

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Oldřiška Hofmannová

Porodní hmotnost u novorozenců s orofaciálními rozštěpy
Birth weight of newborns with orofacial clefts

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Mgr. Mária Hovořáková, Ph.D.
Konzultant práce: doc. MUDr. Miroslav Peterka, DSc.

Praha 2015

Prohlášení:

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

V Praze

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Márii Hovořákové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady v průběhu celého zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře zvláště pak doc. MUDr. Miroslavu Peterkovi DSc. a Mgr. Petře Herlové za pomoc nejen s experimentální částí práce. V neposlední řadě také děkuji primáři novorozeneckého oddělení Fakultní nemocnice v Motole MUDr. Miloši Černému za poskytnutí velké části kontrolního souboru a všem, kteří mi ochotně pomáhali s rozšířením dotazníků. Velký dík patří mé rodině a příteli za jejich podporu a optimismus, který mi dodávali během psaní této práce i celého studia.

Abstrakt

Orofaciální rozštěpy patří mezi časté vrozené vývojové vady. K jejich vzniku přispívá kombinace genetických faktorů a faktorů vnějšího prostředí. Vývojové vady patří společně s retardací růstu mezi projevy embryotoxicity. Tato práce je zaměřena na potencionální vztah mezi porodní hmotností a orofaciálními rozštěpy českých novorozenců. Jsou zde zahrnuty nesyndromatické rozštěpy rtu, rtu a patra, izolované rozštěpy patra a pacienti s Pierre-Robinovou sekvencí reprezentující syndromatickou formu rozštěpu.

Vyhodnocení vztahu mezi porodní hmotností a orofaciálními rozštěpy bylo provedeno na základě statistické analýzy. Rozdíly byly testovány jednak u dětí s jednotlivými typy orofaciálních rozštěpů mezi sebou, a jednak u rozštěpových pacientů v porovnání se zdravou kontrolou.

Statistickou analýzou rozptylu bylo zjištěno, že na porodní hmotnost u novorozenců s orofaciálními rozštěpy nemá vliv typ rozštěpu ani závažnost rozštěpu (jednostranný/oboustranný). Novorozenci s nesyndromatickými rozštěpy měli oproti zdravým kontrolám signifikantně sníženou hmotnost. Ve srovnání s těmito výsledky se pacienti s Pierre-Robinovou sekvencí (syndromatická forma rozštěpu) v porodní hmotnosti od zdravých dětí signifikantně nelišili.

Pro ověření výsledku, že u pacientů s nesyndromatickými orofaciálními rozštěpy je porodní hmotnost ve srovnání s kontrolou snížena, byly provedeny dva experimenty na kuřecím modelu, u kterých byl indukován rozštěp zobáku pomocí hydrokortizonu. Rozdíly v hmotnosti zárodků s indukovaným rozštěpem zobáku byly vyhodnoceny oproti kontrole bez rozštěpu. V obou experimentech měla kuřecí embrya s rozštěpem zobáku menší hmotnost než kuřata bez rozštěpu (o 162 mg, resp. 300 mg), výsledky experimentů tedy potvrdily závěry studie pacientů s orofaciálními rozštěpy.

Závěrem lze říci, že pacienti s nesyndromatickou formou orofaciálního rozštěpu vykazují signifikantní snížení porodní hmotnosti poukazující na závažnost a komplexitu působení faktoru vyvolávajícího tuto vývojovou vadu pro intrauterinní vývoj jedince.

Klíčová slova: orofaciální rozštěp, Pierre-Robin sekvence, porodní hmotnost, intraamniální aplikace, kuřecí model, hydrocortison

Abstract

Orofacial clefts are frequent congenital anomalies. A combination of genetic and environmental factors contributes to their formation. Orofacial clefts together with growth retardation belong among the indicators of embryo toxicity. This thesis is focused on the potential relationship between birth weight and orofacial clefts of newborns born in Czech Republic. The non-syndromic cleft lip, cleft lip and palate, isolated cleft palate and patients with Pierre-Robin sequence are discussed here.

Evaluation of the relationship between the birth weight and orofacial clefts was performed on the base of statistical analysis. The differences were tested in children with different types of orofacial clefts and in cleft patients compared to healthy control.

Statistical analysis of variance demonstrated that the type and severity of the cleft (unilateral/ bilateral) does not affect birth weight of newborns with orofacial clefts. Newborns with non-syndromic clefts had reduced birth weight in comparison to healthy controls. Cleft patients with Pierre-Robin sequence (syndromic form of cleft) did not differ in birth weight from healthy children.

To verify the results obtained in patients with orofacial clefts that the birth weight is lower in these patients compared to control, two experiments on a chicken model were performed, where the cleft of beak was induced using hydrocortisone. The differences of the body-weight of specimens with induced cleft of beak were evaluated in comparison to controls without cleft. In both experiments chicken embryos with a cleft beak had lower body-weight than chicken embryos without a cleft (162 mg or 300 mg less, respectively), and so the experimental results confirmed previous outcomes.

In conclusion it can be stated that the patients with non-syndromic form of orofacial cleft show a significant decrease in the birth weight showing the seriousness and complexity of the factor effect causing this malformation for the intrauterine development.

Key words: orofacial cleft, Pierre-Robin sequence, birth weight, intra-amnial application, chicken model, hydrocortisone

Obsah

1. Úvod	9
2. Embryonální vývoj orofaciální oblasti	11
2.1 Vývoj obličeje	11
2.2 Vývoj primárního a sekundárního patra.....	12
3. Orofaciální rozštěpy	13
3.1 Vznik orofaciálních rozštěpů	13
3.2 Klasifikace orofaciálních rozštěpů.....	15
3.3 Epidemiologie	15
3.4 Genetika	16
3.4.1 Heritabilita (dědivost).....	17
3.4.2 Syndromy spojené s orofaciálními rozštěpy.....	17
3.4.3 Kandidátní geny.....	18
3.5 Vnější prostředí	22
4. Fyziologický novorozenec	27
5. Porodní hmotnost	28
6. Rizika spojená s orofaciálními rozštěpy	30
6.1 Porodní parametry a růstové odchylky od zdravé populace	31
7. Kuře jako model	36
8. Cíle diplomové práce	37
9. Materiál	38
9.1 Sběr dat pro analýzu pacientů s orofaciálními rozštěpy	38
9.1.1 Skupina pacientů s orofaciálními rozštěpy	38
9.1.2 Kontrolní skupina zdravých novorozenců.....	38
9.2 Kuřata použítá v experimentální části.....	38
10. Metody	40
10.1 Dotazníkové šetření.....	40
10.1.1 Tvorba dotazníku	40
10.1.2 Forma šíření dotazníku	41
10.2 Experiment na kuřecím modelu	41
10.2.1 Násadová vejce	41
10.2.2 Inkubace.....	41

10.2.3	Otevírání vajec - vytvoření okének	42
10.2.4	Intraamniální aplikace	43
10.2.5	Odběr zárodků	45
10.3	Statistické zpracování dat.....	46
10.3.1	Shapiro-Wilkův test normality dat	46
10.3.2	Fisherův F-test	47
10.3.3	Dvouvýběrový nepárový t-test	47
10.3.4	Analýza rozptylu.....	48
10.3.5	Regresní analýza.....	50
10.4	Grafické diagnostiky	51
11.	Výsledky	52
11.1	Analýza pacientů s orofaciálními rozštěpy	52
11.1.1	Základní statistická analýza dat.....	52
11.1.2	Analýza rozdílů středních hodnot pro pohlaví u pacientů s rozštěpy.....	56
11.1.3	Sekulární trend.....	58
11.2	Kontrolní skupina zdravých dětí.....	59
11.2.1	Základní statistická a grafická analýza dat pro skupinu zdravých dětí.	60
11.2.2	Analýza rozdílů středních hodnot pro pohlaví u kontrolní skupiny	62
11.3	Rozdíly mezi skupinami pacientů s jednotlivými typy rozštěpů	63
11.3.1	Analýza rozdílů středních hodnot chlapců s rozštěpy a kontrolní skupiny	63
11.3.2	Analýza rozdílů středních hodnot dívek s rozštěpy a kontrolní skupiny.....	67
11.3.3	Porodní hmotnosti u jednostranných a oboustranných typů CL a CLP	70
11.4	Pacienti s Pierre-Robinovou sekvencí.....	72
11.4.1	Analýza rozdílů středních hodnot pro pohlaví	73
11.4.2	Porovnání porodní hmotnosti dětí s Pierre-Robinovou sekvencí s kontrolou	74
11.5	Experimentální ověření výsledků zjištěných u novorozenců na kuřecím modelu... 76	
11.5.1	Experiment 1 - statistická analýza	80
11.5.2	Experiment 2 - statistická analýza	84
11.6	Shrnutí výsledků	87
11.7	Diskuze.....	89
12.	Závěr.....	94
13.	Literatura.....	96
14.	Přílohy	110

Seznam zkratek

AP-2 α	activating enhancer binding protein 2 alpha
BMI	body mass index
Bmp	kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)
Bmpr	bone morphogenetic protein receptor
CL	rozštěp rtu
CL/P	rozštěp rtu a/nebo patra
CLP	rozštěp rtu a patra
CLPED1	syndrom ektodermální dysplázie s CL/P (Cleft lip/palate-ectodermal dysplasia syndrome)
CP	izolovaný rozštěp patra
CPX	X-vázaný rozštěp patra
ED	embryonální den
FGF	fibroblastový růstový faktor
FGFR	receptor fibroblastového růstového faktoru
FNP	frontonazální výběžek
IGF1	inzulinový růstový faktor 1
IRF6	interferon regulační faktor 6
LGA	velký vzhledem ke gestačnímu věku (large for gestational age)
MSX1	msh homeobox 1
OR	podíl šancí (Odds ratio)
P	percentil
PVRL	poliovirus receptor like
SGA	malý vzhledem ke gestačnímu věku (small for gestational age)
SHH	sonic hedgehog
TBX	T-box transcription factor
TGFA (TGF α)	transformující růstový faktor alfa
TGF β	transformující růstový faktor beta
VCFS	velokardiofaciální syndrom

1. ÚVOD

Orofaciální rozštěpy patří mezi časté a život ztěžující vrozené vývojové vady s celosvětovou prevalencí. V České republice je incidence po několik let stabilní, 1 na 530 živě narozených dětí (Peterka et al., 2000).

Na vzniku orofaciálních rozštěpů se podílí genetické pozadí jedince i vnější faktory, přičemž svou roli ve vzniku rozštěpů má převážně interakce mezi oběma faktory. Tyto faktory a interakce mezi nimi nemusí ve vývoji člověka ovlivňovat vznik pouze orofaciálních rozštěpů, ale mohou vyústit i v další projevy.

Rozštěpy rozlišujeme obecně na syndromatické (spojené se syndromy a tedy s dalšími vadami) a nesyndromatické. Protože není etiologie vzniku nesyndromatických rozštěpů doposud zcela známa, je možné, že pacienti s nesyndromatickými rozštěpy mohou vykazovat i jiné odlišnosti od zdravé populace, například v podobě porodních parametrů. Odchylky v porodní hmotnosti, pozitivní i negativní, mohou být samy o sobě příčinou celé řady komplikací. Intrauterinní růstová retardace a vrozená vývojová vada (zde v podobě orofaciálního rozštěpu) jsou také možným projevem tzv. embryotoxicity, mezi jejíž projevy patří i letalita. Embryotoxicita tedy tyto dva zkoumané parametry také spojuje.

Údaje o pacientech s nesyndromatickými a syndromatickými rozštěpy jsou nejčastěji analyzovány z hlediska postnatálního růstu v souvislosti s hmotnostními přírůstky (Zarate et al., 2010; Ize-Iyamu and Saheeb, 2011). Méně pozornosti je však věnováno tomu, jestli děti s orofaciálními rozštěpy, nemají odlišnou hmotnost od zdravé populace již v době porodu.

Tato diplomová práce je zaměřena na zjištění možné interakce mezi různými typy orofaciálních rozštěpů a porodní hmotnosti, a také na zjištění případného rozdílu v porodní hmotnosti novorozenců s orofaciálními rozštěpy a zdravých novorozenců. V práci jsou zahrnuti pacienti s nesyndromatickým rozštěpem rtu, rtu a patra a izolovaným rozštěpem patra. Rozštěpy rtu a rozštěpy rtu a patra jsou brány jako odlišné entity a jsou hodnoceny zvlášť. Vzhledem k odlišné etiologii vzniku rozštěpové vady je odděleně pohlíženo i na pacienty s Pierre-Robinovou sekvencí a tedy se syndromatickou formou orofaciálního rozštěpu.

Výsledky studie novorozenců s rozštěpy jsou konfrontovány experimentálně na kuřecím modelu. Kuřecí model byl zvolen kvůli snadné manipulaci s vejci a kuřecími embryi bez nutnosti ohrožení mateřského organismu. U kuřecího modelu jsou také známy látky, jejichž přiměřené dávky, které jsou schopny vyvolat rozštěpy zobáku, a období vývoje (kritická perioda), v níž tyto látky musí být vyvíjejícím se kuřatům aplikovány, aby rozštěpy vyvolaly.

2. EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ OROFACIÁLNÍ OBLASTI

2.1 Vývoj obličeje

Hlava zárodku se formuje v období organogeneze, tedy čtvrtý až osmý týden vývoje zárodku. Fyziologický vývoj obličeje začíná migrací buněk neurální lišty, které společně s buňkami mezenchymu vytvoří primordia obličeje (Wong and Hagg, 2004). Tato primordia formují kolem stomodea pět obličejových výběžků jeden frontonazální, párový maxilární a párový mandibulární výběžek. Frontonazální výběžek (FNP) obklopuje ventrolaterální část předního mozku, formuje čelo a střední část nosu, maxilární výběžky laterálně ohraničují stomodeum a mandibulární výběžky tvoří spodní hranici stomodea. Každý z výběžků je složen z buněk nervové lišty, které jsou odvozené z neuroektodermu středního a zadního mozku, a z mezenchymu původem z paraxiálního a laterálního mezodermu (Sperber et al., 2001). Na konci čtvrtého gestačního týdne se v laterokaudální oblasti FNP vytváří nazální plakody (oválná ztlustění ektodermu), zároveň ve střední rovině splývají mediální konce mandibulárních výběžků, při velikosti embrya 3-5 mm. Mandibulární výběžky jsou odvozeny z kaudální oblasti prvního žaberního oblouku a formují dolní čelist, spodní ret a bradu. Během 5. až 7. týdne gestace se formují struktury střední části obličeje (Jugessur et al., 2009). Mezenchym FNP na okrajích nazálních plakod proliferuje a vytvoří mediální a laterální nazální výběžky, plakody se prohloubí za vzniku nazálních jamek a posléze nazálních kanálků. Maxilární výběžky se v důsledku proliferace mezenchymu zvětšují. Na přelomu 6. a 7. týdne se sloučí mediální nazální výběžky mezi sebou a laterálně dochází k jejich splynutí s maxilárními výběžky (Moore and Persaud, 2002). Spojením mediálních nazálních výběžků vzniká intermaxilární segment, na jehož vzniku se podílí i část maxilárních výběžků (Lisson and Kjaer, 1997; Barteczko and Jacob, 2004). Horní ret je laterálně tvořen maxilárními výběžky a ve střední části spojenými mediálními nazálními výběžky, tedy intermaxilárním segmentem. Laterální nazální výběžky dávají vznik nosním křídům (Thornton et al., 1996). FNP dává vznik střední části nosu, filtrum, části intermaxilárního segmentu a primárního patra. Z maxilárních výběžků je odvozena maxilla a sekundární patro (Neville et al., 2009).

2.2 Vývoj primárního a sekundárního patra

Primární patro zahrnuje prostor před otvorem foramen incisivum. Prostor za otvorem se považuje za sekundární patro, které obsahuje tvrdé a měkké patro (Thornton et al., 1996).

Vývoj patra začíná začátkem 6. gestačního týdne po vytvoření horního rtu a je ukončen 12. týden gestace. Vývoj primárního patra je pokračováním diferenciací intermaxilárního segmentu. Intermaxilární segment formuje filtrum horního rtu a premaxilární část maxily (Moore et al., 2008). Sekundární patro tvoří 90 % tvrdého patra a měkké patro. Vývoj sekundárního patra začíná v 6. týdnu vznikem 2 patrových plotének na mediálním povrchu maxilárních výběžků, které jsou vertikálně umístěny po obou stranách jazyka (Neville et al., 2009). Během 7. a 8. týdne se ploténky prodlužují a horizontalizují, mimo jiné i v důsledku rozvoje dolní čelisti, kdy se během uzavírání patra mandibula vysunuje dopředu a rozšiřuje, jazyk se posouvá níže (Moore et al., 2008). Díky uvolněnému prostoru dochází k zdvihání plotének do horizontální polohy, horizontalizace je ukončena do 9. gestačního týdne (Wong and Hagg, 2004). Tento proces nastává v důsledku působení vnitřních sil, kdy je zdvih plotének podporován akumulací a hydratací kyseliny hyaluronové. Pozice mezenchymálních buněk uvnitř plotének může sloužit k přímému využití síly pro elevaci plotének. Jakmile jsou ploténky ve vodorovné poloze, je spuštěna apoptóza nahuštěných epitelálních buněk na mediálním okraji (v místech kontaktu proti sobě stojících plotének), jejichž prořídnutí umožní mezenchymu obou stran vzájemné připojení (fúzi) ve středové čáře (Ferguson, 1988; Sperber et al., 2001). Také dochází ke spojení se spodním okrajem nosní přepážky na dorzální straně plotének a srůstu s primárním patrem. Horizontalizace a splynutí plotének nastává u chlapců o několik dní dříve než u dívek (Sperber et al., 2001). Měkké patro a uvula jsou tvořeny postupným slučováním, nikoliv fúzí (není odbourán epitel v místě styku výběžků), ze dvou růstových center umístěných na kaudálním konci tvrdého patra až do 12. týdne gestace (Moore et al., 2008).

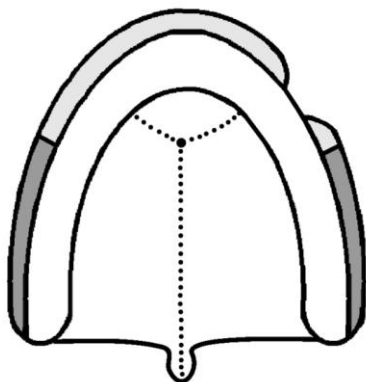
3. OROFACIÁLNÍ ROZŠTĚPY

3.1 Vznik orofaciálních rozštěpů

Rozštěpy rtu, rtu a patra a izolovaného patra mají odlišný etiologický i genetický původ (Goodacre and Swan, 2012). Orofaciální rozštěpy, stejně jako jiné vrozené vady, mohou vzniknout pouze v kritické periodě jejich vývoje, kdy na ně působí nějaký vnější teratogenní faktor, na který jsou dané buňky senzitivní (senzitivní perioda). Vrozená vada může vzniknout pouze v době vývoje orgánu, kdy se překrývá jeho kritická a senzitivní perioda. Kritická perioda vzniku orofaciálních rozštěpů začíná mezi 26. - 30. dnem gestace a trvá do 52. - 60. dne embryonálního vývoje od početí (Peterka et al., 1985).

Rozštěp rtu (CL)

Izolovaný rozštěp rtu (CL, cleft lip) je důsledkem hypoplázie a nedokončeného splynutí mediálních nazálních výběžků s výběžky maxilárními pro oboustrannou formu (Fara et al., 1988). CL může vzniknout 27. - 35. den vývoje (Peterka et al., 1985). Rozštěp rtu může mít různý rozsah od mělké rýhy v červeni rtu, až po úplnou separaci zahrnující kůži, svalstvo, sliznici, zub a kost v místě rozštěpové štěrbiny (obr. 1a, 1b) (Kliegman et al., 2011).



Obr. 1a Rozštěp rtu zahrnující celou část rtu
(z archivu M. Hovořákové).

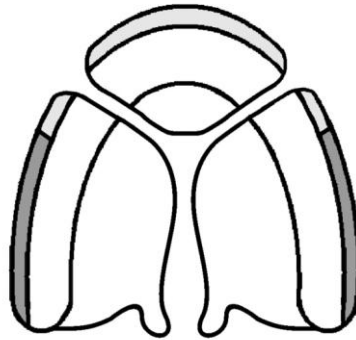


Obr. 1b Rozštěp rtu zahrnující i horní čelist
(z archivu M. Hovořákové).

Rozštěp rtu a patra (CLP)

V případě rozštěpu rtu a patra (CLP, cleft lip and palate) působil teratogenní faktor déle po dobu kritické periody vývoje rtu až po začátek vývoje patra, tedy 27. - 45. den

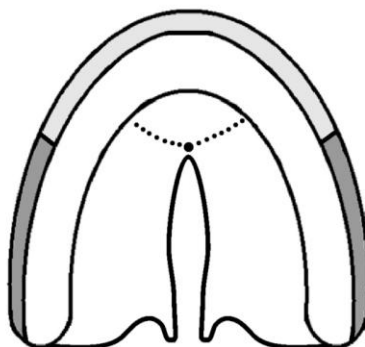
vývoje (Peterka et al., 1985). Jednostranný CLP je výsledkem selhání srůstu mezi maxilárním výběžkem a jednou stranou intermaxilárního segmentu. U oboustranného CLP nesrůstá s intermaxilárním segmentem ani jeden maxilární výběžek (obr. 2) (Jugessur et al., 2009). U celkového CLP rozštěpová štěrbiná vede přes ret a horní čelist k foramen incisivum a pokračuje dále přes tvrdé a měkké patro k uvule (Peterka et al., 1985).



Obr. 2 Celkový oboustranný rozštěp rtu a patra (z archivu M. Hovořákové).

Rozštěp patra (CP)

Příčinou izolovaného rozštěpu patra (CP, cleft palate) může být nedokonalé splynutí dvou patrových plotének mezi sebou a s nosní přepážkou z důvodu jejich hypoplázie, či nesrostou s dorsální částí patra primárního. Další příčinou je již patologický samotný růst plotének, opožděné či neúspěšné zdvihnutí plotének (Ferguson, 1988). Izolovaný rozštěp patra (obr. 3) vzniká při narušení vývoje ke konci kritické periody vývoje patra 6. - 8. týden vývoje, resp. (35 - 55. den vývoje). Rozsah CP je různý, může postihovat pouze uvulu či celé měkké i tvrdé patro (Regezi et al., 2008).



Obr. 3 Rozštěp patra (z archivu M. Hovořákové).

3.2 Klasifikace orofaciálních rozštěpů

Raná klasifikace orofaciálních rozštěpů kladla důraz na anatomicky definovaný alveolární výběžek nesoucí zuby jako bod rozlišující rozštěpy. Aktuálně nejvíce používaná klasifikace se přiklání k rozlišení rozštěpů podle embryonálního bodu foramen incisivum jako landmarku orofaciálních rozštěpů, který je umístěn na rozhraní os incisivum a maxily. Foramen incisivum představuje hranici mezi primárním a sekundárním patrem. Prostor před foramen incisivum zahrnuje primární patro, ret a alveolus. Prostor za otvorem je sekundární patro, jehož součástí je tvrdé i měkké patro. Rozštěp se může vyvinout u primárního, sekundárního patra či u obou naráz (Hassan and Lees, 2014). Rozštěp sekundárního patra může být pouze submukózního charakteru zasahující i svaly měkkého patra, které se uprostřed nespojili (Reiter et al., 2012). Dále je někdy zvlášť popisován rozštěp uvuly, který odpovídá rozštěpu pouze zadní části sekundárního patra, kdy je primární patro netknuté (Hassan and Lees, 2014).

Jedna z klasifikací využívá dělení podle dvou rozdílných morfogenetických skupin. První morfogenetická skupina zahrnuje rozštěpy postihující horní ret a přední část maxily bez nebo se současným postižením patra, konkrétně se dělí na rozštěp rtu, rozštěp rtu spojený s rozštěpem čelisti, rozštěp rtu a patra. Do druhé skupiny postihující tvrdé a měkké patro patří izolovaný rozštěp patra a submukózní rozštěp patra (Fara et al., 1988).

Dalším faktorem, podle něž lze dělit orofaciální rozštěpy, je příčina a míra fyzického postižení. Dle příčiny rozlišujeme nesyndromatické rozštěpy rtu, rtu a patra, rozštěp patra a syndromatické CL/CLP a CP. Pacienti s nesyndromatickými rozštěpy nemají žádné další fyzické ani vývojové anomálie (Fraser, 1970).

Dále se dělí rozštěpy podle závažnosti na jednostranné a oboustranné, úplné a neúplné. Při jednostranném rozštěpu je poškozena pouze jedna strana obličeje, při oboustranném jsou poškozeny obě strany obličeje. Vzácně se vyskytuje rozštěp mandibuly (Moore et al., 2008).

3.3 Epidemiologie

Incidence orofaciálních rozštěpů je závislá na etnické příslušnosti jedince, jeho pohlaví a zeměpisné poloze. Světová zdravotnická organizace odhaduje celkovou incidenci 1 na 700 živě narozených dětí (WHO, 2003). V rámci České republiky byla zjištěna

incidence 1 na 530 živě narozených dětí (Peterka et al., 2000). Vysoký počet CL/P byl zaznamenán ve Střední a Jižní Americe a Asii, především v Japonsku a Číně. Nízký počet byl naopak v Izraeli, jižní Africe a jižní Evropě. Pro CP je rozdělení následující, vysoký počet případů je v Kanadě, severní Evropě a nízké zastoupení má Jižní a Střední Amerika a jižní Afrika (Ching and Chung, 1974; Croen et al., 1998). V rámci etnické příslušnosti je nejnižší prevalence CL/P i CP zaznamenána u Afroameričanů a nejvyšší u Asiatů. Velmi vysoké hodnoty byly zaznamenány i u původních obyvatel Severní Ameriky. Prevalence rozštěpů u bělochů byla oproti hispáncům a afroameričanům větší (Croen et al., 1998; Tolarova and Cervenka, 1998).

Chlapci bývají postiženi dvakrát častěji než dívky. Mají také závažnější rozštěpy (Jagomagi et al., 2010). Chlapci mají větší predispozici k rozštěpům rtu či rtu a patra na rozdíl od dívek, v poměru 2:1 (Goodacre and Swan, 2012). Větší riziko je u chlapců pro vznik rozštěpu rtu a patra než pro izolovaný rozštěp rtu (Harville et al., 2005). Izolovaný rozštěp patra se častěji vyskytuje u dívek než u chlapců, což může mít souvislost s delší dobou uzavírání patra u dívek, kdy se zároveň rozšiřuje období, po které může rozštěp patra vzniknout (Burdí and Silvey, 1969). Rozdíl mezi pohlavími ve výskytu CL/P a CP byl potvrzen i u české populace, kdy CL/P mělo 65% chlapců a 35% dívek, u rozštěpu patra byl rozdíl následující 59 % pro dívky a 41 % pro chlapce (Peterka et al., 1995).

Odlišný je i výskyt druhů rozštěpů z pohledu jejich závažnosti a umístění. Jednostranné rozštěpy jsou devětkrát častější než oboustranné a levostranné jsou dvakrát častější než pravostranné. Poměr výskytu levostranného, pravostranného a oboustranného rozštěpu je 6:3:1 (Goodacre and Swan, 2012).

Incidenci také ovlivňuje předchozí výskyt nějakého typu rozštěpu v rodině, což je zmíněno dále v kapitole 3.4.1 Heritabilita.

3.4 Genetika

Orofaciální rozštěpy mohou být děděny monogenně podle Mendlových pravidel (nejčastěji jako součást syndromu), chromosomálně, či může jít o sporadickou mutaci (nedědí se). Nyní je známo na 300 syndromů, v nichž se objevuje jakýkoliv typ rozštěpu. Nejčastěji se stává součástí syndromu rozštěp patra (Goodacre and Swan, 2012). Orofaciální rozštěpy patří do skupiny multifaktoriální dědičnosti, kdy je potřeba více

různých genů s různou váhou a vnější faktor či faktory, které pokud působí společně, mají za následek právě vznik nesyndromatických rozštěpů (Moore and Persaud, 2002).

3.4.1 Heritabilita (dědivost)

Jestliže mají orofaciální rozštěpy různý genetický podklad, existují dvě genetické skupiny CL/P a CP, které mají odlišné riziko pro jejich zdědění (Bixler, 1981).

Poměr konkordance, tedy shody ve výskytu CL, CLP a CP mezi monozygotními a dizygotními páry dvojčat je vyšší ve prospěch dvojčat monozygotních. Tento výsledek značí podíl genetické složky na vzniku CL, CLP a CP (Little and Bryan, 1986).

Rizikem postižení dítěte některým typem orofaciálního rozštěpu v České republice u rodin s pozitivní historií, kdy jeden z rodičů má nějaký typ orofaciálního rozštěpu, se zabýval Peterka et al. (1996). Pokud měla matka CL nebo CLP či otec CL, jejich dcera měla větší pravděpodobnost, že bude zdravá než syn. Jestliže měl jeden z rodičů CL, děti měly jen CL nebo CLP, žádné z nich nemělo izolovaný rozštěp patra, což potvrzuje odlišný genetický podklad CL/P a CP. Pokud jeden z rodičů měl pouze rozštěp rtu, jejich syn měl větší riziko závažnějšího postižení v podobě CLP. V případě výskytu CP u matky či otce má syn větší šanci, že se narodí zdravý, než dcera (Peterka et al., 1996).

Podle Maďarské studie sledující výskyt rozštěpů v rámci rodiny je incidence CL/P u sourozenců 4,86 %, u tet/strýců 0,75 % a u bratranců/sestřenic 0,31 %. V souvislosti s incidencí celkové populace mají příbuzní prvního stupně zvýšenou incidenci rozštěpů 47krát, příbuzní 2. stupně 7x a 3. stupně 3krát. Dědivost byla u příbuzných 1. stupně 78 % (u sourozenců 92 %), u příbuzných druhého a třetího stupně 82 %, resp. 84 %. Postižené matky měly děti se závažnějším typem malformace než otcové. Frekvence výskytu CL/P byla 6,05 % u sourozence pacienta s CLP, ale jenom 3,47 % u sourozence pacienta pouze s CL. Příbuzenská manželství byla ve vzorku častější než běžně v populaci. CL/P podle autorů splňuje pravidla polygenní dědičnosti (Czeizel and Tusnady, 1972). Větší riziko pro vznik samostatného rozštěpu rtu vůči CLP mají dvojčata a děti, jejichž rodiče jsou příbuzní bratranec a sestřenice (Harville et al., 2005).

3.4.2 Syndromy spojené s orofaciálními rozštěpy

Mezi časté syndromy, u kterých je jedním z klinických příznaků rozštěp rtu a patra, patří Velokardiofaciální syndrom (VCFS), Pierre-Robinnova sekvence (obr. 4), Van der

Woude syndrom, Apert syndrom či Treacher Collins syndrom. Ze syndromatických rozštěpů se tato práce blíže zabývá pouze rozštěpy, které jsou součástí Pierre-Robinovy sekvence, na jejichž vyhodnocení bylo v dostupném souboru dostatečné množství dat.

Pierre-Robin sekvence

Pierre-Robin sekvence (Obr. 4) je charakterizována rozštěpem patra, mikrognatií mandibuly a nízko dozadu posazeným jazykem, který může způsobit ucpání dýchacích cest. Rozštěp patra zde vzniká v důsledku hypoplázie mandibuly, kdy jazyk překáží normálně vyvinutým patrovým ploténkám při procesu horizontalizace (Moore and Persaud, 2002). Tímto způsobem rozštěp patra vzniká na konci kritické periody 55. až 60. den vývoje (Peterka et al., 1985).



Obr. 4 Pierre - Robinova sekvence (převzato z Gewitz et al. (1978).

3.4.3 Kandidátní geny

Různé studie uvádí velkou řadu genů, které mohou souviset se vznikem nesyndromatických typů rozštěpů u člověka. Mezi tyto geny se řadí ve velké míře růstové faktory, transkripční faktory a signální faktory. Tyto geny se nachází na různých oblastech odlišných chromosomů například: 1q, 2p, 4q, 6p, 14q (Carinci et al., 2007). U většiny zkoumaných genů byla v první řadě prokázána souvislost s některými syndromy zahrnující postižení orofaciální oblasti, například *MSX1* (Wolf-Hirschhorn syndrom), *IRF6* (Van der Woude syndrom). Mezi nejvíce diskutované geny patří například: FGFs, *IRF6*, *MSX1*, TGF- β/α , Bmp, PVRL1, TBX22.

FGFs (fibroblastové růstové faktory)

Rodina FGF růstových faktorů je mimo jiné odpovědná za kraniofaciální vývoj zahrnující iniciaci buněk nervové lišty (Bachler and Neubuser, 2001). Mutace v receptoru FGFR1 má za následek Kallmanův syndrom, porucha funkce FGF2 souvisí s Apertovým syndromem, přičemž oba dva syndromy mohou zahrnovat ve fenotypovém projevu orofaciální rozštěpy (Wilkie et al., 1995; Dode et al., 2003). Riley et al. (2007) uvádí, že FGF signalizační cesta odpovídá za 3–5 % případů nesyndromatického CLP. Nejčastěji se jedná o mutace měnící smysl v FGF8, dále v receptorech FGFR2 a FGFR3. V FGFR1 byly zaznamenány kromě mutací měnící smysl kodonu i nonsense mutace, které způsobují vznik terminačního kodonu (Riley et al., 2007).

