Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Možnosti invazivní prenatální diagnostiky ve druhém trimestru těhotenství

Bakalářská práce

2020 Jakub Novák

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Jakub Novák**
Osobní číslo:	**C17197**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Téma práce:	**Možnosti invazivní prenatální diagnostiky ve druhém trimestru těhotenství.**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Teoretická část:

- Zpracování literární rešerše zaměřené na možnosti invazivního prenatálního testování se zaměřením na druhý trimestr těhotenství (tj. vyšetření plodové vody)
- Popsat: důvody indikace k tomuto vyšetření, způsoby provedení amniocentézy, principy cytogenetických a molekulárně cytogenetických metod používaných k vyšetření získaného materiálu (karyotyp, FISH); nejčastější nálezy (trizomie 13,18,21)

2. Praktická část:

- Seznámit se a osvojit si základy jednotlivých vyšetřovacích postupů u metod (karyotyp a FISH)
- Porovnání jednotlivých metod z hlediska rozlišovací schopnosti a dalších definovaných parametrů.
- Sběr dat
  - počty amniocentéz za dané časové období
  - důvody indikací
  - výsledky provedených vyšetření (efektivita)
- Hodnocení získaných dat a diskuze

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

odborné články (zdroje: pubmed, science direct, web of science...); Klinická genetika (Nussbaum); Klinická cytogenetika I. (E. Kočárek); Genetika (E. Kočárek)

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Hana Zůnová**
Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlášení autora

Prohlašuji:
Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.
Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1.7.2020

Jakub Novák

Poděkování

Tímto bych chtěl vřele poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Haně Zůnové za poskytování veškerých materiálů, prostor ke stanovení vzorků, a především za užitečné rady ohledně psaní bakalářské práce.

Anotace

Bakalářská práce se zaměřuje na problematiku prenatálního testování. V teoretické části poskytuje literární přehled o možnostech prenatálního testování. Popisuje nejčastější indikace vedoucí k invazivnímu testování, možnosti odběru prenatálních vzorků s popisem rizik a klasické a molekulárně cytogenetické metody používané v prenatální diagnostice. Další část práce představuje čtenáři nejčastěji detekované chromozomové aberace jako je Downův syndrom, Edwardsův syndrom a Pataův Syndrom.

Klíčová slova

Prenatální diagnostika, amniocentéza, choriocentéza, kordocentéza, chromozomální aberace, karyotyp, FISH, Downův syndrom, Edwardsův syndrom, Patauův syndrom

Title

Invasive prenatal testing in the second trimester of pregnancy

Anotation

Bachelor thesis is focused on the possibilities of prenatal testing. Theoretical part provides literary review of prenatal testing and cytogenetic findings. It describes indications leading to invasive testing, the possibilities of prenatal sampling with their risks, classical and molecular cytogenetic methods used in prenatal diagnostics. and most common chromosomal aberrations such as Down's syndrome, Edwards' syndrome and Patau's syndrome.

Keywords

Prenatal diagnosis, amniocentesis, choriocentesis, cordocentesis, chromosomal aberation, caryotype, FISH, Down syndrome, Edwards syndrome, Patau syndrome

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK **8**

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ **8**

ÚVOD **10**

TEORETICKÁ ČÁST **11**

1 PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA **11**

1.1 NEINVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY 12
1.1.1 Biochemické markery 12
1.1.2 Ultrasonografické hodnocení morfologie plodu 14
1.1.3 Screeningové testy v těhotenství 16
1.2 INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY 17
1.2.1 Indikace k invazivnímu prenatálnímu testování 17
1.2.2 Metody odběru vzorku 20
1.2.2.1 Choriocentéza 20
1.2.2.2 Amniocentéza 21
1.2.2.3 Kordocentéza 23
1.3 CYTOGENETICKÉ A MOLEKULÁRNĚ CYTOGENETICKÉ METODY 24
1.3.1 Kultivace 24
1.3.2 Karyotyp 25
1.3.3 Fluorescenční in situ hybridizace 28
1.4 POČETNÍ CHROMOZOMOVÉ ABERACE U PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY 29
1.4.1 Downův syndrom 29
1.4.2 Edwardsův syndrom 31
1.4.3 Patauův syndrom 33

2 PRAKTICKÁ ČÁST **36**

2.1 CÍLE PRÁCE 36
2.2 METODIKA 36
2.2.1 Soubor použitých dat 36
2.2.2 Použité sondy, spotřební materiál, technické vybavení 36
2.2.3 Zpracování vzorků pro metodu FISH 38
2.3 VÝSLEDKY 39
2.3.1 Důvody indikací 39
2.3.2 Věk rodiček v době odběru 40
2.3.3 Týden těhotenství v době odběru 40
2.3.4 Záchytnost chromozomových aberací 41
2.3.5 Ověření nálezů metodou FISH 42
2.4 ZÁVĚR A DISKUZE 47

SEZNAM LITERATURY **52**

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: Vývoj koncentrace cg během těhotenství 12
Obrázek 2:Nuchální translucence 15
Obrázek 3: Nosní kůstka (NB)....15
Obrázek 4: Počet provedený invazivních výkonů v rámci prenatálního testování....19
Obrázek 5: Zastoupení jednotlivých indikací k invazivnímu testování v ČR 20
Obrázek 6: Způsob provedení transabdominální AMC....22
Obrázek 7: Růstová křivka buněčné kultury....24
Obrázek 8: Chromozomy barvené technikou G-pruhování....26
Obrázek 9: Normální mužský karyotyp....27
Obrázek 10: Druhy chromozom 27
Obrázek 11: Princip cytogenetické metody FISH 29
Obrázek 12: Karyotyp s trisomií 21. chromozomu (Downův syndrom) 30
Obrázek 13: Fenotypové projevy Downova syndromu. 31
Obrázek 14: Karyotyp s trisomií 18....32
Obrázek 15: Fenotypové znaky Edwardsova syndromu....33
Obrázek 16: Karyotyp s trisomií 13. chromozomu (Patauův syndrom) 34
Obrázek 17: Fenotypové znaky Patauova syndromu....35
Obrázek 18: Grafické znázornění značení jednotlivých FISH sond....37
Obrázek 19: Výsledek metody FISH u vzorku 72/19 – trizomie chr. 21 44
Obrázek 20: Výsledek metody FISH u vzorku 97/19 – translokace chr. 2,17 44
Obrázek 21: Výsledek metody FISH u vzorku 133/19 – trizomie chr. 21 45
Obrázek 22: Výsledek metody FISH u vzorku 10/20 – trizomie chrom. 18 45
Obrázek 23: Výsledek metody FISH u vzorku 27/20 – trizomie chrom. 21 46
Obrázek 24: Výsledek metody FISH u vzorku 35/20 – trizomie chrom. 13 46
Obrázek 25: Vývoj počtu invazivních metod prenatálního testování....48
Obrázek 26: Počet provedených AMC, CVS a CC za sledované období 1998-2019 49
Obrázek 27: Výskyt chromozomových aberací 2011–2016....50

Tabulka 1: Riziko vzniku aneuploidií v závislosti na věku matky....18
Tabulka 2: Množství plodové vody v závislosti na stádiu těhotenství 21
Tabulka 3: Příklady studií zaměřených na vyjádření % rizika potratu....23
Tabulka 4: Důvody indikací 39
Tabulka 5: Věk rodiček v době odběru....40
Tabulka 6: Počet provedených AMC v daných týdnech těhotenství....41
Tabulka 7: Chromozomové aberace detekované ve vzorcích plodové vody....42
Tabulka 8: Záchytnost chromozomových aberací v dané věkové skupině 42
Tabulka 9: Ověření nálezů metodou FISH s metodou karyotypování....43

Graf 1: Indikace k AMC....40
Graf 2: Četnost aminocentéz dle tt. 41

Seznam zkratek

AFP	alfa-fetoprotein
ALL	akutní lymfatická leukemie
AMA	pokročilý věk matky (advanced maternal age)
AMC	amniocentéza
BP	bakalářská práce
CC	kordocentéza (cordocentesis)
ČGPS	Česká gynekologicko-porodnická společnost
CNS	centrální nervová soustava
CRL	temeno-kostrční délka (crown-rump length)
CVS	odběr choriových klků (chorionic villus sampling)
DAPI	diamidinfenylindol
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DS	Downův syndrom
DV	venózní ductus *(Ductus Venosus)*
ES	Edwardsův syndrome
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescent in situ hybridization)
FMF	frontomaxilární obličejový úhel (frontomaxillary facial angle)
GIT	gastrointestinální trakt
hCG	lidský choriový gonadotropin (human chorionic gonadotropin)
ISCN	Mezinárodní system pro lidskou cytogenetickou nomenklaturu (The International System for Human Cytogenetic Nomenclature)
IUGR	intrauterinní růstová retardace (intrauterine growth retardation)
KCl	chlorid draselný
MoM	násobky mediánu (multiples of median)
NB	kost nosní (nasal bone)
NIPT	neinvazivní prenatální diagnostika (non invasive prenatal testing)
NK	nukleová kyselina
NRVV	Národní registr vrozených vad
NT	nuchální translucence
NTD	defekty neurální trubice (neural tube defects)
OA	osobní anamnéza
PAPP-A	specifický těhotenský protein A

PHA	fytohemaglutinin (phytohemagglutinin)
PIGF	placentární růstový factor (in English)
PND	prenatální diagnostika
PS	Patauův syndrom
PV	plodová voda
QF-PCR	kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce
RA	rodinná anamnéza
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SLG	Společnost lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP
SSC	salinický roztok citranu sodného
STS	steroidní sulfatáza
TA-CVS	transabdominální odběr choriových klků
TC-CVS	transcervikální odběr choriových klků
TORCH	toxoplasmóza, ostatní, rubeola, cytomegalovirus, herpesviry
TR	trikuspidální regurgitace
tt.	týden těhotenství
uE3	volný estriol
UUT	umělé ukončení těhotenství
UZ	ultrazvukový (ultrazvuk)
VVV	vrozené vývojové vady
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

Úvod

Prenatální diagnostika (PD) je nedílnou součástí péče o každou rodičku. Jedná se o soubor jasně definovaných postupů a metod, které slouží k včasné diagnostice abnormálního těhotenství. Je zaměřena především na hodnocení stavu a stupně vývoje plodu. Kromě informací o plodu by měla také zahrnovat dostatečnou péči o těhotonou ženu, poskytovat jí psychologickou podporu a jednat na základě lékařské etiky. Rodička by měla být dostatečně informována o veškerých postupech, zákrocích a stavu plodu. Na základě způsobu provedení testování se PD rozděluje na invazivní a neinvazivní.

Bakalářská práce je rozdělena na část teoretickou a praktickou. V rámci teoretické části jsou popsány základní informace o procesu prenatálního testování jak v rámci neinvazivních, tak invazivních metod. Teoretická část dále popisuje využití biochemických a ultrazvukových markerů využívaných v rámci screeningových testů. Popisuje, běžné metody invazivní diagnostiky. Stěžijní částí práce jsou metody klasické cytogenetiky a molekulární cytogenetiky. Na závěr jsou zde popsány nejčastější (prenatální) chromozomové aberace.

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na vyhodnocení statistických dat a zpracování vzorků rutinní metodou molekulární cytogenetiky – FISH (fluorescenční hybridizace *in situ*) a zhodnocení získaných dat a výsledků.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Prenatální diagnostika

Jedná se o vyšetření tkání plodu v průběhu těhotenství. Prenatální diagnostika je zaměřena na hodnocení zdravotního stavu, stupně vývoje a genetické konstituce plodu, s cílem detekovat případné abnormality ve vývoji, jakými jsou například vrozené vývojové vady (VVV). Dalším cílem je také poskytnutí psychologické podpory, individuální specifické předporodní a poporodní zdravotní péče či umožnění párům v riziku početí nepostiženého potomka. Prenatální diagnostika je komplexní proces založený na spolupráci několika medicínských oborů – klinické genetiky, gynekologie a porodnictví, ultrazvukové diagnostiky a klinické biochemie. (Nussbaum R. L. et al., 2004). Zrod prenatální diagnostiky nastal roku 1966, kdy se M. Steelovi a W. R. Bregovi jr. podařilo určit chromozomální konstituci plodu s využitím kultivovaných buněk plodové vody (Steele, M., & Breg Jr, W. R., 1966). Prenatální testování je dostupné pro řadu onemocnění a VVV, jejichž příčinou jsou chromozomové odchylky (Norton M. E. et al., 2016).

První sledovanou chromozomovou abnormalitou v prenatální diagnostice byl Downův syndrom (trizomie 21. chromozomu). Do sledování se pak postupně přidávaly VVV: rozštěpové vady centrálního nervového systému, vrozený hydrocefalus, VVV ledvin a vývodných cest močových a další (ÚZIS, 2007).

Evidence vrozených vad má v České republice dlouholetou tradici. Česká republika patřila mezi první státy, kde bylo zavedeno sledování a registrace VVV. První publikace s daty o této problematice byla vydána Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR již v roce 1965. V dnešní době jsou data poskytovaná jednotlivými pracovišti lékařské genetiky a prenatální diagnostiky každoročně zpracovávána Národním registrem vrozených vad (NRVV). Dle NRVV je 3. březen vyhlášen Mezinárodním dnem vrozených vad. Cílem je připomenutí této problematiky širší veřejnosti s důrazem na potřebu výzkumu a prevence.

V rámci prenatální diagnostiky rozlišujeme dva hlavní způsoby provádění prenatálního testování, a to metody neinvazivní a invazivní.

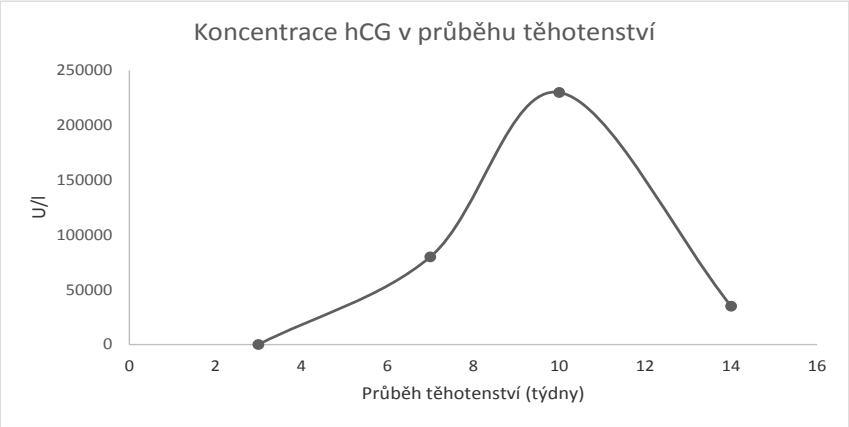
1.1 Neinvazivní metody prenatální diagnostiky

Neinvazivní metody prenatální diagnostiky jsou metody, při nichž není zasaženo do integrity plodu. Mezi neinvazivní metody patří ultrasonografické hodnocení morfologie plodu, stanovení biochemických markerů a nově se rozvíjející metody založené na detekci volné fetální DNA (deoxyribonukleová kyselina) kolující v krvi matky. Metody neinvazivního prenatálního testování se začaly rozvíjet v 50 letech 20. století (Löwy I., 2014).

1.1.1 Biochemické markery

Roku 1970 položili vědci Brock & Sutcliffe základy neinvazivního prenatálního testování, založeném na hodnocení biochemických markerů. Prvním z využívaných markerů se stal alfa-fetoprotein (AFP), který byl detekován u těhotné ženy s prokázanou poruchou vývoje neurální trubice plodu, tzv. anencefalií (Brock D.J. & Sutcliffe R.G., 1972). Postupně pak byly objevovány další markery – lidský choriový gonadotropin (hCG), volný estriol (uE3), specifický těhotenský protein A (PAPP-A), inhibin A a placentární růstový faktor (PIGF).

Lidský choriový gonadotropin patří do skupiny glykoproteinových hormonů, produkovaných syncytiotrofoblastem placenty. Molekula hCG je tvořena dvěmi nekovalentně vázanými podjednotky α a β (Lapthorn A. J. et al., 1994; Cole L. A., 2012). Jak celkový, tak β fragment hCG je následně detekovatelný v moči (Nisula B. C. et al., 1989). Celkový hCG detekujeme v séru k potvrzení gravidity a k jejímu sledování. Hladina hCG vytváří typickou křivku s vrcholem mezi 8. – 10. týdnem těhotenství (tt.) (Obr.1) a s poklesem ve druhém trimestru (Roztočil A., 1998). Volná β podjednotka hCG (free β hCG) je laboratorním parametrem pro screening VVV v 1. trimestru. Stanovení koncentrace free β-hCG v séru se uplatňuje při včasné diagnostice trizomie 21. chromozomu.



Obrázek 1: Vývoj koncentrace cg během těhotenství. Převzato z https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_02024-L0000006.htm

Dalším testovaným markerem je PAPP-A. Hladina PAPP-A dosahuje maxima ve třetím trimestru a po porodu jeho hladina klesá (Zima T., 2007). U většiny chromozomových aberací je jeho koncentrace snížena. V případě plodu s trizomií chromozomu 21 je hladina výrazně snížena v prvním trimestru (Wald N. et al. 1992), zatímco v druhém trimestru se hladiny příliš neodlišují od fyziologického těhotenství (Spencer K. et al., 1994). Vzhledem k tomu, že hladina PAPP-A koreluje s velikostí placenty, respektive trofoblastu, mohou být nižší hodnoty ukazatele dalších rizikových stavů jako je intrauterinní růstová retardace (intrauterine growth retadation, IUGR), samovolný potrat, preeklampsie či předčasný porod (Smith GC, et a., 2002; Dugoff L. et al., 2004; Spencer K. et al., 2008).

AFP je plazmatický glykoprotein produkovaný žloutkovým vakem a později játry plodu. (Gitlin G. et al., 1972). Syntéza fetálního AFP začíná stoupat mezi 7–10.tt. s maximem ve 14. tt. (Yachnin S., 1978). Kromě stanovení hladiny AFP v krvi, je používáno také stanovení v plodové vodě. AFP se využívá především jako screeningový marker pro defekty neurální trubice (NTD, neural tube defects). Jako první byly zvýšené hladiny AFP popsány Brockem a Sutcliffem v plodové vodě žen, u nichž byl u plodu diagnostikován anencefalus (Brock D. J. and Sutcliffe R. G., 1972). O rok později se prokázalo, že zvýšená hladina AFP, v souvislosti s NTD, je detekovatelná v séru matky (Brock D. J. et al., 1973). Kromě zvýšené hladiny, je možné pozorovat snížení koncentrace AFP v krvi matky, jejíž plod je postižen Downovým syndromem (DS) (Cuckle H., Wald N. and Lindebaum R., 1984).

Nekonjugovaný estriol (uE3) je estrogenní hormon produkovaný především placentou, játry plodu a nadledvinkami. uE3 je ukazatelem tzv. fetoplacentární funkce (Macnaughton M. C., 1967). Koncentrace uE3 se postupně zvyšuje od 15. týdne až do porodu. Pokles uE3 může značit zhoršenou fetoplacentární funkci či DS u plodu (Beischer N. A. et al., 1968; Bashore R. A. et al., 1977; Canick J. A. et al., 1988; David M. et al., 1996). Výrazně nižší hladiny byly také prokázány u deficience steroidní sulfatázy (STS), jež se projevuje jako tzv. ichtyóza, neboli kožní onemocnění (David M. et al., 1995).

Inhibin A je nesteroidní gonadální hormon produkovaný hypofýzou, vaječníky a placentou. Koncentrace inhibinu A narůstá mezi 9. – 10. tt., následně výrazně klesá. Další postupný nárůst je pak pozorován ve třetím trimestru těhotenství (Birdsall M. et al., 1997). Placentární produkce inhibinu A se využívá ve screeningu Downova syndromu, kde vykazuje zvýšené hladiny (Aitken D. A. et al., 1996). Dále slouží k monitorování trofoblastické nemoci a k diagnostice preeklampsie (Chada M. et al., 2002).

PIGF patří do skupiny vaskulárních endoteliálních růstových faktorů. V průběhu těhotenství je produkován především buňkami trofoblastu, ale také plicní či srdeční tkání. Je nezbytný pro normální vývoj placenty a plodu (Makrydimas G., Sotiriadis A. eat al., 2008). Fyziologicky se jeho hladina zvyšuje do konce druhého trimestru a následně klesá až do období porodu (Clark D. E., Smith S. K. et al., 1998). Snížená koncentrace PIGF v krvi matky souvisí s preeklampsií a dalšími komplikacemi, které souvisí se špatnou funkcí placenty. Snížené hladiny PIGF byly pozorovány i u Downova syndromu (Benton, S. J., McCowan, L. M., Heazell, A. E. et al., 2016).

1.1.2 Ultrasonografické hodnocení morfologie plodu

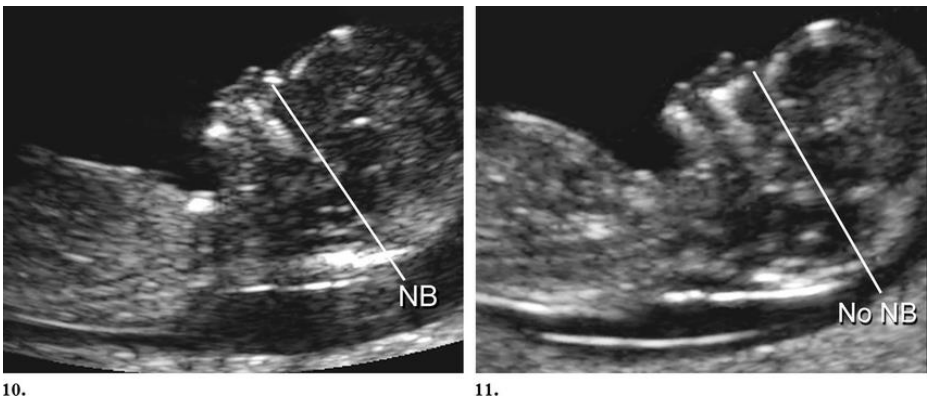
Ultrasonografie hraje velmi důležitou a nezastupitelnou úlohu při sledování průběhu těhotenství. Ultrasonografické metody se začaly vyvíjet na počátku 50. let 20. století (Doležal L. a kol, 1998). V roce 1972 provedl Campbell první ultrasonografické vyšetření plodu s anencefalem (Campbell S. et al., 1972). V České republice se ultrazvuk začal používat na přelomu 70. a 80. let 20. stol. Do gynekologických ordinací se dostal až o několik let později (Doležal L. a kol., 1998).

