022-08-09].

HEREDIA, Nicholas J., Phillip BELGRADER, Shenglong WANG, Ryan KOEHLER, Jack REGAN, Angela M. COSMAN, Serge SAXONOV, Benjamin HINDSON, Stephanie C. TANNER, Alexandra S. BROWN a George KARLIN-NEUMANN. Droplet Digital<sup>TM</sup> PCR quantitation of HER2 expression in FFPE breast cancer samples. *Methods* [online]. 2013, **59**(1), S20–S23. [cit. 2022-08-09].

HERNÁNDEZ, Agustín, Guillermo LÓPEZ-LLUCH, Juan A. BERNAL, Plácido NAVAS a José A. PINTOR-TORO. Dicoumarol down-regulates human *PTTG1/Securin* mRNA expression through inhibition of Hsp90. *Molecular Cancer Therapeutics* [online]. 2008, **7**(3), 474–482. [cit. 2022-08-09].

HIGUCHI, Russell, Carita FOCKLER, Gavin DOLLINGER a Robert WATSON. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology* [online]. 1993, **11**(9), 1026–1030. [cit. 2022-08-09].

HINDSON, Benjamin J., Kevin D. NESS, Donald A. MASQUELIER, Phillip BELGRADER, Nicholas J. HEREDIA, Anthony J. MAKAREWICZ, Isaac J. BRIGHT, Michael Y. LUCERO, Amy L. HIDDESEN, Tina C. LEGLER, Tyler K. KITANO, Michael R. HODEL, Jonathan F. PETERSEN, Paul W. WYATT, Erin R. STEENBLOCK, Pallavi H. SHAH, Luc J. BOUSSE, Camille B. TROUP, Jeffrey C. MELLEN, Dean K. WITTMANN, Nicholas G. ERNDT, Thomas H. CAULEY, Ryan T. KOEHLER, Austin P. SO, Simant DUBE, Klint A. ROSE, Luz MONTESCLAROS, Shenglong WANG, David P. STUMBO, Shawn P. HODGES, Steven ROMINE, Fred P. MILANOVICH, Helen E. WHITE, John F. REGAN, George A. KARLIN-NEUMANN, Christopher M. HINDSON, Serge SAXONOV a Bill W. COLSTON. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, **83**(22), 8604–8610. [cit. 2022-08-09].

HIXSON, Lucas, Srishti GOEL, Paul SCHUBER, Vanessa FALTAS, Jessica LEE, Anjali NARAYAKKADAN, Ho LEUNG a Jim OSBORNE. An Overview on Prenatal Screening for Chromosomal Aberrations. *Journal of Laboratory Automation* [online]. 2015, **20**(5), 562–573. [cit. 2022-08-09].

HODGES, Craig A., Ekaterina REVENKOVA, Rolf JESSBERGER, Terry J. HASSOLD a Patricia A. HUNT. SMC1beta-deficient female mice provide evidence that

cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nature Genetics* [online]. 2005, **37**(12), 1351–1355. [cit. 2022-08-09].

HOLLAND, P. M., R. D. ABRAMSON, R. WATSON a D. H. GELFAND. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1991, **88**(16), 7276–7280. [cit. 2022-08-09].

HOLUBCOVÁ, Zuzana, Martyn BLAYNEY, Kay ELDER a Melina SCHUH. Human oocytes. Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2015, **348**(6239), 1143–1147. [cit. 2022-08-09].

HOU, Yu, Wei FAN, Liying YAN, Rong LI, Ying LIAN, Jin HUANG, Jinsen LI, Liya XU, Fuchou TANG, X. Sunney XIE a Jie QIAO. Genome analyses of single human oocytes. *Cell* [online]. 2013, **155**(7), 1492–1506. [cit. 2022-08-09].

HUDECOVA, Irena. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clinical Biochemistry* [online]. 2015, **48**(15), 948–956. [cit. 2022-08-09].

HULTEN, Ma, S. DHANJAL a B. PERTL. Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* [online]. 2003, 279–297. [cit. 2022-08-09].

HUNTER, Neil. Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2015, **7**(12), a016618. [cit. 2022-08-09].

CHIANG, Teresa, Francesca E. DUNCAN, Karen SCHINDLER, Richard M. SCHULTZ a Michael A. LAMPSON. Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Current biology: CB* [online]. 2010, **20**(17), 1522–1528. [cit. 2022-08-09].

CHITTY, Lyn S. a Y. M. Dennis LO. Noninvasive Prenatal Screening for Genetic Diseases Using Massively Parallel Sequencing of Maternal Plasma DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2015, **5**(9), a023085. [cit. 2022-08-09].

IOANNOU, Dimitrios, Jenny FORTUN a Helen TEMPEST. Meiotic nondisjunction and sperm aneuploidy in humans. *Reproduction* [online]. 2018, **157**(1),R15-R31. [cit. 2022-08-09].

ISHIGURO, Kei-ichiro. The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes to Cells* [online]. 2019, **24**(1), 6–30. [cit. 2022-08-09].

JACOBS, P. A. The chromosome complement of human gametes. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. [online] 1992, **14**, 47–72. [cit. 2022-08-09].

JACOBS, PatriciaA., A.G. BAIKIE, W.M. COURT BROWN, T.N. MACGREGOR, N. MACLEAN a D.G. HARNDEN. Evidence for the existence of the human „super female”. *The Lancet* [online]. 1959, **274**(7100), 423–425. [cit. 2022-08-09].