U myši vede ztráta funkce FGF10 nebo FGFR2 k redukci proliferace a apoptóze, což způsobuje zmenšení patrových plotének a jejich abnormální strukturu. Receptor pro fibroblastový růstový faktor 2 dále aktivuje *SHH* (sonic hedgehog gen), který je exprimován v epitelu patra, přičemž ztráta jeho funkce vede k rozštěpu patra (Rice et al., 2004). Delece jakéhokoliv receptoru či jeho ligandu v signální kaskádě, která vede k zastavení exprese *SHH*, má stejný výsledek palatogeneze patra jako porucha signalizace FGF (Jugessur et al., 2009).

IRF6

IRF6 neboli interferon regulační faktor 6 leží na dlouhém raménku chromozomu 1, 1q32.2 (<http://omim.org/>, 31. 3. 2015). *IRF6* patří mezi transkripční faktory, je silně exprimován v ektodermu patrových plotének před a během formování tvrdého patra. Mutace v něm způsobuje 2 autosomálně dominantní onemocnění Van der Woude syndrom a Popliteal pterygium syndrom, jejichž klinický projev zahrnuje některou z podob rozštěpu patra (Ben et al., 2005).

Zucchero et al. (2004) potvrdili, že mutace postihující oblast *IRF6* souvisí s nesyndromatickým rozštěpem rtu a patra u jihoamerické a asijské populace, u kterých polymorfismus jednoho nukleotidu způsoboval výměnu aminokyselin (val274ile) (Zucchero et al., 2004). Účast *IRF6* v etiologii nesyndromatického CL/P na základě jednonukleotidového polymorfismu byla potvrzena u populace centrální Evropy (Birnbaum et al., 2009). Jednonukleotidový polymorfismus byl nalezen i u italské populace (Scapoli et al., 2005).

Vznik CL může být také zprostředkován přes poruchu vazebného místa pro transkripční faktor AP-2 α ve vysoce konzervované oblasti enhanceru *IRF6*. Jednonukleotidový polymorfismus v oblasti vazebného místa pro AP-2 α zvyšuje i riziko vzniku CLP (Rahimov et al., 2008).

MSX1, TGF- β / α , BMP

Delece genu *MSX1* nebo jeho části byla nejprve spojována s Wolf-Hirschhornovým syndromem, jehož fenotypový projev zahrnuje i CL/P (Nieminen et al., 2003). Tento gen je lokalizován na 4. chromozomu, konkrétně do oblasti dlouhého raménka: 4q16.2 (Lidral et al., 1997). *MSX1* je exprimován v obličejových primordiích. Jezewski et al. (2003) uvádí, že mutace měnící smysl v kódující sekvenci *MSX1* nebo jeho regulačních oblastech má za následek přibližně 2 % pacientů s CL/P, studie zahrnovala jedince z evropské, asijské a jihoamerické populace (Jezewski et al., 2003). Závažnější postižení měli členové velké rodiny, u nichž byla nalezena nonsense mutace v *MSX1*, která přispěla k výskytu CL/P a agenezi zubů (van den Boogaard et al., 2000). Mutace v *MSX1* přispěly ke vzniku CL/P i u vietnamské a filipínské populace (Suzuki et al., 2004; Vieira et al., 2005).

Ukazuje se také důležitost interakce *MSX1* s extracelulárními signálními faktory jako je TGF- β / α (transformující růstové faktory) a Bmp (bone morfogenetic protein). Kdy *MSX1* je vyžadován pro expresi Bmp4 a Bmp2, které jsou exprimovány v oblasti vzniku patra (Zhang et al., 2002). Bmp jsou důležité pro spojení rtu a patra u myší, kde vyřazení jejich interakce vedlo k rozštěpu rtu (Liu et al., 2005). Špatná proliferace kvůli inaktivaci receptoru Bmpr1a v obličejovém primordiu má za následek spíše rozštěpy sekundárního patra. Rozštěp rtu vzniká zřejmě díky předčasné apoptóze v epitelu mediálního nazálního výběžku (Liu et al., 2005). Nonsense mutace (ser104stop) v *MSX1* mohou vést přes regulaci signalizační dráhy Bmp k oběma typům rozštěpu CLP i samostatnému CP (van den Boogaard et al., 2000).

Homozygotní kombinace vzácných variant genu *TGF- α* A2 alely (geny někdy značeny jako *TGFA*) a *MSX1-CA* A4 alely může zvýšit riziko rozštěpu patra 9,7krát (Jugessur et al., 2003). *TGF- α* je za normálních okolností exprimován v tkáni patra a mezenchymu patrových plotének v době jejich fúze (Jugessur et al., 2009). Vyřazení *TGF- β 3* mělo u myší za následek nedostatečnou přilnavost mediálního okraje epitelu protilehlých patrových plotének, což vedlo k rozštěpu patra (Proetzel et al., 1995). U lidí byla spojitost oblasti *TGF- β 3* a CL/P také popsána (Jugessur et al., 2003).

Také může být významná kombinace vnějšího prostředí a genetické predispozice. Romitti et al. (1999) poukázali na interakci variant genů *MSX1*, *TGFB3* u dětí v souvislosti kouřením jejich matek (více jak 10 cigaret denně). Pokud měly děti odlišnou variantu jednoho z genů, bylo signifikantně zvýšené riziko rozštěpu patra (Romitti et al., 1999).

PVRL1 (Poliovirus receptor like-1)

Gen *PVRL1* se nachází na 11. chromozomu v oblasti dlouhého raménka 23.3 a kóduje adhesní protein nectin-1 (Takahashi et al., 1999). Nejprve bylo objeveno, že mutace v tomto genu způsobuje autosomálně recesivní syndrom ektodermální dysplázie - rozštěpu rtu a patra (CLPED1). U myši je tento gen exprimován na mediálním konci epitelu patrových plotének (Suzuki et al., 2000). Mutace genu vedoucí k vytvoření stop kodonu (Trp185Stop) a tedy neúplné formy proteinu byla v homozygotní formě u populace karibského ostrova u Venezuely označena za rizikovou pro vznik CL/P. U této populace byla heterozygotní podoba častá u zdravých jedinců, u venezuelské populace bylo však zjištěno signifikantní riziko pro vznik nesyndromatického CL/P již u heterozygotů pro tento gen (Sozen et al., 2001). V genech *PVRL1* a *PVRL2* ležících blízko sebe byly nalezeny další vzácné mutace způsobující záměnu aminokyselin, které zřejmě souvisí s nesyndromatickým typem CL/P (Warrington et al., 2006). Signifikantní souvislost vzácných i běžných mutací postihující *PVRL1* a vznikem nesyndromatického CL/P byla následně potvrzena i v dalších studiích, které převážně zahrnovaly jihoamerické populace (Avila et al., 2006; Neiswanger et al., 2006).

TBX22 (T-box transkripční faktor 22)

Tento transkripční faktor se nachází v oblasti dlouhého raménka 21.3 chromozomu X. Mutace postihující tento gen způsobuje CPX, tedy X vázaný rozštěp patra a ankyloglosii (vrozený srůst jazyka se dnem dutiny ústní). U modelových organismů byla exprese genu velmi omezená v čase i místě, probíhala v patrových ploténkách těsně před jejich zdvihnutím do horizontální polohy (Braybrook et al., 2002). Velká genomová studie ukazuje propojení chromozomu X s nesyndromatickým typem rozštěpu rtu a patra (Prescott et al., 2000). Další studie ukazují i významné zapojení odlišných mutací genu v případě izolovaného rozštěpu patra u různých populací (Marcano et al., 2004; Suphapeetiporn et al., 2007). Řada pacientů s CPX nemusí vykazovat ankyloglosii, nastává tedy otázka, zda v případě výskytu CP spojeného se změnou *TBX22*, nejde pouze

o odlišnou penetranci tohoto syndromu. Další členové patřící do T-box rodiny *TBX1* a *TBX10* se pravděpodobně také mohou účastnit patogeneze CL/P. U myši je *TBX1* exprimován v oblasti faryngového endodermu a jeho vyřazená činnost způsobuje vadnou migraci buněk z neurální lišty (Vitelli et al., 2002). Domněnka, že mutace *TBX10* vzácně přispívá ke vzniku CL/P i u lidí, byla potvrzena i ve studii Vieira et al. (2005).

3.5 Vnější prostředí

Některé faktory vnějšího prostředí mohou pozitivně či negativně ovlivňovat vznik rozštěpů.

Mezi nejčastější faktory spojované s výskytem orofaciálních rozštěpů patří faktory chemické povahy (léky, návykové látky, čisticí prostředky, barvy), s těmi se můžeme setkat jak v běžném životě, tak i při výkonu některých povolání, kde je expozice těmto látkám zpravidla vyšší a může se tedy zvyšovat i riziko výskytu vrozených vad.

Podle některých studií může přispět ke vzniku CL/P nebo CP i nízký socioekonomický status rodičů (Acuna-Gonzalez et al., 2011). Toto však není jednoznačně potvrzeno a existují i studie s opačným výsledkem, např. Kallen (1997) žádnou souvislost výskytu CL/P s nízkým socioekonomickým statutem nenašel.

Léky/ Léčebné přípravky

Léčebnými přípravky, které potenciálně patří mezi negativní faktory, jsou kortikosteroidy. Studie Hviid and Molgaard-Nielsen (2011) ukazuje na mírnou souvislost zvýšeného rizika výskytu CL/CLP v případě dermatologicky podávaných kortikosteroidů, avšak u jiných způsobů podání autoři nic neprokázali (Hviid and Molgaard-Nielsen, 2011). Zvýšené riziko při kožním podání kortikosteroidů na léčbu dermatitidy a ekzému potvrzuje i další studie, podíl šancí (odds ratio – OR) zde dosáhl pro CL/P 11,73 a pro CP byl tento podíl 12,00 (Edwards et al., 2003). V případě užívání syntetického kortikoidu prednisonu nebyla nalezena žádná souvislost se vznikem rozštěpů (Park-Wyllie et al., 2000).

U matek epileptiček bylo prokázáno zvýšené riziko vzniku orofaciálních rozštěpů, toto riziko vzrostlo pro nesyndromatické rozštěpy pokud byly matky léčeny antiepileptiky (OR = 7,7 pro CLP a 3,61 pro CP). V případě, že se matka léčila několika antiepileptiky zároveň (polyterapický druh léčby), tak OR vzrostlo pro CLP na 10,5 (Abrishamchian et al., 1994).

Statisticky zvýšené riziko vzniku syndromatických i nesyndromatických rozštěpů bylo zjištěno i při užívání cytostatik (Lorente et al., 2000).

Vznik rozštěpů může být podle některých studií ovlivněn i množstvím vitaminů. Podle Johansen et al. (2008) může být sníženo riziko výskytu rozštěpu patra se zvýšením příjmu vitamínu A (retinol a 8,3 % beta-karoten) přijímaných ve stravě a doplňcích stravy ze 1,2 µg/den na 3,8 µg/den. V případě CL a CLP byla pouze slabá asociace se snížením rizika (Johansen et al., 2008). Některé studie však uvádí, že příjem vitamínu A nad 3,0 µg, v podobě biologicky účinného retinolu (bez zahrnutí prekurzoru β-karotenu), může být pro plod škodlivý (Rothman et al., 1995). Obecně bylo zjištěno že, s nedostatkem i nadměrným příjmem vitamínu A narůstá riziko vrozených vad (Collins and Mao, 1999).

Návykové látky:

Dalším faktorem, který může ovlivnit vznik rozštěpu je například kouření matky během těhotenství. Byla nalezena signifikantní souvislost mezi kouřením matek během rané fáze těhotenství a CL/P. OR související s kouřením matek, jejichž děti byly postiženy CP, odpovídal 1,35 a u dětí s CL/P 1,13, z toho plyne větší souvislost kouření a výskytu CP. Závislost na množství vykouřených více než deseti cigaret za den byla potvrzena pouze u skupiny s CP (Kallen, 1997). Zvýšené riziko v souvislosti s kouřením pouze pro rozštěp patra uvádí i další studie (Laumon et al., 1996).

Nadměrné pití alkoholu více jak 5 drinků více než jednou týdně zvyšuje riziko vzniku CLP, větší riziko je však u syndromatického typu CLP. Ale pití alkoholu v malé míře podle autorů téže studie s žádným typem rozštěpů nesouvisí (Shaw and Lammer, 1999). Nadměrné pití alkoholu v těhotenství bylo spojeno s rizikem výskytu nesyndromatického rozštěpu i v dalších studiích (Laumon et al., 1996; Munger et al., 1996). V jedné ze zmíněných studií bylo zjištěno, že oproti matkám, které během těhotenství vůbec nepily alkohol, byl u matek pijících alkohol jednou až třikrát do měsíce zvýšený výskyt dětí s nesyndromatickým CLP 1,5krát. Pokud matky konzumovaly alkohol více než desetkrát za měsíc, byla pravděpodobnost vzniku CLP u dítěte větší až čtyřikrát. U žádného množství vypitého alkoholu nebyla nalezena souvislost s CP (Munger et al., 1996).

Onemocnění matky

Onemocnění matky v době těhotenství může být dalším faktorem ovlivňujícím vývoj dítěte. Angina pectoris byla označena jako vysoce rizikový faktor, který může přispívat k vzniku CL/P i CP, zvláště u žen kuřaček a pokud je přítomná genetická

predispozice (Czeizel et al., 2015). Matka trpící hyperhomocysteinemií může mít větší pravděpodobnost, že bude mít dítě s CL/P, z důvodu narušeného metabolismu homocysteinu, kdy tělo matky nedokáže homocystein dostatečně odbourávat pod vlivem vitamínu B (Wong et al., 1999). Signifikantně zvýšené riziko pro CP bylo zaznamenáno i u matek s diabetes mellitus prvního typu (Carinci et al., 2005). Za rizikový faktor je považována také horečka v raných fázích těhotenství. Odhadované riziko CL/P je ještě více zvýšeno u matek, které při horečce neužívají antipyretika (Hashmi et al., 2010). V rámci české populace mělo onemocnění projevující se horečkou 24–33 % matek dětí s orofaciálními rozštěpy (Peterka et al., 1994).

Riziková povolání rodičů

Ve studii Nguyen et al. (2007) bylo označeno jako rizikové povolání kadeřnice ze strany matky s dosaženým OR 4,8 pro vznik nesyndromatického CLP. Pro CP byla nalezena spojitost s prací ve výrobním průmyslu (OR = 3,8). S prací ve zdravotnictví z matčiny strany nebyla, na rozdíl od slabé souvislosti v případě otce, nalezena žádná souvislost se vznikem ani jednoho z typů rozštěpů. Vysoká pravděpodobnost vzniku CP (OR = 12) byla v případě, že matka pracovala s čisticími a mírná při práci v potravinářském průmyslu. Jako riziková povolání otců pro vznik CLP i CP byla označena práce se dřevem a čisticími (Nguyen et al., 2007). Zvýšené riziko u matek kadeřnic a uklízeček potvrzuje i další studie (Lorente et al., 2000). Souvislost se vznikem orofaciálních rozštěpů byla nalezena i u matek pracujících v kožařském a obuvnickém průmyslu (OR = 3,9) (Bianchi et al., 1997). Mezi vysoce riziková zaměstnání pro vznik CL/P ze strany otce byla zařazena povolání: farmář, laborant v továrně na chemikálie, mechanik pro těžké stavební stroje, tesař, nábytkář, automechanik a instalatér (Mirilas et al., 2011).

Volně dostupné látky:

Zvýšené riziko pro vznik rozštěpů a jiných malformací mohou způsobovat látky, které jsou součástí běžně používaných čisticích a kosmetických přípravků například laků, barev, čisticích, bělidel, odlakovačů, lepidel atd. Tyto látky se řadí především mezi organická rozpouštědla, s kterými se, jak je již zmíněno výše, i v některých povoláních přichází do styku ve větší koncentraci (kadeřnice, uklízečky, výrobní průmysl). Tyto látky se absorbují především kůží a dýchacími cestami (Garlantezec et al., 2009). Chevrier et al. (2006) se zabývali expozicí matky především v prvním trimestru těhotenství organickým rozpouštědly. Mezi nebezpečné látky, které mohou být jejich součástí, patří mimo jiné amoniak, který je přidáván především do barev na vlasy, čisticích. Zjistili, že pokud matky

neměly zvýšený příjem kyseliny listové a byly vystavené některému druhu rozpouštědla - rozpouštědlu rafinovanému z ropy, chlorovaným uhlovodíkům nebo rozpouštědlům obsahujícím kyslík, tak vzrostlo riziko vzniku CL/P i CP. V případě rizika CLP i CP skupiny bylo statisticky signifikantní samostatné působení rozpouštědel vyráběných z ropy. U rozpouštědel obsahujících kyslík - alifatických alkoholů, glykol etheru, ketonů, esterů, bylo riziko zvýšené pouze mírně a statisticky signifikantní bylo až při kombinaci více druhů (Chevrier et al., 2006; Garlantezec et al., 2009). Řada těchto látek je obsažena i v produktech vlasové kosmetiky a právě používání barev na vlasy, laků či odlakovačů je spojeno s dvojnásobným zvýšením rizika vzniku CP a mírně zvyšuje riziko pro CL/P (Chevrier et al., 2006). Chlorované uhlovodíky zvyšovaly riziko pro CL/P i CP s OR 4,40 (Laumon et al., 1996). Ve studii zpracované autory Cordier et al. (1997) rostlo riziko vzniku CL/P s přibližnou dávkou, které byli jedinci vystaveni. Pokud byli do studované skupiny zahrnuti i jedinci se syndromatickým typem CL/P bylo riziko téměř stejné jako u nesyndromatického CL/P. Pro rozštěp patra nebyla nalezena žádná souvislost z důvodu malého počtu jedinců (Cordier et al., 1997). Existují však i studie, které zvýšené riziko při dlouhodobém vystavení se organickým rozpouštědlům nepotvrdily (Desrosiers et al., 2012).

Statisticky signifikantně zvýšené riziko vzniku CP nastává i po vystavení sloučeninám olova, biocidním látkám, alifatickým kyselinám (k.máselná) a trichlorethylenu (organické rozpouštědlo) v závislosti na dávce a frekvenci. Vznik CL/P je spojený se zvýšeným rizikem v závislosti na množství a frekvenci absorpce glycol etheru a alifatických aldehydů (Lorente et al., 2000). Kromě biocidních přípravků může ovlivnit vývoj dítěte i používání pesticidů v běžném množství na domácnost (Shaw et al., 1999).

Faktory prostředí redukuující vznik orofaciálních rozštěpů

Riziko vzniku orofaciálních rozštěpů snižuje vysoký příjem živin převážně přijímaných z ovoce a zeleniny před otěhotněním. Konkrétně se riziko snižuje při zvýšeném příjmu rostlinných bílkovin, vlákniny, kyseliny askorbové (vitamin C), železa a hořčiku spolu s perikonceptčním užíváním kyseliny listové. Bez přídavku kyseliny listové má samostatný vliv pouze zvýšený příjem bílkovin obsažených v zelenině (Krapels et al., 2004).

Mezi volně dostupné látky podporující snížení rizika vzniku orofaciálních rozštěpů patří již výše zmíněná kyselina listová. Podle některých studií její nedostatek přispívá ke

vzniku orofaciálních rozštěpů (Czeizel et al., 1999). Shaw et al. (2002) zjistili, že pokud matka neužívala v perikoncepčním období vitamínové doplňky a měla horečku, mohlo být riziko vzniku CLP u dítěte až trojnásobné (Shaw et al., 2002). Ovšem v jiné ze studií nebyla souvislost příjmu kyseliny listové v jakékoli podobě s orofaciálními rozštěpy potvrzena (Little et al., 2008).

Podle Czeizel et al. (1999) jsou v redukci orofaciálních rozštěpů efektivní pouze farmakologické dávky kyseliny listové překračující 6 mg za den užívané v kritické periodě vývoje primárního i sekundárního patra (problémem může být, že nadměrná konzumace kyseliny listové může být provázena možnými vedlejšími účinky). Užívání pouze multivitaminových doplňků stravy zahrnujících fyziologické dávky kyseliny listové v množství menším než 1 mg během perikoncepčního období nemohou redukovat prevalenci dětí narozených s CL/P či CP (Czeizel et al., 1999). Studie na kanadské populaci také ukazuje, že nízké dávky kyseliny listové podávané v podobě obohacených potravin z obilovin, neposkytují žádnou ochranu před vznikem CLP (Ray et al., 2003). V porovnání s těmito závěry se neshodují výsledky studie van Rooij et al. (2004), podle které i pouhý příjem kyseliny listové z potravy snižuje riziko vzniku CLP. Navíc při jejím užívání v podobě těhotenských doplňků stravy je riziko sníženo až o 47 % oproti matkám, které tyto doplňky neužívaly (van Rooij et al., 2004).

4. FYZIOLOGICKÝ NOVOROZENEK

Porodní parametry jsou jedním z důležitých indikátorů zdraví, prospívání a fyziologického růstu dítěte.

U novorozence jsou zpravidla sledovány následující metrické parametry: porodní hmotnost, porodní délka a obvod hlavičky. Dále je důležitý jeho poporodní stav čili jeho vitalita a adaptace, která se odráží v hodnotě tzv. Apgar skóre, jež se zaměřuje na 5 snadno zjištělných znaků. Mezi tyto znaky patří: dýchání, srdeční akce, barva kůže, svalový tonus a reakce na podráždění (Leifer, 2004). Důležitým faktorem pro vyhodnocení jednotlivých parametrů je vztah ke gestačnímu věku novorozence. Novorozence lze klasifikovat i pouze dle gestačního věku, který u donošeného jedince odpovídá porodu v 37. týdnu až v 41. týdnu a 6. dnu (Dort et al., 2013). Novorozence lze rozdělit dále na základě vztahu gestačního věku k porodní hmotnosti na eutrofické, hypotrofické a hypertrofické. Hmotnost eutrofického novorozence odpovídá jeho gestačnímu věku. Hypotrofický novorozenec může být označován jako SGA (small for gestational age), jeho hmotnost je pod úrovní 10. percentilu pro dokončený týden gestačního věku. Jestliže se hmotnost novorozence pohybuje nad 90. percentilem v dokončeném týdnu věku gestace, je označován jako hypertrofický nebo také jako LGA (large for gestational age) (Dort et al., 2013).

5. PORODNÍ HMOTNOST

Norma porodní hmotnosti u fyziologických novorozenců populace ČR je v rozmezí 2500 g – 4000 g. Dítě s vysokou porodní hmotností váží více než 4499 g. Jestliže novorozenec váží méně než 2500 g, má již nízkou porodní hmotnost (Dort et al., 2013).

Nízká porodní hmotnost je důležitým indikátorem reprodukčního zdraví a odráží celkový zdravotní stav populace (Pattenden et al., 1999).

Bylo zjištěno, že děti s nízkou porodní hmotností pod 2500 g mají zvýšené riziko mortality a morbidit (Haas et al., 1987; Kramer et al., 1990; McIntire et al., 1999). V případě studie McIntire et al. (1999) se vyskytovalo úmrtí novorozence téměř desetkrát častěji u dětí s porodní hmotností na nebo pod úrovni 3. percentilu (P) vzhledem k danému dokončenému gestačnímu týdnu, než u referenční skupiny dětí pohybujících se mezi 75. P a 26. P. Hypotrofičtí novorozenci měli signifikantně nižší hodnoty Apgar skóre v pěti minutách, vážnou acidémii a sepsi, potřeba intubace novorozence byla také častější. U novorozenců pohybujících se hmotnostně pod 10. percentilem byl signifikantně vyšší výskyt záchvatů a porodního stresu (McIntire et al., 1999).

Nízká i vysoká porodní hmotnost je spojována s problémy později v dětství. Například Barker et al. (2002) studovali rizika spojená s výskytem hypertenze, diabetem druhého typu a ischemickou srdeční chorobou ve věku okolo 11 let. Riziko vzniku těchto onemocnění je mimo jiné zvýšeno prudkým hmotnostním přírůstkem u malých novorozenců. Toto riziko se snižovalo s nárůstem porodní hmotnosti a rostlo se zvýšenými hodnotami BMI (body mass index) (Barker et al., 2002). Častý výskyt diabetes mellitus druhého typu byl potvrzen v souvislosti s nízkou porodní hmotností pod 2500 g i vysokou porodní hmotností nad 4000 g. Mezi těmito skupinami byly zaznamenány četné rozdíly v přidružených komplikacích. Děti s vysokou porodní hmotností měly o 64 % větší riziko vzniku onemocnění i po adjustaci na gestační diabetes mellitus oproti těm s nízkou hmotností, navíc se potýkaly se zvýšeným krevním tlakem, většími hodnotami BMI a častější pozitivní rodinou historií (Wei et al., 2003). Nízká porodní hmotnost ve spojitosti s diabetem byla potvrzena i u dospělých, kde se diabetes vyvinul spíše ve vztahu k inzulínové rezistenci (Lithell et al., 1996). Podle Soto et al. (2003) je sekrece a citlivost na inzulín úzce propojena s catch-up růstem dětí. U malých novorozenců, kteří prošli zrychleným růstem, byla zvýšená hladina inzulínu na lačno oproti dětem s normální

porodní hmotností i dětem s malou porodní hmotností bez catch-up růstu (Soto et al., 2003). Naopak riziko onemocnění diabetem prvního i druhého typu je podle jiné studie u malých novorozenců snižené a u dětí s abnormálně vysokou porodní hmotností zvýšené (Dahlquist et al., 1996). Navíc LGA novorozenci mohou vykazovat, již několik hodin po porodu, sníženou senzitivitu na inzulín a zvýšenou lipolytickou aktivitu, což by mohlo v důsledku vést až k rozvoji obezity, cukrovky 2. typu či onemocnění srdce a cév (Ahlsson et al., 2007). Riziko vývoje obezity u chlapců s vysokou porodní hmotností potvrzuje i Eriksson et al. (2001). Se zvýšenou frekvencí výskytu obezity či nadváhy u chlapců i dívek, kteří měli vysokou porodní hmotnost, souvisí i vysoký výskyt abdominálního typu obezity/nadváhy a vysoký podíl tělesného tuku (Navti et al., 2014). Dívky s velkou porodní hmotností nad 4,5 kg mohou mít více jak třikrát zvýšené riziko rozvoje rakoviny prsu již v rané dospělosti. Důvodem mohou být odlišné hladiny hormonů jako je IGF1 (inzulinu podobný růstový faktor 1) a estrogeny, které hrají roli jak v intrauterinním růstu, tak při vývoji prsních žláz (Innes et al., 2000).

Děti s nízkou porodní hmotností mohou také vykazovat již ve věku 3-6 let srdeční a cévní remodelaci. V těchto případech bylo popsáno dilatované kulovité srdce se sníženou funkcí longitudinálních pohybů během systoly, sníženou relaxací srdce (dysfunkce diastoly) spolu se zvýšeným krevním tlakem, tepem a tloušťkou stěny cév (Crispi et al., 2012). Podle studie Kaijser et al. (2008) je také nízká porodní hmotnost silným perinatálním rizikovým faktorem pro ischemickou chorobu srdeční v dospělosti zprostředkovanou nedostatečným růstem plodu (Kaijser et al., 2008).

6. RIZIKA SPOJENÁ S OROFACIÁLNÍMI ROZŠTĚPY

Děti s orofaciálními rozštěpy, především CLP a CP, mají ihned po narození deformovanou ústní dutinu, což vede k problémům s příjmem potravy, později potřebují pomoc logopeda kvůli narušenému svalstvu v důsledku rozštěpu. Také často trpí záněty středního ucha a problémy se správným vývojem zubů, což může vyústit ve vadný skus zubů a následné další operace (Wong and Hagg, 2004). S rozštěpovými vadami je spojený výskyt nadpočetných zubů, ale i jejich ageneze či mikrodoncie. Nejčastěji postiženým zubem je laterální řezák, jehož zárodek se vyvíjí v oblasti styku maxilárního a mediálního nazálního výběžku, což je oblast vzniku CL případně CLP. Zubní zárodek laterálního řezáku využívá materiál obou splývajících výběžků. Při nedostatku tkáně obličejových výběžků v místě vzniku rozštěpu může také dojít k narušení vyvíjejícího se zubního zárodku (Hovorakova et al., 2006). Výsledkem patologického vývoje zubního zárodku může být formace laterálního řezáku mediálně nebo laterálně od rozštěpu, přítomnost dvou laterálních řezáků v místě rozštěpu, případně ageneze laterálního řezáku v místě rozštěpu (Tsai et al., 1998). Laterální řezák může chybět i na straně, kde neprobíhá rozštěpová štěrbin (Ribeiro et al., 2002; Letra et al., 2007). Rozštěp patra vede k problémům s krmením, mluvením a narušené funkci měkkého patra a hltanu (Reiter et al., 2011; Shkoukani et al., 2013)

U dětí s rozštěpem rtu a patra bylo zjištěno, že i přes brzkou korekci vrozené vady mají další problémy, jako je trvalý kognitivní deficit nebo poruchy učení (Broder et al., 1998; Nopoulos et al., 2007).

Lidé s rozštěpy rtu a patra mají zvýšenou míru mortality až do věku 55 let, ve vysoké míře byly jako příčiny úmrtí uvedeny epileptické záchvaty, které mohou souviset s rozdílnou morfologií mozku jedinců s CLP od zdravých lidí (Christensen et al., 2004). Pomocí magnetické rezonance byly zjištěny rozdíly v morfologii mozku u dospělých mužů s nesyndromatickými rozštěpy rtu a patra. Mozek vykazoval signifikantní asymetrii na levé straně, která byla více postižena než pravá. Muži měli zvětšenou přední část mozku, přičemž souběžně měli zmenšenou posteriorní část mozku a mozeček. Toto zvětšení bylo patologické. Frontální a parietální lalok měly zvětšený objem šedé i bílé mozkové hmoty. Naopak největší úbytek hmoty postihl temporální lalok, kde nastal úbytek objemu šedé i bílé hmoty mozkové. Tyto nálezy odpovídají morfologii mozku u dalších vývojových

poruch řeči. Dále byl snížen objem mozkomíšního moku intracerebrálně i extracerebrálně (Nopoulos et al., 2002). Stejná vědecká skupina zkoumala rozdíly v distribuci mozkové tkáně i u dětí. Děti s nesyndromatickým CLP byly značně menší než kontrolní skupina dětí ve všech parametrech včetně výšky, obvodu hlavy, celkového množství tkáně mozkové zahrnující šedou i bílou hmotu mozku. Objem mozku i mozečku byl menší i po adjustaci na malou velikost těla. Preferenčně byl postižen frontální lalok, část bazálních ganglií (nucleus caudatus, putamen, globus pallidus). Chlapci měli oproti dívkám abnormality v distribuci tkáně, měli více kůry a méně bílé hmoty mozku. Přičemž bylo zjištěno, že zvětšení těchto částí kůry negativně koreluje s IQ (Nopoulos et al., 2007).

6.1 Porodní parametry a růstové odchylky od zdravé populace

Seth and McWilliams (1988) se ve své studii zaměřili na skupinku 77 dětí do dvou let věku. Z tohoto počtu se v 38 % vyskytoval rozštěp pouze sekundárního patra a 62 % dětí mělo rozštěp primárního i sekundárního patra. Rozdíl v porodní hmotnosti chlapců s rozštěpy a zdravé populace byl statisticky signifikantní, ve skutečnosti se průměry hmotností lišily o méně než jednu čtvrtinu kilogramu, přičemž tato hodnota není považována za klinicky významnou. Tento hmotnostní rozdíl, kdy zdraví chlapci měli v průměru větší hmotnost, zůstal konstantní i v dalších letech měření. Průměrná hmotnost se v případě dívek s rozštěpy a zdravých dívek při porodu nelišila. Měsíční hmotnostní přírůstky v dalších letech ukazovaly na mírně snížené průměrné hodnoty u dívek s rozštěpy, ale rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Při narození 52,5 % chlapců leželo pod 50. percentilem, ve věku 20. měsíců počet chlapců narostl na 82 %. V případě dívek jich bylo po porodu pod 50. percentilem 57,1 %, tento počet vzrostl po 20. měsíci věku na 66,7 % (Seth and McWilliams, 1988).

Menší rozdíly v porodní hmotnosti zaznamenal i výzkum da Silva Freitas et al. (2012), kdy chlapci vážili o 200 g méně než je průměrná porodní hmotnost populace, tento rozdíl vzrostl ve 3. měsíci na 900 g a poté začal klesat. Dívky vykazovaly podobný vzorec růstu jako chlapci, porodní hmotnost byla oproti hmotnosti průměrné populace o 200 g menší, poté klesla o dalších 750 g a po 3. měsíci se začala vyrovnávat hmotnosti zdravé populace (da Silva Freitas et al., 2012). Naopak porodní hmotnosti dívek a chlapců s rozštěpy byly stejné jako populační průměr hmotnosti v Estónsku, přestože 6,8 % dětí vážilo méně než 2500 g (Jagomagi et al., 2010). Na děti s nesyndromatickým

jednostranným rozštěpem rtu a patra se zaměřil kolektiv autorů Marques et al. (2009). Pro srovnání těchto dětí s referenčním souborem tvořícím národní standardy použil medián porodní délky, hmotnosti i obvodu hlavy. Děti byly stejným způsobem porovnávány až do 2 let. Z výsledků vyplývá, že děti obou pohlaví s rozštěpem měly menší rozměry těla než referenční soubor. Medián porodní délky dívek byl na 30. percentilu, avšak při měření v 1 roce již dívky dosahovaly stejného mediánu jako referenční skupina. Porodní hmotnost dívek byla na 27. P a i při posledním měření ve 2 letech zůstávala jejich hmotnost mírně pod populační normou na 47. P. Obvod hlavy byl vzhledem k menším proporcím také zmenšen, jeho hodnoty odpovídaly 33. P, ale již v 9. měsíci překonal 65. P. U chlapců byla porodní i poslední měřená délka na 36. P, což v dané studii spadalo mezi hraniční hodnoty normy. Signifikantně nižší byla u chlapců porodní hmotnost (na 28. P), přičemž ve 2 letech se dostali na 42. P. Obvod hlavy vykazoval stejný trend růstu jako u dívek. Tyto výsledky naznačují catch-up růst u všech měřených parametrů dívek, u chlapců pouze u hmotnosti a obvodu hlavy (Marques et al., 2009).

