

**Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



RNDr. Jaroslav Loucký

**Patobiochemie inhibinu A a jeho využití v prenatálním
screeningu vrozených vývojových vad**

**Pathobiochemistry of inhibin A and its application in prenatal
screening of chromosomal abnormalities**

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Richard Průša, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31. 1. 2019

JAROSLAV LOUCKÝ

Podpis:



Identifikační záznam:

Loucký, Jaroslav. *Patobiochemie inhibinu A a jeho využití v prenatálním screeningu VVV. [Pathobiochemistry of Inhibin A and its usage in prenatal screening of chromosomal abnormalities]*. Praha, 2019. 80 stran, 3 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2. LF a FN Motol. Vedoucí práce: Průša Richard.

Poděkování:

Děkuji především svému školiteli prof. MUDr. Richardu Průšovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady po dobu studia a při přípravě dizertační práce. Dále děkuji za cenné rady při statistickém zpracování dat paní Mgr. Silvii Běláškové, Ph.D. a za další odborné rady docentu Ing. Karlu Kotaškovi, Ph.D.

Dále děkuji prof. Siru Nicholasi Johnu Waldovi FRS FRCP FRCOG FMedSci FFPH a zesnulému prof. Jacobu Cannickovi za dlouholeté přátelství, množství poskytnutých informací a inspirativních myšlenek z oblasti prenatálního testování.

Moje poděkování patří také laborantkám imunoanalytické laboratoře Imalab s.r.o. za pomoc při stanovení hodnot inhibinu A, slečně Michaelé Kajšové, Ing. Haně Traxlerové a Mgr. Evě Mazáčové za administrativní výpomoc.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své manželce Evě za podporu a velkou dávku trpělivosti v průběhu celého studia a také svým skvělým rodičům.

Obsah

Seznam zkratk	7
1 Úvod.....	9
2 Literární přehled.....	10
2.1 Biochemie a patobiochemie inhibinu A.....	10
2.1.1 Vznik a funkce inhibinů.....	10
2.1.2 Struktura inhibinů	12
2.1.3 Účinek inhibinu A v těhotenství a jeho využití	13
2.1.4 Mechanismus působení inhibinů	14
2.2 Screening vrožených vývojových vad.....	17
2.2.1 Definice screeningu a základní požadavky na jeho provádění	17
2.2.1.1 Základní parametry screeningu	21
2.2.1.2 Vztah screeningu a diagnostické metody	23
2.2.1.3 Ultrazvukový screening	23
2.2.2 Biochemické markery ve screeningu vrožených vývojových vad.....	24
2.2.2.1 Úvod.....	24
2.2.2.2 Obecná charakteristika biochemických markerů.....	25
2.2.2.3 Total hCG a free β -hCG	25
2.2.2.4 PAPP-A	26
2.2.2.5 AFP (alfa-1 fetoprotein)	26
2.2.2.6 uE3 (nekonjugovaný estriol)	26
2.2.2.7 Inhibin A	27
2.2.2.8 Očekávané hodnoty biochemických markerů u trizomií 21, 18 a 13	27
2.2.3 Screening v 1. trimestru, kombinovaný test.....	31
2.2.3.1 Kombinovaný test.....	32
2.2.3.2 Kombinovaný kontingenční test.....	33
2.2.3.3 Kombinovaný test jako součást integrovaného testu – sekvenční integrovaný test.....	34
2.2.3.4 Biochemické markery v 1. trimestru jako součást sérového integrovaného testu	36
2.2.4 Screening ve 2. trimestru, integrovaný test, triple test, kvadruple test	36
2.2.5 Srovnání screeningových programů při 5 % FPR, s nastavením cutt-off a stanovením dalších podmínek	37
2.3 Neinvazivní prenatalní testování	39
2.3.1 Úvod	39
2.3.2 Genetická výbava plodu v krevním oběh matky.....	40

2.3.3	Extracelulární mateřská DNA.....	41
2.3.4	Základní principy využití NIPT a implementace v praxi.....	44
2.3.5	Souhrn.....	49
3	Hypotéza, Cíle práce	50
3.1	Hypotéza	50
3.2	Cíle práce	50
4	Soubory, materiál a metody	51
4.1	Vyšetřované soubory těhotných žen	51
4.2	Výpočet rizika přítomnosti Downova syndromu.....	51
4.3	Stanovení inhibinu A	52
4.4	Výpočet revidovaného rizika přítomnosti Downova syndromu.....	53
4.5	Statistické metody	54
4.6	Použitý materiál	54
4.7	Přístrojové vybavení a software k vyhodnocení rizika přítomnosti Downova syndromu.....	55
5	Výsledky.....	56
5.1	Srovnání skupin rizik u triple testu bez inhibinu A a s inhibinem A	57
5.2	Uspořádání hodnot rizik u triple testu ve skupině s inhibinem A	58
5.3	Srovnání skupin rizik u integrovaného testu bez inhibinu A a s inhibinem A	59
5.4	Uspořádání hodnot rizik u integrovaného testu ve skupině s inhibinem A	60
6	Diskuse	62
7	Závěr	67
8	Souhrn.....	68
9	Summary.....	69
10	Seznam citované literatury.....	70
11	Seznam obrázků a tabulek	76
12	Přílohy	78

SEZNAM ZKRATEK

ActR I	aktivinový receptor typu I
ActR II	aktivinový receptor typu II
AFP	alfa-1-fetoprotein
AMC	amniocentéza
AMH	anti-Mülleriánský hormon
ARSA	aberrantní pravá podklíčková arterie
cfDNA	volná extracelulární fetální DNA
Co-SMAD	SMAD interagující s R-SMAD při přenosu signálu
Cut-off	rozhodovací, diskriminační limit
CVS	biopsie choriových klků
DHEA sulfát	dehydroepiandrosteron sulfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTC	způsob poskytování genetických testů přímo spotřebiteli („direct-to-consumer“)
DV	ductus venosus
FMF	fronto-maxillo-faciálního úhel
FPRI	false positive rate integrated (označení části výsledků studie při provádění integrovaného testu)
FPRT	false positive risk triple (označení části výsledků studie při provádění triple testu)
free β -hCG	volná beta podjednotka lidského choriogonadotropinu
FSH	folikulo-stimulační hormon
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
GTPáza	Guanosintrifosfát fosfohydroláza
hCG	humánní choriogonadotropin
I-SMAD	SMAD proteiny inhibující ostatní SMAD proteiny
IGFBP-4	Insulin-like growth factor-binding protein 4
IQR	Inter kvartilové rozmezí
LMS	Logical Medical System (společnost, která vyvinula software pro hodnocení prenatalního screeningu)
MoM	násobek mediánu
NB	nosní kůstka

NIPT	neinvazivní prenatalní testování
NT	nuchální translucence
NTD	poruchy neurální trubice
P-value	číselná hodnota používaná při statistickém testování hypotéz
p120	inhibinový receptor, protein o molekulové hmotnosti 120 kDa
PAPP-A P	pregnancy-associated plasma protein-A
PIGF	placentární růstový faktor
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
R-SMAD	receptorem regulované SMAD proteiny
ROC křivky	Receiver Operating Characteristic - křivka pro hodnocení a optimalizaci binárního klasifikačního systému (testu), který ukazuje vztah mezi specificitou a senzitivitou daného testu nebo detektoru pro všechny přípustné hodnoty prahu
SCA	abnormalita pohlavních chromozomů
Ser	serin
Thr	threonin
T21, T18, T13	trisomie chromozomu 21, 18, 13
TGF-β	transformující růstový faktor beta
TGF-βR III	receptor typu III pro transformující růstový faktor beta (betaglykan)
TPRI	true positive risk integrated (označení části výsledků studie při provádění integrovaného testu)
TPRT	true positive risk - triple (označení části výsledků studie při provádění triple testu)
TR	trikuspidální regurgitace
TSH	tyreotropin
uE3	nekonjugovaný estriol
UZ	ultrazvuk (ultrasonografie)

1 ÚVOD

Inhibin A není v České republice standardně používán jako biochemický marker při provádění prenatalního screeningu Downova syndromu. Jedním z hlavních parametrů, který je v případě screeningových programů sledován, je pozitivní prediktivní hodnota. Tento parametr udává počet pravdivě pozitivních testů ke všem pozitivním testům. Je zřejmé, že pozitivita screeningu je ovlivněna distribucí rizik u jednotlivých screeningových programů. V naší studii jsme se zaměřili na dvě skupiny pozitivních výsledků screeningu, ve kterých byl využitelný inhibin A. V prvním případě se jednalo o triple test a ve druhém případě o integrovaný test.