JAMIESON, M.E., J.R.T. COUTTS a J.M. CONNOR. The chromosome constitution of human preimplantation embryos fertilized in vitro. *Human Reproduction* [online]. 1994, **9**(4), 709–715. [cit. 2022-08-09].

JIA, Chan-Wei, Li WANG, Yong-Lian LAN, Rui SONG, Li-Yin ZHOU, Lan YU, Yang YANG, Yu LIANG, Ying LI, Yan-Min MA a Shu-Yu WANG. Aneuploidy in Early

Miscarriage and its Related Factors. *Chinese Medical Journal* [online]. 2015, **128**(20), 2772–2776. [cit. 2022-08-09].

JIA CHAN-WEI, WANG SHU-YU, MA YAN-MIN, LAN YONG-LIAN, SI YAN-MEI, YU LAN, a ZHOU LI-YING. Fluorescence in situ hybridization in uncultured amniocytes for detection of aneuploidy in 4210 prenatal cases. *Chinese Medical Journal* [online]. 2011, **124**(08), 1164–1168. [cit. 2022-08-09].

JINDAL, Aditi a Chitra CHAUDHARY. Amniocentesis. In: *StatPearls* [online]. 2021, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [cit. 2022-08-09].

JONES, Kenneth Lyons, Marilyn C. JONES a Miguel del CAMPO. *Smith's recognizable patterns of human malformation*. [online] 2013, Seventh edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders. [cit. 2022-08-09].

JONES, Taylor M. a Freddy J. MONTERO. Chorionic Villus Sampling. In: *StatPearls* [online]. 2021, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2022-08-09]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563301/>

KANAGAL-SHAMANNA, Rashmi. Digital PCR: Principles and Applications. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2016, **1392**, 43–50. [cit. 2022-08-09].

KARLIN-NEUMANN, George a Francisco BIZOUARN, ed.. *Digital PCR* [online]. 2018, New York, NY: Springer New York. *Methods in Molecular Biology* [cit. 2022-08-09].

KHALEK, Nahla. Intrauterine Transfusions. In: Deborah A. SESOK-PIZZINI, ed. *Neonatal Transfusion Practices* [online]. 2017, Cham: Springer International Publishing, s. [cit. 2022-08-09].

KITAJIMA, Tomoya S., Miho OHSUGI a Jan ELLENBERG. Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell* [online]. 2011, **146**(4), 568–581. [cit. 2022-08-09].

KUHN, E. M., G. E. SARTO, B. J. BATES a E. THERMAN. Gene-rich chromosome regions and autosomal trisomy. A case of chromosome 3 trisomy mosaicism. *Human Genetics* [online]. 1987, **77**(3), 214–220. [cit. 2022-08-09].

KULIEV, Anver, Zev ZLATOPOLSKY, Irina KIRILLOVA, Julia SPIVAKOVA a Jeanine CIESLAK JANZEN. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. 2011, **22**(1), 2–8. [cit. 2022-08-09].

KUSTANOVICH, Anatoli, Ruth SCHWARTZ, Tamar PERETZ a Albert GRINSHPUN. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy* [online]. 2019, **20**(8), 1057–1067. [cit. 2022-08-09].

LANGDON H. DOWN, John. Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Reports*. [online] 1866, (3), 259–262. [cit. 2022-08-09].

LEJEUNE, J., M. GAUTHIER a R. TURPIN. [Human chromosomes in tissue cultures]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences*. [online]. 1959, **248**(4), 602–603. [cit. 2022-08-09].

LEVY, Brynn a Ronald WAPNER. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertility and Sterility* [online]. 2018, **109**(2), 201–212. [cit. 2022-08-09].



LIEW, Michael, Robert PRYOR, Robert PALAIS, Cindy MEADOWS, Maria ERALI, Elaine LYON a Carl WITTEWER. Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. *Clinical Chemistry* [online]. 2004, **50**(7), 1156–1164. [cit. 2022-08-09].

LISTER, Lisa Martine, Anna KOUZNETSOVA, Louise Ann HYSLOP, Dimitrios KALLEAS, Sarah Louise PACE, Jaclyn Catharina BAREL, Abinaya NATHAN, Vasileios FLOROS, Caroline ADELFAK, Yoshinori WATANABE, Rolf JESSBERGER, Thomas B. KIRKWOOD, Christer HÖÖG a Mary HERBERT. Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Current biology: CB* [online]. 2010, **20**(17), 1511–1521. [cit. 2022-08-09].

LIU, Yaping. At the dawn: cell-free DNA fragmentomics and gene regulation. *British Journal of Cancer* [online]. 2022, **126**(3), 379–390. [cit. 2022-08-09].

LO, Y. M. Dennis, Fiona M. F. LUN, K. C. Allen CHAN, Nancy B. Y. TSUI, Ka C. CHONG, Tze K. LAU, Tak Y. LEUNG, Benny C. Y. ZEE, Charles R. CANTOR a Rossa W. K. CHIU. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, **104**(32), 13116–13121. [cit. 2022-08-09].