Růstové rozdíly mezi jednotlivými typy rozštěpů

Ranalli and Mazaheri (1975) se zaměřili na hmotnosti u dětí s různými typy rozštěpů od narození až do šesti let. Děti byly rozděleny do skupin podle typu a závažnosti rozštěpu (Tab. 1), přičemž nebyla nalezena žádná spojitost mezi typem či závažností rozštěpu a jejich vlivu na porodní délku či hmotnost dětí. Tyto parametry se nijak nelišily od hodnot zaznamenaných v kontrolní skupině. Poté děti mírně v růstu zaostávaly, do tří let u chlapců nastal catch-up růst, který je přiblížil k hodnotám zdravé populace. Dívky s rozštěpy se dostaly na hodnoty kontrolní skupiny později, průměrně do pěti let (Ranalli and Mazaheri, 1975). V dánské studii byla signifikantně větší porodní hmotnost u dětí, které měly CL (3364 g) a CLP (3291 g) oproti těm s rozštěpem patra (3238 g), do výpočtu těchto průměrů byly však zahrnuty i děti s dalšími anomáliemi. Poté co vyloučili děti s přidruženými vadami, byl tento rozdíl již nesignifikantní. U všech typů rozštěpů byla zaznamenána nižší porodní hmotnost vůči zdravé populaci Dánska (Luijsterburg and Vermeij-Keers, 2010). V další studii měli signifikantně rozdílné porodní hmotnosti od zdravé kontroly nejen novorozenci se syndromatickými typy rozštěpů, ale i novorozenci s nesyndromatickými typy (Nyarko et al., 2013).

Tab. 1 Porodní délka a hmotnost u dívek a chlapců rozdělená podle jednotlivých typů rozštěpů a jejich závažnosti v porovnání s kontrolní skupinou zdravých novorozenců (Ranalli and Mazaheri, 1975). (skupina A - CP, B - jednostranný CLP, C - oboustranný CLP, D - CL)

		A	B	C	D	kontrola
Chlapci	Délka [cm]	50,7	51,2	50,7	51,0	49,6
	Hmotnost [kg]	3,4	3,4	3,7	3,3	3,2
Dívky	Délka [cm]	49,5	50,2	50,8	49,9	49,0
	Hmotnost [kg]	3,0	3,1	3,9	3,3	3,2

Mírně odlišné hodnoty porodní hmotnosti ukazují Fraser and Calnan (1961), jež našli sníženou průměrnou porodní hmotnost oproti zdravým dětem v řádech desítek až stovek gramů (Tab. 2). Pouze porodní hmotnost dětí s rozštěpy rtu byla shodná s hmotností dětí v kontrolní skupině. Nejvíce patrný byl úbytek na váze u dívek s CP (Fraser and Calnan, 1961).

Tab. 2 Průměrné porodní hmotnosti rozdělené podle pohlaví, jednotlivých typů rozštěpů a porodní hmotnost kontrolní skupiny zdravých chlapců a dívek (Fraser and Calnan, 1961). (CL = rozštěp rtu, CP = rozštěp patra, CLP = rozštěp rtu a patra)

Průměrná hmotnost [g]	Typy rozštěpů			kontrola
	CL	CP	CLP	
Chlapci	3452	3416	3379	3452
Dívky	3316	3189	3234	3316

Na mnohem větším souboru čítajícím celkem 2815 dětí s nesyndromatickými orofaciálními rozštěpy pracovali Becker et al. (1998). Skupina obsahující jedince pouze s rozštěpem rtu neměla v žádném ze zkoumaných parametrů OR větší než 1 (nebylo zvýšené riziko vzniku CL). U dětí s rozštěpem patra byl zaznamenán značný nárůst OR, pokud měly nízkou porodní váhu pod 2500 g, porodní délku menší než 49 cm nebo obvod hlavy méně než 33 cm. Signifikantně korelovala nízká porodní hmotnost s výskytem CP, přičemž OR se rovnalo 1,47 pro obě pohlaví dohromady. Pouze ve skupině CLP byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl v nízké porodní hmotnosti pro každé pohlaví zvlášť, OR pro chlapce dosáhlo 1,56, avšak dívky měly OR vyšší 3,03. Vysoké OR bylo i u dětí s porodní délkou nižší než 48 cm, s nízkými hodnotami BMI a nepatrně zvýšené u dětí

s obvodem hlavy pod 33 cm. SGA děti měly signifikantně zvýšené hodnoty OR, pokud trpěly CLP nebo CP, ale předčasně narozené děti s rozštěpy se od kontrolní skupiny nijak nelišily (Becker et al., 1998).

Do 2,5 let věku sledovali Felix-Schollaart et al. (1992) hmotnost, délku/ výšku, obvod hlavy a zdravotní stav dětí s orofaciálními rozštěpy. Průměrná porodní hmotnost dětí ani váhový přírůstek se mezi čtyřmi skupinami: CL, CP, CLP, kontrola, signifikantně nelišil. Co se týče výšky dětí, byla nalezena interakce mezi typem rozštěpu včetně kontrol a pohlavím dítěte. Chlapci s CL byli vyšší než průměr populace, naopak dívky s CL se pohybovaly pod průměrnou hodnotou. Obráceně tomu bylo u dětí s CLP, chlapci měli podprůměrnou výšku a dívky byly nad průměrem. Mezi skupinami nebyl žádný signifikantní rozdíl v obvodu hlavy (Felix-Schollaart et al., 1992).

Podle studie Zarate et al. (2010) se porodní hmotnost, délka ani obvod hlavy nijak neodlišovaly od průměru populace ani mezi jednotlivými typy rozštěpů u dívek ani u chlapců (Tab. 3). V této studii byly děti sledovány až do pěti let. Přestože během celé studie nebyli zaznamenáni pacienti, kteří by neprospívali, tak predikovaná hmotnost a délka vynesena na percentilové stupnici byla během prvního roku života nižší, přičemž její minimum bylo během 5,2 měsíce respektive v 15. měsíci. Tento pokles byl posléze následován růstem, který začal ve dvanáctém měsíci pro váhu a ve 20. měsíci pro délku (Zarate et al., 2010).

Tab. 3 Porodní hmotnost, délka a obvod hlavy rozdělené do skupin podle jednotlivých typů rozštěpů a průměrný percentil těchto parametrů v 1. roce života (Zarate et al., 2010). (CL = rozštěp rtu, CP = rozštěp patra, CLP = rozštěp rtu a patra, P = percentil)

		Délka (cm)	Hmotnost (g)	Obvod hlavy (cm)
CP	Chlapci	50,4	3481,0	34,5
	Dívky	50,2	3338,4	34,5
Průměrný P.	1 rok	40,3 P	22,2 P	57,1 P
CL(P)	Chlapci	52,0	3489,6	35,1
	Dívky	50,8	3351,6	34,9
Průměrný P.	1 rok	39,7 P	35,1 P	47,3 P
CL	Chlapci	51,5	3412,8	35,8
	Dívky	51,2	3348,1	34,7
Průměrný P.	1 rok	50,9 P	37,5 P	43,2 P

Zhoršený růst dětí s nesyndromatickými rozštěpy během prvních dvou let života ve srovnání s referenční skupinou potvrzuje i studie Montagnoli et al. (2005). Děti, které měly ve zmíněné studii pouze rozštěp rtu, byly méně postižené než ty s rozštěpem patra či CLP. Procentuálně se pod 10. percentilem pro hmotnost pohybovalo ve skupině s CL 21,5 % chlapců a 27 % dívek. Ve stejné skupině odrážející délku na úrovni 10. P zůstávalo 15 % chlapců a 25,7 % dívek. Ve skupině CP se pod hranicí 10. P pro hmotnost vyskytlo 36,7 % chlapců a 33 % dívek, pro délku 33 % respektive 42,3 %. Skupina CLP vykazovala podobné procentuální zastoupení jako skupina CP, ačkoliv v rámci hmotnosti i délky chlapců byl mírný nárůst na 37,2 % resp. 35,8 %, u délky dívek byl zaznamenán pokles na 28,3%. Všechny hodnoty byly porovnávány s národními standardy pro danou populaci (Montagnoli et al., 2005).

Charakteristiky růstu od narození do 10 let sledovali Cunningham and Jerome (1997). Průměrná výška dívek i chlapců se stále pohybovala blízko 40. P. Dívky zůstávaly na percentilové škále níže než chlapci. Velké množství pacientů leželo pod 5. P, v ročních intervalech této hodnotě odpovídalo 60 % chlapců a 70 % dívek. Tento rozdíl od populačního průměru byl statisticky signifikantní. Rychlost růstu mezi 2,5 až 12 lety byla u 64 % mužských a pouze u 36 % ženských pacientů nadprůměrná. Během dětství vykazovala většina chlapců s CL/P nadprůměrnou růstovou rychlost, přestože výškou se pohybovali pod populačním průměrem. Dívky vykazovaly podprůměrnou výšku i růstovou rychlost. Proto se autoři domnívají, že dívky s orofaciálními rozštěpy mají větší riziko zkrácené postavy než chlapci, kteří spíše dosáhli průměrné výšky v populaci (Cunningham and Jerome, 1997).

7. KUŘE JAKO MODEL

Vývoj rtu a primárního patra kuřat je značně podobný vývoji těchto struktur u člověka. Kuře jako modelový organismus je využíván především pro vcelku lehký přístup a manipulaci kuřecím embryem, přitom kuřecí embryo po zásahu do vajíčka dále pokračuje ve svém vývoji (Mossey et al., 2009).

Vrchní a střední část obličeje se vyvíjí z několika hlavních primordií, jedná se o mediální nazální primordium, párová laterální nazální a maxilární primordia. Mediálnímu nazálnímu primordiu savců odpovídá u ptáků frontonazální primordium, později frontonazální výběžek. U všech amniot vzniká primární patro z mediálního nazálního resp. frontonazálního výběžku. Na rozdíl od savců nejsou laterální nazální primordia u ptáků zřetelně viditelná jako dvě vyboulení oddělená žlábkem, ale spíše souvisí s frontonazálním výběžkem a celá struktura vypadá jako jeden útvar. Dále se frontonazální výběžek u ptáků prodlužuje do tvaru budoucího zobáku. Rozštěp zobáku je následkem selhání srůstu frontonazálního výběžku s jedním či oběma výběžky maxilárními, podle toho zda se jedná o unilaterální resp. bilaterální rozštěp (Young et al., 2000). I u ptáků vzniká rozštěp zobáku během kritické periody jeho vývoje, u kuřat je to 2. až 5. embryonální den vývoje (Jelinek et al., 1983).

Při vzniku sekundárního patra jsou u kuřat nejprve patrné výrůstky po obou stranách maxilárních výběžků, které dávají vznik patrovým ploténkám. Patrové ploténky rostou na rozdíl od lidí již v horizontální poloze, ale nesplývají spolu. U kuřat je tedy rozštěp patra fyziologický a nejedná se o patologii (Ferguson, 1988).

8. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Orofaciální rozštěpy patří mezi vrozené vývojové vady, které jsou jedním z projevů narušeného zárodečného vývoje například z důvodu působení embryotoxických látek tzv. teratogenů. Mezi další projevy patří letalita či intrauterinní retardace růstu. Právě na poslední ze zmíněných možných projevů byla předložená práce zaměřena. Středem zájmu bylo určit, zda se spolu s výskytem orofaciálního rozštěpu vyskytuje u jedince i snížená porodní hmotnost oproti zdravým novorozencům bez této vrozené vady. Jedním z předpokladů/pracovních hypotéz bylo také to, že by mohla být nižší hmotnost jako indikátor intrauterinní růstové retardace spojená se závažností rozštěpu, což představoval typ rozštěpu - rozštěp rtu, rozštěp rtu a patra, rozštěp patra, a jejich formy tj.: jednostranná či oboustranná.

Byly stanoveny následující cíle práce:

1. Zjistit, zda se liší porodní hmotnosti novorozenců s rozštěpem a bez rozštěpu.
2. Zjistit, zda se liší porodní hmotnosti jedinců mezi jednotlivými typy rozštěpů a jestli se u daného typu rozštěpu odlišují porodní hmotnosti u jeho jednostranné či oboustranné podoby.
3. Zjistit, zda se liší porodní hmotnosti novorozenců se syndromatickým typem rozštěpu, konkrétně s Pierre-Robinovou sekvencí od zdravé populace.

První dva cíle se týkají pouze nesyndromatických orofaciálních rozštěpů. Protože nesyndromatické a syndromatické rozštěpy mohou mít rozdílnou etiologii vzniku rozštěpu, vliv faktoru způsobujícího tuto vývojovou vadu na porodní hmotnost může být u těchto druhů rozštěpu také odlišný. Byl tedy stanoven třetí cíl práce zaměřený na syndromatický typ rozštěpu.

Experimentální část na kuřecím modelu

V neposlední řadě byl na základě předpokladu snížené porodní hmotnosti u dětí s orofaciálními rozštěpy oproti těm zdravým navrhnut experiment na kuřecím modelu, přičemž rozštěp zobáku byl uměle vyvolán pomocí teratogenního činidla.

Cíl experimentální části práce:

1. Zjistit, jestli jsou odlišné hmotnosti kuřecích embryí s rozštěpem zobáku a bez rozštěpu zobáku.
2. Analyzovat a interpretovat výsledky experimentu na kuřecím modelu v kontextu s výsledky studie novorozenců.

9. MATERIÁL

9.1 Sběr dat pro analýzu pacientů s orofaciálními rozštěpy

9.1.1 Skupina pacientů s orofaciálními rozštěpy

Údaje o dětech s rozštěpy byly získávány v průběhu posledních 50 let z databáze Kliniky plastické chirurgie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Kartotéční data obsahují údaje zahrnující pohlaví, porodní hmotnost a délku novorozence, rok narození, národnost, délku těhotenství – gestační věk, paritu, typ orofaciálního rozštěpu a přítomnost a popis dalších přidružených vad. Celkově soubor rozštěpových pacientů obsahoval 5037 jedinců.

9.1.2 Kontrolní skupina zdravých novorozenců

Sběr dat pro kontrolní soubor zdravých novorozenců probíhal formou dotazníkového šetření. Bylo získáno 299 vyplněných dotazníků. Vzhledem k tomu, že počet rozštěpových pacientů byl neúměrně vyšší a bylo zde nerovnoměrné zastoupení v jednotlivých týdnech gestace ve srovnání se získanými údaji z dotazníkového šetření, bylo z důvodu statistické analýzy nutno počet údajů v kontrolní skupině navýšit. Kontrolní soubor byl doplněn o údaje 2672 novorozenců narozených v roce 2014 z databáze porodnice Fakultní nemocnice v Motole. Data z tohoto zdroje zahrnovala porodní hmotnosti, dokončený týden těhotenství, údaje o etnické příslušnosti, přítomnost vrozené vývojové vady a údaje o vícečetných těhotenstvích.

9.2 Kuřata použita v experimentální části

Porovnání hmotnosti bylo prováděno na zárodcích kura domácího (*Gallus gallus domesticus*). Kuře bylo masného typu COBB 500. Ve dvou nezávislých experimentech bylo použito celkem 260 oplozených vajec, podrobně (Tab. 4), která pocházela z líhně Habry od firmy XAVERgen, a.s., jejichž slepice jsou chovány v halách volně na podestýlce.

Tab. 4 Souhrn počtů použitých vajec při obou experimentech.

	experiment 1		experiment 2	
počet nasazených vajec	120		140	
	aplikováno	kontrola	aplikováno	kontrola
počet	49	50	26	23

10.METODY

10.1 Dotazníkové šetření

10.1.1 Tvorba dotazníku

V prvé řadě byl navržen název dotazníku, který vystihoval řešené téma. Hlavička dotazníku obsahovala důvod studie, účel využití vyplňovaných dat a informovala o anonymitě respondenta. Vlastní dotazník (Příloha 1) obsahoval otázky pro získání potřebných informací. V závěru byly uvedeny kontaktní údaje pro možnou korespondenci a poděkování respondentovi.

Pro lepší orientaci byly dotazy rozděleny do tří částí. První část zahrnovala otázky spojené s novorozencem. Druhá část obsahovala údaje o matce a třetí o otci. Dotazník obsahoval jak body pro získání dat ke zpracování, tak i otázky, které by jedince následně pomohli vyřadit ze studie (např. na základě cizí státní příslušnosti), či je případně rozřadit do skupin. Jako optimální maximum délky dotazníku byly zvoleny dvě strany, aby dotazovanému zabralo vyplňování dotazníku co nejméně času.

Jednotlivé získávané údaje v dotazníku byly vybrány na základě údajů, které již byly známy ze zpracovávaného souboru dat o pacientech s rozštěp. Jak již bylo zmíněno výše, do dotazníku bylo také nutné zařadit otázky, podle kterých bylo možné jedince ze studie případně vyloučit. Protože data měla zahrnovat pouze zdravé novorozence či děti, jejichž možná indispozice by nijak nenarušila výsledné parametry, byly zahrnuty také otázky týkající se zdraví novorozence a případných komplikací při porodu. Bral se ohled na srozumitelnost, délku i jednoduchost kladených otázek. Pokud byla otázka jakkoli složitější, byla doplněna příklady nebo zde byla uvedena i její jiná formulace. Pro snadnější vyplňování se u některých otázek vybíralo z předem daných odpovědí, způsob výběru byl označen hvězdičkou. U otevřených otázek byl dán dostatek místa pro adekvátní odpovědi v takové míře, která by zbytečně neprodloužila délku dotazníku.

Dotazník byl nejprve předložen kontrolní skupině respondentů, kteří uvedli své připomínky a nedostatky, podle nichž byl dotazník ještě více adaptován potřebám dotazovaných.

10.1.2 Forma šíření dotazníku

Dotazník byl šířen jednak v tištěné podobě, a jednak přes e-mail v elektronické podobě. Dotazník nebyl zveřejněn na internetu, protože i když byl anonymní, po jeho vyplnění obsahoval osobní informace, jako např. roky narození.

10.2 Experiment na kuřecím modelu

Pro potvrzení či nepotvrzení rozdílu porodní hmotnosti zjištěného u zdravých dětí a dětí s orofaciálními rozštěpy, byl navrhnut experiment na modelovém organismu. Úkolem experimentu bylo zjistit, zda bude nějaký trend či rozdíl v hmotnosti u plodu kura domácího s rozštěpy a bez rozštěpu. Cílem práce bylo zjistit, zda se liší hmotnosti u kuřecích embryí s rozštěpem zobáku a bez rozštěpu zobáku. V průběhu experimentu se postupovalo podle protokolu intraamniální aplikace okénkovou metodou.

10.2.1 Násadová vejce

Po převzetí násadových (oplozených) vajec byly zaznamenány údaje o jejich počtu, datu dodání a poté datu a času zahájení inkubace těchto vajec.

10.2.2 Inkubace

Vejce byla inkubována v inkubátoru Plus II firmy Gallenkamp při teplotě 37,5 °C. V horizontální poloze byla vejce nasazena ve stádiu ED 0 (embryonální den) do nosičů v podobě kovových mřížek s čtvercovými okénky. Při vkládání nosičů s vejci do inkubátoru bylo nutné postupovat opatrně, opřít nosič o zadní hranu, lehce ho nazvednout a teprve poté posouvat. Pokud by se nosič sunul po celé jeho ploše, zároveň s ním by se nepatříčně otáčela i vejce.

Během inkubace byla vejce o několik stupňů otáčena kolem podélné osy, aby se zabránilo přilepení cév na papírovou blánu (membrana papyracea), což by komplikovalo vytvoření aplikačního okénka a mohlo by dojít až k přetržení cév.

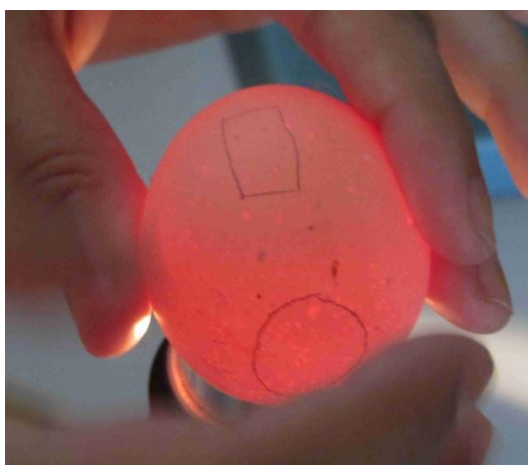
10.2.3 Otevírání vajec - vytvoření okének

Otevírání vajíček probíhalo na ED 2 za použití sterilních nástrojů, roušky a udržování semisterilního prostředí (místa manipulace s otevřenými vejci musela být vysterylizována etanolem, místa manipulace se zavřenými vejci nebyla sterilní).

Den před otvíráním vajíček bylo nutné vysterylizovat v peci sklíčka na překrytí okének, pinzety a velké Petriho misky při 180 °C po dobu 2 hodin.

Postup tvorby okének:

1. Poslední otočení vajíček proběhlo hodinu před jejich otvíráním.
2. V topném hnízdě byl rozpuštěn parafín potřebný pro ukotvení okének. Pinzety a vata byly vyvařeny v destilované vodě po dobu 30 minut. Pracovní plocha a nástroje na tvorbu okének (bodýlka, skalpely, pilníčky) byly vydezinfikovány pomocí 80% etanolu.
3. Za sterilních podmínek byl připraven fyziologický roztok skládající se z Natrium chloratum a destilované vody (10:3) na zakapávání zárodku po otevření vajíčka.
4. Na skořápce byla po prosvícení vyznačena obyčejnou tužkou poloha zárodku a vzduchová bublina (obr. 5). Elektrickou bruskou bylo v místě zárodku napilováno okénko (obr. 6).



Obr. 5 Prosvícené vajíčko se zvýrazněnou vzduchovou bublinou (kolečko) a budoucím okénkem (obdélník).

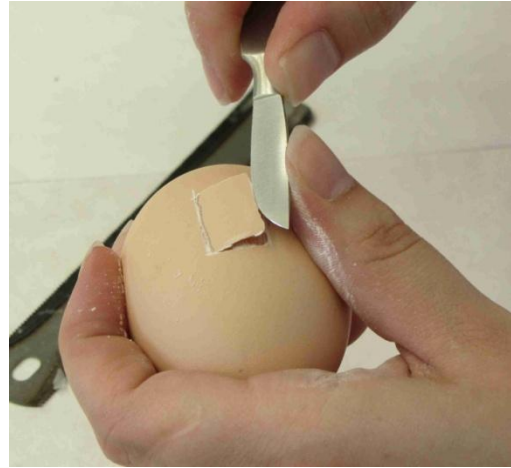


Obr. 6 Napilování okénka elektrickou bruskou.

5. Pomocí bodýlka bylo vajíčko v místě vzduchové bubliny propíchnuto, díky tomu by měl zárodek po odklopení skořápky klesnout. Pilníčkem bylo dopilováno okénko (obr. 7) tak, aby šlo pomocí skalpelu odklopit (obr. 8) a zároveň aby nedošlo k porušení papírové blány vajíčka.



Obr. 7 Jemné dopilování okénka pilníkem.



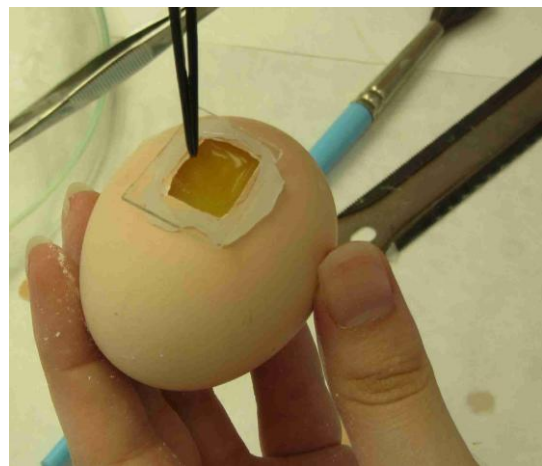
Obr. 8 Odklopení skořápky.

6. Po odklopení skořápky byla papírová blána zakápnuta fyziologickým roztokem, poté propíchnuta a po poklesu zárodku byla v rozsahu okénka pomocí pinzety zcela odstraněna.

7. Při uzavírání vajec byla nejprve parafínem zakápnuta dírka na tupém pólu vajíčka a následně byl kolem okénka vytvořen rámeček z parafínu (obr. 9). Na rámeček bylo přiloženo zahřáté sklíčko (obr. 10), které bylo následně důkladně utěsněno parafínem.



Obr. 9 Tvorba parafinového rámečku.



Obr. 10 Uzavření okénka sklíčkem.

8. Vajíčka byla umístěna zpět do inkubátoru okénkem nahoru. S těmito vejci již nebylo otáčeno.

10.2.4 Intraamniální aplikace

Intraamniální aplikace probíhala čtvrtý embryonální den za sterilních podmínek. Před aplikací byla vyražena embrya, která již byla mrtvá nebo jakkoli malformovaná.

1. Byl připraven fyziologický roztok a roztok aplikované látky způsobující rozštěpy u kuřat. Touto látkou byl Hydrocortison Valeant (výrobce VÚAB Pharma a.s.) pro nitrožilní a nitrosvalovou aplikaci. Hydrokortizon byl rozpuštěn za použití ultrazvuku v destilované vodě na koncentraci 10^{-4} resp. 10^{-3} .
2. Přiložením ohřátého pilníku, případně pinzetou byla z vajec odstraněna sklíčka. Před vlastní aplikací bylo určeno vývojové stádium kuřete (Hamburger and Hamilton, 1951). Podle vývojových stádií mohla být embrya rozdělena na kontrolní embrya bez aplikované látky a zárodky s aplikovanou látkou přibližně ve stejném poměru.
3. Do amniového vaku zárodku bylo za pomoci sterilní skleněné kalibrované mikropipety aplikováno pod binokulární lupou 10 μ l připraveného roztoku hydrokortizonu (obr. 11).



Obr. 11 Aplikace hydrokortizonu pomocí mikropipety.

4. Na každé vajíčko bylo napsáno číslo a bylo označeno, zda bylo aplikováno či patří do kontrol. Vývojová stádía byla zaznamenána do protokolu. Vajíčka zařazená jako kontrolní prošla stejným procesem, pouze bez aplikace roztoku hydrokortizonu.
5. Okénko bylo uzavřeno novým sklíčkem výše popsaným způsobem a vejce byla navracena do inkubátoru. Do devátého embryonálního dne (den odběru) probíhala kontrola vajec a uhynulá embrya byla postupně vyřazována, přičemž se zapisoval den úmrtí a vývojové stádium v době smrti.

10.2.5 Odběr zárodků

Na stádiu ED 9 proběhl odběr zárodků, protože na tomto vývojovém stádiu je již možné pod binokulární lupou bezpečně poznat vzniklé morfologické vývojové vady embrya, kam patří i rozštěpy.

Nejprve bylo odstraněno sklíčko a následně bylo vylamováním skořápky okénko rozšířeno. Pod binokulární lupou byl zkontrolován stav embrya, byly odstříženy cévy, pomocí skleněného háčku bylo embryo vyjmuto z vajíčka a přemístěno do kovové rakvičky (obr. 12). V rakvičkách bylo maximálně deset zárodků, ty byly do rakvičky umístěny podle pořadového čísla (původně uvedeného na skořápce) a jejich zařazení (kontrola/aplikované).

Hmotnost embrya byla zvážena v Petriho misce na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa (obr. 13). Těsně před samotným vážením byly zárodky pomocí háčku za krček vyndány. Přebytek amniové tekutiny byl odstraněn o buničinu. Jednotlivé hmotnosti zárodků byly zaznamenány do protokolu.



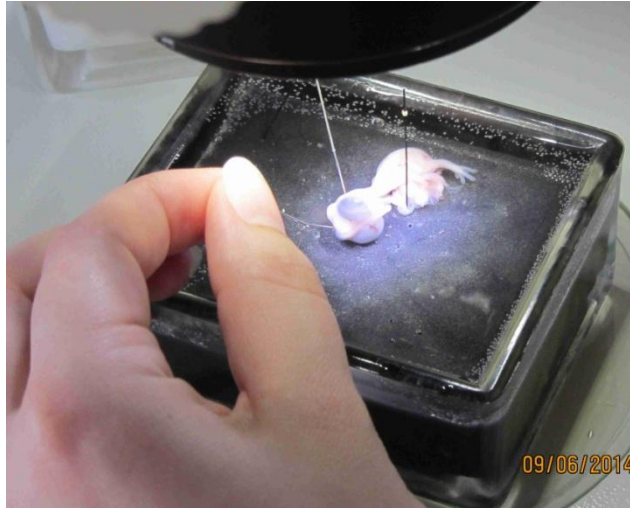
Obr. 12 Zárodky rozdělené do rakviček.



Obr. 13 Vážení hmotnosti zárodku.

Po zvážení byla kontrolní embrya přezkoumána a bylo zjišťováno, zda jsou fyziologické a nejsou u nich přítomné vývojové vady. U zárodků, kterým byl aplikován hydrokortizon, proběhlo určení typu rozštěpu a případně dalších vývojových vad.

Zárodky byly prohlíženy v místičce s parafínem pod binokulární lupou Leica MZ6 (obr. 14) a jedinci s vývojovými vadami zdokumentováni připojenou kamerou Leica EC3.



Obr. 14 Kontrola zárodku pod binokulární lupou.

10.3 Statistické zpracování dat

Data (údaje o novorozencích a experimentální data) byla zpracovávána za použití statistického programu R i386 3.0.2. (freeware) a NCSS 2004. K otestování dat z kartotéky i dat z experimentu byly použity statistické testy Shapiro-Wilkův test, F-test, t-test, analýza rozptylu, regresní analýza (Zvárová, 2004; Pavlík, 2005; Zvára, 2013).

10.3.1 Shapiro-Wilkův test normality dat

Prvotně bylo otestováno, zda mají data normální rozdělení (udané Gaussovou křivkou). Na tuto analýzu byl použit Shapiro-Wilkův test pro každý testovaný soubor zvlášť. Jednotlivé výsledky z každého otestovaného souboru dále určily další postup analýzy těchto dat. Normalita dat je předpokladem k použití parametrických testů.

Statistický software NCSS obsahuje i další testy normality, které nabízejí slovní vyhodnocení, zda je normalita dat přijata či není, na jejichž výsledky byl brán také zřetel.

H₀: rozdělení výběru je normální

H₁: rozdělení výběru není normální

$$\text{Testovací kritérium } W_n = \frac{\sum_{i=1}^{k_n} a_{n,i} \cdot (x_{(n-i+1)} - x_{(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (x_{(i)} - \bar{x})^2} \quad (10.1)$$

n .. rozsah výběru

x_i .. i-tá hodnota

$a_{n,i}$.. tabelovaná konstanta závislá na rozsahu výběru

k_n .. počet konstant $a_{n,i}$ (pro sudé $n \rightarrow n/2$, liché $(n+1)/2$)

\bar{x} .. aritmetický průměr výběru

H_0 je zamítána na hladině α jestliže: $W_n > CW_{n,\alpha}$

$CW_{n,\alpha}$ tabelovaná kritická hodnota Shapiro-Wilkova testu na hladině významnosti α

10.3.2 Fisherův F-test

Jedná se o test významnosti rozdílu dvou rozptylů, jehož výsledek určuje, který typ studentova T rozdělení bude použit.

Testují se následující hypotézy:

$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ (rozptyly obou rozdělení jsou shodné)

$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ (rozptyly obou rozdělení jsou rozdílné)

$$\text{Výběrový rozptyl} \quad s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (10.2)$$

$$\text{Testovací kritérium} \quad F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad s_1^2 > s_2^2 \quad (10.3)$$

H_0 je zamítána na hladině α jestliže:

$$F > F_{1-\frac{\alpha}{2}}(n_1 - 1; n_2 - 1) \quad (10.4)$$

$F_{1-\frac{\alpha}{2}}(n_1 - 1; n_2 - 1)$ kritická hodnota F-rozdělení na hladině významnosti α s počtem

stupňů volnosti n_1 (první výběr), n_2 (druhý výběr)

10.3.3 Dvouvýběrový nepárový t-test

V závislosti na charakteru nasbíraných dat byl použit dvouvýběrový nepárový t-test. Podmínkou použití tohoto testu je, že jsou porovnávány soubory na sobě nezávislé.

U nepárového t-testu je nutné zadat, zda jsou rozptyly rozdělení dat shodné či rozdílné, což je zjišťováno z výsledků výše zmíněného F testu.