Mezi standardně sledované znaky patří měření šíjové projasnění (NT, nuchal translucency), temeno-kostrční délky (CRL, crown-rump length) a přítomnosti nosní kůstky (NB, nasal bone). Mezi další možné sledované parametry patří měření frontomaxilárního obličejového úhlu (FMF, frontomaxillary facial angle) či dopplerovské měření průtoku krve přes trikuspidální chlopeň (TR, trikuspidální regurgitace) a venózním duktem (DV, *Ductus venosus*) (De Graaf I. M., 2002).

Podstata NT spočívá v měření šíře prosáknutí kožní řasy v zátylku plodu (Obr.2). Množství této tekutiny je v těhotenství ovlivněno různými patologickými stavy, jako je srdeční dysfunkce, abnormality srdce a velkých tepen nebo venózní překrvení v oblasti krku a hlavy. Se zvyšujícími se hodnotami NT se zvyšuje riziko výskytu chromozomálních vad jako je např. Downův syndrom, kongenitální hyperplazie nadledvin či Smith-Lemli-Opitzův syndrom. Zvýšené hodnoty NT mohou také signalizovat výskyt VVV, jakými jsou např. omfalokéla, brániční hernie a skeletální defekty (Snijders R. J. M, 1998).

Obrázek 2:Nuchální translucence: UZ zobrazení normálního a abnormálního šíjového projasnění u plodu. Převzato z: https://www.drmikeoconnor.com.au/blog/nipt-screening---nuchal-translucency---complimentary-rather-than-alternatives

Dalším hodnoceným markerem je přítomnost či nepřítomnost nosní kůstky (Obr. 3). Tento parametr je posuzován v období mezi 11. – 13. tt. V roce 1866 si Langdon Down všiml, že charakteristickým rysem pacientů s trizomií 21. chromozomu je právě absence kosti nosní (Pueschel S. M., 1981). Pokud se diagnostikuje absence NB mezi 11. a 12. týdnem, je vhodné udělat vyšetření i o týden později a až tento výsledek opakovaného vyšetření lze použít pro výpočet rizika Downova syndromu, abychom snížili falešnou pozitivitu (Cicero S, 2004).



Obrázek 3: Nosní kůstka (NB): vlevo patrná přítomnost nosní kůstky, vpravo plod bez nosní kůstky. (Fong, K. W. et al., 2004)

CRL je definována jako vzdálenost od temena hlavy plodu ke kostrči. CRL se měří v časném těhotenství (mezi 9.-13. tt.) primárně pro stanovení gestačního stáří plodu (Treolar A., 1967; Cambell S., 1969).

Dalším ultrazvukovým markerem prvního trimestru je měření frontomaxillárního obličejového úhlu (FMF – fronto-maxillo-faciální úhel. Čím je tento úhel větší, tupý, tím je

obličej plodu nápadně oploštělý, což je charakteristické pro děti s chromozomálními aberacemi (Drugan A., 1992).

Jeden z náročnějších UZ je posouzení průtoku krve cévní spojkou, která se nazývá *ductus venosus (DV)*. Abnormálně vysoký tok krve venózním duktem je typický pro chromozomální aberace nebo srdeční vady (Kiserud T, 1994). Použití dopplerovského zobrazení průtoku krve trikuspidální chlopní (TR – trikuspidální regurgitace), patří k dalším pokročilejším možnostem UZ vyšetření. U aneuploidií je diagnostikován zpětný průtok krve, pokud trvá déle než 50 % času systoly komor. Zpětná pulzace je pak charakteristická například pro Downův syndrom (Faiola S, 2005).

1.1.3 Screeningové testy v těhotenství

Kombinace ultrazvukových a biochemických markerů se využívá v rámci screeningových testů v těhotenství. Rozlišujeme screening prvotrimestrální a druhotrimestrální. K rozvoji screeningových metod došlo ve druhé polovině 20. století. Wilson a Junger poprvé definovali zásady a podmínky, pro které je screening i po etické stránce vhodný. Tyto zásady byly schváleny WHO (Raffe AE, Gray JA, 2009).

Prvotrimestrální screening je preferován ČGPS (Českou Gynekologicko-Porodnickou Společností) (Gregor V., Šípek A. a kol., 2009). Jedná se o společné vyhodnocení biochemických markerů a UZ vyšetření, kdy se mezi 10. a 14. tt. provádí biochemická vyšetření a s odstupem 14 dnů UZ vyšetření. V rámci kombinovaného testu se hodnotí PAPP-A, free β hCG, NT a věk matky. Testem se vyhodnocuje riziko především trizomie 21., 18., 13. chromozomu. (Wald N.J., Hackshaw A. K., 1997). Pokud se kombinovaný test v prvním trimestru těhotenství rozšíří o další UZ parametry (přítomnost NB, FMF, vyšetření TR a DV) hovoříme o tzv. kombinovaném kontingenčním testu. K tomuto testování se přistupuje, pokud je výsledek kombinovaného testu hraniční. (Wald NJ, Rodec C, Hackshaw AK, Walters J, Chitty L, Mackinson AM, 2003). Výsledkem hodnocení jsou pak dvě hodnoty cut-off. Nastavení cut-off pro pozitivní výsledky se liší na různých pracovištích. Většinou se jedná o riziko aneuploidie 1:100 a vyšší. Druhý cut-off je nastaven pro riziko 1:1000, který je hodnocen jako negativní. Pokud se výsledek rizika nachází mezi těmito dvěma hodnotami, jsou dále vyšetřovány pomocí kontingenčního testu (Maiz N. et al., 2009).

Screening ve druhém trimestru těhotenství se provádí v období od 15. – 22. tt. Je založen na stanovení biochemických markerů. V současné době je možno druhotrimestriální screening provádět samostatně nebo jako součást integrovaného testu. Druhotrimestriální screening se rozděluje podle počtu stanovovaných biochemických

markerů. V rámci double testu se stanovuje: AFP a hCG může být i free β-hCG. V rámci triple testu se stanovuje hodnota AFP, uE3 a hCG. V rámci quadruple testu AFP, uE3, hCG a inhibin A. Pokud těhotná žena podstoupila kombinovaný test v 1. trimestru a má za sebou i vyšetření v trimestru druhém, je možno výsledky z obou screeningů spojit do jednoho výsledného rizika v rámci tzv. integrovaného testu (Wald N. J., Rodeck C, Hackshaw A. K. et al., 2003).

Hodnoty prakticky všech markerů prenatálního screeningu se mění s gestačním věkem. Proto jsou při výpočtu rizika naměřené hodnoty v jednotkách IU/l, mmol/l, ng/ml, mm přepočítávány na hodnoty MoM (Multiples of Median – násobky mediánu). Zjištěný údaj se podělí hodnotou mediánu pro příslušný marker a den těhotenství. Každá laboratoř si sama stanovuje mediány z databáze svých výsledků (Wald N. J., Hackshaw A. K., 1997).

1.2 Invazivní metody prenatální diagnostiky

Invazivní metody prenatální diagnostiky jsou metody, při kterých je zasaženo do integrity plodu. Umožňují získat vzorek tkáně plodu s cílem potvrzení, či vyloučení rizika vady plodu. Invazivní metody jsou dosud v prenatální diagnostice nezbytné, ale musí splňovat podmínku vysoké bezpečnosti jak pro matku, tak plod samotný. Jsou spojeny s rizikem potratu, které se pohybuje v rozmezí 0,5 – 2 % v závislosti na použité invazivní metodě. Vzhledem k určité rizikovosti se provádí jen u těhotných žen se zvýšeným rizikem výskytu VVV. Mezi invazivní metody prenatální diagnostiky patří: odběr vzorku choria (CVS, chorius villi sampling), aminocentéza (AMC), kordocentéza neboli odběr pupečníkové krve a v některých případech také odběr vzorků fetálních tkání (Hájek Z., 2014).

1.2.1 Indikace k invazivnímu prenatálnímu testování

Doporučení vydané Společností lékařské genetiky (SLG) – „*Doporučený postup genetického diagnostického prenatálního vyšetření (prenatální diagnostika, PND)*“(SLG, 2019), definuje nejčastější indikace k invazivnímu vyšetření, kterými jsou – pozitivní osobní (OA) či rodinná (RA) anamnéza, teratogenní riziko, pokročilý věk matky v době porodu, a především pozitivně hodnocená screeningová vyšetření (nález na ultrazvuku, pozitivní biochemické markery).

Do OA a RA spadá – výskyt VVV či geneticky podmíněného onemocnění v rodině, porod dítěte s chromozomální aberací v předchozí graviditě či potvrzené přenašečství geneticky posmíněného onemocnění (Adzick NS, Thom EA, Spong CY et al., 2011).

V případě, že je těhotná žena vystavena působení látek, které mohou negativně ovlivnit vývoj plodu, mluvíme o tzv. teratogenním riziku. Teratogeny jsou látky, které mohou způsobit řadu VVV. Teratogeny lze rozdělit do čtyř skupin – fyzikální, chemické, biologické a metabolické. Vliv teratogenu je vždy nutné posuzovat na základě několika parametrů, a to na délce působení teratogenu, staří těhotenství, kdy k vlivu teratogenu došlo a také na dávce teratogenu (Gregor V., at al., 2001). Nejznámějším teratogenem ze skupiny chemických látek je alkohol. Vliv alkoholu na vývoj plodu poprvé popsal v roku 1968 Paul Lemoine, pod pojmen fetální alkoholový syndrom (Lemoine P. et al., 1968). Z chemických látek jsou významnými teratogeny také omamné látky, nikotin a některé léky (Volpe JJ., 1993; Koren et al., 1998; Vavřinková B., et al., 2000; Jaddoe VW et al., 2007; Prabhu N. et al., 2010; Rowe T., 2015). Významným teratogenem je také kyselina listová, nikoli však ve smyslu nadbytku, ale nedostatku. Bylo prokázáno, že nedostatečný příjem kyseliny listové je rizikový pro rozvoj defektů neurální trubice, jako je např. spina bifida (Daly IE. et al., 1995). Z fyzikálních teratogenů lze jmenovat tepelnou zátěž a záření (rentgenové, ultrafialové) (Milunski A. et al., 1992). Nejčastějšími biologickými teratogeny jsou původci infekčních onemocnění, označovaných souhrně jako TORCH – Toxoplasmósa, Ostatní, Rubeola, Cytomegalovirus a Herpesviry (Roztočil A. a kol., 2007).

Významnou skupinu pak tvoří indikace z důvodu vyššího věku matky (AMA, advanced maternal age, pokročilý věk matky). Bylo prokázáno že AMA je rizikový pro vznik aneuploidií, především pak trizomie 21. chromozomu (Tab. 1)

Tabulka 1: Riziko vzniku aneuploidií v závislosti na věku matky (Practice bulletin no. 163: screeningfor fetal aneuploidy. Obstet Gynecol 2016;127(5): e 124)

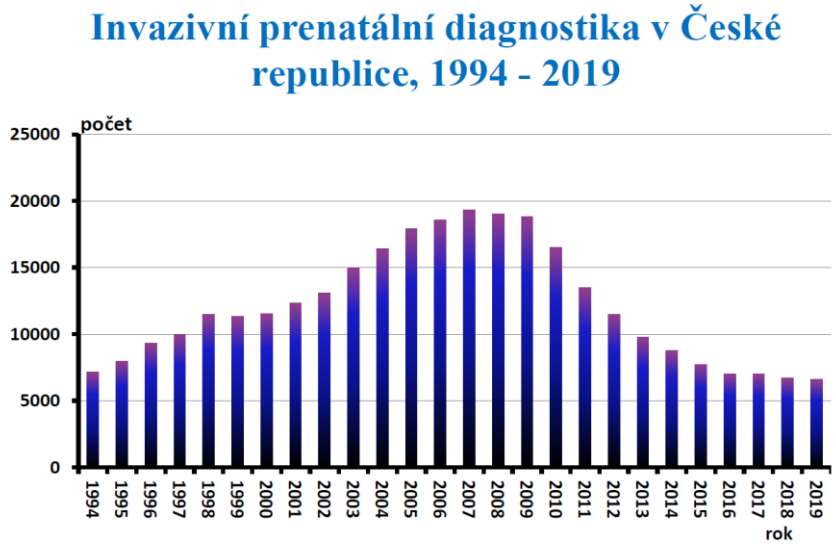
Riziko aneuploidií dané věkem matky		
Věk	**Downův syndrom**	**Ostatní chromosomální aberace**
20	1:1480	1:525
25	1:1340	1:475
30	1:940	1:384
35	1:353	1:178
40	1:85	1:62
45	1:35	1:18

V 70. – 80. letech 20. století patřil AMA k hlavním indikacím k invazivnímu prenatálnímu testování. Z 1000 indikovaných invazivních vyšetření představoval AMA 74,4 % všech indikací. (Bell J. A. et al., 1987). Průměrný věk matek při narození prvního

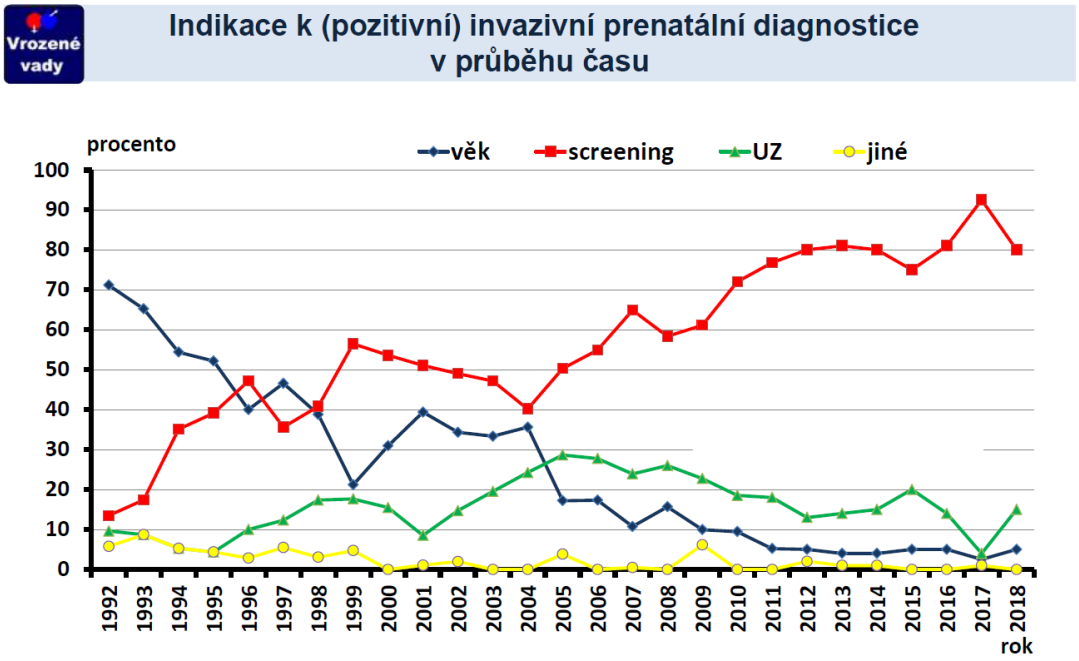
dítěte se celosvětově rok od roku zvyšuje. V roce 1993, bylo ve vybraných zemích (Kanada, Finsko, Česká Republika, Francie, Izrael, Austrálie, Itálie, Holandsko, Švédsko, USA) registrováno 10,8 % matek ve věku > 35 let, v roce 2004 pak došlo k nárůstu na 18,8 % (Cocchi G., et al., 2010). V roce 2017 byl dle Českého statistického úřadu průměrný věk matek 30 let, což je ve shodě s řadou evropských zemí. Tento fakt podporují i další data statistického úřadu, která ukazují největší míru porodů u mužů a žen v ČR ve věkové skupině 30-34 let (Český statistický úřad, online: 25. 3. 2020, https://www.czso.cz/csu/czso/1-obyvatelstvo-rodiny-domacnosti). V řadě evropských zemí je pak AMA stanoven na 35. rok věku matky v době porodu (EUROCAT, 2010).

V případě indikace invazivních technik, by měl být vždy každý případ posuzován individuálně s ohledem na stadium těhotenství a rizikovost výkonu. Každé indikaci k invazivnímu testování předchází genetická konzultace, jejímž cílem je na základě získaných informací poskytnout rodinám informace o riziku, možnostech prevence a dostupných vyšetřovacích postupech. Konzultace by měla být vedena nedirektivně, tzn. rodině by měly být poskytnuty veškeré potřebné informace k tomu, aby se sama rozhodla, jak bude dále postupováno. Výsledkem konzultace je souhlas, eventuálně nesouhlas s potupem, tzv. informovaný souhlas (Ioannides A., 2017; Than N. G. et al., 2017).

Počet indikací k invazivní prenatální diagnostice každoročně klesá. Maxima bylo dosaženo v roce 2007, kdy bylo indikováno cca 20000 výkonů. V minulém roce (2019) pak počet indikací výrazně klesl k cca 7 500 výkonů (Obr. 4). Nejčastější indikací v ČR je pozitivně hodnocený screening, v menší míře pak pozitivní UZ screening či AMA (Obr. 5).



Obrázek 4: Počet provedený invazivních výkonů v rámci prenatálního testování v letech 1994-2019 (Převzato z: www.vrozene-vady.cz, prezentace Prenatální diagnostika chromozomových aberací ČR, Gregor V., Šípek A. Jr., Šípek A., 2020)



Obrázek 5: Zastoupení jednotlivých indikací k invazivnímu testování v ČR (Převzato z: www.vrozene-vady.cz, prezentace Prenatální diagnostika chromozomových aberací ČR, Gregor V., Šípek A. Jr., Šípek A., 2020)

1.2.2 Metody odběru vzorku

Mezi invazivní metody získání vzorku plodu patří choriocentéza (CVS), amniocentéza (AMC) a kordocentéza. Jednotlivé metody se liší především v časovém vymezení, kdy se doporučuje jejich provedení.

1.2.2.1 Choriocentéza

Choriocentéza neboli odběr choriových klků se využívá v prvním trimestru těhotenství. Choriové klky jsou součástí extraembryonální tkáně tzv. trofoblastu. Odběr se provádí nejdříve od 10. tt. (Wapner R. J. et al., 1997; Tabor A. et al., 2010; Ghi T. et al., 2016). Existují dvě možnosti odběru, a to odběr transcervikální (TC-CVS) a transabdominální (TA-CVS). Samotný odběr je vždy prováděn pod ultrazvukovou kontrolou. Mezi výhody CVS patří získání většího množství tkáně, a především časná diagnostika snižující míru stresu. Stejně tak jsou popsány nevýhody a rizika spojená se CVS, kterými jsou riziko maternální kontaminace, placentární mozaicizmus, infekce, krvácení, předčasný porod a riziko potratu. Riziko potratu u CVS je pak obecně stanoveno na 0,2-2 % (Hogge W. A. et al., 1985; Williams J. et al., 1987; Collins SL. et al., 2012; Niederstrasser SL. et al., 2017; Chevreau J. et al., 2019; Martins AT., et al., 2020).

1.2.2.2 **Amniocentéza**

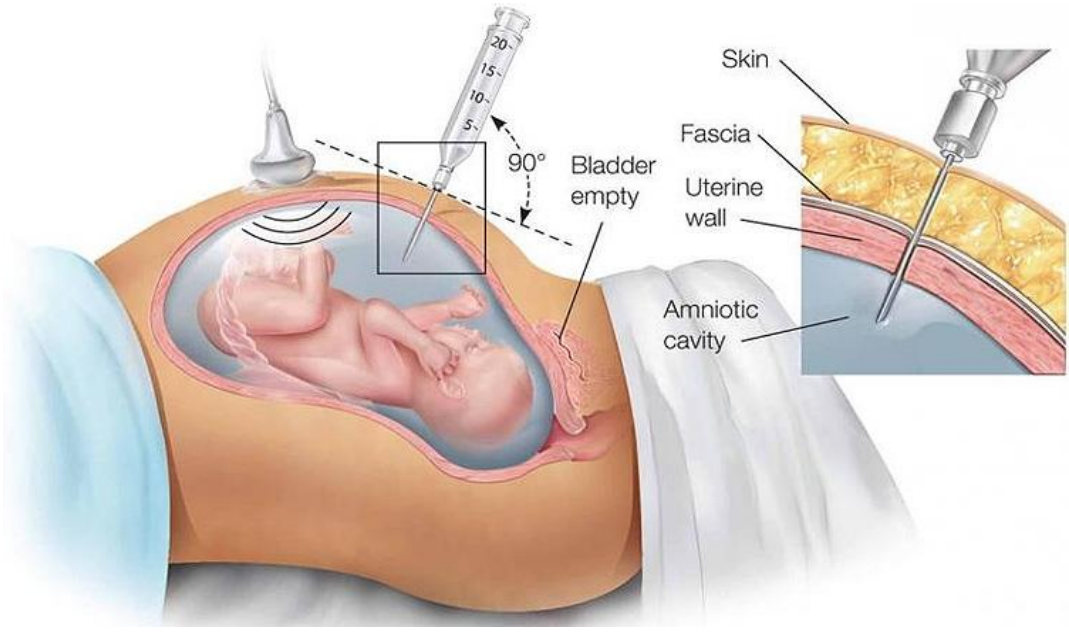
Amniocentéza neboli odběr plodové vody je prováděn v druhém trimestru těhotenství, nejčastěji od 15. tt. (Ghi T. et al., 2016). Odběr plodové vody v 15. - 16. tt. byl v počátcích prenatální diagnostiky považován za tzv. zlatý standard. (Delisle M. F., Wilson D. R., 1999).