LO, Y. M. Dennis, Mark S.C. TEIN, Tze K. LAU, Christopher J. HAINES, Tse N. LEUNG, Priscilla M.K. POON, James S. WAINSCOAT, Philip J. JOHNSON, Allan M.Z. CHANG a N. Magnus HJELM. Quantitative Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 1998, **62**(4), 768–775. [cit. 2022-08-09].

LOS, Evan a George A. FORD. Klinefelter Syndrome. In: *StatPearls* [online]. 2022, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2022-08-09].

LU, Sijia, Chenghang ZONG, Wei FAN, Mingyu YANG, Jinsen LI, Alec R. CHAPMAN, Ping ZHU, Xuesong HU, Liya XU, Liying YAN, Fan BAI, Jie QIAO, Fuchou TANG, Ruiqiang LI a X. Sunney XIE. Probing meiotic recombination and aneuploidy of single sperm cells by whole-genome sequencing. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2012, **338**(6114), 1627–1630. [cit. 2022-08-09].

LUN, Fiona M F, Rossa W K CHIU, K C ALLEN CHAN, Tak YEUNG LEUNG, Tze KIN LAU a Y M DENNIS LO. Microfluidics Digital PCR Reveals a Higher than Expected Fraction of Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry* [online]. 2008a, **54**(10), 1664–1672. [cit. 2022-08-09].

LUN, Fiona M. F., Nancy B. Y. TSUI, K. C. Allen CHAN, Tak Y. LEUNG, Tze K. LAU, Pimlak CHAROENKWAN, Katherine C. K. CHOW, Wyatt Y. W. LO, Chanane WANAPIRAK, Torpong SANGUANSEMSRI, Charles R. CANTOR, Rossa W. K. CHIU a Y. M. Dennis LO. Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008b, **105**(50), 19920–19925. [cit. 2022-08-09].

MA, Jun-Yu, Sen LI, Lei-Ning CHEN, Heide SCHATTEN, Xiang-Hong OU a Qing-Yuan SUN. Why is oocyte aneuploidy increased with maternal aging? *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* [online]. 2020, **47**(11), 659–671. [cit. 2022-08-09].

MADIC, Jordan, Cécile JOVELET, Julien LOPEZ, Barbara ANDRÉ, Jean FATIEN, Isabelle MIRAN, Aurélie HONORÉ, Laura MEZQUITA, Benjamin BESSE, Ludovic LACROIX a Magali DRONIOU. *EGFR C797S, EGFR T790M and EGFR sensitizing mutations in non-small cell lung cancer revealed by six-color crystal digital PCR. *Oncotarget* [online]. 2018, 9(100), 37393–37406. [cit. 2022-08-09].*

MAJUMDAR, Nivedita, Thomas WESSEL a Jeffrey MARKS. Digital PCR Modeling for Maximal Sensitivity, Dynamic Range and Measurement Precision. *PLOS ONE* [online]. 2015, 10(3), e0118833. [cit. 2022-08-09].

MALVESTITI, Francesca, Cristina AGRATI, Beatrice GRIMI, Eva POMPILII, Claudia IZZI, Lorenza MARTINONI, Elisa GAETANI, Maria Rosaria LIUTI, Anna TROTTA, Federico MAGGI, Giuseppe SIMONI a Francesca Romana GRATI. Interpreting mosaicism in chorionic villi: results of a monocentric series of 1001 mosaics in chorionic villi with follow-up amniocentesis: Interpreting mosaicism in chorionic villi. *Prenatal Diagnosis* [online]. 2015, 35(11), 1117–1127. [cit. 2022-08-09].

MANN, Kathy a Caroline Mackie OGILVIE. QF-PCR: application, overview and review of the literature: QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenatal Diagnosis* [online]. 2012, 32(4), 309–314. [cit. 2022-08-09].

MAO, Xiaodong, Chao LIU, Hua TONG, Yajun CHEN a Kangsheng LIU. Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *American Journal of Translational Research* [online]. 2019, 11(12), 7209–7222. [cit. 2022-08-09].

MARANGOS, Petros, Michelle STEVENSE, Konstantina NIAKA, Michaela LAGOUDAKI, Ibtissem NABTI, Rolf JESSBERGER a John CARROLL. DNA damage-induced metaphase I arrest is mediated by the spindle assembly checkpoint and maternal age. *Nature Communications* [online]. 2015, 6, 8706. [cit. 2022-08-09].

MAYMON, Ron, Eric JAUNIAUX, Ofir COHEN, Eli DREAZEN, Zwi WEINRAUB a Arie HERMAN. Pregnancy outcome and infant follow-up of fetuses with abnormally increased first trimester nuchal translucency. *Human Reproduction* [online]. 2000, 15(9), 2023–2027. [cit. 2022-08-09].

MCCRADY, M. H. The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube Results. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. 1915, 17(1), 183–212. [cit. 2022-08-09].

MCDERMOTT, Geoffrey P., Duc DO, Claudia M. LITTERST, Dianna MAAR, Christopher M. HINDSON, Erin R. STEENBLOCK, Tina C. LEGLER, Yann JOUVENOT, Samuel H. MARRS, Adam BEMIS, Pallavi SHAH, Josephine WONG, Shenglong WANG, David SALLY, Leanne JAVIER, Theresa DINIO, Chunxiao HAN, Timothy P. BRACKBILL, Shawn P. HODGES, Yunfeng LING, Niels KLITGORD, George J. CARMAN, Jennifer R. BERMAN, Ryan T. KOEHLER, Amy L. HIDDESEN, Pramod WALSE, Luc BOUSSE, Svilen TZONEV, Eli HEFNER, Benjamin J. HINDSON, Thomas H. CAULY, Keith HAMBY, Viresh P. PATEL, John F. REGAN, Paul W. WYATT, George A. KARLIN-NEUMANN, David P. STUMBO a Adam J. LOWE. Multiplexed Target Detection Using DNA-Binding Dye Chemistry in Droplet Digital PCR. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, 85(23), 11619–11627. [cit. 2022-08-09].