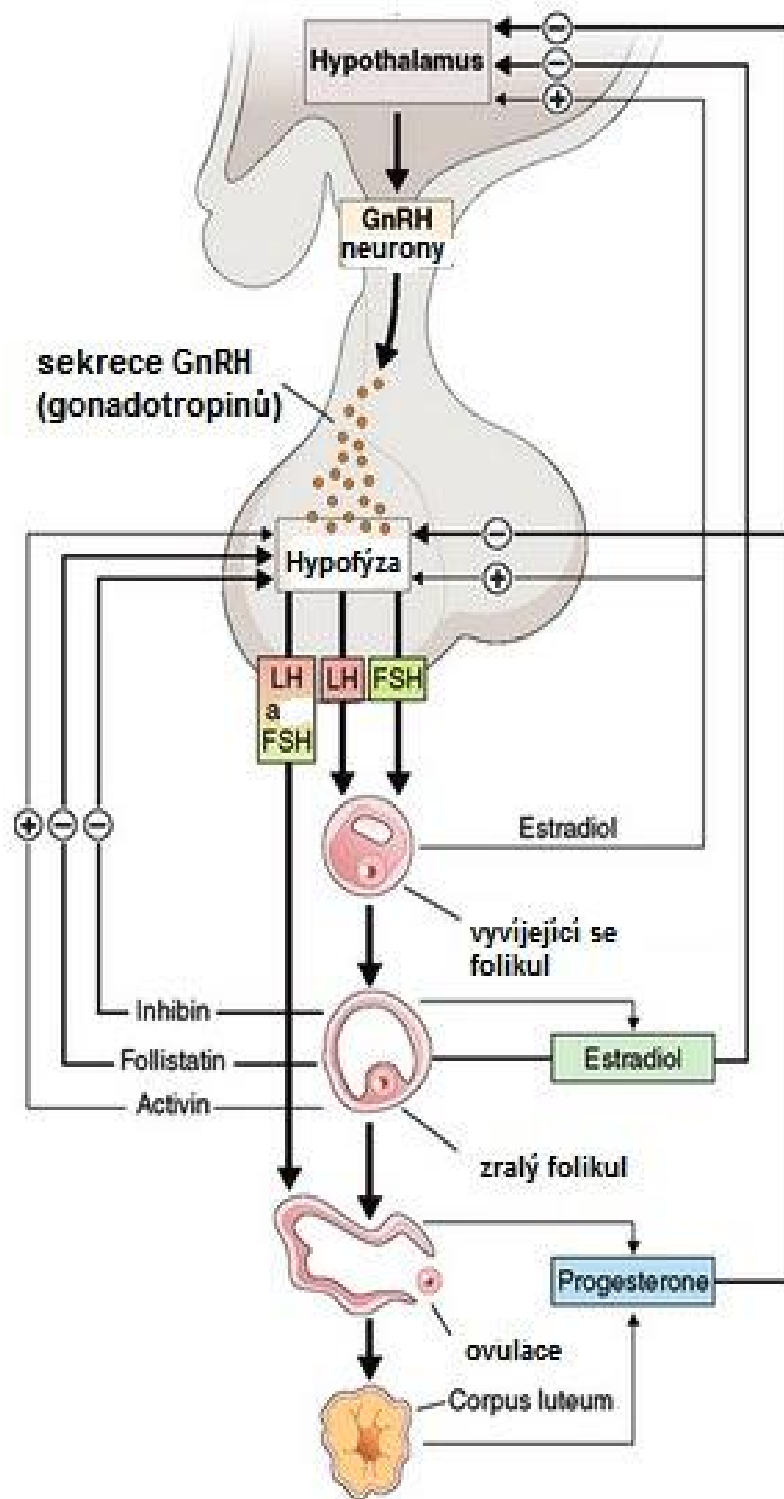
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Biochemie a patobiochemie inhibinu A

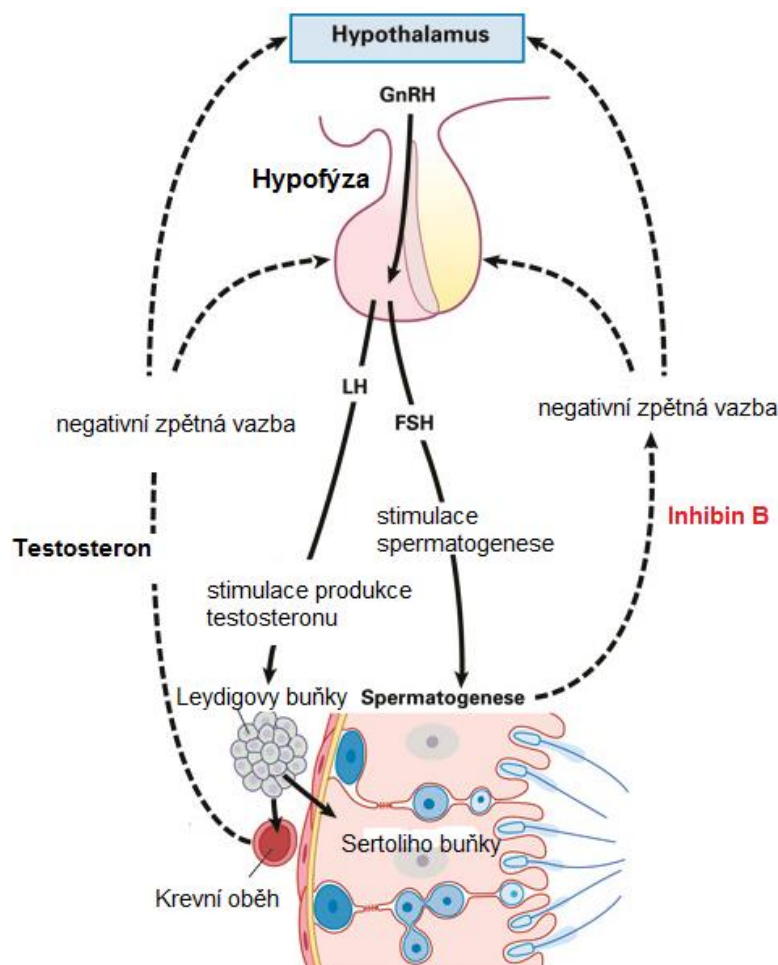
2.1.1 Vznik a funkce inhibinů

Inhibiny jsou glykoproteiny patřící do rodiny transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β) (Mason A. J. et al., 1985), která čítá více než 60 proteinů a zahrnuje dále také aktiviny, které jsou podobné strukturálně, liší se ale po stránce funkční. Do této rodiny látek patří např. také AMH (Anti-Mülleriánský hormon). Inhibin byl poprvé popsán v roce 1923 (McCullagh D. R., 1932) a je charakterizován jako pohlavní hormon, jehož významnou funkcí je regulace produkce folikulo-stimulačního hormonu (FSH) v buňkách adenohipofýzy (Setchell B. P., Jacks F., 1974; De Jong F. H., Sharpe R. M., 1976; Burger H. G., Igarashi M., 1988; Ledger W. L., Muttukrishna S., 2014). Inhibiny u žen vznikají v granulózových buňkách vaječníků, inhibin A je v průběhu těhotenství produkován také žlutým tělískem a placentou. Inhibiny mají důležitou roli v regulaci folikulogeneze a zrání oocyty. Zatímco inhibin B je produkován především malými antrálními folikuly, inhibin A je hormon zralých forem oocytů a těhotenství. Jeho působením dochází ke snížení produkce FSH. V současnosti je ovšem také zřejmé, že funkce inhibinu zahrnuje mnohem širší spektrum účinků, které se netýkají jenom reprodukčního systému. Jakožto jeden z hlavních reprodukčních hormonů je zapojen do parakrinní regulace folikulogeneze, steroidogeneze a ovlivňuje biochemické procesy i v dalších orgánech (Hsueh A. J. et al., 1987; Woodruff T. K. et al., 1990).

U mužů se inhibiny majoritně tvoří v Sertoliho buňkách varlat, v menší míře pak také v Leydigových buňkách. Jejich syntéza je stimulována působením androgenů, avšak primárně ji reguluje spermatogeneze. V krevním oběhu se vyskytuje pouze **inhibin B**, který negativní zpětnou vazbou tlumí tvorbu FSH v hypofýze.



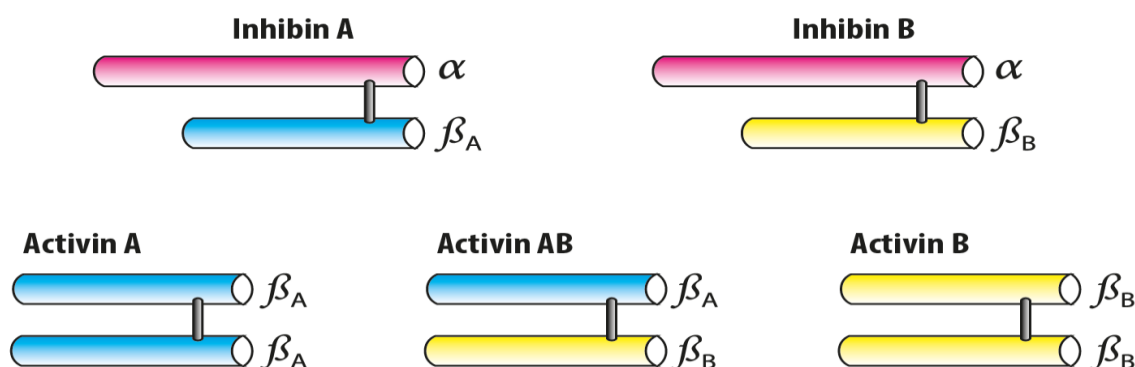
Obr. 1 Hypotalamo-hypofyzárně-gonadální osa ženy (převzato a upraveno z ref. (Gupta M. K., Chia S. Y., 2013))



Obr. 2 Hypotalamo-hypofyzárně-gonadální osa muže (převzato a upraveno z ref. (Kiserud C. E. et al., 2008))

2.1.2 Struktura inhibinů

Ze strukturálního hlediska jsou inhibiny tvořeny dimerickými glykoproteiny, které se vyskytují ve formě α podjednotky a podjednotek β_A a β_B . (obr. 3). Podjednotka α je společná pro obě molekuly inhibinů a specifická je dána přítomností podjednotky β_A nebo podjednotky β_B . Podjednotka α má molekulovou hmotnost zhruba 20kD a je připojena disulfidickou vazbou na jednu ze dvou možných podjednotek β (molekulová hmotnost 13 kDa). β podjednotka se vyskytuje ve dvou modifikacích – β_A a β_B . Inhibin se tedy vyskytuje ve 2 izoformách. Pokud se spojí do dimeru pouze podjednotky β , vznikne molekula aktivinu, která může existovat ve 3 izoformách.



Obr. 3 Podjednotkové složení inhibinů a aktivinů

Celkem bylo nalezeno nejméně 9 biologicky aktivních forem inhibinu (Good T. et al., 1995; Robertson D. M. et al., 1995; Robertson D. et al., 1996). Tyto formy se liší svou molekulovou hmotností, která je ovlivněna prodloužením řetězce aminokyselin na podjednotkách a tím pádem i větší glykosilací na C - terminálním konci alfa podjednotky (Miyamoto K. et al., 1985; Sugino K. et al., 1993).