Plodová voda (PV) je za normálních okolností čirá tekutina, která pro plod vytváří optimální podmínky. Amniová tekutina se skládá z řady látek, jako jsou proteiny, aminokyseliny, steroidní hormony, mastné kyseliny, močovina, kreatinin, kyselina močová a především pak epiteliálních buněk plodu, díky kterým je plodová voda vhodným materiálem pro prenatální genetická vyšetření (Kudela M., 2008; Hájek Z., 2014). Množství plodové vody se během těhotenství mění s maximem ve 38. tt. (Tab.2).

Tabulka 2: Množství plodové vody v závislosti na stádiu těhotenství (Hájek Z., 2014)

Týden těhotenství	**Objem plodové vody (ml)**
8	10
12	50
16	150
38	900-1000
40	800-900
> 42	300

Poprvé prezentoval provedení transabdominální amniocentézy Prochownick, Von Schatz a Lambl. Roku 1919 pak byla provedena tzv. léčebná amniocentéza z důvodu rozvoje polyhydramnionu u těhotné pacientky. Pokrok ve využití amniocentéz nastal roku 1956, kdy Reis-Fuchs využili buňky plodové vody k určení pohlaví. V témže roce byla vyslovena hypotéza o možnosti využití buněk PV v diagnostice dědičných onemocnění. Největší pokrok byl zaznamenán roku 1966 kdy se Steelovi s Bregem podařilo poprvé kultivovat buňky plodové vody s následným vyšetřením karyotypu. Tento poznatek vedl k masivnímu rozvoji využití amniocentéz v prenatální diagnostice (Riis P., Fuchs F., 1960; Steele MW., Berg WR., 1966; Sahitya R. R., 2018). V České republice byla aminocentéza zavedena MUDr. Miroslavem Břešťákem na počátku sedmdesátých let 20. století letech (Štembera Z., 2004). Odběr PV se provádí punkční jehlou přes břišní stěnu (transabdominálně) (Obr. 6), eventuálně přes děložní čípek (transcervikálně). Před vlastním odběrem je provedena UZ kontrola polohy plodu s výběrem vhodného místa vpichu. Za stálé kontroly UZ se jehlou pronikne do amniového vaku a pomocí odběrové soupravy se odebere požadované množství plodové vody (Roztočil A., 1998).



Obrázek 6: Způsob provedení transabdominální AMC (Mcclane S., 2015)

Fyziologicky se jedná o čirou, lehce nažloutlou tekutinu. Změna barvy může indikovat patologické stavy. Červená svědčí o čerstvém krvácení, které může být způsobeno poraněním placenty. Tmavě hnědé zabarvení vzniká v důsledku staršího krvácení nebo při odumření plodu. Nitroděložní dechová tíseň může být následována vypuzováním smolky a tím zbarvit plodovou vodu do zelena (Kudela M., 1996).

AMC má své výhody, nevýhody a rizika. Nevýhodou AMC je doba zisku tkáňové kultury z deskvamovaných buněk a její následné zpracování pro cytogenetické účely. Nutná doba k získání výsledků je zhruba 3 týdny. Z časových důvodů některá pracoviště upřednostňují časnou aminocentézu, která se provádí dříve než v 16.tt. Brzká amniocentéza je však dle mnoha studií rizikovějším úkonem z hlediska možných komplikací. Byla-li AMC provedena dříve než v 15. tt., byly komplikace pozorovány u 7,3 % žen, zatímco u žen, které podstoupily AMC po 16. tt., byl výskyt komplikací 2,8 % (Simpson N. et al., 1976). U brzkých amniocentéz se také prodlužuje doba kultivace a riziko neúspěšné kultivace je zvýšené, s čímž souvisí často i nutnost opakovat odběr PV (The Canadian Early and Mid-Trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group, 1998; Delisle M. F., Wilson R. D., 1999). U brzkých amniocentéz byla naopak pozorována menší míra kontaminace maternální tkání (Penso CA., Frigoletto FD., 1990).

Mezi další rizika spojena s odběrem PV patří rozvoj infekce, tzv. amnionitidy, odtok plodové vody, poškození plodu při odběru, předčasný porod a riziko potratu. Riziko potratu je jedním z nejdiskutovanějších témat mnoha studií (Tab. 3). Obecně je riziko potratu spojené

s AMC publikováno jako < 1% (Ghi T. et al., 2016). Riziko potratu je však důležité posuzovat stejně jako v případě CVS individuálně s přihlednutím k dalším faktorům tzv. pozadí rodičky (věk matky, tt., opakované potraty, komplikace v těhotenství). Papantouniou N. E. et al., pak popisují zvýšený výskyt potratů u skupiny rodiček ve věkové skupině ≥ 40 let, oproti věkové skupině 20-34 let (Papantoniou N.E. et al.,2001; Theodora M. et al., 2015). Amniocentéza prováděna u vícečetného těhotenství má vyšší riziko potratu oproti jednočetným graviditám. Proto musí být aminocentézy u dvojčat prováděny v přísně indikovaných případech. (Hájek Z., 2004).

Tabulka 3: Příklady studií zaměřených na vyjádření % rizika potratu

Studie	**Riziko potratu**
Simpson N. E. et al., 1976	2,3 %
NICH 1976	3,5 %
Tabor A. et al., 1986	1,7%
Papantoniou N. E., et al., 2001	0,7-0,9 %
Mujezinovic F., et al., 2007	0,6 – 1,9 %
Towner D. et al., 2007	0,46 %

Mezi další nevýhody AMC patří riziko kontaminace maternálmími buňkami. Z tohoto hlediska je doporučeno, aby několik prvních kapek odebrané PV nebylo použito (Ferguson-Smith M. A., 1984). Z hlediska výskytu mozaicizmu představuje PV menší riziko. Bylo prokázáno, že na rozdíl od CVS, je riziko mozaicizmu u vyšetření PV 10x menší. Nehledě na fakt, že průkaz mozaicizmu v choriových klcích po CVS je indikací k odběru plodové vody (Tabor A., Alfirevic Z., 2010).

1.2.2.3 **Kordocentéza**

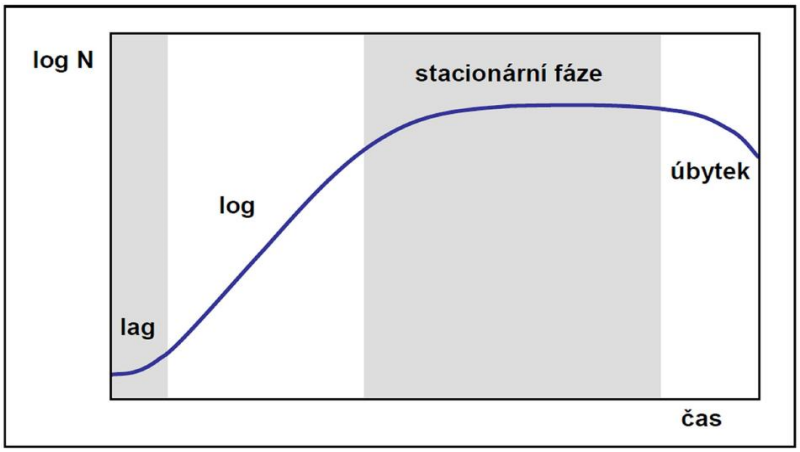
Kordocentéza (CC) neboli odběr krve z pupeční žíly se provádí nejdříve po 20. tt. Poprvé tuto metodu popsal Valenti C. v roce 1973 (Valenti C., 1973). Primární výhodou kordocentézy oproti CVS a AMC je rychlost zisku karyotypu plodu (1–3 dny), a tím i diagnostika chromozomálních abnormalit. Jakýkoli přínos však musí být zvážen s ohledem na riziko kordocentézy. Riziko potratu u CC je předmětem zájmu mnoha studií a pohybuje se v rozmezí od 0,3 % až po 4,8 % (Daffos et al., 1985; Tongsong T., et al., 2001; Acar A., et al., 2007). Dalšími riziko jsou – krvácení z místa vpichu, amnionitida či vzácně se rozvíjející se sepse a syndrom respirační tísně (Daffos et al., 1985; Bovicelli L., et al., 1989; Wilkins I., et al., 1989)

1.3 Cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody

1.3.1 Kultivace

Kultivace buněk je nezbytnou součástí předcházející vlastnímu cytogenetickému vyšetření. Kultivace umožňuje získat buňky, nacházející se v metafázi buněčného dělení, kdy jsou chromozomy nejlépe hodnotitelné. Pro kultivaci buněk v umělých podmínkách se používá termín in vitro (z latiny „ve skle“)(Schwarzacher H. G., Wolf U., 1974). Pro kultivaci jsou nezbytná tzv. živná média, která poskytují nejvhodnější podmínky. Do živného média se také přidávají antibiotika, aby se zabránilo bakteriální kontaminaci. Buněčné kultury se uchovávají v umělohmotných nádobkách v termostatu při teplotě 37 °C a zvýšené tenzi oxidu uhličitého. Při práci s buněčnými kulturami je potřeba dodržovat zásady sterilní práce (používání laminárních boxů, germicidních lamp).

Růst buněk je možné sledovat pomocí inverzního mikroskopu (Nadler H. L. et al., 1969). Buňky rostou v určitých fázích, které znázorňuje křivka fázového růstu (obr. 7). Lag fáze je fází, kdy se buňky adaptují na kultivační prostředí a začínají se dělit. V logaritmické fázi počet buněk exponenciálně roste. Ve stacionární fázi rychlost růstu klesá a projevují se inhibiční mechanismy. Poslední fází je fáze úbytku, kdy dochází k odumírání buněk (Kočárek E. et al, 2010)



Obrázek 7: Růstová křivka buněčné kultury (Kočárek E. a kol, 2010)

Ve stacionární fázi buňky pokryjí povrch nádoby a dostanou se do vzájemného kontaktu, čímž dochází ke kontaktní inhibici. V této fázi je nutné buňky přenést do nové kultivační nádoby s živným médiem. Tomuto procesu se říká pasážování. Podle toho, jakým způsobem buňky rostou v kultuře a způsobu pasážování, lze buňky dělit na adherentní a suspenzní (Peterson, Carol A., et al., 1996). Adherentní buňky jsou přisedlé na kultivační

povrch. Adhezi buněk usnadňují proteiny jako je například kolagen, fibronektin nebo laminin. K uvolnění buněk ze dna nádobky se používá proteolytický enzym, například trypsin. Suspenzní buňky rostou naopak dispergované v médiu (Peshwa, Madhusudan V. et al., 1993). K zastavení dělení buněk se používá kolcemid. Kolcemid je syntetickým derivátem kolchicinu. Původem se jedná o rostlinný alkaloid, který je schopný zadržet buňky v metafázi mitotického dělení (Rodman T. C., Flehinger B. J, Rohlf F. J., 1980).

Mezi nejčastěji kultivované buňky patří lymfocyty periferní krve. Tyto buněčné kultury se řadí mezi tzv. krátkodobé kultury. Dělení lymfocytů je stimulováno rostlinnými lektiny, z nichž je nejběžněji využíván výtažek z fazolí – fytohemaglutinin (PHA). Pro kultivaci lymfocytů se odebírají 2–3 ml krve do zkumavky s heparinem. Krev se kultivuje v živném médiu v termostatu při 37 °C, 72 hod. Mitotické dělení je ukončeno přidáním kolcemidu (Fedorenko B. eat al., 2001). V rámci prenatální diagnostiky se kultivují buňky plodové vody (amniocyty) či buňky trofoblastu (choriocyty) (Nadler H. L. et al., 1969). Tyto kultivace se označují jako dlouhodobé. Tyto kultivace s sebou nesou riziko kontaminace, a proto se musí pracovat za přísně sterilních podmínek. Plodová voda je po odebrání zcentrifugována a k vlastnímu nasazení kultury se používá sediment. Sediment je resuspendován v kultivačním médiu a přenesen do kultivačních lahviček. Supernatant lze využít k biochemickému vyšetření. Amniocyty se kultivují v termostatu při 37 °C v atmosféře 5 % CO_2. Většinou 5. – 7. den kultivace se provádí mikroskopická kontrola kultury a zároveň první pasážování. V průběhu dalších dnů se prováději kontroly růstu. Po vhodném nárůstu následuje blokace buněčného cyklu kolcemidem (Nadler H. L. et al., 1969). V případě kultivace tkáně choriových klků se odpreparujjí příměsy mateřské tkáně a krve. Poté je biologický materiál resuspendován v kultivačním médiu a nasazen do kultivačních lahviček. Kultivace probíhá za stejných podmínek jako kultivace amniocytů.

1.3.2 Karyotyp

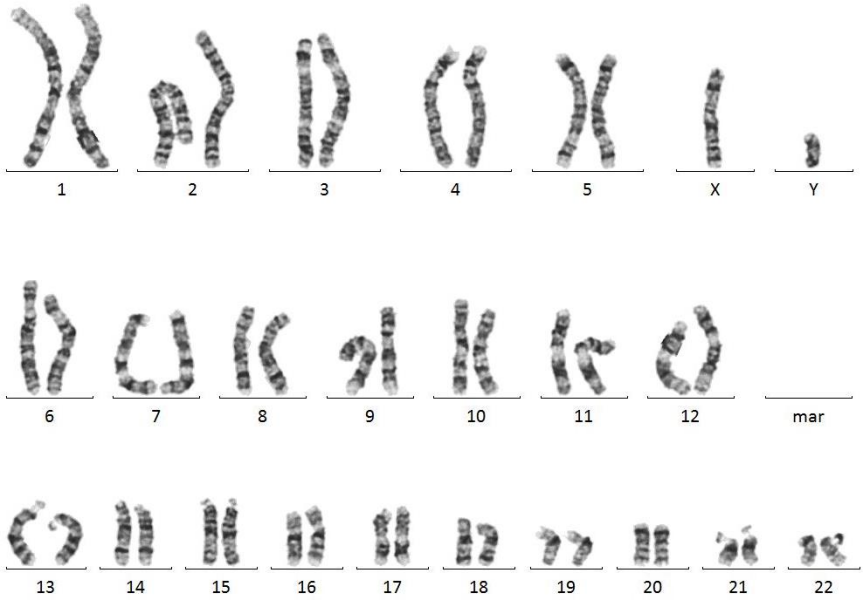
Vyšetření karyotypu patří mezi základní cytogenetické metody. Spočívá v chromozomové analýze buněk v metafázi buněčného dělení (Michalová, 1999). Po zastavení buněčného dělení v odpovídající fázi je nutné buňky hypotonizovat 0,75 M (molární) roztokem KCl (chlorid draselný) (Rønne, 1989). Při hypotonizaci dochází k přechodu vody z extracelulárního do intracelulárního prostředí což vede k rozestoupení chromozomů (Schrek R., 1945).
Následuje fixace pomocí fixačního roztoku, který se skládá ze směsi metanolu a kyseliny octové v poměru 3 : 1. Takto zpracovaná buněčná suspenze je takto připravena pro přípravu

vlastního preparátu tzv. kapání, kdy dojde k prasknutí buněčné membrány a „vylití“ chromozomů (Rønne, 1989). Následuje barvení chromozomů. Existuje celá řada barvících technik. Prvním typem je klasické neboli konvenční barvení pomocí Giemsova barviva. Tímto způsobem se chromozomy zbarví homogenně. Toto barvení se používá při hodnocení chromosomů v celkovém počtu nebo hodnocení zlomů (Rooney D.E., Czepulkowski, B.H.,1992). Dalším typem barvení jsou tzv. techniky pruhování – G-, R-, C-, Q-. Nejpoužívanější metodou v klinické praxi je G-pruhování. Barvení je založeno na působení trypsinu s následným obarvením Giemsovým roztokem, Kombinace těchto činidel vytvoří na chromozomech tmavé (G+, heterochromatinové) a světlé (G-, euchromatinové) pruhy (Obr. 8). Tyto pruhy jsou pro každý chromozom charakteristické a slouží k přesné identifikaci jednotlivých chromozomů. (Holmquist, 1989).

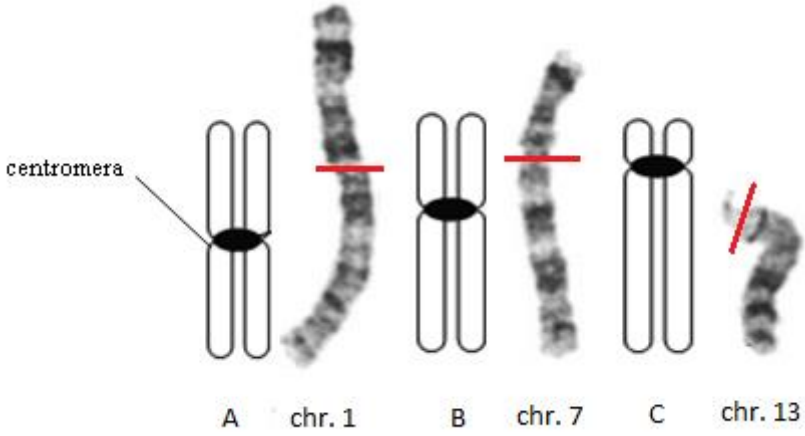
Obrázek 8: Chromozomy barvené technikou G-pruhování (Alma Ganezer, 2019, web: https://www.flandershealth.us/cytogenetics/qbanding-quinacrine-banding.html)

Další technikou je R-pruhování neboli reverzní pruhování. Technika využívá zahřátí vzorků s následným barvením. Výsledkem jsou pak opět světlé a tmavé pruhy, které jsou reverzní ke G-pruhování. (Comings D. E., 1978). Další technikou je Q pruhování využívající fluorescenční barvivo, chinakrin (Sumner A. T., 1990). Technika selektivního barvení heterochromatinu okolo centromer se nazývá C-pruhování, založené na degradaci chromatinu pomocí hydroxidu barnatého. Jediné, co odolává degradaci, je konstituční heterochromatin, který se jako jediný obarví Giemsou.

Výsledkem chromozomové analýzy je karyotyp (Obr. 9) – soubor všech chromozomů v buňce. (Holmquist, 1989). Na chromozomu rozlišujeme několik oblastí – centromera, telomery, krátká raménka (p) a dlouhá raménka (q). Podle délky ramének a uložení centromery, rozlišujeme v lidském karyotypu chromozomy – metacentrické, submetacentrické a akrocentrické (Obr. 10) (Kočárek E. et al., 2006).



Obrázek 9: Normální mužský karyotyp (Zdroj: vlastní meterály ÚBLG 2.LF UK a FN Motol)



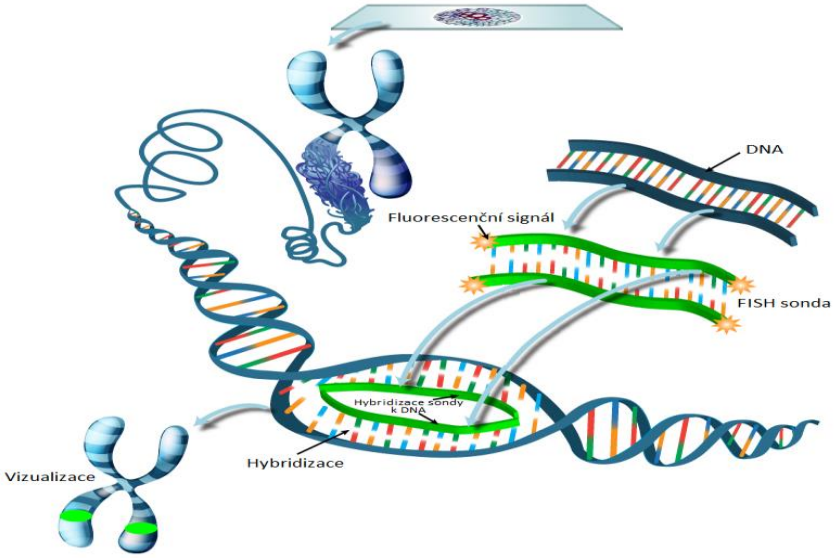
Obrázek 10: Druhy chromozomů – A: metacentrický, B: submetacentrický, C: akrocentrický (vlastní obrázek)

Jádro lidské buňky obsahuje fyziologicky 23 párů, neboli 46 chromozomů. Chromozomy se dělí na autozomy a gonozomy. Autozomy jsou chromozomy somatických buněk a jsou očíslovány (1-22). Gonozomy jsou pohlavní chromozomy, které se označují písmeny X a Y. Žena má 22 párů autozomů a 2 pohlavní chromozomy X. Muž má stejný počet autozomů, ale pohlavní chromozomy jsou zastoupeny jedním chromozom X a jedním chromozomem Y.

(Ford, 1956). Chromozomy jsou dle tzv. Denverské klasifikace rozděleny do 7 skupin označených písmeny A – G. Zápis výsledku karyotypu má jasně daná pravidla a zásady, které jsou definované v ISCN (An international systém for human cytogenomic nomenclature).

1.3.3 Fluorescenční hybridizace *in situ*

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH, Fluorescent In Situ Hybridization) je molekulárně cytogenetická metoda, která umožňuje lokalizaci a identifikaci specifických úseků DNA na chromozomu. Metoda využívá dvou základních postupů, a to procesu denaurace a hybridizace (Obr. 11). Při denaturaci dochází k rozvolnění dvouvláknové struktury DNA za vzniku jednovláknové DNA. Denaturace DNA probíhá při 75–80 °C (Schwarzacher T., 2000). Následně nastává tzv. hybridizace, kdy fluorescenčně značená sonda nasedá na cílové specifické sekvence podle pravidla komplementarity. Hybridizace probíhá při 37 °C (Bayani J. et al., 2004). Sonda je uměle připravený úsek DNA, který slouží k detekci sekvencí vyšetřované DNA. Sondy dělíme do tří skupin: centromerické, lokusově specifické a celochromozomové. Centromerické sondy hybridizují k oblasti centromer lidských chromozomů. Využívají se především k diagnostice početních odchylek. Lokusově specifické sondy hybridizují ke specifickým úsekům DNA. Využívají se především k diagnostice delecí, translokací nebo amplifikací. Celochromozomové sondy, hybridizují k mnoha oblastem na chromozmu a tím se označí celý chromozom (Liehr T., 2009). Sondy jsou nejčastěji značeny fluorescenčně. Sonda může být značena přímo, pomocí fluorochromů, nebo nepřímo pomocí haptenu. K hodnocení preparátů se používá fluorescenční mikroskop. Hybridizační signál se pak jeví jako barevný bod, který identifikuje daný chromozom nebo lokus.