MELLIS, Rhiannon, Natalie CHANDLER a Lyn S CHITTY. Next-generation sequencing and the impact on prenatal diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics* [online]. 2018, 18(8), 689–699. [cit. 2022-08-09].

MENNUTI, Michael T., Suchitra CHANDRASEKARAN, Nahla KHALEK a Lorraine DUGOFF. Cell-free DNA screening and sex chromosome aneuploidies. *Prenatal Diagnosis* [online]. 2015, **35**(10), 980–985. [cit. 2022-08-09].

MERSY, E., L. J. M. SMITS, L. a. a. P. VAN WINDEN, C. E. M. DE DIE-SMULDERS, SOUTH-EAST NETHERLANDS NIPT CONSORTIUM, A. D. C. PAULUSSEN, M. V. E. MACVILLE, A. B. C. COUMANS a S. G. M. FRINTS. Noninvasive detection of fetal trisomy 21: systematic review and report of quality and outcomes of diagnostic accuracy studies performed between 1997 and 2012. *Human Reproduction Update* [online]. 2013, **19**(4), 318–329. [cit. 2022-08-09].

MORRIS, R. Katie, Ashwini BILAGI, Pooja DEVANI a Mark D. KILBY. Association of serum PAPP-A levels in first trimester with small for gestational age and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis: Systematic review association serum PAPP-A and adverse pregnancy outcome. *Prenatal Diagnosis* [online]. 2017, **37**(3), 253–265. [cit. 2022-08-09].

MUJEZINOVIC, Faris a Zarko ALFIREVIC. Procedure-Related Complications of Amniocentesis and Chorionic Villous Sampling: A Systematic Review. *Obstetrics & Gynecology* [online]. 2007, **110**(3), 687–694. [cit. 2022-08-09].

MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN a H. ERLICH. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* [online]. 1986, **51**(0), 263–273. [cit. 2022-08-09].

MUSACCHIO, Andrea. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current biology: CB* [online]. 2015, **25**(20), R1002-1018. [cit. 2022-08-09].

NABTI, Ibtissem, Rosanna GRIMES, Hema SARNA, Petros MARANGOS a John CARROLL. Maternal age-dependent APC/C-mediated decrease in securin causes premature sister chromatid separation in meiosis II. *Nature Communications* [online]. 2017, **8**(1), 15346. [cit. 2022-08-09].

NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M.J. CASTAÑO a J. SOLERA. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, **439**, 231–250. [cit. 2022-08-09].

NIXON, Gavin, Jeremy A GARSON, Paul GRANT, Eleni NASTOULI, Carole A. FOY a Jim F. HUGGETT. Comparative Study of Sensitivity, Linearity, and Resistance to Inhibition of Digital and Nondigital Polymerase Chain Reaction and Loop Mediated Isothermal Amplification Assays for Quantification of Human Cytomegalovirus. *Analytical Chemistry* [online]. 2014, **86**(9), 4387–4394. [cit. 2022-08-09].

NYARUABA, Raphael, Jin XIONG, Caroline MWALIKO, Nuo WANG, Belindah J. KIBII, Junping YU a Hongping WEI. Development and Evaluation of a Single Dye Duplex Droplet Digital PCR Assay for the Rapid Detection and Quantification of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microorganisms* [online]. 2020, **8**(5), 701. [cit. 2022-08-09].

O'BRIEN, Helen, Catherine HYLAND, Elizna SCHOEMAN, Robert FLOWER, James DALY a Glenn GARDENER. Non-invasive prenatal testing (NIPT) for fetal Kell, Duffy and Rh blood group antigen prediction in alloimmunised pregnant women: power of droplet digital PCR. *British Journal of Haematology* [online]. 2020, **189**(3), e90–e94. [cit. 2022-08-09].

OLIVER, Tiffany Renee, Stuart W. TINKER, Emily Graves ALLEN, Natasha HOLLIS, Adam E. LOCKE, Lora J. H. BEAN, Reshmi CHOWDHURY, Ferdouse BEGUM, Mary MARAZITA, Vivian CHEUNG, Eleanor FEINGOLD a Stephanie L. SHERMAN. Altered patterns of multiple recombinant events are associated with nondisjunction of chromosome 21. *Human Genetics* [online]. 2012, **131**(7), 1039–1046. [cit. 2022-08-09].

OTTOLINI, Christian S., Louise NEWNHAM, Antonio CAPALBO, Senthilkumar A. NATESAN, Hrishikesh A. JOSHI, Danilo CIMADOMO, Darren K. GRIFFIN, Karen SAGE, Michael C. SUMMERS, Alan R. THORNHILL, Elizabeth HOUSWORTH, Alex D. HERBERT, Laura RIENZI, Filippo M. UBALDI, Alan H. HANDYSIDE a Eva R. HOFFMANN. Genome-wide maps of recombination and chromosome segregation in human oocytes and embryos show selection for maternal recombination rates. *Nature Genetics* [online]. 2015, **47**(7), 727–735. [cit. 2022-08-09].

