



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Laboratorní vyšetření vrozených vývojových vad
v rámci prenatálního screeningu se zaměřením na
chromozomální aberace

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:
Specializace ve zdravotnictví

Autor: Andrea Tomanová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Laboratorní vyšetření vrozených vývojových vad v rámci prenatálního screeningu se zaměřením na chromozomální aberace*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 7. 2018

.....

Andrea Tomanová

Poděkování

Touto cestou bych v první řadě ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, panu Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D., za ochotnou pomoc, cenné odborné rady a veškerou spolupráci, dále panu primáři MUDr. Jaroslavu Kotlasovi, za odbornou konzultaci, laboratořím synlab czech s.r.o. za umožnění laboratorní praxe vztahující se k této bakalářské práci, a v závěru Mgr. Sandře Šlégrové za odborné rady a připomínky, a Mgr. Kristýně Glendové za cenné rady a připomínky při tvorbě bakalářské práce.

Laboratorní vyšetření vrozených vývojových vad v rámci prenatalního screeningu se zaměřením na chromozomální aberace

Abstrakt

Tato bakalářská práce utváří souhrnný přehled o možnostech prevence vrozených vývojových vad v oboru prenatalní diagnostiky, přičemž jejím hlavním zaměřením je biochemický screening sloužící k posouzení rizika výskytu vrozených anomálií, a to především nejčastějších aneuploidií.

Teoretická část obecně charakterizuje vrozené vývojové vady a dále je dělí dle základních kritérií. Další část se věnuje popisu jejich prevence a samotné diagnostiky, v jejímž rámci jsou shrnuty základní informace o screeningových programech, které slouží primárně k posouzení rizika výskytu vrozených vývojových vad u každé těhotné pacientky.

Praktická část podává podrobnější popis zvolené screeningové metody, konkrétně biochemického screeningu, a celkové organizace prenatalního screeningu u zvolené populace těhotných pacientek. Tato část zahrnuje i stručný popis postupu při detekci jakékoliv patologie v prvotní části prenatalní diagnostiky, přičemž se zaměřuje na genetická vyšetření a jejich možnosti využití.

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit souhrnný přehled výsledků biochemického screeningu za I. a II. trimestr těhotenství včetně výsledných hodnot PAPP – A, free β -hCG a NT zaznamenaných v násobcích mediánů (MoM). A dále sledovat korelaci mezi věkem pacientek a zmíněnými hodnotami uváděnými v násobcích mediánů.

Klíčová slova

vrozené vady; prenatalní diagnostika; prenatalní screening, chromozomální aberace, cytogenetika

Laboratory examination of developmental defects in prenatal screening with a focus on chromosomal aberrations

Abstract

This thesis forms summary overview about possibilities of prevention of congenital defects in prenatal diagnostics with focus on the most biochemical screening to assess the risk of congenital anomalies, in particular the most common aneuploidy.

The theoretical part generally characterizes the congenital defects and divides the anomalies according to the basic aspects. The next part deals with the description of prevention and diagnosis, which summarizes basic information about screening programs, which are primarily used to assess the risk of congenital defects for each pregnant patient.

The practical part provides a more detailed description of the chosen screening method, namely biochemical screening, and the overall organization of prenatal screening in the selected population of pregnant patients. This part also includes a brief description of the procedure for detecting any pathology in the primary part of the prenatal diagnosis, focusing on genetic analyzes and the variants of use.

The aim of this bachelor thesis was to summarize the results of the biochemical screening for the 1st and 2nd trimester of pregnancy including the resulting PAPP-A, free β -hCG and NT scores recorded in multiples of the median (MoM). Furthermore, the study of the correlation between the age of the patients and the values given in the multiples of the medians.

Key words

birth defects; prenatal diagnostics; prenatal screening, chromosomal aberrations, cytogenetics

Obsah

Obsah	6
1 Úvod.....	8
2 Současný stav.....	9
2.1 Přehled současného stavu.....	9
2.2 Vrozené vývojové vady.....	9
2.2.1 Dělení VVV na základě období jejich vzniku	9
2.2.2 Dělení VVV na základě mechanismu vzniku	10
2.2.3 Dělení VVV na základě klinických projevů	11
2.2.4 Dělení VVV na základě příčin vzniku	11
2.3 Chromozomální aberace.....	12
2.3.1 Strukturní chromozomální aberace	12
2.3.2 Numerické chromozomální aberace	13
2.4 Prevence a diagnostika	16
2.4.1 Prevence.....	16
2.4.2 Primární prevence	16
2.4.3 Sekundární prevence – prenatalní diagnostika	17
2.5 Prenatální screening chromozomálních aberací.....	21
2.5.1 Screeningové testy v prvním trimestru těhotenství.....	22
2.5.2 Screeningové testy ve druhém trimestru těhotenství	22
2.5.3 Screeningové testy v prvním i ve druhém trimestru těhotenství	23
2.5.4 Základní cytogenetické vyšetření chromozomů	24
2.5.5 Fluorescenční in situ hybridizace (mFISH).....	25
2.5.6 Metoda mnohobarevného pruhování (mBAND)	27
2.5.7 Statistika efektivity prenatalní diagnostiky v ČR dle ÚZIS ČR	27
3 Cíl práce.....	31
4 Metodika práce	32

4.1	Materiál	32
4.2	Biochemický screening	33
4.3	Biochemické markery vyšetřované v prvním trimestru těhotenství	34
4.3.1	Celkové hCG / free β -hCG (lidský choriogonadotropin)	34
4.3.2	PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A).....	34
4.4	Biochemické markery vyšetřované ve druhém trimestru těhotenství	35
4.4.1	AFP (Alfa – 1 – fetoprotein).....	35
4.4.2	uE3 (nekonjugovaný estriol).....	35
4.5	Vyšetření biochemických markerů v laboratorní praxi.....	36
4.6	Lékařské postupy v případě patologického nálezu	37
4.7	Genetické vyšetření chromozomálních aberací metodou FISH.....	38
4.8	Statistická analýza	40
5	Vyhodnocení výsledků	41
6	Diskuze	49
7	Závěr	50
8	Citovaná literatura.....	51
9	Seznam obrázků a příloh.....	55
9.1	Přílohy	55
9.2	Obrázky	55
9.3	Tabulky	56
	Seznam použitých zkratek	57
	Přílohy.....	58

1 Úvod

Tato bakalářská práce pojednává o problematice vrozených vývojových vad plodu se zaměřením na chromozomální aberace. Tyto chromozomální anomálie nevznikají pouze v důsledku patologických procesů na genetické úrovni, ale značný vliv na ně mají především faktory životního stylu. A to ať už se jedná o nežádoucí užívání návykových látek v období těhotenství, nebo stále se zvyšující průměrný věk prvního těhotenství, což jsou zásadní aspekty zvyšující riziko výskytu vývojových vad. Proto hraje včasné potvrzení či vyloučení onemocnění důležitou roli v péči o těhotnou pacientku. K tomu slouží právě i prenatální screeningová vyšetření, kterým se tato práce primárně věnuje.

Cíl práce spočívá v přehledném shrnutí výsledků biochemického screeningu těhotných pacientek za období I. a II. trimestru v rámci své laboratorní praxe, jejíž součástí je i kompletace anamnestických údajů, které jsou nezbytným kritériem pro posouzení pravděpodobnosti výskytu vrozené vývojové vady. Dalším cílem je sledování korelace mezi věkem pacientek, jakožto významným rizikovým faktorem, a hodnotami, které jsou taktéž důležitým aspektem pro výpočet pravděpodobnosti výskytu vrozené vývojové vady, a to hodnotami markerů PAPP – A, free β -hCG a NT uváděných v násobcích mediánů.

2 Současný stav

2.1 Přehled současného stavu

V případě, kdy žena otěhotní, bývá jejím prioritním zájmem zdraví vyvíjejícího se plodu. K diagnostice zdravotního stavu plodu slouží komplexní prenatalní diagnostika, jejíž součástí je i včasná detekce vrozených vývojových vad. Tyto diagnostické metody se neustále vyvíjejí a kladou důraz na zachycení jakékoliv patologie tak, aby byly odhaleny v co možná nejranějším stádiu těhotenství. Preferovány jsou přitom metody, které jsou maximálně bezpečné pro matku i plod.

2.2 Vrozené vývojové vady

Význam pojmu vývojová vada je z lékařského hlediska velmi rozsáhlý, jelikož vývojové vady zasahují prakticky všechny orgánové soustavy a nabývají různého charakteru. Může se jednat o drobné odchylky, které ovlivňují kvalitu života postiženého jedince pouze v zanedbatelné míře, ale také mohou být důsledkem těchto defektů závažné zdravotní obtíže, které nemusí být v některých případech slčitelné se životem. Postižený jedinec tak umírá buď již během intrauterinního vývoje, nebo krátce po narození. Vývojové vady nejsou ani nijak vzácným problémem, jelikož dle statistik v České republice stále přichází na svět 3 – 5 % potomků s určitým typem vývojové vady (Šípek et al., 2013a).

VVV, jakožto odchylky od fyziologického vývoje jedince, se běžně dělí na základě několika hledisek. Mezi tato hlediska se řadí například mechanismus, příčina či období vzniku, nebo konkrétní klinické projevy těchto vad (Šípek, © 2010 – 2014; Binder, 2011).

2.2.1 Dělení VVV na základě období jejich vzniku

Gametopatie

Poruchy vznikající uvnitř zárodečných buněk v důsledku chyby při rozdělování chromozomů v rámci jejich vývoje nebo dělení (Mačák, 2012).

Blastopatie

Jedná se o poruchy zapříčiňující vážné chromozomální anomálie, v jejichž důsledku mohou vznikat zrůdy a vrozené defekty. Tyto odchylky jsou typické pro raná stadia těhotenství, konkrétně pro období 15 dnů po oplodnění (Mačák, 2012).

Embryopatie

Obzvláště citlivým obdobím pro vznik embryopatií je organogeneze, tedy období tvorby základů orgánů. Tyto vady vznikají od 15. dne od oplození do 12. týdne těhotenství. Podkladem pro vznik bývají často infekce (rubeola) nebo toxiny (léky či chemikálie) (Mačák, 2012; Hájek et al., 2014).

Fetopatie

Fetopatie postihují plod od 3. měsíce až do konce těhotenství, přičemž zde zásadní roli hrají infekce nebo škodliviny, které organogenezi podstatně brzdí, zastavují nebo zásadně poškozují. Významnou příčinou bývá taktéž nekompatibilní Rh faktor matky a plodu, kdy dochází k tzv. *morbus hemolyticus neonatorum* (Mačák, 2012; Hájek et al., 2014).

2.2.2 Dělení VVV na základě mechanismu vzniku

Malformace

V důsledku dědičných nebo exogenních činitelů vznikají vývojové anomálie. Tyto patologické odchylky vznikají již na začátku vývoje a způsobují defekty orgánů či jejich částí. Příkladem může být defekt neurální trubice, která se při vývoji zcela neuzavře, a tím pádem nedojde ani k jejímu kompletnímu vytvoření (Ježová, 2013).

Disrupce

Při této poruše se neuplatňují genetické vlivy, ale důvodem vzniku mohou být jak vnitřní, tak vnější faktory. Ty působí patologicky na dosud fyziologicky se vyvíjející orgány a jejich části a způsobují defekty, jako například amniální pruhy (Ježová, 2013).

Deformace

Zásadní příčinou vzniku deformací je působení mechanického vlivu, v jehož důsledku dochází ke vzniku abnormalit ve tvaru nebo polohy části těla. Tyto abnormality však nevedou k poruchám celkového vývoje, ale odchyľují ho mimo původní směr (Ježová, 2013).

Dysplazie

Příčinou vzniku dysplazií bývá abnormální uspořádávání buněk, které formují příslušné tkáně a následně orgány (Ježová, 2013).

2.2.3 Dělení VVV na základě klinických projevů

Isolované vady

Jedná se o vady, pro jejichž výskyt je charakteristické, že není asociativně spojen s dalšími vadami. Příkladem může být izolovaná polydaktylie (Šípek, © 2008 - 2018).

Sekvence

Mnohonásobné vady vznikají jako následek patologické kaskády dějů, jejíž vznik inicioval původní patologický zásah. Jedním z příkladů těchto vad je sekvence Potterové (Šípek, © 2008 - 2018).

Asociace

Asociace jsou vrozené defekty, pro které je charakteristický výskyt s dalšími vadami, například VATER asociace (Šípek, © 2008 - 2018).

Syndrom

Syndrom lze definovat jako komplex příznaků projevujících se souběžně a vytvářejících klinický obraz charakteristický pro dané onemocnění, a to například pro Downův syndrom (Selikowitz, 2011).

2.2.4 Dělení VVV na základě příčin vzniku

Genetické vlivy

Za genetické odchylky považujeme změny vznikající na genové úrovni, tedy mutace konkrétních genů a odchylky v chromozomální výbavě člověka, ať už v jejich počtu, nebo celkové stavbě jednotlivých chromozomů. Projev těchto anomálií označujeme jako syndrom - například Downův, Patauův, Edwardsův, aj. (Hájek et al., 2014).

Multifaktoriálně dědičné vady

Jedná se o vady podmíněné genetickou predispozicí, a zároveň vlivem vnějších faktorů. Patří mezi ně například rozštěpy rtu, patra a neurální trubice, vrozené srdeční vady, a jiné (Maříková, Seemanová, 2013).

Vlivy vnějšího prostředí, které mají vliv na VVV

Teratogeny se řadí mezi exogenní faktory zásadně zvyšující riziko nebo přímo zapříčiňující vznik vrozených vývojových vad. Dělí se na faktory chemické, fyzikální a biologické (Šípek, © 2010 – 2014).

Jako chemický faktor se uplatňuje řada léčiv (cytostatika, antiepileptika nebo některé druhy antibiotik). Dalšími látkami, u nichž byl prokázán taktéž teratogenní vliv, jsou alkohol a drogy. Mutagenní účinky nelze vyloučit ani u všeobecně nebezpečných chemických látek, jako jsou například těžké kovy (Šípek, © 2010 – 2014).

Mezi nejčastější fyzikální vlivy řadíme záření. V důsledku radioaktivního záření může docházet ke zlomům na chromozomech. Rentgenové záření zase nepříznivě ovlivňuje vývoj neurální trubice. Z tohoto důvodu je proto doporučeno nepodstupovat RTG vyšetření do 3. měsíce těhotenství. Jako další fyzikální teratogen lze zmínit vysokou teplotu (Šípek, © 2010 – 2014).

Jako biologické teratogeny se uplatňují původci infekčních onemocnění. Tito původci mají zastoupení napříč všemi druhy organismů. Jedná se o viry (herpesviry, cytomegaloviry, rubiviry, HIV), bakterie (*Treponema pallidum* způsobující syfilis) a prvoky (*Toxoplasma gondii*). Přírodním teratogenním účinkem se vyznačují i některá onemocnění matky, jež mají chronický charakter, a to například diabetes mellitus či fenylketonurie (Šípek, © 2010 – 2014).

2.3 Chromozomální aberace

Běžný lidský karyotyp sestává ze 46 chromozomů. Tuto chromozomální výbavu tvoří 22 párů somatických chromozomů (autozomů) a 1 pár chromozomů pohlavních (gonozomů). U ženského pohlaví se jedná o gonozomy XX, u mužského o gonozomy XY (Mačák, 2012).