Obrázek 11: Princip cytogenetické metody FISH (Převzato a upraveno, https://www.labmanager.com/sponsored/fish-fluorescence-in-situ-hybridization-22054)

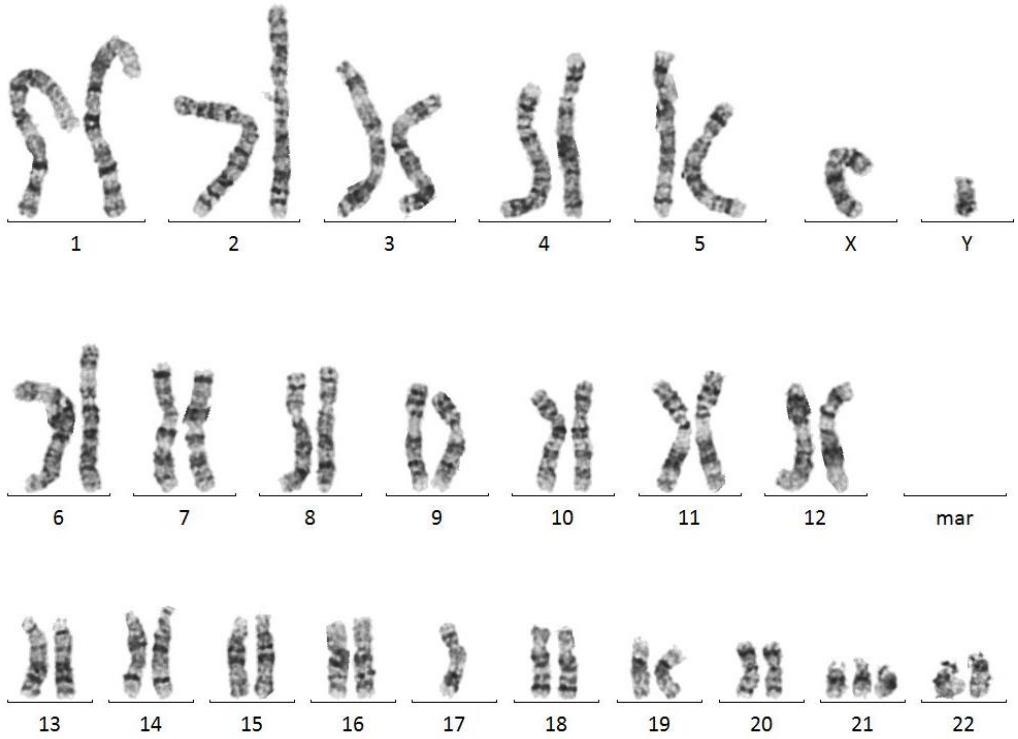
1.4 Početní chromozomové aberace u prenatální diagnostiky

Chromozomové aberace dělíme na početní a strukturní. Pokud chromozomální aberace neovlivňují fenotyp, jsou označovány jako balancované (např. translokace, inverze). Nebalancované aberace se naopak fenotypově projeví (např. delece, duplikace) (Snustad D. et al., 2009). Početní abnormality se označují jako změny ploidie organismu (z řeckého slova „*ploos*“ – „násobný“). Organismy, které ve svých buňkách obsahují nadbytečnou sadu chromozomů, označujeme jako polyploidní. Pokud se mění pouze počet jednotlivých chromozomů, pak tyto chromozomální vady označujeme jako aneuploide. Mezi aneuploidie patří trizomie, což je označení pro existenci tří kopií téhož chromozomu. U člověka jsou nejznámnější trizomie: Downův syndrom (trizomie chromozomu 21), Edwardsův sydrom (trizomie 18. chromozomu) a Patauův syndrom (trizomie chromozomu 13). Dalším typem aneuploidie je tzv. monozomie. Jedná se o ztrátu jednoho chromozomu v karyotypu diploidního jedince. Jednou z nejznámější s životem slučitelnou monozomií je Turnerův syndrom (45,X)(Snustad et al., 2009).

1.4.1 Downův syndrom

Downův syndrom (DS) je jeden z nejčastějších a nejznámějších syndromů. Poprvé jej popsal anglický lékař John Langdon Down roku 1838 (Pueschel S. M., 1981). Příčina DS však byla objasněně až roku 1959, kdy LeJeune a Jacobs přišli na to, že DS je způsoben trisomií 21. chromozomu (Korenberg J. R., Pulst S. M., Gerwehr S., 1992). Nejčastější formou DS je tzv. volná trizomie chromozomu 21. (Obr. 12). Trizomie vzniká jako důsledek

chybného rozchodu chromozomů při buněčném dělení – tzv. nondisjunkce (Antonarakis S. E., Petersen M. B. et al., 1992). Druhou nejčastější formou je translokační forma DS. V tomto případě je chromozom 21 translokován na jiný, nejčastěji akrocentrický chromozom. Zůstává-li genetický materiál zastoupen dvěmi kopiemi chromozomu 21, mluvíme o balancované translokaci a jedinec nesoucí tento chromozom je přenašečem. Je-li chromozom 21 přítomen ve třech kopiích, mluvíme již o nebalancované formě, která se projeví jako DS. Nejčastějším typem translokace u DS je robertsonská translokace mezi krátkými raménky 21. chromozmu a chromozomu 14 (Muntau A. C., 2009).

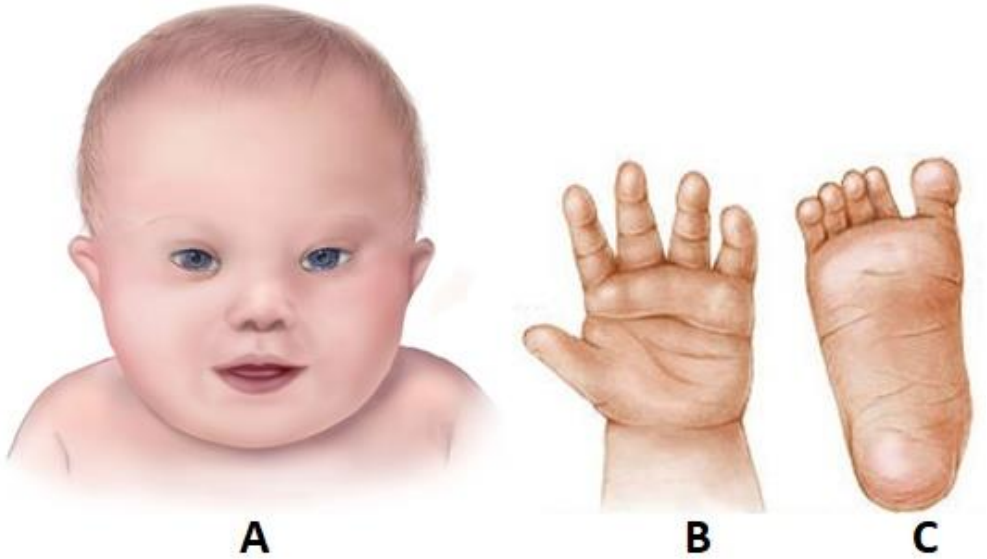


Obrázek 12: **Karyotyp s trisomií 21. chromozomu (Downův syndrom)** (Zdroj: vlastní materály ÚBLG 2. LF UK a FN Motol)

Méně často se DS vyskytuje v tzv. mozaice. Znamená to, že nadbytečný chromozom 21 je přítomen pouze v některých buňkách. Ostatní buňky nesou fyziologický počet chromozomů 21 (Niikawa N., Kajii T., 1984). Výsledný fenotyp jedince pak závisí na podílu euploidních a trizomických buněk (Selikowitz, 2005).

U jedinců s DS je popsán komplexní fenotypový projev. Mezi typické fenotypové znaky patří faciální dysmorfie (Obr. 13-A) zahrnující mongoloidní směr očních štěrbin, níže posazené uši, makroglosii, hypertelorismus, kratší nos, široký kořen nosu, Brushfieldovy skvrny na duhovce a mikrodoncie (Stark A., 1982; Selikowitz, 2005). Ruce jedinců s DS bývají většinou široké s krátkými prsty. V souvislosti s prsty na rukou se může vyskytovat i klinodaktylie. V dlani bývá popisována tzv. čtyřprstá rýha (Obr. 13-B). Nohy bývají silné

a na chodidle se vyskytuje tzv.: sandálová mezera mezi palcem a ukazovákem (Obr.13-C) (Selikowitz, 2005).



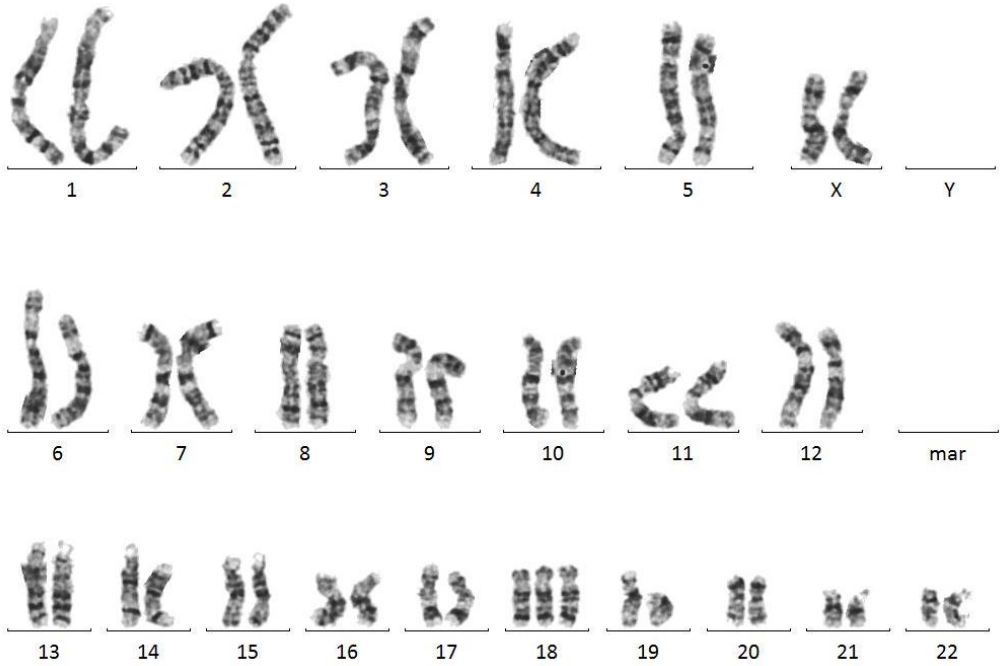
Obrázek 13: **Fenotypové projevy Downova syndromu.** A – faciální dysmorfie, B – čtyřprstá rýha, C – sandálová mezera (Centers for Disease Control and Prevention, 2012, dostupné z: https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/DownSyndrome.html, citováno 29.5.2020 ttps://kpcolmenares.wixsite.com/sindromededown/fenotipo-sndrome-de-down, citováno 29.5.2020)

Psychomotorický vývoj bývá opožděn. Typická je mentální nedostatečnost. U dětí s DS se také vyskytují systémové vady (kardiovaskulární, vady postihující nervový systém nebo imunohematologické anomálie). Kardiovaskulární vady postihují přibližně 40 % dětí s DS (Goodman R., Gortin R., 1983). Typickým příkladem kardiovaskulární vady, která má vyšší prevalenci výskytu u dětí s DS je prolaps mitrální chlopně (Barnett M. I. et al., 1988). U dětí s DS je dále zvýšené riziko výskytu akutní lymfocytární leukemie (ALL). Mezi další anomálie patří vady nervového systému. U mladších dětí se vyskytuje porucha motoriky a koordinace. Po 35. roce života se mohou u mnoha pacientů vyvinout neuropatické změny, které jsou podobné jako u Alzheimerovy choroby (Wilson, M. D., 1994).

1.4.2 Edwardsův syndrom

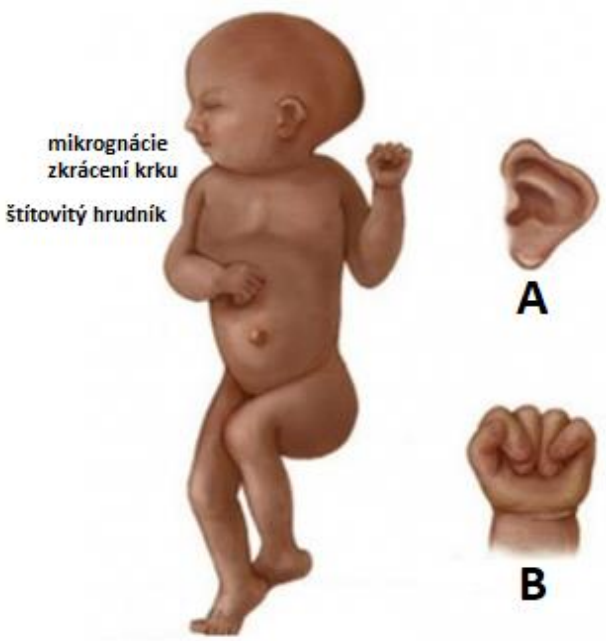
Trisomie 18. chromozomu, známá též jako Edwardsův syndrom (ES), je druhou nejčastější chromozomální vadou hned po Downově syndromu. Porucha je způsobena přítomností třetího chromozomu 18. (Cereda A., 2012). Poprvé byl syndrom popsán roku 1960 (Edwards J. H. et al., 1960). Stejně jako v případě DS, i ES se může vyskytnout ve formě volné trizomie (Obr. 14), ve formě translokace nebo v mozaikové formě. Nejčastější formou Edwardsova syndromu je volná trisomie chromozomu 18 vznikající v důsledku

nondisjunkce (Bugge et al., 1998). Dle studií je nadbytečný chromozomu 18 častěji maternálního původu (Kupke K. G., Müller U., 1989).



Obrázek 14: **Karyotyp s trisomií 18 (Edwardsův sy.)** (Zdroj: vlastní meterály ÚBLG 2. LF UK a FN Motol)

Typickými znaky ES jsou poruchy růstu, vady gastrointestináoního traktu (GIT), kardiovaskulárního a nervového systému, svalové a kostní malformace, zpomalení růstu, projevující se již intrauterině (IUGR, intra-uterine growth retardation), celkové vývojové opoždění a faciální dysmorfie (malá ústa, mikrognácie, dysplastické uši) (Obr.15-A) (Sepulveda W. et al., 2010). Průměrná porodní hmotnost je velmi nízká, pohybuje se v rozmezí 1700–1800 g (Embleton N. D. et al., 1996). Většina dětí má potíže se sáním a polykáním v souvislosti s roštěpy rtu a patra a gastroesophageálním refluxem (Baty B. J., Blackburn B. L., Carey J. C., 1994; Carey J. C., 2010). U 80-100 % jedinců s ES jsou diagnostikovány vrozené srdeční vady (defekt komorového a síňového septa, otevřená tepenná dučej, defekty chlopní) (Van Praagh R., 1989). Dále jsou popsány oční vady, jako je katarakta či zákal rohovky (Calderone J. P., 1983). Z dalších vrozených vad se mohou objevit deformity končetin, např. radiální aplazie, hypoplazie prstů, pes equinovarus a typické překládání prstů, tzv. „overlapping fingers“ (Obr. 15-B), štítovitý hrudník, prominující sternum (Obr. 15) (Carey J. C., 2010). V rámci urogenitálního traktu je typický nález tzv. podkovovité ledviny (Staples A. J. et al., 1991). Typické jsou také strukturální vady centrální nervové soustavy (CNS) – mikrocefalie, cerebrální hypoplasie, hydrocefalus či ageneze corpus callosum (Kinoshita M. et al., 1989).

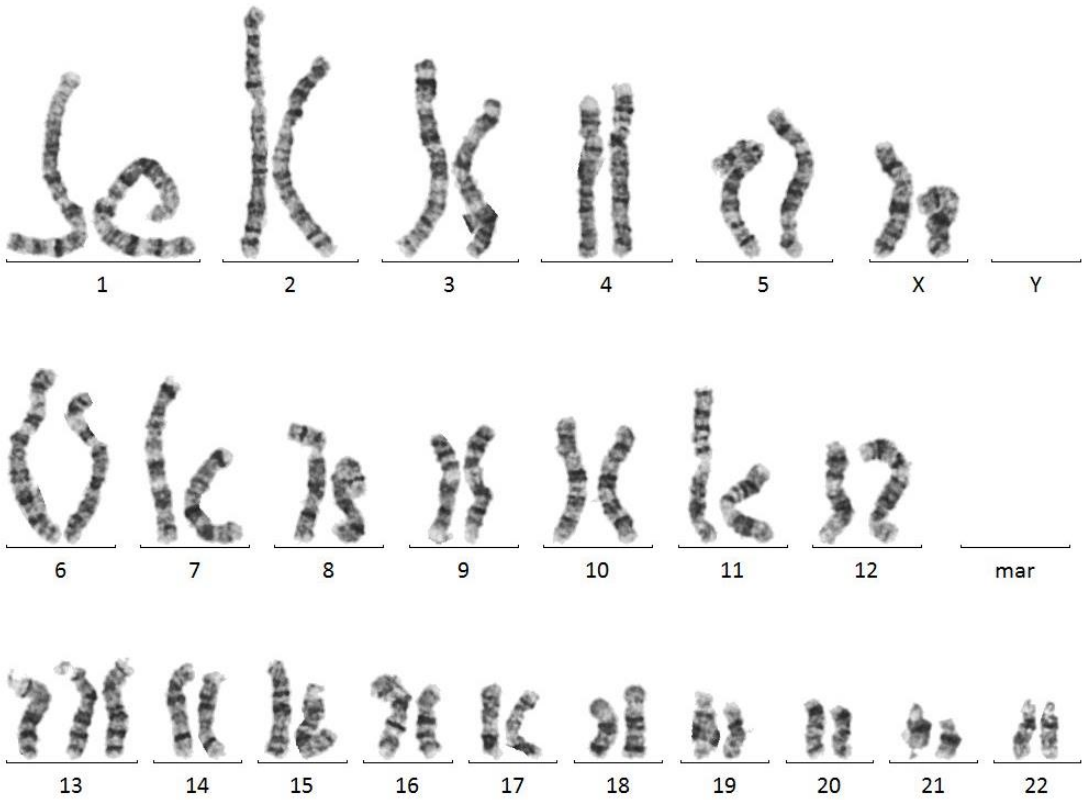


Obrázek 15: Fenotypové znaky Edwardsova syndromu. A - dysplastické uši, B-typické překládání prstů (Pivoňková, 2013, web: https://www.priznaky-projevy.cz/images/priznaky-projevy/edwardsuv-syndrom-trisomie-18-priznaky-projevy-symptomy-3.jpg)

Přežívání dětí s ES je zkráceno. Jedinci umírají většinou již v průběhu porodu, či těsně po porodu. Průměrná doba dožití se dle jednotlivých studií liší, avšak zhruba 90 % jedinců umírá do 1 roku věku (Weber W. W., 1967; Yamanaka M. et al., 2006, Carey J. C., 2010). Prevalence Edwardsova syndromu se pohybuje v rozmezí 1:3600–1:10000 (Rasmussen S. A. et al., 2003).

1.4.3 Patauův syndrom

Patauův syndrom, trisomie 13. chromozomu patří mezi třetí nejčastější chromozomální aberaci detekovanou preantálně (Wyllie J. P. et al., 1994). Je způsoben přítomností nadbytečného chromozomu 13 (Ishikiriyama S. and Niikawa N., 1984). Patauův syndrom poprvé popsal Dr. Patau v roce 1960 (Patau K. et al., 1960). Nejčastější formou je volná trisomie 13. chromozomu způsobená nondisjunkcí při meiotickém dělení (Obr. 16)(Wyllie J. P. et al., 1994).



Obrázek 16: **Karyotyp s trisomií 13. chromozomu (Patauův syndrom)** (Zdroj: vlastní meterály ÚBLG 2. LF UK a FN Motol)

Patauův syndrom se také může vyskytovat ve formě Robertsonské translokace (Pérez-Castillo A. et al., 1978). Méně často se Patauova syndromu vyskytuje v mozaice (Petry P. et al., 2013).

Patauův syndrom má jasně definovatelné klinické projevy (Obr. 17). Typické jsou neurologické, rozštěpové a srdeční vady, polydaktilie, kožní defekty a mentální opoždění (Baty B. J. et al., 1994). Mezi defekty obličeje a hlavy patří například: mikrocefalie, zvětšená velká fontanela, opožděný uzávěr lebečních švů, tenké rty, rozštěpy rtu a patra. Mezi vady skeletu patří krátký krk, kyfóza, skolióza, hypoplazie žeber a pánve. Kůže může být volná, objevují se kožní kapilární hemangiomy a hypoplastické nehty. Mezi neurologické vady patří těžké psychomotorické opoždění. Z vad urogenitálního systému se objevují například: polycystické ledviny, hydronefróza, mikropenis či hypoplazie ovarií (Žižka J., 1994). Studie uvádějí velice špatnou prognózu u trisomie 13. chromozomu. Jedinci s PS se běžně dožívají 7–10 dní a 90 % dětí se nedožije jednoho roku života (Peroos S. et al., 2012). Prevalence Pataova syndromu je 1:5000 (Springett A., et al., 2015).

Obrázek 17: Fenotypové znaky Patauova syndromu (Santiago J., modern genetics, web: https://moderngeneticsjavier.blogspot.com)

2 PRAKTICKÁ ČÁST

2.1 Cíle práce

Praktická část bakalářské práce je rozdělena na dvě části. První část se zabývá vyhodnocením dat, souvisejících s odběry plodové vody. Cílem této části je:

- vyhodnotit, ve kterém týdnu těhotenství byly AMC nejčastěji provedeny
- zhodnotit důvody indikací k AMC
- vyhodnotit věk matek v době těhotenství v souvislosti s AMA
- vyhodnotit záchytnost chromozomových aberací pomocí metody karyotypování

Ve druhé části bylo cílem práce u vzorků s nálezem chromozomové aberace v karyotypu, ověřit nález pomocí metody FISH a porovnat tyto výsledky.