OXNARD, Geoffrey R., Cloud P. PAWELETZ, Yanan KUANG, Stacy L. MACH, Allison O'CONNELL, Melissa M. MESSINEO, Jason J. LUKE, Mohit BUTANEY, Paul KIRSCHMEIER, David M. JACKMAN a Pasi A. JÄNNE. Noninvasive Detection of Response and Resistance in *EGFR* -Mutant Lung Cancer Using Quantitative Next-Generation Genotyping of Cell-Free Plasma DNA. *Clinical Cancer Research* [online]. 2014, **20**(6), 1698–1705. [cit. 2022-08-09].

PATAU, K., D. W. SMITH, E. THERMAN, S. L. INHORN a H. P. WAGNER. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. *Lancet (London, England)* [online]. 1960, **1**(7128), 790–793. [cit. 2022-08-09].

PATEL, Jessica, Seang Lin TAN, Geraldine M. HARTSHORNE a Andrew D. MCAINSH. Unique geometry of sister kinetochores in human oocytes during meiosis I may explain maternal age-associated increases in chromosomal abnormalities. *Biology Open* [online]. 2015, **5**(2), 178–184. [cit. 2022-08-09].

PAZOURKOVA, Eva, Iveta ZEDNIKOVA, Marie KORABECNA, Jana KRALOVA, Martin PISACKA, Michaela NOVOTNA, Pavel CALDA a Ales HORINEK. Optimization of diagnostic strategy for non-invasive cell-free foetal *RHD* determination from maternal plasma. *Vox Sanguinis* [online]. 2021, **116**(9), 1012–1019. [cit. 2022-08-09].

PEDDI, Nikhil Chowdary, Chaithanya AVANTHIKA, Sravya VUPPALAPATI, Ramya BALASUBRAMANIAN, Jaskaranpreet KAUR a Chaithanya Datta N. A Review of Cordocentesis: Percutaneous Umbilical Cord Blood Sampling. *Cureus* [online]. 2021, **13**(7): e16423. [cit. 2022-08-09].

PINHEIRO, Leonardo B., Victoria A. COLEMAN, Christopher M. HINDSON, Jan HERRMANN, Benjamin J. HINDSON, Somanath BHAT a Kerry R. EMSLIE. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Analytical Chemistry* [online]. 2012, **84**(2), 1003–1011. [cit. 2022-08-09].

QIU, Danhong, Xiaojing HOU, Longsen HAN, Xiaoyan LI, Juan GE a Qiang WANG. Sirt2-BubR1 acetylation pathway mediates the effects of advanced maternal age on oocyte quality. *Aging Cell* [online]. 2018, **17**(1). [cit. 2022-08-09].

QUAN, Phenix-Lan, Martin SAUZADE a Eric BROUZES. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel, Switzerland)* [online]. 2018, **18**(4), E1271. [cit. 2022-08-09].

RAMAKRISHNAN, Ramesh, Jian QIN, Robert C. JONES a L. Suzanne WEAVER. Integrated Fluidic Circuits (IFCs) for digital PCR. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2013, **949**, 423–431. [cit. 2022-08-09].

REYNIER, P., P. MAY-PANLOUP, M. F. CHRÉTIEN, C. J. MORGAN, M. JEAN, F. SAVAGNER, P. BARRIÈRE a Y. MALTHIÈRY. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Molecular Human Reproduction* [online]. 201, **7(5)**, 425–429. [cit. 2022-08-09].

ROBINSON, Bret S., Paul T. MONIS a Phillip J. DOBSON. Rapid, Sensitive, and Discriminating Identification of *Naegleria* spp. by Real-Time PCR and Melting-Curve Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, **72(9)**, 5857–5863. [cit. 2022-08-09].

RODRIGO, Lorena. Sperm genetic abnormalities and their contribution to embryo aneuploidy & miscarriage. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2020, **34(6)**, 101477. [cit. 2022-08-09].

RODRIGO, Lorena, Marcos MESEGUER, Emilia MATEU, Amparo MERCADER, Vanessa PEINADO, Lorena BORI, Inmaculada CAMPOS-GALINDO, Miguel MILÁN, Sandra GARCÍA-HERRERO, Carlos SIMÓN a Carmen RUBIO. Sperm chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy. *Biology of Reproduction* [online]. 2019, **101(6)**, 1091–1101. [cit. 2022-08-09].

RODRIGO, Lorena, Vanessa PEINADO, Emilia MATEU, José REMOHÍ, Antonio PELLICER, Carlos SIMÓN, Manuel GIL-SALOM a Carmen RUBIO. Impact of different patterns of sperm chromosomal abnormalities on the chromosomal constitution of preimplantation embryos. *Fertility and Sterility* [online]. 2010, **94(4)**, 1380–1386. [cit. 2022-08-09].

ROSA, Rafael Fabiano M., Rosana Cardoso M. ROSA, Paulo Ricardo G. ZEN, Carla GRAZIADIO a Giorgio Adriano PASKULIN. Trisomy 18: review of the clinical, etiologic, prognostic, and ethical aspects. *Revista Paulista De Pediatria: Orgao Oficial Da Sociedade De Pediatria De Sao Paulo* [online]. 2013, **31(1)**, 111–120. [cit. 2022-08-09].