Za předpokladu rovnosti rozptylů následoval další postup:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$ (střední hodnoty výběrů jsou shodné)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ (střední hodnoty výběrů jsou rozdílné)

společná směrodatná odchylka
$$S = \sqrt{\frac{(n_1-1) \cdot s_1^2 + (n_2-1) \cdot s_2^2}{n_1+n_2-2}} \quad (10.5)$$

Testovací kritérium
$$T = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (10.6)$$

H_0 se zamítá jestliže

$$T > t_{1-\frac{\alpha}{2}}(n_1 + n_2 - 2) \quad (10.7)$$

$t_{1-\frac{\alpha}{2}}(n_1 + n_2 - 2)$ kritická hodnota studentova t-rozdělení na hladině významnosti α s počtem stupňů volnosti $(n_1 + n_2 - 2)$

10.3.4 Analýza rozptylu

Analýza rozptylu byla použita pro případy, kdy bylo třeba porovnat více náhodných výběrů mezi sebou. Touto metodou lze porovnávat výběry pro jednotlivé úrovně jednoho, či více faktorů. Tato statistická metoda předpokládá nezávislost a normalitu dat v jednotlivých výběrech a rovnost rozptylů jednotlivých výběrů. Rovnost rozptylů byla testována v programu pomocí Levenova testu. (Normalitu dat lze testovat před zahájením testu na jednotlivých výběrech i po jeho proběhnutí, kdy se testuje normalita dat náhodné chyby (rezidua)).

Testují se následující hypotézy:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ (střední hodnoty jednotlivých souborů jsou shodné)

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \neq \mu_n$ (alespoň dvě střední hodnoty se liší)

Princip této metody je založen na zápisu kterékoliv hodnoty do podoby:

$$Y_{ij} = \mu_i + e_{ij} = \mu + a_i + e_{ij} \quad (10.8)$$

kde: μ_i je střední hodnota i-tého náhodného výběru

μ je celková střední hodnota celého souboru dat

a_i je parametr vyjadřující vliv i-tého náhodného výběru na celý soubor

e_{ij} je parametr vyjadřující náhodné vlivy a má rozdělení $N(0, \sigma^2)$.

Z tohoto vztahu lze odvodit rozložení součtu čtverců odchylek celého souboru:

$$S_c = S_a + S_r \quad (10.9)$$

kde: S_c je celkový součet čtverců odchylek souboru

S_a je součet čtverců odchylek středních hodnot jednotlivých náhodných výběru od celkové střední hodnoty

S_r je součet čtverců daný náhodnými vlivy v daném náhodném výběru.

Poměr takto získaných čtverců odchylek se porovná s kritickou hodnotou F testu.

$$H_0 \text{ je zamítnuta na hladině } \alpha \text{ jestliže: } F = \frac{s_a/df_a}{s_r/df_r} > F_{1-\alpha}(df_a; df_r) \quad (10.10)$$

kde df_a, df_r jsou počty stupňů volnosti

$F_{1-\alpha}(df_a; df_r)$ kritická hodnota F-rozdělení

(F = Odhad rozptylu založený na výběrových průměrech/ Odhad rozptylu založený na pozorovaných hodnotách)

Výše uvedený postup je určen pro porovnání více úrovní jednoho faktoru tzv. jednoduché třídění. Pro výpočet analýz rozptylu dvojného a vyššího třídění, kde je 2 a více faktorů, se výpočet komplikuje a přesouvá do vyšší dimenze prostoru (2D pro jednoduché třídění, 3D pro dvojné,...). Pro každý další faktor se do rovnice (10.8) zavádí nový parametr např. b_i , vyjadřující vliv daného faktoru a dále také λ_{ab} vyjadřující interakce mezi těmito faktory (rovnice lze definovat jako lineární model). V případě dvojného třídění se přidává navíc hypotéza, že existuje interakce mezi prvním a druhým faktorem, které ovlivňují hodnotu závisle proměnné Y_{ij} . Tyto interakce vyjadřují neaditivní vliv dvou faktorů, pokud interakce přítomny nejsou, je vliv těchto dvou faktorů aditivní. Tyto výpočty již přesahují rámeček této práce.

Pro zjištění vzájemných rozdílů mezi středními hodnotami skupin byly použity metody mnohonásobného porovnávání. V této práci bylo využito metod následného (post-hoc) porovnávání podle Wyszynski et al. (2003). Byla použita Tukeyova metoda HSD a speciální typ porovnávání s kontrolou, kdy se střední hodnoty jednotlivých skupin neporovnávají všechny mezi sebou, ale jednotlivé skupiny se porovnávají s kontrolní skupinou.

10.3.5 Regresní analýza

Regresní analýza je metodou, umožňující nalézt matematické vyjádření vztahu mezi závisle proměnnou/proměnnými a nezávisle proměnnou. Regresní analýzy lze rozlišit podle počtu závislých proměnných na jednoduchou regresi (1 proměnná) a vícenásobnou regresi (2 a více proměnných). Dále se rozlišuje podle použitého modelu proložení dat, kdy nejjednoduššími příklady jsou modely lineární regrese s rovnicí $y = b_1x + b_0$, či regrese kvadratická $y = b_2x^2 + b_1x + b_0$. Principem výpočtu regrese je odhad parametrů b_i nejčastěji metodou nejmenších čtverců. Ta určí funkci s nejmenším součtem čtverců odchylek mezi body z testovaného souboru a danou vypočtenou funkcí. Pro lineární regresi se parametr b_1 nazývá směrnici přímky a udává, o kolik se zvýší hodnota závisle proměnné, jestliže se nezávisle proměnná navýší o jednotku. Parametr b_0 se nazývá úsek a udává průsečík vypočtené funkce s osou y .

Základní předpoklady použití metody lineární regresní analýzy jsou spojeny s rezidui, která musí mít normální rozdělení, jejich střední hodnotu rovnou nule a rozptyl konstantní. Tato metoda byla aplikována za účelem zjistit závislost či nezávislost porodní hmotnosti novorozence na roce, ve kterém se narodil. Za tímto účelem bylo potřeba rozhodnout, zda je, či není parametr b_1 ve vypočteném modelu signifikantní.

H0: $b_1 = 0$ (směrnice je rovna nule), (hmotnost je na roce narození nezávislá)

H1: $b_1 \neq 0$ (směrnice je odlišná od nuly), (hmotnost je na roce narození závislá)

Pro tento výpočet je nutné znát standardní chybu určení parametru b_1 .

$$s_{b_1} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2 / n - 2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (10.11)$$

kde y_i je hodnota závislé proměnné

\hat{y}_i je hodnota závislé proměnné vypočtená z regresního modelu

n je počet dvojic hodnot $[x, y]$

x_i je hodnota nezávisle proměnné

\bar{x} je průměrná hodnota nezávisle proměnné

Tato hodnota se použije pro výpočet testovací statistiky T , která se porovná s kritickou hodnotou studentova rozdělení.

$$T = \frac{|b_1|}{s_{b_1}} > t_{1-\alpha/2}(n-2) \text{ jestliže platí, zamítá se } H_0 \quad (10.12)$$

10.4 Grafické diagnostiky

Předmětem výstupů byly následující grafické diagnostiky:

- **Q-Q graf (plot)** - pravděpodobnostní diagram sloužící k zjištění rozložení dat - jejich normality a odlehlých pozorování. Jsou zde vyneseny proti sobě kvantily odpovídající skutečným pozorováním a kvantily teoretické přibližné normálnímu rozdělení. Pro body ležící na přímce či blízko ní můžeme předpokládat, že je normalita dat zachována. Body ležící zcela mimo přímku, či ve vymezených mezích odpovídají odlehlým pozorováním.
- **Histogram** - jedná se o graf, kde na ose x jsou znázorněny pozorované hodnoty rozdělené do tříd o vhodném rozsahu. Na ose y je hustota hodnot v dané třídě, z které lze vypočítat relativní četnost vynásobením šířkou sloupce. Při normálním rozdělení dat by měl histogram přibližně odpovídat Gaussově křivce.
- **Krabicový graf (Box plot)** - graf znázorňující rozložení hodnot daného souboru. Základem grafu je obdélník o šířce kvartilového rozpětí. Uvnitř obdélníku je příčka znázorňující medián. Ze stran obdélníku vybíhají tykadla, která sahají k největšímu a nejmenšímu pozorování, za podmínky, že není překročen 1,5 násobek kvartilového rozpětí od příslušného kvartilu. Jestliže se hodnota nachází za tykadlem, označuje se jako odlehlá. Hodnota se označuje za extrémně odlehlou, jestliže je vzdálena trojnásobek kvartilového rozpětí od daného kvartilu.
- **Plot of means** - jsou zde vyneseny proti sobě hodnoty průměru dané číselné proměnné pro každou zvolenou kategorii. V případě, že se vnesené intervaly spolehlivosti jednotlivých kategorií nepřekrývají, je rozdíl mezi průměry statisticky významný.

11. VÝSLEDKY

Předpokladem předložené studie bylo, že pacienti s orofaciálním rozštěpem mohou mít nižší porodní hmotnost jako další z projevů embryotoxicity. Syndromatické a nesyndromatické orofaciální rozštěpy mohou mít odlišnou etiologii vzniku. Proto lze předpokládat, že i mezi těmito skupinami bude existovat rozdíl v porodních hmotnostech. Skupiny pacientů s nesyndromatickými a syndromatickými rozštěpy (skupina pacientů s Pierre-Robinovou sekvencí) byly hodnoceny zvlášť vůči kontrolnímu souboru zdravých dětí. U všech souborů byla testována normalita dat. U každého jednotlivého souboru bylo nejprve nutné otestovat, zda se porodní hmotnosti signifikantně liší mezi pohlavími. V další analýze pak byl tento rozdíl zohledněn samostatným hodnocením pro každé pohlaví. Pro korektní srovnávací analýzu s kontrolní skupinou bylo v rámci skupiny pacientů s nesyndromatickými rozštěpy také nutné zjistit, zda nedošlo za posledních 50 let (doba sběru materiálu v této skupině) k přirozenému nárůstu porodní hmotnosti, proto byl testován sekulární trend. Dále byla provedena statistická analýza vedoucí ke zjištění odpovědí na stanovené cíle práce.

11.1 Analýza pacientů s orofaciálními rozštěpy

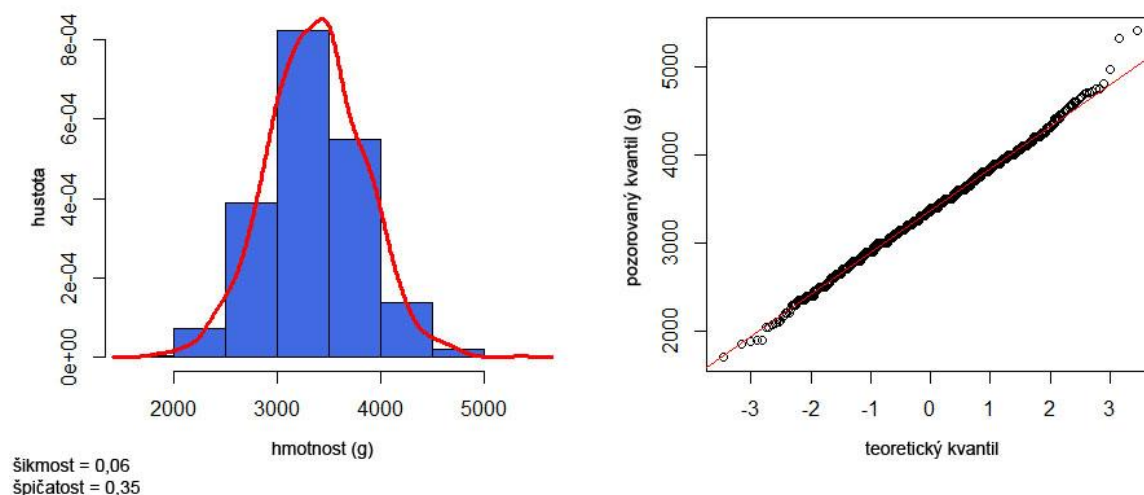
11.1.1 Základní statistická analýza dat

Nejprve bylo nutné zjistit, zda se liší porodní hmotnosti mezi dívkami a chlapci v této skupině. Data byla podrobena základní popisné analýze, pro oba výběry zvlášť (Tab. 5), v které udaná šikmost nelišící se od 0 pro obě pohlaví značí zachování symetrického rozdělení, které přibližně odpovídá průběhu Gaussovy křivky. Špičatost se v obou výběrech blíží k normálnímu rozdělení. Přestože tyto dva parametry (šikmost a špičatost) se blíží normálnímu rozdělení zastoupeného v obou případech hodnotou 0, test normality zamítá normalitu dat u chlapců na základě p-hodnoty 0,005741 a u dívek 0,04599 na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tab. 5).

Tab. 5 Souhrn výsledků pro chlapce a dívky s orofaciálními rozštěpy zahrnující základní popisné statistiky polohy, variability a tvaru rozdělení, doplněné o test normality.

	Chlapci	Dívky
popisná statistika polohy (g)		
minimum	1700	1750
dolní kvartil	3050	2900
medián	3380	3200
průměr	3370	3218
horní kvartil	3690	3500
maximum	5400	4950
popisná statistika variability		
směrodatná odchylka	475,2194	449,3487
rozptyl	225833,5	201914,3
tvar rozdělení		
šikmost	0,06179551	0,03661095
špičatost	0,3549634	0,1934972
Shapiro-Wilkův test normality		
hladina významnosti stanovena na $\alpha = 0,05$	normalita dat zamítnuta $p = 0,005741^*$	normalita dat zamítnuta $p = 0,04599^*$

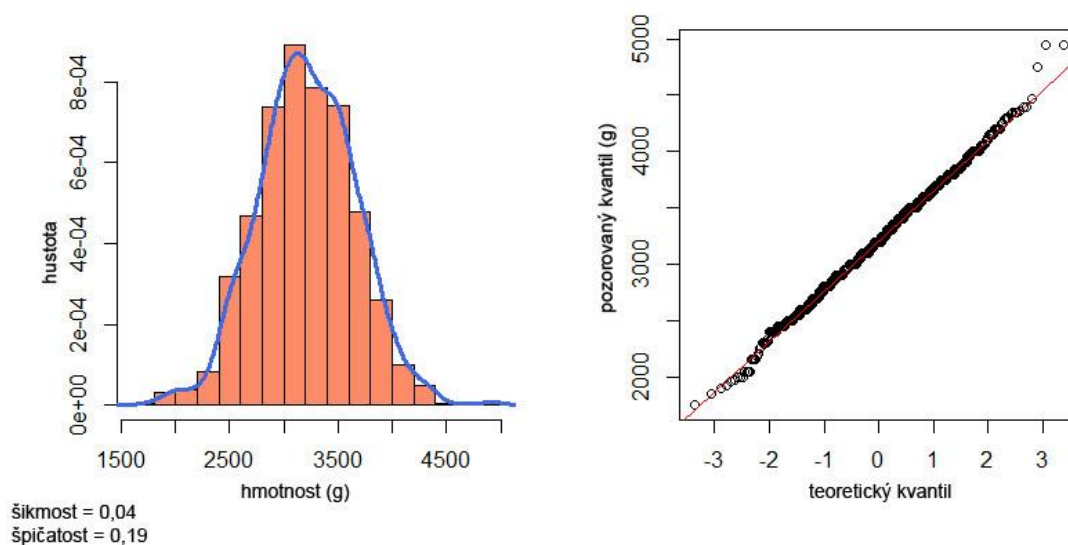
Grafická diagnostika chlapců s rozštěpy se zamítnutou normalitou dat



Graf 1 Praviděpodobnostní rozdělení dat pro skupinu chlapců s orofaciálními rozštěpy.

Zhodnocení grafické diagnostiky: Na histogramu není patrný důvod k zamítnutí normality dat, které vychází z Shapiro-Wilkova testu (Graf 1). Q-Q graf zobrazuje dvě hodnoty nejvíce vzdálené od ideálního rozložení, podle tohoto grafu mohou právě tyto 2 hodnoty být důvodem k zamítnutí normality dat (Graf 1).

Grafická diagnostika dívek s rozštěpy se zamítnutou normalitou dat



Graf 2 Pravděpodobnostní rozdělení dat pro skupinu dívek s orofaciálními rozštěpy.

Zhodnocení grafické diagnostiky: Z histogramu nelze přesně určit důvod zamítnutí normality dat, je zde patrné zastoupení více pozorování ve větších hmotnostech (Graf 2). Q-Q graf ukazuje několik odlehlých hodnot, které mohou být důvodem výsledku testu normality (Graf 2).

Závěr zhodnocení základní statistické analýzy dat a grafických diagnostik pro obě pohlaví: Pro chlapce i dívky s rozštěpy byla zamítnuta na základě Shapiro-Wilkova testu normalita dat. Z Q-Q grafů obou pohlaví jsou viditelné body, které by mohly ovlivnit výsledek testu a následné použití parametrických testů, které mají větší sílu testování (Graf 1, 2).

Ze souboru dat pro chlapce byly na základě Grubbsova testu pro extrémně odlehlé hodnoty vyřazeny 2 nejvzdálenější hodnoty s p-hodnotou 0,01713 pro první, resp. $p = 0,03292$ pro druhou nejvyšší hodnotu.

U dívek nebyla nejvyšší hodnota ohodnocena Grubbsovým testem jako extrémně odlehlá ($p = 0,07408$). Byl použit výpočet na určení odlehlých pozorování, podle kterého byla nejvyšší hodnota vyhodnocena jako odlehlá a byla odebrána ze souboru.

Vzorec pro výpočet odlehlé hodnoty

odlehlá hodnota > kvartilové rozpětí * 1,5 + horní kvartil (75%)

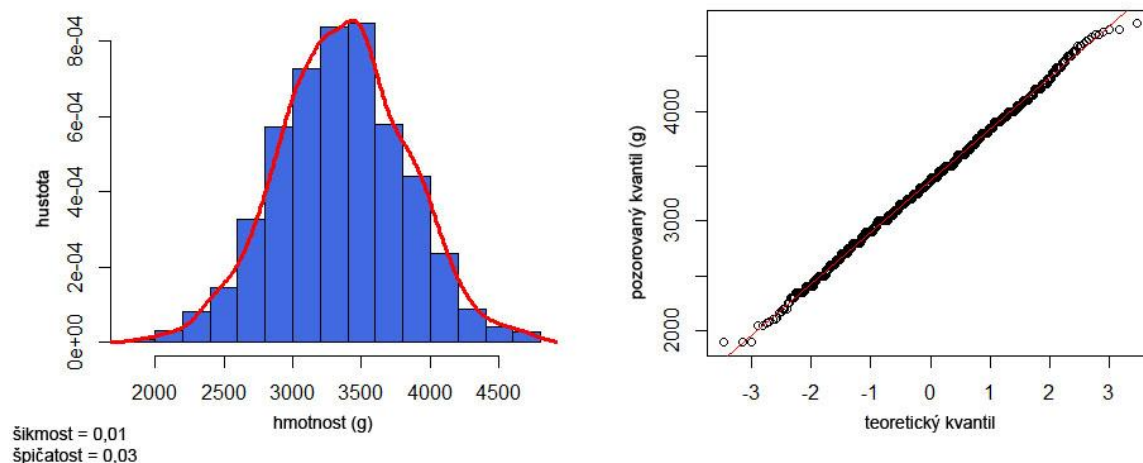
Oba výběry byly po vyřazení odlehlých hodnot podrobeny základní popisné statistice, jejíž výsledky jsou uvedené v Tab. 6 a vizualizovány pomocí grafické diagnostiky (Graf 3, 4).

Tab. 6 Základní statistická analýza pacientů s orofaciálními rozštěpy po vyřazení odlehlých hodnot.

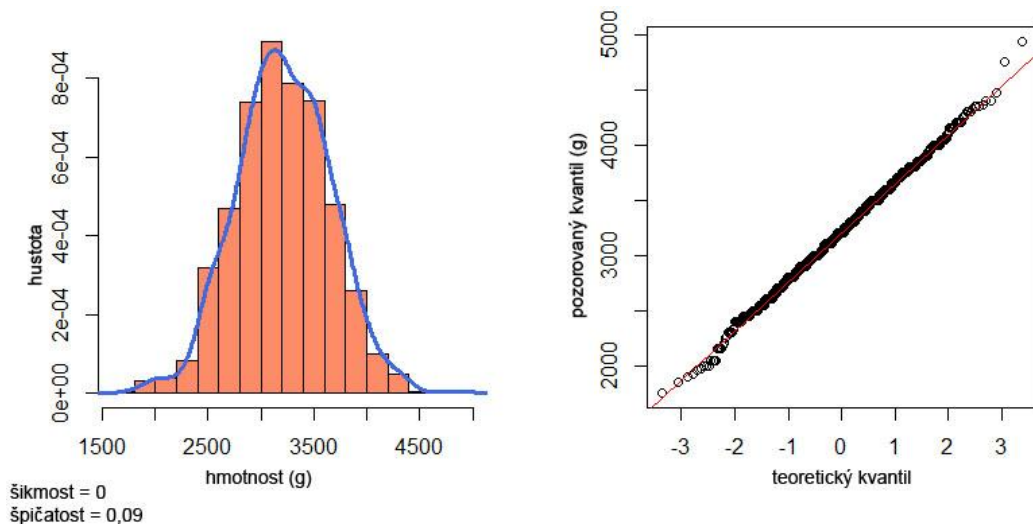
	Chlapci	Dívky
popisná statistika polohy (g)		
minimum	1700	1750
dolní kvartil	3050	2900
medián	3380	3200
průměr	3368	3217
horní kvartil	3690	3500
maximum	4960	4940
popisná statistika variability		
směrodatná odchylka	467,085	446,992
rozptyl	218168,4	199801,9
tvar rozdělení		
šikmost	0,01221979	0,002133975
špičatost	0,02598479	0,09395835
Shapiro-Wilkův test normality		
hladina významnosti stanovena na $\alpha = 0,05$	normalita dat přijata $p = 0,09287$	normalita dat přijata $p = 0,1504$

Po vyřazení odlehlých hodnot se zmenšily v obou souborech směrodatné odchylky, na šikmosti i špičatosti je viditelné ještě větší přiblížení normálnímu rozložení určenému Gaussovou křivkou. Normalita dat není u chlapců zamítnuta na $p = 0,09287$ a u dívek na p -hodnotě 0,1504.

Grafické diagnostiky po vyřazení odlehlých hodnot pro obě pohlaví.



Graf 3 Pravděpodobnostní rozdělení dat pro skupinu chlapců s orofaciálními rozštěpy po vyřazení odlehlých hodnot.



Graf 4 Pravděpodobnostní rozdělení dat pro skupinu dívek s orofaciálními rozštěpy po vyřazení odlehlých hodnot.

Závěr grafických diagnostik po vyřazení odlehlých hodnot:

Z grafické diagnostiky je patrné mírné vyrovnaní křivky v oblasti vyšších hodnot kolem 4500 g (Graf 3, 4).

Epidemiologie výskytu rozštěpů v závislosti na pohlaví na dostupném souboru dat

V dostupném souboru mají častěji CL (61,7 %) a CLP (67,5 %) chlapci ve srovnání s dívkami (Tab. 7). Dívky mají větší počet zastoupení ve skupině rozštěpů patra (55,4 %), (Tab. 7).

Tab. 7 Procentuální zastoupení počtu chlapců a dívek s jednotlivými typy rozštěpů.

Rozštěp	Dívky %	Chlapci %	Celkem %	Počet
CL	38,3	61,7	100	862
CLP	32,5	67,5	100	1259
CP	55,4	44,5	100	1062

11.1.2 Analýza rozdílu středních hodnot pro pohlaví u pacientů s rozštěpy

Nejprve bylo testováno za pomoci kontingenční tabulky a Pearsonova chí-kvadrát testu rozložení dat mezi pohlavími na základě týdnu narození. Na p-hodnotě 0,07634 ($\alpha = 0,05$) nebyl porušen předpoklad, že jsou hmotnosti v rámci gestačních týdnů stejně

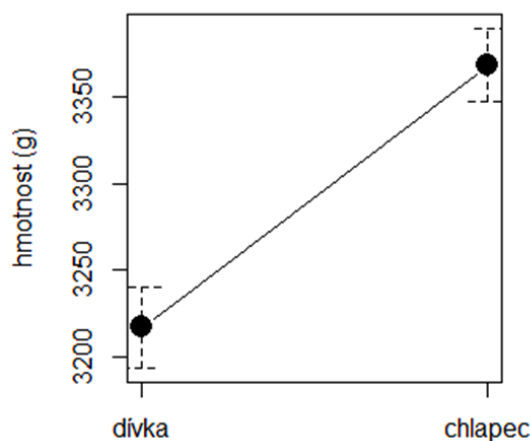
zastoupeny u obou pohlaví. Data byla otestována pomocí F-testu na shodnost rozptylů. Na základě $p = 0,04126$ byla zamítnuta shodnost rozptylů, další analýza byla proto provedena pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu pro odlišné rozptyly s oboustrannou alternativou.

H_0 : dívky - chlapci = 0, hmotnosti dívek a chlapců se neliší

H_1 : dívky - chlapci \neq 0, hmotnosti dívek a chlapců se liší

Tab. 8 Výsledky dvouvýběrového nepárového t-testu pro rozdíl porodní hmotnosti mezi pohlavími u dětí s rozštěpy.

Skupina	chlapci	dívky
průměr (g)	3368	3217
testovací kritérium T	9,1536	
stupně volnosti	2939	
p - hodnota	2,2e-16* (Zamítá se H_0)	
95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	<118,3273; 182,8399>	



Graf 5 Rozdíl v porodní hmotnosti mezi pohlavími u skupiny dětí s orofaciálními rozštěpy.

Závěr analýzy středních hodnot pro pohlaví u pacientů s orofaciálními rozštěpy:

Byla zamítnuta nulová hypotéza na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($p = 2,2e-16$), (Tab. 8). Porodní hmotnosti se u dívek a chlapců s orofaciálními rozštěpy liší. 95% intervaly spolehlivosti součástí výstupu plot of means se nepřekrývají (Graf 5), rozdíl mezi průměry je tedy statisticky významný. Chlapci mají statisticky významně větší porodní hmotnosti oproti dívkám a je tedy nutné testovat obě pohlaví zvlášť.

11.1.3 Sekulární trend

U skupiny pacientů s orofaciálními rozštěpy, která byla sbírána od roku 1964 do roku 2011, byla testována možnost projevu sekulárního trendu u porodní hmotnosti. Předpoklad byl, že porodní hmotnost v pozdějším období se oproti minulým letům mohla zvýšit a bylo třeba ověřit, zda bude možné použít soubor za celé časové období. Trend byl testován pomocí regresní analýzy a pomocí analýzy rozptylu. Všechny předpoklady pro použití těchto testů byly splněny. V případě analýzy rozptylu byla proti sobě konfrontována dvě desetiletá období (1964-1974 vs. 2001-2011).

Tab. 9 Průměrná porodní hmotnost a mediány za dvě testovaná desetiletá období.

		1964-1974	2001-2011
Dívky	průměr (g)	3222	3245
	medián (g)	3200	3230
Chlapci	průměr (g)	3389	3400
	medián (g)	3362	3360

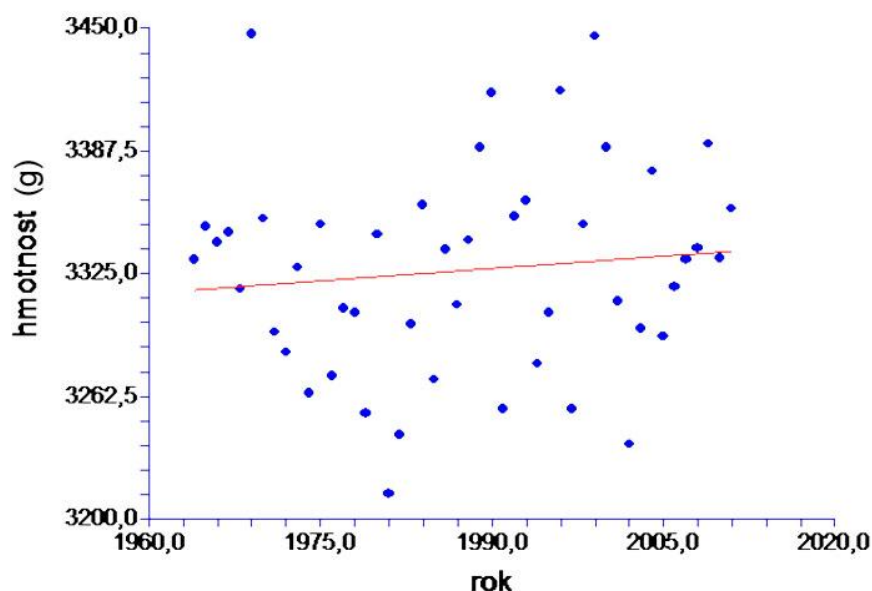
Ve výstupu analýzy rozptylu pro rozdíl porodní hmotnosti, mezi dvěma desetiletými obdobími, není patrný žádný statisticky signifikantní rozdíl u dívek ($p = 0,492248$) ani chlapců ($p = 0,157197$) mezi hmotnostmi dětí narozených v jiných obdobích (viz Příloha 2 a Příloha 3). Porodní hmotnost tedy nevykazuje nárůst v posledním desetiletí sběru dat ve srovnání s prvním desetiletím ani u jednoho pohlaví.

Regresní analýza

Regresní analýzou byla získána rovnice pro model přímky ve tvaru:

$$\text{hmotnost} = 2491,5429 + 0,4201 \cdot \text{rok_narození}$$

Hodnota směrnice 0,4201 ukazuje, že porodní hmotnost se za rok v průměru zvýšila právě o 0,4201 g (za celé zkoumané období přibližně o 20 g). Pro tuto rovnici byl vypočten koeficient determinace $R^2 = 0,0125$, který indikuje, že model vysvětluje pouze 1 % variability dat. Nízká hodnota R^2 je v souladu grafickou analýzou (Graf 6), kde nepozorujeme žádnou významnou závislost. Z tohoto důvodu byl proveden test významnosti směrnice (Tab. 10), na jehož základě nelze zamítnout, že je směrnice rovna nule ($p = 0,4498$).



Graf 6 Grafické znázornění regresního modelu.

Tab. 10 Výsledné hodnoty testu významnosti směrnice.

testovací kritérium T	p-hodnota	95% interval spolehlivosti pro směrnici
0,7623	0,4498	<-0,6892; 1,5294>

Závěry výsledků sekulárního trendu

Při srovnání dvou desetiletých období ani při srovnání celého časového úseku dostupného souboru dat, nebyla nalezena statisticky signifikantní změna v porodní hmotnosti. Sekulární trend zvyšování porodní hmotnosti v čase není patrný. V dalším vyhodnocování mohou tedy být použita data pacientů s rozštěpy za celý nasbíraný časový úsek.

11.2 Kontrolní skupina zdravých dětí

Kontrolní soubor zdravých dětí nasbíraný pomocí dotazníku obsahoval 299 jedinců. Tento soubor se ukázal pro další analýzu jako nedostatečný, jednak kvůli nízkému počtu hodnot a dále z důvodu jejich nerovnoměrného zastoupení v jednotlivých týdnech gestace. Konkrétně v 37. – 39. týdnu gestace byl nízký počet jedinců oproti zastoupení v těchto týdnech v rozštěpové skupině.

Kontrolní soubor bylo nutno navýšit o získaná data novorozenců narozených v roce 2014 ve Fakultní nemocnici v Motole, který obsahoval 2672 jedinců. O sloučení obou datových souborů (dotazníkového a nově získaného) bylo rozhodnuto na základě těchto parametrů: oba soubory reprezentují stejný statistický výběr (v souborech jsou shodné proměnné), odpovídají stejnému typu pravděpodobnostního rozdělení (splněn předpoklad normálního rozdělení dat), rozdělení má stejné parametry normálního rozdělení - tedy střední hodnotu a rozptyl. Shodnost rozptylů ověřena F-testem a rovnost středních hodnot byla ověřena nepárovým dvouvýběrovým t-testem (Tab. 11). Poté došlo k sloučení těchto souborů.

Tab. 11 Výsledky testů vedoucí ke sloučení dvou souborů do kontrolní skupiny.

	testovací hodnota	p-hodnota
F-test	1,0566	0,5373
t-test	1,473	0,1409

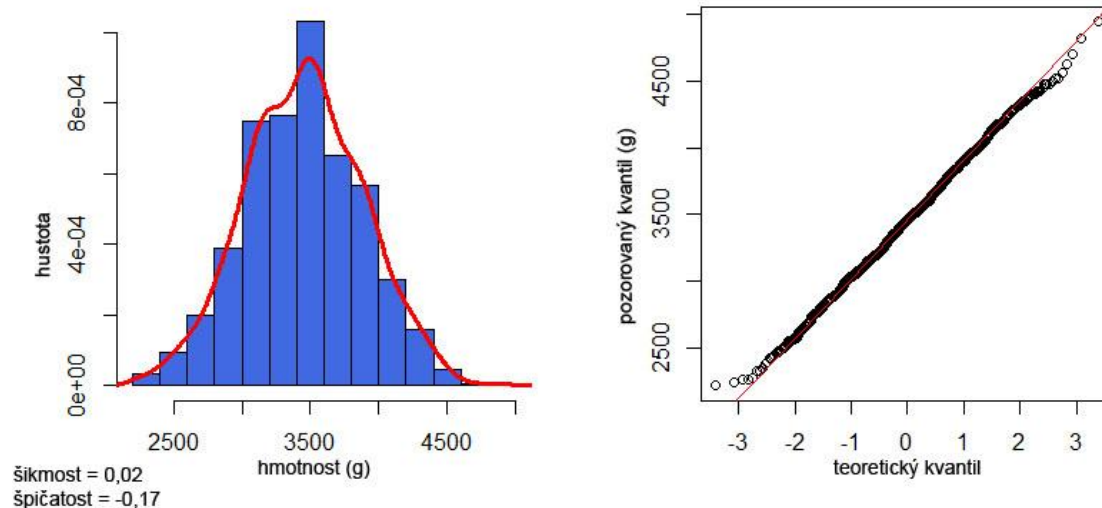
11.2.1 Základní statistická a grafická analýza dat pro skupinu zdravých dětí.