2.2 Metodika

2.2.1 Soubor použitých dat

Vzorky pochází z ÚBLG 2. LF UK a FN Motol. Celkem bylo za období od ledna 2019 do března 2020 k prenatálnímu vyšetření přijato 179 vzorků plodových vod.

2.2.2 Použité sondy, spotřební materiál, technické vybavení

Technické vybavení

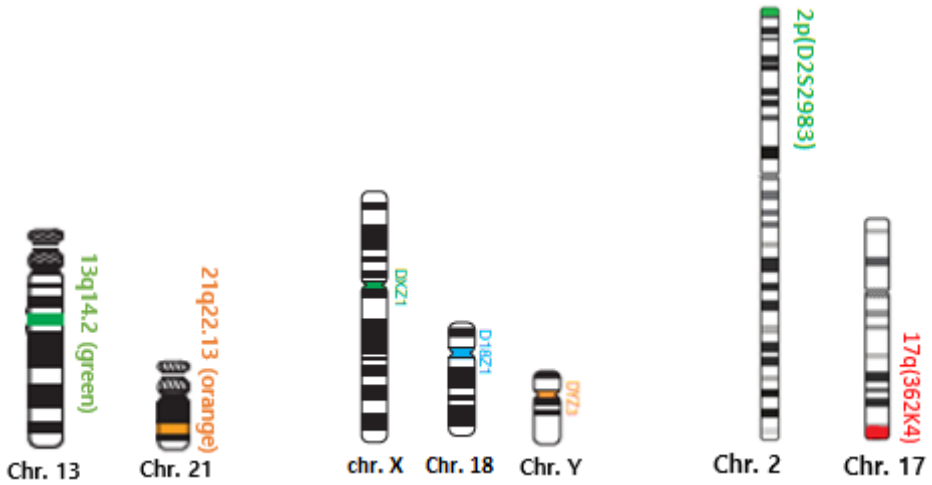
- Automatické pipety
- Fluorescenční mikroskop ZEISS Imager.Z1
- Vodní lázeň BM302
- Systém na zpracování sklíček Thermobrite TS 02
- Vyhřívaná ploténka Stuart Heat SD 160
- Mikroskop MEOPTA DN 816 BI

FISH sondy

K vyšetření byly použity následující komerčně vyráběné sondy (Obr. 18):

- Aquarius FAST FISH Prenatal kits – probe set 1
    - centromera X - Xp11.1q11.1 (DXZ1) – značená zeleným fluorochromem
    - centromera Y - Yp11.1q11.1 (DYZ3) – značená oranžovým fluorochromem
    - centromera 18 – 18p11.1q11.1 (D18Z1) – značená modrým fluorochromem

- Aquarius FAST FISH Prenatal kits – probe set 2
    - oblast chromozomu 13q14.2 - značená zeleným fluorochromem
    - oblast chromozomu 21q22.13 – značená oranžovým fluorochromem
- Aquarius Subtelomere Specific Probes
    - Subtelomerická oblast 2pter (D2S2983) – značená zeleným fluorochromem
    - Subtelomerická oblast 17qter (362K4) - značená červeným fluorochromem



Obrázek 18: Grafické znázornění značení jednotlivých FISH sond

Reagencie a chemikálie:

- 2x SSC (roztok chloridu sodného a citronanu sodného)
- 0,4x SSC
- DAPI (diamidifenylindol)
- Alkohol (80%, 96%, absolutní)

Další materiál:

- laboratorní plastik
- mikroskopické podložní sklíčko
- krycí sklíčko
- fixogum

2.2.3 Zpracování vzorků pro metodu FISH

Vlastní zpracování vyšetřovaných vzorků bylo provedeno dle standardního operačního postupu laboratoře IISOP_UBLG_17/2013 - Analýza chromozomových odchylek metodou FISH.

1) **Příprava preparátu z buněčné suspenze**
    - na namražené a vlhké podložní sklo kápneme 5–6 μl buněčné suspenze
    - necháme oschnout na plotýnce při 75–80 °C
    - zhodnotíme kvalitu (hustota, počet mitóz, kvalita jader a mitóz) preparátu v mikroskopu
2) **Aplikace sondy**
    - preparát ponoříme na 2 minuty do roztoku 2xSSC (při pokojové teplotě)
    - necháme oschnout
    - odvodníme vzestupnou řadou alkoholů
        - 80% alkohol – 2 minuty
        - 96% alkohol – 2 minuty
        - Absolutní alkohol – 2 minuty
    - na krycí sklo aplikujeme definované množství sondy, řídící se velikostí krycího sklíčka (sklo 15x15 mm – 2,9 μl sondy)
    - na krycí sklo přiložíme podložní sklo s připraveným preparátem buněčné suspenze
    - okraje krycího skla převrstvíme lepidlem
    - vložíme do přístroje pro hybridizaci (Thermobrite) a navlhčíme pásky udržující vlhkost
    - zvolíme program 4 - teplota denaturace: 75 °C doba: 4 min, teplota hybridizace: 37 °C doba: min 20 hod
3) **Odmytí**
    - sundáme lepidlo (nejlépe i se sklíčkem, pokud sklíčko zůstane, ponoříme do roztoku 2xSSC a jemně stáhneme)
    - oplácheme v roztoku 0,4 SSC při 72 °C po dobu 2 min
    - opláchenem roztokem 2xSSC při 22 °C po dobu 30 s
    - necháme oschnout

4) **Obarvení pozadí:**

- na krycí sklíčko aplikujeme dané množství DAPI
- přiklopíme podložním sklíčkem s buněčnou suspenzí
- lakem přelakujeme hrany sklíčka
- vzorky uchováváme ve tmě a v ledničce

5) **Odečet:**

- odečítáme pomocí fluorescenčního mikroskopu
- hodnotíme alespoň 10 mitóz a 30 jader (dle kvality preparátu)
- pomocí softwaru ISIS (MetaSystem) nasnímáme několik mitóz a jader
- obrázky upravíme pomocí softwaru ISIS (MetaSystem)

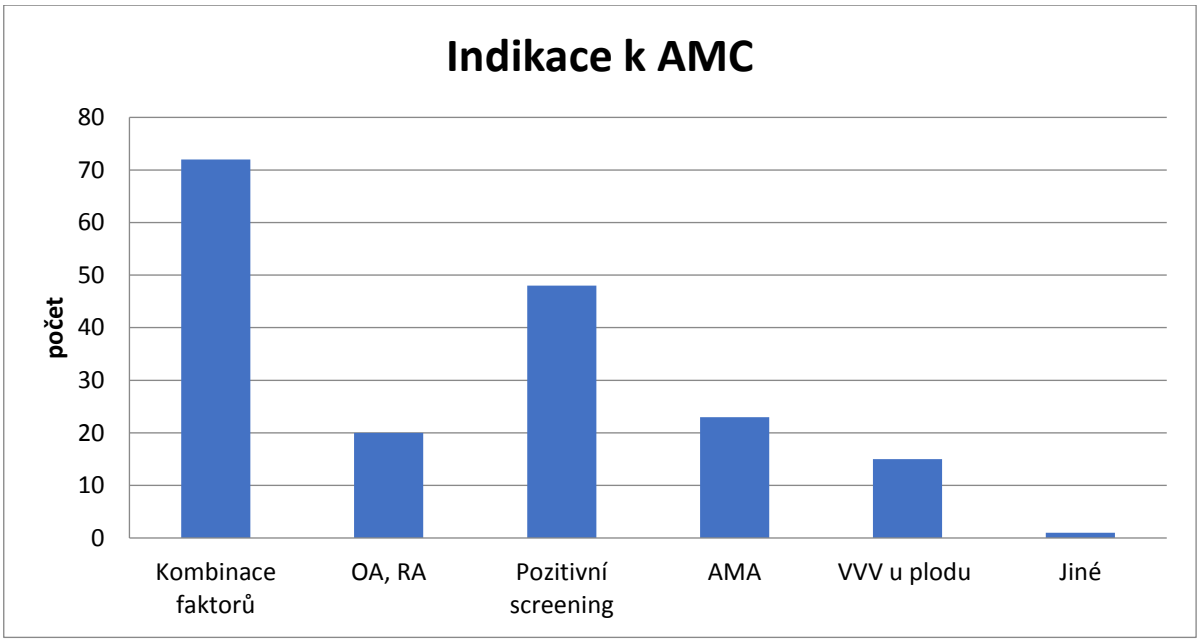
2.3 Výsledky

2.3.1 Důvody indikací

Z celkového počtu 179 indikací byla nejčastějším důvodem k AMC kombinace několika rizikových stavů a faktorů (40,2 %), jako například AMA + pozitivní screening, či AMA + pozitivní OA, RA). Druhou nejčastější skupinu tvořily indikace z důvodu pozitivního screeningu (26,8 %). Pozitivní osobní (OA) či rodinná (RA) anamnéza byla důvodem indikace v 11,2 % případů. Invazivní prenatální testování pouze z důvodu AMA bylo provedeno ve 23 případech (12,8 %). Skupina jiné zahrnovala rizikové zaměstnání matky. Početní a procentuální zastoupení jednotlivých indikací zobrazuje tabulka 4 a graf 1.

Tabulka 4: Důvody indikací

Indikace	Počet	%
AMA	23	12,8
Pozitivní screening	48	26,8
Pozitivní RA, OA	20	11,2
Kombinace rizik	72	40,2
VVV u plodu	15	8,4
Jiné	1	0,6



Graf 1: Indikace k AMC

2.3.2 Věk rodiček v době odběru

Za dané sledované období tvořilo nejvíce rodiček věkovou skupinu do 34,9 let v počtu 97/179. Zhruba 45 % souboru představovaly ženy ve věku > 34,9 let. Z této skupiny představovaly většinu ženy ve věku 35 – 39,9 let. V 15 případech se jednalo o ženy ve věku > 40 let. Průměrný věk rodiček za sledované období byl 33,4 let. Početní zastoupení a průměrný věk rodiček je uveden v tabulce (Tab. 5).

Tabulka 5: Věk rodiček v době odběru

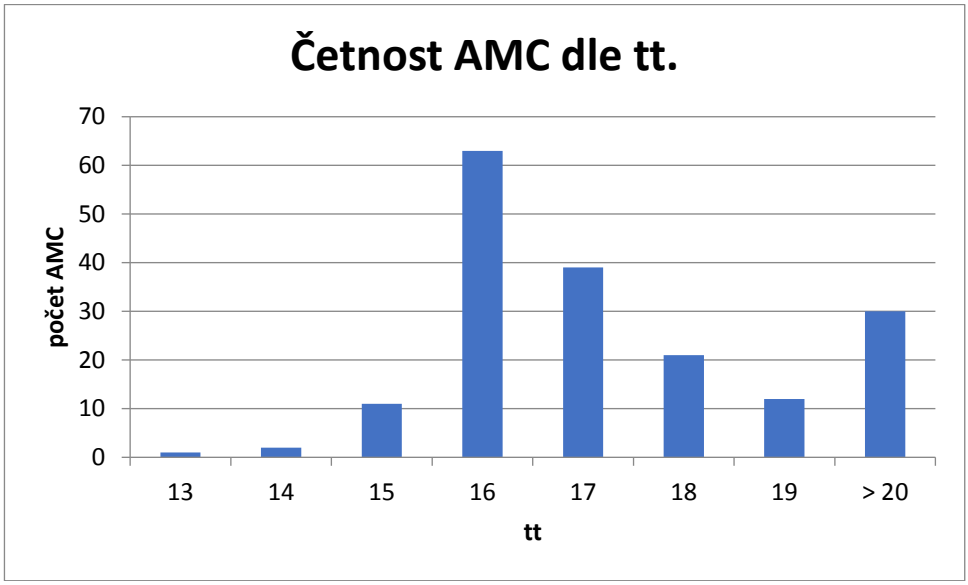
Věk rodičky	počet
do 34,9	98
35 – 39,9	66
nad 40	15
průměrný věk rodiček	33,42

2.3.3 Týden těhotenství v době odběru

Ve sledovaném období za rok 2019 a část roku 2020 (1. čtvrtletí) bylo provedeno celkem 179 amniocentéz. U 14 pacientek byla provedena tzv. časná aminocentéza, tj. před 16 tt. Nejvíce amniocentéz bylo provedeno v 16. tt. (63/177) a 17. tt. (39/177) (Graf 2.). Počty AMC v jednotlivých týdnech těhotenství shrnuje tabulka 6.

Tabulka 6: Počet provedených AMC v daných týdnech těhotenství

Týden těhotenství	počet AMC
13.	1
14.	2
15.	11
16.	63
17.	39
18.	21
19.	12
20.	5
21.	11
22.	7
23.	4
24.	1
26.	1
33.	1
Součet	**179**



Graf 2: Četnost aminocentéz dle tt.

2.3.4 Záchytnost chromozomových aberací

Chromozomová aberace byla prokázána u 9 těhotenství ze 179 (5,03 %). V pěti případech se jednalo o numerickou aberaci a u 4 nálezů se jednalo o strukturní aberaci. V rámci numerických aberací se jednalo o trizomii 21. chromozomu (3/5), trizomii 13. chromozomu (1/5) a trizomii 18. chromozomu (1/5). Ve skupině strukturních aberací byly

zastoupeny translokace a inverze (Tab. 7). Záchytnost chromozomových aberací v závislosti na věkové skupině je uvedena v tabulce 8.

Tabulka 7: Chromozomové aberace detekované ve vzorcích plodové vody

Pacientka	Výsledek karyotypu	Slovní popis
50/19	46,XX,t(2;10)(p24.2;p11.2)	Translokace mezi chromozomy 2 a 10
72/19	47,XX,+21	Trizomie chromozomu 21
97/19	46,XX,t(2;17)(q37.2;q21.2)	Translokace mezi chromozomy 2 a 17
133/19	47,XX,+21	Trizomie chromozomu 21
134/19	46,XY,inv(4)(p12q12)	Pericentrikcá inverze chromozomu 4
10/20	47,XX,+18	Trizomie chromozomu 18
12/20	46,XY,inv(7)(p21q33)	Pericentrická inverze chromozomu 7
27/20	47,XY,+21	Trizomie chromozomu 21
35/20	47,XX,+13	Trizomie chromozomu 13

Tabulka 8: Záchytnost chromozomových aberací v dané věkové skupině

Věk těhotných	Patologický karyotyp	Normální karyotyp	Celkem případů	Zastoupení patologií
Do 34,9	4	93	97	4,12 %
35-39,9	3	63	66	4,55 %
Nad 40	2	13	15	13,33 %

2.3.5 Ověření nálezů metodou FISH

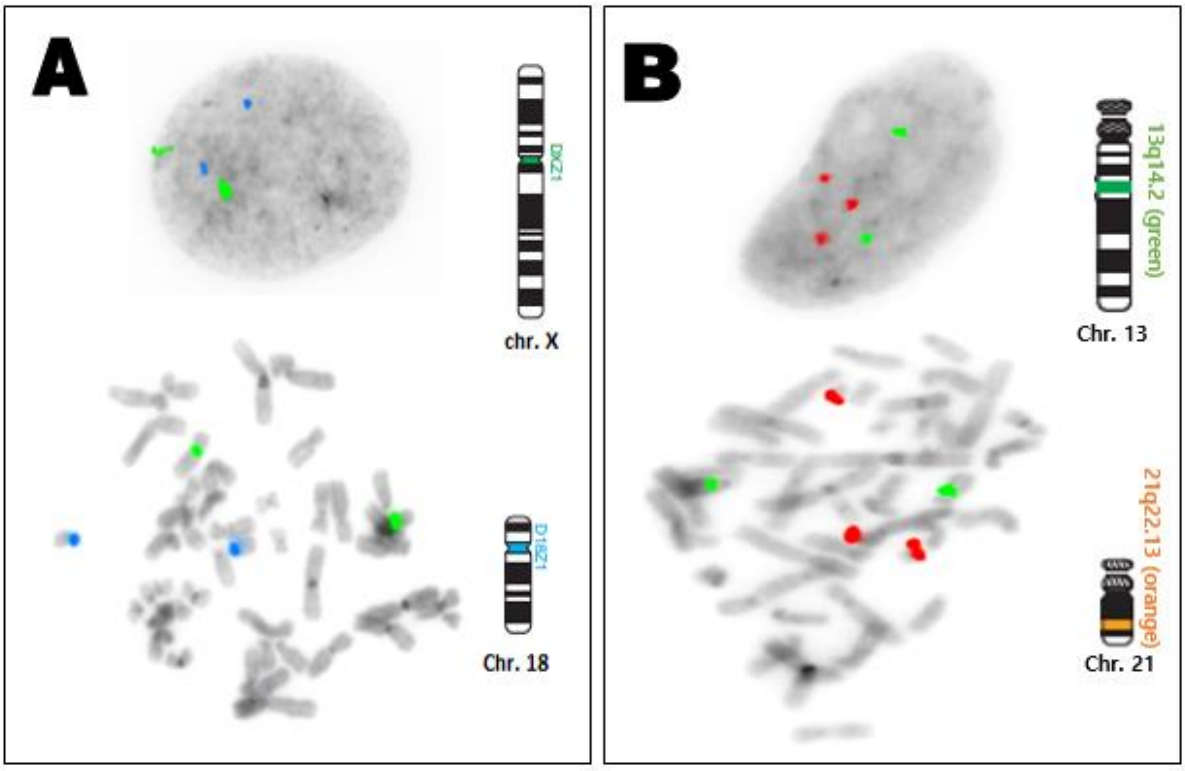
U vzorků s nálezem chromozomové aberace bylo provedeno ověření nálezu pomocí metody FISH. Před vlastním vyšetření vzorků plodové vody byla provedena kontrola funkčnosti použité sondy FAST FISH. K ověření byly použity dva vzorky plodové vody s karyotypem 46,XX a 46,XY. Sondy byly zhodnoceny jako funkční a vhodné k vyšetření.

Ověření bylo provedeno u 6 vzorků z 9 (Tab. 9). V jednom případě (vzorek 50/19) nebylo možné provést metodu FISH z důvodu nedostatku buněčné suspenze. U vzorků s inverzí - 134/19 a 12/20 nebyly k dispozici vhodné sondy pro ověření nálezu.

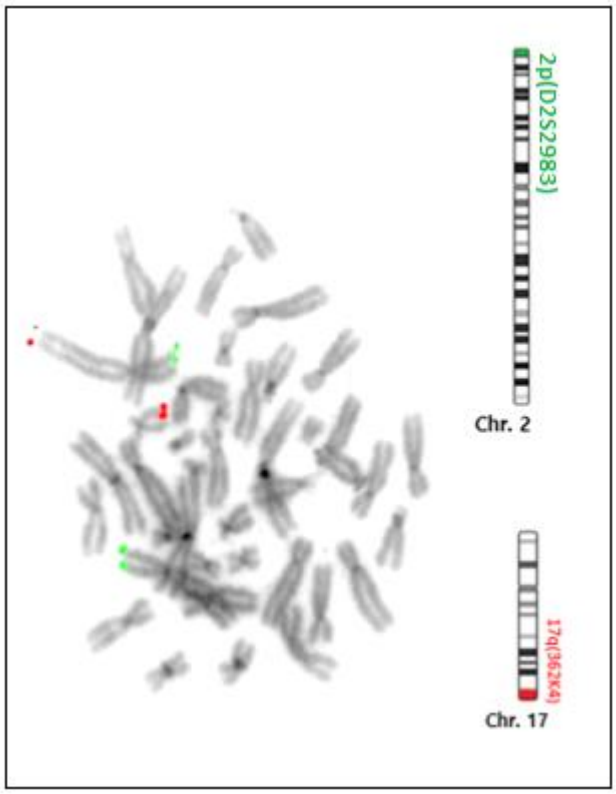
Tabulka 9: Ověření nálezů metodou FISH s metodou karyotypování

Vzorek	Výsledek karyotypu (ISCN zápis)	Výsledek FISH (ISCN zápis)	S/NE/ N
50/19	46,XX,t(2;10)(p24.2;p11.2)	Nelze	NE
72/19	47,XX,+21	nuc ish Xcen(DXZ1x2), Ycen(DYZ3x0), 18cen(D18Z1x2),13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x2), 21q22.13(DYRK1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x3) ish Xcen(DXZ1x2), Ycen(DYZ3x0),18cen(D18Z1x2), 13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x2),21q22.13(DYRK 1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x3) **(Obr. 20)**	S
97/19	46,XX,t(2;17)(q37.2;q21.2)	ish t(2;17)(D2S2983+,D2S2986-;D17S2199+, 362K4-). **(Obr. 21)**	S
133/19	47,XX,+21	nuc ish Xcen(DXZ1x2), Ycen(DYZ3x0), 18cen(D18Z1x2),13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x2), 21q22.13(DYRK1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x3) ish Xcen(DXZ1x2), Ycen(DYZ3x0),18cen(D18Z1x2), 13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x2),21q22.13(DYRK 1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x3) **(Obr. 22)**	S
134/19	46,XY,inv(4)(p12q12)	Nelze	NE
10/20	47,XX,+18	nuc ish Xcen(DXZ1x2), Ycen(DYZ3x0), 18cen(D18Z1x3),13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x2), 21q22.13(DYRK1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x2) ish Xcen(DXZ1x2), Ycen(DYZ3x0),18cen(D18Z1x3), 13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x2),21q22.13(DYRK 1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x2) **(Obr. 23)**	S
12/20	46,XY,inv(7)(p21q33)	Nelze	NE
27/20	47,XY,+21	nuc ish Xcen(DXZ1x1), Ycen(DYZ3x1), 18cen(D18Z1x2),13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x2), 21q22.13(DYRK1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x3) ish Xcen(DXZ1x1),Ycen(DYZ3x1),18cen(D18Z1x2) 13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x2),21q22.13(DYRK 1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x3) **(Obr. 24)**	S
35/20	47,XX,+13	nuc ish Xcen(DXZ1x2), Ycen(DYZ3x0), 18cen(D18Z1x2),13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x3), 21q22.13(DYRK1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x2) ish Xcen(DXZ1x1),Ycen(DYZ3x1),18cen(D18Z1x2, 13q14.2(ITM2B/RB1/RCBTB2x3),21q22.13(DYRK 1A/KCNJ6/DSCR4/DSCR8x2) **(Obr. 25)**	S

