

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE**

**KATEDRA ANTROPOLOGIE**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

# **Indikace k prenatálnímu vyšetření**

**Martina Benešová**

**Školitel: MUDr. Miloslav Kuklík, CSc.**

**Praha 2007**

## **ABSTRAKT**

Tato práce pojednává o důvodech, které vedly náhodně vybraný vzorek pacientek Genetické poradny MUDr. Miloslava Kuklíka v Ústavu pro péči o matku a dítě k podstoupení invazivního prenatalního vyšetření. Za tímto účelem jsem zpracovala 127 lékařských karet gravidních žen ve věku 20-45 let, které v letech 2004-2006 navštívily Genetickou poradnu a podrobily se invazivní diagnostice. Indikace k podstoupení těchto zákroků jsou zaneseny do tabulek v programu Excel. Tabulky a grafy z nich získané jsou v příloze a hodnocení a výstupy ve výsledcích.

Převážnou část této práce tvoří literární rešerše o nejvýznamnějších metodách prenatalní diagnostiky a to invazivních i neinvazivních, jejich výhodách a nevýhodách a dalším potenciálním vývoji v budoucnosti.

I have attended to indications which had led randomized part of patients of Genetic Clinic Dr Miloslav Kuklík in Institute For The Care Of Mother And Child to undergo an invasive prenatal investigation in this study. I have elaborated 125 medical cards of pregnant women at the age of 20-45 years, who had visited the genetic clinic and underwent the invasive prenatal investigation. Causes for undergoing these invasive diagnostics are assumed in a program Excel's tables. Tables and graphs are attached.

The majority of this study is composed of a literature retrieval about most important invasive and non-invasive prenatal diagnostic methods, about pros and cons of these diagnostic methods and about their next development in the future.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

prenatální diagnostika – indikace – invazivní diagnostika – screening – chromozomální aberace plodu – fetální DNA

## OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Historie prenatalní diagnostiky</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Indikace k prenatalnímu vyšetření</b> .....	<b>4</b>
<b>4. Neinvazivní metody prenatalní diagnostiky</b> .....	<b>6</b>
4.1. Biochemický screening.....	6
4.2. Ultrazukový screening .....	11
4.3. Diagnostika z krve matky .....	13
<b>5. Invazivní metody prenatalní diagnostiky</b> .....	<b>16</b>
5.1. Amniocentéza .....	16
5.2. Biopsie choriových klků (CVS).....	19
<b>6. Cytogenetické vyšetření fetálních buněk</b> .....	<b>21</b>
6.1. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) .....	22
6.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	22
<b>7. Chromozomální aberace a vrozené vývojové vady</b> .....	<b>23</b>
<b>8. Výsledky</b> .....	<b>24</b>
<b>9. Závěr</b> .....	<b>25</b>
<b>10. Přílohy</b> .....	<b>27</b>
<b>11. Použitá literatura</b> .....	<b>35</b>

# 1. ÚVOD

Prenatální diagnostika je dynamicky se rozvíjející disciplínou spojující lékařské, genetické a v poslední době také psychologické obory. Jejím cílem je, v co nejranějším stadiu těhotenství, objevit odchylky ve vývoji plodu a nastávající rodiče informovat o případných komplikacích. Zkvalitňování prenatální péče stále posouvá možnosti diagnostiky do ranějších fází těhotenství, což rodičům poskytuje čas na rozhodování o dalším vývoji těhotenství a psychickou přípravu na případné narození postiženého potomka.

Přítom jsou kladeny požadavky na maximální přesnost výsledků vyšetření, aby matka nebyla vystavována zbytečné psychické zátěži v případě výsledků falešně pozitivních. Zatím neexistuje ideální a 100% spolehlivý test, proto se pro co největší přesnost kombinují a navzájem doplňují různé testy a testované faktory. Zároveň jsou neustále hledány nové postupy, které by prenatální diagnostiku co nejvíce usnadnily a zpřesnily.

Nejpřesnější údaje prozatím poskytují invazivní diagnostické metody, ale ty zároveň nesou riziko pro těhotnou ženu a její plod, proto jejich provedení musí být něčím indikováno. Právě k vyhledávání pacientek se zvýšeným rizikem chromozomálních aberací slouží neinvazivní screening, nejčastěji biochemický a ultrazvukový, jehož pozitivní výsledky jsou, vedle pokročilého věku pacientky, nejčastějším důvodem pro podstoupení invazivního prenatálního vyšetření.

Prenatální diagnostika je v současnosti hojně rozšířena v zemích s vyspělým zdravotnictvím a představuje důležitý zdroj informací pro nastávající matku o jejím těhotenství.

## 2. HISTORIE PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

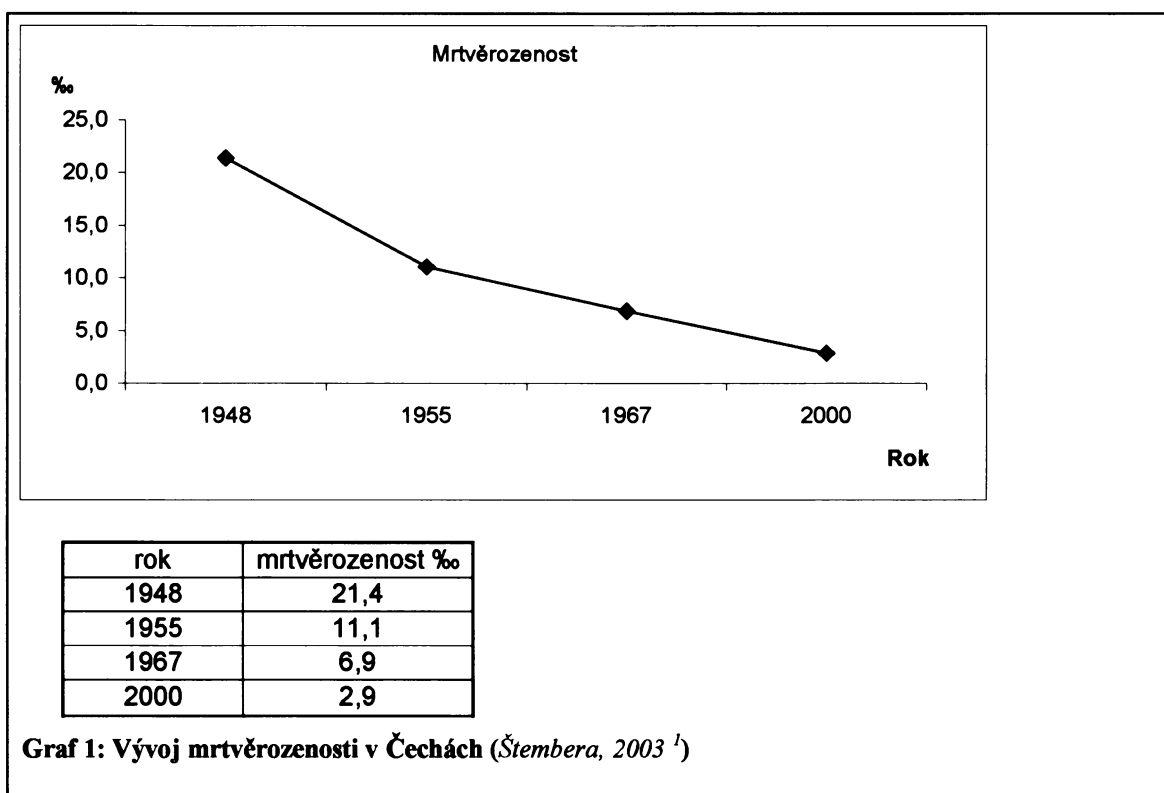
Náplní práce prvních poraden pro gravidní ženy, které byly v Čechách zřízeny v Olomouci (r. 1938) a Brně (r. 1941), byla zejména snaha předcházet předčasným porodům a diagnostikovat patologická těhotenství vyžadující ústavní péči (*Štembera, 2003*<sup>1</sup>).

V průběhu druhé světové války vznikaly další poradny, do roku 1945 jich bylo v Čechách a na Moravě 142 (*Štembera, 2003*<sup>1</sup>).

Návštěvnost ale v této době byla pouze 28%. Jak se při hloubkové kontrole ukázalo, byla tato nízká návštěvnost způsobena zejména nedostačujícími hygienickými podmínkami, nízkou úrovní poskytovaného vyšetření a nedostatkem specializovaných lékařů v poradnách (Štembera, 2003<sup>1</sup>).

Ke skutečnému rozvíjení prenatalní diagnostiky začalo docházet až po roce 1966, kdy bylo prokázáno, že chromozomální konstituci plodu lze určit analýzou kultivovaných buněk z plodové vody (Simpson, Bischoff, 2004<sup>2</sup>). V následujících letech byly pro využití v prenatalní diagnostice objevovány různé hormony vypovídající o průběhu těhotenství. Analýzou jejich hladin v krvi těhotné ženy lze detekovat těhotenství s patologickým vývojem. Výsledky získávané z biochemických vyšetření se tak neustále zpřesňovaly.

Stále se zlepšující úroveň prenatalní péče doprovázel trend klesajícího počtu mrtvě narozených dětí. V Čechách můžeme dobu od r. 1948 do současnosti rozdělit na několik hlavních etap, kde je toto zřejmé. (Štembera, 2003<sup>1</sup>).



Objev volně cirkulujících nukleových kyselin plodu v krvi těhotné ženy na konci devadesátých let znamenal průlom ve vývoji prenatalní diagnostiky (Lo, et al, 1997<sup>3</sup>). Na jejich analýze a možnostech využití v diagnostice se stále pracuje.

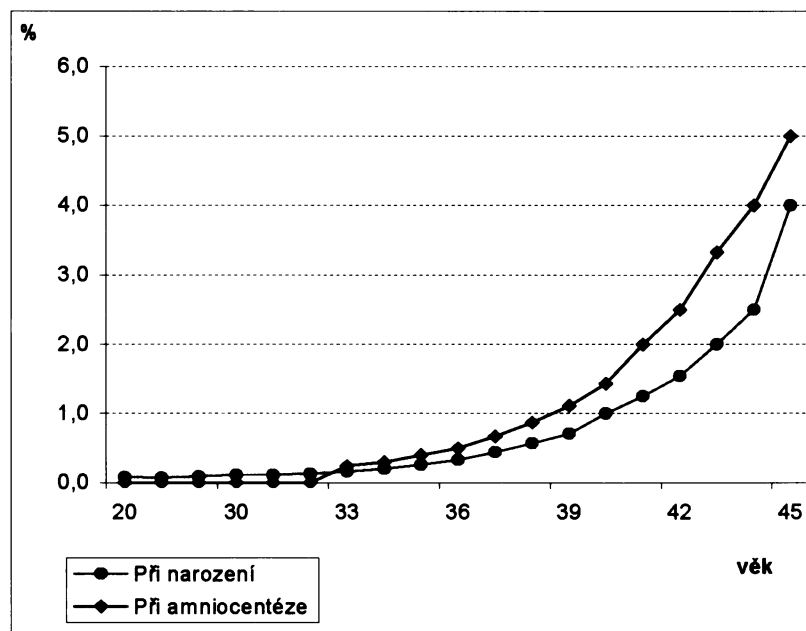
V posledních několika letech docházelo k rozšiřování přístrojového vybavení, zkvalitňování péče o pacientky a dalšímu růstu návštěvnosti poraden. Například ultrazvukové vyšetření v roce 2003 podstoupilo 96,6% všech těhotných žen (Štembera, 2003<sup>1</sup>) a více než 90% těhotných žen v ČR absolvovalo alespoň 10 návštěv u specializovaného lékaře (Hájek, 2003<sup>4</sup>).

### 3. INDIKACE K PRENATÁLNÍMU VYŠETŘENÍ

Před provedením invazivních diagnostických metod se používá screening, který slouží k vyhledávání těhotných žen se zvýšeným rizikem pro konkrétní patologie plodu.

Screening by měl být co nejefektivnější, tzn. detekovat co největší množství skutečně postižených plodů s minimální falešnou pozitivitou, tedy s minimálním procentem zdravých plodů označených za postižené (Višková, Calda, 2003<sup>5</sup>).

Nejčastějším důvodem k podstoupení invazivního prenatálního vyšetření je vysoký věk ženy. Podle statistik s věkem ženy stoupá riziko poškození plodu Downovým syndromem (Calda, 1998<sup>6</sup>).



Graf 2: Incidence Downova syndromu (Thompson, 2004<sup>7</sup>)

Věk matky	Při naroz.	Při AMC
15-19	1/1250	-
20-24	1/1400	-
25-29	1/1100	-
30	1/900	-
31	1/900	-
32	1/750	-
33	1/625	1/420
34	1/500	1/333
35	1/385	1/250
36	1/300	1/200
37	1/225	1/150
38	1/175	1/115
39	1/140	1/90
40	1/100	1/70
41	1/80	1/50
42	1/65	1/40
43	1/50	1/30
44	1/40	1/25
45	1/25	1/20

Riziko je o něco vyšší při amniocentéze než při narození vzhledem k frekvenci potratů u těhotenství s Downovým syndromem. Za zlomovou hranici se považuje věk 35 let, kdy je riziko vzniku Downova syndromu 1/250 (*Thompson, 2004*<sup>7</sup>). Proto může být pokročilý věk sám o sobě dostačujícím důvodem pro podstoupení invazivního zákroku prenatalní diagnostiky.