Po sloučení obou výběrů byl kontrolní soubor dat, shodně se skupinou pacientů s orofaciálními rozštěpy, podroben popisné analýze dat (Tab. 12).

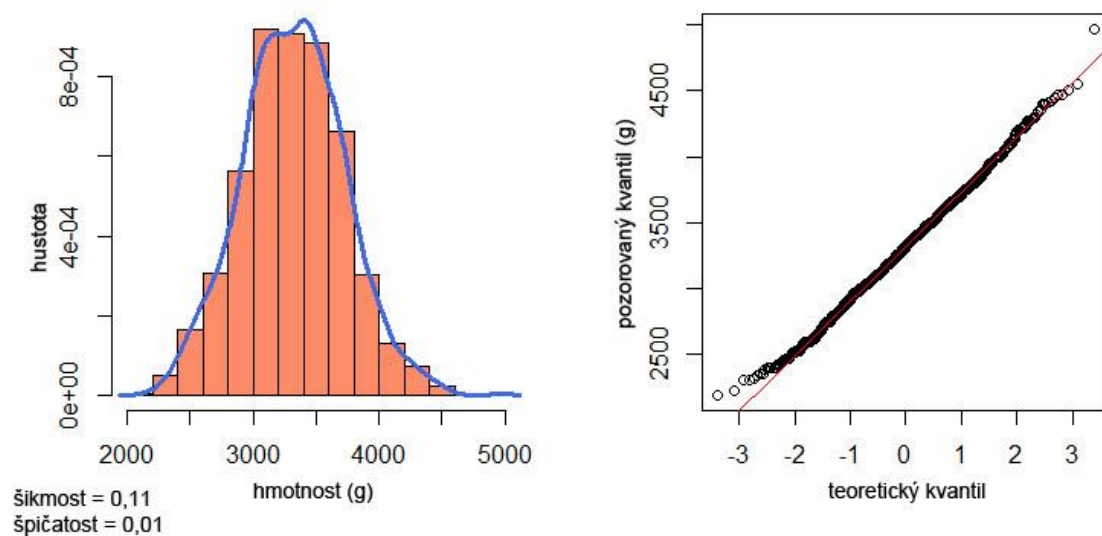
Tab. 12 Souhrn výsledků pro zdravé chlapce a dívky v kontrolní skupině zahrnující základní popisné statistiky polohy, variability a tvaru rozdělení, doplněné o test normality.

	Chlapci	Dívky
popisná statistika polohy (g)		
minimum	2220	2190
dolní kvartil	3160	3040
medián	3460	3320
průměr	3457	3320
horní kvartil	3760	3600
maximum	4940	4970
popisná statistika variability		
směrodatná odchylka	433,414	406,3461
rozptyl	187847,7	165117,1
tvar rozdělení		
šikmost	0,02302434	0,1102770253
špičatost	-0,1668811	0,008129871
Shapiro-Wilkův test normality		
hladina významnosti stanovena na $\alpha = 0,05$	normalita dat přijata p = 0,4551	normalita dat přijata p = 0,06184

Grafická diagnostika kontrolní skupiny



Graf 7 Pravděpodobnostní rozdělení dat pro skupinu zdravých chlapců.



Graf 8 Pravděpodobnostní rozdělení dat pro skupinu zdravých dívek.

Závěr zhodnocení základní statistické analýzy dat a grafických diagnostik:

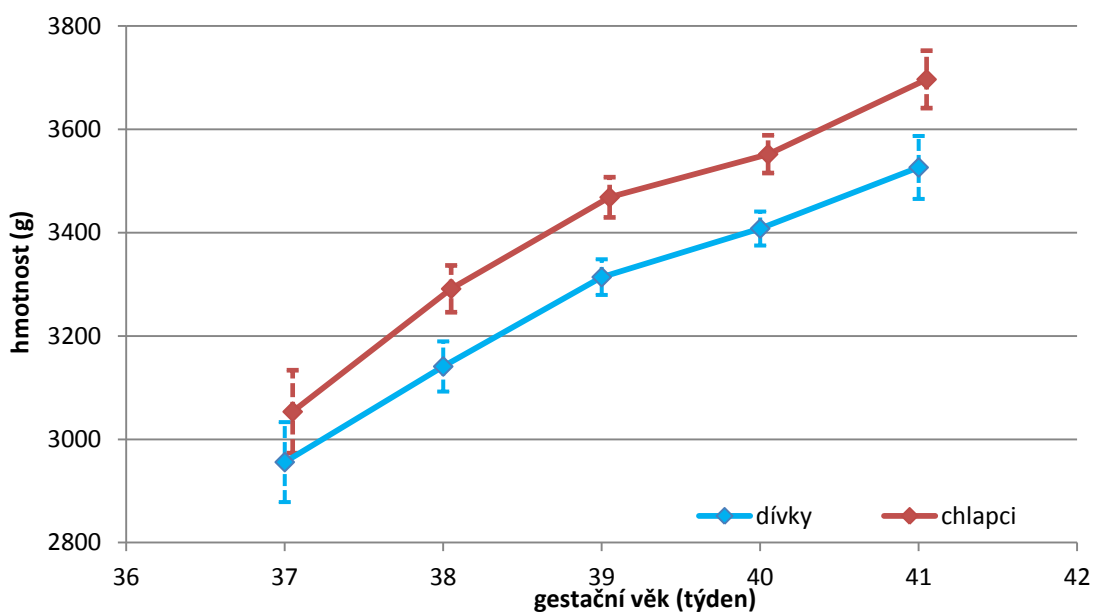
Všechny parametry odrážející normalitu dat jako jsou šikmost, špičatost a Shapiro-Wilkův test potvrzují u zdravých chlapců i dívek normální rozdělení dat (Graf 7, 8).

11.2.2 Analýza rozdílů středních hodnot pro pohlaví u kontrolní skupiny

Paralelně s pacienty s orofaciálními rozštěpy i zde bylo testováno, zda se u zdravých dětí liší porodní hmotnost v rámci kontrolní skupiny mezi pohlavími. Tato data vzhledem k rozdílnému zastoupení počtu jedinců v jednotlivých týdnech gestace byla testována pomocí analýzy rozptylu s přidáním faktoru týdne gestace. Cílem testu bylo zjistit, zda se budou lišit porodní hmotnosti mezi pohlavími, jestliže budou porovnány ve stejných týdnech gestace (tj. např. hmotnost chlapců v 37. týdnu se bude lišit od hmotnosti dívek v 37. týdnu). Všechny podmínky pro použití testu byly splněny.

Tab. 13 Výstup analýzy rozptylu kontrolní skupiny.

	počet stupňů volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	F - kritérium	p - hodnota
A: pohlaví	1	1,089E+07	1,089E+07	71,73	0,000000*
B: gestace	4	9,485E+07	2,371E+07	156,18	0,000000*
A+B	4	318412	79603	0,52	0,717899
rezidua	2912	4,421E+08	151829		
celkem	2921	5,292E+08			



Graf 9 Rozdíly porodních hmotností mezi zdravými chlapci a dívkami z kontrolní skupiny. Úsečky tvoří 95% intervaly spolehlivosti.

Závěr analýzy rozdílu středních hodnot v kontrolní skupině:

Z výsledku analýzy rozptylu (Tab. 13) vyplívá statisticky signifikantní rozdíl mezi pohlavími i mezi gestačními týdny v době porodu. Na grafické analýze (Graf 9) je patrný rozdíl mezi hmotnostmi chlapců a dívek v 38. – 41. týdnu porodu. V 37. týdnu nebyl nalezen rozdíl, což mohlo být mimo jiné způsobeno nižším počtem dat u dívek v tomto gestačním týdnu. Jak u rozštěpové skupiny, tak i v kontrolní skupině mají chlapci větší porodní hmotnost než dívky.

11.3 Rozdíly mezi skupinami pacientů s jednotlivými typy rozštěpů

V rámci dalšího postupu byly jednak porovnány porodní hmotnosti pacientů s jednotlivými typy rozštěpů mezi sebou, a jednak byly tyto porodní hmotnosti pacientů rozdělených podle typů rozštěpů porovnány s porodní hmotností zdravých jedinců z kontrolní skupiny. Celkem byly porovnány 4 skupiny mezi sebou pro obě pohlaví samostatně. Tyto skupiny tvořili novorozenci s CL, CLP, CP a zdraví novorozenci v kontrolní skupině. Všechny podmínky pro použití následujících testů byly splněny.

11.3.1 Analýza rozdílu středních hodnot chlapců s rozštěpy a kontrolní skupiny

Pro zjištění rozdílu v porodní hmotnosti mezi jednotlivými skupinami chlapců byla použita analýza rozptylu dvojného třídění.

Závisle proměnná: porodní hmotnost

Kategoriální faktor: A: skupina - CL, CLP, CP, kontrola

B: gestace (gestační týden v době porodu) - 37, 38, 39, 40, 41

H₀: $\lambda_{ab} = 0$ (interakce jsou nevýznamné)

H₁: $\lambda_{ab} \neq 0$ (interakce jsou významné)

H₀: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$ (porodní hmotnosti chlapců se mezi skupinami neliší)

H₁: $\mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \neq \mu_n$ (porodní hmotnosti chlapců se mezi skupinami liší)

Tab. 14 Výstup analýzy rozptylu pro rozdíly mezi všemi skupinami chlapců.

	počet stupňů volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	F - kritérium	p - hodnota
A: skupina	3	9259004	3086335	16,90	0,000000*
B: gestace	4	4,294E+07	1,074E+07	58,80	0,000000*
A+B	12	1975797	164650	0,90	0,544368
rezidua	3287	6,001E+08	182576		
celkem	3306	6,812E+08			

Ve výstupu analýzy rozptylu (Tab. 14) je patrný statisticky signifikantní rozdíl porodních hmotností mezi skupinami ($p = 0,000000^*$) i mezi týdny gestace ($p = 0,000000^*$). Interakce představující A+B nejsou významné ($p = 0,544368$). Za účelem zjištění, mezi kterými skupinami a týdny gestace je rozdíl v porodní hmotnosti významný, byly použity dvě metody mnohonásobného porovnání.

Metody mnohonásobného porovnání

Nejprve byly porovnány všechny zmíněné skupiny chlapců mezi sebou pomocí Tukeyovy HSD metody. Pro zjednodušení jsou v další části uvedeny pouze kombinace, kde byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl (Tab. 15). Další nesignifikantní výsledky jsou uvedeny v příloze - Příloha 4.

Tab. 15 Výsledky Tukeyovy HSD metody pro chlapce, porovnání rozdílů mezi skupinami. (skupiny chlapců s: CL = rozštěpy rtu, CLP = rozštěpy rtu a patra, CP = rozštěpy patra)

	95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
40. týden kontrola x CL	<26,214; 238,6815>	0,0016988*
40. týden kontrola x CLP	<72,5634; 262,454>	0,0000001*
40. týden kontrola x CP	<25,4074; 243,9114>	0,0032060*

Signifikantní rozdíly v porodní hmotnosti byly nalezeny mezi chlapci s orofaciálními rozštěpy a kontrolní skupinou ve 40. týdn gestace. Konkrétně se od kontrolní skupiny lišily porodní hmotnosti chlapců s CL, CLP a CP. Mezi skupinami chlapců s jednotlivými typy rozštěpů signifikantní rozdíly nalezeny nebyly. V dalších

gestačních týdnech nebyly rozdíly mezi porodními hmotnostmi chlapců v jednotlivých skupinách statisticky signifikantní.

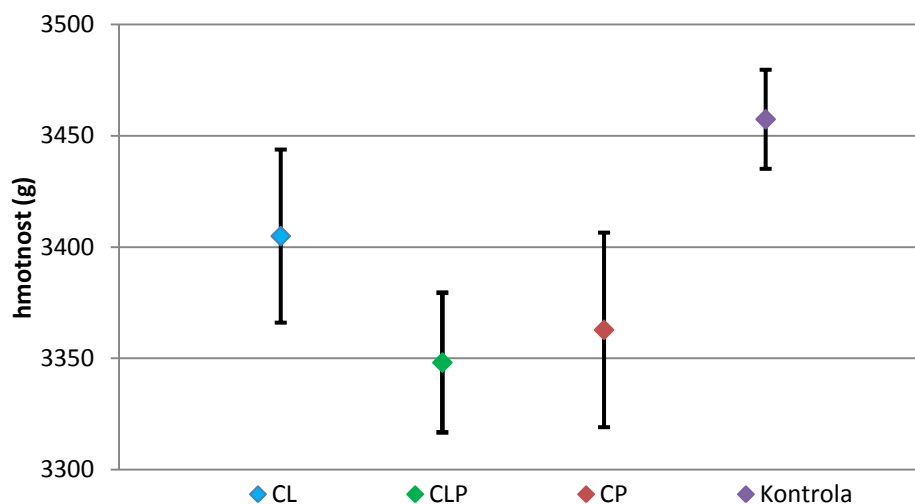
Pro zjištění, jestli se liší porodní hmotnosti pacientů s jednotlivými typy rozštěpů, právě od skupiny kontrolní, má větší sílu Bonferroniho metoda. Mohou tak být nalezeny další rozdíly, které předchozí metodou nemusely být zachyceny.

Bonferroniho metoda

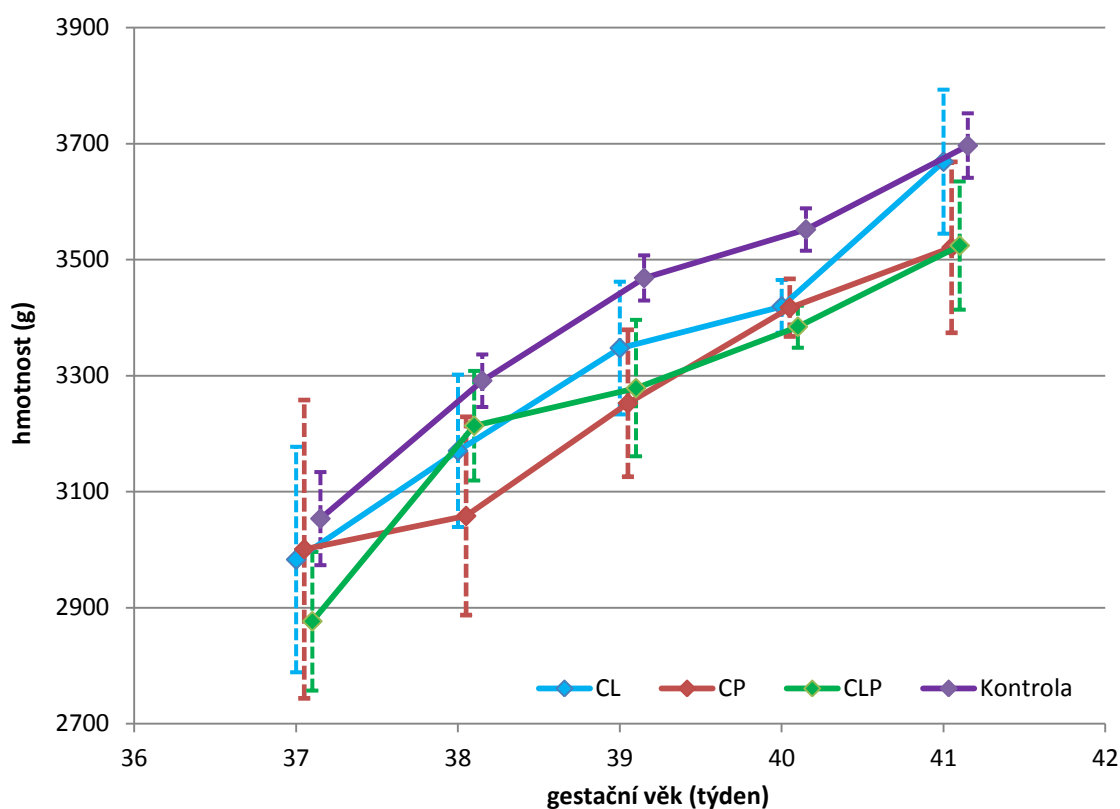
Použitím této metody jsou místo porovnání středních hodnot všech skupin mezi sebou porovnány jednotlivé skupiny (v tomto případě jednotlivé typy rozštěpů) pouze se skupinou kontrolní. V tomto testu je další vyhodnocení uvedeno pouze sdělením, která skupina se odlišuje od skupiny kontrolní. Z těchto výsledků jsou považovány za rozdílné od kontroly pouze ty skupiny, které se lišily ve stejném týdnu gestace. Rozdíly nalezené předchozí Tukeyovou metodou byly i pomocí této metody označeny za statisticky signifikantní. Navíc byly nalezeny rozdíly mezi porodními hmotnostmi chlapců v 38. a 39. týdnu gestace. Od kontrolní skupiny se lišila skupina chlapců s rozštěpy patra v 38. a 39. týdnu. Také se od kontroly lišila porodní hmotnost chlapců s rozštěpem rtu a patra v 39. týdnu gestace (Tab. 16).

Tab. 16 Průměrné porodní hmotnosti chlapců po skupinách, s uvedeným týdnem gestace, které se lišily od kontrolní skupiny. Testováno Bonferroniho metodou. (skupiny chlapců s: CL = rozštěpy rtu, CLP = rozštěpy rtu a patra, CP = rozštěpy patra)

	průměrná porodní hmotnost (g)
Kontrola v 38. týdnu	3291
CP v 38. týdnu	3058
Kontrola v 39. týdnu	3468
CP v 39. týdnu	3252
CLP v 39. týdnu	3279
kontrola v 40. týdnu	3552
CL v 40. týdnu	3420
CP v 40. týdnu	3417
CLP v 40. týdnu	3384



Graf 10 Porovnání porodních hmotností jednotlivých skupin chlapců. Úsečky tvoří 95% intervaly spolehlivosti. (CL = rozštěp rtu, CLP = rozštěp rtu a patra, CP = rozštěp patra)



Graf 11 Rozdíly mezi skupinami chlapců v jednotlivých týdnech gestaže. Úsečky tvoří 95% intervaly spolehlivosti. (CL = rozštěp rtu, CLP = rozštěp rtu a patra, CP = rozštěp patra)

Závěr analýzy rozdílů středních hodnot mezi skupinami chlapců

Z výsledků analýzy rozptylu vyplývá, že gestační věk v době porodu i některé skupiny mají vliv na porodní hmotnost chlapců (Tab. 14). S pomocí metod

mnohonásobného porovnávání bylo zjištěno, že se od porodní hmotnosti kontrolní skupiny liší ve 40. týdnu všechny rozštěpové skupiny tzn., že zdraví chlapci mají větší porodní hmotnost oproti chlapcům s CL, CLP i CP (Graf 11). Dále jsou zdraví chlapci v 38. a 39. týdnu těžší než chlapci s rozštěpy patra. Od porodní hmotnosti kontrolní skupiny se v 39. týdnu liší i hmotnost chlapců s CLP, přičemž chlapci s CLP mají hmotnost nižší.

11.3.2 Analýza rozdílu středních hodnot dívek s rozštěpy a kontrolní skupiny

Stejně jako u chlapců byla pro zjištění rozdílu v porodní hmotnosti mezi jednotlivými skupinami dívek použita analýza rozptylu dvojného třídění.

Závisle proměnná: porodní hmotnost

Kategoriální faktor: A: skupina - CL, CLP, CP, kontrola

B: gestace (gestační týden v době porodu) - 37, 38, 39, 40, 41

Tab. 17 Výstup analýzy rozptylu pro rozdíly mezi všemi skupinami dívek.

	počet stupňů volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	F - kritérium	p - hodnota
A: skupina	3	1,087E+07	3622309	22,78	0,000000*
B: gestace	4	2,809E+07	7022452	44,16	0,000000*
A+B	12	199818	99984,84	0,63	0,819360
rezidua	2757	4,384E+08	159023		
celkem	2776	4,958E+08			

Z výstupu analýzy rozptylu (Tab. 17) je stejně jako u chlapců patrný statisticky signifikantní rozdíl porodních hmotností mezi skupinami ($p = 0,000000^*$) i mezi týdny gestace ($p = 0,000000^*$). Interakce A+B nejsou opět významné ($p = 0,819360$). Pro zjištění, mezi kterými skupinami a týdny gestace byl nalezený rozdíl pomocí analýzy rozptylu významný, byla použita Tukeyova HSD a Bonferonniho metoda mnohonásobného porovnání, obdobně jako u chlapců.

Metody mnohonásobného porovnání

I u dívek byla pro upřesnění, mezi kterými skupinami se nachází rozdíl použita Tukeyova (Tab. 18) a Bonferroniho metoda (Tab. 19).

Tab. 18 Signifikantní výsledky Tukeyovy HSD metody pro dívky, porovnání rozdílů mezi skupinami. (skupiny dívek s: CL = rozštěpy rtu, CLP = rozštěpy rtu a patra, CP = rozštěpy patra)

	95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
39. týden kontrola x CP	<15,0761; 517,4099>	0,0241944*
40. týden kontrola x CL	<30,15243; 256,7615>	0,0012571*
40. týden kontrola x CLP	<62,32276; 269,914>	0,0000028*
40. týden kontrola x CP	<43,74501; 230,5025>	0,0000375*
41. týden kontrola x CLP	<3,543404; 546,7726>	0,0429460*

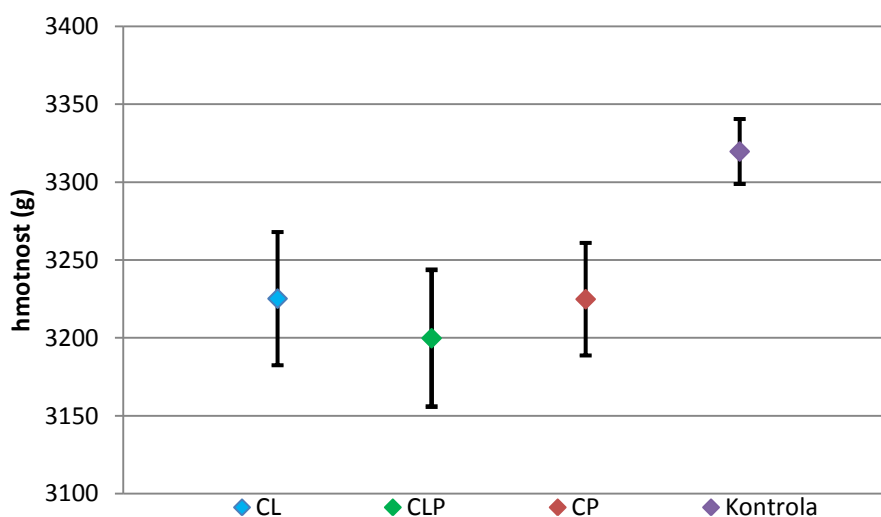
Stejně jako u chlapců se od zdravých dívek ve 40. gestačním týdnu lišily porodní hmotnosti pacientek s CL, CLP, i CP. Dále se od kontrolní skupiny lišila porodní hmotnost dívek s CP v 39. gestačním týdnu. Další statisticky signifikantní rozdíl byl nalezen mezi porodními hmotnostmi zdravých dívek a dívek s CLP v 41. týdnu gestace. Pro další gestační týdny nebyly rozdíly mezi skupinami dívek statisticky signifikantní (Příloha 5).

Bonferroniho metoda

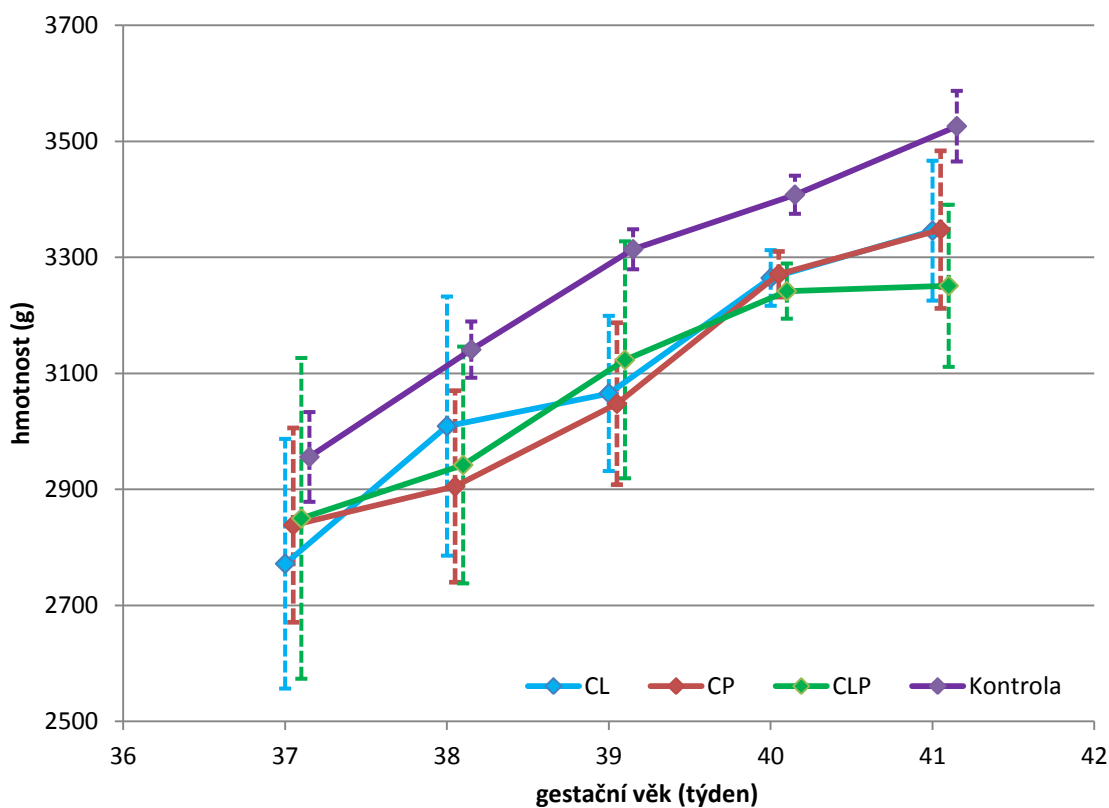
Použití této metody je podrobněji popsáno výše, viz. 11.3.1. Všechny rozdíly mezi skupinami, které byly označeny jako signifikantní pomocí Tukeyovy metody, byly označeny jako rozdílné i touto metodou. Dále se od skupiny zdravých dívek odlišovaly dívky s rozštěpy patra, které měly nižší porodní hmotnost v 38. týdnu porodu (Tab. 19).

Tab. 19 Průměrné porodní hmotnosti dívek po skupinách s uvedeným týdnem gestace, které se signifikantně lišily od kontrolní skupiny. Testováno Bonferroniho metodou. (skupiny dívek s: CL = rozštěpy rtu, CLP = rozštěpy rtu a patra, CP = rozštěpy patra)

	průměrná porodní hmotnost (g)
Kontrola v 38. týdnu	3141
CP v 38. týdnu	2905
Kontrola v 39. týdnu	3314
CP v 39. týdnu	3048
kontrola v 40. týdnu	3408
CL v 40. týdnu	3264
CP v 40. týdnu	3271
CLP v 40. týdnu	3242
kontrola v 41. týdnu	3526
CLP v 41. týdnu	3251



Graf 12 Porovnání porodních hmotností jednotlivých skupin dívek. Úsečky tvoří 95% intervaly spolehlivosti. (CL = rozštěp rtu, CLP = rozštěp rtu a patra, CP = rozštěp patra)



Graf 13 Rozdíly mezi skupinami dívek v jednotlivých týdnech gestace. Úsečky tvoří 95% intervaly spolehlivosti. (CL = rozštěp rtu, CLP = rozštěp rtu a patra, CP = rozštěp patra)

Závěr analýzy rozdílu středních hodnot mezi skupinami dívek

Z výsledků analýzy rozptylu je patrné, že na porodní hmotnost dívek má vliv jak gestační věk novorozence, tak některé ze stanovených skupin dívek (typy rozštěpů a kontrola). Díky mnohonásobnému porovnávání bylo zjištěno, že se liší porodní hmotnosti dívek s CP v 38., 39. a 40. týdnu gestace od dívek v kontrolní skupině. Dále se od porodní hmotnosti dívek z kontrolní skupiny lišily hmotnosti dívek s CLP v 40. a 41. gestačním týdnu. Oproti zdravým dívkám měly ve 40. týdnu gestace menší hmotnost i dívky s rozštěpy rtu. Po vynesení hodnot do grafu je patrný i rozdíl u dívek s CL v 39. týdnu vůči kontrolní skupině (Graf 13). Tento rozdíl však nebyl při použití testů statisticky signifikantní (Příloha 5).

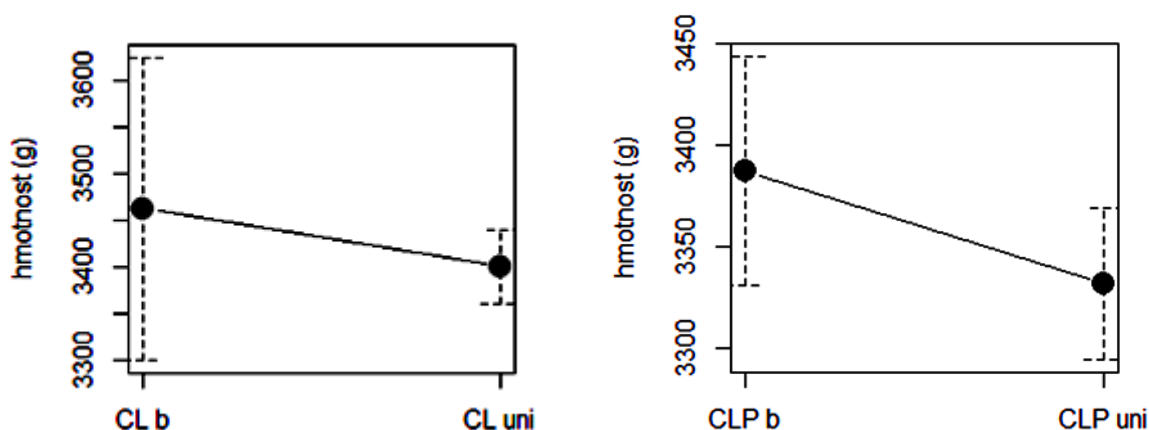
11.3.3 Porodní hmotnosti u jednostranných a oboustranných typů CL a CLP

Přestože nebyl nalezen žádný rozdíl v porodních hmotnostech mezi jednotlivými typy rozštěpů, existuje možnost, že se tyto hmotnosti odlišují mezi jednostrannou a oboustrannou formou typu rozštěpu. Předpokládalo se, že závažnost, představující

v tomto souboru jednostrannou či oboustrannou formu jednotlivých typů rozštěpů, bude souviset s rozdílem v porodní hmotnosti, kdy nižší hmotnost bylo možné očekávat u závažnější oboustranné formy konkrétního typu rozštěpu (Tab. 20, 21, Graf 14 a 15). Vzhledem k tomu, že byly mezi sebou porovnávány vždy pouze dvě skupiny, testování proběhlo pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu pro obě pohlaví (Tab. 20, 21). Ve všech případech byly splněny předpoklady testu a všechny testovací hodnoty F-testu byly vyšší než $\alpha = 0,05$. Jednalo se tedy o variantu oboustranného dvouvýběrového t-testu s rovností rozptylů.