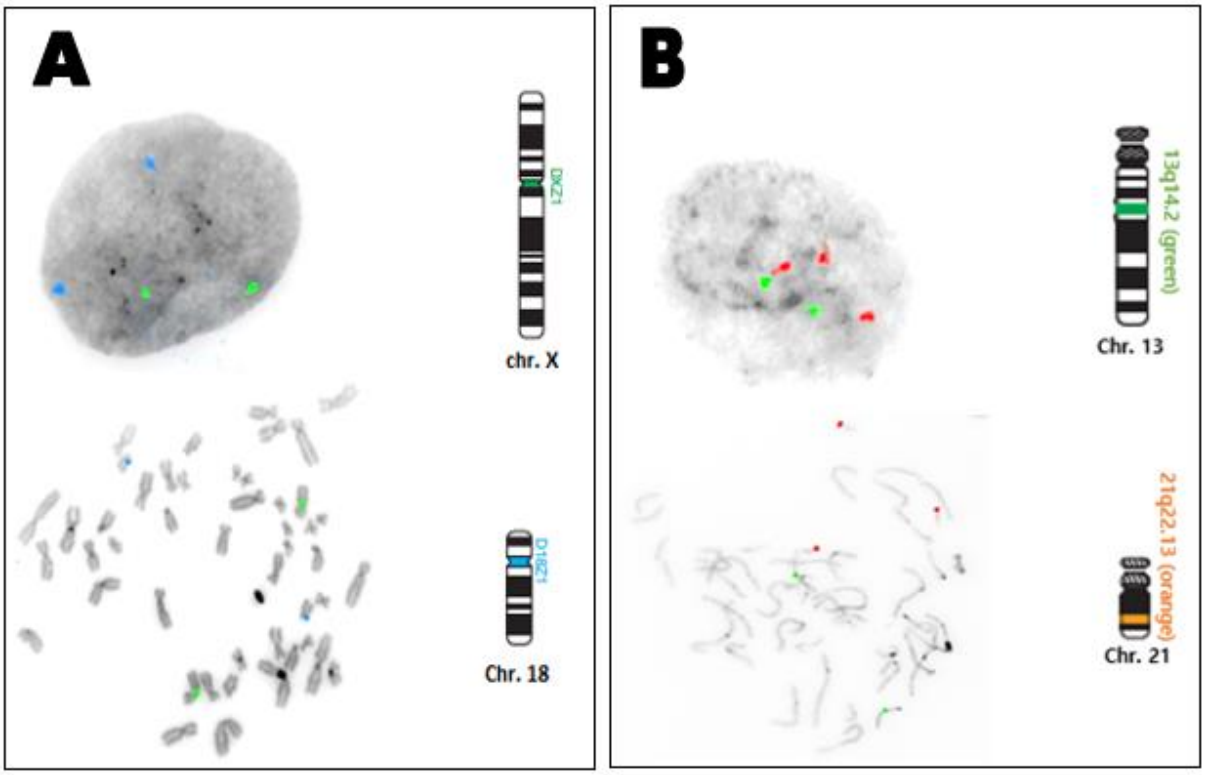
S- shoda, NE- nelze/neprovedeno,N-neshoda



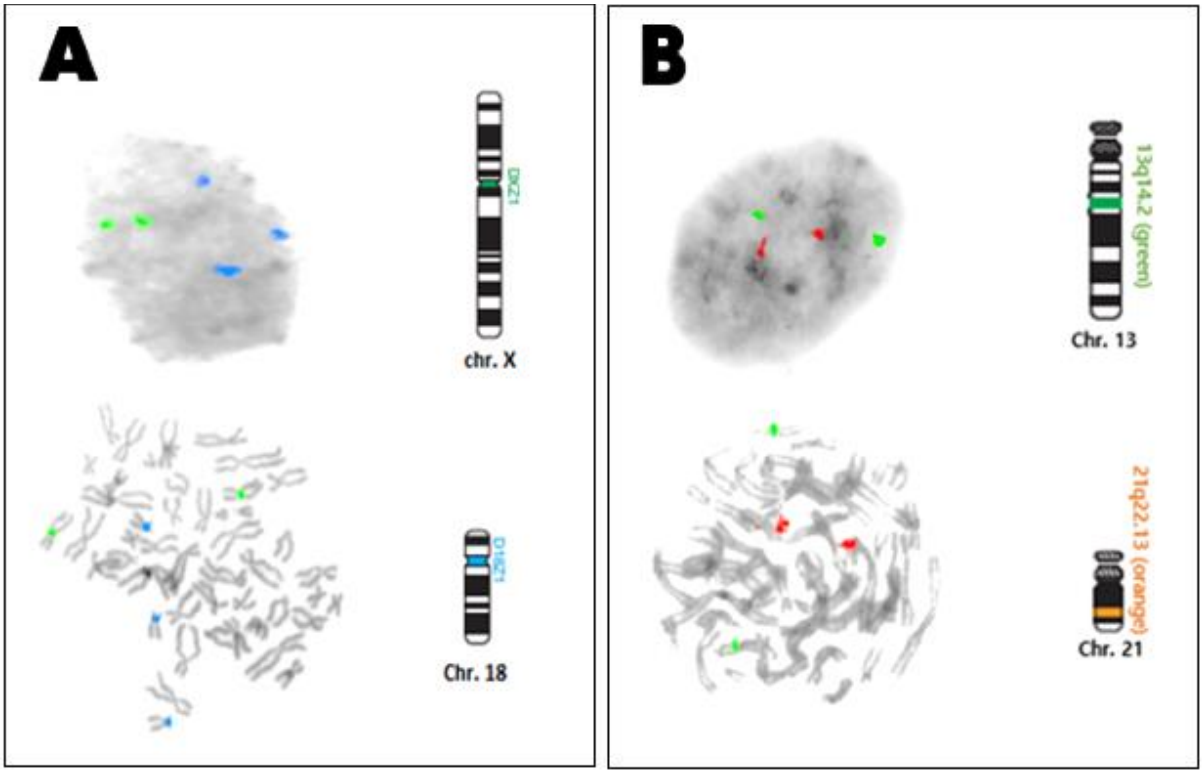
Obrázek 19: Výsledek metody FISH u vzorku 72/19 – trizomie chr. 21
A- jádro/mitóza – 2x zelený signál pro chrom. X, 2x modrý signál pro chrom. 18
B- jádro/mitóza – 2x zelený signál pro chrom. 13, 3x červený signál pro chrom. 21



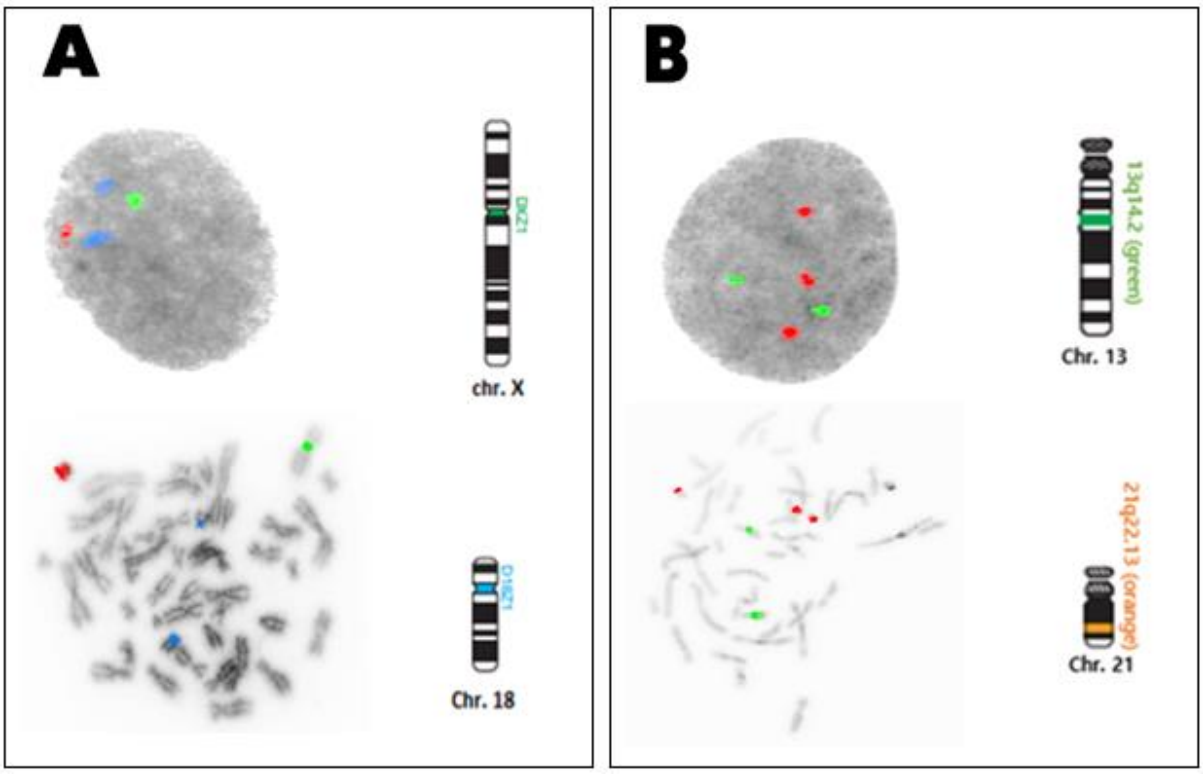
Obrázek 20: Výsledek metody FISH u vzorku 97/19 – translokace chr. 2,17
Mitóza – 2x zelený signál a 2x červený signál (druhý č. signál na chr. 2)



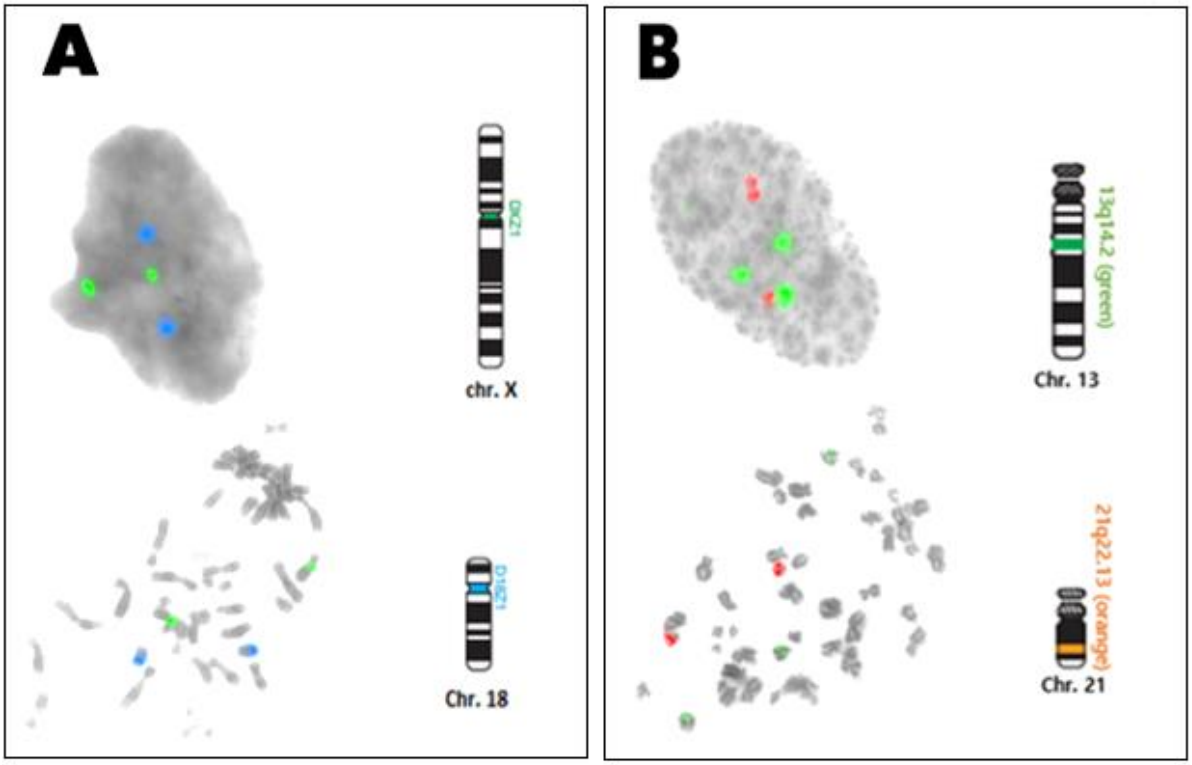
Obrázek 21: Výsledek metody FISH u vzorku 133/19 – trizomie chr. 21
A – jádro/mitóza – 2x zelený signál pro chrom. X, 2x modrý signál pro chrom. 18
B – jádro/mitóza – 2x zelený signál pro chrom 13, 3x červený signál pro chrom. 21



Obrázek 22: Výsledek metody FISH u vzorku 10/20 – trizomie chrom. 18
A – jádro/mitóza – 2x zelený signál pro chrom. X, 3x modrý signál pro chrom. 18
B – jádro/mitóza – 2x zelený signál pro chrom 13, 2x červený signál pro chrom. 21



Obrázek 23: Výsledek metody FISH u vzorku 27/20 – trizomie chrom. 21
A – jádro/mitóza – 1x zelený signál pro chrom. X, 1x červený signál pro chrom. Y, 2x modrý signál pro chrom. 18
B – jádro/mitóza – 2x zelený signál pro chrom. 13, 3x červený signál pro chrom. 21



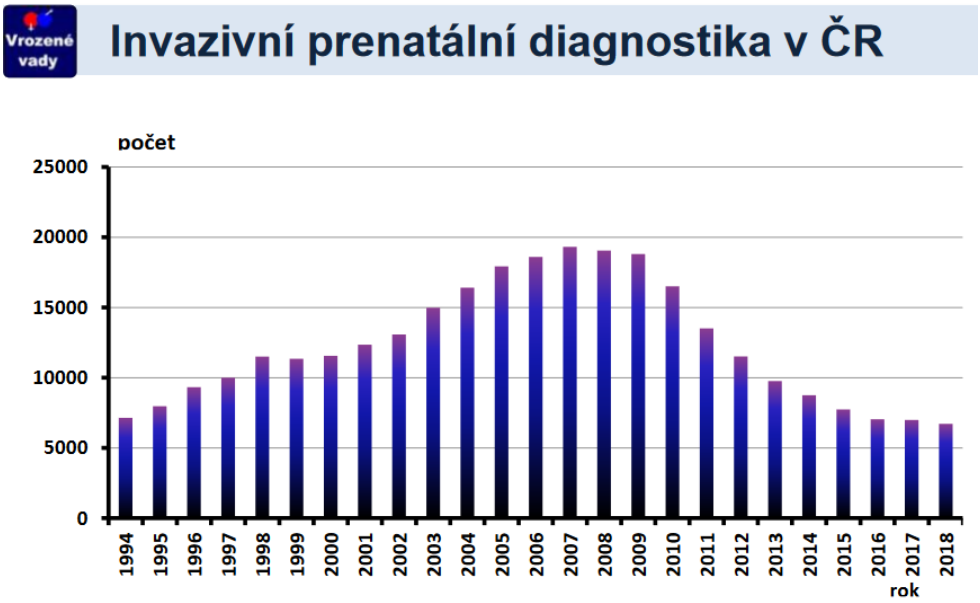
Obrázek 24: Výsledek metody FISH u vzorku 35/20 – trizomie chrom. 13
A – jádro/mitóza – 2x zelený signál pro chrom. X, 2x modrý signál pro chrom. 18
B – jádro/mitóza – 3x zelený signál pro chrom. 13, 2x červený signál pro chrom. 21

2.4 Závěr a diskuze

Prenatální diagnostika představuje významnou roli v gynekologicko-porodnické péči. V průběhu let se indikace k invazivnímu vyšetření měnila. Zatímco v roce 1992 byl nejčastější indikací k invazivní prenatální diagnostice pokročilý věk matky, v roce 2018 zaujal první pozici pozitivní screening (Gregor V. a kol., 2020). Mezi další časté indikace patří také pozitivní OA či RA pro geneticky podmíněná onemocnění. V tomto případě se častěji volí prekoncepční testování, založené na vyšetření páru, před vlastním početím. Výsledky prekoncepčních testů pak umožňují páru volit nejvhodnější postupy z hlediska eliminace případného geneticky podmíněného onemocnění. Většina států má jasně definovaná indikační kritéria, která splňují podmínky daného státu. Tato kritéria se ve většině případů shodují a zahrnují především pozitivní OA či RA, AMA či nález na UZ.

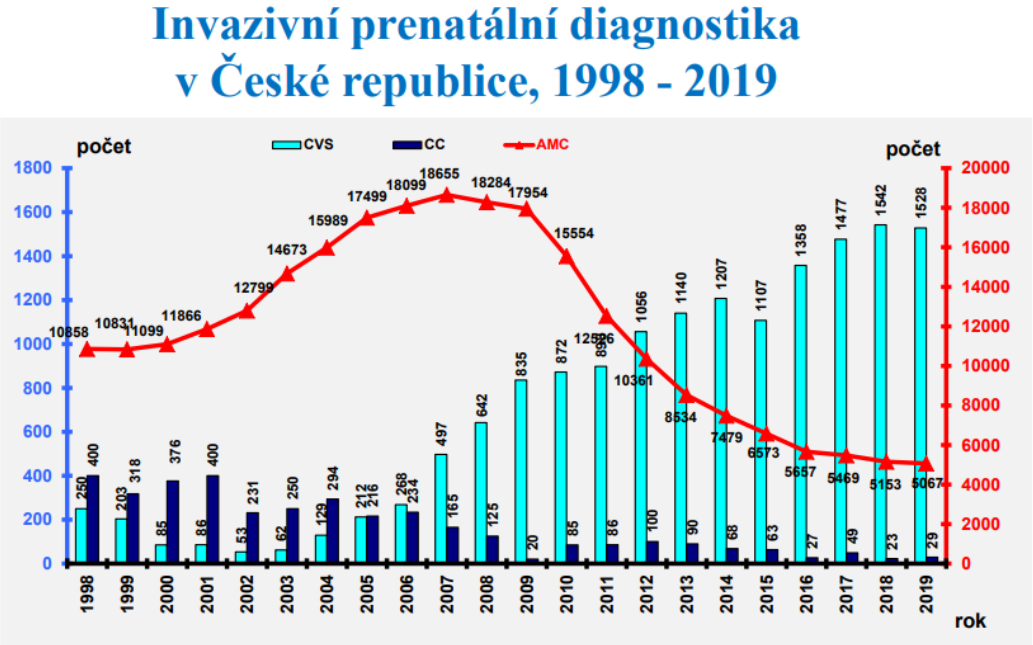
Screeningové testy během těhotenství patří mezi rutině prováděné metody nejen v ČR ale i v ostatních státech. V ČR jsou biochemické testy, jako součást prenatálního screeningu, nastavené jako nepovinné, ale doporučené. Obecně platí, že žena by měla během těhotenství podstoupit alespoň jeden trimestrální screening, s tím, že preferovaný je spíše test prvotrimestrální. Přičemž právě pozitivně hodnocený prvotrimestrální screening je jedním z indikačních kritérií pro invazivní prenatální testování (Boyd PA. Et al., 2008; EUROCAT 2010; Skirton H. et al., 2014; ČGPS ČLS JEP, 2019; EUROCAT 2010; Skirton H. et al., 2014). Prvotrimestriální screening je preferovanější. Umožňuje včasnou diagnózu VVV a v porovnání s druhotrimestrálním biochemickým screeningem vykazuje nížší míru falešné pozitivity (LEWIS C. et al., 2012; ČSKB ČLS JEP, 2018).

Dle statistik v České republice každoročně, od roku 2007, klesá počet provedených invazivních zákroků (Obr. 25). Zatímco roku 2007 bylo indikováno zhruba 20 000 zákroků, v roce 2019 počet klesl na zhruba 7500. Důvodem jsou stále více se rozvíjející moderní metody založené na přímé analýze volné DNA (cfDNA) přímo v krvi matky tzv. neinvazivní prenatální testování (NIPT) (Allyse M. et al., 2015).