2.3.1 Strukturní chromozomální aberace

Tento typ aberací vzniká na podkladě chromozomálních změn, konkrétně jejich zlomů. V důsledku těchto dějů následují patologické změny, jako například ztráty, zdvojení nebo přestavby segmentů, které jsou zapříčiněny abnormalitami ve spojení úseků. Změny ve struktuře se dělí na balancované, kdy nedochází ke změnám v množství genetické informace, a na nebalancované, kdy dochází k úbytku nebo naopak přebytku původního množství genetické informace. Tímto případem mohou být delece (absence části chromozomu), duplikace (znásobení daného úseku chromozomu), či translokace (rozdělení části chromozomu a jeho následné připojení k chromozomu jinému) a další anomálie (Šípek, © 2010 – 2014).

2.3.2 Numerické chromozomální aberace

Vznik numerických chromozomálních aberací je přisuzován chybnému rozdělení genetického materiálu mezi dceřiné buňky během buněčného dělení. V důsledku této chyby dochází buď ke stavům znásobení celé chromozomální sady, tedy polyploidii, nebo ke stavům, kdy chybí či přebývá pouze některý z chromozomů, tedy aneuploidii vznikajícím v důsledku tzv. nondisjunkce. Mezi aneuploidie se řadí monozomie, kdy jeden z páru chromozomů chybí, a trizomie, kdy je naopak jeden z chromozomů nadpočetný (Sadler, 1995; Šípek, © 2010 – 2014).

Syndromy zapříčiněné aneuploidii autozomů

Downův syndrom

Downův syndrom je považován za nejčastější numerickou odchylku v chromozomální výbavě, která je doprovázena jak duševní, tak tělesnou poruchou. Příčinou je nadpočetný chromozom, který je patologicky připojen k 21. páru chromozomů, a způsobuje tak trizomii 21. chromozomu známou pro svůj typický fenotypový projev. K projevu nemoci přitom postačuje i pouhá nadbytečná část chromozomu, která se k 21. páru připojí. Statisticky Downův syndrom postihuje přibližně 1 ze 700 novorozenech dětí napříč všemi etnickými skupinami. Vyšší riziko výskytu je přičítáno vyššímu věku rodičky, konkrétně se riziko znatelně zvyšuje nad 35 let věku. Existují dva patologické děje podněcující ke vzniku této poruchy, a to nondisjunkce, při které dochází k chybnému dělení genetické informace, a translokace (Selikowitz, 2011; National Down Syndrome Society, 2018).

Fenotypově se Downův syndrom projevuje mongoloidním vzhledem, různým stupněm mentální retardace, malým vzrůstem se sklonem k zavalitosti a poruchami imunity. Dalším typickým projevem je výskyt tzv. opičí rýhy, epikantální řasy a zešíkmených očních štěrbin. U přibližně 1 % jedinců je zaznamenán výskyt jiné formy, tzv. mozaicismu, kdy chromozomální odchylka postihuje jen některé buňky, zatímco zbylé jsou zdravé. Chromozomální odchylky jsou tak fyziologickými buňkami částečně kompenzovány, a patologické projevy poruchy jsou zmírněny (Selikowitz, 2011; National Down Syndrome Society, 2018).

Karyotyp jedince postiženým Downovým syndromem je: 47, XX (XY), + 21 (Selikowitz, 2011; National Down Syndrome Society, 2018).

Edwardsův syndrom

Tento syndrom je považován za relativně častou chromozomální odchylku, jejíž výskyt je zaznamenáván u asi jednoho z 5000 – 6000 narozených jedinců. Příčina těžkého postižení spočívá v nadpočetném chromozomu 18. Riziko výskytu této trizomie se stupňuje společně s věkem matky. Výskyt této vrozené vady bývá pro postižené jedince tak závažným zdravotním zásahem, že ve vysokém měřítku dochází k úmrtí plodu již během těhotenství. Narození jedinci se pak zřídka dožijí prvního roku života (Sadler, 2011; Štefánek, © 2011).

Zásadní podíl na úmrtnosti nesou vrozené srdeční vady. Časté obtíže také způsobují problémy s dýcháním a polykáním. Typickým projevem postiženého jedince jsou nízká porodní hmotnost, rozštěpové vady, deformity v obličejové i hlavové části, různé deformace kostí a končetin. Jedinec trpí mentální retardací (Sadler, 2011; Štefánek, © 2011).

Karyotypový zápis pro Edwardsův syndrom vypadá takto: 47, XX (XY), + 18 (Sadler, 2011; Štefánek, © 2011).

Patauův syndrom

S výskytem u jednoho z 10 000 narozených jedinců se u nás Patauův syndrom řadí mezi vzácně se vyskytující vrozené vady. Svůj podíl na tak nízkém výskytu může však nést i fakt, že určité množství těhotenství, kdy je plod postižen tímto syndromem, končí samovolným potratem. Příčinou patologických změn, které vedou u jedince k celkové degradaci mentálního i fyzického vývinu je nadpočetný 13. chromozom (Sadler, 2011; Štefánek, © 2011).

Typickým fenotypovým projevem bývá nízká porodní hmotnost, zásadně zpomalený růst, deformace hlavy i obličejové části, včetně deformit a poruch funkce očí, a časté polydaktylie. Výjimku netvoří ani vrozené vady srdce a ledvin (Sadler, 2011; Štefánek, © 2011).

Karyotyp jedinců s Patauovým syndromem: 47, XX (XY), + 13 (Sadler, 2011; Štefánek, © 2011).

Syndromy zapříčiněné aneuploidiegonozomů

V případě gonozomálních odchylek se jedná především o jejich počet, který se liší od běžné chromozomální výbavy ženy (XX) a muže (XY). Odchylky jsou zapříčiněny nondisjunkcí gonozomů v pohlavních buňkách (Mačák, 2012).

Klinefelterův syndrom

Klinefelterův syndrom se vyskytuje cca u jednoho z 500 – 1000 narozených dětí mužského pohlaví. Pro své latentní projevy však bývá diagnostikován buď zcela náhodně, nebo až v pozdějším věku, kdy se začínají projevovat typické odchylky. Příčinou je nadbytečný pohlavní chromozom. Typickou formou karyotypového zápisu jedince s Klinefelterovým syndromem je: 47, XXY (Sadler, 2011; Štefánek, © 2011).

Logicky tak dochází převážně k tělesným změnám, které jsou podmíněny hormonální dysbalancí, která je způsobena poruchou produkce hormonu testosteronu. Z toho lze odvodit, že typické projevy tohoto syndromu spočívají v odchylkách pohlavních znaků a funkcí pohlavních žláz. Jedince s Klinefelterovým syndromem charakterizuje vysoký vzrůst s nápadně dlouhými končetinami, menší množství svalové hmoty, zvětšené prsní žlázy, pubické ochlupení ženského typu a vyšší hlas. Typicky bývá narušena funkce varlat, což se projevuje neplodností postiženého jedince (Sadler, 2011; Štefánek, © 2011).

Turnerův syndrom

Turnerův syndrom je charakterizován přítomností pouze jednoho pohlavního chromozomu. V některých případech nechybí druhý pohlavní chromozom zcela, ale v karyotypu můžeme nalézt jeho část. Tato monozomie je tak jako jediná slučitelná se životem. Výskyt syndromu je zaznamenán i v podobě mozaiky, kdy se absence chromozomu X vyskytuje pouze v některých buňkách. Míra výskytu se pohybuje okolo 1 z 2000 – 3000 narozených dívek, vysoké procento – až 98 % však vyjadřuje množství těhotenství, které v případě tohoto postižení plodu, končí spontánním potratem (Sadler, 1995; Štefánek, © 2011).

Turnerův syndrom je u dívek spojen buď s úplnou absencí vaječníků, nebo s přítomností útvarů, které zpravidla nenesou žádnou z původních funkcí. V důsledku této anomálie dochází k poruchám dospívání, nepřítomnosti menstruačního cyklu a v návaznosti na tyto patologické procesy i k celkové neplodnosti. Mezi fyzické projevy onemocnění řadíme kožní řasu na krku, nízký vzrůst, často se vyskytující lymfedémy končetin a různé skeletální deformity (Sadler, 1995; Štefánek, © 2011).

2.4 Prevence a diagnostika

2.4.1 Prevence

Vrozené vývojové vady jsou v první řadě považovány za vážný problém zasahující zdraví. Význam tohoto problému však zasahuje i sféru sociální, a samozřejmě ekonomickou. I z těchto důvodů se apeluje na předcházení těmto vadám, přičemž tou nejlepší cestou je primární prevence, jelikož si jako prioritní úkol klade přímo zabránění vzniku vrozených vývojových vad. Sekundární druh prevence se již potýká s diagnostikou samotných vad a následném řešení patologických stavů postižených plodů (Gate-2-biotech, © 2006 – 2018).

2.4.2 Primární prevence

Prevence zahrnuje nespočet faktorů, jejichž působení má na zdraví matky a plodu zásadní vliv, a tudíž je nezbytné se jejich konkrétním účinkům věnovat (Gate-2-biotech, © 2006 – 2018).

Souhrnně lze konstatovat, že prioritním zájmem by mělo být plánované rodičovství s co nejvhodnějšími podmínkami k početí potomků, do kterých lze zahrnout odpovídající věk a zdravotní stav ženy. Se vzrůstajícím věkem je spojován četnější výskyt chromozomálních anomálií, především těch numerických. Samotný zdravotní stav ženy může být nepříznivě ovlivněn z různých hledisek, a to počínaje nedostatečně vyváženou stravou z pohledu zastoupení vitaminů, minerálů a jiných důležitých látek. Ženám je proto doporučován stabilní příjem kyseliny listové, která hraje důležitou roli v působení na vývoj plodu a snižování rizika výskytu různých defektů. Paradoxním faktem je, že zvýšená dávka některých vitaminů, a to například vitamínu A, může být pro plod naopak toxická. Nezbytná preventivní opatření se týkají také potenciálně nebezpečných látek, jako jsou teratogeny, alkohol, drogy a některé skupiny léků (Gate-2-biotech, © 2006 – 2018).

Preimplantační genetická diagnostika

Vzhledem k tomu, že je preimplantační genetická diagnostika jedinou metodou umožňující odhalit výskyt aneuploidií ještě před početím, lze ji též zahrnout do preventivních metod (Rutarová, 2008).

Tento druh diagnostiky je využíván v případě fertilizace *in vitro* a je doporučován především těm párům podstupujícím umělé oplodnění, u kterých je zvýšené riziko výskytu geneticky podmíněného onemocnění, dále například

pacientkám, které překročily věkovou hranici 35 let, nebo již prodělaly těhotenství, kdy byl plod postižen genetickou vadou. Hlavním záměrem je tedy získání embrya, které nevykazuje žádnou genetickou abnormalitu, v opačném případě je embryo vyřazeno.

Nejčastěji se využívá bioptického odběru 1 – 2 blastomerů u embrya, které v rámci kultivace v médiu dosáhlo stáří 3 dnů, tedy stádia 8 buněk. Získané blastomery jsou pak fixovány na sklíčka a odesílány k molekulární a cytogenetické analýze, kdy se využívá metody FISH a PCR. Pokud se v rámci genetické analýzy nepotvrdí žádná abnormalita, embryo může být využito k dalším krokům v procesu IVF (Rutarová, 2008).

2.4.3 Sekundární prevence – prenatální diagnostika

Prenatální diagnostiku charakterizuje kombinace vyšetřovacích metod a postupů, jež napomáhají k odhalování vrozených vývojových vad, jejichž klinický obraz buď indikuje velmi obtížnou léčbu, nebo jakékoliv možnosti léčby přímo vylučuje. Mezi tyto případy lze zahrnout i vady s letálními následky (Hájek et al., 2014).

Dle charakteru zákroku se tento druh diagnostiky dělí na neinvazivní a invazivní (Hájek et al., 2014).

Neinvazivní metody vyšetření

Pro neinvazivní diagnostické metody je typické, že nezatěžují organismus ženy jakýmkoliv zásahem, a tím pádem eliminují riziko ztráty plodu. Souhrnným neinvazivním vyšetřením, které zahrnuje několik druhů vyšetření je tzv. prenatální screening. Tato metoda si klade za úkol vyhledávat pacientky, u nichž existuje několikanásobně vyšší šance na výskyt vrozené vývojové vady u jejich plodu. Součástí je zkoumání anamnézy, přičemž konkrétním cílem je existence geneticky podmíněných onemocnění v rodině, dále ultrasonografie a biochemický screening detekující specifické markery v mateřském séru (Sadler, 2011, Hájek et al., 2014).

Ať už z důvodu patologického nálezu v rámci předchozího screeningu, riziku vyplývajícího ze zjištěné anamnézy, nebo čistě na vlastní žádost lze v současnosti využít i analýzy DNA samotného plodu, která se získává též z mateřského séra. Na rozdíl od základního prenatálního screeningu toto vyšetření standardně nepodstupují všechny gravidní pacientky (Sadler, 2011, Hájek et al., 2014).

Ultrazvuková diagnostika

Využití ultrazvukové diagnostiky v trvání celého těhotenství se staví na prioritní místa v prenatalní diagnostické péči. Standardně se k UZ vyšetření během těhotenství přistupuje celkem 4x, avšak záleží zcela individuálně na lékařském posouzení pro využití dalšího vyšetření v případě výskytu jakékoliv abnormality. (Calda, 2005; Calda, 2012b)

Za obvyklých podmínek se UZ screening provádí pro stanovení gravidity ideálně mezi 11. – 14. týdnem, čímž se stává součástí prvotrimestrálního screeningu, dále mezi 18. – 22. týdnem těhotenství, a následně mezi 30. – 32. týdnem gravidity, kdy je možné vyloučit různé druhy patologií včetně hypotrofizace plodu. Přibližně 1 – 2 týdny před porodem se provádí UZ vyšetření, které však neslouží jako typická součást prenatalní diagnostiky, ale už jen jako vyšetření sloužící k posouzení podmínek pro blížící se porod (Calda, 2005; Calda, 2012b).

Vstupní ultrazvukové vyšetření

Ideálně by mělo být prvotní ultrazvukové vyšetření provedeno ještě před 13. týdnem gravidity. Během úvodního vyšetření se stanovuje gestační stáří plodu, a zároveň případné vícečetné těhotenství, posuzuje se vitalita plodu a dochází k prvotnímu záchytu závažných fetálních abnormalit (Calda, 2012a).

Vyšetření v rámci prvotrimestrálního screeningu

Prvotrimestrální screening sestává z několika druhů vyšetření, která mají komplexně posoudit stav těhotné pacientky a vyvíjejícího se plodu, a zároveň již vyjádřit míru existujícího rizika výskytu vývojových vad (Sonek et al., © 2012).

Mimo aspekty, které posuzují toto riziko, se stanovuje například četnost těhotenství a upřesňuje se gestační stáří. Pro detekci rizika se zohledňují ultrazvukové nálezy, kdy je možné na základě posouzení velikosti plodu a specifických markerů detekovat vývojovou vadu již v raném stádiu. Mezi sledované markery patří především nuchální translucence, tedy šíjové projasnění a přítomnost nosní kosti (Sonek et al., © 2012).

Ultrazvuková vyšetření v průběhu těhotenství

Ultrazvukové vyšetření mezi 18. – 22. týdnem těhotenství je zaměřeno především na stanovení počtu plodů a jejich vitalitu, což je spojeno s posouzením celkové anatomie, biometrických údajů plodu a kontrolou srdeční činnosti. Mimo informace týkající se plodu se dále sleduje i množství plodové vody a uložení placenty (Calda, 2012a).