Častou indikací k invazivnímu vyšetření je také pozitivní biochemický nebo ultrazvukový screening.

Kromě vysokého věku a pozitivních výsledků biochemického či ultrazvukového screeningu může být indikací k prenatalnímu vyšetření postižení matky určitými chorobami či infekcemi. Největší validitu mají rizikové faktory vzniklé v průběhu těhotenství (jako např. krvácení, hypertenze, vícečetné těhotenství) (*Hájek, 2003*<sup>8</sup>).

Protože je metabolismus matky úzce spjat s metabolismem plodu, mohou mít některé choroby matky negativní vliv na vývoj plodu. Mezi nebezpečná metabolická onemocnění patří např. diabetes mellitus, kdy deficiencie hormonu inzulinu může mít za následek 3x vyšší postižení plodu vrozenými vývojovými vadami srdce, ledvin, končetin a centrální nervové soustavy. Při thyreopatii, postižení štítné žlázy, hrozí deficiencie nebo naopak hromadění thyreoidních hormonů, což může vést až k abortu plodu (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9</sup>).

Léčba antiepileptiky v případě epilepsie matky může být pro zdraví plodu nebezpečná, protože antiepileptika spadají do kategorie léků s pravděpodobnou teratogenitou (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9</sup>).

Při postižení matky infekčními onemocněními hrozí také postižení plodu. U neléčené toxoplasmózy hrozí až 60% riziko infekce pro plod, postižení jeho duševního vývoje, kalcifikace mozku, slepota aj. (*Žižka, Calda, 10*).

Podstoupila-li žena před otěhotněním chemoterapii, hrozí vznik chromozomálních aberací v zárodečných buňkách. To platí i pro muže, kteří byli z nějakého důvodu pod vlivem ozařování. Početí i dlouho po ozáření je spojeno s rizikem vzniku bodových mutací a těhotenství by v takovém případě mělo být klinicky sledováno už od samého počátku (*Harper, 1993*<sup>11</sup>).

Další indikací může být zátěž v rodokmenu dědičnými onemocněními či problém v předchozích graviditách. Pod genetickým sledováním jsou také ženy, které podstoupily umělé oplodnění.

## 4. NEINVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

Nespornou výhodou neinvazivních diagnostických metod je minimální zátěž a riziko pro matku i plod.

Nejrozšířenější neinvazivní metodou je screening, který v první řadě slouží k vyhledávání žen se zvýšeným rizikem patologického vývoje plodu. V současné době existuje screening několika hlavních typů: **screening chromozomálních aberací** (podle věku a anamnestických údajů těhotné ženy **biochemický screening** (použití markerů AFP, hCG, uE3), **ultrazvukový screening** (ultrazvukové markery chromozomálních aberací a malformace) a **screening dědičných onemocnění** (Caldá, 1998<sup>6</sup>).

Screening ale poskytuje informace pouze o statistickém riziku vzniku vrozené vývojové vady plodu a nemůže proto být plnohodnotnou alternativou k vyšetření invazivnímu.

V současnosti dochází k rozvoji zcela nových neinvazivních metod, založených na analýze krve těhotné ženy. V mateřské krvi se totiž nalézají fetální buňky a nukleové kyseliny (Lo, et al, 1997<sup>3</sup>), poskytující široké spektrum informací o chromozomální konstituci plodu. Tyto rychle se vyvíjející metody s nulovým rizikem pro těhotenství budou pravděpodobně v budoucnu nahrazovat metody invazivní.

### 4.1. Biochemický screening

Při biochemickém screeningu se vyšetřují hladiny hormonů, tzv. markerů, v krevním séru těhotných žen. Abnormálně snížená či zvýšená hladina těchto hormonů může signalizovat, že v těhotenství něco není v pořádku. Pozitivní výsledky screeningu jsou indikací k invazivnímu vyšetření. Pro větší přesnost se biochemický screening často doplňuje se screeningem ultrazvukovým.



onemocnění	AFP	hCG	uE3	PAPP-A
tris. 21	↓	↑	↓	↓
tris. 18	↓	↓	↓	
tris. 16	↑	↑		
tris. 13	↓			
Pohl. chr.	↓	↑		
anencefalie			↓	
NTD	↑			

**Tab. 1: Zvýšené či snížené hladiny markerů poukazující na riziko určitého onemocnění (upraveno dle Thompson, 2004<sup>33</sup>).**

Při interpretaci výsledků je třeba zohlednit, že hladiny hormonů se také mění dle gestačního věku a v závislosti na různých faktorech, jako u těhotenství s dvojčaty, podle hmotnosti těhotné ženy a u některých chorob, kterými těhotná žena trpí (takto hladinu markerů ovlivňuje např. diabetes mellitus) (Hájek, Kulovaný, Macek, 2000<sup>9</sup>).

Marker	Gestační stáří (týdny)	MoM
AFP	<15	0,73
	≥15	0,74
uE3	<15	0,68
	≥15	0,73
β hCG	<15	2,04
	≥15	2,30

**Tab. 2: Mediány hlavních markerů v závislosti na gestačním stáří (Cuckle, 1995<sup>48</sup>).**

Absolutní hodnoty markerů jsou běžně propočítávány na MoM (multiple of medians), což jsou násobky mediánů normálních hodnot získané u kontrol pro dané gestační stáří.

Nejdůležitější markery používané pro biochemický screening jsou: alfafetoprotein (AFP), těhotenský plasmatický protein A (PAPP-A), nekonjugovaný estriol (uE<sub>3</sub>) a lidský choriový gonadotropin (hCG).

## Biochemické markery

**AFP** je fetální glykoprotein tvořený už od 29. dne početí zejména játry a ledvinami plodu a odtud je vylučován do krevního oběhu a plodové vody. Přes placentu a materno-fetální cirkulací se dostává do krevního oběhu matky, jeho hladina proto může být stanovována z krevního séra matky (maternal serum AFP, tedy MS AFP) nebo z plodové vody (*Thompson, 2004*<sup>7</sup>).

Hladina AFP se mění v závislosti na gestačním stáří. Jeho syntéza prudce narůstá do 10.-13. týdne a po 16. týdnu gravidity jeho množství klesá (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9</sup>).

Úloha tohoto proteinu spočívá nejspíš v ochraně plodu před imunitní reakcí mateřského organismu (*Milunsky, A., 1992*<sup>12</sup>). Jeho využití v prenatalní diagnostice je založeno na patologické propustnosti fetoplacentální bariéry, což je doprovodný znak například poruch uzávěru nervové trubice (*Brock, Bolton, Monaghan, 1973*<sup>13</sup>) a porušené vaskularizace placenty u chromozomálně podmíněných vrozených vývojových vad (VVV) jako je Downův syndrom (*Chard, Lowings, Kitan, 1984*<sup>14</sup>).

Snížení hladin pod normální hodnoty ukazuje na riziko vzniku Downova syndromu a dalších chromozomálních aberací, jako trisomie 18, 13, aneuploidie pohlavních chromozomů a dalších (*Brambati, et al., 1986*<sup>15</sup>). Zvýšení hladin se pak vyskytuje u trisomie chromozomu 16 a u chorob způsobujících únik fetálních proteinů, včetně AFP, přes kůži a jeho následné hromadění v plodové vodě. (*Chard, Lowings, Kitan, 1984*<sup>14</sup>)

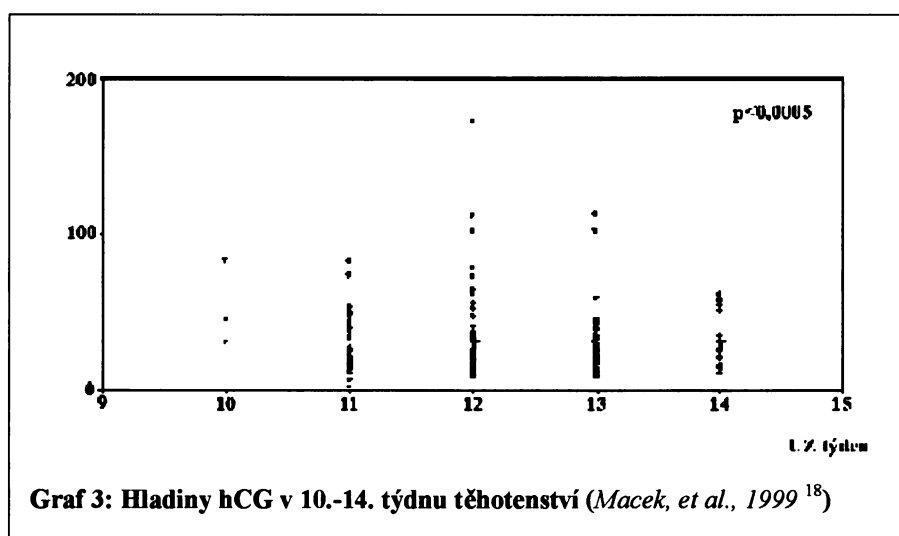
**hCG** je glykoprotein složený z beta a alfa podjednotky a syntetizovaný v buňkách syncytiotrofoblastu. V diagnostice se využívá jeho beta podjednotky. Hlavní funkcí hCG je udržovat syntézu progesteronu v corpus luteum a testosteronu fetálních varlat (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9</sup>).

Na korelaci vyšších hladin **hCG** a výskytu chromozomálních aberací plodu jako první upozornil Bogart. Ten popsal 17 případů s Downovým syndromem, z nichž 11 (tj. 65%) mělo hCG vyšší, u 74 zdravých plodů se zvýšení hCG projevilo jen v jednom případě. (*Bogart, 1987*<sup>16</sup>).

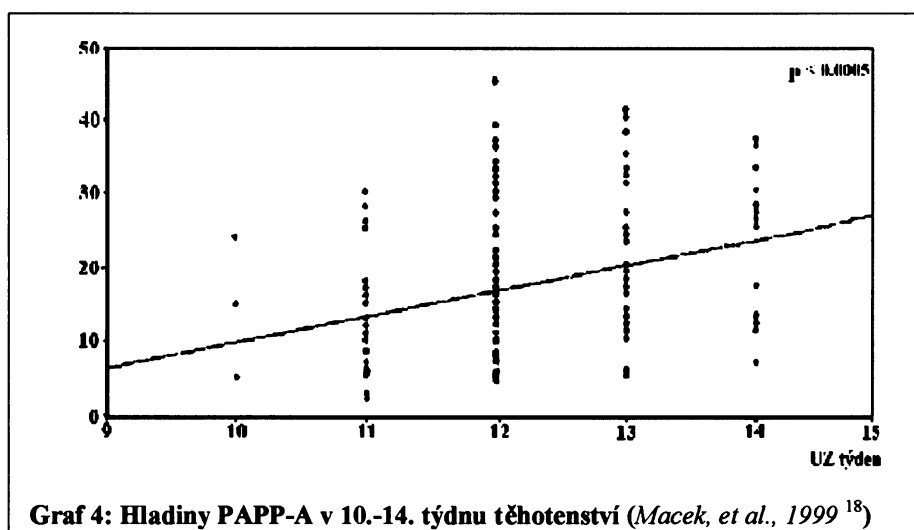
Jeho tvrzení potvrdil Wald provedením rozsáhlé studie 77 případů s Downovým syndromem a 385 kontrol v letech 1973-1983 (*Wald, et al., 1988*<sup>17</sup>).

Toto zvýšení koncentrací hCG by mělo souviset s tím, že hCG je produkován placentou a jeho koncentrace mezi 10-20. týdnem znatelně klesne. Plody s Downovým syndromem jsou nezralé a produkují vysoké koncentrace hCG typické pro raná těhotenství, což způsobuje rozdíl mezi koncentrací hCG u plodů postižených a normálních (Wald, et al., 1988<sup>17</sup>).

Zvýšení hladin volné beta podjednotky hCG v prvním i druhém trimestru poukazuje dále na vývoj Turnerova syndromu (monosomie chromosomu X) a unipaternální disomií chromosomu 16, snížení hladin pak na výskyt trisomie 18 (Hájek, Kulovaný, Macek, 2000<sup>9</sup>).



**PAPP-A** je glykoprotein produkováný v těhotenství zejména trofoblastem a následně uvolňován do mateřské cirkulace. Jeho biologická funkce je zatím neznámá (Caldá, 1998<sup>6</sup>). Hladiny PAPP-A narůstají od 5.-18. týdne gravidity, úměrně se zvyšující se hmotností. Do 14. týdne se jeho hladina zvýší desetinásobně. (Macek, et al., 1999<sup>18</sup>). Snížené koncentrace tohoto proteinu poukazují už v 6.-9. týdnu těhotenství na riziko Downova syndromu. (Macek, et al., 1999<sup>18</sup>).