Tab. 20 Výsledky nepárových dvouvýběrových t-testů pro chlapce, porovnání jednostranných (uni) a oboustranných (bil) forem rozštěpů. (CL uni = jednostranný rozštěp rtu, CL bil = oboustranný rozštěp rtu, CLP uni = jednostranný rozštěp rtu a patra, CLP = oboustranný rozštěp patra)

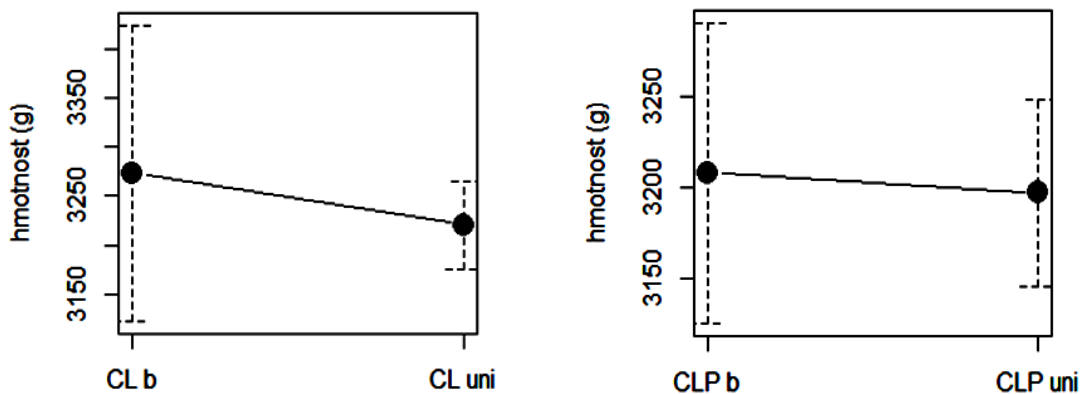
Chlapci				
Skupina	CL uni	CL bil	CLP uni	CLP bil
průměr (g)	3400	3462	3332	3387
testovací kritérium T		0,8755		1,5886
stupně volnosti		528		846
p - hodnota		0,3817		0,1125
95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot		<-77,30994; 201,62838>		<-13,10203; 124,33924>



Graf 14 Rozdíl mezi porodní hmotností chlapců s oboustrannou formou rozštěpu rtu (CL b) a jednostrannou formou (CL uni), a chlapců s oboustranným rozštěpem rtu a patra (CLP b) a jednostranným rozštěpem rtu a patra (CLP uni). (CL = rozštěp rtu, CLP = rozštěp rtu a patra)

Tab. 21 Výsledky nepárových dvouvýběrových t-testů pro dívky, porovnání jednostranných (uni) a oboustranných (bil) forem rozštěpů. (CL = rozštěp rtu, CLP = rozštěp rtu a patra)

Dívky				
Skupina	CL uni	CL bil	CLP uni	CLP bil
průměr (g)	3221	3273	3197	3208
testovací kritérium T		0,6768	0,2114	
stupně volnosti		324	405	
p - hodnota		0,499	0,8327	
95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot		<-100,1788; 205,2584>	<-90,82131; 112,71059>	



Graf 15 Rozdíl mezi porodní hmotností dívek s oboustrannou formou rozštěpu rtu (CL b) a jednostrannou formou (CL uni), a chlapců s oboustranným rozštěpem rtu a patra (CLP b) a jednostranným rozštěpem rtu a patra (CLP uni). (CL = rozštěp rtu, CLP = rozštěp rtu a patra)

Závěr analýzy rozdílu středních hodnot hodnocených t-testy

Při porovnávání jednostranných a oboustranných forem rozštěpů rtu a rozštěpů rtu a patra, tj. CL jednostranný vs. CL oboustranný a totéž pro CLP, nebyl ani u jednoho pohlaví nalezen žádný statisticky signifikantní rozdíl v porodních hmotnostech mezi těmito skupinami.

11.4 Pacienti s Pierre-Robinovou sekvencí

Soubor dat obsahující novorozence s Pierre-Robinovou sekvencí byl nejprve podroben základní statistické analýze dat (Tab. 22). Z výsledků testu normality vyplývá, že data mají normální rozdělení a mohou být v dalším postupu použity parametrické testy.

Tab. 22 Souhrn výsledků pro chlapce a dívky s Pierre-Robinovou sekvencí zahrnující základní popisné statistiky polohy, variability a tvaru rozdělení, doplněné o test normality.

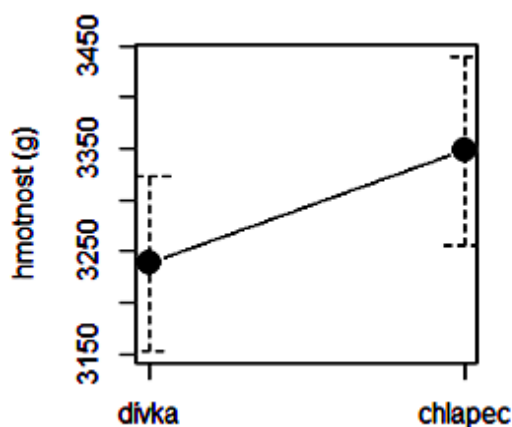
	Chlapci	Dívky
popisná statistika polohy (g)		
minimum	2380	1750
dolní kvartil	3005	2900
medián	3400	3250
průměr	3348	3238
horní kvartil	3620	3580
maximum	4430	4760
popisná statistika variability		
směrodatná odchylka	444,201	487,3363
rozptyl	197314,8	237496,6
počet	85	129
Shapiro-Wilkův test normality		
hladina významnosti stanovena na $\alpha = 0,05$	0,3046	0,2324

11.4.1 Analýza rozdílu středních hodnot pro pohlaví

Rozdíl mezi porodními hmotnostmi chlapců a dívek se syndromatickým typem rozštěpu byl testován pomocí oboustranné alternativy dvouvýběrového nepárového t-testu se shodnými rozptyly (Tab. 23, Graf 16).

Tab. 23 Výsledky testování rozdílu porodní hmotnosti mezi pohlavími u dětí s Pierre-Robinovou sekvencí.

Skupina	chlapci	dívky
průměr (g)	3348	3238
testovací kritérium T		1,7182
stupně volnosti		220
p - hodnota		0,08717
95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot		<-16,1436; 235,7450>



Graf 16 Srovnání porodních hmotností podle pohlaví u dětí s Pierre-Robinovou sekvencí.

Závěr analýzy středních hodnot pro pohlaví

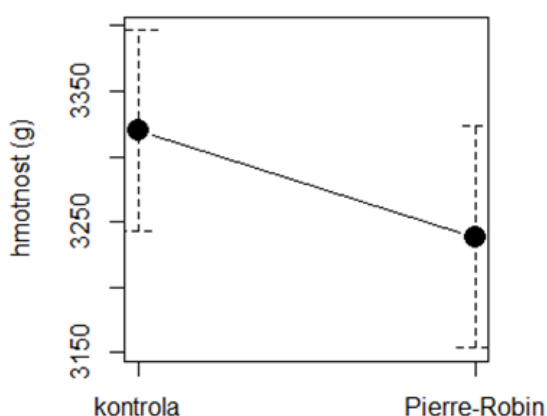
Pomocí dvouvýběrového t-testu nebyl nalezen žádný statisticky signifikantní rozdíl v porodních hmotnostech mezi chlapci a dívkami (Tab. 23). Grafické znázornění (Graf 16) ukazuje sice vyšší porodní hmotnost u chlapců, avšak intervaly spolehlivosti se překrývají a rozdíl tedy není statisticky signifikantní.

11.4.2 Porovnání porodní hmotnosti dětí s Pierre-Robinovou sekvencí s kontrolou

Z důvodu nižšího počtu jedinců v souboru dětí s Pierre-Robinovou sekvencí byla jako kontrolní skupina použita pouze skupina dat sesbíraných pomocí dotazníků, kde byl poměr mezi počty dat téměř totožný. U pacientů s Pierre-Robinovou sekvencí, kteří vykazují rozštěp patra, se předpokládalo, že i u této skupiny bude porodní hmotnost odlišná od kontrolní skupiny podobně jako u pacientů s nesyndromatickým CP. Potencionální rozdíl v porodních hmotnostech mezi kontrolní skupinou a skupinou pacientů s Pierre-Robinovou sekvencí byl testován pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu se shodnými rozptyly v případě dívek (Tab. 24), u chlapců byla z důvodu nerovnoměrného rozložení jedinců v týdnech narození (gestace) použita analýza rozptylu (Tab. 25).

Tab. 24 Výsledky testování rozdílu (pomocí t-testu) mezi porodními hmotnostmi zdravých dívek a dívek s Pierre-Robinovou sekvencí.

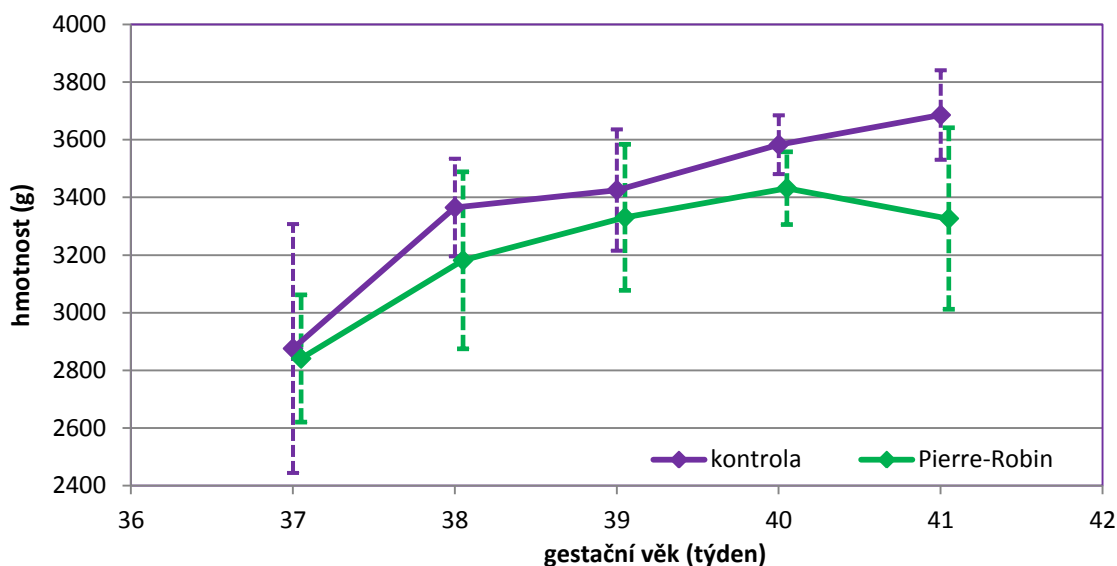
Skupina	Dívky	
	Kontrola	Pierre-Robin
průměr (g)	3320	3238
testovací kritérium T	1,4097	
stupně volnosti	253	
p - hodnota	0,1599	
95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	<-32,4138; 195,7054>	



Graf 17 Srovnání porodních hmotností skupiny dívek s Pierre-Robinovou sekvencí s kontrolou.

Tab. 25 Výsledky analýzy rozptylu pro srovnání chlapců s Pierre-Robinovou sekvencí a zdravých chlapců s přidáním faktoru gestace, z důvodu nerovnoměrného rozložení dat v jednotlivých gestačních týdnech mezi kontrolní skupinou a chlapci s Pierre-Robinovou sekvencí.

	Chlapci				
	počet stupňů volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	F - kritérium	p - hodnota
A: skupina	1	535708,4	535708,4	3,27	0,072235
B: gestace	1	4395970	1098993	6,70	0,000045*
A+B	4	474136,5	118534,1	0,72	0,577306
rezidua	196	3,214E+07	163992,8		
celkem	205	3,925E+07			



Graf 18 Rozdíly v porodních hmotnostech mezi chlapci s Pierre-Robinovou sekvencí a zdravými chlapci v jednotlivých týdnech gestace. Úsečky tvoří 95% intervaly spolehlivosti.

Závěr porovnání porodní hmotnosti pacientů s Pierre-Robinovou sekvencí a kontrolou pro obě pohlaví

Porodní hmotnosti zdravých dívek a dívek s Pierre-Robinovou sekvencí se nelišily. Na grafu 17 je patrný mírný rozdíl ve prospěch vyšších hodnot u zdravých dívek, ale p-hodnota je poměrně vysoká 0,1599 a rozdíl v porodní hmotnosti není průkazný. Obdobně ani porodní hmotnosti skupiny zdravých chlapců a chlapců s Pierre-Robinovou sekvencí se nelišily ($p = 0,072235$). Tento výsledek je dobře viditelný po vnesení do grafu (Graf 18). Závěrem lze říci, že u porodní hmotnosti pacientů se syndromatickým typem rozštěpu nebyl nalezen signifikantní rozdíl ve srovnání s kontrolou ani u jednoho pohlaví.

11.5 Experimentální ověření výsledků zjištěných u novorozenců na kuřecím modelu

Výsledky zjištěné ve skupině pacientů s nesyndromatickým typem rozštěpu byly ověřovány pomocí dvou experimentů na kuřecím modelu. Při těchto experimentech byla porovnána kuřecí embrya bez rozštěpu zobáku, tedy kontrolní skupina, s kuřecími zárodky s rozštěpem zobáku. Rozštěp zobáku byl u kuřecích zárodků vyvolán pomocí aplikace teratogenního činidla hydrokortizonu.

Tab. 26 Souhrnný počet použitých jedinců u obou experimentů a jejich úmrtnost v jednotlivých dnech inkubace před i po aplikaci hydrokortizonu, v případě kontrol bez aplikace.

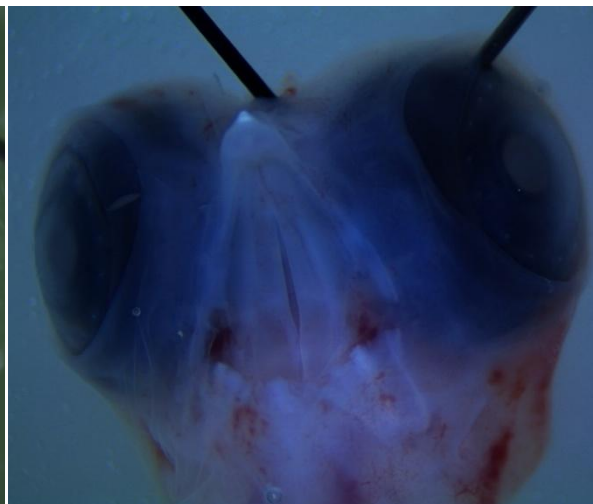
	experiment 1		experiment 2	
počet nasazených vajec	120		140	
† úmrtnost před aplikací	21		91	
	aplikováno	kontrola	aplikováno	kontrola
Počet v den aplikace	49	50	26	23
† 5 ED	3	1	2	0
† 6 ED	2	1	1	3
† 7 ED	1	1	7	2
† 8 ED	0	4	3	1
† 9 ED	8	2	0	1
Výtěžnost aplikace				
rozštěp	23		9	
bez rozštěpu	26		17	

Přítomnost a typ rozštěpu zobáku byl určován pomocí binokulární lupy. Kuřecí zárodky z aplikované skupiny byly srovnávány se zdravými zárodky (obr. 15, 16) z kontrolní skupiny. Byly pozorovány tyto vady: oboustranný rozštěp zobáku (obr. 17, 18), levostranný rozštěp zobáku (obr. 19, 20), pravostranný rozštěp zobáku (obr. 21), centrální rozštěp zobáku (obr. 22).

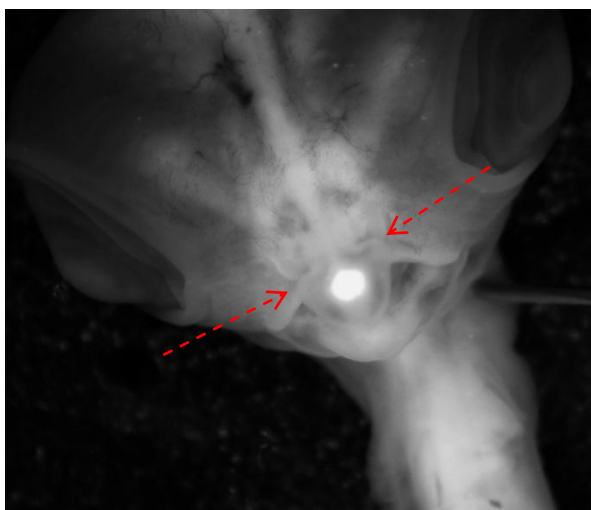
Nejčastěji byl v rámci prvního experimentu zastoupen oboustranný rozštěp zobáku v 52 %, poté jednostranný v 39 % a posledním typem byl centrální rozštěp, který byl zastoupen v 9 %. V druhém experimentu se vyskytoval pouze oboustranný rozštěp zobáku.



Obr. 15 Pohled z levé strany na zdravou kontrolu bez rozštěpu.



Obr. 16 Patro zdravé kontroly zevnitř, s odstraněnou mandibulou.



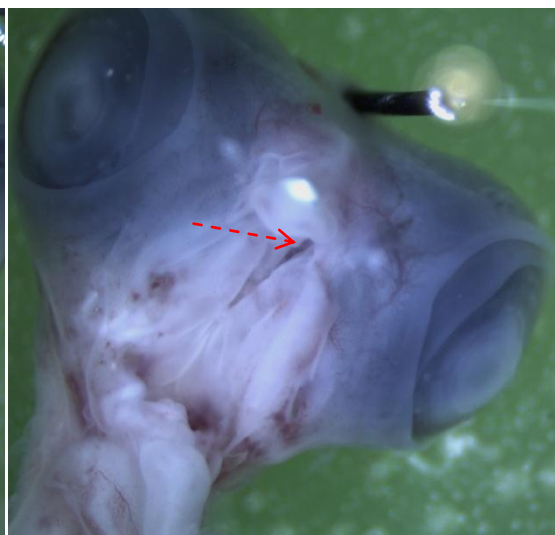
Obr. 17 Oboustranný rozštěp zobáku kuřete pohled zepředu z vrchu.



Obr. 18 Oboustranný rozštěp ze spodu, mandibula byla odstraněna.



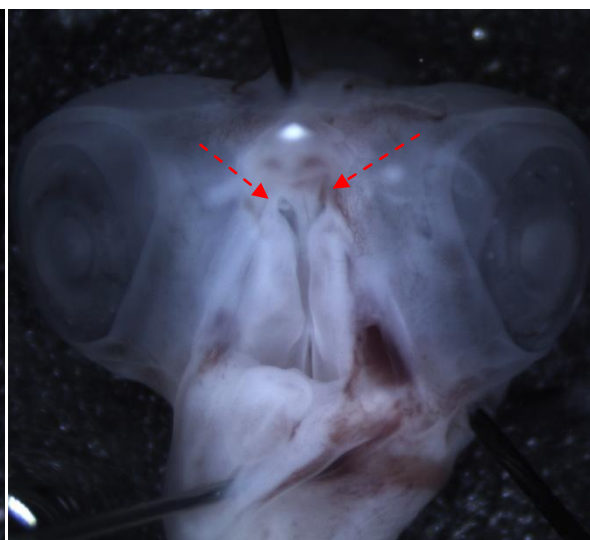
Obr. 19 Pohled zřepředu, mírně ze strany na levostranný rozštěp.



Obr. 20 Pohled na levostranný rozštěp ze spodu po odstranění mandibuly.

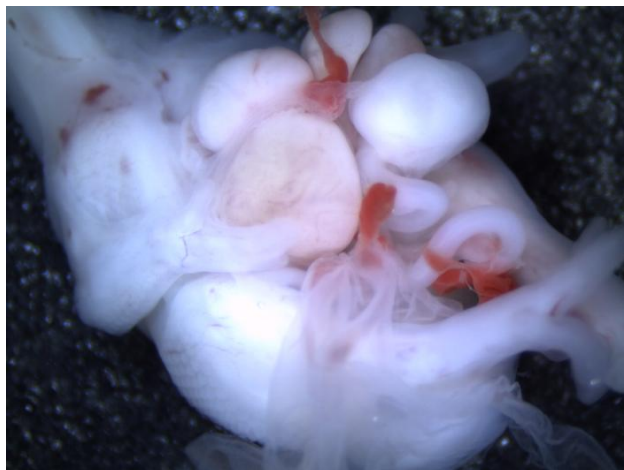


Obr. 21 Pohled z pravé strany na pravostranný rozštěp zobáku.



Obr. 22 Pohled ze spodu po odstranění mandibuly na centrální rozštěp zobáku.

V obou experimentech byly zaznamenány zárodky, které měly pouze eventraci (obr. 23) a byly vyřazeny z dalšího testování.



Obr. 23 Přiblížený pohled na zárodek s eventrací.

11.5.1 Experiment 1 - statistická analýza

V prvním experimentu byla na vyvolání rozštěpů u kuřat použita koncentrace Hydrocortisonu Valeant 10^{-4} .

11.5.1.1 Základní statistická analýza dat pro první experiment

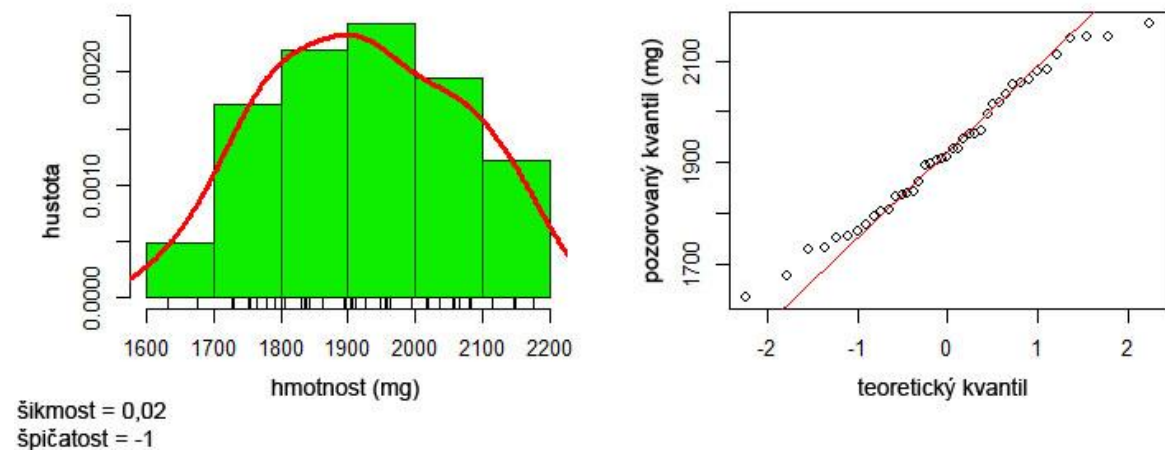
Pro základní analýzu dat (Tab. 27) získaných z prvního experimentu byl použit statistický program R i386 3.0.2.

Tab. 27 Souhrn výsledků z prvního experimentu zahrnující základní popisné statistiky polohy, variability a tvaru rozdělení, doplněné o test normality.

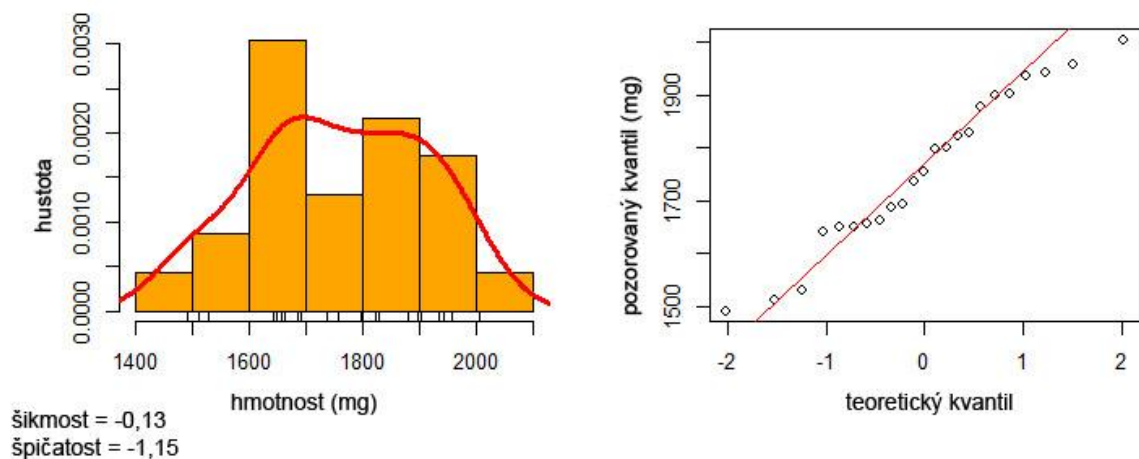
	embrya bez rozštěpu	embrya s rozštěpem
popisná statistika polohy (mg)		
minimum	1633	1492
dolní kvartil	1806	1654
medián	1910	1756
průměr	1920	1758
horní kvartil	2035	1888
maximum	2175	2004
popisná statistika variability		
směrodatná odchylka	141,5132	148,0416
rozptyl	20025,98	21916,31
tvar rozdělení		
šikmost	0,01912645	-0,1268261
špičatost	-1,000964	-1,147478
Shapiro-Wilkův test normality		
hladina významnosti stanovena na $\alpha = 0,05$	normalita dat přijata p = 0,5305	normalita dat přijata p = 0,4376

V tabulce 27 udaná šikmost u obou skupin není odlišná od 0 a odpovídá tak symetrickému rozdělení, které se blíží normálnímu (Gaussovu) rozdělení. Špičatost je v obou případech záporná a odlišná od 0, což poukazuje na mírně plošší rozdělení než je normální. Na základě testu určujícího normalitu dat jak pro skupinu kuřat s rozštěpy ($p = 0,4376$), tak pro kontrolní skupinu ($p = 0,5305$), bylo zjištěno, že data mají normální rozdělení.

11.5.1.2 Grafické diagnostiky dat pro experiment 1



Graf 19 Rozložení dat u kontrolní skupiny kuřecích embryí pro první experiment.

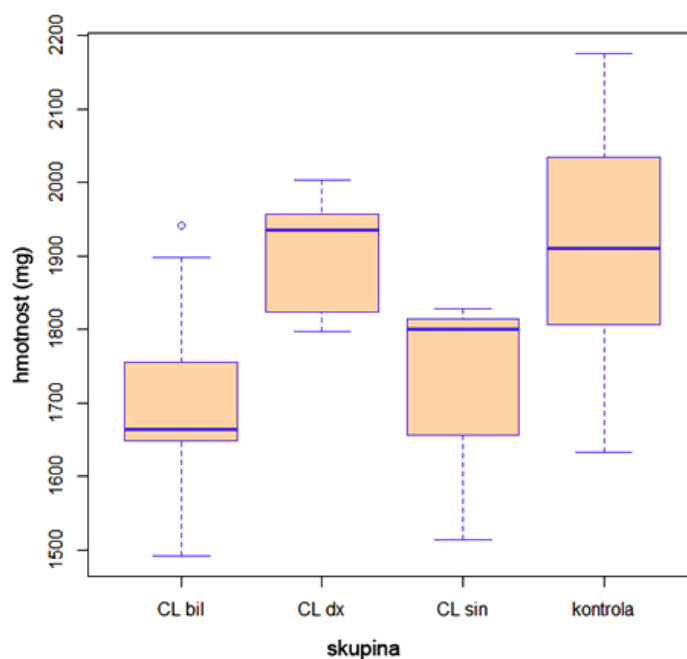


Graf 20 Rozložení dat u skupiny kuřecích embryí s rozštěpy zobáku pro první experiment.

Zhodnocení grafických diagnostik: Na histogramu kontrolní skupiny je vidět přibližně symetrické plošší rozložení dat kopírující Gaussovu křivku. Q-Q graf kontrol ukazuje dvě odlehlejší hodnoty, které však podle výsledku testu nemají vliv na normalitu dat (Graf 19).

Histogram embryí s rozštěpem (Graf 20) vykazuje stejně jako u kontrolní skupiny mírně plošší symetrické rozložení dat. Je zde vidět větší zastoupení dat v oblasti hmotností 1600-1700 mg a intervaly hmotností jsou oproti kontrolní skupině posunuty k nižším hodnotám. Q-Q graf rozštěpové skupiny má rovněž posunutou osu y, jsou zde patrné dvě odlehlé hodnoty, které opět nemají vliv na normalitu dat.

Na základě grafické analýzy (Graf 21) dat byl zjištěn, patrný hmotnostní rozdíl mezi pravostranným a levostranným rozštěpem. Dále se lišil levostranný a oboustranný rozštěp od kontroly, v obou případech byla hmotnost u zárodků s rozštěpem nižší. Statistické testování rozdílu mezi těmito skupinami, však nebylo možné provést kvůli nízkému zastoupení pozorování u některých typů rozštěpů.



Graf 21 Hmotnosti kuřecích zárodků u jednotlivých typů rozštěpů a kontrolní skupiny v prvním experimentu. (CL bil = oboustranný rozštěp, CL dx = pravostranný rozštěp, CL = sin levostranný rozštěp)

11.5.1.3 Analýza rozdílu v hmotnosti kuřecích embryí s rozštěpy a kontrolní skupiny

Na základě výsledku F-testu nebyla zamítnuta shoda rozptylů v obou výběrech (kontrola a experimentální skupina kuřecích zárodků s rozštěpem zobáku), kdy p-hodnota byla 0,7827 a testovací kritérium bylo $F = 1,0944$. Následně tedy byla použita oboustranná alternativa dvouvýběrového nepárového t-testu se shodnými rozptyly. Obdobně jako

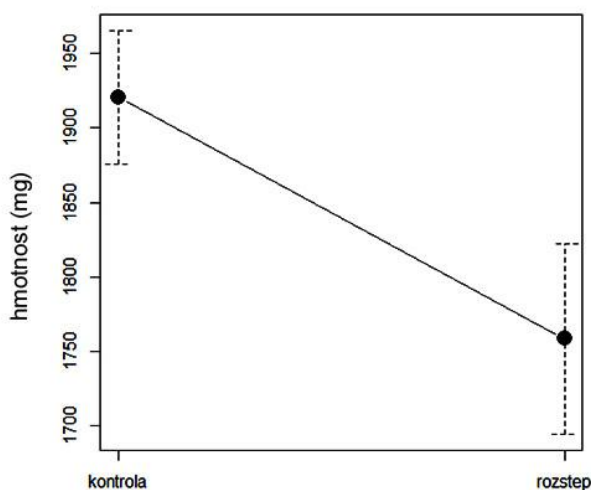
u předchozí analýzy novorozenců byla všechna rozhodnutí určena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

H0: kontrola - experiment = 0 (hmotnosti kontrolní a experimentální skupiny se neliší)

H1: kontrola - experiment \neq 0 (hmotnosti skupin se liší)

Tab. 28 Výsledky dvouvýběrového nepárového t-testu pro první experiment.

Skupina	kontrola	experiment
průměr (mg)	1920,659	1758,304
testovací kritérium T	4,3319	
stupně volnosti	62	
p - hodnota	5,508e-05* (Zamítá se H0)	
95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	<87,43523; 237,27315>	



Graf 22 Rozdíl v hmotnosti kuřecích zárodků kontrolní a experimentální skupiny. Úsečky tvoří 95% intervaly spolehlivosti.

Závěr analýzy středních hodnot:

Dvouvýběrový nepárový t-test zamítl na základě $p = 5,508e-05$ pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ nulovou hypotézu (hmotnosti ve skupinách se neliší). Z grafické analýzy dat (Graf 22) je patrné, že se intervaly spolehlivosti nepřekrývají a rozdíl mezi průměry je tedy statisticky významný. Hmotnost u kontrolní skupiny, tedy embryí bez rozštěpu, byla vyšší než hmotnost u skupiny embryí s rozštěpy.

11.5.2 Experiment 2 - statistická analýza

V druhém experimentu byla kuřecím embryí aplikována koncentrace Hydrocortisonu Valeant 10^{-3} .

11.5.2.1 Základní statistická analýza dat pro druhý experiment

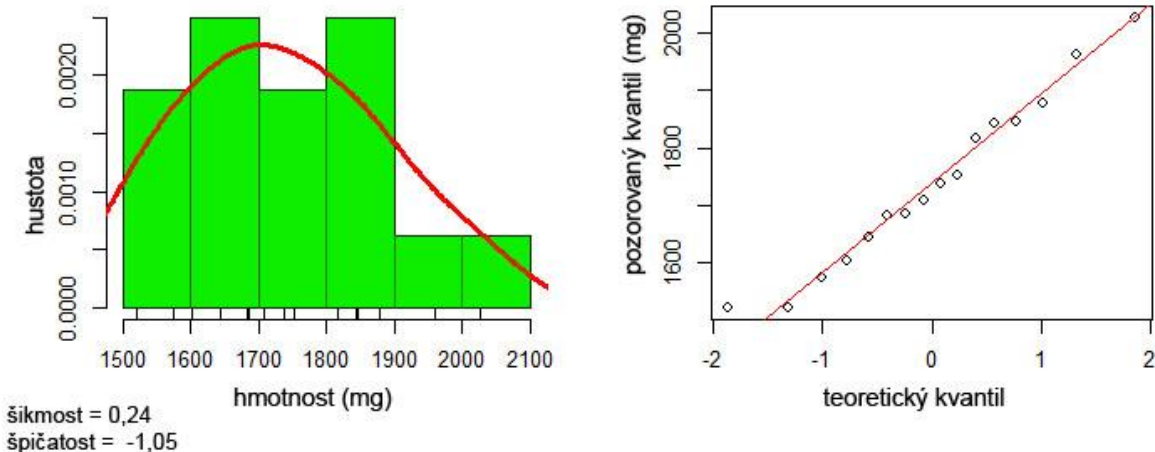
Stejně jako u prvního experimentu byla nejprve i v rámci druhého experimentu provedena základní statistická analýza dat (Tab. 29).

Tab. 29 Souhrn výsledků z druhého experimentu zahrnující základní popisné statistiky polohy, variability a tvaru rozdělení, doplněné o test normality.