Inhibin je kódován 3 geny, které jsou zodpovědné za produkci tří uvedených peptidů, peptidu α , peptidu β_A a β_B . Alfa podjednotka inhibinu je u lidí lokalizovaná na chromozomu 2 (2q33-q36) (Barton D. E. et al., 1989), podjednotky β_A a β_B jsou lokalizovány na chromozomech 7 (7p15-p13), resp. 2 (2cen-q13) (Mason A. J. et al., 1986). Pouze heterodimerní podjednotky $\alpha\beta_A$ a $\alpha\beta_B$, které jsou spojené kovalentně disulfidickým můstkem, tvoří aktivní formy inhibinů A a B. Obě formy inhibinu nejen potlačují sekreci FSH v hypofýze, ale také mají lokální modulární efekt na gonadální steroidogenezi (Ying S. Y., 1988; Baird D. T., Smith K. B., 1993; Wald N. J. et al., 1996). Zralé inhibiny jsou rychle odplaveny z cirkulace, jejich biologický poločas je zhruba 3-6 minut (inhibin A) (Woodruff T. K., Krummen L. A. et al., 1993a; Makanji Y. et al., 2009) a asi 3 minuty (inhibin B) (Makanji Y. et al., 2009). Při pokusu s radiočtěně značeným inhibinem A bylo zjištěno, že se akumuluje ve slezině, nadledvině, kostní dřeni a ováriu (Woodruff T. K., Krummen L. et al., 1993b).

2.1.3 Účinek inhibinu A v těhotenství a jeho využití

Zdrojem inhibinu A je v těhotenství žluté tělísko a později placenta. Inhibin (a také aktivin) fungují v lidské placentě parakrinně i autokrinně a lokálně ovlivňují tvorbu hormonů v placentě,

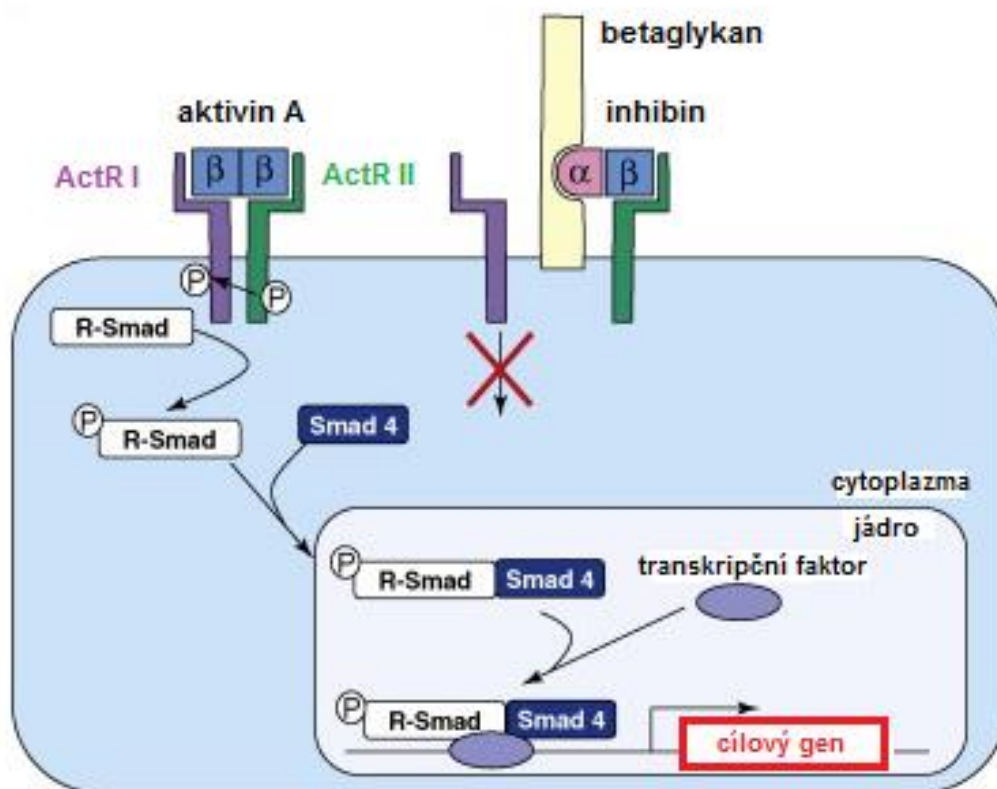
buněčnou imunitu, růst buněk a diferenciaci placenty a embrya. Inhibin A navíc vstupuje do mateřské cirkulace a může mít endokrinní efekt během těhotenství. Sérové změny těchto proteinů reflektují změny v placentální syntéze a sekreci (Ledger W. L., Muttukrishna S., 2014). Právě během těhotenství je jedním z hlavních cirkulujících proteinů inhibin A (Muttukrishna S. et al., 1995; Fowler P. et al., 1998). Jeho sérová hladina klesá zhruba od 8. do 16. týdne gestace. Hladina zůstává nižší během druhého trimestru, poté se ale zvyšuje až pětinašobně během třetího trimestru a dosahuje maxima ve 36 týdnu gestace (Ledger W. L., Muttukrishna S., 2014). Většina inhibinu detekovatelného v séru je pravděpodobně placentárního původu (McLachlan R. I. et al., 1987; Muttukrishna S. et al., 1995). Funkce inhibinu A během těhotenství není zatím objasněna, pravděpodobně má ale autokrinní i parakrinní vliv na úrovni placenty a corpus luteum (Petraglia F. et al., 1987). Placentální cytotrofoblast a syncytiotrofoblast secernuje inhibin A, který inhibuje placentální sekreci hCG a progesteronu. Biochemické látky, které jsou v průběhu těhotenství produkovány placentou, jsou v některých případech využívány jako markery Downova syndromu při provádění screeningu tohoto genetického onemocnění. Bylo zjištěno, že zvýšení hladiny inhibinu A je s určitou pravděpodobností asociováno s přítomností Downova syndromu a je možné jej využít v kombinaci s dalšími biochemickými látkami produkovány fetoplacentární jednotkou (Wald N. J. et al., 1996).

2.1.4 Mechanismus působení inhibinů

Inhibiny i aktiviny jsou členy rodiny TGF- β a mají také společný vazebný membránový protein **ActR II** (Stenvers K. L., Findlay J. K., 2010), (aktivinový receptor typu II), který má vysokou afinitu pro aktivin A a B, s menší afinitou váže také inhibin, který působí jako antagonist aktivinu (jeho navázání blokuje vznik receptorového komplexu). Aktivinové receptory jsou dimery Ser/Thr kinázových podjednotek. Aktivinový receptor typu I - **ActR I** váže pouze aktivin, po jehož navázání dochází k připojení **ActR II** za vzniku membránového komplexu a k transfosforylaci podjednotek **ActR I**. Takto aktivovaný receptorový komplex spouští fosforylační kaskádu zahrnující cytoplasmatické SMAD proteiny, které slouží jako přenašeče extracelulárních signálů ligandů z rodiny TGF- β do jádra, kde ovlivňují transkripci příslušných genů. SMAD proteiny dělíme do několika tříd:

- **R-SMAD**: receptorem regulované SMAD proteiny (SMAD 1, 2, 3, 5, 8/9)
- **Co-SMAD**: interagují s R-SMAD při přenosu signálu (pouze SMAD 4)
- **I-SMAD**: inhibují ostatní SMAD proteiny (SMAD 6, 7)

Inhibin se rovněž váže na receptor **p120** (inhibinový receptor, protein o molekulové hmotnosti 120 kDa), který je specifický pro inhibin B a vyskytuje se v hypofýze a v Leydigových i Sertolliho buňkách. Dále se inhibin váže na **TGF- β R III** (receptor typu III pro transformující růstový faktor beta), jiným názvem **betaglykan**, který působí jako ko-receptor inhibinu a zvyšuje jeho afinitu k vazbě na ActRII. Tím inhibuje stimulační efekt aktivinu cestou tohoto receptoru.



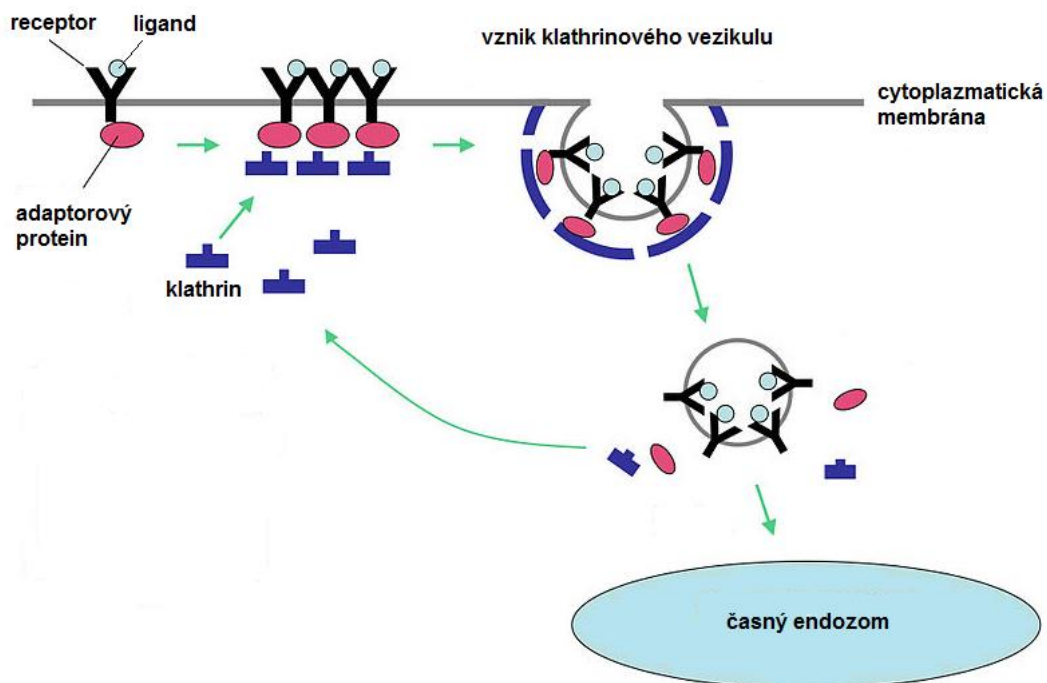
Obr. 4 Mechanismus působení aktivinů a inhibinů přes membránový receptor (převzato a upraveno z ref. (Stenvers K. L., Findlay J. K., 2010))