Vyšetření mezi 30. – 32. týdnem opětovně posuzuje biometrii plodu a společně s kontrolou rozměrů a výpočtem hmotnosti se vylučuje hypotrofický stav plodu. Vzhledem k tomu, že tento stav je vyvoláván právě defektní funkcí placenty, kontroluje se i nyní uložení placenty a množství plodové vody (Calda, 2012a).

Ultrazvukové parametry

Ultrazvukové vyšetření přispívá v rámci prenatalního screeningu získáním několika důležitých markerů, které jsou později zohledňovány společně s anamnézou a výsledky biochemického screeningu. Těmito markery jsou CRL (crown rump length), tedy stanovení temeno-kostrční vzdálenosti, jejíž hodnota se v období 11. – 14. týdne gravidity fyziologicky pohybuje mezi 45 – 84 mm. Tento marker je považován jako zásadní parametr pro odhad rizika jakýchkoliv anomálií plodu jak v prvním, tak i ve druhém trimestru (Sonek et al., © 2012; Polák et al., 2017).

Dalším základním markerem je NT (nuchální translucence), tedy hodnota šíjového projasnění plodu, která se stanovuje v prvním trimestru. Výsledky se s ohledem na potřeby vyhodnocení kombinovaného testu převádí na mediány. Všeobecně se riziko výskytu chromozomální abnormality úměrně zvyšuje se zvětšující se šířkou (Sonek et al., © 2012; Polák et al., 2017).

Důležitým aspektem při UZ vyšetření je přítomnost nosní kůstky, tedy marker zvaný NB (nasal bone). Pokud během screeningu v období mezi 11. – 14. týdnem těhotenství nosní kůstka chybí, existuje mnohem vyšší pravděpodobnost, že bude plod postižen geneticky podmíněnou vadou. (Sonek et al., © 2012; Polák et al., 2017)

V rámci vyšetření biometrických parametrů v průběhu druhého trimestru se měří například BPD (biparietal diameter), což je parametr, který udává biparietální průměr hlavy plodu (Sonek et al., © 2012; Polák et al., 2017).

Biochemický screening

Biochemická laboratorní vyšetření se provádí pro detekci nejčastějších vad zasahujících chromozomální výbavu. I přesto, že je biochemický screening zaměřen na odhalování těchto vad, podává s ostatními posuzovanými aspekty pouze informaci o míře rizika jejich výskytu, tudíž neslouží k jejich přímé diagnostice. V rámci tohoto screeningu se posuzují konkrétní biochemické markery – konkrétně jejich hladiny v mateřském séru. Jedná se o PAPP – A, free β -hCG, hCG, AFP a uE3 (Polák et al., 2017).

Invazivní metody vyšetření

Vzhledem k rapidnímu vývoji laboratorní diagnostiky se stále rozšiřují možnosti ve využití invazivních metod. Nicméně je prioritní snahou snížit počet těchto invazivních vyšetření prenatalní diagnostiky s ohledem na existující rizika, kdy mohou nastat komplikace spojené s poškozením plodu, vyvoláním potratu či předčasného porodu. Z těchto důvodů by se mělo k těmto vyšetřovacím metodám přistupovat až v případě závažného podezření na některou ze zmiňovaných aberací, tedy nejčastěji na základě pozitivních výsledků prenatalního screeningu jak v I., tak i ve II. trimestru, nebo při posouzení jiných rizikových faktorů, jako například věku matky (Hájek, 2004; Binder, 2011).

Mezi invazivní diagnostické metody se řadí bioptický odběr vzorku choria (CVS), odběr fetální krve z pupečnickové žíly (kordocentéza) a odběr plodové vody (amniocentéza). Veškerá vyšetření probíhají pod ultrazvukovým dohledem, aby se minimalizovala rizika komplikací. Ze získaného materiálu – tedy buněk choria či plodové vody je možné provést především genetická vyšetření stanovující karyotyp plodu (Binder, 2011; PUBS – odběr pupečnickové krve, © 2018).

Odběr vzorku choria (CVS)

Dle pokročilosti těhotenství se CVS dělí na časnou, prováděnou mezi 9. – 12. týdnem, a na pozdní, tedy placentocentézu prováděnou po 12. týdnu. K cytogenetickému vyšetření se využívá buněk cytotrofoblastu nebo pluripotentních mezenchymálních buněk mezodermy. Výkon je prováděn zpravidla transabdominálně, tedy přes břišní stěnu s ultrazvukovou kontrolou. K úspěšnému odběru je třeba získat alespoň 10 – 20 mg tkáně. Po vyšetření je nezbytné předpokládat zvýšenou hladinu AFP, který může být v důsledku CVS zvýšen až o 70 % (Hájek, 2004; Polák et al., 2017).

Další komplikací při diagnostice může být výskyt placentárního mozaicismu, kdy je chromozomální změna přítomna pouze v choriu, nikoliv u plodu, v tomto případě je nutné přistoupit k amniocentéze. Všeobecné riziko ostatních komplikací, jako spontánní potrat, odtok plodové vody, krvácení, a dalších je přibližně 0,5 – 1 % (Hájek, 2004; Polák et al., 2017).

Amniocentéza (AMC)

Ideální období pro odběr plodové vody je mezi 15. – 22. týdnem těhotenství, kdy se její množství pohybuje okolo 240 – 280 ml, přičemž se během vyšetření odebírá 10 – 20 ml

v závislosti na týdnu gravidity. Odběr probíhá též pod kontrolou ultrazvuku pomocí transabdominální punkce. Odebírají se buňky ektodermálního nebo mezodermálního původu, ty následně slouží k cytogenetickému nebo molekulárnímu vyšetření DNA, kdy se využívá metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a PCR polymerázová řetězová reakce). Získaný vzorek se následně zasílá i k diagnostice biochemických markerů. Riziko komplikací se opět pohybuje kolem 0,5 – 1 % (Hájek, 2004; Polák et al., 2017).

Kordocentéza (KDC)

Kordocentézou se rozumí odběr fetální krve punkcí pupečnickové vény. K tomuto vyšetření se přistupuje zpravidla až kolem 20. týdne gravidity, a to na základě neurčitých výsledků aminocentézy, požadavku na určení karyotypu plodu, při podezření na infekční onemocnění, jejichž stanovení z plodové vody není většinou možné, a pro stanovení markerů hematologických, imunologických a metabolických (Hájek, 2004; Polák et al., 2017).

Odběr se provádí punkční jehlou pod ultrazvukovou kontrolou a pro následnou diagnostiku je vyžadováno množství 1 - 2 ml fetální krve. Riziko následných komplikací přitom nepřesahuje 1 % (Hájek, 2004; Polák et al., 2017).

2.5 Prenatální screening chromozomálních aberací

K přímému vyloučení či potvrzení výskytu chromozomální vady slouží invazivní vyšetření, která s sebou nesou určitou míru rizika komplikací. Právě i z důvodu snahy vyloučit komplikace v rámci prenatální diagnostiky se začalo přistupovat k využití screeningových programů. Jedná se o metody, které si kladou za úkol vyhledat pacientky s určitým rizikem výskytu aneuploidie. Za pomoci této diagnostiky je pak možné indikovat invazivní metody pouze u pacientek s vážným podezřením na výskyt chromozomální aberace či s výskytem vývojových vad v rodinné anamnéze nebo předchozích těhotenstvích (Belošovičová, Calda, 2012; Hájek et al., 2014).

Tato metoda vyhledávání rizikových pacientek by měla splňovat určité požadavky, které v zásadě souvisí se šetrností vůči pacientce – zákrok by měl být bezbolestný a bez negativních pocitů pacientky. Dále by provedení testu mělo být snadné a celkově by ho měla charakterizovat jednoduchost, vysoká spolehlivost a citlivost. Vedlejším aspektem je jeho ekonomická únosnost. I přes veškeré požadavky je však nutné podotknout, že žádný screeningový test není tím ideálním a univerzálním, a

tak nelze počítat se 100 % schopností detekovat všechny vývojové vady (Belošovičová, Calda, 2012; Hájek et al., 2014).

2.5.1 Screeningové testy v prvním trimestru těhotenství

Kombinovaný test

Tento test je charakterizován vysokou efektivitou v odhalování trizomií jak 13., 18., tak i 21. chromozomu, a to až v 90 % případů postižení plodu. Výskyt falešně pozitivních výsledků je přitom přibližně do 5 %. Princip vyšetření spočívá v komplexním zohlednění výsledků biochemického a ultrazvukového vyšetření a společně s věkem matky tak probíhá výpočet rizika výskytu aneuploidie. V rámci biochemického screeningu se vyšetřuje PAPP – A a free β -hCG. Ultrazvukové vyšetření zohledňuje parametr nuchální translucence, zachycuje jakékoliv strukturální anomálie a ověřuje četnost těhotenství (Belošovičová, Calda, 2012).

Kontingenční test

Kontingenční test je obdobou testu kombinovaného, kdy se vyšetřují prakticky stejné markery a zohledňují totožné aspekty, přičemž jsou ještě začleněny tzv. minormarkery, k nimž řadíme například přítomnost NB – nosní kosti, krevní průtok v ductus venosus, srdeční frekvenci, měření délky kosti stehenní a pažní, a jiné. Míra detekce výskytu trizomií je přitom až 95 %, a to při pouhých 2 % falešně pozitivních detekcí (Belošovičová, Calda, 2012).

2.5.2 Screeningové testy ve druhém trimestru těhotenství

Double test

Double test je využíván ke stanovení rizika výskytu trizomií 18 a 21. Podkladem je vyšetření markerů AFP a hCG. Míra detekce závisí na přítomnosti volné podjednotky

β -hCG. Pokud je součástí testu celá molekula, pohybuje se procento detekce mezi 55 – 60, v případě, že je přítomna volná podjednotka, zvyšuje se míra detekce o 5 % při stejné míře falešné pozitivity pro obě varianty, a to 5 %. Přes značnou nespolehlivost je test v klinické praxi nadále využíván (Belošovičová, Calda, 2012).

Triple test

Triple test určuje riziko trizomií 18 a 21 stanovením markerů AFP, hCG, volného E3 a zohledněním věku pacientky. Jako u double testu se v případě přítomnosti volné podjednotky β -hCG zvyšuje míra detekce o 5 %, přičemž s přítomností celé molekuly

se detekce pohybuje mezi 60 – 65 % při 5 % falešné pozitivitě (Belošovičová, Calda, 2012).

Quadruple test

Quadruple test stanovuje riziko výskytu trizomie 18 a 21 na základě vyšetření markerů AFP, hCG, volného E3, inhibinu A, a zohlednění věku pacientky. I v případě quadruple testu je nutné brát v potaz rozdílnost detekce na základě přítomnosti volné podjednotky β -hCG, kdy je o 5 % vyšší, než za přítomnosti celé molekuly, kdy se míra detekce pohybuje mezi 55 – 60 %, a to při 5 % falešně pozitivních případů (Belošovičová, Calda, 2012).

2.5.3 Screeningové testy v prvním i ve druhém trimestru těhotenství

Integrovaný test

Integrovaný test je v současnosti ze všech testů nejvíce vyzdvihován vzhledem k vysokému procentu detekce a nízké hodnotě falešné positivity. Pomocí integrovaného testu se stanovuje riziko výskytu trizomií 13, 18, i 21. Test zahrnuje vyšetření markeru PAPP – A a ultrazvukového vyšetření šijového projasnění za období prvního trimestru a vyšetření markerů AFP, hCG, volného E3 a inhibinu A za trimestr druhý (Belošovičová, Calda, 2012).

Nízké procento falešné positivity je v případě tohoto vyšetření nespornou výhodou, ale je zapotřebí brát v potaz podmínku, že se po vyšetření, které probíhá v první trimestru, nebude na případnou pozitivitu reagovat invazivní diagnostikou s navazující karyotypizací, ale vyčká se na výsledek screeningu biochemických markerů v druhém trimestru. Tento aspekt tak může být považován jako hlavní nevýhoda, jelikož ne všechny pacientky jsou ochotné vyčkat (Belošovičová, Calda, 2012).

Existuje i varianta integrovaného testu, a tou je takzvaný sérum integrovaný test, který se shoduje se základní podobou s tím rozdílem, že není prováděno ultrazvukové vyšetření. Riziko výskytu všech trizomií se tak vypočítává na základě výsledků biochemického screeningu za první i druhý trimestr a věku těhotné pacientky. Míra detekce dosahuje při 5 % falešné positivity až 86 % (Belošovičová, Calda, 2012).

Sekvenční test

Sekvenční test se dělí na dvě části, a to na kombinovaný test prováděný v prvním trimestru, a na biochemický screening prováděný ve druhém trimestru. Riziko výskytu všech trizomií je tedy vyhodnocováno na základě věku pacientky, stanovení

biochemických markerů PAPP – A, free β -hCG a vyšetření nuchální translucence v rámci ultrazvukového vyšetření v prvním trimestru, a stanovení biochemických markerů AFP, inhibinu A, volného E3 a hCG v trimestru druhém. (Belošovičová, Calda, 2012)

Sekvenční test se od toho integrovaného odlišuje v tom, že se kombinovaný test v prvním trimestru vyhodnocuje buď jako pozitivní, nebo negativní, a v případě jeho positivity se přistupuje k invazivní metodě vyšetření a následnému vyšetření karyotypu. V případě negativity se standardně provádí screening v rámci druhého trimestru a zpravidla probíhá komplexní vyhodnocení obou druhů screeningu (Belošovičová, Calda, 2012).

2.5.4 Základní cytogenetické vyšetření chromozomů

Analýza chromozomálních defektů a chromozomů samotných dnes spadá pod základní náplň cytogenetických laboratoří. Historie vývoje metod zabývajících se analýzou genetického materiálu však nesáhá nijak daleko, jelikož k dostatečně kvalitní vizualizaci chromozomů je zapotřebí především kvalitně zpracovaného buněčného preparátu, čehož bylo dosaženo až na počátku 2. poloviny 20. století, kdy bylo zpočátku úspěchem stanovit konkrétní počet chromozomů v karyotypu. Prvotně používané techniky barvení neumožňovaly diferencovat jednotlivé chromozomy, ale sloužily alespoň k jejich rozdělení v rámci 7 tříd, přičemž dělicím kritériem byla jejich velikost a přibližná poloha centromer (Hatina, Sykes, 1999).

Základním principem pro vyšetření chromozomů je rozdílnost v jejich struktuře, která se mění v závislosti na probíhající fázi buněčného cyklu. Chromozomy obsahující jadernou DNA zaujímají podstatnou část buněčného cyklu tzv. nezkondenzovanou formu, až v průběhu metafáze během buněčného dělení se stávají pro většinu cytogenetických analýz pozorovatelnými, jelikož nabývají hustší a kompaktnější formy (Primrose, Twyman, 2003).

Důležitou strukturní jednotku, jež spadá pod analyzované struktury chromozomů, tvoří chromatin – jaderná hmota tvořená DNA a proteiny. Chromatin existuje v jádře ve dvou podobách, a to jako euchromatin, který se při barvení zobrazuje světle, zatímco heterochromatin tmavě, a to na základě rozdílnosti transkripční aktivity (Primrose, Twyman, 2003).