**uE3** vzniká z estriolu, je produkován placentou z maternálních substrátů (z cholesterolu, který přechází do placenty, postupně se přeměňuje na estriol a vrací se do jater matky) a detekovatelný je v maternálním séru. (Hájek, Kulovaný, Macek, 2000<sup>9</sup>). Koncentrace tohoto markeru je snižena u nezralých nadledvin a jater plodu. Měření koncentrace tohoto hormonu je také spolehlivý test na trisomii chromozomu 21, 18 či anencefalii (Canick, et al., 1988<sup>19</sup>).

Podle doby provedení úkonu můžeme biochemický screening rozdělit na screening prvního trimestru a screening druhého trimestru těhotenství.

### Screening prvního trimestru

Screening prvního trimestru je prováděn mezi 11.-14. týdnem gravidity. Markery, jejichž hladina se při tomto typu vyšetření zjišťuje, jsou AFP, PAPP-A, hCG a uE3. Spolehlivost těchto markerů při detekci Downova syndromu při zachované 5% falešné pozitivitě uvádí tabulka sestavená dle Cuckle (Cuckle, Lith, 1999<sup>20</sup>).

Čím více markerů se vyšetřuje, tím je test samozřejmě spolehlivější. Pravděpodobnost záchytu Downova syndromu se dále zvyšuje při použití biochemického screeningu v kombinaci s ultrazvukovým měřením nuchální translucence (NT).

Marker	Samostatná biochemie (%)	Biochemie + NT (%)
hCG	41,8	77,7
PAPP-A	52,2	81,2
PAPP-A + hCG	64,6	86,4
PAPP-A + hCG + AFP	66,6	87,2
PAPP-A + hCG + uE3	68,6	87,9
Všechny čtyři markery	70,1	88,3
Samostatná NT	-	72,7

**Tab. 3: Odhad pravděpodobnosti záchytu (%) Downova syndromu při zachování 5% falešné pozitivity: biochemické testování s různou kombinací markerů a NT v 9-11 týdnu těhotenství (Cuckle, Lith, 1999<sup>20</sup>).**

### Screening druhého trimestru

Screening druhého trimestru, známý jako triple test nebo AFP test, je založen na interpretaci hodnot uE3, hCG a AFP v mateřském séru. Jedná se o odběr krve matky mezi 15. a 22. týdnem těhotenství a je to rutinní metoda ve většině civilizovaných zemí.

Používání trojkombinace všech tří markerů (hCG, uE3 a AFP) spolu s věkovou indikací pro co nejpřesnější výsledky navrhl Wald (*Wald, et al., 1988*<sup>17</sup>). Je tak umožněna detekce přes 60% případů plodů postižených Downovým syndromem. Podle Cuniffa (*Cunniff, 2004*<sup>21</sup>) může být identifikováno biochemickým screeningem druhého trimestru dokonce až 80% případů Downova syndromu.

Screening druhého trimestru se používá nejenom pro detekci aneuploidii chromozomů, ale také pro prevenci jiných vývojových vad, jako jsou anencefalie, poruchy uzávěru nervové trubice, mediální rozštěp patra a další poruchy prenatálního vývoje plodu. O tomto širokém využití koncentrací AFP informovali Brock a Sutcliffe (*Brock, Sutcliffe, 1972*<sup>22</sup>), když v roce 1972 ukázali, že koncentrace AFP v amniové tekutině plodů s anencefalií jsou výrazně vyšší než u plodů normálních. Odběry plodové vody prováděli ve většině případů v 26. týdnu, ale podle jednoho případu odběru z 18. týdnu a jednoho případu ze 13. týdnu se už tehdy Brock zmiňoval o možnosti využití tohoto měření v ranějších fázích těhotenství (*Brock, Bolton, Monaghan, 1973*<sup>13</sup>).

Biochemický screening je pro větší efektivitu doplňován ultrazvukovým vyšetřením. Ultrazvuk se používá hlavně k upřesnění gestačního stáří a k vyloučení vícečetného těhotenství, protože v takových případech je hladina AFP změněná. Normální výsledek ultrazvukového vyšetření snižuje riziko defektu neurální trubice o 95% a více (*Cunniff, 2004*<sup>21</sup>).

#### 4.2. Ultrazvukový screening

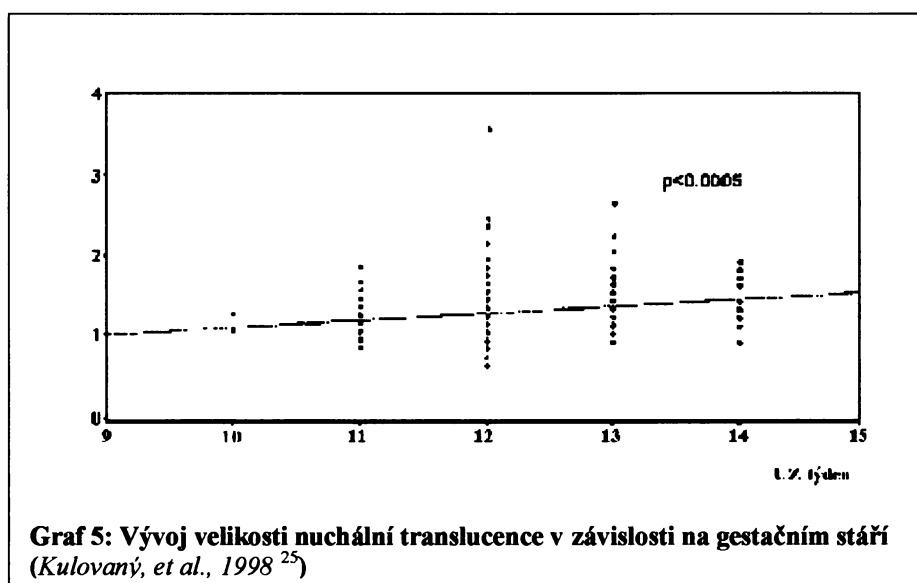
Chromozomální aberace plodu jsou doprovázeny vnitřními nebo vnějšími morfologickými odchylkami (tedy ultrazvukovými markery), které lze pozorovat na ultrazvuku. Ultrazvukový screening tak slouží nejenom například ke sledování růstu plodu, jeho pozice a morfologii, k detekci vícečetného těhotenství, k dataci těhotenství a sledování placenty a množství plodové vody ale i případných vývojových anomálií plodu.

Touto metodou lze detekovat takřka všechny případy anencefalie a asi 90% případů otevřené spina bifida u případů se zvýšeným rizikem (např. u případů s vysokými koncentracemi AFP) (*Cunniff, 2004*<sup>21</sup>).

Markery fetálních chromozomálních aberací jsou např.: nuchální translucence (NT), délka nasální kosti, cysty chorioidálního plexu, zvýšená echogenita střevního obsahu, rozšíření ledvinné pánvičky, délka humeru aj. (Cunniff, 2004<sup>21</sup>). Záchyt vad se v současnosti posunuje z druhého trimestru do časnějších fází těhotenství, a to do 9.-13. týdne.

Využití NT pro detekci plodů s Downovým syndromem navrhl v roce 1985 Benaceraff, když prokázal souvislost mezi zvětšenou oblastí nuchální translucence a výskytem tohoto syndromu (Benaceraff, 1985<sup>23</sup>). Při vyšetření nuchální translucence se měří objem lymfatické tekutiny, která se kumuluje mezi páteří a kůží na krku plodu (Smith, 2006<sup>24</sup>).

Nuchální translucence větší nebo rovna 3mm se vyskytuje u 86% trisomických (59% trisomie 21, z 41% trisomie 13, 18) a 4,5% chromosomálně normálních plodů (Calda, 1998, Kulovaný, et al., 1998<sup>6,25</sup>). Zvýšená nuchální translucence nad 2,5 mm se dále vyskytuje u postižení plic, dysplázií, u postižení plodu toxoplasmózou, virovými a bakteriálními infekcemi, u narušení hemodynamiky u plodu s těžkými VVV (Kulovaný, et al., 1998<sup>25</sup>).



Kombinací měření NT, délky nosní kosti a biochemického screeningu lze při falešné pozitivitě 5% identifikovat až 97,5% trisomií 21 (Višková, Calda, 2003<sup>5</sup>). Další studie rozšířily využití tohoto markeru o detekci trisomií 13, 18 a monosomie X (Kulovaný, et al., 1998<sup>25</sup>).

Pro ověřování pozitivních výsledků screeningu je ženám s rizikem aneuploidii nebo vrozených vývojových vad plodu doporučována amniocentéza či odběr choriových klků, tedy metody invazivní.

### 4.3. Diagnostika z krve matky

#### **Izolace fetálních buněk z krve matky**

Placenta propojuje plod a mateřský organismus a proto některé fetální buňky, jako leukocyty, buňky trofoblastu či erythroblasty, prostupují placentární bariérou a kolují pak v krevním oběhu matky, odkud mohou být izolovány a jakožto zdroje DNA použity pro vyšetření v prenatalní diagnostice (*Kunert, 1997*<sup>26</sup>)

Pro cytogenetickou analýzu jsou nejvhodnějšími buňkami jaderné erythrocyty, protože ty se v krevním oběhu dospělého jedince (a tedy matky) normálně nevyskytují (*Takabayashi, et al., 1995*<sup>27</sup>).

Výměna krve mezi matkou a plodem je teoreticky možná od 4. týdne těhotenství, kdy začíná srdeční akce plodu, tuto metodu je tedy možné provádět již během prvního trimestru těhotenství. Jaderné erythrocyty se v mateřské krvi nalézají od 8. – 24. týdne těhotenství (*Takabayashi, et al., 1995*<sup>27</sup>).

Jako nejvhodnější období pro odběr fetálních jaderných erythrocytů se zdá být doba kolem 15. týdne těhotenství, tedy druhý trimestr. Množství fetálních buněk totiž stoupá v závislosti na gestačním věku, podle některých studií ale ve třetím trimestru začíná klesat (*Alba, et al., 2001*<sup>28</sup>).

K určení, jestli jsou izolované buňky mateřského původu nebo pocházejí z fétu, se používá metoda PCR pro detekci repetitivních sekvencí typických pro Y-chromozóm.

Takabayashi izoloval mikromanipulátorem z mateřské krve jaderné erythrocyty fetálního původu a u deseti případů z jedenácti se mu podařilo správně určit pohlaví plodu (*Takabayashi, et al., 1995*<sup>27</sup>).

Tuto diagnostickou metodu však výrazně zpochybnil pokus pěti nezávislých laboratoří, které nebyly schopny v plasmě 38 těhotných žen čekajících potomky mužského pohlaví identifikovat a izolovat buňky pocházející z plodu (*Bischoff, et al., 2003*<sup>29</sup>).

V poslední době se od analýzy buněk z krve matky postupně upouští. Izolace nepoškozených fetálních buněk je technicky náročná a množství buněk, které lze takto získat, je velmi malé - v 1ml mateřské krve se vyskytuje jedna jaderná červená buňka (*Alba, et al., 2001*<sup>28</sup>), tzn. asi 0,008% - 0,0035% (*Poon, Lo, 2001*<sup>30</sup>).

Navíc fetální buňky mohou v krvi matky přetrvávat i po ukončení těhotenství a při odběru krve ženy tak hrozí jejich smíchání s buňkami z předcházejících těhotenství.

Trimestr	Poměr fetálních buněk vůči mateřským buňkám
První	$0,27 * 10^{-5}$
Druhý	$3,52 * 10^{-5}$
Třetí	$8,56 * 10^{-5}$

**Tab. 4: Odhadovaný počet fetálních buněk podle gestačního stáří**  
(Hamada et al., 1993, In: Simpson, Elias, 1994<sup>31,32</sup>)

### Izolace fetálních buněk výplachem děložního čípku

Buňky trofoblastu oddělené z placenty jsou přítomny v děložním hrdle a odtud mohou být získány takřka neinvazivním výplachem pro analýzu pomocí PCR nebo FISH. Už od 6. týdne gestačního stáří mohou být tyto buňky použity pro analýzu chromozomu X, Y či 21. a tedy mj. pro určení pohlaví plodu (Adinolfi, et al., 1995<sup>33</sup>). Před používáním této metody ale varuje Chou, který ve své práci představuje případ čínské ženy, jíž byl výplach děložního krčku proveden v 8. týdnu těhotenství. Dítě se narodilo předčasně, s končetinami deformovanými a amputovanými (Chou, Lin, Ho, 1997<sup>34</sup>).

Tato metoda nebyla zatím důkladně prostudována a je třeba jí pokládat za experimentální.

### Izolace volné fetální DNA

Když v roce 1997 Lo a kol. informoval o objevu nukleových kyselin fetálního původu, volně cirkulujících v krevním oběhu matky (free fetal DNA), začala se rozvíjet zatím nejperspektivnější neinvazivní diagnostická metoda. (Lo, et al, 1997<sup>3</sup>).

Koncentrace DNA v mateřské plazmě je překvapivě vyšší než koncentrace fetálních buněk. Vyrůstá postupně od 1. trimestru do 3. trimestru, prudký nárůst koncentrace v posledních 8 týdnech těhotenství ale může být způsoben patologickými procesy postihujícími placentu a porušením placentální bariéry mezi plodem a matkou (Simpson, Bischoff, et al., 2004<sup>2</sup>).