Degradace inhibinů probíhá, podobně jako u jiných peptidových hormonů, za pomoci receptory zprostředkované endocytózy (Doherty G. J., McMahon H. T., 2009). V místě vzniku komplexu inhibin-receptor dochází k postupnému vchlípení plazmatické membrány (invaginaci) a vzniku váčku (endozomu), který se následně spojí s lysozomem obsahujícím proteolytické enzymy. Vzniklé fragmenty jsou dále chemicky modifikovány jaterními enzymy a malé peptidy jsou vyloučeny močí. Tímto mechanismem dochází vlastně k modulaci účinku inhibinu, neboť se snižuje koncentrace hormonu v krvi i počet receptorů v cílových buňkách. Na vzniku endozomu se podílí protein klathrin, který vytváří polymerní prostorové struktury v místě invaginace a přes

tzv. adaptorové proteiny interaguje cytoplazmatickými doménami receptorů. Díky GTPáze dynaminu dochází pak k odštěpení vezikulu od cytoplazmatické membrány. Klathrinový plášť je poté uvolněn za pomoci auxilinu nebo heat shock cognate proteinu 70 a vezikul fúzuje s časným endozomem.

Existují také mechanismy endocytózy nezávislé na klathrinu, např. kaveolární endocytóza při níž vznikají tzv. kaveoly (vchlípeniny plasmatické membrány) obsahující proteiny kaveoliny, které v membráně asociují s cholesterolem a se sfingolipidy. I v této dráze hraje důležitou roli při odštěpení vezikulu GTPáza dynamin, vzniklé váčky mohou splývat s tzv. kaveozomy (speciální endozomy bohaté na kaveoliny), ale také s klasickými časnými endozomy.

Z časného endozomu jsou pohlcené látky tříděny do různých lokalit. Vezikuly jsou recyklovány zpět na plazmatickou membránu a ostatní náklad může být transportován do lysozomu. Důležitým krokem na cestě mezi časným endozomem a lysozomem je tvorba multivezikulárních tělísek, do nichž jsou transportovány především receptory značené ubiquitinem, které jsou určeny k degradaci. V případě, že má dojít k recyklaci receptorů, slouží endocytóza k dočasnému snížení počtu receptorů na plazmatické membráně. Endocytóza také může vést k odstranění ligandů z povrchu buňky (ligand je degradován, receptor je recyklován).



Obr. 5 Mechanismus receptorem zprostředkované endocytózy za účasti klathrinu (převzato z ref. (Barth D. G., Miyuki S., 2006))

2.2 Screening vrožených vývojových vad

2.2.1 Definice screeningu a základní požadavky na jeho provádění

Pojem screening je poměrně hojně využíván nejen v oblasti medicíny. Obecně se dá konstatovat, že existuje několik způsobů hromadného testování populace, které zahrnují pozorování, monitorování a screening (Leck I., Wald N. J., 2000). V případě pozorování se jedná o sledování určité skupiny tak, aby bylo zjištěno, s jakou frekvencí se určitý jev v této skupině vyskytuje. Tento způsob hromadného testování populace je v medicínských oborech využíván např. pro stanovení výskytu určitého onemocnění v dané skupině – stanovení prevalence onemocnění. Smyslem pozorování může tedy být například získání informací o výskytu nemoci v populaci bez dalších kroků směřovaných ke konkrétnímu jednotlivci. Do určité míry podobný charakter má monitorování, s tím rozdílem, že v případě potřeby je ten, kdo monitorování provádí, připraven nějakým způsobem na zjištěné skutečnosti reagovat. Oba tyto typy hromadného testování spojuje to, že získané výsledky jsou prospěšné nikoliv pro konkrétního jednotlivce, nýbrž pro sledovanou populaci nebo skupinu. Oproti těmto dvěma typům hromadného testování stojí screening. Základním smyslem screeningu v oblasti medicíny je identifikace konkrétních jednotlivců, kteří mají vyšší nebo vysoké riziko možnosti výskytu hledaného onemocnění.

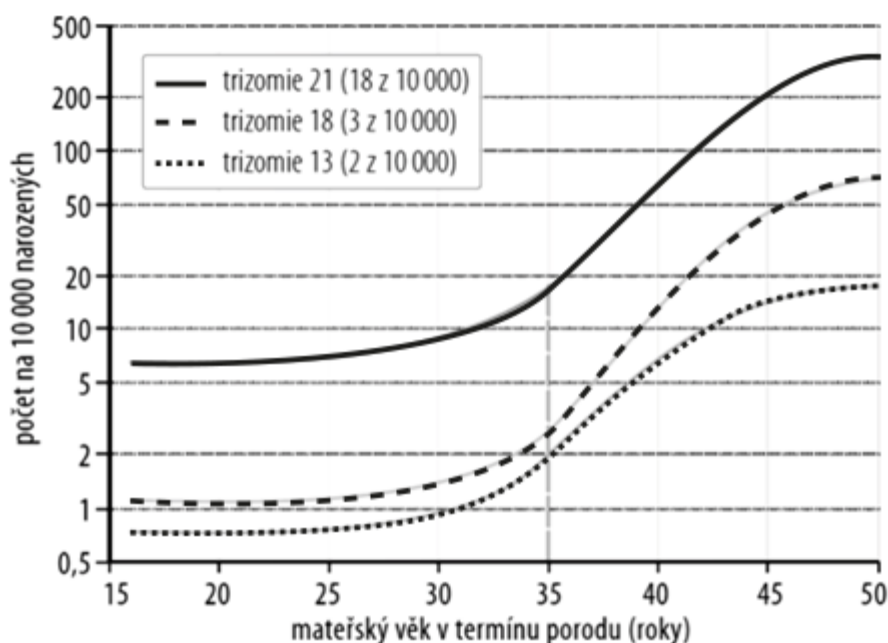
Základní charakteristiky racionálního provádění screeningu jsou následující:

- Je to proces, který slouží k vyhledání osob s vyšším rizikem výskytu určitého onemocnění s předpokladem dalších preventivních nebo diagnostických úkonů, které s tímto onemocněním souvisejí.
- Většinou tento proces diagnostickým nebo preventivním úkonům předchází. Jedná se o systematicky prováděná vyšetření, která jsou zpravidla iniciována nějakou autoritou a provádějí se u určité skupiny pacientů (např. těhotných žen), aniž by předem existovalo důvodné podezření, že pacient hledaným onemocněním trpí.
- Smyslem procesu je získání potřebné informace z pohledu konkrétního pacienta tak, aby pro něj z tohoto vyšetření vyplýval užitek.

Na základě těchto předpokladů byl medicínský screening v roce 1994 definován N. J. Waldem jako systematická aplikace testu či vyšetření, kterým se identifikují jedinci s určitým rizikem pro výskyt nějaké vady nebo onemocnění. Smyslem screeningu je, aby nebyly prováděny další vyšetření nebo přímé diagnostické testy u osob, u nichž k tomu z hlediska výskytu těchto vad neexistují žádné medicínské důvody.“

Tuto obecnou definici je možno dále v detailech zpřesnit pomocí několika požadavků, které by měly být splněny, aby mohla být prováděná aktivita považována za správně a plnohodnotně prováděný screening. Mělo by platit, že screeningový postup by měl na jedné straně přinášet maximální benefit z pohledu jednotlivce, ale na druhé straně by měl být ekonomický a nezatěžovat zbytečně zdravotní systém.

- Hledané (screenované) onemocnění nebo porucha by měly být jasně definované a konkrétně medicínsky popsáné. Toto platí v případě screeningu Downova syndromu, Edwardsova syndromu, Patauova syndromu a také v případě defektů neurální trubice. Prevalence (výskyt v populaci) musí být známá. Tento požadavek splňuje jak znalost četnosti výskytu Downova syndromu v populaci, tak znalost četnosti výskytu Edwardsova a Patauova syndromu, ev. defektů neurální trubice (obr. 6).