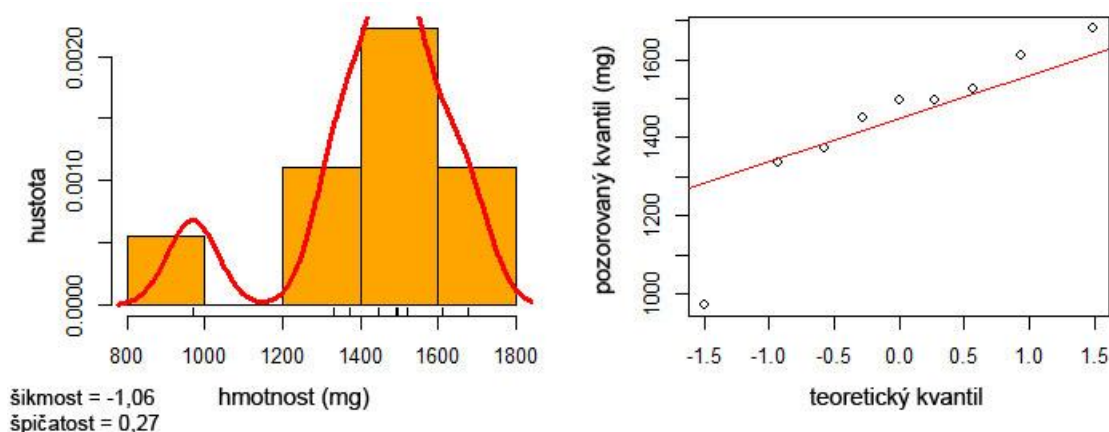
	embrya bez rozštěpu	embrya s rozštěpem
popisná statistika polohy (mg)		
minimum	1522	970
dolní kvartil	1633	1373
medián	1723	1494
průměr	1738	1437
horní kvartil	1844	1523
maximum	2027	1679
popisná statistika variability		
směrodatná odchylka	149,6551	205,0523
rozptyl	22396,66	42046,45
tvar rozdělení		
šikmost	0,2439561	-1,062012
špičatost	-1,048989	0,2722161
Shapiro-Wilkův test normality		
hladina významnosti stanovena na $\alpha = 0,05$	normalita dat přijata $p = 0,8127$	normalita dat přijata $p = 0,1314$

V tabulce 29 hodnoty šikmosti a špičatosti pro embrya bez rozštěpu (kontrola) značí symetrické, ale mírně zploštělé rozložení dat, které by mělo být pouze mírně odlišné od normálního rozdělení. Toto potvrzuje i výsledek testu normality, kdy v rámci kontrolní skupiny není normalita dat na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ zamítnuta ($p = 0,8127$). Rozložení dat u skupiny embryí s rozštěpy vykazuje na základě šikmosti jejich levostrannou asymetričnost s přibližně normální špičatostí. Normalita dat není na základě Shapiro-Wilkova testu zamítnuta ($p = 0,1314$).

11.5.2.2 Grafické diagnostiky dat pro experiment 2



Graf 23 Rozložení dat u kontrolní skupiny kuřecích embryí pro druhý experiment.



Graf 24 Rozložení dat u skupiny kuřecích embryí s rozštěpým zobákem pro druhý experiment.

Zhodnocení grafů: Na histogramu kontrolní skupiny (Graf 23) je vidět téměř stejné zastoupení dat v intervalu 1600-1700 mg a 1800-1900 mg, oproti tomu nízké zastoupení je u hmotností 1900-2100 mg, což má dohromady za následek plošší rozložení dat. Q-Q graf ukazuje pouze jednu posunutou hodnotu, která podle testu normality dat neovlivňuje (Graf 23). Histogram u rozštěpové skupiny (Graf 24) je zešikmen doleva v důsledku odlehle hodnoty, která je patrná na Q-Q grafu. Osy vyjadřující hmotnosti jsou od os kontrolní skupiny posunuty směrem dolů.

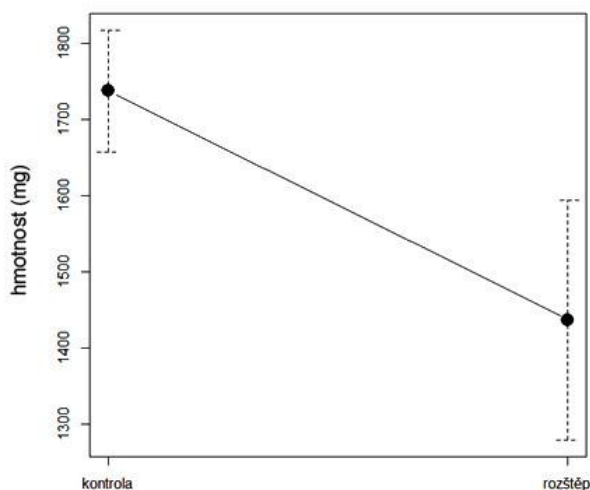
11.5.2.3 Analýza rozdílu v hmotnosti kuřecích embryí s rozštěpy a kontrolní skupiny

Shodně s prvním experimentem bylo nejprve nutné otestovat na souboru dat shodu rozptylů pomocí F-testu. Na základě p-hodnoty 0,279 nebyla zamítnuta shoda rozptylů. Následně byl použit dvouvýběrový nepárový t-test pro shodné rozptyly při oboustranné alternativě (Tab. 30).

Hypotézy byly shodné s prvním experimentem.

Tab. 30 Výsledky dvouvýběrového nepárového t-testu pro druhý experiment.

Skupina	kontrola	experiment
průměr (mg)	1737,562	1436,778
testovací kritérium T		4,2222
stupně volnosti		23
p - hodnota		0,0003236* (Zamítá se H ₀)
95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot		< 153,4171; 448,1523>



Graf 25 Rozdíl v hmotnosti kuřecích zárodků kontrolní a experimentální skupiny. Úsečky tvoří 95% intervaly spolehlivosti.

Závěr analýzy středních hodnot: Na základě p-hodnoty 0,0003236 dvouvýběrového nepárového t-testu byla přijata alternativní hypotéza (hmotnosti se mezi skupinami liší). Dle nepřekrývajících se intervalů spolehlivosti obou skupin lze potvrdit, že je rozdíl mezi skupinami statisticky významný. Na základě grafické analýzy dat je viditelné, že hmotnosti embryí v kontrolní skupině jsou větší než hmotnosti embryí s rozštěpy (Graf 25).

V obou experimentech měla kuřecí embrya s rozštěpy zobáku menší hmotnost než kuřecí zárodky bez rozštěpu. Na závěr lze tedy říci, že výsledky experimentální části jsou obdobné, jako výsledky analýzy dětí s nesyndromatickým typem rozštěpu.

11.6 Shrnutí výsledků

Od porodní hmotnosti kontrolní skupiny se statisticky významně lišily průměrné porodní hmotnosti některých skupin pacientů s rozštěpy a to u chlapců i dívek.

V 38. týdnu byli chlapci s CP (3058 g) signifikantně lehčí než zdraví chlapci (3291 g). Ve srovnání s kontrolou měli chlapci s CP (3252 g) a s CLP (3279 g) signifikantně nižší průměrnou porodní hmotnost než kontrolní skupina zdravých chlapců (3468 g) v 39. týdnu. Průměrná porodní hmotnost zdravých chlapců ve 40. týdnu gestace byla 3552 g. Porodní hmotnost chlapců s CL (3420 g), CP (3417 g) i s CLP (3384 g) byla ve 40. týdnu signifikantně nižší ve srovnání s kontrolou.

V 38. týdnu gestace se od zdravých dívek (3141 g) signifikantně lišily dívky s CP (2905 g). V 39. týdnu byla průměrná porodní hmotnost zdravých dívek (3314 g) rovněž signifikantně vyšší než porodní hmotnost dívek s CP (3048 g).

Podobně jako u chlapců i u dívek s CL (3264 g), CP (3271 g) i s CLP (3242 g) bylo patrné signifikantní snížení porodní hmotnosti ve srovnání s kontrolou (3408 g) pro 40. týden gestace. U dívek s CLP (3251 g) byla signifikantně nižší průměrná porodní hmotnost ve srovnání se zdravými dívkami (3526 g) zjištěná i ve 41. týdnu gestace.

Nebyly potvrzeny žádné signifikantní rozdíly v porodních hmotnostech pro jednostrannou a oboustrannou formu ani u jednoho z hodnocených typů rozštěpů, ani u jednoho pohlaví, i když zajímavé je, že vyšší hmotnost v průměru obecně vykazovali pacienti u oboustranné formy všech hodnocených rozštěpových vad u obou pohlaví navzdory faktu, že oboustranná forma je považovaná za těžší postižení.

Chlapci s jednostrannou formou CL vážili v průměru 3400g a chlapci s oboustrannou formou 3462g, pro CLP byla průměrná porodní hmotnost u jednostranné varianty 3332g a u oboustranné 3387g. Rozdíly nebyly statisticky významné.

Dívky s jednostrannou formou CL měly průměrnou porodní hmotnost 3221 g a dívky s oboustrannou formou CL 3273 g. Pro CLP byla průměrná porodní hmotnost jednostranné varianty 3197 g, oboustranné 3208 g. Rozdíly ani při tomto srovnání nebyly signifikantní.

U dívek s CP (3238 g) asociovaným s Pierre-Robinovou sekvencí jako jedinou hodnocenou syndromatickou formou orofaciálního rozštěpu nebyly na rozdíl od pacientů s nesyndromatickými rozštěpy nalezeny žádné signifikantní rozdíly v průměrných porodních hmotnostech proti kontrole (3320 g). Podobně ani u skupiny chlapců s CP asociovaným s Pierre-Robinovou sekvencí nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl ve srovnání se zdravými chlapci a to ani v jednom ze sledovaných týdnů gestace, i když křivka porodní hmotnosti chlapců s tímto typem syndromu je v celé své délce pod křivkou kontrolní skupiny a hmotnost chlapců s CP u pacientů s Pierre-Robinovou sekvencí je tedy v celém hodnoceném období nižší než průměr zdravých novorozených chlapců (Graf 18).

Výsledky experimentálního šetření snížení hmotnosti zárodků s rozštěpy ve srovnání se zárodky bez rozštěpů zobáku v prvním (1758 mg vs. 1920 mg) i ve druhém (1494 mg vs. 1738 mg) experimentu, což podepírá výsledky studie pacientů s nesyndromatickými orofaciálními rozštěpy. Oba experimenty potvrdily působení faktoru vyvolávajícího rozštěpovou vadu i ve smyslu intrauterinní retardace růstu a nižší výsledné hmotnosti zárodku s rozštěpovou vadou.

11.7 Diskuze

Na vzniku orofaciálních rozštěpů, které patří mezi vrozené vývojové vady, se mohou podílet genetické i environmentální faktory. Existují rozdíly ve výskytu jednotlivých orofaciálních rozštěpů mezi pohlavími. Uvádí se větší predispozice chlapců k rozštěpu rtu a rozštěpu rtu a patra (Fraser and Calnan, 1961; Harville et al., 2005). Na zkoumaném souboru dat byla tato predispozice rovněž potvrzena, procento chlapců s CL bylo 61,7 % a CLP 67,5 % (Tab. 7). V rámci dětí s CP bylo množství mírně přikloněno na stranu dívek 55,4 % (Tab. 7), což je v souladu například se studií Jensen et al. (1988), kde je procento dívek s CP téměř 60 %.

Kromě faktu, že environmentální faktory přispívají ke vzniku orofaciálních rozštěpů, mohou ovlivňovat i porodní parametry, především hmotnost a délku novorozenců. Tato diplomová práce byla zaměřena na porodní hmotnost, která se z klinického hlediska bere jako faktor prospívání během intrauterinního života a lze ji těsně po porodu přesněji změřit než porodní délku. Přestože i menší porodní délka je indikátorem intrauterinní růstové retardace, většina studií zkoumajících souvislost parametrů novorozence s orofaciálními rozštěpy je zaměřena právě na porodní hmotnost. Porodní délka novorozenců sice byla i v předložené práci součástí dotazníkového sběru dat jako doplňující faktor, ale v řadě případů nebyla podle matek vůbec měřena. Je zajímavé, že porodní délka obecně je spíše méně častým údajem, a to i přestože je adekvátní resp. nepřiměřený poměr délky a hmotnosti spojen s lepší pravděpodobností určit novorozence s rizikem pro některá neonatální onemocnění, např. vrozená pneumonie (Bertagnon et al., 2003). Tento parametr nebyl součástí ani získaného souboru dat z porodnice Fakultní nemocnice v Motole. Ve většině studií dostupných v literatuře je obecně častěji hodnocen vliv orofaciálních rozštěpů na délku či výšku jedince a jsou tedy spíše vyhodnocovány starší děti ve vztahu orofaciálních rozštěpů k jejich lineárnímu růstu (Ranalli and Mazaheri, 1975; Jensen et al., 1988; Cunningham and Jerome, 1997).

Jak je již zmíněno výše, porodní hmotnost může být ovlivňována vnějšími vlivy, a tudíž různé výkyvy od normálních hodnot porodní hmotnosti nemusí být způsobeny samotným výskytem orofaciálních rozštěpů. Nízká porodní hmotnost může být způsobena podle některých studií také nízkým socioekonomickým statusem, dokládáným především nízkým vzděláním matky, nedostatkem prenatální péče či nižším příjmem v domácnosti

(Zeka et al., 2008; Gage et al., 2013). Podle jiných nemá socioekonomický status vliv ani na porodní hmotnost, ani na vznik orofaciálních rozštěpů (Kallen, 1997; Wijlaars et al., 2011). Jedním z faktorů může být nadbytečná hustota dopravy v okolí bydliště či kouření matky (Zeka et al., 2008). Vliv kouření na výsledné porodní parametry byl také potvrzen řadou studií a to i v případě kouření pasivního (Nijati et al., 2008; Wadi and Al-Sharbatti, 2011). Podle Chelchowska et al. (2014) se s kouřením tabáku snižuje kromě hmotnosti i porodní délka (Chelchowska et al., 2014). Kvůli předpokladu, že by kouření matky mohlo ovlivnit porodní hmotnost u zdravých dětí zařazených v kontrolní skupině, byl v předložené práci tento faktor také zjišťován pomocí dotazníkového šetření. Z 299 matek odpovědělo kladně pouze 12 matek, z toho jen 5 uvedlo, že kouřilo pravidelně. Otázkou však zůstává, jestli zbylé matky odpovídaly na tuto otázku pravdivě, či ne. Avšak ani v jednom případě nezůstala tato otázka nevyplněna. Pokud byly i další matky kuřačky, ale zodpovědně během těhotenství nekouřily, tak v některých studiích byla právě abstinence matek během těhotenství označena jako přínosná, a děti těchto matek měly stejné porodní hmotnosti jako děti celoživotních/dlouhodobých nekuřaček (Nijati et al., 2008) Tento přínos byl potvrzen i u české populace (Hruba and Kachlik, 2000). Protože údaje o kouření matek nebyly v případě rozštěpového ani kontrolního (kromě 12 jedinců z dotazníků) souboru dat dostupné, nemohl být tento vnější faktor zohledněn při analýze dat. Porodní hmotnost je negativně i pozitivně ovlivňována také charakteristikami matky, mezi něž patří věk matky (Schimmel et al., 2015), hmotnostní přírůstek během těhotenství a výška matky, nikoliv však hmotnost matky před otěhotněním (Ash et al., 1989). Bohužel tyto charakteristiky týkající se matky nebyly v předložené studii dostupné. S řadou obdobných nedostatků se potýkají i srovnávací studie v literatuře.

Na dané či podobné téma předložené diplomové práce nebylo vypracováno mnoho studií. Většina z těchto studií se zaměřuje především na přírůstky hmotnosti novorozenců po narození kvůli špatnému příjmu potravy z důvodu existence orofaciálního rozštěpu a údaje o porodních parametrech jsou zmíněny pouze okrajově. Vzhledem k tomu, že u hmotnostních přírůstků není třeba rozlišovat pohlaví, tak výsledné hodnoty bývají často uváděny pro chlapce i dívky dohromady (Jones, 1988). V některých z dostupných prací se nerozlišuje mezi syndromatickými a nesyndromatickými orofaciálními rozštěpy, výsledek tak může být zkreslen o následky těchto syndromů (Jensen et al., 1988; Hagberg et al., 1998). V jiných studiích jsou tyto dva druhy rozštěpových vad hodnoceny odděleně, navíc bývají vyloučeny i ostatní anomálie (Felix-Schollaart et al., 1992; Marques et al., 2009).

Často jsou dohromady hodnoceni i pacienti s CL a CLP, které tak tvoří jednu společnou skupinu CL/P (Becker et al., 1998; Wyszynski et al., 2003).

Z předložené práce byli vyloučeni jedinci, kteří měli přidružené vrozené vady, syndrom (kromě Pierre-Robinovy sekvence) či chromosomální aberaci. Nejčastějšími syndromy v souboru byly syndrom Sedláčkové, Downův a Apertův syndrom. Novorozenci s Pierre-Robinovou sekvencí byli hodnoceni zvlášť, nezávisle na nesyndromatických rozštěpech.

V rámci skupiny nesyndromatického rozštěpu patra bylo v této studii prokázáno signifikantní snížení hmotnosti dívek s CP oproti kontrole (Tab. 19). Ke stejnému zjištění došel i Fraser and Calnan (1961), kdy se průměrný rozdíl CP lišil o 127 g od kontrolní skupiny (Fraser and Calnan, 1961). Z výsledků předložené studie vyplývá větší průměrný rozdíl v rámci hmotnosti dívek s CP mezi 38. - 40. týdnem, které byly vůči kontrolní skupině v průměru o 213 g lehčí. Pro chlapce s CP byl ve studovaném souboru dat tento rozdíl mezi 38. - 40. týdnem gestace 195 g tzn., že zdraví chlapci měli v průměru ve stejném období o 195 g větší hmotnost (Tab. 16). V porovnání s výše zmíněnou studií byl tento rozdíl větší, autoři udávají hodnoty pouze kolem 36 g pro chlapce s CP, které již nebyly statisticky signifikantní (Fraser and Calnan, 1961). V případě chlapců byla nižší porodní hmotnost potvrzena i v další ze studií, ale u dívek byl nalezen průkazný rozdíl od kontroly pouze u parametru porodní délky (Jensen et al., 1988). Wyszynski et al. (2003) udává společný rozdíl, jež je 159 g pro obě pohlaví s CP oproti kontrole. Na rozdíl od zmíněných studií byla v předložené práci prokázána menší porodní hmotnost v rámci rozštěpu patra u obou pohlaví, u dívek i chlapců pro 38., 39. a 40. týden gestace.

Dalším z hodnocených rozštěpů je rozštěp rtu a patra. Porodní hmotnost novorozenců s tímto typem rozštěpu byla v této studii vyhodnocena jako nižší oproti kontrolní skupině u obou pohlaví (Tab. 16 a 19). Průměrný úbytek hmotnosti dívek s CLP byl od zdravých dívek přibližně 221 g (40. - 41. týden porodu), u chlapců byl rozdíl menší průměrně o 179 g (39. - 40. týden porodu). U chlapců jsou hodnoty posunuty níže i ve 41. týdnu gestace, ale tento rozdíl nebyl prokázán jako statisticky signifikantní, což mohlo být dáno velkým rozptylem hodnot v CLP skupině. Větší úbytek hmotnosti dívek oproti chlapcům ve skupině CLP byl zaznamenán i v dánské studii (Fraser and Calnan, 1961). Rozdíly byly ale celkově menší (82 g dívky, 73 g chlapci) než v předložené studii. Průměrný rozdíl o 197 g pro obě pohlaví je uveden u maďarské populace (Wyszynski et al., 2003). Tento rozdíl je v souladu s našimi výsledky, ovšem v dané studii byly sloučeni

pacienti s CLP dohromady s CL (Wyszynski et al., 2003). Naopak Jensen et al. (1988) žádný rozdíl mezi porodními hmotnostmi zdravých dětí a dětí s CLP nenašel, zaznamenal však u dětí s CLP sníženou délku i hmotnost v 9. týdnu a v 22. měsíci po porodu (Jensen et al., 1988). Porodní hmotnosti se u dětí s jednostrannou či oboustrannou formou CLP v předložené studii nijak nelišily (Tab. 20 a Tab. 21). Některé práce prezentují stejný závěr (Ranalli and Mazaheri, 1975), jiní autoři dospěli k opačnému závěru, kdy byli novorozenci s jednostrannými CLP těžší (Becker et al., 1998).

Děti s nesyndromatickým rozštěpem rtu měly v předložené práci oproti kontrole signifikantně sníženou porodní hmotnost pouze ve 40. týdnu gestace, dívky o 144 g (Tab. 19) a chlapci o 132 g (Tab. 16), přičemž děti narozené ve 40. týdnu tvořily kolem 70 % souboru, což by mohlo být jedním z důvodů tohoto výsledku. Navíc v 39. týdnu gestace u dívek s CL je patrné také mírné snížení porodní hmotnosti vůči kontrole, které však nebylo statisticky signifikantní (Graf 13). Snížená hmotnost dětí s CL byla zaznamenána i u dánské populace (Luijsterburg and Vermeij-Keers, 2010). Ostatní studie shodně uvádí, že porodní hmotnosti zdravých dětí a dětí s CL jsou téměř či zcela totožné (Fraser and Calnan, 1961; Ranalli and Mazaheri, 1975; Jensen et al., 1988). Dále byla v předložené studii hodnocena jednostranná a oboustranná forma rozštěpu rtu samostatně, bez zahrnutí rozštěpu patra (CL/P), mezi těmito druhy CL nebyl nalezen žádný rozdíl (Tab. 20 a Tab. 21, Graf 14 a 15).

V předložené práci bylo u souboru dětí s Pierre-Robinovou sekvencí hodnoceno celkem 214 jedinců. Pokud byly např. hodnoty porodní hmotnosti chlapců vyneseny v grafické podobě s přidáním gestačního věku, jejich intervaly spolehlivosti se téměř celé překrývaly (Graf 18). Je tedy možné konstatovat, že snížení porodní hmotnosti u této skupiny pacientů ve srovnání s kontrolou nebylo potvrzeno. V literatuře se udává u pacientů s Pierre-Robinovou sekvencí nižší hmotnost především v rámci skupiny < 2500 g, i když tento rozdíl nenabyl statistické signifikace (Becker et al., 1998). U chlapců s Pierre-Robinovou sekvencí byla v jednom případě zjištěna stejná hmotnost jako u dětí s nesyndromatickým CP, přičemž porodní hmotnost chlapců s CP byla nižší, než měli zdraví chlapci (Jensen et al., 1988). Možným vysvětlením výsledků by mohlo být působení vnějšího faktoru, tedy pokud by vznik intrauterinní retardace růstu i rozštěpu byl ovlivněn působením stejného faktoru (Becker et al., 1998). Jedním z takových faktorů by mohlo být například kouření, u něhož bylo prokázáno působení na oba diskutované problémy, na všechny typy nesyndromatických rozštěpů a porodní hmotnost (Kallen,

1997). Rozdílné působení vnějšího faktoru na nesyndromatické typy rozštěpů a na rozštěp, který je součástí Pierre-Robinovy sekvence může být důsledkem odlišného způsobu vzniku těchto dvou typů rozštěpů. Podle jedné z hypotéz vzniká rozštěp, který je součástí Pierre-Robinovy sekvence z jiné příčiny, tj., v důsledku znemožněné horizontalizace plotének, než nesyndromatický izolovaný CP (Schubert et al., 2005). Avšak v jiné studii byla prokázána souvislost mezi výskytem CP součástí Pierre-Robinovy sekvence a velmi častým kouřením matek během perikoncepční periody (Honein et al., 2007). Výše uvedená studie by tedy vylučovala domněnku odlišného působení vnějších faktorů na nesyndromatické rozštěpy a rozštěpy součástí Pierre-Robinovy sekvence.

Dalším vysvětlením rozdílu v rámci porodní hmotnosti mezi pacienty s nesyndromatickými rozštěpy a pacienty s Pierre-Robinovou sekvencí může být zapojení genetických faktorů. U růstových faktorů TGF- α , TGF- β a FGF, které byly zmíněny v literárním přehledu, byla zaznamenána souvislost se vznikem orofaciálních rozštěpů. Transformující růstové faktory regulují vývoj, především u faktorů TGF- α a TGF- β je známo, že mají důležitou roli ve vývoji obličeje, konkrétně v oblasti vytvářejícího se patra (Ardinger et al., 1989; Holder et al., 1992). Avšak ovlivňují i celkový růst. Do rodiny růstových faktorů TGF- β patří například i růstový a diferenciací faktor (GDFs), který patří mezi Bmp proteiny (Levine and Brivanlou, 2006; Ye et al., 2010). In vitro studie ukazují, že tyto růstové faktory mohou stimulovat tvorbu extracelulární matrix z mezenchymálních buněk patra (Sharpe and Ferguson, 1988). Zásah do genetického kódu buněk odpovědných za lokální adhezi tkáně a uzavírání rozštěpové štěrby, může vyústit v malformaci v podobě rozštěpu patra.

V rámci této diplomové práce byl dále navržen experiment, jehož účelem bylo experimentálně potvrdit, či vyvrátit výsledky dostupné ze studie novorozenců. Celkem byly provedeny dva experimenty na kuřecím modelu, u nichž byl rozštěp zobáku vyvolán pomocí hydrokortizonu, u kterého je známo, že vyvolává rozštěpy u kuřat (Jelinek et al., 1983), u myší (Dostal, 1971), i u člověka (Hviid and Molgaard-Nielsen, 2011). Kuřecí embrya s rozštěpy zobáku měla v obou experimentech menší hmotnost než kuřata bez rozštěpu. Tyto závěry byly stanoveny na základě 32 jedinců s rozštěpy a 43 kuřat bez rozštěpu. U prvního experimentu byla kuřata s rozštěpy v průměru lehčí o 162 mg (95% CI: 87-237 mg) a v druhém experimentu byl tento rozdíl průměrně dokonce 300 mg (95% CI: 153-448 mg). Výsledky těchto experimentů odpovídají výsledkům získaným hodnocením novorozenců s nesyndromatickými rozštěpovými vadami.

12. ZÁVĚR

Závěr 1 Porodní hmotnosti zdravých dětí se lišily od porodní hmotnosti pacientů s orofaciálními rozštěpy u obou pohlaví. Všechny hodnocené skupiny nesyndromatických rozštěpů vykazovaly signifikantně nižší porodní hmotnosti ve srovnání s kontrolní skupinou. Nižší hmotnost u dívek (o 144 g) i chlapců (o 132 g) s rozštěpy rtu byla prokázána pro porod ve 40. týdnu těhotenství. U ostatních týdnů gestace nebylo snížení porodní hmotnosti ve srovnání s kontrolou signifikantní. Jedním z možných důvodů může být nedostatečný počet jedinců v ostatních týdnech.

Dívky s CLP měly nižší hmotnost vůči zdravým dívkám při porodu ve 40. a 41. týdnu gestace (průměrně o 221 g), chlapci s CLP v 39. a 40. týdnu porodu (průměrně o 179 g).

U novorozenců s CP byla potvrzena snížená porodní hmotnost u dívek (průměrně o 213 g) i chlapců (průměrně o 195 g) v 38., 39. a 40. týdnu gestace.

Závěr 2 Porodní hmotnosti se mezi jednotlivými typy rozštěpů nelišily ani u jednoho pohlaví. Žádný rozdíl nebyl zjištěn ani mezi jednostrannými a oboustrannými formami CL, ani CLP a to opět pro obě pohlaví.

Závěr 3 Chlapci ani dívky s Pierre-Robinovou sekvencí neměli porodní hmotnost ve srovnání se zdravou populací signifikantně nižší.

Experimentální část

Závěr 1 Z obou provedených experimentů bylo zjištěno, že kuřecí embrya s rozštěpem zobáku měla menší hmotnost než kuřecí zárodky bez rozštěpu zobáku (průměrně o 162 mg, resp. 300 mg).

Závěr 2 Výsledky z experimentální studie potvrdily závěry zjištěné ze studie novorozenců s orofaciálními rozštěpy, ve které byly porodní hmotnosti dětí s nesyndromatickou formou CL, CLP i CP signifikantně nižší než u zdravých dětí.

Pro další analýzu by bylo potřebné navýšit počty jedinců s rozštěpy rtu pro všechny gestační týdny a ve zbylých skupinách (CLP, CP) především o jedince narozené

v 37. týdnu. Dále by bylo zajímavé do případných studií zahrnout charakteristiky matky (věk matky, přírůstek hmotnosti atd.) a působení vnějších faktorů, především kouření matky.

13.LITERATURA

- Abrishamchian AR, Khoury MJ, Calle EE.** (1994) The contribution of maternal epilepsy and its treatment to the etiology of oral clefts: a population based case-control study. *Genetic epidemiology* 11:343-351
- Acuna-Gonzalez G, Medina-Solis CE, Maupome G, Escoffie-Ramirez M, Hernandez-Romano J, Marquez-Corona Mde L, Islas-Marquez AJ, Villalobos-Rodelo JJ.** (2011) Family history and socioeconomic risk factors for non-syndromic cleft lip and palate: a matched case-control study in a less developed country. *Biomedica* 31:381-391
- Ahlsson FS, Diderholm B, Ewald U, Gustafsson J.** (2007) Lipolysis and insulin sensitivity at birth in infants who are large for gestational age. *Pediatrics* 120:958-965
- Ardinger HH, Buetow KH, Bell GI, Bardach J, VanDemark DR, Murray JC.** (1989) Association of genetic variation of the transforming growth factor-alpha gene with cleft lip and palate. *American journal of human genetics* 45:348-353
- Ash S, Fisher CC, Truswell AS, Allen JR, Irwig L.** (1989) Maternal weight gain, smoking and other factors in pregnancy as predictors of infant birth-weight in Sydney women. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 29:212-219
- Avila JR, Jezewski PA, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Christensen K, Daack-Hirsch S, Romitti PA, Murray JC.** (2006) PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *American journal of medical genetics Part A* 140:2562-2570
- Bachler M, Neubuser A.** (2001) Expression of members of the Fgf family and their receptors during midfacial development. *Mechanisms of development* 100:313-316
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C.** (2002) Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *International journal of epidemiology* 31:1235-1239
- Barteczko K, Jacob M.** (2004) A re-evaluation of the premaxillary bone in humans. *Anatomy and Embryology* 207:417-437
- Becker M, Svensson H, Kallen B.** (1998) Birth weight, body length, and cranial circumference in newborns with cleft lip or palate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 35:255-261
- Ben J, Jabs EW, Chong SS.** (2005) Genomic, cDNA and embryonic expression analysis of zebrafish IRF6, the gene mutated in the human oral clefting disorders Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. *Gene expression patterns* 5:629-638

- Bertagnon JR, de Mattos Segre CA, Dall Colletto GM.** (2003) Weight-for-length relationship at birth to predict neonatal diseases. *Sao Paulo medical journal* 121:149-154
- Bianchi F, Cianciulli D, Pierini A, Seniori Costantini A.** (1997) Congenital malformations and maternal occupation: a registry based case-control study. *Occupational and environmental medicine* 54:223-228
- Birnbaum S, Ludwig KU, Reutter H, Herms S, de Assis NA, Diaz-Lacava A, Barth S, Lauster C, Schmidt G, Scheer M, Saffar M, Martini M, Reich RH, Schiefke F, Hemprich A, Potzsch S, Potzsch B, Wienker TF, Hoffmann P, Knapp M, Kramer FJ, Nothen MM, Mangold E.** (2009) IRF6 gene variants in Central European patients with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *European journal of oral sciences* 117:766-769
- Bixler D.** (1981) Genetics and clefting. *The Cleft palate journal* 18:10-18
- Braybrook C, Lisgo S, Doudney K, Henderson D, Marcano AC, Strachan T, Patton MA, Villard L, Moore GE, Stanier P, Lindsay S.** (2002) Craniofacial expression of human and murine TBX22 correlates with the cleft palate and ankyloglossia phenotype observed in CPX patients. *Human molecular genetics* 11:2793-2804
- Broder HL, Richman LC, Matheson PB.** (1998) Learning disability, school achievement, and grade retention among children with cleft: a two-center study. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 35:127-131
- Burdi AR, Silvey RG.** (1969) Sexual differences in closure of the human palatal shelves. *The Cleft palate journal* 6:1-7
- Carinci F, Rullo R, Farina A, Morano D, Festa VM, Mazzarella N, Del Viscovo D, Carls PF, Becchetti A, Gombos F.** (2005) Non-syndromic orofacial clefts in Southern Italy: pattern analysis according to gender, history of maternal smoking, folic acid intake and familial diabetes. *Journal of Cranio-Maxillofacial surgery* 33:91-94
- Carinci F, Scapoli L, Palmieri A, Zollino I, Pezzetti F.** (2007) Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 71:1509-1519
- Collins MD, Mao GE.** (1999) Teratology of retinoids. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39:399-430
- Cordier S, Bergeret A, Goujard J, Ha MC, Ayme S, Bianchi F, Calzolari E, De Walle HE, Knill-Jones R, Candela S, Dale I, Dananche B, de Vigan C, Fevotte J, Kiel G, Mandereau L.** (1997) Congenital malformation and maternal occupational exposure to glycol ethers. Occupational Exposure and Congenital Malformations Working Group. *Epidemiology* 8:355-363
- Crispi F, Figueras F, Cruz-Lemini M, Bartrons J, Bijmens B, Gratacos E.** (2012) Cardiovascular programming in children born small for gestational age and

relationship with prenatal signs of severity. American journal of obstetrics and gynecology 207:121 e121-129

Croen LA, Shaw GM, Wasserman CR, Tolarova MM. (1998) Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983-1992. American journal of medical genetics 79:42-47

Cunningham ML, Jerome JT. (1997) Linear growth characteristics of children with cleft lip and palate. The Journal of pediatrics 131:707-711

Czeizel A, Tusnady G. (1972) A family study on cleft lip with or without cleft palate and posterior cleft palate in Hungary. Human heredity 22:405-416

Czeizel AE, Timar L, Sarkozi A. (1999) Dose-dependent effect of folic acid on the prevention of orofacial clefts. Pediatrics 104:e66

Czeizel AE, Vereczkey A, Banhidy F. (2015) Higher risk of orofacial clefts in children born to mothers with angina pectoris: A population-based case-control study. Congenital anomalies 55:49-54

da Silva Freitas R, Lopes-Grego AB, Dietrich HL, Cerchiari NR, Nakakogue T, Tonocchi R, Gabardo J, da Silva ED, Forte AJ. (2012) Weight Gain in Children with Cleft Lip and Palate without Use of Palatal Plates. Plastic surgery international 2012:1-4