Průměrně se koncentrace DNA pohybuje průměrně okolo 7%, po přidání formaldehydu do vzorku krve stoupne koncentrace izolovatelné DNA průměrně na 20,2% (Dhallan, et al., 2004<sup>35</sup>). Formaldehyd stabilizuje buněčné membrány a potlačuje tak lyzi a destrukci buněk gravitačními silami, které při izolaci DNA vznikají centrifugací vzorků. Také inhibuje enzymy jako DNázu degradující DNA (Dhallan, et al., 2004<sup>35</sup>).



I po ošetření vzorků krve formaldehydem je ale výtěžek volné DNA nepravidelný a pohybuje se v širokém rozmezí od 17-94%, proto je dále potřeba vyvíjet techniky pro zvyšování koncentrace (*Benachi, Costa, 2007*<sup>36</sup>).

Přítomnost DNA v plazmě matky po porodu prudce klesá a do několika hodin zcela zmizí (*Poon, Lo, 2001*<sup>30</sup>), takže nehrozí kontaminace vzorku DNA pocházející z předchozích těhotenství.

Zdrojem volné DNA mohou být buňky plodu, které byly po prostoupení placentou zničeny mateřským imunitním systémem, čímž došlo k uvolnění extracelulární DNA. Nukleové kyseliny se také mohou uvolňovat při remodelaci placenty a s ní spojenou lýzí buněk (*Bischoff, et al., 2003*<sup>29</sup>).

Diagnostické využití volné fetální DNA má široký potenciál. Detekcí Y-specifických sekvencí je možné určení pohlaví plodu s 94% senzitivitou (*Poon, Lo, 2004*<sup>30</sup>). Také se provádí Rh genotypizace plodu – když jsou u matky s Rh- genotypem a tudíž alely **dd** nalezeny alely dominantní (**D**), je jasné že tyto patří plodu, byly zděděny od otce, a plod je Rh+ (*Nelson, et al, 2001*<sup>37</sup>).

Hladiny volné fetální DNA jsou zvýšené u trisomie 21, přestože lokus na chromozomu 21 není pro produkci fetální volné DNA nezbytný (*Simpson, Bischoff, 2004*<sup>2</sup>). Ve využití volné fetální DNA pro diagnostiku chromozomálních aberací plodu zatím brání problémy s izolací těchto nukleových kyselin z mateřské krve a jejich odlišením od DNA matky (*Benachi, Costa, 2007*<sup>36</sup>).

Řešením těchto problémů by mohla být analýza polymorfismu v jednotlivých nukleotidech (single-nucleotide polymorphisms, SNP) zděděných od otce a odlišující tak DNA plodu od DNA matky (*Dhallan, et al., 2007*<sup>38</sup>). Tak je ovšem možné odlišit pouze takové sekvence DNA plodu, které se liší od sekvencí DNA matky.

Když bude v určitém místě genomu matky nukleotid guanin na obou chromozomech a v tomtéž místě genomu otce bude například thymin na obou chromozomech, dítě pak od každého z rodičů zdědí po jednom chromozomu a na jednom chromozomu (od matky) bude mít guanin a na druhém chromozomu (od otce) pak thymin. Přítomnost thyminu, který nemohl plod zdědit od matky, bude svědčit o fetálním původu tohoto chromozomu (*Dhallan, et al., 2007*<sup>38</sup>). Tohoto principu lze využívat při detekci mutantních paternálních alel plodu.

V plazmě matky se nevyskytuje jen volná fetální DNA, ale také volná RNA (*Lo, et al, 1997*<sup>3</sup>), čehož by se dalo využít při zkoumání genové exprese plodu (*Poon, 2001*<sup>30</sup>).

## 5. INVAZIVNÍ METODY PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKY

Nedílnou součástí prenatální diagnostiky jsou tzv. invazivní metody, které představují určitý zásah do těla matky a často i plodu a proto nesou jisté riziko pro těhotenství.

Obecně platí, že invazivní zákrok by se měl provádět jen tehdy, je-li riziko plynoucí ze zákroku menší, než riziko postižení. Je-li diagnostická metoda spojena s rizikem pro těhotenství nebo není-li v daném případě realizovatelná či má-li nízkou senzitivitu, musí být zvolena efektivnější alternativa (*Thompson, 2004*<sup>7</sup>)

Nejpoužívanějšími invazivními metodami jsou amniocentéza (AMC) a odběr choriových klků (CVS). Existují i jiné metody, jako například kordocentéza (odběr fetální krve z pupečnicku) nebo coelocentéza (odebrání tekutiny z extraembryonálního coelomu).

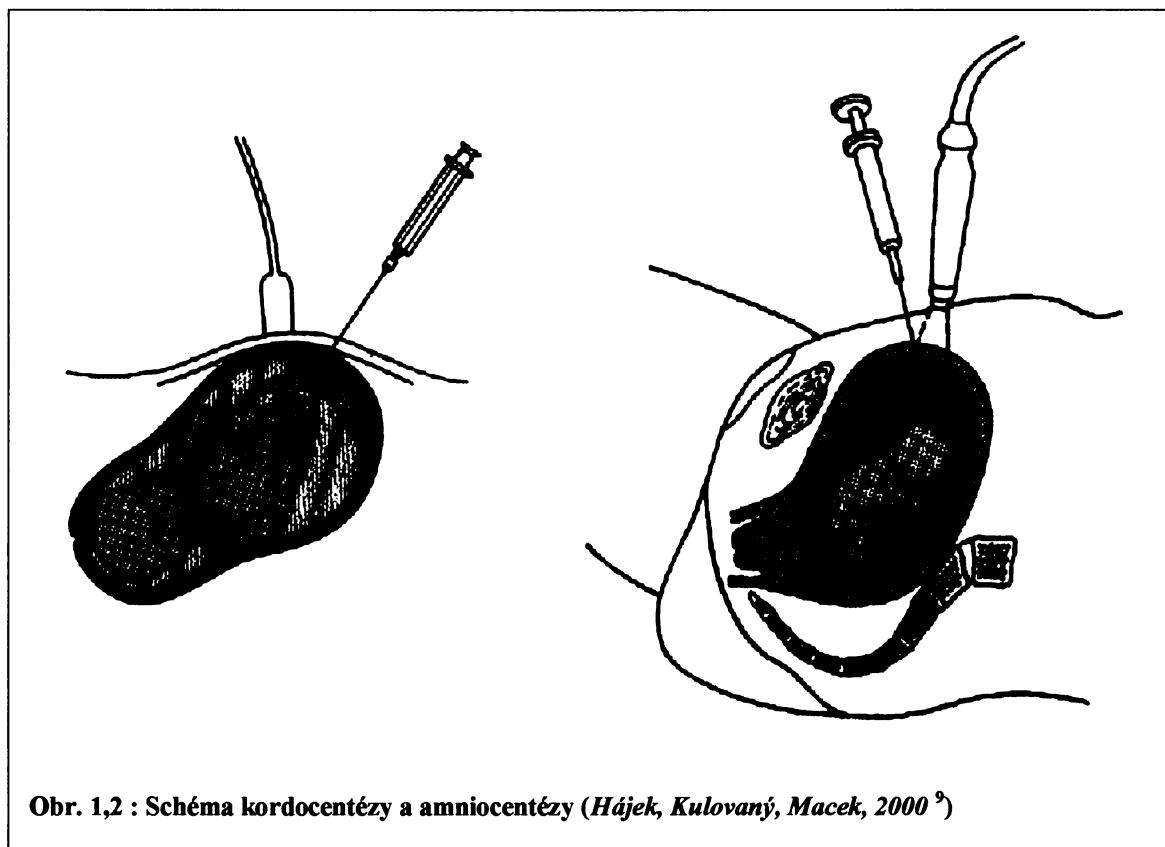
Kordocentéza se používá v případech, kdy vyšetření z plodové vody a placenty neposkytnou spolehlivé závěry. Ale riziko spontánního abortu s kordocentézou spojené se pohybuje mezi 1-2%, což je více než u AMC a CVS (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9</sup>).

U coelocentézy je riziko abortu dokonce až 25% (*Ross, Jurkovic, Nicolaidis, 1997*<sup>39</sup>), což tuto metodu vyřazuje z běžného diagnostického používání.

### 5.1. Amniocentéza

Tato dnes již zcela rutinní invazivní metoda spočívá v transabdominálním odběru plodové vody, v níž se vyskytují odloučené fetální buňky. Po kultivaci těchto buněk je z nich možno získat dostatečné množství DNA pro diagnostiku cytogenetickou, biochemickou nebo molekulární. Stanovuje se tedy nejenom hladina markerů, ale i karyotyp plodu k odhalení defektů neurální trubice i chromozomálních vad (*Cunniff, 2004*<sup>21</sup>).

Hlavním zdrojem buněk pro cytogenetickou analýzu je pokožka těla plodu - oddělené epidermální buňky tvoří většinu plodové vody (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9</sup>). U dvojčat je riziko potratu po provedení zákroku vyšší, což asi souvisí s obecně vyšším rizikem spontánního potratu u vícečetných těhotenství (*Žižka, Calda, 1998*<sup>10</sup>).



### Časná amniocentéza

Jedná se o odběr plodové vody před ukončeným 15. týdnem těhotenství, mezi 11.-14. týdnem. Tato metoda byla navržena roku 1986. Pro její vykonávání bylo nutné co nejvíce snížit potřebné množství plodové vody, protože v prvním trimestru je amniální vak malý. Což se podařilo – pro časnou amniocentézu jsou potřeba jen 3ml plodové vody a také se zkrátila doba kultivace.

Této metodě je přičítáno vyšší riziko potratu a poškození plodu. Crandall (*Crandall, Kulch, Tabsh, 1994*<sup>40</sup>) udává u zákroků prováděných před 15. týdnem riziko spontánního abortu 1,5%, Daniel 2,2% (*Daniel, et al., 1998*<sup>41</sup>), Nicolaidides přes 5% (*Nicolaidides, et al.: 1994*<sup>42</sup>). Toto riziko je ale závislé na době odběru plodové vody – uskuteční-li se před 13. týdnem těhotenství, riziko prudce vzrůstá. Stipparo udává dokonce 14,8% fetálních ztrát při výkonu provedeném před 13. týdnem těhotenství a 1,8% fetálních ztrát po 13. týdnu těhotenství (*Stipparo, 1990*<sup>43</sup>).

Časnou amniocentézou se podrobně zabývala studie CEMAT. V ní bylo 4374 těhotenství rozděleno do dvou skupin podle toho, byla-li provedena amniocentéza časná nebo po 15. týdnu (tzv. amniocentéza klasická). U časné AMC docházelo k potratům v 7,6% případů, u klasické v 5,9% případů. U časné AMC byl rovněž zjištěn předčasný odtok plodové vody (3,5% versus 1,7% u klasické) a navíc bylo častěji potřeba úkon opakovat následkem selhání cytogenetické diagnostiky (2,2% versus 0,3%) (*Višková, Calda, 2003*<sup>5</sup>).

Zvýšeným rizikem vzniku deformovaných dolních končetin u dětí, jejichž matky podstoupily časnou amniocentézu, se zabýval například Tredwell. Ve své studii uvádí, že z 1784 živě narozených dětí, jejichž matky podstoupily časnou AMC, se jich narodilo 29 (což odpovídá 1,63%) s deformitami dolních končetin. Zatímco ve skupině matek, které podstoupily AMC až ve druhém trimestru, se narodily pouze dvě děti s deformitami dolních končetin (to je asi 0,12%) (*Tredwell, et al., 2001*<sup>44</sup>).

Jako možné vysvětlení Tredwell udává, že časná AMC je zákrok prováděný v době maximální růstové rychlosti končetin plodu (max. rychlost je mezi 11.-16. týdnem), toto období je velmi důležité pro správný vývoj končetin a pro správnou koordinaci pohybů. Navíc během 8.-16. týdne dochází k exponenciálnímu nárůstu množství plodové vody (v 10. týdnu 30ml, ve 20. týdnu 350ml, mezi 11.-15. týdnem stoupá její množství o 25ml týdně). Zásah v podobě AMC v tomto období znamená odběr plodové vody a tím zmenšení místa potřebného pro pohyb a vývoj plodu. To mohou být jedny z důvodů deformování končetin u plodů s časnou AMC (*Tredwell, et al., 2001*<sup>44</sup>).

### **Klasická amniocentéza**

Klasická amniocentéza je prováděna ve II. trimestru gravidity a je ověřenou metodou pro zjišťování chromozomálních abnormalit plodu. Je vykonávána transabdominálně, v 15.-16. týdnu. Odběr potřebných 20ml plodové vody je bezpečný a uváděné riziko spojené s touto metodou je 0,6% (*Crandall, Kulch, Tabsh, 1994*<sup>40</sup>). Přesto hrozí odtok většího množství plodové vody, kontrakce dělohy, abrupce placenty nebo poranění plodu jehlou (*Žižka, Calda, 1998*<sup>10</sup>). Další nevýhodou je pozdní doba testování a výsledky testu až od 17. týdne těhotenství.