RUBIO, Carmen, Pilar BUENDÍA, Lorena RODRIGO, Amparo MERCADER, Emilia MATEU, Vanessa PEINADO, Arantxa DELGADO, Miguel MILÁN, Pere MIR, Carlos SIMÓN, José REMOHÍ a Antonio PELLICER. Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. 2009, **18(5)**, 687–693. [cit. 2022-08-09].

SAIKI, Randall K., David H. GELFAND, Susanne STOFFEL, Stephen J. SCHARF, Russell HIGUCHI, Glenn T. HORN, Kary B. MULLIS a Henry A. ERLICH. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* [online]. 1988, **239(4839)**, 487–491. [cit. 2022-08-09].

SAKAKIBARA, Yogo, Shu HASHIMOTO, Yoshiharu NAKAOKA, Anna KOUZNETSOVA, Christer HÖÖG a Tomoya S. KITAJIMA. Bivalent separation into univalents precedes age-related meiosis I errors in oocytes. *Nature Communications* [online]. 2015, **6(1)**, 7550. [cit. 2022-08-09].

SAYIN, N. Cenk, M. Tunç CANDAN, Nefize AHMET, Sezer ARDA, Necdet SÜT a Füsün G. VAROL. The association of triple-marker test results with adverse pregnancy outcomes in low-risk pregnancies with healthy newborns. *Archives of Gynecology and Obstetrics* [online]. 2007, **277(1)**, 47–53. [cit. 2022-08-09].

- SHAW, J., E. SCOTCHMAN, N. CHANDLER a L. S. CHITTY. PREIMPLANTATION GENETIC TESTING: Non-invasive prenatal testing for aneuploidy, copy-number variants and single-gene disorders. *Reproduction (Cambridge, England)* [online]. 2020, **160**(5), A1–A11. [cit. 2022-08-09].
- SCHIFFMAN, M H, H M BAUER, A T LORINCZ, M M MANOS, J C BYRNE, A G GLASS, D M CADELL a P M HOWLEY. Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 1991, **29**(3), 573–577. [cit. 2022-08-09].
- SCHWARZENBACH, Heidi, Dave S. B. HOON a Klaus PANTEL. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2011, **11**(6), 426–437. [cit. 2022-08-09].
- SILLENCE, Kelly A., Llinos A. ROBERTS, Heidi J. HOLLANDS, Hannah P. THOMPSON, Michele KIERNAN, Tracey E. MADGETT, C. ROSS WELCH a Neil D. AVENT. Fetal Sex and RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. *Clinical Chemistry* [online]. 2015, **61**(11), 1399–1407. [cit. 2022-08-09].
- SIMMONDS, P., P. BALFE, J. F. PEUTHERER, C. A. LUDLAM, J. O. BISHOP a A. J. BROWN. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *Journal of Virology* [online]. 1990, **64**(2), 864–872. [cit. 2022-08-09].
- SIMONI, G., B. BRAMBATI, C. DANESINO, F. ROSSELLA, G. L. TERZOLI, M. FERRARI a M. FRACCARO. Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Human Genetics* [online]. 1983, **63**(4), 349–357. [cit. 2022-08-09].
- SINGH, Chanchal, Seema THAKUR, Nidhi ARORA a Deeksha KHURANA. Revisiting absent nasal bone in the second trimester. *Journal of Clinical Ultrasound* [online]. 2021, **49**(1), 3–7. [cit. 2022-08-09].
- SIRIKUNALAI, P., C. WANAPIRAK, S. SIRICHOTIYAKUL, F. TONGPRASERT, K. SRISUPUNDIT, S. LUEWAN, K. TRAISRISILP a T. TONGSONG. Associations between maternal serum free beta human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) levels and adverse pregnancy outcomes. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* [online]. 2016, **36**(2), 178–182. [cit. 2022-08-09].
- SONG, Qi, Yibo GAO, Qiangyuan ZHU, Qingchang TIAN, Bingwen YU, Bofan SONG, Yanan XU, Maokai YUAN, Congcong MA, Wei JIN, Tao ZHANG, Ying MU a Qinhan JIN. A nanoliter self-priming compartmentalization chip for point-of-care digital PCR analysis. *Biomedical Microdevices* [online]. 2015, **17**(3), 64. [cit. 2022-08-09].
- SPOLEČNOST LÉKAŘSKÉ GENETIKY A GENOMIKY. *Aktualizované indikace neinvazivního prenatalního testování (NIPT)* [online]. 2018, 7. srpen 2018. B.m.: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, z. s. Dostupné z: <https://slg.cz/documents/16/doporuceny-postup-indikace-nipt.pdf>
- SPOLEČNOST LÉKAŘSKÉ GENETIKY A GENOMIKY. *Doporučený postup genetického diagnostického prenatalního vyšetření (prenatální diagnostiku, PND)*. [online]. 2019, 12 2019. B.m.: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, z. s. Dostupné z: <https://slg.cz/documents/13/doporuceny-postup-prenatalni-diagnostika.pdf>

STOKOWSKI, Renee, Eric WANG, Karen WHITE, Annette BATEY, Bo JACOBSSON, Herb BRAR, Madhumitha BALANARASIMHA, Desiree HOLLEMON, Andrew SPARKS, Kypros NICOLAIDES a Thomas J. MUSCI. Clinical performance of non-invasive prenatal testing (NIPT) using targeted cell-free DNA analysis in maternal plasma with microarrays or next generation sequencing (NGS) is consistent across multiple controlled clinical studies. *Prenatal Diagnosis* [online]. 2015, **35**(12), 1243–1246. [cit. 2022-08-09].