Možnost stanovení a rozdělení jednotlivých chromozomů přinesla až technika proužkování, tzv. chromosome banding. Tato metoda totiž umožnila vizualizaci oblastí uvnitř chromozomů, které se do té doby barvily jednotně. V praxi se můžeme setkat se

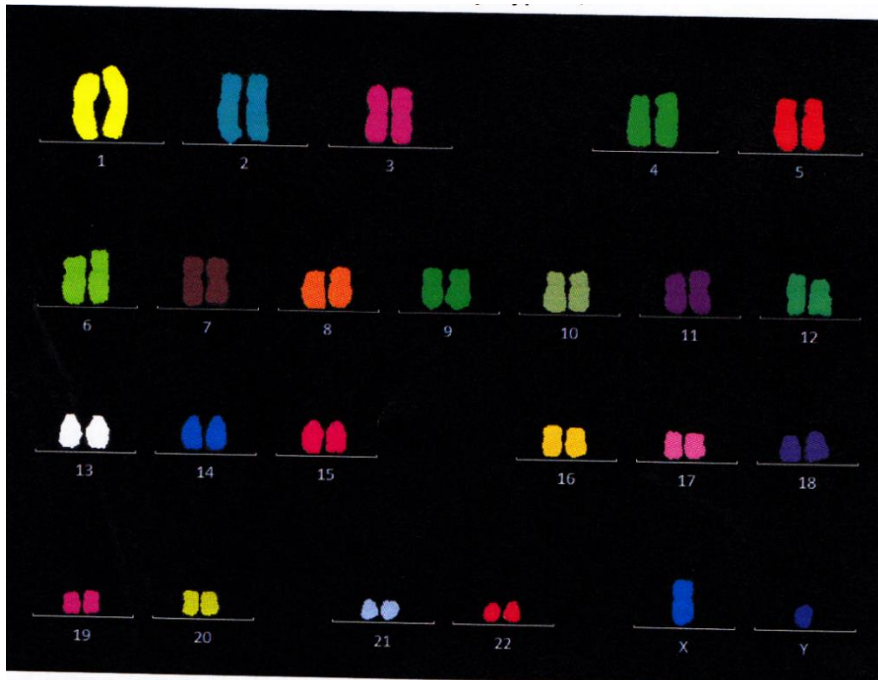
čtyřmi základními systémy proužkování. Q-banding je vhodným systémem pro vizualizaci Y-chromozomu a využívá chinakrinu, což je fluorescenční barvivo. Pro C-, G-, a R-banding je společným bodem využití Giemsova barvení, ale odlišnost spočívá v přípravě vzorků vyšetřovaných chromozomů. C- banding se využívá k detekci centromer. G-banding (obr. 4) se využívá nejčastěji pro svou přednost ve vizualizaci nejjemnější struktury proužků a předchází mu aplikace trypsinu ke vzorku chromozomů. R-banding využívá techniky, při níž jsou chromozomy ošetřeny teplým fyziologickým roztokem, a v závěru poskytuje výsledek obdobný G-banding technice, ale v reverzní poloze světlých a tmavých proužků (Hatina, Sykes, 1999).

2.5.5 Fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH)

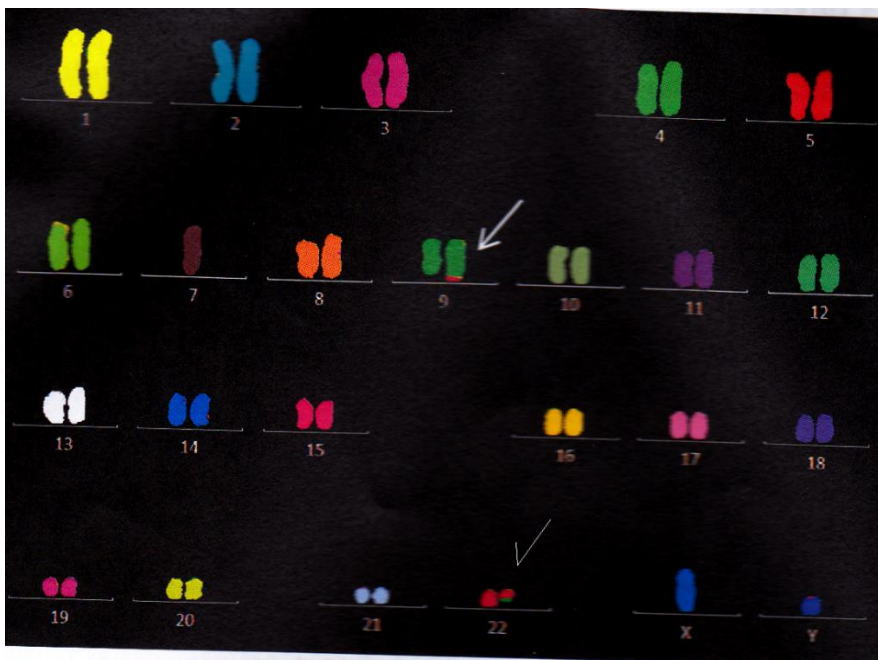
Pro vyšetření karyotypu, které je prováděno pomocí mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace, je zapotřebí buněk dělících se v procesu metafáze (Synlab czech s.r.o., 2018b).

Využívá se neradioaktivně značených DNA sond, u kterých probíhá hybridizace k daným úsekům DNA chromozomů fixovaných k podložnímu sklíčku, a to na základě vzájemné komplementarity. Sondy jsou značené pomocí několika flurochromů. Samotnou hybridizací a následnou detekcí vzniká mnohobarevný obraz, který je za pomoci fluorescenčního mikroskopu snímán CCD (Charged-coupled device) kamerou, pro kterou je charakteristická její vysoká citlivost a přítomnost několika optických filtrů, jenž se vyznačují úzkým spektrem odpovídajícím použitým flurochromům (Synlab czech s.r.o., 2018b).

Obraz je nadále zpracován speciálním softwarem, který proměřuje intenzitu fluorescenčních signálů vycházejících od jednotlivých chromozomů. Na základě této analýzy jsou homologním párům přiřazeny klasifikační barvy, pomocí nichž je možné chromozomy rozdělit na autozomy a gonozomy (obr. 5; obr. 6), což umožňuje karyotypizaci dle ISCN nomenklatury (Synlab czech s.r.o., 2018b).



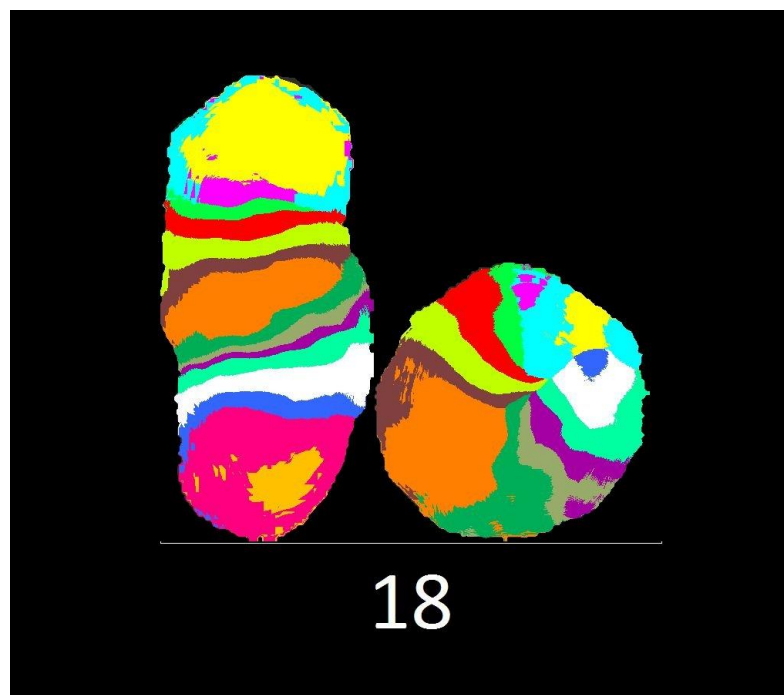
Obr. 5 – Fyziologický karyotyp
(Synlab czech s.r.o., 2018b)



Obr. 6 – Aberantní karyotyp
(Synlab czech s.r.o., 2018b)

2.5.6 Metoda mnohobarevného pruhování (mBAND)

Princip této metody spočívá ve využití parciálních sond, komplementárních k variabilně rozsáhlým překrývajícím se úsekům DNA analyzovaného chromozomu. Tyto sondy jsou též značeny pěti flurochromy. Po hybridizaci dochází v důsledku částečného překryvu fluorescenčních signálů jednotlivých sond k souvislým změnám v intenzitě signálů všech fluorochromů podél analyzovaných chromozomů. Za pomoci analýzy intenzity těchto signálů přiřazuje počítačový software ke konkrétním chromozomálním oblastem různé klasifikační barvy. Výsledkem je specifický obraz sledovaného chromozomu s mnohobarevnými pruhy (obr. 7) (Synlab czech s.r.o., 2018b).



Obr. 7 – Výsledný obraz techniky mBAND

(Zdroj: MetaSystems Group, Inc., 2017)

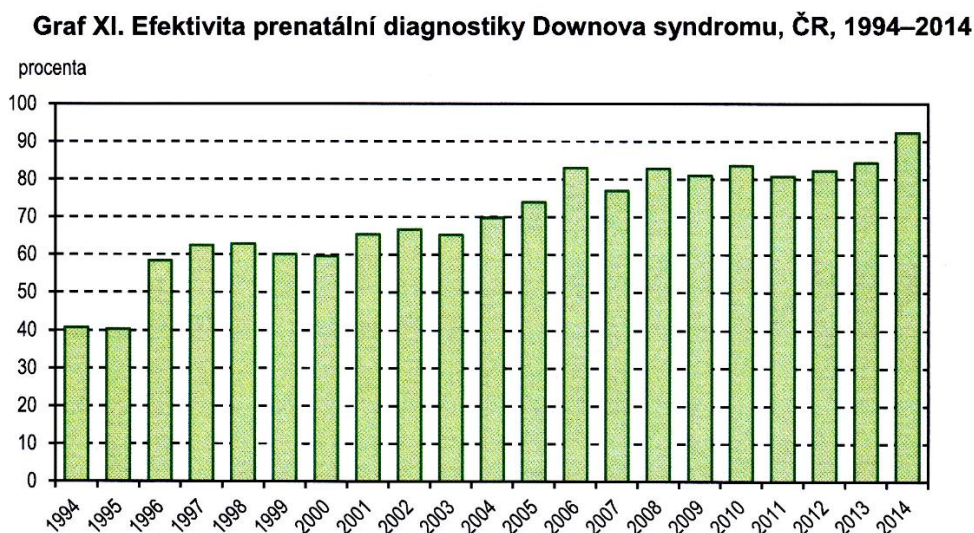
Tato analýza není limitována konkrétním stupněm kondenzace chromozomů a je adekvátním způsobem analýzy rozsahu chromozomálních aberací, a to zejména delecí a inverzí. Dále umožňuje mapovat zlomová místa v rámci komplexních přestaveb chromozomální výbavy (Synlab czech s.r.o., 2018b).

2.5.7 Statistika efektivity prenatální diagnostiky v ČR dle ÚZIS ČR

Část statistik publikace ÚZIS ČR „Vrozené vady u narozených v roce 2013 – 2014“ se věnuje výslednému vlivu prenatální diagnostiky v ČR. Dle primáře oddělení lékařské genetiky v Thomayerově nemocnici, MUDr. Gregora, významně roste vliv prenatální

diagnostiky ve vztahu k výslednému počtu zaznamenaných VVV. Zásadní podíl na tom nese přesun diagnostiky do raných fází gravidity, což přispívá jak k rozsáhlejšímu záchytu aberací, tak k možnosti přistoupit k invazivním diagnostickým metodám mnohem dříve. V rámci statistik se sleduje jak vývoj neinvazivní, tak invazivní prenatalní diagnostiky (ÚZIS ČR, © 2017).

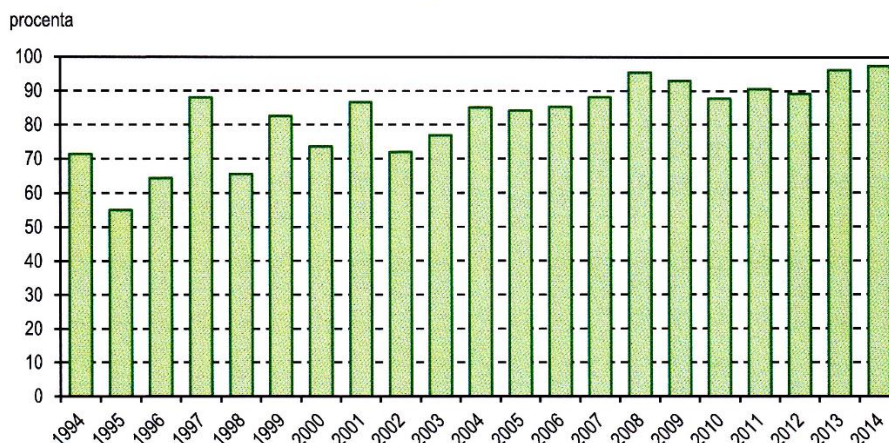
Ve statistických grafech je věnována pozornost především efektivitě záchytu Downova syndromu (obr. 12), (ÚZIS ČR, © 2017).



Obr. 12 - Graf efektivitě prenatalní diagnostiky u Downova syndromu (ÚZIS ČR, © 2017)

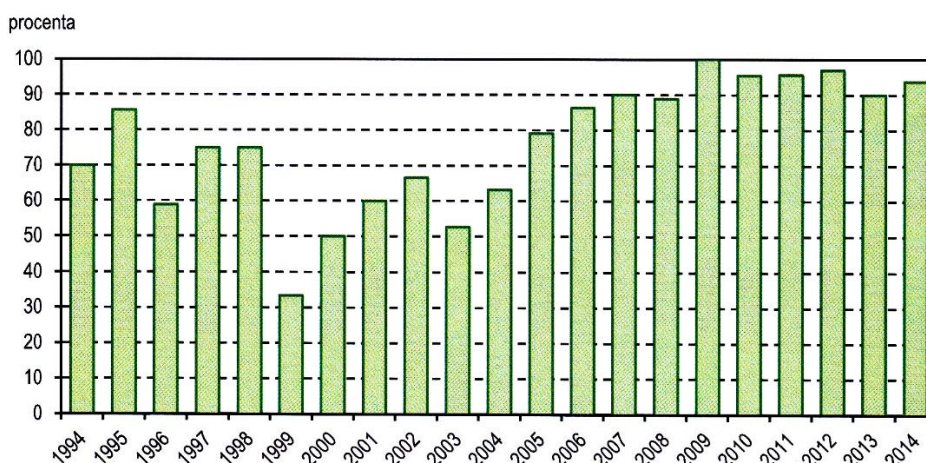
Dále je efektivita prenatalní diagnostiky sledována i u ostatních trizomií, tedy u Edwardsova syndromu (obr. 13) a u Patauova syndromu (obr. 14) (ÚZIS ČR, © 2017).