### **Amniocentéza ve třetím trimestru**

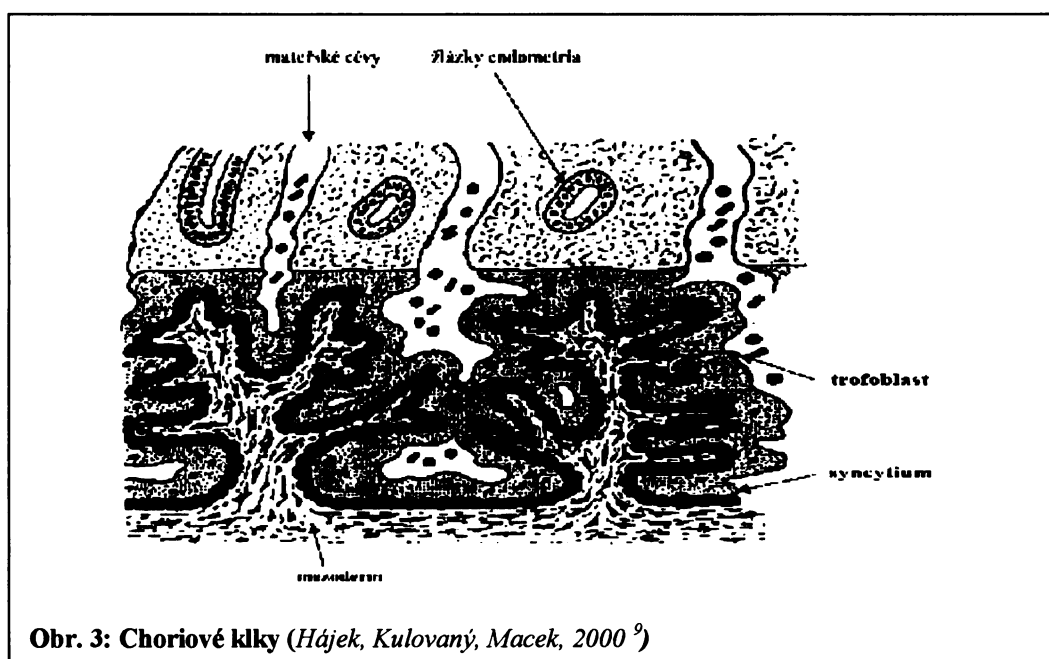
Pozdní amniocentéza je prováděna ve třetím trimestru těhotenství a může být používána pro odhad zralosti plic plodu. Přestože je považována za bezpečnou, komplikace spojené s tímto úkonem se v různé literatuře uplynulých 20 let pohybují v rozmezí 1- 9%.

Například ve studii Stark a kol. bylo v letech 1990-1997 sledováno 913 případů amniocentézy ve třetím trimestru, z nichž 15 (1,6%) bylo neúspěšných kvůli průniku jehly. Ve 41 případech došlo k porodu ten samý den, co byla amniocentéza provedena a komplikace vyžadující vyvolání porodu se objevily v 6 případech (0,7%) (Stark, et al., 2000<sup>45</sup>).

Procento neúspěšných zákroků (1,6%) z této studie je signifikantně nižší než tomu tak bylo podle dřívějších studií, což nejspíš svědčí o zdokonalení ultrazvukových metod za posledních 20 let, kterými je tento zákrok kontrolován. Například studie z roku 1979 udává 9,2% komplikací (Young, 1979<sup>46</sup>).

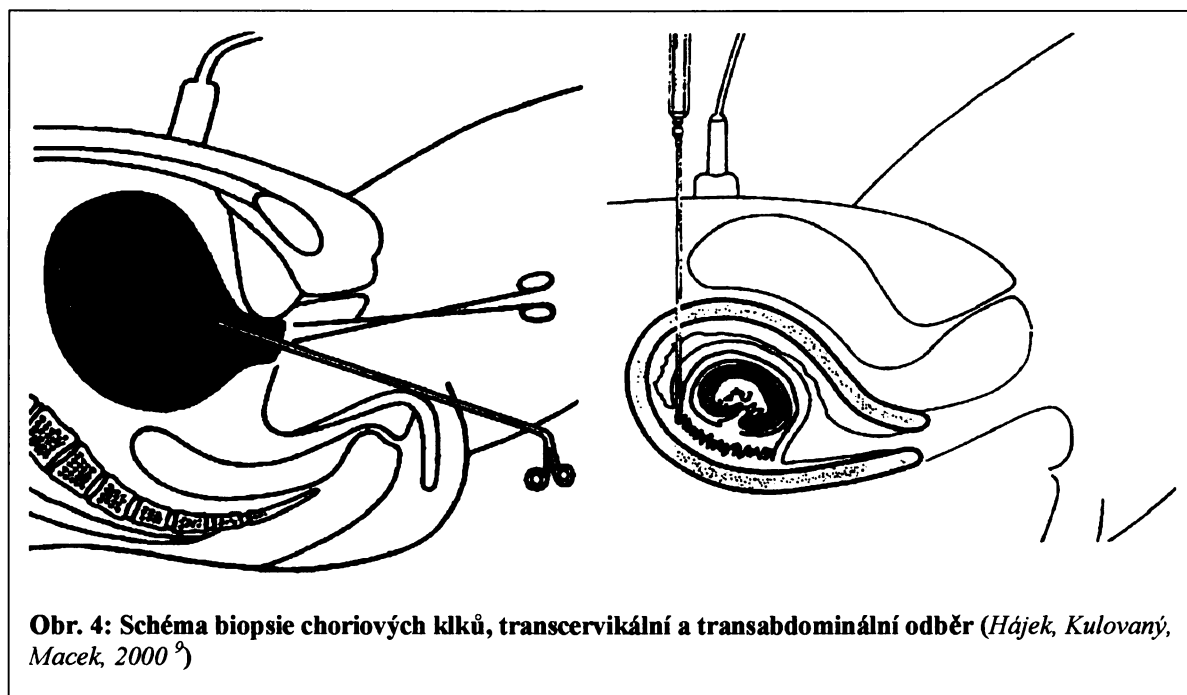
## 5.2. Biopsie choriových klků (CVS)

Při této metodě se po 10. týdnu těhotenství odebírá malé množství buněk (asi 20mg tkáně) plodového obalu (choria), který je, stejně jako plod sám, složen z buněk plodu. Při odběru nedostatečného množství tkáně je třeba vpichy opakovat, čímž se ale geometrickou řadou zvyšuje riziko spontánního potratu (Hájek, Kulovaný, Macek, 2000<sup>9</sup>). Z rychle rostoucích buněk choriových klků je možno izolovat DNA přímo, s krátkou dobou kultivace.



Odběr buněk může být proveden transcervikálně (zavedením katétru) nebo transabdominálně (zavedením jehly) do placenty pod kontrolou ultrazvuku (Cunniff, 2004<sup>21</sup>). Transcervikální odběr se provádí v 10.-11. týdnu, transabdominální ve 12.-13. (Hájek, Kulovaný, Macek, 2000<sup>9</sup>).

Transabdominální a transcervikální přístup porovnával Brambati a kol., a nezjistil mezi nimi rozdíl v bezpečnosti ani účinnosti. Naproti tomu Smidt-Jensen a kol. prokázal vyšší riziko transcervikálního přístupu a Jahoda a kol. poukazuje na souvislost rizika potratu s dobou provádění zákroku - ztráty obou technik jsou 5,8-6,2%, a poklesnou na 2,4%, pokud jsou zákroky provedeny až po 12. týdnu gravidity (Žižka, Calda, 1998<sup>10</sup>).



S CVS je spojována vyšší frekvence vzniku chromozomální mozaiky placenty\*, kterou lze nalézt přibližně v 1% vzorků CVS, častěji u transabdominálního odběru 0,92% vs. 1,20% u transcervikálního, zatímco u AMC se jedná o 0,25% (Wapner, et al., 1992<sup>47</sup>).

Objevují se též studie o souvislosti CVS a vzniku končetinových defektů u plodu, zejména je-li technika provedena před 10. týdnem gravidity (Cunniff, 2004<sup>21</sup>).

#### **Placentální mozaicismus (CPM- confined placental mosaicism)**

Mozaicismus znamená přítomnost dvou nebo více různých buněčných linií v jednotlivci nebo ve vzorku jeho tkáně. Mozaika postihující placentu i plod vzniká při poruše prvního nebo druhého postzygotického dělení. Placentální mozaika je způsobena dichotomií mezi chromozomální konstitucí placentální a fetální tkáně. Placenta pak obsahuje mozaiku buněk s určitou aberací, tato aberace se však nevyskytuje u plodu. Karyotyp plodu je sice normální, ale přesto může být u plodu fenotypický projev, například proto, že plod má obě kopie určitého chromozomu od jednoho rodiče – tzv. unipaternální disomie (patrně je to kompenzace trisomie, tedy nadpočetnosti, tohoto chromozomu, kdy dojde ke ztrátě jedné kopie). Placentální mozaicismus v genetickém poradenství a prenatalní diagnostice představuje složitou situaci, interpretace je nejistá kvůli nedostatečným diagnostickým možnostem. (Thompson, 2004, Hájek, Kulovaný, Macek, 2000<sup>7,9</sup>)

Výhodou odběru choriových klků oproti amniocentéze je možnost časného použití (v 10.-12. týdnu), což poskytuje rodičům čas na rozhodnutí ohledně pokračování těhotenství v případech pozitivních výsledků. Je-li potřeba těhotenství ukončit, v tak časném stadiu těhotenství je to pro matku méně traumatizující zákrok, ať už po stránce fyzické nebo psychické.

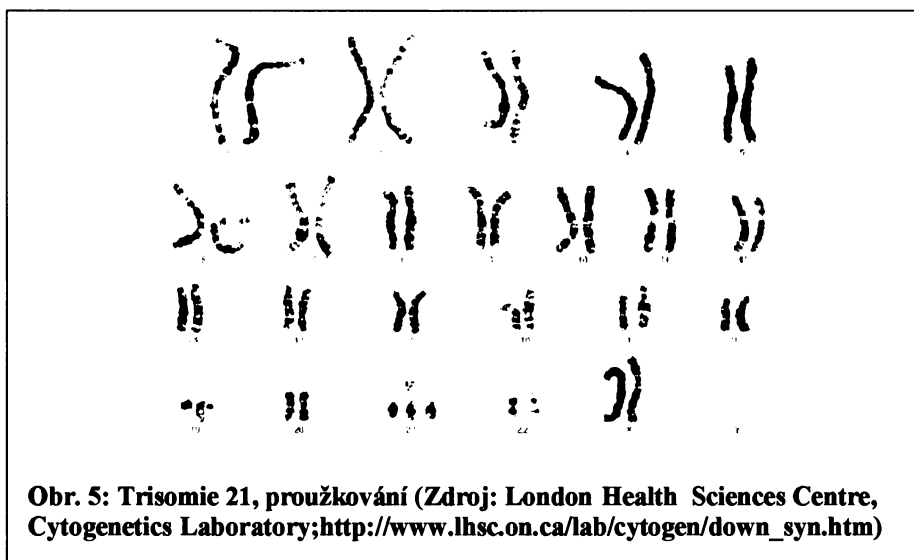
## 6. CYTOGENETICKÉ VYŠETŘENÍ FETÁLNÍCH BUNĚK

Získané fetální buňky jsou využívány pro klinické vyšetření chromozomálně podmíněných vrozených vývojových vad. Po kultivaci jsou pak použity pro analýzu počtu a struktury chromozomů a tedy pro detekci strukturálních i početních chromozomálních aberací.

Buněčné kultury získané z periferní krve jsou vhodné pro rychlé vyšetření, jejich životnost je však jen několik dnů. Dlouhodobé kultury lze získat kultivací buněk z plodové vody či biopsie choria (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9)</sup>).

Kultivace trvá několik dnů až týdnů. Je možné zvolit krátkodobou kultivaci, která ale neposkytuje příliš kvalitní preparáty, a dlouhodobou kultivaci (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9)</sup>).

Po kultivaci se v hypotonickém roztoku oddělí chromozomy od mitotického vřetenka, fixují se a barví. V mitóze jsou chromozomy nejlépe rozpoznatelné a proto je tato fáze pro diagnostiku nejvhodnější. Nejpoužívanějším typem barvení je Giemsovo (G- pruhování). Odliší se heterochromatinové úseky na chromozomech a chromozomy tak získají charakteristické proužky.