Obrázek 25: Vývoj počtu invazivních metod prenatálního testování od roku 1994 do roku 2018 (http://www.vrozene-vady.cz/prezentace/pdf/Sekluv_vecer_2020.pdf)

Ve sledovaném období od ledna 2019 do března 2020 bylo provedeno ve FN Motol celkem 179 AMC. Nejčastěji byla indikována AMC v 16. a 17. tt. V těchto týdnech těhotenství jsou dostatečně odděleny plodové obaly (chorion a amnion), což je významné pro snížení rizikovosti výkonu (Smidt-Jensen S. et al., 1995). Některá pracoviště upřednostňují tzv. časnou AMC, tedy AMC provedenou před 16. tt. Ve sledovaném souboru byla časná amniocentéza provedena pouze ve 14 případech. Časná AMC bývá indikována nejčastěji s cílem brzkého získání výsledku, ev. v odůvodněných případech, jako je např., gravidita s vysokým rizikem vrozených poruch metabolismu (Čutka K. a kol., 2007). Časná AMC však s sebou nese dle studií vyšší riziko potratu a zároveň se prodlužuje doba nezbytná pro kultivaci, eventuálně kultivace selhává, s čímž souvisí nutnost opakování odběru (Simpson N. et al., 1976; The Canadian Early and Mid-Trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group, 1998; Delisle M. F., Wilson R. D., 1999). V současnosti se spíše nahrazuje odběrem choriových klků (Obr. 26)



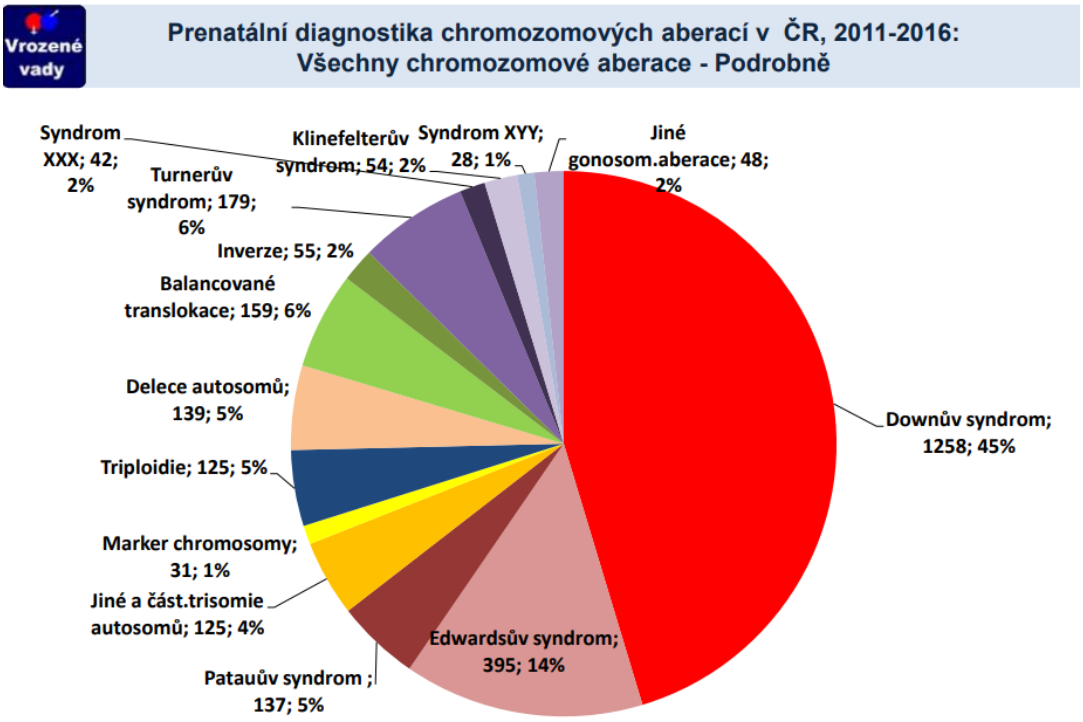
Obrázek 26: Počet provedených AMC, CVS a CC za sledované období 1998-2019 (Převzato z: http://www.vrozene-vady.cz/prezentace/pdf/Kapras_2020_Gregor.pdf, prezentace Prenatální diagnostika chromozomových aberací, Gregor V., Šípek A. Jr., Šípek A

AMC provedené po 20. tt. lze považovat z hlediska doby nutné pro získání výsledků a následných postupů, především umělého ukončení těhotenství (UUT), za pozdní. V ČR je možné provést UUT do 24.tt. Ve třech případech byla provedena AMC ve velmi pozdním tt. (24.tt, 26.tt. a 33 tt.) z důvodu pozdního záchytu VVV na UZ.

Významným trendem nejen v rámci ČR, ale i celosvětově je zvyšující se průměrný věk rodiček i prvorodiček. Roku 2001 činil průměrný věk matek 27,3 let a o 16 let později překročil 30 letou hranici (30,7 roku). Nejvyšší věk rodiček byl v hl. m. Praha, kde průměrný věk činil roku 2017 31,1 let. Ve sledovaném souboru tvořilo nejvíce rodiček věkovou skupinu do 34,9 let (celkem 97 žen). Druhou nejpočetnější skupinou byly ženy 35 – 39,9 let (66 žen). Průměrný věk rodiček v souboru byl nad věkovou hranicí 30 let (33,42 let), což přibližně koreluje se statistikami pro rok 2017, kdy průměrný věk pro celou ČR činil 31,1 rok.

Chromozomové aberace byly prokázány celkem u 9 těhotenství. U pěti plodů byla detekována numerická aberace ve smyslu trizomie. Ve 4 případech se jednalo o nález strukturní aberace typu translokace a inverze. Záchytnost aberací ve věkové skupině do 34,9 let a ve skupině 35-39,9 let se pohybovala okolo 4 %, zatímco ve věkové skupině žen nad 40 let byla chromozomová aberace detekována u dvou z 15 plodů (13,33 %). Toto pozorování dokazuje, že AMA je rizikovější pro výskyt chromozomových aberací.

Z devíti záchytů byl třikrát prokázán Downův syndrom, jednou Edwardsův syndrom a jednou Patauův syndrom. Jedná se o tři nejčastěji detekované chromozomové aberace v ČR. (Obr. 27)



Obrázek 27: Výskyt chromozomových aberací 2011–2016 (Převzato z: www.vrozene-vady.cz, Prezentace Historie, současnost i budoucnost prenatální diagnostiky vrozených vad v České republice, Šípek A. Jr., Gregor V., Šípek A.)

Metodou FISH bylo ověřeno celkem 6 vzorků z 9. U všech šesti vzorků bylo dosaženo shody s výsledkem metodou karyotypování. Karyotypování a FISH patří mezi rutinně používané cytogenetické a molekulárně cytogenetické metody, které se liší především v rozlišovací schopnosti. Zatím co metodou karayotypování je dosaženo rozlišovací schopnosti okolo 10 Mb, metoda FISH poskytuje vyšší rozlišení, a to v závislosti na typu použité sondy (Nussbaum R. L. et al., 2004). Významnou výhodou metody FISH je přesnější schopnost detekce mozaicizmu. Z hlediska časové náročnosti jsou obě metody srovnatelné. V případě potřeby rychlého výsledku je možné provést vyšetření buněk plodové vody bez nutnosti kultivace tzv. nativní FISH. V tomto případě odpadá nutnost několika denní až týdenní kultivace a výsledky jsou známy zhruba do 48 hodin po odběru PV. V případě vyšetření nativní plodové vody však hodnotíme pouze interfázní jádra, jelikož mitózy nejsou přítomny. Metoda je tedy vhodná pouze pro detekci numerických, nikoli nebalancovaných strukturních aberací.

V současné době je metoda FISH nahrazena molekulárně genetickou metodou QF-PCR (kvantitativní fluorescenční polymerázová řetězová reakce), která poskytuje rychlejší výsledky s dostatečnou mírou přesnosti. Metoda FISH tak zůstává spíše doplňkovou metodou, vhodnou pro upřesnění rozsahu mozaiky či strukturních aberací (především translokací).

Prenatální diagnostika je nedílnou součástí těhotenství. I když se v současné době počet indikací k invazivnímu prenatálnímu testování snižuje, především z důvodu rozvoje nových neinvazivních metod, stále představují důležitou roli v diagnostice chromozomových aberací. A ačkoli jsou v dnešní době metody klasické i molekulární cytogenetiky, stále více nahrazovány moderními molekulárními metodami, stále představují zlatý standard metod prenatálního testování.

Seznam literatury

ACAR, A., et al. 2007, "Evaluation of the results of cordocentesis." *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 46.4: 405-409

ADZICK, N. S., THOM, E. A., SPONG, C. Y., BROCK, J. W., 3RD, BURROWS, P. K., JOHNSON, M. P., HOWELL, L. J., FARRELL, J. A., DABROWIAK, M. E., SUTTON, L. N., GUPTA, N., TULIPAN, N. B., D'ALTON, M. E., FARMER, D. L., & MOMS Investigators, 2011, A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. The New England journal of medicine, 364(11), 993–1004. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1014379

AITKEN, D. A., WALLACE, E. M., CROSSLEY, J. A., SWANSTON, I. A., VAN PAREREN, Y., VAN MAARLE, M., GROOME, N. P., MACRI, J. N., & CONNOR, J. M., 1996 Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy. The New England journal of medicine, 334(19), 1231–1236. https://doi.org/10.1056/NEJM199605093341904

ALLYSE M., MINEAR M.A. et al., 2015, Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. International Journal of Women's Health, 7 113–126. http://dx.doi.org/10.2147/IJWH.S67124

ANTONARAKIS, S.E., PETERSEN, M.B., MCINNIS, M.G., ADELSBERGER, P.A., SCHINZEL, A.A., BINKERt, F., PANGALOS, C., RAOUL, O., SLAUGENHAUPT, S.A., & HAFEZ, M., 1992. The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *American journal of human genetics*, *50*(3), 544–550.

BARNETT M.I., FRIEDMAN D., KASTNER T., 1988, The prevalence of mitral valve prolapse in patients with Down syndrome: implications for dental management. Oral Surg Oral Med Oral Pathol; 66:445-7.

BASHORE, R. A., & WESTLAKE, J. R., 1977, Plasma unconjugated estriol values in high-risk pregnancy. American journal of obstetrics and gynecology, 128(4), 371–380. https://doi.org/10.1016/0002-9378(77)90555-5

BATY B.J., BLACKBURN B.L., CAREY J.C., 1994: Natural history of trisomy 18 and trisomy 13. I. Growth, physical assessment, medical histories, survival, and recurrence risk. Am J Med Genet, 49:175–188.

BAYANI, Jane a Jeremy A. SQUIRE, 2004. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). *Current Protocols in Cell Biology* [online]. **23**(1) [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1002/0471143030.cb2204s23. ISSN 1934-2500. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471143030.cb2204s23

BEISCHER, N. A., TOWNSEND, L., HOLSMAN, M., BROWN, J. B., & SMITH, M. A., 1968, Urinary estriol excretion in pregnancy anemias. American journal of obstetrics and gynecology, 102(6), 819–827. https://doi.org/10.1016/0002-9378(68)90509-7

BELL, JA., PEARN, JH., WILSON, BH., et al., 1987, Prenatal cytogenetic diagnosis – a current audit. A review of 2000 cases of prenatal cytogenetic diagnoses after amniocentesis, and comparisons with early experience. Med J Aust, 146, 1, p. 12-15.

BELOŠOVIČOVÁ H, CALDA P., 2012, Screening Downova syndromu v prvním, druhém nebo obou trimestrech. Actual Gyn. 4:14-21

BENTON, S. J., MCCOWAN, L. M., HEAZELL, A. E., GRYNSPAN, D., HUTCHEON, J. A., SENGER, C., BURKE, O., CHAN, Y., HARDING, J. E., YOCKELL-LELIÈVRE, J., HU, Y., CHAPPELL, L. C., GRIFFIN, M. J., SHENNAN, A. H., MAGEE, L. A., GRUSLIN, A., & VON DADELSZEN, P., 2016, Placental growth factor as a marker of fetal growth restriction caused by placental dysfunction. Placenta, 42, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.03.010

BIRDSALL, M., LEDGER, W., GROOME, N., ABDALLA, H., & MUTTUKRISHNA, S., 1997, Inhibin A and activin A in the first trimester of human pregnancy. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 82(5), 1557-1560.

BOVICELLI L., ORSINI L.F., GRANNUM P.A.T. et al., 1989, A new funipuncture technique: Two-needle ultrasound- and needle biopsy-guided procedure. Obstet Gynecol 73: 428.

BOYD PA, C DEVIGAN B KHOSHNOOD, M LOANE E GARNE a H DOLK, 2008. Survey of prenatal screening policies in Europe for structural malformations and chromosome anomalies, and their impact on detection and termination rates for neural tube defects and Down's syndrome. BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology [online]. 115(6), 689-696

BROCK, D.J. H., BOLTON, A.E., & MONAGHAN, J.M, 1973, Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum-alphafetoprotein measurement. The Lancet, 302(7835), 923-924.

BROCK, D.J., & SUTCLIFFE, R.G., 1972, Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. The Lancet, 300(7770), 197-199.

BUGGE M., COLLINS A., PETERSEN M.B., FISHER J., BRANDT C., HERTZ J.M., TRANEBJAERG L., DELOZIER-BLANCHET C., NICOLAIDES P., BRONDUM-NIELSEN K., MORTON N., MIKKELSEN M., 1998, Non-disjunction of chromosome 18. Hum Mol Genet, 7:661–669.

CALDERONE J.P., CHESS J., BORODIC G., ALBERT D.M., 1983, Intraocular pathology of trisomy 18 (Edwards syndrome): report of a case and review of the literature. Br J Ophthalmol, 67:162–169.

CAMPBELL S., 1969, The prediction of fetal maturity by ultrasonic measurement of the biparietal diameter. The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth, 76(7), 603–609. https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.1969.tb06146.x

CAMPBELL, Stuart, et al. Anencephaly: early ultrasonic diagnosis and active management. The Lancet, 1972, 300.7789: 1226-1227.

CANICK, J. A., KNIGHT, G. J., PALOMAK1, G. E., HADDOW, J. E., CUCKLE, H. S., & WALD, N. J., 1988, Low second trimester maternal serum unconjugated oestriol in pregnancies with Down's syndrome. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 95(4), 330-333.

CAREY J.C., 2010, Trisomy 18 and trisomy 13 syndromes. In Management of genetic syndromes. 3rd edition. Edited by Cassidy SB, Allanson JE. New York: John Wiley & Sons; 2010:807–823.

CEREDA, Anna a John C CAREY, 2012. The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. **7**(1) [cit. 2020-05-31]. DOI: 10.1186/1750-1172-7-81. ISSN 1750-1172. Dostupné z: http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-7-81

CICERO, S., CURCIO, P., REMBOUSKOS, G., SONEK, J., & NICOLAIDES, K. H., 2004, Maxillary length at 11-14 weeks of gestation in fetuses with trisomy 21. Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 24(1), 19–22. https://doi.org/10.1002/uog.1077

CLARK, D. E., SMITH, S. K., LICENCE, D., EVANS, A. L., & CHARNOCK-JONES, D. S., 1998, Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. The Journal of endocrinology, 159(3), 459–467. https://doi.org/10.1677/joe.0.1590459

COCCHI, GUIDO, et al., 2010, "International trends of Down syndrome 1993–2004: births in relation to maternal age and terminations of pregnancies." Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology 88.6 474-479.

COLE L.A., 2012, The hCG assay or pregnancy test. Clinical chemistry and laboratory medicine, 50(4), 617–630. https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.808

COLLINS, S.L., & IMPEY, L., 2012, Prenatal diagnosis: types and techniques. *Early human development*, *88*(1), 3-8.

COMINGS D.E., 1978, Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. Ann. Rev. Genet. 12: 25–46.

Committee on Practice Bulletins—Obstetrics, Committee on Genetics, and the Society for Maternal-Fetal Medicine (2016). Practice Bulletin No. 163: Screening for Fetal Aneuploidy. Obstetrics and gynecology, 127(5), e123–e137. https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000001406

CUCKLE, H., WALD, N., & LINDENBAUM, R., 1984, Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome. The Lancet, 323(8383), 926-929.

Český statistický úřad, 2019, online: 25.3.2020, převzato z: https://www.czso.cz/csu/czso/1-obyvatelstvo-rodiny-domacnostiČGPS, ČLS JEP, 2019. Zásady dispenzární péče v těhotenství. Doporučené postupy ČGPS ČLS JEP [online]. ČGPS a Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 17.1.2019 [cit. 2020-07-16]. Dostupné z: http://www.gynultrazvuk.cz/data/clanky/6/dokumenty/2019-01-zasady-dispenzarni-pece-v-tehotenstvi-dp-cgps-cls-jep-revize.pdf

ČUTKA K., ČUTKA D., ŠUSTROVÁ M.., 2007, Amniocentéza – bezpečná metoda invazivní prenatální diagnostiky. Praktická gynekologie, č.l, s.23-25, ISSN 1801-8750.

DAFFOS F., CAPELLA-PAVLOVKSY M., FORESTIER F., 1985, Fetal blood sampling during pregnancy with use of a needle guided by ultrasound: A study of 606 consecutive cases. Am J Obstet Gynecol 153: 655.

DALY IE, KIRKE PN, MOLLOY A et al., 1995, Folate levels and neural tube defects. Implications for Prevention. JAMA 274: 1698-1702.

DAVID, M., MERKSAMER, R., ISRAEL, N., & DAR, H.,1996, Unconjugated estriol as maternal serum marker for the detection of Down syndrome pregnancies. Fetal diagnosis and therapy, 11(2), 99-105.

DAVID, M., N. ISRAEL, R. MERKSAMER, N. BAR-NIZAN, Z. BOROCHOWITZ, H. BAR-EL, I. YEHUDAI, AND H. DAR., 1995, "Very low maternal serum unconjugated estriol and prenatal diagnosis of steroid sulfatase deficiency." Fetal diagnosis and therapy 10, no. 2 76-80.

DE GRAAF, I. M., TIJMSTRA, T., BLEKER, O. P., & VAN LITH, J. M., 2002, Womens' preference in Down syndrome screening. Prenatal diagnosis, 22(7), 624–629. https://doi.org/10.1002/pd.358

DELISLE, M.F., & WILSON, R.D., 1999, First trimester prenatal diagnosis: amniocentesis. In *Seminars in perinatology* (Vol. 23, No. 5, pp. 414-423). WB Saunders.

DOLEŽAL, L. (Ed), 1998, Základy sonografie v porodnictví a gynekologii. Univerzita Palackého v Olomouci.

Doporučení o laboratorním screeningu vrozených vývojových vad v prvním a druhém trimestru těhotenství [online], 2018. Česká společnost klinické biochemie [cit. 2020-07-16]. Dostupné z: https://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/2018/doporuceni-7-5-2018-vidiSLG.pdf

Doporučený postup genetického diagnostického prenatálního vyšetření, 2019. Společnost lékařské genetiky a genomiky [online]. Praha: Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 11.12.2019 [cit. 2020-06-26]. Dostupné z: https://slg.cz/doporuceni/prenatalni-diagnostika/prenatalni-vysetreni/

DRUGAN, A., JOHNSON, M. P., ISADA, N. B., HOLZGREVE, W., ZADOR, I. E., DOMBROWSKI, M. P., SOKOL, R. J., HALLAK, M., & EVANS, M. I., 1992, The smaller than expected first-trimester fetus is at increased risk for chromosome anomalies. American journal of obstetrics and gynecology, 167(6), 1525–1528. https://doi.org/10.1016/0002-9378(92)91732-p

DUGOFF L, NORTON ME, KULLER JA., .2016, Society for Maternal-Fetal Medicine (SMFM), The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. Am J Obstet Gynecol;215(4):B2-9

DUGOFF, L., HOBBINS, J. C., MALONE, F. D., PORTER, T. F., LUTHY, D., COMSTOCK, C. H., HANKINS, G., BERKOWITZ, R. L., MERKATZ, I., CRAIGO, S. D., TIMOR-TRITSCH, I. E., CARR, S. R., WOLFE, H. M., VIDAVER, J., & D'ALTON, M. E., 2004, First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (the FASTER Trial). American journal of obstetrics and gynecology, 191(4), 1446–1451. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.06.052

EDWARDS J.H., HARNDEN D.G., CAMERON A.H., CROSSE V.M., WOLFF O.H., 1960, A new trisomic syndrome. Lancet, 1:787–789.

EMBLETON, N. D., WYLLIE, J. P., WRIGHT, M. J., BURN, J., & HUNTER, S. (1996). Natural history of trisomy 18. Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition, 75(1), F38–F41. https://doi.org/10.1136/fn.75.1.f38

EUROCAT, EUROCAT Special Report: Prenatal Screening Policies in Europe 2010", EUROCAT Central Registry, University of Ulster, 2010, 34 s., dostupné z WWW: [http://www.eurocat-network.eu/content/Special-Report-Prenatal-Screening-Policies.pdf]

FAIOLA S, TSOI E, HUGGON IC, ALLAN LD, NICOLAIDES KH., 2005, Likelihood ratio for trisomy 21 in fetuses with tricuspid regurgitation at the 11 to 13 + 6-week scan. Ultrasound Obstet Gynecol. 26(1):22-27. doi:10.1002/uog.1922

FEDORENKO, B.,S. DRUZHININ, L. YUDAEVA, et al., 2001. Cytogenetic studies of blood lymphocytes from cosmonauts after long-term space flights on MIR station. *Advances in Space Research* [online]. **27**(2), 355-359 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/S0273-1177(01)00011-4. ISSN 02731177. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273117701000114

FERGUSON-SMITH, M. A., & YATES, J. R., 1984, Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses. Prenatal diagnosis, 4 Spec No, 5–44. https://doi.org/10.1002/pd.1970040704

FONG, KATHERINE W. et al., 2004, "Detection of fetal structural abnormalities with US during early pregnancy." Radiographics 24.1 157-174.

FORD, C.E. a J.L. HAMERTON, 1956. The Chromosomes of Man. *Nature* [online]. **178**(4541), 1020-1023 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1038/1781020a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: http://www.nature.com/articles/1781020a0

GANEZER Alma, 2019, web: https://www.flandershealth.us/cytogenetics/qbanding-quinacrine-banding.html

GHI, T., et al., 2016, "ISUOG Practice Guidelines: invasive procedures for prenatal diagnosis." *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 48.2 (2016): 256-268.

GITLIN D, PERRICELLI A, GITLIN GM., 1972, Synthesis of -fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus. Cancer Res. 32(5):979-982.

GOODMAN R., GORTIN R., 1983, The malformed infant and child: an illustrated guide. New York: Oxford University; p. 122-3.

GREGOR V., 2001, Teratogenní rizika v graviditě, Praktická gynekolog ie, 3/2001 s.37-40

GREGOR V., ŠÍPEK A. JR., ŠÍPEK A., 2020, www.vrozene-vady.cz, prezentace Prenatální diagnostika chromozomových aberací ČR,

GREGOR V., ŠÍPEK A., ŠÍPEK, A. jr., HORÁČEK, J., LANGHAMMER P., PETRŽÍLKOVÁ L., CALDA P., 2009, Prenatální diagnostika chromozomálních aberací v České republice: 1994- 2007. Česká Gynekologie, č. 74(1), s. 44-54

HÁJEK, Zdeněk, 2004. Rizikové a patologické těhotenství. Vyd. 1. české. Praha: Grada. ISBN 80-247-0418-8.

HÁJEK, Zdeněk, Evžen ČECH a Karel MARŠÁL, 2014. Porodnictví. 3., zcela přepr. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4529-9.

HOGGE W.A. Et al., 1985,: Prenatal diagnosis by chorionic villus sampling: Lessons of the first 600 cases. Prenatal Diagnosis 5:393

HOLMQUIST, Gerald P., 1989. Evolution of chromosome bands: Molecular ecology of noncoding DNA. Journal of Molecular Evolution [online]. 28(6), 469-486 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1007/BF02602928. ISSN 0022-2844. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/BF02602928

CHADA, M., LISÁ, L., & PRŮSA, R., 2002, Inhibin v těhotenství--nový screeningový marker v prenatální diagnostice? [Inhibin in pregnancy--a new screening marker for prenatal diagnosis?]. Ceska gynekologie, 67(2), 93–96.