Graf XII. Efektivita prenatalní diagnostiky Edwardsova syndromu, ČR, 1994–2014



Obr. 13 - Graf efektivity prenatalní diagnostiky u Edwardsova syndromu (ÚZIS ČR, © 2017)

Graf XIII. Efektivita prenatalní diagnostiky Patauova syndromu, ČR, 1994–2014



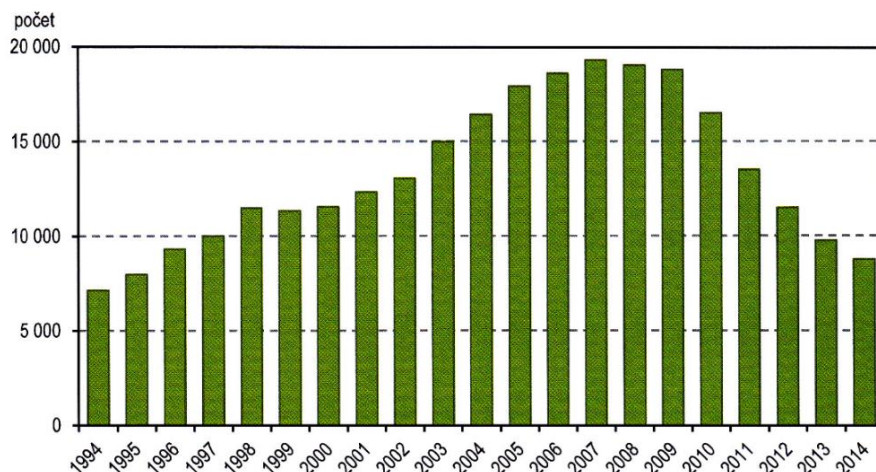
Obr. 14 - Graf efektivity prenatalní diagnostiky u Patauova syndromu (ÚZIS ČR, © 2017)

Ze souhrnných statistik je zřetelné, že se efektivita prenatalní diagnostiky zvyšuje napříč všemi zmiňovanými aberacemi, přičemž nejvyšší záchyt je zaznamenán u Downova syndromu. Nezanedbatelný podíl na tom nesou komplexní změny screeningových programů v ČR. Důraz je přitom kladen na časnější diagnostiku VVV, tedy využívání diagnostiky v rámci prvního trimestru, díky čemuž dochází k poklesu počtu provedených invazivních diagnostických zákroků, nebo alespoň k možnosti

využít časnější invazivní metody s nízkým rizikem následných komplikací (ÚZIS ČR, © 2017).

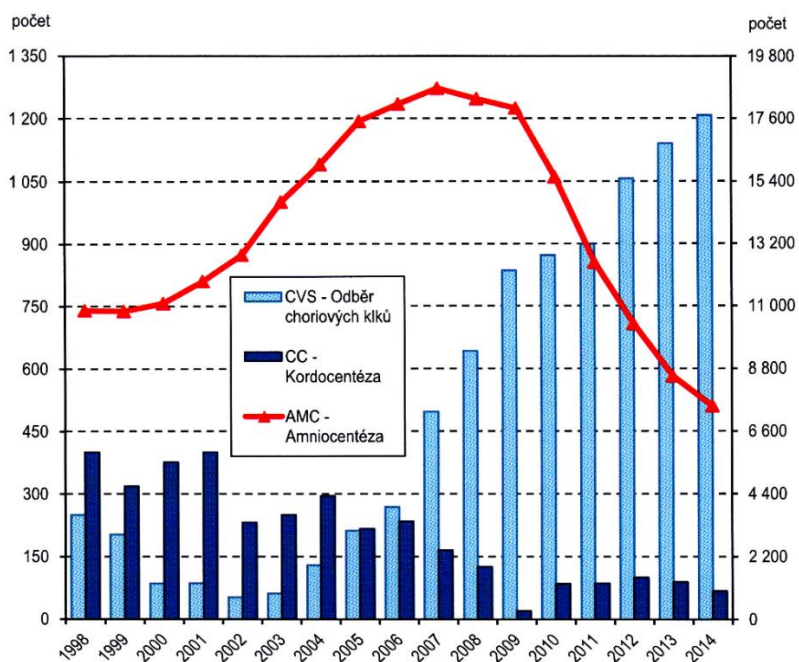
Vývoj invazivní diagnostiky je také součástí zpracované statistiky (obr. 15), kdy se ÚZIS ČR zaměřuje i na četnost jednotlivých invazivních metod (obr. 16) (ÚZIS ČR, © 2017).

Graf I. Vývoj počtu provedené invazivní prenatalní diagnostiky vrozených vad v ČR, 1994–2014



Obr. 15 - Graf vývoje počtu invazivní prenatalní diagnostiky (ÚZIS ČR, © 2017)

Graf III. Vývoj prenatalní diagnostiky vrozených vad v ČR, 1998–2014



Obr. 16 - Graf vývoje invazivní prenatalní diagnostiky (ÚZIS ČR, © 2017)

3 Cíl práce

Výzkumná část této bakalářské práce se zabývá laboratorním vyšetřením těhotných pacientek, zaměřeným na vyhledávání těch s vyšším rizikem výskytu vrozené vývojové vady, a to konkrétně biochemickým screeningem prováděným v I. i II. trimestru těhotenství. Výzkumný soubor tvořilo 40 pacientek, jejichž vzorky byly zpracovány laboratoří klinické biochemie společnosti synlab czech s.r.o. Tyto vzorky pocházely převážně ze spolupracující laboratoře GENNET, s.r.o., dále z Ústavu pro péči o matku a dítě v pražském Podolí, a v menší míře z ordinací praktických lékařů – gynekologů. Vyhledávacím kritériem byla indikace k provedení druhotrimestrálního screeningu a existence dat z biochemického vyšetření v rámci I. trimestru.

Cílem bakalářské práce je tvorba souhrnného přehledu výsledků biochemického screeningu za I. i II. trimestr včetně některých anamnestických údajů a výsledků UZ vyšetření. A dále sledování korelace mezi věkem pacientek a výslednými hodnotami PAPP – A, free β -hCG a NT uváděnými v násobcích mediánů.

4 Metodika práce

4.1 Materiál

4.1.1 Biochemické vyšetření

K provedení biochemického vyšetření nebylo zapotřebí žádné speciální úpravy či přípravy vzorku, jelikož se jedná o automatizovaný proces analýzy vzorku séra či plazmy.

4.1.2 Genetické vyšetření – pomůcky, chemikálie

Kultivace buněk

15 ml zkumavky Falcon
jednorázové sterilní pipety
automatické pipety
kultivační lahvičky
RPMI1640 kultivační médium bez stimulantů
kolcemid

Hypotonizační roztok

směs Optimal Hypotonic
destilovaná voda

Fixační roztok

metanol
99,5% kyselina octová

Příprava preparátu

podložní skla
krycí skla
elastické lepidlo Fixogum
96% ethanol
destilovaná voda
DNA sondy
DAPI barvivo
20x SSC

4.2 Biochemický screening

Biochemický screening je založen na principu monitorování biochemických látek, jejichž produkce je spjata se změnami v organismu ženy v průběhu těhotenství. Produkce těchto látek je zprostředkována fetoplacentární jednotkou. Sledování hladiny těchto specifických látek může přispívat buď ke zhodnocení zdravotního stavu těhotné pacientky, nebo samotného plodu. Pro vyšetření nejčastějších chromozomálních aberací se tyto testy provádí jak v prvním, tak i ve druhém trimestru těhotenství, je však nutné podotknout, že analyzované markery nenesou funkci přímé detekce anomálií, ale pouze vyjadřují míru rizika jejich výskytu (Polák et al., 2017).

Všeobecně probíhá v laboratorní praxi analýza 6 biochemických markerů, a to AFP, hCG, free β -hCG, PAPP-A, uE₃ a inhibinu A. V laboratoři, kde probíhala samotná praxe, se vyšetřují všechny markery, až na Inhibin A. V rámci své laboratorní praxe jsem se tedy podílela především na analýze markerů AFP, hCG a uE₃, které spadají pod biochemický screening II. trimestru.

Nedílnou součástí biochemického screeningu tvoří také anamnéza a ultrazvukové vyšetření. Jelikož jsou výsledky biochemického screeningu posuzovány komplexně, je nezbytné, aby žádanka s požadavkem na biochemické vyšetření zahrnovala i výsledky z ultrazvukového vyšetření pacientky a některé z anamnestických údajů. (obr. 1). Veškeré potřebné anamnestické údaje společně s výsledky z UZ jsem získala v programu Selma, který slouží k evidenci žádanek. Výsledky screeningu z I. trimestru byly k dispozici v programu STAPRO.

Veškeré údaje a výsledky jsou pak základem pro výpočet pravděpodobnosti výskytu vrozené vývojové vady. Hranici hodnot mezi negativitou a pozitivitou si určuje sama laboratoř a míru pravděpodobnosti vyjadřuje například hodnotou 1:100. Pokud je například jako hranice positivity stanovena hodnota 1:50, bude výsledek 1:100 považován jako negativní, zatímco výsledek 1:25 jako pozitivní. V případě této laboratorní praxe probíhá výpočet buď v laboratořích GENNET, s.r.o., nebo přímo u ošetřujících lékařů. K samotnému výpočtu slouží specializované počítačové programy (např. Alpha nebo Astraia), které zohledňují požadovaná kritéria, a to hlavně výsledky biochemického screeningu, hodnoty naměřené při UZ vyšetření, věk, hmotnost, gestační stáří, případně další specifické anamnestické údaje.

4.3 Biochemické markery vyšetřované v prvním trimestru těhotenství

4.3.1 Celkové hCG / free β -hCG (lidský choriongonadotropin)

Tvorba glykoproteinu hCG je zajištěna syncytiotrofoblastem placenty. Lidský choriongonadotropin se v lidském organismu vyskytuje nejen jako celistvá molekula, ale i jako volná podjednotka. Zásadní úlohou hCG je stimulace funkce žlutého tělíska (Polák et al., 2017).

Hodnoty hCG se zvyšují v případě postižení plodu trizomií 21, opačný efekt vyvolává přítomnost trizomií 18 a 13, kdy bývají hladiny nižší. Pokud se jedná o pacientku, která podstoupila jakýkoliv druh asistované reprodukce, je zapotřebí počítat s tím, že hodnoty hCG bývají vyšší. Vyšetření hladiny lidského gonadotropinu se provádí jak v prvním, tak i ve druhém trimestru (Polák et al., 2017).

Za standartních podmínek se ve vybrané laboratorní praxi stanovuje samostatná free β -hCG v rámci prvotrimestrálního screeningu, zatímco celkové hCG společně s β podjednotkou je formou stanovovanou pomocí biochemického screeningu v průběhu druhého trimestru. Vyšetřovaným materiálem je v případě samostatné podjednotky sérum - totožně, jako u kombinovaného stanovení s tím rozdílem, že u kombinovaného stanovení lze využít i plazmu s různými antiagregačními činidly, jako například citrát sodný, heparin, fluorid sodný, K_3EDTA či Na_2EDTA , aj. (Synlab czech s.r.o., 2018d; Synlab czech s.r.o., 2018e).

4.3.2 PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A)

Jedná se o glykoprotein, který je během těhotenství produkován placentou, avšak jeho funkce nebyla zcela definována. Spekulace hovoří o účasti při regulaci fetoplacentárního růstu, v období mimo těhotenství je spojen s hojivými procesy nebo opětovným tvarováním kostní tkáně (Polák et al., 2017).

Při existenci chromozomální anomálie bývají jeho hladiny nižší, přičemž markantní snížení může být varovným signálem pro vysoké riziko potratu. Ovlivnění výsledků metodami asistované reprodukce je obdobné jako u hCG, v případě PAPP-A ovšem záleží i na konkrétním způsobu, který byl k fertilizaci využit, hodnoty tak mohou být ovlivněny jak směrem ke spodní, tak i k horní hranici (Polák et al., 2017).

Analyzovaným materiálem je mateřské sérum odebrané ve standartní odběrové soupravě nebo v soupravě se separačním gelem (Synlab czech s.r.o., 2018f).

4.4 Biochemické markery vyšetřované ve druhém trimestru těhotenství

4.4.1 AFP (Alfa – 1 – fetoprotein)

Produkce tohoto onkofetálního proteinu je zprostředkována žloutkovým váčkem a játry samotného plodu. AFP lze strukturou a funkcí připodobnit albuminu. Jeho úloha nespočívá pouze v odhalování rizika výskytu chromozomálních anomálií, ale ve spojení s ultrazvukovou diagnostikou ho lze také využít jako marker detekce poškození neurální trubice a různých druhů malformací plodu (Polák et al., 2017).

Přítomnost chromozomálních aberací, konkrétně trizomií 21, 18 a 13, naznačují abnormálně snížené hodnoty AFP, naopak vyšší hodnoty se objevují například u různých defektů, malformací, nebo i v případě úmrtí plodu. S vyššími hodnotami je nutné počítat v případě metod asistované reprodukce. (Polák et al., 2017)

AFP je analyzován ze séra v klasické soupravě nebo v soupravě se separačním gelem, dále i z plazmy v K3EDTA, citrátu sodném, nebo heparinizované plazmy (Synlab czech s.r.o., 2018c).

4.4.2 uE3 (nekonjugovaný estriol)

Nekonjugovaný estriol nespadá svým charakterem jako jediný z vyšetřovaných látek pod skupinu proteinů, ale jedná se o steroidní hormon, a zároveň o nejmenší molekulu ze všech zmiňovaných biochemických markerů. Vzniká ve fetálních nadledvinách, játrech a placentě, kde se tvoří v rámci metabolismu cholesterolu. Některé zdroje uvádí, že napomáhá změkčovat děložní čípek před samotným porodem a podílí se na procesu přípravy mléčné žlázy před nástupem laktace. (Polák et al., 2017)

Potenciální riziko výskytu Downova, Edwardsova i Patauova syndromu značí snížené hodnoty, jako je tomu i u AFP, ale z pohledu míry citlivosti ve vztahu k detekci Downova syndromu je estriol považován za spolehlivější marker. Lehce snížené hladiny jsou očekávané u těhotenství vzniklých za pomoci asistované reprodukce (Polák et al., 2017).

Ke stanovení volného estriolu se využívá nehemolyzovaného séra (Synlab czech s.r.o., 2018g).

4.5 Vyšetření biochemických markerů v laboratorní praxi

Převážná část vzorků určených k diagnostice biochemických markerů pocházela ze spolupracující laboratoře GENNET, s.r.o., další část tvořily vzorky od praktických lékařů, a z Ústavu pro péči o matku a dítě v pražském Podolí.

Vzorky nebylo zapotřebí před vyšetřením nijak upravovat, jen bylo důležité, aby u nich byla před měřením zachována pokojová teplota, jelikož v důsledku zvýšené teploty mohlo dojít k jejich inaktivaci. V některých případech bylo také třeba zvýšené pozornosti na stav materiálu, a to konkrétně u hemolytických vzorků.

Vyšetření biochemických markerů probíhalo na biochemickém analyzátoru Cobas e601 (obr. 2), u nekonjugovaného estriolu na analyzátoru UniCel DxI 800 (obr. 3). Požadovaným materiálem, který byl zpracováván, bylo převážně krevní sérum, u některých markerů to byla plazma. Markery byly z mateřského séra nebo plazmy analyzovány elektrochemiluminiscenční metodou.

Tato imunoanalytická metoda je modifikovanou verzí chemiluminiscence, kdy je luminiscence generována chemickými reakcemi s tím rozdílem, že jsou tyto reakce iniciovány elektrochemicky (Synlab czech s.r.o., 2018a).

V případě analyzátoru Cobas e601 je využit sendvičový princip imunoanalytického stanovení. V průběhu inkubace spolu nejdříve reagují biotinylovaná monoklonální protilátka stanovovaného analytu s monoklonální protilátkou stanovovaného analytu, značená rutheniovým komplexem a tvoří tak sendvičový komplex. V druhé fázi inkubace se přidávají mikročástice potažené streptavidinem a komplex vzniklý v předešlém kroku se tak váže na pevnou fázi v důsledku interakce mezi biotinem a streptavidinem. V měřicí komůrce, kam je reakční směs nasáta, jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody, zatímco nenavázané složky odstraňuje roztok ProCell. Následně je přivedeným napětím vyvolána chemiluminiscenční emise fotonů, kterou měří fotonásobič. V závěru jsou výsledky hodnoceny z kalibrační křivky (Synlab czech s.r.o., 2018f).