Obr. 6 Prevalence trizomie 21, trizomie 18 a trizomie 13 (Savva G. M. et al., 2010)

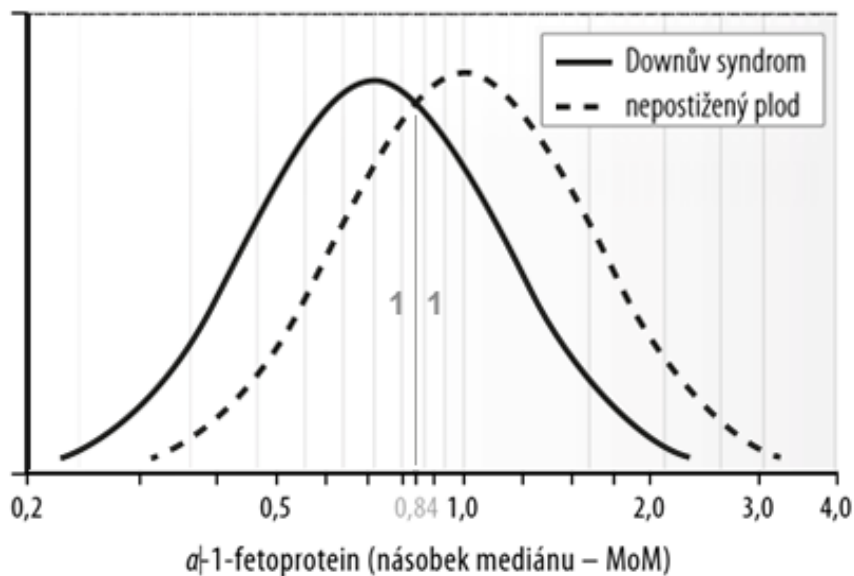
- Mělo by se jednat o medicínsky závažné onemocnění, pro které existuje efektivní způsob léčby nebo jiná možnost medicínskému zásahu. V případě screeningu výše uvedených syndromů taková možnost existuje. Po provedení screeningu je možno vysoce rizikovým jednotlivcům, v tomto případě těhotným ženám, nabídnout některou z metod invazivní diagnostiky a následně testování odebraného materiálu v genetické laboratoři.
- Jednotlivci ze sledované skupiny by měli mít rovnocenný přístup ke screeningu. Toto pravidlo platí za předpokladu, že je screeningový program pro určitý účel oficiálně vyhlášen

zodpovědnou autoritou a jsou jasně definovány všechny ekonomické vztahy mezi poskytovateli a plátcí zdravotní péče.

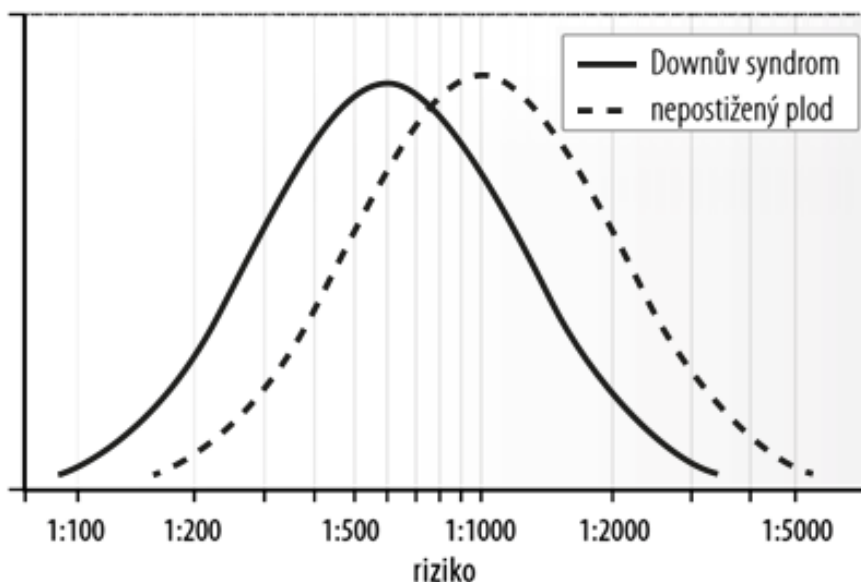
- Screening by měl být ekonomický, tzn., že vynaložené náklady související s prováděním screeningu by měly být posouzeny v kontextu vlastních nákladů souvisejících přímo s prováděním screeningu (cena biochemického a ultrazvukového vyšetřování, vyhodnocení výsledků, konzultace s těhotnými atd.). Ekonomická efektivita by měla být posouzena také v širším kontextu a měla by zahrnovat náklady na vyšetření a úkony, které po provedení screeningu následují. V celospolečenském kontextu by souhrnná efektivita screeningového programu měla uvažovat i s ekonomickými dopady péče o postižené jedince.
- Vybavení, které k provádění screeningových vyšetření slouží, by mělo být dostatečně dostupné. V praxi to většinou znamená nalezení rozumného kompromisu v počtu screeningových center tak, aby na jedné straně byl screening prováděn ekonomicky a na druhé straně byl regionálně dostupný. Jinými slovy, vybavení, které se pro provádění screeningových vyšetření využívá, by nemělo být tak komplikované a nákladné, aby jej nešlo instalovat na více pracovištích. Tento předpoklad zřejmě ale nemusí zcela platit v případě neinvazivního testování (NIPT).
- Přijatelnost – v případě pozitivního výsledku musí existovat další postup, který je obecně akceptovatelný jak z pohledu provádějících screening, tak z pohledu pacientů. Na základě výsledku získaného pomocí diagnostických metod je možné navrhnout další postup – pokračování v těhotenství, ukončení těhotenství, případně zvážení terapeutického postupu. Každý z kroků tohoto procesu může být uskutečněn až po souhlasu nastávajících rodičů.
- Screeningový test musí být jednoduchý a bezpečný, což současné screeningové protokoly založené na provádění biochemických testů a měření ultrazvukových parametrů splňují. Bezpečnost z pohledu těhotných žen splňuje také neinvazivní testování (NIPT). Složitější je však otázka jednoduchosti. Neinvazivní testování je technologicky a vědecky založeno na tzv. sekvenování mimobuněčné DNA. Tento typ testování, na rozdíl od běžných biochemických vyšetření, nelze v běžných medicínských laboratořích provádět. Důvodem je ekonomická, technologická a personální náročnost.

Aby mohl být konkrétní test považovat za screeningový, musí být spolehlivě známa distribuce měřených hodnot u postižených a nepostižených jedinců (obr. 7). Musí zároveň platit, že překryv těchto hodnot u zdravé a postižené populace musí být dostatečně nízký. Při provádění screeningu musí být stanoveno, která skupina je považována za nízkorizikovou a která za vysoce

rizikovou (obr. 8). Oddělení těchto dvou skupin se provádí nastavením vhodného rozhodovacího limitu (hranice, která rozděluje výsledky na pozitivní a negativní) (Leck I., Wald N. J., 2000) .



Obr. 7 Příklad rozdělení hodnot biochemického markeru AFP v souboru těhotných se zdravým a postiženým plodem



Obr. 8 Příklad rozdělení hodnot biochemického markeru AFP v souboru těhotných se zdravým a postiženým plodem s přiřazeným vyjádřením rizika

2.2.1.1 Základní parametry screeningu

Pro popis efektivity screeningových programů se používá několik základních parametrů: senzitivita, falešná pozitivita, specificita, pozitivní prediktivní hodnota. Jednoduchý matematický popis těchto parametrů lze odvodit z rozdělení výsledků získaných při provádění screeningu. Získané výsledky jsou pozitivní nebo negativní. Pozitivní výsledky mohou být: správně pozitivní **a** (hledané onemocnění je přítomno a je screeningem správně označeno jako pozitivní) nebo nesprávně pozitivní **b** (hledané onemocnění není přítomno, ale výsledek screeningového vyšetření je pozitivní). Negativní výsledky mohou být: nesprávně negativní **c** (hledané onemocnění je přítomno, ale výsledek screeningového vyšetření je negativní) nebo správně negativní **d** (hledané onemocnění není přítomno a výsledek screeningového vyšetření je negativní).

Tyto výsledky lze tedy matematicky velmi jednoduše kombinovat a získat představu o základních screeningových parametrech (tab. 1).

Tab. 1 Matematické vyjádření senzitivity a falešné pozitivity při provádění screeningových testů (Polák P. et al., 2017)

	postižení jedinci	nepostižení jedinci
pozitivní test	a	b
negativní test	c	d
	a + c	b + d
senzitivita = $a / (a + c)$		
falešná pozitivita (1 – specificita) = $b / (b + d)$		

Senzitivita screeningu popisuje, s jakou procentuální pravděpodobností použitý screeningový protokol dané onemocnění správně zachytí.

$$\frac{a}{a + c} \times 100 = \text{senzitivita}$$

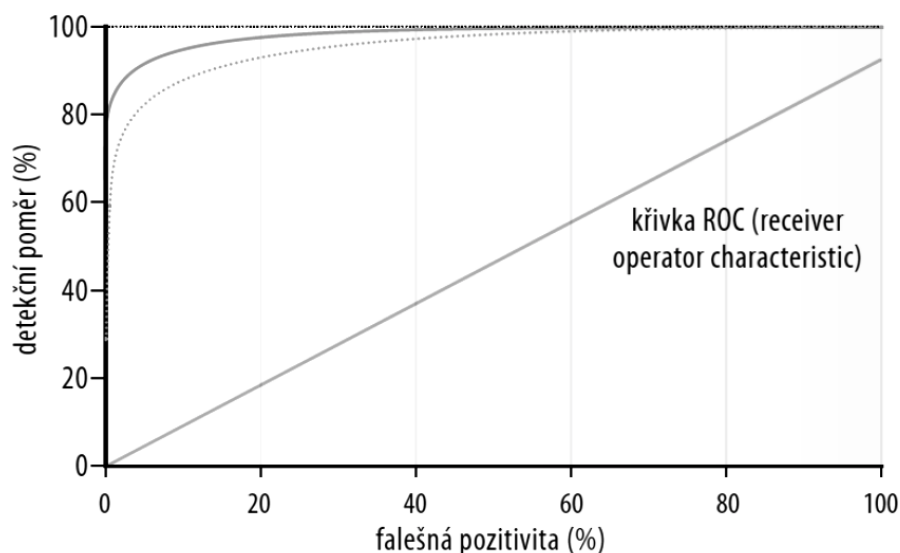
Falešná pozitivita popisuje, s jakou procentuální pravděpodobností může být výsledek screeningu pozitivní, při čemž hledané onemocnění ve skutečnosti není přítomno.

$$\frac{b}{b + d} \times 100 = \text{falešná pozitivita} = (1 - \text{specificita})$$

Specificita popisuje, s jakou procentuální pravděpodobností screeningový test správně označí výsledek jako negativní v případě, že hledané onemocnění není přítomno. V praxi se tento parametr v oblasti prenatalního screeningu prakticky nevyužívá.