CHEVREAU, J. et al., 2020, Risk factors for failed chorionic villus sampling: results of a 4-year retrospective study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 1-6.

IOANNIDES, ADONIS S., 2017, "Preconception and prenatal genetic counselling." Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 42 2-10

ISHIKIRIYAMA, S., & NIIKAWA, N., 1984, *Origin of extra chromosome in Patau syndrome. Human Genetics, 68(3), 266–268*.doi:10.1007/bf00418400

JADDOE VW, VERBURG BO, DE RIDDER MA, HOFMAN A, MACKENBACH JP, MOLL HA, et al., 2007, Maternal smoking and fetal growth characteristics in different periods of pregnancy: The generation R study. Am J Epidemiol. 165:1207–1215. 10.1093/aje/kwm014

JAVIER, 2010, Modern genetics, převzato z: https://moderngeneticsjavier.blogspot.com

KINOSHITA M., NAKAMURA Y., NAKANO R., FUKUDA S., 1989, Thirty-one autopsy cases of trisomy 18: clinical features and pathological findings. Pediatr Pathol 9:445–457.

KISERUD, T., EIK-NES, S. H., BLAAS, H. G., HELLEVIK, L. R., & SIMENSEN, B., 1994, Ductus venosus blood velocity and the umbilical circulation in the seriously growth-retarded fetus. Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 4(2), 109–114. https://doi.org/10.1046/j.1469-0705.1994.04020109.x

KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ, 2006. Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1069-8.

KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ, 2010. Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1880-7.

KOREN, GIDEON, ANNE PASTUSZAK, AND SHINYA ITO., 1998, "Drugs in pregnancy." New England Journal of Medicine 338.16 1128-1137.

KORENBERG J.R., PULST S.M., GERWEHR S., 1992, Advancesin the under- standing of chromosome 21 and Down syndrome.In: Lott I, McCoy E, editors. Down syndrome:advancesin medical care. New York: Wiley-Liss p. 3-12.

KUDELA, Milan, 2008. Základy gynekologie a porodnictví pro posluchače lékařské fakulty. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-2441-975-6.

KUDELA, Milan. Základy gynekologie a porodnictví. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 1996. ISBN 80-7067-603-5.

KUPKE K.G., MÜLLER U., 1989, Parental origin of the extra chromosome in trisomy 18. *Am J Hum Genet* 45(4):599-605.

LAPTHORN, A.J., HARRIS, D.C., LITTLEJOHN, A., LUSTBADER, J.W., CANFIELD, R.E., MACHIN, K.J., MORGAN, F.J., & ISAACS, N.W., 1994, Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature, 369(6480), 455–461. https://doi.org/10.1038/369455a0

LEWIS C., HILL M., SKIRTON H., CHITTY L. S., 2012, Non-invasive prenatal diagnosis for fetal sex determination: benefits and disadvantages from the service users' perspective. Eur J Hum Genet 20: 1127–1133.

LIEHR, Thomas, ed., 2009. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1007/978-3-540-70581-9. ISBN 978-3-540-70580-2.

LOSTCHUCK, E., A. POULTON, J. HALLIDAY a L. HUI, 2019. Population-based trends in invasive prenatal diagnosis for ultrasound-based indications: two decades of change from 1994 to 2016. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology [online]. 53(4), 503-511 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1002/uog.19107. ISSN 0960-7692. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/uog.19107

LÖWY, Ilana, 2014. Prenatal diagnosis: The irresistible rise of the 'visible fetus'. Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences [online]. 47, 290-299 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1016/j.shpsc.2013.12.003. ISSN 13698486. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369848613001775

MACNAUGHTON, M. C., 1967, Hormone excretion as a measurement of fetal growth and development. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 97(7), 998-1019.

MAIZ, N.,C. VALENCIA, K.O. KAGAN, D. WRIGHT a K.H. NICOLAIDES, 2009a. Ductus venosus Doppler in screening for trisomies 21, 18 and 13 and Turner syndrome at 11 – 13 weeks of gestation. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. 33(5), 512-517. ISSN 0960-7692.

MAKRYDIMAS, G., SOTIRIADIS, A., SAVVIDOU, M. D., SPENCER, K., & NICOLAIDES, K. H., 2008, Physiological distribution of placental growth factor and soluble Flt-1 in early pregnancy. Prenatal diagnosis, 28(3), 175–179. https://doi.org/10.1002/pd.1916

MARTINS, A. T., FRANCISCO, C., CORREIA, H., & COHEN, Á., 2020, Chorionic villus sampling: 10 years of experience in a University referral center. Journal of gynecology obstetrics and human reproduction, 49(5), 101715. https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101715

MCCLANE, Stephanie. Pregnancy Health [online]. 27.12. 2015 [cit. 23.1.2020]. Dostupný na WWW: https://www.pregnancyhealth.net/amniocentesis-test/

MICHALOVÁ, Kyra, 1999. *Úvod do lidské cytogenetiky*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-281-7.

MILUNSKY A, ULCICKAS M, ROTHMAN KJ et al., 1992, Maternal Heat Exposure and Neural Tube defects, JAMA 12-885

MrMatze, 2007, převzato z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:FISH_(Fluorescent_In_Situ_Hybridization).jpg

MUJEZINOVIC, F., & ALFIREVIC, Z., 2007, Procedure-related complications of amniocentesis and chorionic villous sampling: a systematic review. *Obstetrics & Gynecology*, *110*(3), 687-694.

MUNTAU A.C., 2009. Pediatrie, překlad 4., zcela přepracovaného a aktualizovaného vydání. Grada, Praha. 37 - 39. ISBN 978-80-247-2525-3

NADLER, Henry L., 1969. Prenatal detection of genetic defects. The Journal of Pediatrics [online]. 74(1), 132-143 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1016/S0022-3476(69)80023-5. ISSN 00223476. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347669800235

NIEDERSTRASSER, S.L., et al., 2017, Fetal loss following invasive prenatal testing: a comparison of transabdominal chorionic villus sampling, transcervical chorionic villus sampling and amniocentesis. *Journal of perinatal medicine*, *45*(2), 193-198.

NICH, 1976, National Registry for Amniocentesis Study Group Mid-trimester Amniocentesis for Prenatal Diagnosis; Safety and Accuracy. *Journal of American Medical Assosiation, 236*, 1471-1477.

NIIKAWA, N., KAJII, T., 1984, The origin of mosaic Down syndrome: four cases with chromosome markers. Am. J. Hum. Genet. 36, 23 – 130

NISULA, B. C., BLITHE, D. L., AKAR, A., LEFORT, G., & WEHMANN, R. E., 1989, Metabolic fate of human choriogonadotropin. Journal of steroid biochemistry, 33(4B), 733–737. https://doi.org/10.1016/0022-4731(89)90485-8

NUSSBAUM, Robert L., Roderick R. MCINNES a Huntington F. WILLARD, c2004. *Klinická genetika*. 6. vyd. Praha: Triton. ISBN 80-725-4475-6.

P. LEMOINE, H. HAROUSSEAU, J.P. BORTEYRU, J.C., 1968, MenuetLes enfants des parents alcoholiques: anomolies observees a propos de 127 cas (The children of alcoholic parents: anomalies observed in 127 cases)

PAPANTONIOU N.E., DASKALAKIS G.J., TZIOTIS J.G., KITMIRIDES S.J., MESOGITIS J.S., ANTSAKLIS A.J., 2001, Risk factors predisposing to fetal loss following a second trimester amniocentesis. Brit J Obstet Gynaecol 108:1053–6.

PATAU K, SMITH D.W., THERMAN E., INHORN S.L., WAGNER H.P., 1960, Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. Lancet. 1(7128):790-3.

PENSO C.A., FRIGOLETTO F.D., 1990: Early amniocentesis. Sem Perinatoi 14:465-470.

PÉREZ-CASTILLO, A., ABRISQUETA, J.A., 1978, Patau's syndrome and 13q21q translocation. *Hum Genet* **42,** 327–331. https://doi.org/10.1007/BF00291315

PEROOS S., FORSYTHE E., PUGH J.H., ARTHUR-FARRAJ P., HODES D., 2012, Longevity and Patau syndrome: what determines survival? BMJ Case Rep.

PESHWA, Madhusudan V., Yun-Seung KYUNG, Don B. MCCLURE a Wei-Shou HU, 1993. Cultivation of mammalian cells as aggregates in bioreactors: Effect of calcium concentration of spatial distribution of viability. Biotechnology and Bioengineering [online]. 41(2), 179-187 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1002/bit.260410203. ISSN 0006-3592. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260410203

PETERSON, Carol A. a Daryl E. ENSTONE, 1996. Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots. Physiologia Plantarum [online]. 97(3), 592-598 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00520.x. ISSN 0031-9317. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00520.x

PETRY P., POLLI J.B., MATTOS V.F., ROSA R.C., ZEN P.R., GRAZIADIO C., PASKULIN G.A., ROSA R.F., 2013, Clinical features and prognosis of a sample of patients with trisomy 13 (Patau syndrome) from Brazil. Am. J. Med. Genet. A. 1278-83.

PIVOŇKOVÁ, 2013, web: https://www.priznaky-projevy.cz/images/priznaky-projevy/edwardsuv-syndrom-trisomie-18-priznaky-projevy-symptomy-3.jpg

PRABHU N, SMITH N, CAMPBELL D, CRAIG LC, SEATON A, HELMS PJ, et al., 2010, First trimester maternal tobacco smoking habits and fetal growth. Thorax. 65:235–240. 10.1136/thx.2009.123232

PUESCHEL S.M., 1981, A historical viewpoint: Down syndromegrowing andlearning.Pueschel SM, editor.Canning,Murphy,Zaumer. Andrews and McMeel, Inc. Kansas City: Down Syndrome, (Humanpotentialsfor children series). p. 37-9.

Quest Medical, 25, pp. 476-482

RAFFE A.E., GRAY J.A., 2009, "How Screening Started." From Screening: Evidence and Practice. Oxford: Oxford University Press; pp.1-29.

RASMUSSEN S.A., WONG L., YANG Q., MAY K., FRIEDMAN J.M., 2003, Population-based analyses of mortality in trisomy 13 and trisomy 18. Pediatrics 111:777–784.

RIIS P., FUCHS F., 1960, Antenatal determination of foetal sex in the prevention of hereditary diseases. Lancet 2:180-182, 1960

RODMAN TC, FLEHINGER BJ, ROHLF FJ., 1980, Metaphase chromosome associations: Colcemid distorts the pattern. Cytogenet Cell Genet. 27(2-3):98-110. doi:10.1159/000131471

RØNNE, Imogens, 1989. Chromosome Preparation and High Resolution Banding Techniques. A Review. *Journal of Dairy Science* [online]. **72**(5), 1363-1377 [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79243-2. ISSN 00220302. Dostupné z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030289792432

ROONEY, D.E. and CZEPULKOWSKI, B.H. (eds.), 1992, Human Cytogenetics: A Practical Approach, Volume I: Constitutional Analysis. IRL/Oxford University Press, New York.

ROWE, TIMOTHY., 2015, "Drugs in Pregnancy." 489-492.

ROZTOČIL A., a kol., 2007, Moderní porodnictví 2., ISBN:978-80-271-9757-6

ROZTOČIL, Aleš, 1998. Vyšetřovací metody v gynekologii a porodnictví. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-255-8.

SAHITYA RAYU R., 2018, „Ultrasound guided invasice prenatal diagnostic techniques simplified, ISBN 978-93-5270-233-6¨

SANTIAGO J., 2010, Modern genetics, převzato z: https://moderngeneticsjavier.blogspot.com

SELIKOWITZ, Mark, 2005. Downův syndrom: definice a příčiny, vývoj dítěte, výchova a vzdělávání, dospělost. Praha: Portál. Rádci pro zdraví. ISBN 80-7178-973-9.

SEPULVEDA W., WONG A.E., DEZEREGA V., 2010, First-trimester sonographic findings in trisomy 18: a review of 53 cases. Prenat Diagn 30:256–259.

SCHREK R., 1945, Studies in Vitro on the Physiology of Cells: Histologic Reactions of Living Tissues to Hypotonic Solutions. *The American journal of pathology*, *21*(6), 1101–1119.

SCHWARZACHER Trude and HESLOP-HARRISON Pat, 2000), Practical in situ hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford

SCHWARZACHER, H.G., U. WOLF a E. PASSARGE, ed., 1974. *Methods in Human Cytogenetics* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg [cit. 2020-05-03]. DOI: 10.1007/978-3-642-65787-0. ISBN 978-3-642-65789-4.

SIMPSON, N.E., DALLAIRE, L., MILLER, J.R., SIMINOVICH, L., HAMERTON, J.L., MILLER, J., & MCKEEN, C., 1976, Prenatal diagnosis of genetic disease in Canada: report of a collaborative study. *Canadian Medical Association Journal*, *115*(8), 739.

SKIRTON H., GOLDSMITH L., JACKSON L. et al., 2014, Offering prenatal diagnostic tests: European guidelines for clinical practice. Eur J Hum Genet 22, 580–586. https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.205

SMIDT-JENSEN, Steen a Karin SUNDBERG, 1995. Early amniocentesis. Current Opinion in Obstetrics and Gynecology [online]. 7(2), 117-121 [cit. 2020-07-01]. DOI: 10.1097/00001703-199504000-00007. ISSN 1040-872X. Dostupné z: http://journals.lww.com/00001703-199504000-00007

SMITH, G. C., STENHOUSE, E. J., CROSSLEY, J. A., AITKEN, D. A., CAMERON, A. D., & CONNOR, J. M., 2002, Early pregnancy levels of pregnancy-associated plasma protein a and the risk of intrauterine growth restriction, premature birth, preeclampsia, and stillbirth. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 87(4), 1762–1767. https://doi.org/10.1210/jcem.87.4.8430

SNIJDERS, R. J., NOBLE, P., SEBIRE, N., SOUKA, A., & NICOLAIDES, K. H., 1998, UK multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nuchal-translucency thickness at 10-14 weeks of gestation. Fetal Medicine Foundation First Trimester Screening Group. Lancet (London, England), 352(9125), 343–346. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)11280-6

SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS, RELICHOVÁ, Jiřina, ed., 2009. *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4852-2.

SPENCER K, COWANS NJ, NICOLAIDES KH., 2008, Low levels of maternal serum PAPP-A in the first trimester and the risk of pre-eclampsia. Prenat Diagn. 28(1):7-10. doi:10.1002/pd.1890

SPENCER, K., AITKEN, D. A., CROSSLEY, J. A., MCCAW, G., BERRY, E., ANDERSON, R., ... & MACRI, J. N., 1994, First trimester biochemical screening for trisomy 21: the role of free beta hCG, alpha fetoprotein and pregnancy associated plasma protein A. Annals of clinical biochemistry, 31(5), 447-454.

SPRINGETT A., WELLESLEY D., GREENLEES R., LOANE M., ADDOR M.C., ARRIOLA L., BERGMAN J., CAVERO-CARBONELL C., CSAKY-SZUNYOGH M., DRAPER E. S., GARNE E., GATT M., HAEUSLER M., KHOSHNOOD B., KLUNGSOYR K., LYNCH C., DIAS C.M., MCDONNELL R., NELEN V., O'MAHONY M., PIERINI A., QUEISSER-LUFT A., RANKIN J., RISSMANN A., ROUNDING C., STOIANOVA S., TUCKERZ D., ZYMAK-ZAKUTNIA N., MORRIS J. K., 2015, Congenital anomalies associated with trisomy 18 or trisomy 13: A registry-based study in 16 European countries, 2000-2011. Am. J. Med. Genet. A. 167A(12):3062-9.

STAPLES A.J., ROBERTSON E.F., RANIERI E., RYALL R.G., HAAN E.A., 1991, A maternal serum screen for trisomy 18: an extension of maternal serum screening for down syndrome. Am J Hum Genet 49:1025–1033.

STARK A., DENTISTRY, 1982, Down syndrome advances in biomedicine and behavioral sciences. In: Rynders JE. editor. Cambridge, MA: 1982. p. 198-203.

STEELE M.W., BERG W.R., 1966, Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. Lancet 1:383-385

SUMNER A. T., 1990, Chromosome banding. London: Unwin Hyman.

ŠÍPEK A. Jr., GREGOR V., ŠÍPEK A., 2020, Prezentace Historie, současnost i budoucnost prenatální diagnostiky vrozených vad v České republice, Převzato z: www.vrozene-vady.cz

ŠÍPEK, A. a V. GREGOR, 2009. Vrozené vady v České republice v období1994 – 2008: prenatální a postnatální incidence. Aktuální gynekologie a porodnictví [online]. (1), 16-20. [cit. 12. 4. 2013]. ISSN 1803-9588. Dostupné z http://www.actualgyn.com/pdf/cz_2009_6.pdf

ŠTEMBERA, Z. Historie české perinatologie. Praha: Maxdorf, 2004. 403 s. ISBN 80-7345-021-6.

TABOR, A., ALFIREVIC, Z., 2010, Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal diagnosis and therapy*, *27*(1), 1-7.

TABOR, A., MADSEN, M., OBEL, E., PHILIP, J., BANG, J., & GAARD-PEDERSEN, B., 1986, Randomised controlled trial of genetic amniocentesis in 4606 low-risk women. *The Lancet*, *327*(8493), 1287-1293.

THAN, NANDOR GABOR, AND ZOLTAN PAPP., 2017, "Ethical issues in genetic counseling." Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 43 32-49..

The Canadian Early and Mid-Trimester Amniocentesis Trial (CEMAT) Group: Randomised trial to assess safety and fetal outcome of early and midtrimester amniocentesis. Lancet 351:242-247, 1998

THEODORA, M., ANTSAKLIS, A., BLANAS, K., ANTSAKLIS, P., DASKALAKIS, G., SINDOS, M., ... & PAPANTONIOU, N., 2015, Risk for fetal loss and prematurity after 12,413 second trimester amniocenteses in a single center. *Journal of perinatal medicine*, *43*(3), 347-351.

TONGSON T., et al., 2001, "Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation." *American journal of obstetrics and gynecology* 184.4: 719-723.

TOWNER, D., CURRIER, R.J., LOREY, F.W., CUNNINGHAM, G.C., & GREVE, L.C, 2007, Miscarriage risk from amniocentesis performed for abnormal maternal serum screening. *American journal of obstetrics and gynecology*, *196*(6), 608-e1.

TRELOAR, A. E., BEHN, B. G., & COWAN, D. W., 1967, Analysis of gestational interval. American journal of obstetrics and gynecology, 99(1), 34–45. https://doi.org/10.1016/s0002-9378(16)34488-x

VALENTI C., 1973, Antenatal detection of hemoglobinopathies. Am J Obstet Gynecol 115: 851

VAN PRAAGH S., TRUMEN T., FIRPO A., BANO-ROGRIGA A., FREID R., MCMANUS B., ENGLE M.A., VAN PRAAGH R., 1989, Cardiac malformations in trisomy-18: a study of 41 postmortem cases. J Am Coll Cardiol 13:1586–1597.

VAVŘINKOVÁ B, BINDER T., 2000, Vliv abúzu kokainu v průběhu těhotenství na plod a novorozence, Praktická gynekologie 2: 16-17.

VOLPE JJ., 1993, Effect of cocaine use on the fetus, new England Journal of Medicine 1993; 3 27.

Vrozené vady u narozených [online]. Praha 2: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2007, 27 [cit. 2020-06-12]. Dostupné z: https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/vrozvnar2007.pdf

WALD N.J., RODEC C., HACKSHAW A.K., WALTERS J., CHITTY L., MACKINSON A.M., 2003, First and second trimestrer antenatal screening for Down's syndrom: the result of the Serum, Urine and Ultrasound Screening Study (SURRUS). J Med Screen 10(2):56-104

WALD, N., STONE, R., CUCKLE, H. S., GRUDZINSKAS, J. G., BARKAI, G., BRAMBATI, B., ... & FUHRMANN, W., 1992, First trimester concentrations of pregnancy associated plasma protein A and placental protein 14 in Down's syndrome. BMJ: British Medical Journal, 305(6844), 28.

WALD, N.J. and A.K. HACKSHAW, 1997, Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for Down's syndrome. Prenat Diagn, 17(9): p. 821-9

WAPNER, R.J., 1997, Chorionic villus sampling. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, *24*(1), 83-110.

WEBER W.W., 1967, Survival and the sex ratio in trisomy 17-18. Am J Hum Genet 19:369–377.

WILKINS I, MEZROW G, LYNCH L et al., 1989, Amniotic and life-threatening respiratory distress after percutaneous umbilical blood sampling. Am J Obstet Gynecol 160: 427

WILLIAMS J. et al., 1987, Maternal cell contamination in cultured chorionic villi: Comparison of chromosome Q-polymorphisms derived from villi, fetal skin, and maternal lymphocytes. Prenatal Diagnosis 7315

WILSON M.D., 1994, Special considerations for patients with Down syndrome. ODA J 184:24--5.

WRIGHT, D., BRADBURY, I., BENN, P., CUCKLE, H., RITCHIE, K., 2004, Contingent screening for Down syndrome is an efficient alternative to non-disclosure sequential screening. Prenatal

WYLLIE J.P., WRIGHT M.J., BURN J., HUNTER S., 1994, Natural history of trisomy 13. Arch. Dis. Child 71(4):343-5.

YACHNIN S., 1978, The clinical significance of human alpha-fetoprotein. Ann Clin Lab Sci. 8(2):84-90.

YAMANAKA M., SETOYAMA T., IGARASHI Y., KUROSAWA K., ITANI Y., HASHIMOTO S., SAITOH K., TAKEI M., HIRABUKI T., 2006, Pregnancy outcome of fetuses with trisomy 18 identified by prenatal sonography and chromosomal analysis in a perinatal center. Am J Med Genet 140:1177–1182.

ZIMA, Tomáš, 2007. Laboratorní diagnostika. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-372-3.

ŽIŽKA, Jan, 1994. *Diagnostika syndromů a malformací*. Praha: Galén. ISBN 80-85824-04-3.