SUCIU, Ioan Dumitru, Oana Daniela TOADER, Slavyana GALEVA a Lucian POP. Non-Invasive Prenatal Testing beyond Trisomies. *Journal of Medicine and Life* [online]. 2019, **12**(3), 221–224. [cit. 2022-08-09].

SYKES, P. J., S. H. NEOH, M. J. BRISCO, E. HUGHES, J. CONDON a A. A. MORLEY. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques* [online]. 1992, **13**(3), 444–449. [cit. 2022-08-09].

TAN, Chianru, Xihua CHEN, Fang WANG, Dong WANG, Zongfu CAO, Xiurui ZHU, Chao LU, Wenjun YANG, Na GAO, Huafang GAO, Yong GUO a Lingxiang ZHU. A multiplex droplet digital PCR assay for non-invasive prenatal testing of fetal aneuploidies. *The Analyst* [online]. 2019, **144**(7), 2239–2247. [cit. 2022-08-09].

TARTAGLIA, Nicole R., Susan HOWELL, Ashley SUTHERLAND, Rebecca WILSON a Lennie WILSON. A review of trisomy X (47,XXX). *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 2010, **5**, 8. [cit. 2022-08-09].

TAYLOR-PHILLIPS, Sian, Karoline FREEMAN, Julia GEPPERT, Adeola AGBEBIYI, Olalekan A. UTHMAN, Jason MADAN, Angus CLARKE, Siobhan QUENBY a Aileen CLARKE. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open* [online]. 2016, **6**(1), e010002. [cit. 2022-08-09].

THORSEN, Todd, Sebastian J. MAERKL a Stephen R. QUAKE. Microfluidic large-scale integration. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2002, **298**(5593), 580–584. [cit. 2022-08-09].

TONG, Yu K., Rossa W. K. CHIU, Ranjit AKOLEKAR, Tak Y. LEUNG, Tze K. LAU, Kypros H. NICOLAIDES a Y. M. Dennis LO. Epigenetic-Genetic Chromosome Dosage Approach for Fetal Trisomy 21 Detection Using an Autosomal Genetic Reference Marker. *PLoS ONE* [online]. 2010a, **5**(12), e15244. [cit. 2022-08-09].

TONG, Yu K., Shengnan JIN, Rossa W. K. CHIU, Chunming DING, K. C. Allen CHAN, Tak Y. LEUNG, Ling YU, Tze K. LAU a Y. M. Dennis LO. Noninvasive Prenatal Detection of Trisomy 21 by an Epigenetic–Genetic Chromosome-Dosage Approach. *Clinical Chemistry* [online]. 2010b, **56**(1), 90–98. [cit. 2022-08-09].

TOUATI, Sandra A. a Katja WASSMANN. How oocytes try to get it right: spindle checkpoint control in meiosis. *Chromosoma* [online]. 2016, **125**(2), 321–335. [cit. 2022-08-09].

TREFF, Nathan R., Jing SU, Deanne TAYLOR a Richard T. SCOTT. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS genetics* [online]. 2011, **7**(6), e1002161. [cit. 2022-08-09].

TSUCHIYA, Karen D. Fluorescence In Situ Hybridization. *Clinics in Laboratory Medicine* [online]. 2011, **31**(4), 525–542. [cit. 2022-08-09].

TSUI, Nancy B. Y., Rezan A. KADIR, K. C. Allen CHAN, Claudia CHI, Gillian MELLARS, Edward G. TUDDENHAM, Tak Y. LEUNG, Tze K. LAU, Rossa W. K. CHIU a Y. M. Dennis LO. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood* [online]. 2011, **117**(13), 3684–3691. [cit. 2022-08-09].

TURNER, Henry H. A SYNDROME OF INFANTILISM, CONGENITAL WEBBED NECK, AND CUBITUS VALGUS<sup>1</sup>. *Endocrinology* [online]. 1938, **23**(5), 566–574. [cit. 2022-08-09].

TURNER, S. a G. M. HARTSHORNE. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* [online]. 2013, **19**(8), 510–518. [cit. 2022-08-09].

VANNITAMBY, Amanda, Shona HENDRY, Louis IRVING, Daniel STEINFORT a Steven BOZINOVSKI. Novel multiplex droplet digital PCR assay for scoring PD-L1 in non-small cell lung cancer biopsy specimens. *Lung Cancer* [online]. 2019, **134**, 233–237. [cit. 2022-08-09].

VOGELSTEIN, B. a K. W. KINZLER. Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1999, **96**(16), 9236–9241. [cit. 2022-08-09].

WANG, Eric, Annette BATEY, Craig STRUBLE, Thomas MUSCI, Ken SONG a Arnold OLIPHANT. Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma: Maternal factors affecting fetal cell-free DNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* [online]. 2013, **33**(7), 662–666. [cit. 2022-08-09].