Pozitivní prediktivní hodnota (Positive predictive value) vyjadřuje procentuálně počet správně pozitivních výsledků (hledané onemocnění je přítomno) ze všech pozitivních výsledků, tedy i z těch, kdy výsledek je pozitivní, ale hledané onemocnění ve skutečnosti není přítomno. Někdy tento parametr může být zejména v anglické odborné literatuře vyjádřen pomocí termínu Odds of being affected given a positive result (OAPR) a vyjadřuje se jako poměr správně a nesprávně pozitivních výsledků (Wald N. J., Cuckle H. S., 1984).

Při hodnocení těchto parametrů a jejich vzájemných vztahů platí, že senzitivita a falešná pozitivita nejsou závislé na prevalenci screenovaného onemocnění. Naopak, pozitivní prediktivní hodnota je na prevalenci onemocnění závislá. Optimální screeningový test by měl mít co možná nejvyšší senzitivitu a co možná nejnižší falešnou pozitivitu. Z praktického pohledu tedy jde o to, aby co možná nejvíce žen s postiženým těhotenstvím z pohledu hledaného onemocnění bylo screeningem odhaleno a naopak, co možná nejméně žen, jejichž těhotenství je v pořádku, bylo screeningem označeno jako pozitivní. Vztah mezi senzitivitou a falešnou pozitivitou lze na základě výsledků velkých studií vyjádřit pomocí ROC křivek, ze kterých vyplývají také určitá omezení použití různých typů screeningových programů (obr. 9). Nalezení optimálního screeningového modelu má jednak velký význam medicínský, kdy je snahou minimalizovat rizika spojená s prováděním např. invazivních diagnostických postupů, tak i ekonomický.



Obr. 9 Vztah mezi senzitivitou a falešnou pozitivitou u screeningových testů (ROC křivka)

2.2.1.2 Vztah screeningu a diagnostické metody

Velmi stručně řečeno – diagnostický test poskytuje definitivní odpověď, kdežto screeningový test pouze stanoví riziko. Vztah mezi screeninem a diagnostickou metodou je dán charakterem získaného výsledku. Screeningový test pouze stanoví riziko přítomnosti hledaného onemocnění, kdežto diagnostický test poskytuje definitivní odpověď, zda jsou onemocnění nebo hledaná vada přítomny či nikoliv. Zpravidla platí, že screeningový test by měl být nabídnut a proveden u všech jednotlivců, kteří patří do screenované skupiny (např. těhotné ženy), ale diagnostický test by měl být proveden pouze u těch, kteří mají na základě výsledků screeningu zvýšené riziko. Jiným způsobem lze vyjádřit rozdíl mezi screeningovou a diagnostickou metodou např. tím, že na základě výsledku screeningu se v praxi neprovádí žádné definitivní diagnostické nebo terapeutické rozhodnutí, ale toto je možno provést až na základě výsledku diagnostické metody.

2.2.1.3 Ultrazukový screening

Vedle biochemických vyšetření je velmi důležitou součástí screeningu vrozených vývojových vad také vyšetření pomocí ultrazvuku. První zmínky o možnosti ultrazukového vyšetření nitroděložního obsahu se objevily v 60. letech 20. století. V 70. letech se ultrazuková vyšetření stávala postupně součástí porodnické praxe. S tím, jak se rychle zvyšovala úroveň ultrazukových přístrojů a zlepšovala se jejich rozlišovací schopnost, vzrůstal také význam ultrazvuku v prenatalní péči. Díky tzv. „real time“ zobrazení bylo možno začít posuzovat některé anatomické detaily, a to jak v embryonálním, tak i ve fetálním období. Na přelomu 80. a 90. let 20. století se objevily definice ultrazukových markerů pro screening Downova syndromu, poruch neurální trubice (NTD), ale také dalších morfologických abnormalit. S dalším zvyšováním kvality ultrazukových přístrojů vzrůstal význam dopplerovských průtokových markerů, trojrozměrného zobrazení, ev. multiplanární analýzy. Nejvyšší citlivost pro detekci Downova syndromu mají UZ markery, které lze vyšetřovat v prvním trimestru těhotenství. Při vyhodnocení výsledků kombinovaného testu lze statisticky s výsledkem měření nuchální translucence (NT) pracovat obdobně jako s výsledky biochemických vyšetření. Senzitivita ultrazukových vyšetření je na jedné straně velmi vysoká, ale na straně druhé je velmi závislá na erudici provádějícího pracovníka. Ve velkých studiích (Malone F. D. et al., 2005), (Wald N. J. et al., 2004) bylo např. zjištěno, že nuchální translucence má jako screeningový marker pro Downův syndrom sensitivitu vyšší než 70 %, ale to samozřejmě platí za dodržení metodických pravidel pro správné měření tohoto UZ parametru (FMF – Fetal Medicine Foundation).

2.2.2 Biochemické markery ve screeningu vrozených vývojových vad

2.2.2.1 Úvod

V průběhu těhotenství dochází v organismu ženy k mnoha změnám. Tyto změny se týkají také produkce biochemických látek, které mohou být monitorovány prostřednictvím různě zaměřených testů. V některých případech může být smyslem sledování zdravotního stavu nastávající matky, v jiných případech může být biochemické testování využito pro zjištění informací souvisejících s plodem. Právě pro účely screeningu nejfrekventovanějších chromozomálních vad plodu se provádějí u těhotných žen biochemické testy, které zahrnují testování jak v prvním, tak ve druhém trimestru těhotenství. Je nutno zmínit, že ačkoliv je účelem biochemických testů odhalovat konkrétní genetická onemocnění, tak samotné biochemické testy mají charakter surogátních markerů, které souvisejí s fenotypem plodu, ale žádná z těchto biochemických látek není přímo asociovaná s konkrétními chromozomy, jejichž numerické změny jsou zodpovědné za screenovaná onemocnění.

Z historického hlediska bylo ovšem první využití biochemických markerů spojováno se sledováním rizika výskytu otevřených defektů neurální trubice. Pro tyto účely se využívalo a dodnes využívá stanovení alfa-1-fetoproteinu (AFP). Rutinně se vypočet rizika přítomnosti trizomie 21 na základě hladiny AFP a věku matky začal používat v roce 1987. V roce 1988 byl do praxe uveden triple test, tedy screeningový program založený pouze na stanovení biochemických parametrů ve druhém trimestru těhotenství. Triple test vyhodnocoval riziko Downova syndromu u plodu na základě kombinace hladin tří biochemických markerů – AFP, humánního choriogonadotropinu (hCG), nekonjugovaného estriolu (uE3) – a věku matky. Čtvrtým biochemickým parametrem, který se začal ve screeningu Downova syndromu používat ve druhé polovině devadesátých let, byl inhibin A. Stanovení čtyř uvedených biochemických látek je označováno jako kvadruple test. V devadesátých letech bylo zjištěno, že těhotenství s Downovým syndromem oproti normálním těhotenstvím vykazují zvýšené hladiny free β -hCG a naopak snížené hladiny PAPP-A v prvním trimestru.

Ve stejné době bylo prokázáno, že u plodů s trizomií 21. chromozomu dochází k výraznější koncentraci tekutiny v oblasti šíje. Tento parametr byl označen jako nuchální translucence (NT). Stanovení NT bylo spolu s PAPP-A, free β -hCG a věkem matky začleněno do tzv. kombinovaného testu.

Koncem devadesátých let bylo poprvé stanovení rizika provedeno na základě parametrů měřených jak v prvním, tak ve druhém trimestru těhotenství. Tento způsob vyhodnocení rizika je označován jako integrovaný test.

2.2.2.2 Obecná charakteristika biochemických markerů

Biochemické látky, které jsou využívány ve screeningu vrozených vývojových vad, jsou produkovány fetoplacentární jednotkou (Polák P. et al., 2017). Bylo zjištěno, že u těhotenství nesoucích plod s Downovým syndromem nebo s některou z dalších chromozomálních aberací, jsou jejich hodnoty odlišné od těhotenství se zdravým plodem. V běžné praxi se využívá šest biochemických látek (AFP, hCG, free b-hCG, PAPP-A, uE3 a inhibin A), které mají různou senzitivitu pro záchyt Downova syndromu. S výjimkou nekonjugovaného estriolu patří využívané biochemické látky mezi glykoproteiny, které jsou charakterizované vyšší rozpustností než běžné proteiny a mají delší poločas přetrvávání ve vaskulárním systému. Nekonjugovaný estriol (uE3) je steroidním hormonem a zároveň je látkou s nejmenší molekulou ze všech screeningových biochemických markerů. Stanovení se provádí pomocí imunoanalytických metod. Menší molekuly se stanovují zpravidla pomocí kompetitivní imunoanalýzy s jedním vazebným antigenním místem. Větší molekuly se stanovují imunometrickými metodami se dvěma vazebnými antigenními místy. Z pohledu detekce se zpravidla jedná o chemiluminiscenční, fluorescenční, případně radioizotopové metody.

2.2.2.3 Total hCG a free β -hCG

Lidský choriogonadotropin (hCG) patří mezi glykoproteiny. Syntéza hCG probíhá v syncytiotrofoblastu placenty. Molekula hCG je tvořena dvěma nekovalentně vázanými podjednotkami α a β , s celkovou molekulovou hmotností kolem 38 kDa. Biologickou specificitu určuje β podjednotka, α podjednotka je analogická s α podjednotkou lidského lutropinu (LH), follitropinu (FSH) a tyreotropinu (TSH). V tělních tekutinách se nachází jak ve formě intaktní molekuly, tak ve formě volných podjednotek. Degradanční produkty hCG se nacházejí také v moči, jako např. tzv. β -core fragment. hCG je zodpovědný za stimulaci funkce žlutého tělíska. U těhotenství s Downovým syndromem se nacházejí vyšší hladiny hCG než u těhotenství s normálním plodem, a to jak v prvním, tak i ve druhém trimestru těhotenství. U trizomie 18. a 13. chromozomu nacházíme naopak hladiny nižší. U těhotenství, která vznikla technikami asistované reprodukce, jsou hladiny hCG mírně zvýšené. Stanovení koncentrace free β -hCG v krvi se uplatňuje především při včasné diagnostice trizomie 21 během 1. trimestru gravidity.