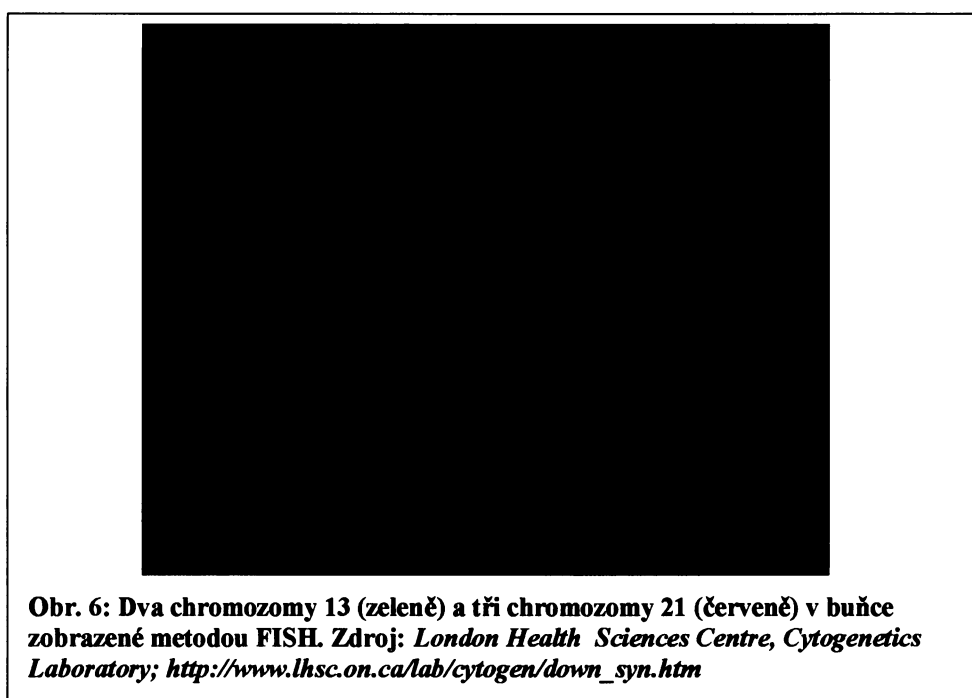


## 6.1. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Tato metoda spočívá v hybridizaci chromozomu s jeho specifickou, fluorescenčně označenou sondou, a to okamžitě po odběru plodové vody nebo choriových klků.

Dvoušroubovice DNA se nejprve denaturuje a získá se jednořetězcová DNA, po hybridizaci se sondou se DNA chromozomů dobarví a sleduje se ve fluorescenčním mikroskopu, který umožňuje vizualizovat fluorescenční signály.

Existují různé typy sond, ať už pro lokalizaci určitého genu, detekci unikátních DNA sekvencí nebo pro znázornění celých chromozomů.



Touto metodou mohou být znázorněny strukturální aberace chromozomů a aneuploidie chromozomů 13, 18, 21, X a Y (*Thompson, 2004*<sup>7</sup>).

Poměrně nová metoda, vícebarevná FISH (Spektrální karyotypizace) chromozomy odliší barevně, což umožní zjistit původ marker chromozomů a chromozomálních přestaveb.

## 6.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR umožňuje detekci aberací chromozomů bez kultivace fetálních buněk, do 4 hodin po odběru plodové vody (*Hájek, Kulovaný, Macek, 2000*<sup>9</sup>). Využívá se například i při odlišování fetální DNA od DNA matky, identifikací SRY sekvence u žen s plodem mužského pohlaví (*Nelson, et al., 2000*<sup>37</sup>).



Jedná se o rychlou přípravu velkého množství klonů vyšetřovaných sekvencí DNA, a to třeba jen z jediné molekuly DNA.

## 7. CHROMOZOMÁLNÍ ABERACE A VROZENÉ VÝVOJOVÉ VADY

Cytogenetickým vyšetřením fetálních buněk lze detekovat abnormality chromozomů, které mohou být strukturální nebo numerické. Nejčastějším typem numerických aberací je aneuploidie, tedy abnormální počet chromozomů (absence chromosomu - monozomie, nebo přítomnost nadbytečného chromozomu - nejčastěji trizomie) (*Thompson, 2004*<sup>7</sup>).

Přirozený výskyt chromozomálních abnormalit je asi 6,23 případů na 1000 živě narozených dětí. Z toho v 54% případů jde o aberace numerické, ve 43% případů jsou to aberace strukturální, a 3% připadají na oba typy. Největší podíl (80%) na numerických aberacích autozomů mají trisomie chromozomu 21 (Downův syndrom), trisomie chromosomu 18 (10%) a trisomie chromosomu 13 (6%). Numerické aberace gonozomů (chromosomu X a Y) připadají na 0,2% živě narozených. Downův syndrom tedy tvoří téměř 50% všech chromozomálních aberací u živě narozených dětí (*Višková, Calda, 2003*<sup>5</sup>).

Prenatální diagnostikou se ovšem počet dětí narozených s vrozenou vývojovou vadou snižuje – při detekci abnormality matka může podstoupit potrat.

S autozomální aneuploidii se narodí asi 0,14% dětí, tedy 1/700 živě narozených. S nejčastější trizomií autozomu, tedy Downovým syndromem, se narodí přibližně 0,12% dětí, tj. 1/830 živě narozených dětí (*Thompson, 2004*<sup>7</sup>).

Nejčastější anomálií centrální nervové soustavy je anencefalie, tedy nepřítomnost krania a mozku. Anencefalie vzniká důsledkem selhání uzavření neurální trubice a často jí doprovází spina bifida, která má obdobný původ. Novorozenci s defektem neurální trubice (NTD) se rodí mrtví anebo umírají do několika hodin po porodu. Incidence NTD má geografickou variabilitu a pohybuje se od 1-0,2% na počet narozených dětí (*Thompson, 2004*<sup>7</sup>).

Tyto choroby jsou multifaktoriální, tzn. že se na jejich vzniku podílí mnoho faktorů vnějších i vnitřních, stejně jako je tomu u vzniku rozštěpu rtu a patra. Rozštěpy jsou jednou z nejrozšířenějších vrozených vývojových vad (*Thompson, 2004*<sup>7</sup>).

## 8. VÝSLEDKY

V této práci jsem zpracovala lékařské karty 124 gravidních žen ve věku 20-45 let, které v období mezi roky 2004-2006 navštívily Genetickou poradnu MUDr. Miloslava Kuklíka v ÚPMD. Z etických a právních důvodů v tabulkách neuvádím jména ani rodná čísla pacientek, pouze jejich pořadí dle abecedního pořádku.

Všechny tyto pacientky podstoupily z nějakého důvodu invazivní prenatalní vyšetření, a to ve 123 případech amniocentézu a v 1 případě odběr choriových klků.

Průměrný věk pacientek, které navštívily genetickou poradnu, byl 33,3 let. Největší soubor tvořily ženy ve věkové kategorii 35-39 let (nejpočetnější skupinou byly ženy ve věku 35 let). *Graf 6,7*

Ze souboru 124 pacientek jich největší podíl, tedy 27% podstoupilo invazivní diagnostické vyšetření z důvodu vysokého věku, 20% kvůli pozitivnímu biochemickému screeningu, 16% kvůli chorobám matky a 11% z důvodu opakovaných spontánních abortů v minulosti. Ostatní indikace, jako problémy v předchozích těhotenstvích, oplodnění in vitro (IVF), pozitivní ultrazvukový screening a rodokmenová zátěž, byly zastoupeny rovnoměrně podílem 5-10%. *Graf 10*

U skupiny 59 žen, které v souboru překročily hranici 35 let, byl nejčastější indikací pro invazivní vyšetření vysoký věk (51%). Druhou nejčastější příčinou vyšetření u této skupiny byly choroby matky (13%). Pacientky do 35 let věku (65 případů) podstupovaly invazivní vyšetření nejčastěji z důvodu pozitivního biochemického screeningu (30%) a kvůli chorobám matky (22%). *Graf 11*

Některé pacientky v souboru sice překročily hranici 35 let, invazivní vyšetření ale u nich bylo aplikováno z jiného důvodu než právě kvůli vysokému věku.

Pozitivní screening, ať už biochemický nebo ultrazvukový, se na indikacích se stoupajícím věkem žen podílel zmenšující se měrou. *Graf 9*

Tato klesající tendence patrně odráží skutečnost, že starší ženy podstupovaly invazivní vyšetření z důvodu vysokého věku a pozitivní výsledky screeningu se tak staly významnou indikací pro pacientky mladší. Tento trend ale mohl také vzniknout chybou malého vzorku, protože skupiny pacientek s vysokým podílem pozitivního screeningu na indikacích (dokonce až 100%) jsou zároveň nejméně početnými skupinami – v kategorii 20-24 let jsou pouze dvě pacientky a v kategorii 25-29 let je 25 pacientek.

Kromě indikací k podstoupenému invazivnímu prenatalnímu vyšetření jsem zaznamenávala pohlaví plodů, bylo-li v kartě pacientek uvedeno.

Karyotyp plodů byl ve 41% případů ženský a v 56% mužský. Ve 3,5%, tj. ve 4 případech, byla zjištěna aneuploidie chromozomů. Jednalo se o dva případy trisomie chromozomu 21 (1 u plodu ženského pohlaví a 1 u plodu mužského pohlaví), o jeden případ mozaiky trisomie chr. 21 a jednu mozaiku karyotypu 47 XYY. *Graf 8*

Průměrný věk žen s abnormální chromozomální konstitucí plodu byl 35 let.

V Tabulce 1 jsou rozepsány údaje o pacientkách podrobněji. Každý řádek odpovídá jedné pacientce. Uvedený *věk* pacientky je z doby jejího vyšetření v genetické ambulanci. Byla-li příčinou invazivního vyšetření *rodokmenová zátěž*, je konkrétně uvedeno o jakou chorobu v rodokmenu se jednalo, stejně tak u *chorob matky*, které byly příčinou invazivního vyšetření. V případě pozitivního *biochemického* nebo *ultrazvukového screeningu* je uveden konkrétní pozitivní marker. Podstoupila-li pacientka invazivní vyšetření po umělém oplodnění, je tak uvedeno ve sloupečku *IVF*. Dalšími indikacemi pro podstoupení invazivní diagnostiky byly *opakované spontánní aborty* v minulosti nebo *problém v minulé graviditě*, zde je opět uveden o jaký problém se jednalo konkrétně. V posledním sloupci je *karyotyp plodu*, byl-li v kartě pacientky uveden.

Tabulka 2 je zobecněná verze tabulky 1. Jsou zde pouze křížky v příslušných sloupcích s indikacemi, bez konkrétních detailů. Křížek ve sloupci *Věk* znamená, že žena byla sledována z důvodu dosažení věkové hranice 35 let. Tato přehlednější, ale méně podrobná tabulka shrnuje indikace k invazivnímu prenatalnímu vyšetření.

## 9. ZÁVĚR

Prenatální diagnostika je důležitou součástí vyspělého zdravotnictví. V Čechách je takřka 100% těhotných žen pod kontrolou lékařů a je jim poskytována kvalitní preventivní péče.

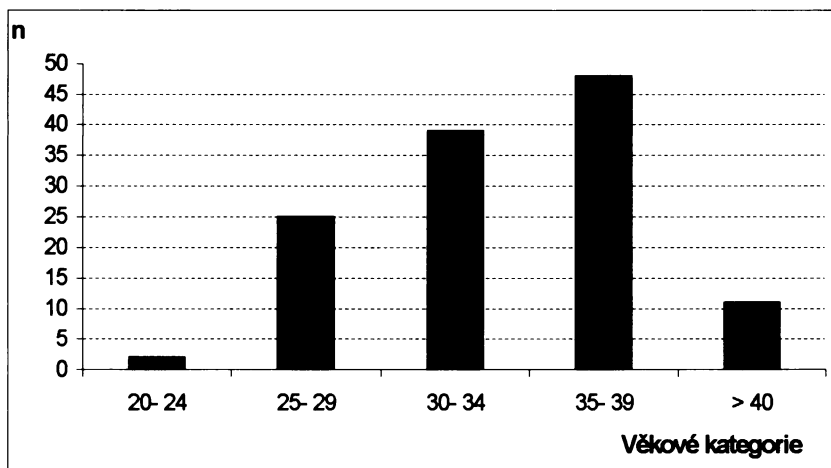
Poukazuje-li některý faktor na možný výskyt vývojové vady u plodu, podstupuje těhotná žena další, tentokrát invazivní vyšetření. Největší podíl na indikacích k tomuto zákroku má u žen starších 35 let právě pokročilý věk ženy. U žen do 35 let věku je nejvýznamnější indikací pozitivní biochemický screening.

Výzvou pro budoucnost prenatalní diagnostiky je zdokonalování neinvazivních metod a snaha nahrazovat jimi invazivní přístupy, které s sebou nesou určité riziko pro matku i plod.

Nejperspektivnějším odvětvím prenatalní diagnostiky se jeví vývoj zcela nových neinvazivních metod, založených na analýze krve těhotné ženy. Fetální buňky a nukleové kyseliny zde přítomné poskytují množství informací o chromozomální konstituci plodu a jeho zdravotním stavu. V budoucnu nejspíš budou tyto rychle se vyvíjející metody s nulovým rizikem pro vývoj těhotenství nahrazovat metody invazivní.