WANG, Qiang, Ann M. RATCHFORD, Maggie M.-Y. CHI, Erica SCHOELLER, Antonina FROLOVA, Tim SCHEDL a Kelle H. MOLEY. Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* [online]. 2009, **23**(10), 1603–1612. [cit. 2022-08-09].

WATANABE, Rikiya, Naoki SOGA, Daishi FUJITA, Kazuhito V. TABATA, Lisa YAMAUCHI, Soo HYEON KIM, Daisuke ASANUMA, Mako KAMIYA, Yasuteru URANO, Hiroaki SUGA a Hiroyuki NOJI. Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity. *Nature Communications* [online]. 2014, **5**, 4519. [cit. 2022-08-09].

WEBSTER, Alexandre a Melina SCHUH. Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends in Cell Biology* [online]. 2017, **27**(1), 55–68. [cit. 2022-08-09].

WELLESLEY, Diana, Helen DOLK, Patricia A BOYD, Ruth GREENLEES, Martin HAEUSLER, Vera NELEN, Ester GARNE, Babak KHOSHNOOD, Berenice DORAY, Anke RISSMANN, Carmel MULLANEY, Elisa CALZOLARI, Marian BAKKER, Joaquin SALVADOR, Marie-Claude ADDOR, Elizabeth DRAPER, Judith RANKIN a David TUCKER. Rare chromosome abnormalities, prevalence and prenatal diagnosis rates from population-based congenital anomaly registers in Europe. *European Journal of Human Genetics* [online]. 2012, **20**(5), 521–526. [cit. 2022-08-09].

WHALE, Alexandra S., Jim F. HUGGETT a Svilen TZONEV. Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification* [online]. 2016, **10**, 15–23. [cit. 2022-08-09].

WILDING, M., B. DALE, M. MARINO, L. DI MATTEO, C. ALVIGGI, M. L. PISATURO, L. LOMBARDI a G. DE PLACIDO. Mitochondrial aggregation patterns and



activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)* [online]. 2001, **16**(5), 909–917. [cit. 2022-08-09].

WILLIAMS, Grant M. a Robert BRADY. Patau Syndrome. In: *StatPearls* [online]. 2002, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 2022-08-09]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538347/>

WITTWER, Carl T., Randy P. RASMUSSEN a Kirk M. RIRIE. Rapid polymerase chain reaction and melting analysis. *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications* [online]. 2010, 48. [cit. 2022-08-09].

WONG, Wendy S. W., Benjamin D. SOLOMON, Dale L. BODIAN, Prachi KOTHIYAL, Greg ELEY, Kathi C. HUDDLESTON, Robin BAKER, Dzung C. THACH, Ramaswamy K. IYER, Joseph G. VOCKLEY a John E. NIEDERHUBER. New observations on maternal age effect on germline de novo mutations. *Nature Communications* [online]. 2016, **7**, 10486.[cit. 2022-08-09].

WU, Xinghan, Feifei HU, Juan ZENG, Longsen HAN, Danhong QIU, Haichao WANG, Juan GE, Xiaoyan YING a Qiang WANG. NMNAT2-mediated NAD<sup>+</sup> generation is essential for quality control of aged oocytes. *Aging Cell* [online]. 2019, **18**(3), e12955. [cit. 2022-08-09].

YUN, Yan, Simon I. R. LANE a Keith T. JONES. Premature dyad separation in meiosis II is the major segregation error with maternal age in mouse oocytes. *Development (Cambridge, England)* [online]. 2014, **141**(1), 199–208. [cit. 2022-08-09].

YUN, Yan, Zijie WEI a Neil HUNTER. Maternal obesity enhances oocyte chromosome abnormalities associated with aging. *Chromosoma* [online]. 2019, **128**(3), 413–421. [cit. 2022-08-09].

ZEDNIKOVA, Iveta, Eva PAZOURKOVA, Sona LASSAKOVA, Barbora VESELA a Marie KORABECNA. Detection of cell-free foetal DNA fraction in female-foetus bearing pregnancies using X-chromosomal insertion/deletion polymorphisms examined by digital droplet PCR. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1), 20036. [cit. 2022-08-09].

ZHANG, Haoqing, Soňa LAŠŠÁKOVÁ, Zhiqiang YAN, Xinlu WANG, Pavel ŠENKYŘÍK, Martina GAŇOVÁ, Honglong CHANG, Marie KORABECNA a Pavel NEUZIL. Digital polymerase chain reaction duplexing method in a single fluorescence channel. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2022, 340243. [cit. 2022-08-09].

ZHANG, Liang, Xiaojing HOU, Rujun MA, Kelle MOLEY, Tim SCHEDL a Qiang WANG. Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [online]. 2014, **28**(3), 1435–1445. [cit. 2022-08-09].

ZHOU, Luming, Alexander N MYERS, Joshua G VANDERSTEEN, Lesi WANG a Carl T WITTWER. Closed-Tube Genotyping with Unlabeled Oligonucleotide Probes and a Saturating DNA Dye. *Clinical Chemistry* [online]. 2004, **50**(8), 1328–1335. [cit. 2022-08-09].

ZIELINSKA, Agata P, Zuzana HOLUBCOVA, Martyn BLAYNEY, Kay ELDER a Melina SCHUH. Sister kinetochore splitting and precocious disintegration of bivalents could explain the maternal age effect. *eLife* [online]. 2015, **4**, e11389. [cit. 2022-08-09].