Dahlquist G, Bennich SS, Kallen B. (1996) Intrauterine growth pattern and risk of childhood onset insulin dependent (type I) diabetes: population based case-control study. British medical journal 313:1174-1177

Desrosiers TA, Lawson CC, Meyer RE, Richardson DB, Daniels JL, Waters MA, van Wijngaarden E, Langlois PH, Romitti PA, Correa A, Olshan A, National Birth Defects Prevention S. (2012) Maternal occupational exposure to organic solvents during early pregnancy and risks of neural tube defects and orofacial clefts. Occupational and environmental medicine 69:493-499

Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP. (2003) Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nature genetics 33:463-465

Dort J, Dortová E, Jehlička P. *Neonatologie*, Karolinum Praha 2013, pp 118

Dostal M. (1971) Morphogenesis of cleft palate induced by exogenous factors. 3. Intraamniotic application of hydrocortisone in mice. Teratology 4:63-68

Edwards MJ, Agho K, Attia J, Diaz P, Hayes T, Illingworth A, Roddick LG. (2003) Case-control study of cleft lip or palate after maternal use of topical corticosteroids during pregnancy. American journal of medical genetics Part A 120A:459-463

- Eriksson J, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker D.** (2001) Size at birth, childhood growth and obesity in adult life. *International journal of obesity and related metabolic disorders* 25:735-740
- Fara M, Jelinek R, Peterka M, Dostal M, Hrivnakova J.** (1988) Orofacial clefts. A theoretical basis for their prevention and treatment. *Acta Universitatis Carolinae Medica Monographia* 124:1-143
- Felix-Schollaart B, Hoeksma JB, Prah-Andersen B.** (1992) Growth comparison between children with cleft lip and/or palate and controls. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 29:475-480
- Ferguson MW.** (1988) Palate development. *Development* 103 Suppl:41-60
- Fraser FC.** (1970) Genetics of Cleft Lip and Cleft Palate. *American journal of human genetics* 22:336-352
- Fraser GR, Calnan JS.** (1961) Cleft lip and palate: seasonal incidence, birth weight, birth rank, sex, site, associated malformations and parental age. A statistical survey. *Archives of disease in childhood* 36:420-423
- Gage TB, Fang F, O'Neill E, Dirienzo G.** (2013) Maternal education, birth weight, and infant mortality in the United States. *Demography* 50:615-635
- Garlantezec R, Monfort C, Rouget F, Cordier S.** (2009) Maternal occupational exposure to solvents and congenital malformations: a prospective study in the general population. *Occupational and environmental medicine* 66:456-463
- Gewitz M, Dinwiddie R, Yuille T, Hill E, Carter CO.** (1978) Cleft palate and accessory metacarpal of index finger syndrome: possible familial occurrence. *Journal of Medical Genetics* 15:162-164
- Goodacre T, Swan MC.** (2012) Cleft lip and palate: current management. *Paediatrics and Child Health* 22:160-168
- Haas JD, Balcazar H, Caulfield L.** (1987) Variation in early neonatal mortality for different types of fetal growth retardation. *American journal of physical anthropology* 73:467-473
- Hagberg C, Larson O, Milerad J.** (1998) Incidence of cleft lip and palate and risks of additional malformations. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 35:40-45
- Hamburger V, Hamilton HL.** (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology* 88:49-92
- Harville EW, Wilcox AJ, Lie RT, Vindenes H, Abyholm F.** (2005) Cleft lip and palate versus cleft lip only: are they distinct defects? *American journal of epidemiology* 162:448-453

- Hashmi SS, Gallaway MS, Waller DK, Langlois PH, Hecht JT.** (2010) Maternal fever during early pregnancy and the risk of oral clefts. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology* 88:186-194
- Hassan WA, Lees CC.** (2014) Facial cleft detected: is the palate normal? Best practice & research *Clinical obstetrics & gynaecology* 28:379-389
- Holder SE, Vintiner GM, Farren B, Malcolm S, Winter RM.** (1992) Confirmation of an association between RFLPs at the transforming growth factor-alpha locus and non-syndromic cleft lip and palate. *Journal of medical genetics* 29:390-392
- Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J, Romitti PA, Lammer EJ, Sun L, Correa A.** (2007) Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology* 18:226-233
- Hovorakova M, Lesot H, Peterkova R, Peterka M.** (2006) Origin of the deciduous upper lateral incisor and its clinical aspects. *Journal of dental research* 85:167-171
- Hruba D, Kachlik P.** (2000) Influence of maternal active and passive smoking during pregnancy on birthweight in newborns. *Central European journal of public health* 8:249-252
- Hviid A, Molgaard-Nielsen D.** (2011) Corticosteroid use during pregnancy and risk of orofacial clefts. *Canadian Medical Association Journal* 183:796-804
- Chelchowska M, Ambroszkiewicz J, Mazur J, Lewandowski L, Maciejewski TM, Oltarzewski M, Gajewski J.** (2014) Effect of tobacco smoking on the maternal and fetal adipokine axis in relation to newborn birth weight and length. *Przegląd lekarski* 71:567-571
- Chevrier C, Dananche B, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert-Gnansia E, Cordier S.** (2006) Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. *Occupational and environmental medicine* 63:617-623
- Ching GH, Chung CS.** (1974) A genetic study of cleft lip and palate in Hawaii. I. Interracial crosses. *American journal of human genetics* 26:162-176
- Christensen K, Juel K, Herskind AM, Murray JC.** (2004) Long term follow up study of survival associated with cleft lip and palate at birth. *British medical journal* 328:1405
- Innes K, Byers T, Schymura M.** (2000) Birth characteristics and subsequent risk for breast cancer in very young women. *American journal of epidemiology* 152:1121-1128
- Ize-Iyamu IN, Saheeb BD.** (2011) Feeding intervention in cleft lip and palate babies: a practical approach to feeding efficiency and weight gain. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 40:916-919
- Jagomagi T, Soots M, Saag M.** (2010) Epidemiologic factors causing cleft lip and palate and their regularities of occurrence in Estonia. *Stomatologija* 12:105-108

- Jelinek R, Pavlik A, Peterka M.** (1983) Glucocorticoid receptor-mediated teratogenesis in the chick embryo. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 3:1-7
- Jensen BL, Kreiborg S, Dahl E, Fogh-Andersen P.** (1988) Cleft lip and palate in Denmark, 1976-1981: epidemiology, variability, and early somatic development. *The Cleft palate journal* 25:258-269
- Jezewski PA, Vieira AR, Nishimura C, Ludwig B, Johnson M, O'Brien SE, Daack-Hirsch S, Schultz RE, Weber A, Nepomucena B, Romitti PA, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Machida J, Natsume N, Murray JC.** (2003) Complete sequencing shows a role for MSX1 in non-syndromic cleft lip and palate. *Journal of medical genetics* 40:399-407
- Johansen AMW, Lie RT, Wilcox AJ, Andersen LF, Drevon CA.** (2008) Maternal dietary intake of vitamin A and risk of orofacial clefts: A population-based case-control study in Norway. *American journal of epidemiology* 167:1164-1170
- Jones WB.** (1988) Weight gain and feeding in the neonate with cleft: a three-center study. *The Cleft palate journal* 25:379-384
- Jugessur A, Farlie PG, Kilpatrick N.** (2009) The genetics of isolated orofacial clefts: from genotypes to subphenotypes. *Oral Diseases* 15:437-453
- Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Murray JC, Taylor JA, Saugstad OD, Vindenes HA, Abyholm F.** (2003) Variants of developmental genes (TGFA, TGFB3, and MSX1) and their associations with orofacial clefts: a case-parent triad analysis. *Genetic epidemiology* 24:230-239
- Kaijser M, Bonamy AK, Akre O, Cnattingius S, Granath F, Norman M, Ekblom A.** (2008) Perinatal risk factors for ischemic heart disease: disentangling the roles of birth weight and preterm birth. *Circulation* 117:405-410
- Kallen K.** (1997) Maternal smoking and orofacial clefts. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 34:11-16
- Kliegman RM, Stanton BF, St. Geme JW, Schor NF, Behrman RE.** *Nelson Textbook of Pediatrics*, Saunders Elsevier Philadelphia 2011, pp 2680
- Kramer MS, Olivier M, McLean FH, Willis DM, Usher RH.** (1990) Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome. *Pediatrics* 86:707-713
- Krapels IPC, van Rooij IALM, Ocke MC, West CE, van der Horst CMAM, Steegers-Theunissen RPM.** (2004) Maternal nutritional status and the risk for orofacial cleft offspring in humans. *Journal of Nutrition* 134:3106-3113
- Laumon B, Martin JL, Collet P, Bertucat I, Verney MP, Robert E.** (1996) Exposure to organic solvents during pregnancy and oral clefts: a case-control study. *Reproductive toxicology* 10:15-19

- Leifer G.** *Úvod do porodnického a pediatrického ošetřovatelství*, Grada Publishing, a.s. Praha 2004, pp 988
- Letra A, Menezes R, Granjeiro JM, Vieira AR.** (2007) Defining subphenotypes for oral clefts based on dental development. *Journal of dental research* 86:986-991
- Levine AJ, Brivanlou AH.** (2006) GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* 133:209-216
- Lidral AC, Murray JC, Buetow KH, Basart AM, Schearer H, Shiang R, Naval A, Layda E, Magee K, Magee W.** (1997) Studies of the candidate genes TGFB2, MSX1, TGFA, and TGFB3 in the etiology of cleft lip and palate in the Philippines. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 34:1-6
- Lisson JA, Kjaer I.** (1997) Location of alveolar clefts relative to the incisive fissure. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 34:292-296
- Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, et al.** (1996) Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *British Medical Journal* 312:406
- Little J, Bryan E.** (1986) Congenital anomalies in twins. *Seminars in perinatology* 10:50-64
- Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D, Cardy A, Clayton-Smith J, Fryer AE, collaboration IM.** (2008) Folate and clefts of the lip and palate--a U.K.-based case-control study: Part I: Dietary and supplemental folate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 45:420-427
- Liu W, Sun X, Braut A, Mishina Y, Behringer RR, Mina M, Martin JF.** (2005) Distinct functions for Bmp signaling in lip and palate fusion in mice. *Development* 132:1453-1461
- Lorente C, Cordier S, Bergeret A, De Walle HE, Goujard J, Ayme S, Knill-Jones R, Calzolari E, Bianchi F.** (2000) Maternal occupational risk factors for oral clefts. Occupational Exposure and Congenital Malformation Working Group. *Scandinavian journal of work, environment & health* 26:137-145
- Luijsterburg AJM, Vermeij-Keers C.** (2010) Ten Years Recording Common Oral Clefts With a New Descriptive System. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 48:173-182
- Marcano AC, Doudney K, Braybrook C, Squires R, Patton MA, Lees MM, Richieri-Costa A, Lidral AC, Murray JC, Moore GE, Stanier P.** (2004) TBX22 mutations are a frequent cause of cleft palate. *Journal of medical genetics* 41:68-74
- Marques IL, Nackashi JA, Borgo HC, Martinelli AP, Pegoraro-Krook MI, Williams WN, Dutka JC, Seagle MB, Souza TV, Garla LA, Neto JS, Silva ML, Graciano MI, Moorhead J, Piazzentin-Penna SH, Feniman MR, Zimmermann MC, Bento-Goncalves CG, Pimentel MC, Boggs S, Jorge JC, Antonelli PJ, Shuster J.** (2009) Longitudinal study of growth of children with unilateral cleft-lip palate from birth to two years of age. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 46:603-609

- McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ.** (1999) Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *The New England journal of medicine* 340:1234-1238
- Mirilas P, Mentessidou A, Kontis E, Asimakidou M, Moxham BJ, Petropoulos AS, Emmanouil-Nikolousi EN.** (2011) Parental exposures and risk of nonsyndromic orofacial clefts in offspring: a case-control study in Greece. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 75:695-699
- Montagnoli LC, Barbieri MA, Bettiol H, Marques IL, de Souza L.** (2005) Growth impairment of children with different types of lip and palate clefts in the first 2 years of life: a cross-sectional study. *Jornal de pediatria* 81:461-465
- Moore KL, Persaud TVN.** *Zrození člověka: embryologie s klinickým zaměřením*, ISV Praha 2002, pp 564
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG.** *The developing human: clinically oriented embryology*, Saunders Elsevier Philadelphia 2008, pp 536
- Mossey PA, Little J, Munger RG, Dixon MJ, Shaw WC.** (2009) Cleft lip and palate. *Lancet* 374:1773-1785
- Munger RG, Romitti PA, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC, Hanson J.** (1996) Maternal alcohol use and risk of orofacial cleft birth defects. *Teratology* 54:27-33
- Navti LK, Ferrari U, Tange E, Bechtold-Dalla Pozza S, Parhofer KG.** (2014) Contribution of socioeconomic status, stature and birth weight to obesity in Sub-Saharan Africa: cross-sectional data from primary school-age children in Cameroon. *BMC Public Health* 14:320
- Neiswanger K, Deleyiannis FW, Avila JR, Cooper ME, Brandon CA, Vieira AR, Noorchashm N, Weinberg SM, Bardi KM, Murray JC, Marazita ML.** (2006) Candidate genes for oral-facial clefts in Guatemalan families. *Annals of plastic surgery* 56:518-521
- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot J.** *Oral and Maxillofacial Pathology*, W.B. Saunders 2009, pp 984
- Nguyen RH, Wilcox AJ, Moen BE, McConnaughey DR, Lie RT.** (2007) Parent's occupation and isolated orofacial clefts in Norway: a population-based case-control study. *Annals of epidemiology* 17:763-771
- Nieminen P, Kotilainen J, Aalto Y, Knuutila S, Pirinen S, Thesleff I.** (2003) MSX1 gene is deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome patients with oligodontia. *Journal of dental research* 82:1013-1017
- Nijiati K, Satoh K, Otani K, Kimata Y, Ohtaki M.** (2008) Regression analysis of maternal smoking effect on birth weight. *Hiroshima journal of medical sciences* 57:61-67

- Nopoulos P, Berg S, Canady J, Richman L, Van Demark D, Andreasen NC.** (2002) Structural brain abnormalities in adult males with clefts of the lip and/or palate. *Genetics in medicine* 4:1-9
- Nopoulos P, Langbehn DR, Canady J, Magnotta V, Richman L.** (2007) Abnormal brain structure in children with isolated clefts of the lip or palate. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 161:753-758
- Nyarko KA, Lopez-Camelo J, Castilla EE, Wehby GL.** (2013) Does the relationship between prenatal care and birth weight vary by oral clefts? Evidence using South American and United States samples. *The Journal of pediatrics* 162:42-49
- Park-Wyllie L, Mazzotta P, Pastuszak A, Moretti ME, Beique L, Hunnisett L, Friesen MH, Jacobson S, Kasapinovic S, Chang D, Diav-Citrin O, Chitayat D, Nulman I, Einarson TR, Koren G.** (2000) Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies. *Teratology* 62:385-392
- Pattenden S, Dolk H, Vrijheid M.** (1999) Inequalities in low birth weight: parental social class, area deprivation, and "lone mother" status. *Journal of epidemiology and community health* 53:355-358
- Pavlik J.** *Aplikovaná statistika*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze Praha 2005, pp 172
- Peterka M, Jelinek R, Fara M.** (1985) [An analysis of the causes of congenital defects from the viewpoint of the teratologist]. *Ceskoslovenska gynekologie* 50:363-368
- Peterka M, Peterkova R, Halaskova M, Tvrdek M, Fara M, Likovsky Z.** (1996) Sex differences in the incidence of orofacial clefts and the question of primary prevention in families with genetic risk. *Acta chirurgiae plasticae* 38:57-60
- Peterka M, Peterková R, Likovský Z, Tvrdek M, Fára M.** (1995) Incidence of orofacial clefts in Bohemia (Czech Republic) in 1964-1992. *Acta chirurgiae plasticae* 37:122-126
- Peterka M, Peterkova R, Tvrdek M, Kuderova J, Likovsky Z.** (2000) Significant differences in the incidence of orofacial clefts in fifty-two Czech districts between 1983 and 1997. *Acta chirurgiae plasticae* 42:124-129
- Peterka M, Tvrdek M, Likovsky Z, Peterkova R, Fara M.** (1994) Maternal hyperthermia and infection as one of possible causes of orofacial clefts. *Acta chirurgiae plasticae* 36:114-118
- Prescott NJ, Lees MM, Winter RM, Malcolm S.** (2000) Identification of susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a two stage genome scan of affected sib-pairs. *Human genetics* 106:345-350
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T.** (1995) Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nature genetics* 11:409-414

- Rahimov F, Marazita ML, Visel A, Cooper ME, Hitchler MJ, Rubini M, Domann FE, Govil M, Christensen K, Bille C, Melbye M, Jugessur A, Lie RT, Wilcox AJ, Fitzpatrick DR, Green ED, Mossey PA, Little J, Steegers-Theunissen RP, Pennacchio LA, Schutte BC, Murray JC.** (2008) Disruption of an AP-2alpha binding site in an IRF6 enhancer is associated with cleft lip. *Nature genetics* 40:1341-1347
- Ranalli DN, Mazaheri M.** (1975) Height-weight growth of cleft children, birth to six years. *The Cleft palate journal* 12:400-404
- Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Wyatt PR, Cole DE.** (2003) Association between folic acid food fortification and congenital orofacial clefts. *The Journal of pediatrics* 143:805-807
- Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK.** *Oral Pathology: Clinical-Pathologic Correlations*, Saunders Elsevier USA 2008, pp 480
- Reiter R, Brosch S, Ludeke M, Fischbein E, Haase S, Pickhard A, Assum G, Schwandt A, Vogel W, Hogel J, Maier C.** (2012) Genetic and environmental risk factors for submucous cleft palate. *European journal of oral sciences* 120:97-103
- Reiter R, Brosch S, Wefel H, Schlomer G, Haase S.** (2011) The submucous cleft palate: diagnosis and therapy. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 75:85-88
- Ribeiro LL, das Neves LT, Costa B, Gomide MR.** (2002) Dental development of permanent lateral incisor in complete unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 39:193-196
- Rice R, Spencer-Dene B, Connor EC, Gritli-Linde A, McMahon AP, Dickson C, Thesleff I, Rice DP.** (2004) Disruption of Fgf10/Fgfr2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate. *The Journal of clinical investigation* 113:1692-1700
- Riley BM, Mansilla MA, Ma J, Daack-Hirsch S, Maher BS, Raffensperger LM, Russo ET, Vieira AR, Dode C, Mohammadi M, Marazita ML, Murray JC.** (2007) Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:4512-4517
- Romitti PA, Lidral AC, Munger RG, Daack-Hirsch S, Burns TL, Murray JC.** (1999) Candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate and maternal cigarette smoking and alcohol consumption: evaluation of genotype-environment interactions from a population-based case-control study of orofacial clefts. *Teratology* 59:39-50
- Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen USDT, Mannino S, Milunsky A.** (1995) Teratogenicity of High Vitamin-a Intake. *New England Journal of Medicine* 333:1369-1373
- Scapoli L, Palmieri A, Martinelli M, Pezzetti F, Carinci P, Tognon M, Carinci F.** (2005) Strong evidence of linkage disequilibrium between polymorphisms at the

- IRF6 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate, in an Italian population. *American journal of human genetics* 76:180-183
- Seth AK, McWilliams BJ.** (1988) Weight gain in children with cleft palate from birth to two years. *The Cleft palate journal* 25:146-150
- Sharpe PM, Ferguson MW.** (1988) Mesenchymal influences on epithelial differentiation in developing systems. *Journal of cell sciences Supplement* 10:195-230
- Shaw GM, Lammer EJ.** (1999) Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for orofacial clefts. *The Journal of pediatrics* 134:298-303
- Shaw GM, Nelson V, Carmichael SL, Lammer EJ, Finnell RH, Rosenquist TH.** (2002) Maternal periconceptional vitamins: interactions with selected factors and congenital anomalies? *Epidemiology* 13:625-630
- Shaw GM, Wasserman CR, O'Malley CD, Nelson V, Jackson RJ.** (1999) Maternal pesticide exposure from multiple sources and selected congenital anomalies. *Epidemiology* 10:60-66
- Shkoukani MA, Chen M, Vong A.** (2013) Cleft lip - a comprehensive review. *Frontiers in pediatrics* 1:53
- Schimmel MS, Bromiker R, Hammerman C, Chertman L, Ioscovich A, Granovsky-Grisaru S, Samueloff A, Elstein D.** (2015) The effects of maternal age and parity on maternal and neonatal outcome. *Archives of gynecology and obstetrics* 291:793-798
- Schubert J, Jahn H, Berginski M.** (2005) Experimental aspects of the pathogenesis of Robin sequence. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 42:372-376
- Soto N, Bazaes RA, Pena V, Salazar T, Avila A, Iniguez G, Ong KK, Dunger DB, Mericq MV.** (2003) Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:3645-3650
- Sozen MA, Suzuki K, Tolarova MM, Bustos T, Fernandez Iglesias JE, Spritz RA.** (2001) Mutation of PVRL1 is associated with sporadic, non-syndromic cleft lip/palate in northern Venezuela. *Nature genetics* 29:141-142
- Sperber GH, Wald J, Gutterman GD, Sperber SM.** *Craniofacial development*, B.C. Decker London 2001, pp 220
- Suphapeetiporn K, Tongkobpetch S, Siriwan P, Shotelersuk V.** (2007) TBX22 mutations are a frequent cause of non-syndromic cleft palate in the Thai population. *Clinical genetics* 72:478-483
- Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA, Spritz RA.** (2000) Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nature genetics* 25:427-430

- Suzuki Y, Jezewski PA, Machida J, Watanabe Y, Shi M, Cooper ME, Viet le T, Nguyen TD, Hai H, Natsume N, Shimozato K, Marazita ML, Murray JC.** (2004) In a Vietnamese population, MSX1 variants contribute to cleft lip and palate. *Genetics in medicine* 6:117-125
- Takahashi K, Nakanishi H, Miyahara M, Mandai K, Satoh K, Satoh A, Nishioka H, Aoki J, Nomoto A, Mizoguchi A, Takai Y.** (1999) Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *The Journal of cell biology* 145:539-549
- Thornton JB, Nimer S, Howard PS.** (1996) The incidence, classification, etiology, and embryology of oral clefts. *Seminars in orthodontics* 2:162-168
- Tolarova MM, Cervenka J.** (1998) Classification and birth prevalence of orofacial clefts. *American journal of medical genetics* 75:126-137
- Tsai TP, Huang CS, Huang CC, See LC.** (1998) Distribution patterns of primary and permanent dentition in children with unilateral complete cleft lip and palate. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 35:154-160
- van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amstel HK.** (2000) MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nature genetics* 24:342-343
- van Rooij IA, Ocke MC, Straatman H, Zielhuis GA, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP.** (2004) Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Preventive medicine* 39:689-694
- Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Felix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, Fitzpatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC.** (2005) Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS genetics* 1:e64
- Vitelli F, Morishima M, Taddei I, Lindsay EA, Baldini A.** (2002) Tbx1 mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways. *Human molecular genetics* 11:915-922
- Wadi MA, Al-Sharbatti SS.** (2011) Relationship between birth weight and domestic maternal passive smoking exposure. *Eastern Mediterranean health journal* 17:290-296
- Warrington A, Vieira AR, Christensen K, Orioli IM, Castilla EE, Romitti PA, Murray JC.** (2006) Genetic evidence for the role of loci at 19q13 in cleft lip and palate. *Journal of medical genetics* 43:e26
- Wei JN, Sung FC, Li CY, Chang CH, Lin RS, Lin CC, Chiang CC, Chuang LM.** (2003) Low birth weight and high birth weight infants are both at an increased risk to have type 2 diabetes among schoolchildren in taiwan. *Diabetes care* 26:343-348

- WHO.** *Global Registry and Database on Craniofacial Anomalies*, World Health Organization Geneva, Switzerland 2003, pp 101
- Wijlaars LP, Johnson L, van Jaarsveld CH, Wardle J.** (2011) Socioeconomic status and weight gain in early infancy. *International journal of obesity* 35:963-970
- Wilkie AO, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, et al.** (1995) Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nature genetics* 9:165-172
- Wong FK, Hagg U.** (2004) An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong medical journal* 10:331-336
- Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM, Hamel BC, Blom HJ, Steegers-Theunissen RP.** (1999) Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology* 60:253-257
- Wyszynski DF, Sarkozi A, Vargha P, Czeizel AE.** (2003) Birth weight and gestational age of newborns with cleft lip with or without cleft palate and with isolated cleft palate. *The Journal of clinical pediatric dentistry* 27:185-190
- Ye M, Berry-Wynne KM, Asai-Coakwell M, Sundaresan P, Footz T, French CR, Abitbol M, Fleisch VC, Corbett N, Allison WT, Drummond G, Walter MA, Underhill TM, Waskiewicz AJ, Lehmann OJ.** (2010) Mutation of the bone morphogenetic protein GDF3 causes ocular and skeletal anomalies. *Human molecular genetics* 19:287-298
- Young DL, Schneider RA, Hu D, Helms JA.** (2000) Genetic and teratogenic approaches to craniofacial development. *Critical reviews in oral biology and medicine* 11:304-317
- Zarate YA, Martin LJ, Hopkin RJ, Bender PL, Zhang X, Saal HM.** (2010) Evaluation of growth in patients with isolated cleft lip and/or cleft palate. *Pediatrics* 125:e543-549
- Zeka A, Melly SJ, Schwartz J.** (2008) The effects of socioeconomic status and indices of physical environment on reduced birth weight and preterm births in Eastern Massachusetts. *Environmental Health* 7:60
- Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y.** (2002) Rescue of cleft palate in Msx1-deficient mice by transgenic Bmp4 reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 129:4135-4146
- Zuccherro TM, Cooper ME, Maher BS, Daack-Hirsch S, Nepomuceno B, Ribeiro L, Caprau D, Christensen K, Suzuki Y, Machida J, Natsume N, Yoshiura K, Vieira AR, Orioli IM, Castilla EE, Moreno L, Arcos-Burgos M, Lidral AC, Field LL, Liu YE, Ray A, Goldstein TH, Schultz RE, Shi M, Johnson MK, Kondo S, Schutte BC, Marazita ML, Murray JC.** (2004) Interferon regulatory factor 6

(IRF6) gene variants and the risk of isolated cleft lip or palate. The New England journal of medicine 351:769-780

Zvára K. *Biomedicínská statistika IV: Základy statistiky v prostředí R*, Karolinum Praha 2013, pp 259

Zvárová J. *Základy statistiky pro biomedicínské obory*, Karolinum Praha 2004, pp 224

Internetové zdroje

Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. [online].[cit. 31.3.2015].

Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 607199, Date last edited: 20.8.2014. World Wide Web URL: <http://omim.org/>

Dostupné z <http://www.omim.org/entry/607199>

14. PŘÍLOHY

Příloha 1 Dotazník pro zdravou kontrolu.



Dotazník na porodní parametry

Vážená paní,

dovolte mi se na Vás obrátit s prosbou o vyplnění tohoto dotazníku, který je zcela anonymní a slouží k získání dat o zdravé populaci. Data sledují četnost výskytu porodních parametrů novorozenců v ČR s ohledem na věk rodičů. Výsledky dotazníku budou použity v diplomové práci jako kontrolní skupina k souboru novorozenců s obličejovou rozštěpovou vadou a k porovnání s jejich porodními údaji.

Údaje o dítěti

1. Rok narození dítěte

2. Pohlaví dítěte *

CHLAPEC

DĚVČE

3. Porodní hmotnost

4. Porodní délka

5. Gestační věk dítěte v době porodu – délka těhotenství (dokončený týden porodu)

6. Pořadí dítěte (parita)

7. Vícečetné těhotenství *

NE

DVOJČATA

TROJČATA

VÍCE

8. Vrozené vady, onemocnění u dítěte v době porodu

9. Komplikace při porodu (např.: císařský řez, předčasné odloučení placenty, omotaný pupečník kolem hlavičky dítěte...)

Údaje o matce

10. Národnost matky

11. Rok narození matky

12. Kouření matky během těhotenství *

ANO/jsem pravidelný kuřák

Ano/pouze příležitostně

Ne/jsem nekuřák

Údaje o otci

13. Národnost otce

14. Rok narození otce

* takto označené prosím zakroužkujte

Získaná data budou použita pouze k vypracování příslušné diplomové práce, výsledky nebudou použity pro komerční účely.

Děkuji za Váš čas

*ÚEM AV ČR, v.v.i.
Odd. Teratologie
Videňská 1083
142 20 Praha 4*

*Bc. Oldřiška Hofmannová
email: ol.hofmannova@gmail.com*

*Katedra antropologie a genetiky člověka
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
Viničná 7
128 43 Praha 2*

Příloha 2 Výstup analýzy rozptylu pro sekulární trend pro dívky.

	počet stupňů volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	F - kritérium	p - hodnota
A= rok narození	1	81741,25	66349,48	0,47	0,492248
B=gestace	4	9091859	2272965	13,13	0,000000*
A+B	4	265397,9	81741,25	0,38	0,820738
rezidua	736	1,274E+08	173151,4		
celkem	745	1,379E+08			

Příloha 3 Výstup analýzy rozptylu pro sekulární trend pro chlapce.

	počet stupňů volnosti	Součet čtverců	Průměrný čtverec	F - kritérium	p - hodnota
A= rok narození	1066	379355,8	189315	2,00	0,157197
B=gestace	1057	1,740E+07	193976,1	22,97	0,000000*
A+B	4	775904,5	379355,8	1,02	0,393378
rezidua	4	2,001E+08	4349304		
celkem	1	2,222E+08			

Příloha 4

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro chlapce v 37. týdnu gestace.

37. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
kontrola	CL	<-305,0151; 446,0502>	1,0000000
	CLP	<-89,83537; 443,771>	0,6967590
	CP	<-381,3309; 369,7344>	1,0000000
CL	CLP	<-308,1772; 521,0778>	0,9999964
	CP	<-568,0035; 415,3719>	1,0000000
CLP	CP	<-597,3936; 231,8614>	0,9999456

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro chlapce v 38. týdnu gestace.

38. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
kontrola	CL	<-161,2043; 402,8192>	0,9942226
	CLP	<-122,6901; 277,8437>	0,9983786
CL	CLP	<-365,9059; 279,4446>	1,0000000
	CP	<-251,2593; 475,9567>	0,9999345
CLP	CP	<-149,0302; 460,1888>	0,9603147

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro chlapce v 39. týdnu gestace.

39. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
kontrola	CL	<-98,81286; 340,4795>	0,9212265
CL	CLP	<-215,27; 353,27>	0,9999986
	CP	<-218,7408; 409,1067>	0,9999508
CLP	CP	<-280,892; 333,2578>	1,0000000

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro chlapce v 40. týdnu gestace.

40. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
CL	CLP	<-64,82905; 134,951>	0,9995776
	CP	<-111,3639; 115,7872>	1,0000000
CLP	CP	<-135,9434; 70,24484>	0,9999823

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro chlapce v 41. týdnu gestace.

41. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
kontrola	CL	<-211,4094; 266,8879>	1,0000000
	CLP	<-31,30619; 376,0162>	0,2309700
	CP	<-116,7286; 467,5489>	0,8413695
CL	CLP	<-131,3433; 420,5748>	0,9492234
	CP	<-198,7689; 494,1108>	0,9945597
CLP	CP	<-319,9098; 326,0201>	1,0000000

Příloha 5

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro dívky v 37. týdnu gestace.

37. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
kontrola	CL	<-268,6301; 636,7178>	0,9969648
	CLP	<-244,9267; 456,6509>	0,9999541
	CP	<-208,6268; 443,6842>	0,9993883
CL	CLP	<-609,186; 452,8224>	1,0000000
	CP	<-581,5784; 448,548>	1,0000000
CLP	CP	<-416,6196; 439,953>	1,0000000

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro dívky v 38. týdnu gestace.

38. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
kontrola	CL	<-182,8424; 446,5234>	0,9955846
	CLP	<-129,8861; 527,749>	0,8323425
CL	CLP	<-369,9547; 504,1365>	1,0000000
	CP	<-282,9632; 491,145>	0,9999924
CLP	CP	<-361,6308; 435,6308>	1,0000000

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro dívky v 39. týdnu gestace.

39. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
kontrola	CL	<-47,47045; 544,5005>	0,2440236
	CLP	<-75,77398; 456,8875>	0,5539750
CL	CLP	<-445,3578; 329,4412>	1,0000000
	CP	<-359,4075; 394,8634>	1,0000000
CLP	CP	<-278,6523; 430,0248>	0,9999998

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro dívky v 40. týdnu gestace.

40. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
CL	CLP	<-100,5701; 145,8929>	1,0000000
	CP	<-120,9284; 108,2619>	1,0000000
CLP	CP	<-134,1976; 76,20831>	0,9999888

Nesignifikantní výsledky mnohonásobného porovnávání pro dívky v 41. týdnu gestace.

41. týden gestace		95% interval spolehlivosti pro rozdíl hodnot	p - hodnota
kontrola	CL	<-75,4363; 435,7354>	0,5837088
	CP	<-53,65592; 410,315>	0,4085083
CL	CLP	<-246,4809; 436,4978>	0,9999870
	CP	<-312,7183; 309,0782>	1,0000000
CLP	CP	<-421,0323; 227,3753>	0,9999608