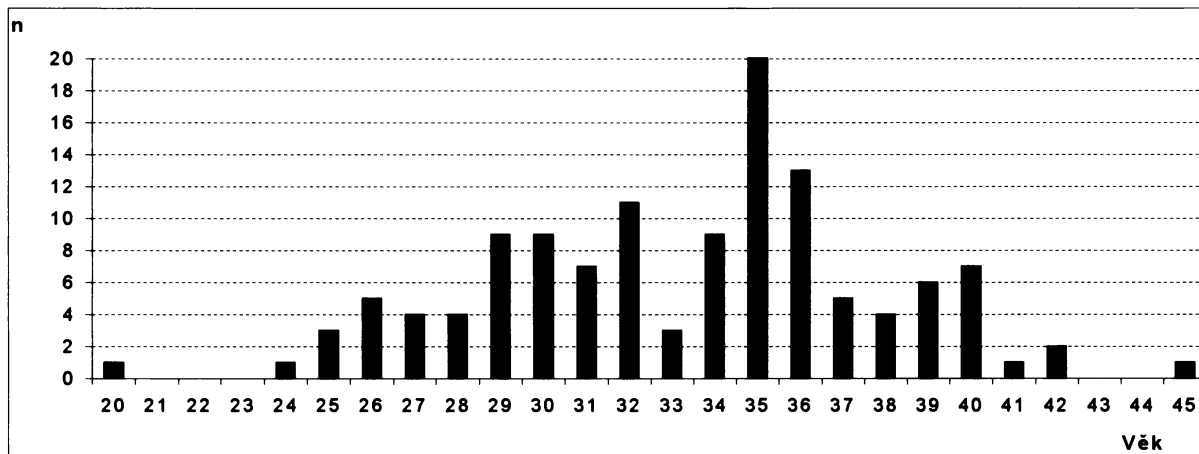
## 10. PŘÍLOHY

věk	počet
20- 24	2
25- 29	25
30- 34	38
35- 39	48
> 40	11



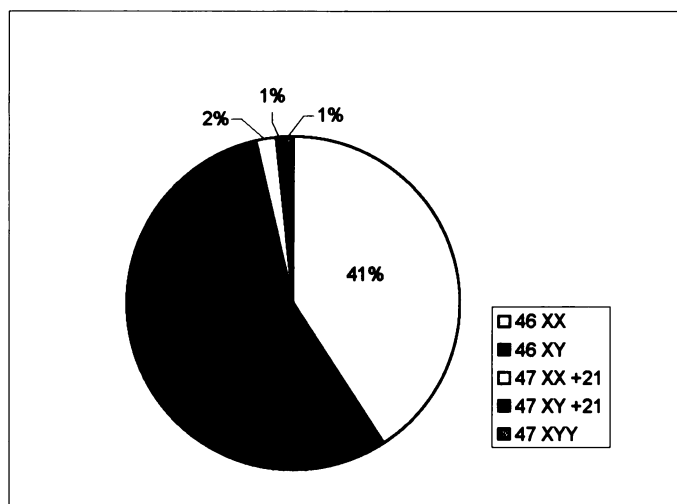
**Graf 6: Množství pacientek které podstoupily invazivní prenatalní diagnostiku, rozdělené dle věkových kategorií**

věk	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
počet	1	0	0	0	1	3	5	4	4	9	9	7	10	3	9	20	13	5	4	6	7	1	2	0	0	1



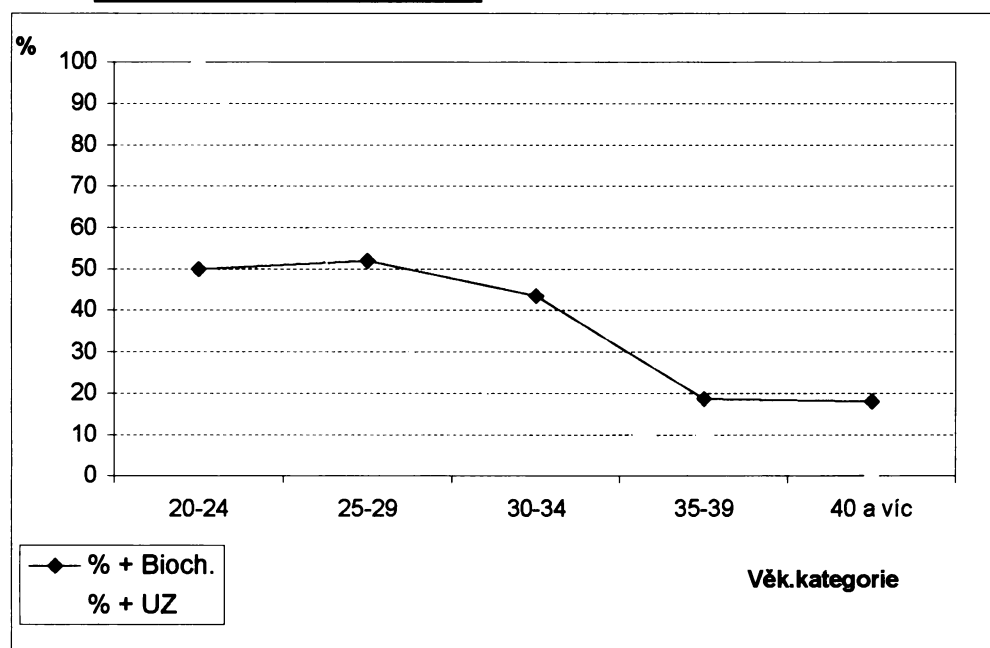
**Graf 7: Množství pacientek které podstoupily invazivní prenatalní diagnostiku rozdělené dle věku pacientek**

Chromozomální konstituce	počet	%	Poznámka
46 XX	48	41,0	
46 XY	65	55,6	(2* dvojčata)
47 XX +21	2	1,7	(1* mozaika)
47 XY +21	1	0,9	
47 XYY	1	0,9	(mozaika)



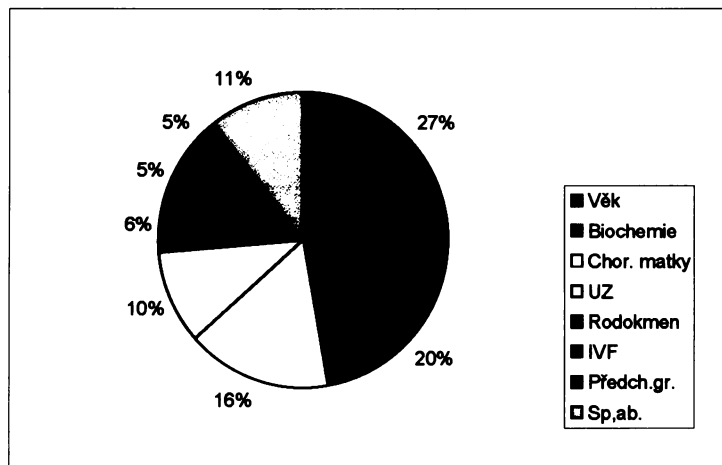
Graf 8: Chromozomální konstituce plodů, jejichž matky podstoupily invazivní diagnostiku

VĚK. KAT.	% + Bioch.	% + UZ
20-24	50,0	100,0
25-29	52,0	36,0
30-34	43,6	12,8
35-39	18,8	8,3
40 a víc	18,2	0,0



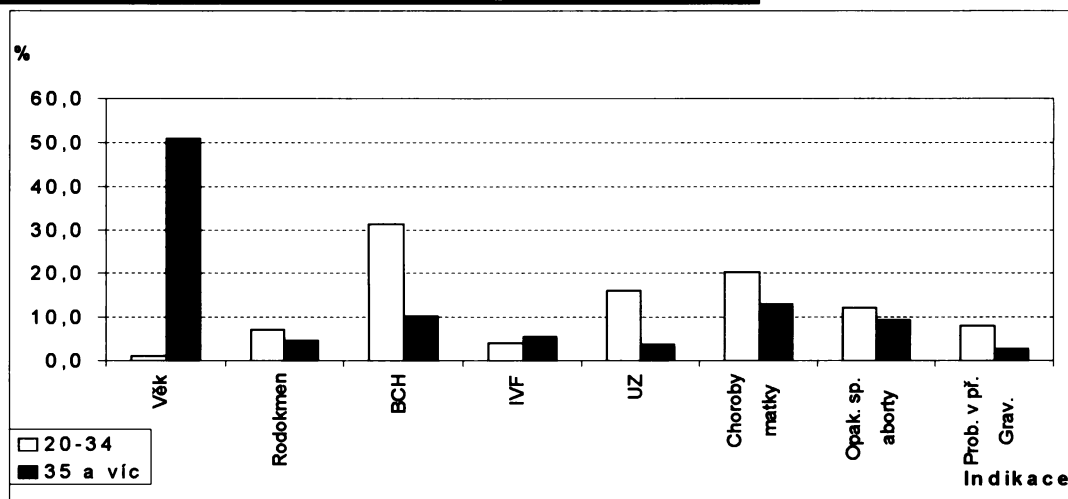
Graf 9: Podíl pozitivního UZ a Biochemického screeningu na indikacích v závislosti na věku ženy

	Věk	Biochemie	Chor. matky	UZ	Rodokmen	IVF	Předch.gr.	Sp.ab.
Podíl na indikacích %	26,9	20,2	16,3	10,1	5,8	4,8	5,3	10,6



Graf 10: Nejvýznamnější indikace k podstoupení invazivního prenatalního vyšetření

Kategorie (roky)	Věk	Rodokmen	Biochemie	IVF	UZ	Choroby matky	Opak. sp. aborty	Prob. v př. Grav.
20-34	1,0	6,9	30,4	3,9	15,7	21,6	12,7	7,8
35 a víc	50,9	4,6	10,2	5,6	3,7	13,0	9,3	2,8



Graf 11: Nejvýznamnější indikace k podstoupení invazivního prenatalního vyšetření rozdělené do dvou skupin podle věku pacientky

**Tabulka 1**

č.	Věk	Zátěž v rodokmenu	Biochemický screening	IVF	UZ markery	Choroby matky	Opak. sp. aborty	Problém v min.grav.	Karyotyp plodu
1	32	NTD	AFP						46 XY
2	35								46 XX
3	32		AFP						46 XY
4	32				x				46 XY
5	30	ortopedická vada							
6	29		AFP			hemicefální mikrosomie			46 XY
7	41			x		astma, autoimunitní, mozaika Turner	x		46 XX
8	36	CNS	PAPP		NT, nosní kůstky				47 XX+21
9	34								46 XX
10	35						x		46 XX
11	30		x						46 XY
12	35								46 XX
13	30				cysty choroidálního plexu				46 XX
14	32				cysta levé postranní komory				46 XX
15	27		x						46 XY
16	26				NT				
17	39								47 XY +21
18	39								
19	33		x						46 XX
20	36								46 XY
21	29						x	46XX5q+	46 XX
22	35	MTHFR	hCG			MTHFR			46 XX
23	38					defekt síňového septa			46 XX
24	40								46 XY
25	39								46 XY
26	32		x						46 XY
27	35								46 XY
28	30					toxoplasmosa			46 XX
29	32			x	cysta v obl. vermis				
30	31					MTHFR, thyreopatie	x		46 XX
31	38			x			x		
32	36	Duschene							46 XY
33	37					astma			46 XY dvojčata
34	38			x		thyreopatie			46 XY
35	35		x						46 XY
36	37						x		46 XY
37	45						x		46 XY
38	40						x	Edwardsův s.	46 XX
39	40		x			thyreopatie			46 XX
40	26	Gilbertova ch.	AFP						46 XY
41	36						x		46 XY
42	35		x			astma			
43	31							Downův s.	46 XY
44	28				chybí umbilik. arterie				46 XY



č.	Věk	Zátěž v rodokmenu	Biochemický screening	IVF	UZ markery	Choroby matky	Opak. sp. aborty	Problém v min.grav.	Karyotyp plodu
45	34		AFP						46 XY
46	27		x		cysta choriodálního plexu, struna v srdečních oddílech				46 XY
47	40								46 XX
48	36			x					46 XX
49	24				echogenicita střeva				46 XY
50	37								46 XY
51	29				struna v komoře srdce, dilatace párníček				46 XY
52	35					toxoplasmosa			46 XY
53	26		x						46 XX
54	31		hCG						47 XYY mozaika
55	34					léčba antibiotiky	x	hydropická degenerace gemini	46 XX
56	36	rozštěp u otce					x	47XY+16	46 XY
57	39								46 XY dvojčata
58	28			x					46 XY
59	40			x					46 XX
60	35								46 XX
61	25				chybí kůstka nosu	roztroušená skleróza			46 XY
62	33					Leydenovska trombofilní mutace, MTHFR	x		46 XY
63	35		x						
64	34		x						46 XY
65	26		x						46 XY
66	35		AFP						46 XX
67	42								46 XY
68	42								46 XY
69	35		PAPP		dilatace kalichopánvičkových systémů ledvin				46 XY
70	31	Down. s.	x						46 XY
71	25		AFP						46 XY
72	29				echogenita střev				46 XX
73	39								46 XY
74	31					manžel chemoterapie			46 XX
75	37								46 XX
76	30		x						46 XY
77	35					chemoterapie			46 XX
78	36								46 XX
79	35			x	NT				46 XY
80	39					thyreopatie			46 XY
81	32					MTHFR	x	triploidie	47 XX +21 mozaika