Stanovení nekonjugovaného estriolu oproti ostatním markerům probíhalo na analyzátoru UniCel DxI 800.

Jeho principem je kompetitivní imunoenzymatická analýza. Vzorek je v reakční kvěť smíchán s konjugátem estriolu s alkalickou fosfatázou a paramagnetickými částicemi, které jsou potažené kozí záchytnou protilátkou proti králičím imunoglobulinům a polyklonální králičí protilátkou proti estriolu. Ve vzorku tak estriol

soutěží s konjugátem estriolu s alkalickou fosfatázou o vazebná místa na omezené množství specifické protilátky proti estriolu. Vzniklé komplexy se vážou na záchytnou protilátku na pevné fázi. Při následné inkubaci se nenavázané látky odstraňují pomocí separace v magnetickém poli a promytím. V závěrečném kroku je do reakční květy aplikován chemiluminiscenční substrát a světlo generované reakcí je měřeno luminometrem. Výsledné množství analytu je opět stanoveno na základě kalibrační křivky (Synlab czech s.r.o., 2018g).

Výsledky získané z analyzátoru byly kontrolovány pro případné neočekávané hodnoty. V případě jakýchkoliv nesrovnalostí se analýza opakovala a prováděla se kontrola korelace výsledků s údaji na žádance, v krajních případech došlo i na konzultaci s ošetřujícím lékařem. Naopak, za ideálních podmínek byly výsledky zaslány zpět laboratoři GENNET, s.r.o., praktickým lékařům a do Ústavu pro péči o matku a dítě v Podolí. Lékaři poté provádí závěrečné výpočty, indikují rozšířenější diagnostiku a věnují se další péči o těhotné pacientky.

4.6 Lékařské postupy v případě patologického nálezu

Na základě posouzení výsledků komplexního prenatalního screeningu se odvíjí charakter následné péče o těhotnou pacientku. Pokud se během vyšetření odhalí zvýšené riziko výskytu jakékoliv vývojové anomálie plodu, následuje konzultace s lékařem – genetikem, který by měl doporučit nejvhodnější postup s ohledem na celkový stav pacientky, plodu a průběh těhotenství. Nejčastější volbou v případě positivity předchozího screeningu je invazivní vyšetření, a to zpravidla odběr choriových klků sloužící k následným molekulárně-cytogenetickým analýzám chromozomových aberací. K tomuto vyšetření se však přistupuje v časnějších fázích těhotenství.

Ať už je využito jakékoliv formy invazivního vyšetření, v první řadě se přistupuje k metodě kvantitativní fluorescenční PCR, díky které je možné během 1 – 2 dnů získat výsledky a předběžně vyloučit či potvrdit přítomnost nejčastějších aneuploidí. Pro potvrzení výsledku mohou nebo v některých případech musí následovat metody cytogenetické, jejichž výsledky jsou však v důsledku nutnosti kultivace buněk k dispozici přibližně za týden, zásadní je stanovení karyotypu plodu pomocí klasického barvení chromozomů a případné využití dalších metod, které se soustřeďují na analýzu konkrétních chromozomů nebo jejich úseků.

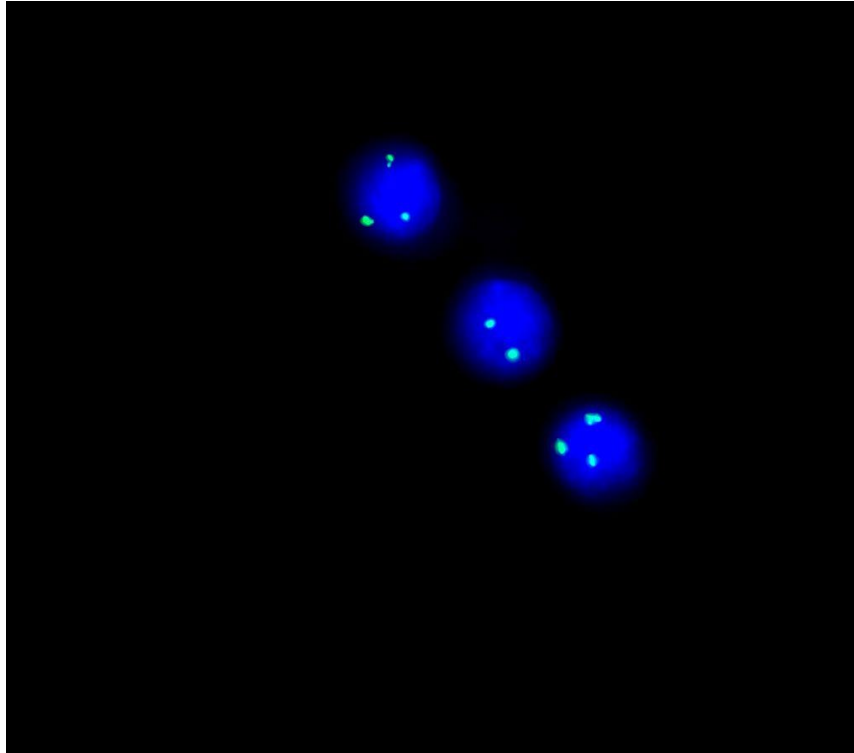
4.7 Genetické vyšetření chromozomálních aberací metodou FISH

Část laboratorní praxe probíhala i na oddělení cytogenetiky v laboratoři v Praze 6, kde se naskytla možnost vlastní analýzy vzorku. Vzorek plodové vody pocházel od těhotné pacientky, u níž se na základě indikace O281, tedy pozitivní screening ve II. trimestru, přistoupilo k aminocentéze a následnému genetickému vyšetření. Analýza QF-PCR potvrdila trizomii 21. chromozomu a výsledek bylo nutné podpořit metodou FISH.

Vzorek plodové vody bylo zapotřebí před samotnou kultivací nejprve centrifugovat 15 minut při 1000 otáčkách. V laminárním boxu (obr. č. 17) následně proběhlo odsátí supernatantu. Za běžných okolností se tento supernatant přenáší do sterilní zkumavky pro další biochemická vyšetření, v mém případě se jednalo o studii již analyzovaného vzorku, tudíž tento postup nebyl vyžadován. Dále jsem již tuto buněčnou suspenzi přenesla do kultivační lahvičky, která byla předem opatřena identifikačním štítkem a datem nasazení této suspenze do kultivačního média, které bylo předem nahřáté za pomoci termobloku na 37°C. K suspenzi jsem následně přidala přibližně 3 ml kultivačního média, přičemž přidávané množství obvykle závisí na konkrétním týdnu gravidity. Kultivační lahvičky jsou poté uloženy do termostatu (obr. č. 18), při teplotě 37°C za přítomnosti 5% CO₂. Po dvou dnech se provádí kontrola růstu buněk za pomoci inverzního mikroskopu. Během kultivace byla zapotřebí i výměna kultivačního média, které se poprvé měnilo po 4 dnech. Tento proces probíhá též ve sterilním laminárním boxu, a to tak, že se původní obsah kultivační lahvičky opatrně promíchá a slije. Následně se přidají 3 ml nového předem nahřátého kultivačního média a po pár hodinách probíhá opět kontrola růstu buněk. Po uplynutí 9 dnů jsem za pomoci aplikace 100 µl kolcemidu ukončila růst buněk, kultivační lahvičky jsem ponechala v termostatu ještě do druhého dne. Obsah kultivační lahvičky jsem následně přenesla do sterilní zkumavky, kde byl tento obsah smíchán s roztokem trypsin EDTA a následně slit. Tuto proceduru jsem opakovala dvakrát. Roztok trypsin EDTA je poté pomocí 15 minutové centrifugace při 1000 otáčkách oddělen od původní suspenze. Dále jsem přistoupila k hypotonizaci pomocí roztoku vytvořeného smícháním jednoho balení prášku Optimal Hypotonic s 1 l destilované vody, který je uchováván v lednici a alespoň 30 minut před zpracováním je třeba roztok nahřát na 37°C. Roztok jsem k suspenzi přidávala po kapkách za současného třepání na vortexu a v průběhu dalších 30 minut za 37°C nechala hypotonizovat. Následovala prefixace pomocí 3 kapek fixačního roztoku, připraveného smícháním metanolu a 99,5% kyseliny octové

v poměru 3:1, vychlazeným v mrazničce, a centrifugace 10 minut při 1000 otáčkách. Poté jsem odsála supernatant, přibližně 0,5 ml resuspendovala, a za stálého třepání vortexu přidala celkem 8 ml fixačního roztoku. Roztok jsem nechala 20 minut stát a následně opět nechala centrifugovat. Především krok jsem ještě dvakrát opakovala s tím, že po druhém odsátí supernatantu a resuspendaci jsem přidala znovu 8 ml fixačního roztoku. Následovala centrifugace a odsátí supernatantu. Zbylé množství sedimentu již bylo připravené k aplikaci na podložní sklo.

Samotná příprava preparátu probíhala tak, že jsem si na podložním skle vybrousila křížky, které značily oblasti, kam jsem později aplikovala 20 μ l suspenze buněk. Preparát jsem dehydratovala pomocí ethanolové řady (70%, 85%, 96%) po 1 minutě a nechala zaschnout. Následovala aplikace sondy a přiložení krycího skla, které bylo orámované elastickým lepidlem (Fixogum). Dalším krokem byla společná denaturace preparátu a sondy na termobloku, předem nastaveném na 75°C, po dobu 2 minut. Hybridizace proběhla přes noc v hybridizační peci při 37°C. Další den jsem pomocí pinzety odstranila vulkanizační roztok společně s krycím sklem a preparát nechala inkubovat ve speciálním roztoku 0,4xSSC při 72°C na 2 minuty, dále v roztoku 2xSSC při pokojové teplotě na 30 s. Preparát bylo zapotřebí nechat oschnout a chránit před světlem. V závěru jsem aplikovala fluorescenční barvivo DAPI a krycí sklo. Preparát byl tak připraven k samotné analýze hybridizačních signálů za pomoci fluorescenčního mikroskopu (obr. č. 19), přičemž je zapotřebí hodnotit alespoň 200 interfázních jader. Na základě pozorování jsme zaznamenali trizomii 21. chromozomu, zachycenou CCD kamerou (obr. č. 20).



Obr. 20 – Metoda FISH – interfázni jádra chromozomů - trizomie 21

(Zdroj: vlastní foto)

4.8 Statistická analýza

K testování asociací hodnot PAPP-A, free β -hCG a NT uváděných v MoM s věkem byla použita funkce CORREL v programu Microsoft Excel®. Vztah mezi těmito hodnotami se zjišťuje za pomoci tzv. korelačního koeficientu. Tento koeficient nabývá hodnot od -1 do 1 , kdy záporné hodnoty vykazují určitou sílu závislosti, ale nikoliv přímý vztah. V případě nulového koeficientu prakticky žádný vztah neexistuje, zatímco kladné hodnoty dosahující až 1 vypovídají o silné a přímé závislosti.

5 Vyhodnocení výsledků

Během laboratorní praxe bylo analyzováno 40 vzorků těhotných pacientek, přičemž vyhledávacím kritériem byla indikace k vyšetření biochemického screeningu v rámci II. trimestru těhotenství, tedy k tzv. triple testu. Zároveň bylo žádoucí, aby byla k dispozici data související s prvotrimestrálním screeninem. V rámci této praxe tedy byla prováděna vyšetření AFP, nekonjugovaného estriolu a hCG.

Získané údaje byly zaznamenány do tabulek chronologicky dle posloupnosti vyšetření. Výsledky biochemického screeningu v rámci I. trimestru jsou uvedeny v tabulce č. 1 a č. 2.

Tabulka č. 1 – Výsledky prenatalního screeningu – I. trimestr (pacientky č. 1–20)

pacientka	věk	hmotnost (kg)	PAPP-A (IU/l)	β-hCG (μg/l)
1	32	90	0,30	71,00
2	25	72	1,00	28,00
3	40	62	1,80	89,00
4	25	68	2,30	93,00
5	34	69	1,40	21,00
6	32	67	1,30	58,00
7	25	49	1,60	37,00
8	38	82	0,70	14,00
9	35	86	1,90	20,00
10	37	51	1,70	35,00
11	42	68	1,50	115,00
12	29	73	2,30	18,00
13	28	71	2,20	28,00
14	28	83	1,30	59,00
15	26	62	1,10	32,00
16	32	63	1,40	205,00
17	25	70	1,30	16,00
18	26	70	5,80	180,00
19	31	57	2,20	72,00
20	32	65	2,90	49,00

Tabulka č. 2 – Výsledky prenatalního screeningu – I. trimestr (pacientky č. 21–40)

pacientka	věk	hmotnost (kg)	PAPP-A (IU/l)	β-hCG (μg/l)
21	40	66	2,60	71,00
22	38	88	1,70	188,00
23	34	56	1,60	93,00
24	33	91	1,20	21,00
25	31	51	1,80	76,00
26	37	64	8,80	39,00
27	36	75	2,10	48,00
28	40	55	1,90	38,00
29	35	58	1,70	85,00
30	40	75	1,40	27,00
31	33	67	1,10	40,00
32	38	49	2,30	40,00
33	33	49	1,50	67,00
34	29	61	2,30	38,00
35	26	60	3,00	27,00
36	28	68	2,40	53,00
37	32	58	1,60	39,00
38	20	70	0,90	34,00
39	28	76	4,20	73,00
40	32	67	3,60	86,00

Hodnota biochemického markeru PAPP-A se typicky s průběhem těhotenství zvyšuje a v rámci prvotrimestrálního screeningu by měla být vyšší než 0,3 IU/l. V případě nižší koncentrace se doporučuje konzultace s lékařem o dalších postupech a indikacích ke specializovaným vyšetřením. Hladina hCG má pro těhotenství typický sestupný průběh. Vyšší hodnoty jsou například typické pro plod postižený Downovým syndromem.

Výsledky biochemického screeningu za II. trimestr těhotenství jsou uvedeny v tabulce č. 3 a č. 4, ve kterých jsou zahrnuty i výsledky UZ vyšetření, jelikož ta byla většinou kompletně provedena až po absolvování biochemického vyšetření v průběhu prvního trimestru. Zároveň bylo nezbytné uvést věk a hmotnost pacientek s ohledem na

to, že tyto údaje tvoří podstatnou část při závěrečných výpočtech pravděpodobnosti výskytu VVV.