2.2.2.4 PAPP-A

PAPP-A (Pregnancy-Associated Plasma Protein-A) je látkou, která vzniká v průběhu těhotenství v placentě. Strukturálně je jeho molekula sestavena ze čtyř podjednotek. Dvě podjednotky jsou větší a dvě jsou můstkové. Protein PAPP-A je metaloproteináza štěpící IGFBP-4. Jeho funkce v těhotenství není zcela prokázána, ale předpokládá se, že by se mohl účastnit regulace fetoplacentárního růstu. U těhotenství s chromozomálními aberacemi jsou jeho hladiny v 1. trimestru nižší a velmi nízké hladiny mohou také předpovídat blížící se odumření plodu. Podobně jako u hCG také hladiny PAPP-A jsou ovlivněny technikami asistované reprodukce. V případě PAPP-A ovšem záleží přímo na postupu, jakým těhotenství vzniklo. U in vitro fertilizace nebo ovulační indukce jsou hodnoty nižší, naopak u intrauterinní inseminace jsou hodnoty PAPP-A zpravidla vyšší. Jeho funkce mimo těhotenství je spojena s proliferativními procesy při hojení nebo kostní remodelaci.

2.2.2.5 AFP (alfa-1 fetoprotein)

AFP je významný sérový onkofetální protein, který je v těhotenství produkován žloutkovým váčkem a fetálními játry. Strukturálně a funkčně je podobný albuminu. AFP je marker, který je – společně s UZ vyšetřením – využíván nejen pro screening chromozomálních aberací, ale také pro detekci otevřených defektů neurální trubice. Zvýšené hodnoty AFP v mateřské krvi umožňují záchyt anencefalie v 90 %, u ostatních případů poruch uzávěru neurální trubice v 85 %. Ultrazvukové vyšetření zvýší detekční poměr těchto vad na 95–100 %.

Pomocí vyšších hladin AFP lze zachytit – společně s UZ vyšetřením – i některé další malformace plodu jako omfalokélu, gastroschisis, thorakoabdominální defekt, agenezi ledvin, odumření plodu, teratom, hydrocefalus, mnohočetné malformace, hygroma colli cysticum, oligohydramnion, kongenitální nefrózu, Meckelův syndrom a encefalokélu. U žen, které otěhotněly pomocí technik asistované reprodukce, jsou zpravidla vyšší hodnoty AFP po intrauterinní inseminaci nebo u těhotenství s darovaným vajíčkem. Ženy s IDDM mají hodnoty AFP většinou mírně snížené. Výrazně snížené hladiny AFP se objevují při pomalém vývoji plodu, toxemii, placentárním tumoru, nebo u plodů s Downovým nebo Edwardsovým syndromem. Nižší hodnoty jsou charakteristické také pro trizonii chromozomu 13.

2.2.2.6 uE3 (nekonjugovaný estriol)

Nekonjugovaný estriol je nejvýznamnějším estrogením hormonem v průběhu těhotenství. V porovnání s dalšími využívanými screeningovými markery se jedná o malou molekulu. Místem vzniku jsou fetální nadledvinky, fetální játra a placenta, kdy postupně dochází k přeměně

cholesterolu na DHEA sulfát a jeho hydroxylovanou formu, která se pak v placentě mění na nekonjugovaný estriol. Tento steroidní hormon má relativně krátký poločas rozpadu, s dobou přetrvávání v krevním oběhu kolem 20–30 minut. Účinkem se jedná o velmi slabý estrogen, u něhož se někdy uvádí, že má změkčovací účinek na cervix před porodem a že se účastní reakcí, které předcházejí přípravě mléčné žlázy před laktací. Estriol je z hlediska senzitivity pro screening Downova syndromu o něco lepším markerem než AFP, ale to platí za předpokladu dodržení podmínek preanalytické fáze vyšetření. Podobně jako u AFP také u nekonjugovaného estriolu se nacházejí u všech tří hlavních syndromů snížené hladiny této látky v krevním oběhu matky. Mírně nižší hodnoty jsou zpravidla také u těhotenství, která vznikla v režimu asistované reprodukce. Výrazně nižší hodnoty mohou indikovat přítomnost Smithova-Lemliova-Opitzova syndromu.

2.2.2.7 *Inhibin A*

Tento protein patří do nadrodiny proteinů TGF- β . Inhibin existuje ve formě A a B, které se odlišují β podjednotkou. Jeho funkcí je regulace produkce FSH a GnRH. Funkce v těhotenství spočívá v inhibici produkce FSH. Místem vzniku inhibinu A u žen je hypofýza, ovaria a placenta a u mužů Sertoliho buňky. Právě placentární produkce inhibinu A se dá využít ve screeningu Downova syndromu, kdy zvýšené hodnoty této látky mohou signalizovat vyšší riziko přítomnosti tohoto onemocnění u plodu.

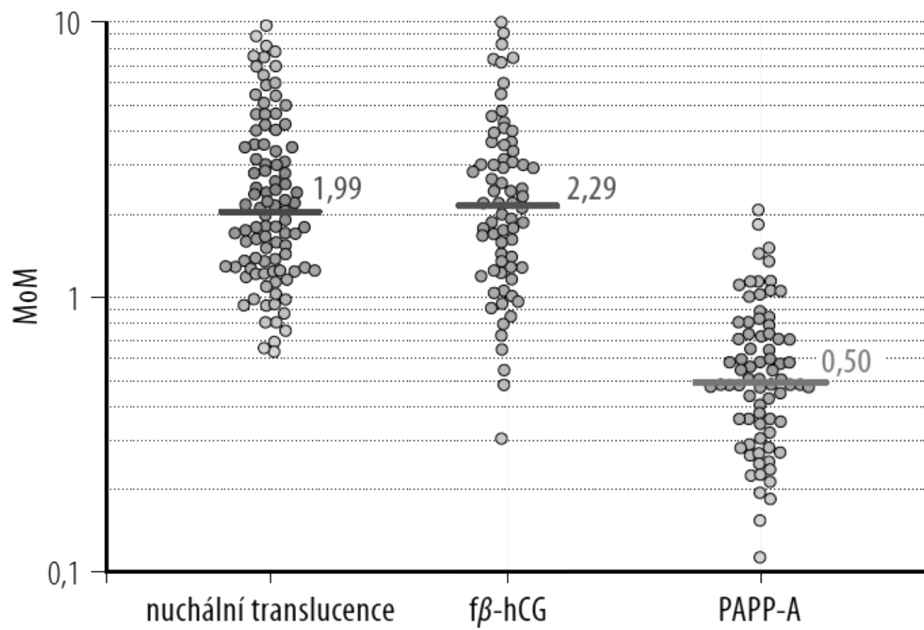
Podobně jako je tomu u dalších biochemických látek ve druhém trimestru, také u inhibinu A mohou být jeho hladiny ovlivněny u těhotenství, která vznikla při asistované reprodukci. V tomto případě jsou hladiny tohoto parametru zvýšené až o třetinu. V menší míře jsou hladiny této látky ovlivněny také rasou matky, kouřením nebo hmotností matky. Testování inhibinu A je další možností, jak zvýšit efektivitu screeningu ve 2. trimestru těhotenství.

2.2.2.8 *Očekávané hodnoty biochemických markerů u trizomií 21, 18 a 13*

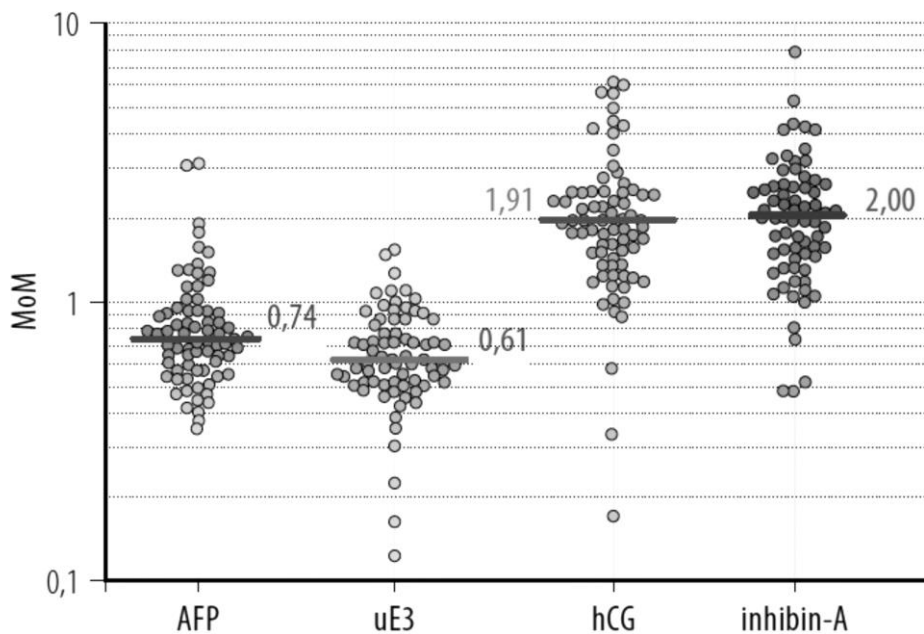
Hodnoty biochemických markerů, stejně jako hodnota NT, se u těhotenství s trizomiemi 21, 18 a 13 odlišují od hodnot nalézáných u těhotenství s nepostiženým plodem (obr. 10–15). Hodnocení odchylky se provádí pomocí násobku mediánu (MoM), tedy střední hodnoty souboru, která odpovídá nepostiženým těhotenstvím.