č.	Věk	Zátěž v rodokmenu	Biochemický screening	IVF	UZ markery	Choroby matky	Opak. sp. aborty	Problém v min.grav.	Karyotyp plodu
82	38								46 XX
83	32		hCG			thyreopatie			
84	35								46 XY
85	32				hydronefroza plodu				46 XY
86	37					trombofilní mutace Leden V.			46 XY
87	30		hCG						46 XX
88	36	Down. s.							46 XX
90	25				echogenicita střeva				46 XY
91	34					diabetes	x		46 XX
92	34			x		hyperprolaktinemie, hypertyreóza	x		46 XX
93	35				EIF v komorách srdce				46 XY
94	28	x	AFP						46 XY
95	35								46 XX
96	40					thyreopatie, autoimunitní			46 XY
97	29					astma	x	NTD	46 XY
98	29					diabetes, thyreopatie, autoimunitní	x		46 XX
99	36								46 XX
100	36		hCG						46 XX
101	27					chemoterapie			46 XX
102	40		x			pásový opar obličeje			46 XX
103	28		AFP		malá náplň žaludku				46 XY
104	31		x						46 XY
105	31					diabetes	x	kaudální regrese	46 XX
106	32		AFP			thyreopatie			46 XY
107	30					astma	x	mozika plodu	46 XX
108	36						x	Downův s.	
109	29	anosmia	AFP		EIF v komoře srdce				46 XX
110	34		x					Klinefelterův s.	46 XX
111	35		AFP						46 XX
112	34			x			x		46 XY
113	35					thyreopatie			46 XX
114	30	myopatie				astma			46 XY
115	27				NT				46 XY
116	34		hCG			autoimunitní			46 XY
117	20				chybí pupečnicková arterie				46 XX
118	29		AFP						46 XY
119	30					sideropenie, autoimunitní, MTHFR			46 XX
120	35								46 XY
121	29		AFP						46 XX
122	36						x		46 XY
123	33		x			thyreopatie			46 XY
124	36								46 XY

Tabulka 2

Č.č.	Věk pacientky	Indikace invazivního vyšetření							
		Věk	Rodokmen	BCH	IVF	UZ	Choroby matky	Opak. sp. aborty	Prob. v předch. grav.
1	32		x	x					
2	35	x							
3	32			x					
4	32					x			
5	30		x						
6	29			x			x		
7	41				x		x	x	
8	36		x	x		x			
9	34	x							
10	35	x					x		
11	30			x					
12	35	x							
13	30					x			
14	32					x			
15	27			x					
16	26					x			
17	39	x							
18	39	x							
19	33			x					
20	36	x							
21	29						x	x	
22	35	x	x	x			x		
23	38	x					x		
24	40	x							
25	39	x							
26	32			x					
27	35	x							
28	30						x		
29	32				x	x			
30	31						x	x	
31	38	x			x			x	
32	36	x	x						
33	37	x					x		
34	38	x			x		x		
35	35	x		x					
36	37	x						x	
37	45	x						x	
38	40	x						x	x
39	40	x		x			x		
40	26		x	x					
41	36	x						x	
42	35			x			x		
43	31								x
44	28					x			
45	34			x					
46	27			x		x			
47	40	x							

Č.č.	Věk pacientky	Indikace invazivního vyšetření								
		Věk	Rodokmen	BCH	IVF	UZ	Choroby matky	Opak. sp. aborty	Prob. v předch. grav.	
48	36	x				x				
49	24						x			
50	37	x								
51	29						x			
52	35	x						x		
53	26			x						
54	31			x						
55	34							x	x	
56	36	x	x					x	x	
57	39	x								
58	28					x				
59	40	x				x				
60	35	x								
61	25						x	x		
62	33							x	x	
63	35	x		x						
64	34			x						
65	26			x						
66	35			x						
67	42	x								
68	42	x								
69	35	x		x			x			
70	31		x	x						
71	25			x						
72	29						x			
73	39	x								
74	31							x		
75	37	x								
76	30			x						
77	35	x						x		
78	36	x								
79	35	x				x	x			
80	39	x						x		
81	32							x	x	x
82	38	x								
83	32			x				x		
84	35	x								
85	32							x		
86	37	x							x	
87	30			x						
88	36	x	x							
89	26			x						
90	25							x		
91	34								x	x
92	34						x		x	x
93	35	x						x		
94	28		x	x						

č. x	Věk pacientky	Indikace invazivního vyšetření							
		Věk	Rodokmen	BCH	IVF	UZ	Choroby matky	Opak. sp. aborty	Prob. v předch. grav.
95	35	x							
96	40	x					x		
97	29						x	x	x
98	29						x	x	
99	36	x							
100	36	x		x					
101	27						x		
102	40	x		x			x		
103	28			x		x			
104	31			x					
105	31						x	x	x
106	32			x			x		
107	30						x	x	x
108	36	x						x	x
109	29		x	x		x			
110	34			x					x
111	35	x		x					
112	34				x			x	
113	35	x					x		
114	30		x				x		
115	27					x			
116	34			x			x		
117	20			x		x			
118	29			x					
119	30						x		
120	35	x							
121	29			x					
122	36	x						x	
123	33			x			x		
124	36	x							

## 11. POUŽITÁ LITERATURA

1. Štembera, Z.: *Mimulost a současnost prenatalní péče v ČR, Moderní gynekologie a porodnictví, 2003; 1: 212- 217*
2. Simpson, J.L., Bischoff, F.: *Cell-Free Fetal DNA in Maternal Blood - Evolving Clinical Applications, JAMA. 2004; 291:1135-1137.*
3. Lo, Y. M. D., et al.: *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum, Lancet, 1997; 350:485-487*
4. Hájek, Z.: *Prenatální péče o fyziologické těhotenství, Moderní gynekologie a porodnictví, 2003; vol. 12, č. 2: 218-221*
5. Višková H., Calda P.: *Prenatální screening a diagnostika nejčastějších patologií plodu, Moderní gynekologie a porodnictví, 2003; vol. 12, č.2: 239-246*
6. Calda, P.: *Screening vrozených vad v graviditě, Moderní gynekologie a porodnictví, 1998; vol.7, č. 2: 7-16*
7. Thompson: *Klinická genetika, Triton 2004*
8. Hájek, Z.: *Prenatální péče o rizikové těhotenství, Moderní gynekologie a porodnictví, 2003; vol. 12, č. 2: 221-231*
9. Hájek, Z., Kulovaný, E., Macek, M.: *Základy prenatalní diagnostiky, Grada 2000*
10. Žižka, Z., Calda, P.: *Invazivní metody prenatalní diagnostiky: Amniocentéza, biopsie choria a punkce pupečníku, Moderní gynekologie a porodnictví, 1998; vol. 7, č.2: 21-36*
11. Harper, P.S.: *Practical genetic counselling, 1993. In: Hájek, Z., Kulovaný, E., Macek, M.: Základy prenatalní diagnostiky, Grada 2000*
12. Milunsky, A.: *The use of biochemical markers in maternal serum screening for chromosome defects. In: Hájek, Z., Kulovaný, E., Macek, M.: Základy prenatalní diagnostiky, Grada 2000*
13. Brock, D.J.H., Bolton A.E., Monaghan J.M.: *Prenatal Diagnosis od Anencephaly through Maternal Serum-Alphafetoprotein Measurement, The Lancet, 1973; 2: 923-926*
14. Chard, T., Lowings, C., Kitan, M.J.: *Alphafetoprotein and chorionic gonadotropin levels in relation to Down's syndrome, Lancet, 1984; 2: 750*
15. Brambati, et al.: *Fetal chromosomal aneuploidies and maternal serum alpha-fetoprotein levels in first trimester, Lancet, 1986; 2: 165-166*

16. Bogart, M.H., et al.: *Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities, 1987. In: Wald, N.J., et al.: Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy, The British Medical Journal, 1988; 297:883-887.*
17. Wald, N.J., et al.: *Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy, The British Medical Journal, 1988; 297:883-887*
18. Macek, M., et al.: *Využití PAPP-A proteinu a volné beta podjednotky hCG k biochemickému screeningu chromozomálně podmíněných vrozených vývojových vad v 9.-14. týdnu gravidity, Česko-slovenská pediatrie, 1999; 54:27-3019.*
19. Canick, J.A., et al.: *Low second trimester maternal serum unconjugated estriol in pregnancies with Down's syndrome, British journal of obstetrics and gynaecology, 1988; 95: 330- 333*
20. Cuckle, H.S., Lith, J.M.M.: *Appropriate biochemical parameters in first-trimester screening for Down's syndrome, Prenatal Diagnosis, 1999; 19: 505-512*
21. Cunniff, Ch.: *Prenatal Screening and Diagnosis for Pediatricians. Pediatrics 2004; 114: 889-894*
22. Brock, D.J.H., Sutcliffe, R.G.: *Alpha-fetoprotein in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida, 1972. In: Brock, D.J.H., Bolton A.E., Monaghan J.M.: Prenatal Diagnosis od Anencephaly through Maternal Serum-Alphafetoprotein Measurement, The Lancet, 1973; 2: 923-926*
23. Benacerraf, B.R., et al.: *A sonographic sign for the detection in the second trimester of the fetus with Down's syndrome, American journal of obstetrics and gynecology, 1985; 151: 1078-1079*
24. Smith, N.C., Smith, A.M.: *Ultrazvuk v porodnictví, Grada 2006*
25. Kulovaný, E., et al.: *Využití ultrazvukového měření nuchální translucence k časné prenatalní diagnostice chromozomálně podmíněných vrozených vývojových vad, Česko-slovenská pediatrie, 1998; 53:737-740*
26. Kunert, J.: *Zjednodušení diagnostiky dědičných chorob před narozením, Vesmír 76, 273, 1997/5*
27. Takabayashi, H., et al.: *Development of non-invasive fetal DNA diagnosis from maternal blood, Prenatal Diagnosis, 1995; 15:74- 77*
28. Alba, M.R., et al.: *Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical comparative evaluation of the first and second trimesters, Prenatal Diagnosis, 2001; 21: 165-170*
29. Bischoff, F., Z., et al.: *Intact fetal cells in maternal plasma: are they really there?, Lancet, 2003; 361: 139-140*

30. Poon, L.M., Lo, Y.M.D.: *Circulating fetal DNA in maternal plasma*, *Clinica Chimica Acta*, 2001; 313: 151-155
31. Hamada H., et al.: *Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age*, 1993. In: Simpson, J.L., Bischoff, F.: *Cell-Free Fetal DNA in Maternal Blood - Evolving Clinical Applications*, *JAMA*. 2004; 291:1135-1137
32. Simpson, J.L., Elias, S.: *Isolating fetal cells in maternal circulation for prenatal diagnosis*, *Prenatal diagnosis*, 1994; 14: 1229-1242
33. Adinolfi, M., et. al.: *Detection of fetal cells in transcervical samples and prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities*, *Prenatal Diagnosis*, 1995; 15: 943-949
34. Chou, M.M., Lin, S., Ho, E.: *Severe limb reduction defects after uterine lavage at 7-8 week's gestation*, *Prenatal Diagnosis*, 1997; 17: 77-80
35. Dhallan, R., et al.: *Methods to Increase the Percentage of Free Fetal DNA Recovered From the Maternal Circulation*, *JAMA*,. 2004; 291: 1114-1119
36. Benachi, A., Costa, J.-M.: *Non-invasive prenatal diagnosis of fetal aneuploidies*, *Lancet*, 2007; 369: 441-442
37. Nelson, M. et al.: *Genotyping fetal DNA by non-invasive means: extraction from maternal plasma*, *Vox Sanguinis*, 2001; 80: 112-116
38. Dhallan, R., et al.: *A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study*, *Lancet*, 2007; 369: 474-481
39. Ross, J.A., Jurkovic, D., Nicolaidis, K.: *Coelocentesis: A study od short-term safety*, *Prenatal Diagnosis*, 1997; 17: 913 -917
40. Crandall, B.F., Kulch, P., Tabsh,K.: *Risk assessment of amniocentesis between 11 and 15 weeks: comparison to later amniocentesis controls*, *Prenatal Diagnosis*, 1994; 14: 913- 919
41. Daniel, A., et al.: *A study of early amniocentesis for prenatal cytogenetic diagnosis*, *Prenatal Diagnosis*, 1998; 18: 21- 28
42. Nicolaidis,K., et al.: *Comparison of chorionic villus sampling and amniocentesis for fetal karyotyping at 10-13 weeks' gestation*, *The Lancet*, 1994; 344: 435- 439
43. Stripparo, L.: *Genetic amniocentesis 505 cases performed before the 16<sup>th</sup> week of gestation*, *Prenatal Diagnosis*, 1990; 10: 359-364
44. Tredwell, S.J.,. et al.: *Review of the Effect of Early Amniocentesis on Foot Deformity in the Neonate*, *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 2001; 21:636-641
45. Stark, C., et al.: *Need for Urgent Delivery After Third-Trimester Amniocentesis*. *Obstetrics and Gynecology* 2000; 95: 48- 50

46. Young, B.K.: *Report of third trimester amniocentesis at NY University Medical Center, New York, NY, 1979. In: Stark, C., et al.: Need for Urgent Delivery After Third-Trimester Amniocentesis. Obstetrics and Gynecology 2000; 95: 48- 50*

47. Wapner, R.J., et al.: *Chorionic mosaicism: Association with fetal loss but not with adverse perinatal outcome, Prenatal Diagnosis, 1992; 12: 347-355*

48. Cuckle, H.S., et al.: *Urinary multiple marker screening for Down's syndrome, 1995. In: Hájek, Z., Kulovaný, E., Macek, M.: Základy prenatální diagnostiky, Grada 2000*