Tabuka č. 3 – Výsledky prenatálního screeningu – II. trimestr (pacientky č. 1–20)

pacientka	věk	hmotnost (kg)	AFP (µg/l)	µEstriol (µg/l)	hCG (IU/l)	CRL (mm)	BPD (mm)	NT (mm)
1	32	92	15,5	0,50	22,00	72,10	22,60	2,00
2	25	73	25,2	0,42	23,00	66,00	21,00	2,40
3	40	60	88,6	1,38	40,00	74,40	23,90	2,10
4	25	69	40,4	0,79	83,00	69,90	22,60	1,30
5	34	70	72,4	0,72	29,00	66,60	24,30	1,50
6	32	67	35,0	0,53	46,00	71,10	22,90	1,60
7	25	50	29,8	1,05	15,00	70,00	neued.	0,80
8	38	82	38,9	1,06	9,00	67,70	neued.	1,70
9	35	87	39,8	0,92	13,00	66,00	21,90	1,80
10	37	54	50,5	1,34	11,00	68,60	22,40	2,00
11	42	73	68,1	0,97	60,00	61,20	19,40	1,70
12	29	73	25,4	0,95	33,00	76,00	24,00	2,80
13	28	75	27,9	0,59	23,00	64,00	20,50	2,90
14	28	85	50,0	0,91	39,00	60,00	20,30	1,98
15	26	66	54,1	1,07	18,00	62,00	18,70	1,20
16	32	64	64,4	1,08	73,00	61,50	18,90	1,66
17	25	72	42,0	0,65	14,00	69,00	22,50	1,90
18	26	71	49,7	1,30	24,00	71,00	23,00	2,10
19	31	57	63,8	1,65	17,00	59,90	neued.	1,60
20	32	65	30,4	0,76	36,00	73,30	24,90	1,50

Tabulka č. 4 – Výsledky prenatalního screeningu – II. trimestr (pacientky č. 21–40)

pacientka	věk	hmotnost (kg)	AFP (µg/l)	µEstriol (µg/l)	hCG (IU/l)	CRL (mm)	BPD (mm)	NT (mm)
21	40	67	65,7	1,19	37,00	57,50	17,70	1,10
22	38	89	24,1	0,69	39,00	63,00	21,00	1,90
23	34	60	48,3	0,62	38,00	66,00	21,80	1,30
24	33	94	53,1	1,19	16,00	65,00	20,90	1,60
25	31	52	54,9	1,74	34,00	61,23	21,03	1,18
26	37	64	55,1	1,02	20,00	69,70	22,10	2,20
27	36	78	37,1	0,58	27,00	61,10	21,30	1,60
28	40	57	39,6	1,12	21,00	70,10	22,40	1,30
29	35	60	38,5	2,06	28,00	67,10	22,80	1,90
30	40	77	22,8	0,60	16,00	65,40	21,00	1,30
31	33	69	25,1	0,54	39,00	72,00	neuved.	1,70
32	38	50	97,7	1,39	34,00	59,50	20,80	1,80
33	33	51	49,8	0,85	18,00	62,30	neuved.	1,60
34	29	62	41,4	1,02	19,00	73,50	neuved.	1,50
35	26	61	64,4	1,18	10,00	65,70	23,10	1,30
36	28	71	25,0	1,07	44,00	66,00	20,00	1,52
37	32	58	25,3	0,77	41,00	72,50	24,00	1,30
38	20	71	44,7	0,90	32,00	68,80	26,00	1,95
39	28	78	50,5	1,04	31,00	71,00	21,50	1,33
40	32	68	20,2	0,87	48,00	59,00	20,00	1,50

Údaje o hmotnosti pacientek jsou zaznamenány na základě toho, že je tento údaj nezbytný při komplexním posouzení rizika při závěrečném výpočtu. Pro účely korelace s dalšími markery bylo však nevhodné tento údaj využít s ohledem na to, že jsme neměli k dispozici výšku, kterou pacientky disponují. Nebylo tak možné určit, zda se pacientka dle vypočteného Body Mass Indexu pohybuje v rozmezí hmotnosti odpovídající její výšce či nikoliv, a korelaci výsledných markerů tak asociovat například s nadváhou či podváhou. Hodnoty nuchální translucence (NT) se považují za hraniční do 2,5 – 3 mm. Hodnota temenokostřční délky (CRL) by se měla pohybovat v rozmezí minimálně 45 mm a maximálně 84 mm. Hodnoty NT a CRL se vyšetřovaly

současně v období od 10. – 13. týdne těhotenství. Biparietální průměr (BPD) byl měřen v rámci UZ vyšetření ve II. trimestru, proto u některých pacientek údaj chybí.

Závěrečnou část tvoří výsledky vztahující se k vybraným markerům, a to konkrétně k PAPP-A, volné podjednotce β -hCG a hodnotě nuchální translucence, které jsou uvedeny v tabulce č. 5 a č. 6. Hodnoty jsou uvedeny v násobcích mediánů (MoM) a jsou vypočteny na základě naměřené hodnoty daného markeru a mediánu koncentrace pro konkrétní týden gravidity. V tomto případě se jedná o markery vztahující se ke screeningu v rámci I. trimestru, jelikož závěrečné výpočty zohledňující výsledky za oba trimestry byly prováděny počítačovým programem přímo u ošetřujících lékařů nebo v laboratoři GENNET, s.r.o. a výsledky nám ve většině případů nebyly zpřístupněny.

Tabulka č. 5 – Prenatální screening – výsledky v MoM (pacientky č. 1–20)

pacientka	věk	NT (MoM)	PAPP-A (MoM)	free β-hCG (MoM)
1	32	1,16	0,16	2,77
2	25	1,46	0,81	0,62
3	40	1,19	1,30	1,84
4	25	0,76	1,34	2,18
5	34	0,91	0,90	0,51
6	32	0,93	0,82	1,36
7	25	0,47	1,02	0,55
8	38	1,02	0,55	0,39
9	35	1,09	1,21	0,66
10	37	1,19	1,11	0,63
11	42	1,07	1,21	2,52
12	30	1,57	0,96	0,50
13	28	1,79	0,98	0,85
14	28	1,26	1,20	1,57
15	26	0,75	0,60	0,75
16	32	1,05	0,86	4,62
17	25	1,13	0,80	0,41
18	26	1,22	4,50	4,14
19	31	1,02	1,93	1,27
20	32	0,86	1,62	1,10

Tabulka č. 6 – Prenatální screening – výsledky v MoM (pacientky č. 21–40)

pacientka	věk	NT (MoM)	PAPP-A (MoM)	free β-hCG (MoM)
21	40	0,72	1,55	1,71
22	38	1,18	1,47	5,60
23	34	0,79	0,97	1,87
24	33	0,98	1,01	0,67
25	31	0,75	1,24	1,33
26	37	1,30	4,33	0,99
27	36	1,01	2,09	1,03
28	40	0,76	0,91	0,77
29	35	1,14	1,00	1,79
30	40	0,79	1,09	0,64
31	33	0,98	0,59	0,94
32	38	1,15	1,60	0,64
33	33	1,00	1,20	1,05
34	29	0,86	1,23	0,89
35	26	0,79	2,17	0,51
36	28	0,92	1,54	1,28
37	32	0,75	0,70	0,94
38	20	1,16	0,56	0,86
39	28	0,78	2,30	2,17
40	32	0,97	1,93	2,21

Dle hodnot v násobcích mediánů již lze částečně odvodit riziko výskytu některé z aneuploidii. U těchto markerů lze předběžně například stanovit míru rizika u Downova syndromu, kdy se míra rizika výrazně zvyšuje s hodnotami free β -hCG vyššími než 2,5 MoM a PAPP-A nižšími než 0,5 MoM. Hodnoty je však nutné hodnotit i na základě gestačního stáří, jelikož hladiny v průběhu těhotenství charakteristicky klesají nebo stoupají, přičemž se pro tento výpočet zaznamenává gestační stáří v době odběru vzorku.

Vzhledem ke všeobecně známému faktu, na jehož základě je zvýšená míra rizika výskytu vrozených vývojových vad přisuzována vyššímu věku, bylo přehledně zaznamenáno věkové zastoupení vyšetřovaných pacientek (obr. č. 21). Z grafu je patrné, že největší zastoupení měla věková skupina 31–35 let, konkrétně 15 pacientek z celkových 40, o něco slabší zastoupení měla skupina pacientek od 36–40 let, kterou tvořilo 10 pacientek. Dále v rámci této praxe podstoupilo screeningové vyšetření 9 pacientek ve věku od 26 do 30 let, 5 pacientek spadalo do skupiny 20-25 let a 1 do skupiny 41-45 let.



Obr. 21 – Graf věkového zastoupení těhotných pacientek

Dalším záměrem bylo sledovat korelaci mezi věkem pacientek a hodnotami vybraných markerů uváděných v násobcích mediánů, a to konkrétně PAPP – A, free β -hCG a NT. Výsledné hodnoty koeficientů vypočtené na základě vztahu věk – PAPP – A (MoM), věk - free β -hCG (MoM) a věk – NT (MoM) jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7 – Výpočet korelace věku a vyšetřovaného markeru

vztah hodnot	korelační koeficient
Věk – PAPP – A (MoM)	-0,034480197
Věk - free β -hCG (MoM)	0,013376976
Věk – NT (MoM)	0,101896372

6 Diskuze

Primárním cílem této práce byl sběr dat na základě vlastní analýzy vzorků indikovaných k vyšetření biochemického screeningu I. a II. trimestru v rámci prenatalního screeningu. Výzkumný soubor tvořilo 40 pacientek ve věku od 20 do 42 let, přičemž se jednalo o pacientky praktických lékařů, spolupracujících buď přímo s laboratořemi synlab czech s.r.o., nebo skrze spolupracující laboratoř GENNET, s.r.o., případně o pacientky lékařů působících v Ústavu péče o matku a dítě v pražském Podolí. Průměrný věk pacientek byl 32 let a každá věková skupina z výběrů 20-25 let, 26-30 let, 31-35 let, 36-40 let a 41-45 let měla své zastoupení, přičemž nejpočetnější skupinou byly pacientky ve věku od 31 do 35 let.

Sběr dat probíhal v laboratoři firmy synlab czech s.r.o., na oddělení klinické biochemie v Praze 7. Na základě těchto dat byl utvořen souhrnný přehled výsledků za období I. i II. trimestru těhotenství společně s dalšími důležitými parametry z ultrazvukového vyšetření a důležitými anamnestickými údaji.

Získaná data za období I. trimestru, konkrétně výsledky markerů PAPP-A a free β -hCG zaznamenaná v násobcích mediánů byla využita ke sledování korelace v asociaci s věkem pacientek. Na základě vypočtených koeficientů bylo patrné, že marker NT uváděný v MoM má ze všech posuzovaných hodnot nejsilnější vztah k věku pacientky, a to přímého charakteru. Vzhledem k jeho hodnotě však nemůžeme považovat tento vztah za statisticky významný. V případě free β -hCG se jedná o nejslabší vazbu s hodnotou věku a hodnota PAPP – A se odvíjí opačným směrem, než hodnota NT. Vztah je tedy silnější než u free β -hCG, ale inklinuje k nepřímému charakteru závislosti.

Sledování korelace v rámci této laboratorní praxe tedy nepotvrdilo, že by v tomto případě věk výrazně působil na výsledné hodnoty. Vzhledem k relativně nízkému počtu pacientek však nemůžeme považovat tento výsledek za relevantní, a zároveň je zapotřebí zmínit, že věk, jako zásadní rizikový faktor, ve vztahu k výskytu vrozených vývojových vad, je skloňován spíše ve vztahu k celkové problematice, nikoliv ke konkrétním biochemickým markerům. Jako vhodnější parametr ke sledování korelace byl původně zamýšlen závěrečný výsledek výpočtu rizika výskytu VVV, tyto výsledky však nebyly ze strany externích lékařů zpřístupněny na základě zpřísnění podmínek ochrany soukromí.

7 Závěr

Tématem této bakalářské práce bylo vyšetření vrozených vývojových vad, konkrétně screening vrozených anomálií se zaměřením na chromozomální aberace. V rámci teoretické části bylo všeobecně specifikováno dělení VVV na základě různých kritérií, přičemž další část byla zaměřena na chromozomální aberace. Závěr teoretické části byl věnován prenatalní diagnostice, a to především jejímu členění a druhům.

Jelikož byla práce zaměřena na laboratorní vyšetření VVV v rámci biochemického screeningu, tak se metodická část věnovala konkrétním screeningovým programům v rámci prenatalní diagnostiky. Blíže byly specifikovány postupy a členění biochemického screeningu, funkce konkrétních biochemických markerů a jejich způsob a princip vyšetření. Byla zdůrazněna nutnost pohlížet na screeningové programy jako na komplexní vyšetření, která vyhodnocují pouze míru rizika, nikoliv přítomnost samotných VVV. Ve snaze přiblížit postupy, které následují v případě vyhodnocení vyšší míry rizika výskytu VVV, byla věnována pozornost i několika druhům cytogenetických vyšetření, která bývají naopak zásadním nástrojem pro detekci chromozomálních anomálií. V závěrečné části metodiky byla využita metoda korelace, v rámci níž byla sledována asociace věku pacientek a vybraných markerů vyšetřovaných v rámci prvotrimestrálního screeningu a zaznamenaných v násobcích mediánů. Tato statistická analýza nepotvrdila striktní závislost věku těhotných pacientek na hodnotách jednotlivých markerů, ale pouze slabou závislost přímého i nepřímého charakteru. Průměrný věk pacientek byl 32 let, přičemž je všeobecně známo, že míra rizika výskytu vrozené vývojové vady se zásadně zvyšuje s překročením 35 let věku.

Tato práce tak podává podrobnější přehled o možnostech prenatalního screeningu VVV se zaměřením na chromozomální aberace, a zároveň apeluje na zásadní úlohu prenatalní diagnostiky, jelikož čím časněji je odhaleno zvýšené riziko anomálie, tím více následných diagnostických možností je pro pacientku dostupných. Anomálie je tak případně odhalena a specifikována brzy, a i přes nepřívětivou situaci je tak možné zabránit komplikacím, které mohou mít závažný dopad na samotné zdraví a psychiku. Dále je třeba brát v potaz i dopady týkající se sociální či ekonomické situace těhotné pacientky, které by se v poměru se zdravím mohly jevit jako nepodstatné, avšak v reálném životě jsou dost důležitým aspektem, ovlivňujícím jak zdraví, tak i samotnou psychiku.

8 Citovaná literatura

1. BELOŠOVIČOVÁ, H., CALDA, P, 2012. Screening Downova syndromu v prvním, druhém, nebo obou trimestrech? *Aktuální gynekologie a porodnictví* [online]. Roč. 4, s. 14 – 21. [cit. 2018-01-14].
Dostupné z: http://www.actualgyn.com/pdf/cz_2012_67.pdf
2. BINDER, Tomáš, 2011. Porodnictví. 1. vyd. Praha: Karolinum. 297 s. ISBN 978-80-246-1907-1
3. CALDA, P, 2005. Ultrazvukové vyšetření v graviditě. *Medicína pro praxi* [online]. Roč. 3, s. 117 – 119. [cit. 2018-01-14].
Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2005/03/08.pdf>
4. CALDA, P, 2012a. Ultrazvuková diagnostika v gynekologicko – porodnické praxi. *Moderní gynekologie a porodnictví*, Roč. 21, č. 4, s. 358 – 424. [cit. 2018-01-14]. ISSN 1211- 1058
5. CALDA, P., BŘEŠŤÁK, M, 2012b. Doporučený postup k provádění rutinního ultrazvukového vyšetření v těhotenství. *Aktuální gynekologie a porodnictví* [online]. Roč. 4, s. 22 – 30. [cit. 2018-01-14]. ISSN 1803-9588
Dostupné z: http://www.actualgyn.com/pdf/en_2012_68.pdf
6. Gate-2-biotech: vše o českých biologických technologiích na jednom místě, © 2006 – 2018. *Primární prevence vývojových vad* [online]. JAIP. [cit. 2018-01-14].
Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/primarni-prevence-vyvojovych-vad/>
7. HÁJEK, Z, 2004. Rizikové a patologické těhotenství. Vydání 1. české. Praha: Grada. 443 s. ISBN 80-247-0418-8
8. HÁJEK, Z., ČECH, E., MARŠÁL, K, 2014. Porodnictví: 3., zcela přepracované a doplněné vydání. 3., zcela přepracované a doplněné vydání (v tiráži 1. vyd.). Praha: Grada. XXIII, 538 s. ISBN 978-80-247-4529-9
9. HATINA, Jiří, SYKES, Brian D, 1999. Lékařská genetika: problémy a přístupy. Praha: Academia. 296 s. ISBN 80-200-0700-8
10. JEŽOVÁ, M. aj, 2013. *Fetopatologie a vývojová patologie embrya a plodu* [online]. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: http://atlases.muni.cz/atlases/feto/atl_cz/pvhot.html

11. LOUCKÝ, J. aj, 2015. Doporučení o laboratorním screeningu vrozených vývojových vad v prvním a druhém trimestru těhotenství. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. Roč. 23, č. 44, s. 27 – 30. [cit. 2018-].
Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2015/2015-1/KBM-1-2015-dop-vvv-27.pdf>
12. MAČÁK, J. a kol, 2012. *Patologie*. 2. vyd. Praha: Grada. 347 s. ISBN 978-80-247-3530-6
13. MAŘÍKOVÁ, Taťána, SEEMANOVÁ, Eva, 2013. *Klinická genetika: praktické aplikace*. 1. vyd. Praha: Karolinum. 59 s. ISBN 978-80-246-2318-4
14. *National Down Syndrome Society*, © 2018. [online]. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: <https://www.ndss.org/about-down-syndrome/down-syndrome/>
15. POLÁK, P., LOUCKÝ, J., TOMEK, V, 2017. *Prenatální diagnostika vrozených vývojových vad*. Praha: Maxdorf. 288 s. ISBN 978-80-7345-499-9
16. PRIMROSE, S. B., TWYMAN, Richard M, 2003. *Principles of genome analysis and genomics*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing. VIII, 263 s. ISBN 1-40510-120-2
17. *PUBS – odběr pupečnickové krve*, © 2018. [online]. GENNET. [cit. 2018-02-01].
Dostupné z: <https://www.gennet.cz/pubs-odber-pupecnikove-krve>
18. RUTAROVÁ, Jana, 2008. Preimplantační genetická diagnostika: přínosy, rizika. *Časopis lékařů českých*. Roč. 147, č. 11, s. 589-590. ISSN 0008-7335
19. SADLER, T. W., 1995. *Langman's medical embryology*. 7th ed. Baltimore [etc.]: Williams and Wilkins. XI, 460 s. ISBN 0-683-07489-X
20. SADLER, T. W., 2011. *Langmanova lékařská embryologie*. 1. české vyd. Praha: Grada. XVIII, 414 s. ISBN 978-80-247-2640-3
21. SELIKOWITZ, Mark, 2011. *Downův syndrom: definice a příčiny, vývoj dítěte, výchova a vzdělání, dospělost*. Vyd. 2. Praha: Portál. 197 s. ISBN 978-80-7367-882-1
22. SONEK, J. D., NICOLAIDES, K. H., JANKU, P, 2012. *Česká gynekologie* [online]. Screening at 11 – 13⁺⁶ weeks' gestation. 77, č. 2, s. 92-104. [cit. 2018-01-14].
Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/ceska-gynekologie-clanek/screening-v-11-13-6-tydnu-tehotenstvi-37579>

23. SYNLAB CZECH S.R.O., 2017. PI.PJ/BIO 07 – interní dokument. *Pracovní instrukce pro práci na UniCel Dxl 800.*
24. SYNLAB CZECH S.R.O., 2018a. PI.PJ/BIO 06 - interní dokument. *Pracovní instrukce pro práci na Cobas e601.*
25. SYNLAB CZECH S.R.O., 2018b. SOP A.PCE/GEN 06 - interní dokument. *Molekulárně-cytogenetická analýza chromozomových aberací metodou mnohobarevné fluorescenční in situ hybridizace (mFISH) a mnohobarevného pruhování s vysokou rozlišovací schopností (mBAND).*
26. SYNLAB CZECH S.R.O., 2018c. SOP A.PCE/GEN 62 - interní dokument. *AFP (Alfa-1-fetoprotein).*
27. SYNLAB CZECH S.R.O., 2018d. SOP A.PCE/GEN 63 - interní dokument. *Volná β -hCG podjednotka (free β -hCG).*
28. SYNLAB CZECH S.R.O., 2018e. SOP A.PCE/GEN 64 - interní dokument. *Celkové hCG + β podjednotka (hCG + β).*
29. SYNLAB CZECH S.R.O., 2018f. SOP A.PCE/GEN 65 - interní dokument. *PAPP A.*
30. SYNLAB CZECH S.R.O., 2018g. SOP A.PCE/GEN 66 - interní dokument. *Estriol volný (uE_3).*
31. ŠÍPEK, A. aj, © 2008 - 2018. *Vrozené vady* [online]. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: <http://www.vrozene-vady.cz/>
32. ŠÍPEK, Antonín, © 2010 - 2014. *Genetika – biologie* [online]. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/>
33. ŠÍPEK, A. aj, 2012. Cytogenetické varianty v klinické pediatrické praxi: přehledové články. *Pediatric pro praxi* [online]. Roč. 13, č. 6, 398 – 400 s. [cit. 2018-01-14]. Dostupné z: <https://pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2012/06/10.pdf>
34. ŠÍPEK, A., GREGOR, V. aj, 2013. Primární prevence vrozených vad a úloha kyseliny listové. *Aktuální gynekologie a porodnictví* [online]. Roč. 5, 47 – 51 s. [cit. 2018-01-04]. ISSN 1803-9588. Dostupné z: http://www.actualgyn.com/pdf/cz_2013_103.pdf
35. ŠÍPEK, A. aj, 2013. Prevalence vybraných vrozených vad v České republice: vývojové vady ledvin, srdce a vrozené chromozomové aberace. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. Roč. 62, č. 3, s. 112 – 128. ISSN 1210-7913

36. ŠTEFÁNEK, J, © 2011. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF* [online]. [cit. 2018-01-14]. Dostupné z: <http://www.stefajir.cz/>
37. ÚZIS ČR, © 2017. *Vrozené vady narozených v roce 2013 – 2014*. 140 s. ISSN 1801-4798

9 Seznam obrázků a příloh

9.1 Přílohy

1. Příloha 1: Žádanka pro biochemický screening s odebraným vzorkem séra
2. Příloha 2: Analyzátor Cobas e601
3. Příloha 3: Analyzátor UniCel DxI 800
4. Příloha 4: Metoda G-pruhování chromozomů
5. Příloha 5: Laminární box Clean Air firmy Schoeller pro zpracování vzorků pro metody molekulární cytogenetiky
6. Příloha 6: Termostat firmy Schoeller pro inkubaci vzorků v kultivačním médiu
1. Příloha 7: Fluorescenční mikroskop AxioImager Z2 s příslušenstvím

9.2 Obrázky

2. Obrázek 1: Žádanka pro biochemický screening s odebraným vzorkem séra
3. Obrázek 2: Analyzátor Cobas e601
4. Obrázek 3: Analyzátor UniCel DxI 800
5. Obrázek 4: Metoda G-pruhování chromozomů
6. Obrázek 5: Fyziologický karyotyp
7. Obrázek 6: Aberantní karyotyp
8. Obrázek 7: Výsledný obraz techniky mBAND
9. Obrázek 8: Graf incidence nejčastějších chromozomálních aberací
10. Obrázek 9: Graf narozených s VVV podle věku rodičky
11. Obrázek 10: Tabulka vývoje vrozených vad v letech 2000 – 2010
12. Obrázek 11: Tabulka vývoje vrozených vad v letech 2011 - 2013
13. Obrázek 12: Graf efektivity prenatální diagnostiky u Downova syndromu
14. Obrázek 13: Graf efektivity prenatální diagnostiky u Edwardsova syndromu
15. Obrázek 14: Graf efektivity prenatální diagnostiky u Patauova syndromu
16. Obrázek 15: Graf vývoje počtu invazivní prenatální diagnostiky
17. Obrázek 16: Graf vývoje invazivní prenatální diagnostiky
18. Obrázek 17: Laminární box Clean Air firmy Schoeller pro zpracování vzorků pro metody molekulární cytogenetiky

- 19.Obrázek 18: Termostat firmy Schoeller pro inkubaci vzorků v kultivačním médiu
- 20.Obrázek 19: Fluorescenční mikroskop AxioImager Z2 s příslušenstvím
- 21.Obrázek 20: Metoda FISH – interfázní jádra chromozomů - trizomie 21
- 22.Obrázek 21: Graf věkového zastoupení těhotných pacientek

9.3 Tabulky

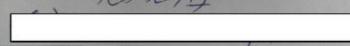
1. Tabulka 1: Výsledky prenatalního screeningu – I. trimestr (pacientky č. 1–20)
2. Tabulka 2: Výsledky prenatalního screeningu – I. trimestr (pacientky č. 21–40)
3. Tabulka 3: Výsledky prenatalního screeningu – II. trimestr (pacientky č. 1–20)
4. Tabulka 4: Výsledky prenatalního screeningu – II. trimestr (pacientky č. 21–40)
5. Tabulka 5: Prenatální screening – výsledky v MoM (pacientky č. 1-20)
6. Tabulka 6: Prenatální screening – výsledky v MoM (pacientky č. 21–40)
7. Tabulka 7: Výpočet korelace mezi věkem a vybranými hodnotami


Seznam použitých zkratek

AFP	- alfa - 1 - fetoprotein
AMC	- aminocentéza
CCD	- zařízení s vázanými náboji (charged-coupled device)
CO ₂	- oxid uhličitý
CRL	- temeno-kostrční délka (crown-rump length)
CVS	- odběr choriových klků (chorion villi sampling)
DAPI	- 4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
E ₃	- nekonjugovaný estriol
FISH	- fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FSH	- folikuly stimulující hormon
hCG	- choriový gonadotropin
ISCN	- International system for cytogenetic nomenclature
IVF	- <i>in vitro</i> fertilizace
K ₃ EDTA	- tri-draselná sůl kyseliny etylen-diamin-tetraoctové
KDC	- kordocentéza
PAPP – A	- plazmatický protein A
PCR	- polymerázová řetězová reakce
QF – PCR	- kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce (quantitative fluorescent polymerase chain reaction)
RTG	- rentgen
SSC	- roztok citronanu sodného a chloridu sodného (Saline Sodium Citrate)
UZ	- ultrazvuk
ÚZIS ČR	- Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
VFN	- Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
VVV	- vrozené vývojové vady

Přílohy

Příloha 1: Obrázek 1: Žádanka pro biochemický screening s odebraným vzorkem séra

Pojišťovna		IČZ	07-161-000	laboratoř	Synlab s.r.o. Kostelní 9 17000 Praha 7 - Letná
		Odbornost	603		
Screening ve II. trim. + integrovaný test					
Pacient		podpis a razítko lékaře			
Rodné číslo		07 199 001			
		GNET, s.r.o. (23) Centrum lékařské genetiky a reprodukční medicíny Ambulance lékařské genetiky (208) Kostelní 9, 170 00 Praha 7 Tel. 222 319 000			
Datum nar.		PM	6.7.2017		
Diagnóza	Z369				
zpráva			Anamnéza		
Počet plodů: 1 UZ provedl(a) Externí sonografista dne 3.11.2017 Optimum pro odběr v II. trim. od 22.10.2017 do 5.11.2017. <i>6.10.2017</i> <i>CRL 74,5 = 13+1</i> <i>HT 1,78</i> <i>PROVEDENO V NĚMECKU</i>			<input type="checkbox"/> IDM <input type="checkbox"/> ART <input type="checkbox"/> Kuřačka Odběr dne: <i>3.11.2017</i> Hmotnost: <i>70,5</i> Kg		
			Požadavek		
			<input checked="" type="checkbox"/> AFP <input checked="" type="checkbox"/> hCG <input checked="" type="checkbox"/> uE3 <input type="checkbox"/> INH-A		
zařízení	GNET, s.r.o. Praha	<i>KARTY</i>			
					
		GNET			
		<i>7-7</i>			



Zdroj: vlastní foto

Příloha 2: Obrázek 2: Analyzátor Cobas e601



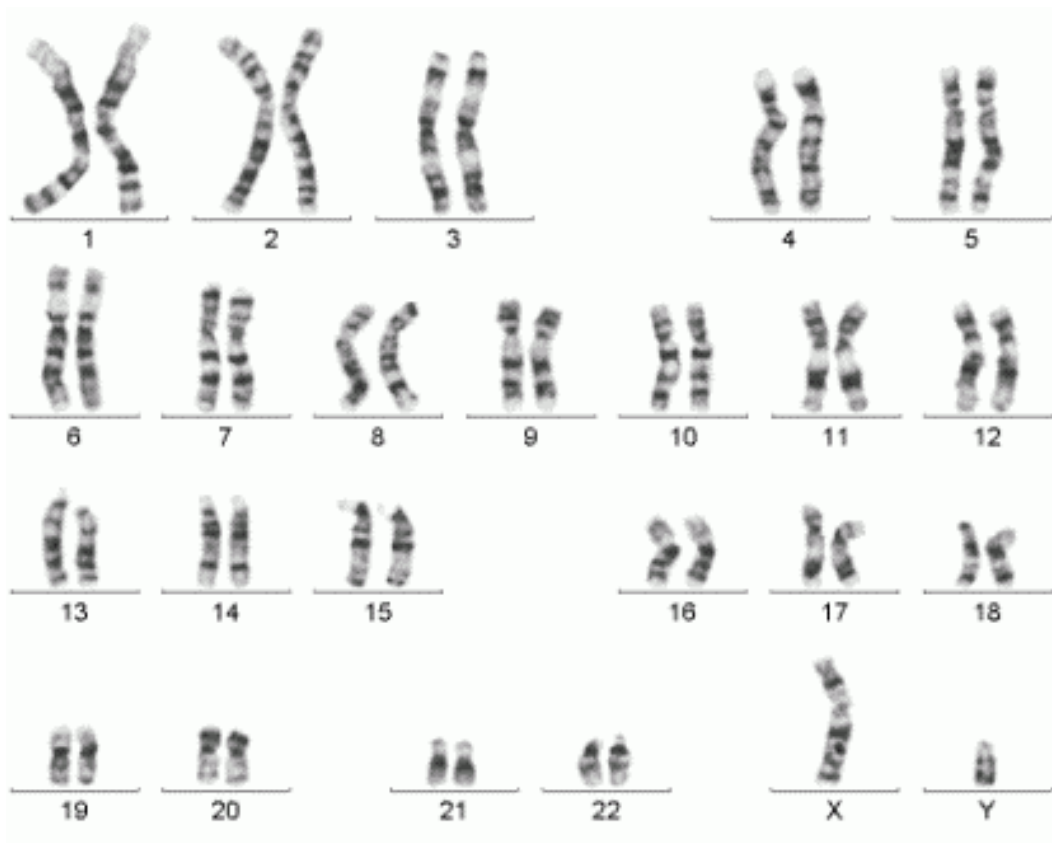
Zdroj: vlastní foto

Příloha 3: Obrázek 3: Analyzátor UniCel DxI 800



Zdroj: <http://www.beckmancoulter.com>

Příloha 4: Obrázek 4: Metoda G-pruhování chromozomů



Zdroj: <http://www.biologie-lfhk.cz>

Příloha 5: Obrázek 17: Laminární box Clean Air firmy Schoeller pro zpracování vzorků pro metody molekulární cytogenetiky



Zdroj: vlastní foto

Příloha 6: Obrázek 18: Termostat firmy Schoeller pro inkubaci vzorků v kultivačním médiu



Zdroj: vlastní foto

Příloha 7: Obrázek 19: Fluorescenční mikroskop AxioImager Z2 s příslušenstvím



Zdroj: vlastní foto