Využití mediánu pro tyto účely je výhodné z několika důvodů: odstraňují systematické rozdíly mezi laboratořemi, odstraňují rozdíly mezi hladinami biochemických látek při různém

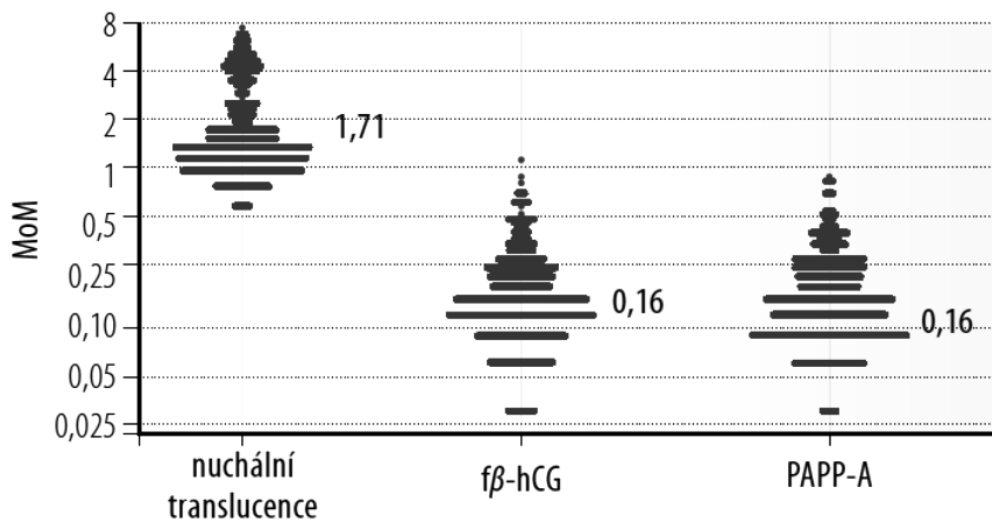
gestačním stáří, hodnoty vyjádřené pomocí MoM jsou nezávislé na jednotkách a stejným způsobem lze provádět také hodnocení měření NT.



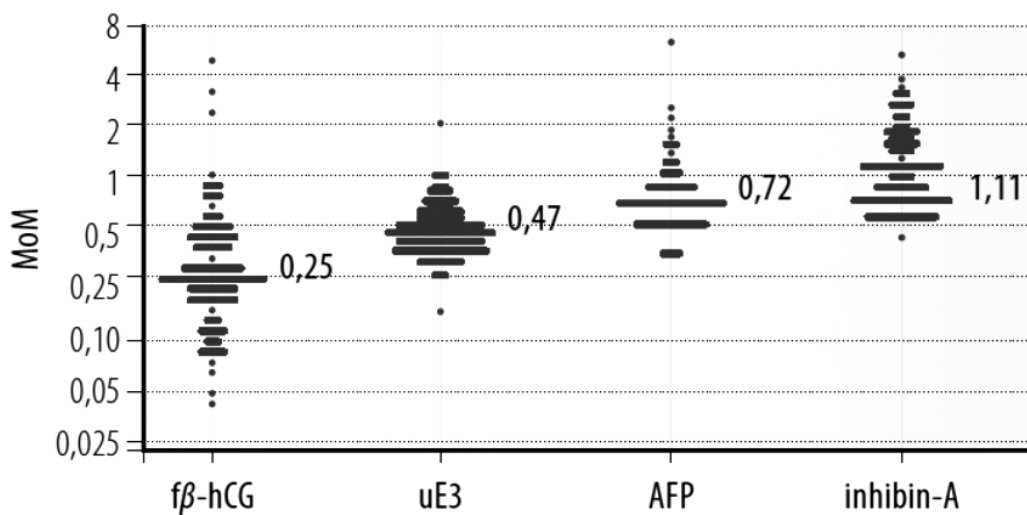
Obr. 10 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Downovým syndromem v 1. trimestru (FASTER Study) (Malone F. D. et al., 2005)



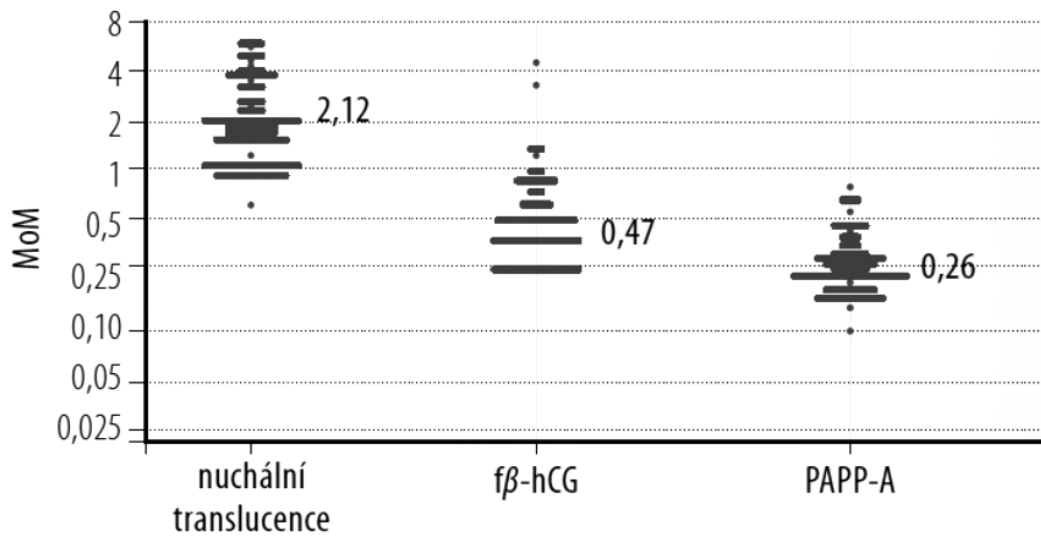
Obr. 11 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Downovým syndromem ve 2. trimestru (FASTER Study) (Malone F. D. et al., 2005)



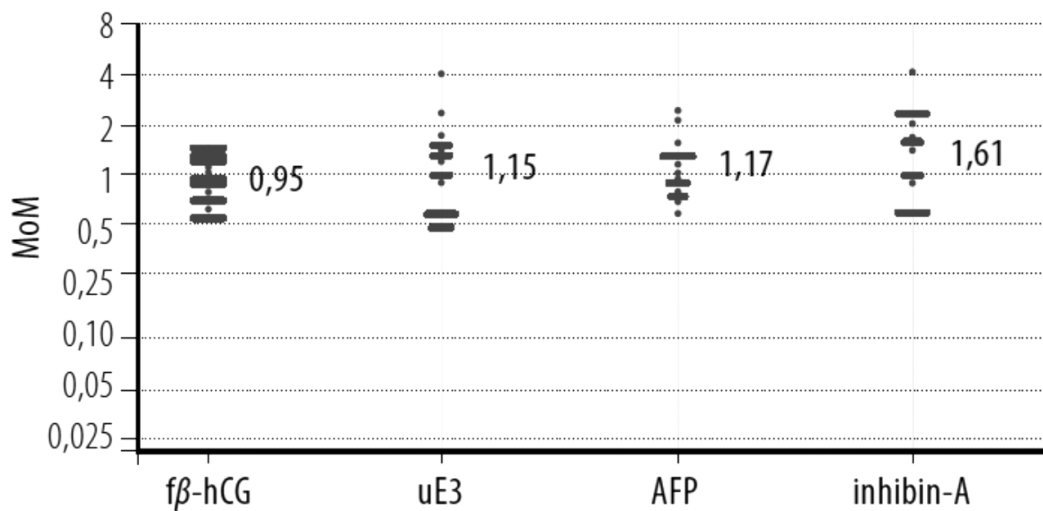
Obr. 12 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Edwardsovým syndromem v 1. trimestru (Bestwick J. P. et al., 2013)



Obr. 13 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Edwardsovým syndromem ve 2. trimestru (Bestwick J. P. et al., 2013)



Obr. 14 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Patauovým syndromem v 1. trimestru (Bestwick J. P. et al., 2013)



Obr. 15 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Patauovým syndromem ve 2. trimestru (Bestwick J. P. et al., 2013)

2.2.3 Screening v 1. trimestru, kombinovaný test

Pro těhotnou ženu je výhodou, když se provádění screeningového vyšetření přesunuje do časnějšího stadia těhotenství (Wald N. J., Hackshaw A. K., 1997). V tomto ohledu je v současné době screening v prvním trimestru pro ženy optimální volbou. Na druhé straně je třeba si uvědomit, že screening v 1. trimestru je sice vysoce efektivní, ale jeho výsledky mohou být ovlivněny také skutečností, že zachytává i část těhotenství s postiženými plody, u kterých by mezi 1. a 2. trimestrem došlo k samovolnému ukončení (Morris J. K. et al., 1999). Odhaduje se, že mezi 1. a 2. trimestrem takto zanikne více než třetina těhotenství, která nesou plod postižený Downovým syndromem. Kombinovaný test se zpravidla provádí od začátku 11. týdne těhotenství, tedy od gestačního stáří 10 týdnů a 0 dnů. Horní hranicí pro provádění kombinovaného testu je gestační stáří 13 týdnů a 6 dnů.

Screeningové vyšetření se v 1. trimestru skládá ze dvou biochemických testů a vyšetření různého počtu ultrazvukových parametrů. Na základě vyhodnocení mnoha publikovaných prací, které se zabývaly efektivitou tohoto typu screeningu, bylo zjištěno, že jeho výtěžnost se mírně mění v průběhu sledovaného období. Tato skutečnost souvisí se změnou senzitivity jednotlivých screeningových parametrů, které se v průběhu 1. trimestru pro výpočet rizika používají (tab. 2 a 3) (Palomaki G. E. et al., 2007).

Kombinovaný test může být prováděn v různém uspořádání, které se může lišit počtem vyšetřovaných UZ markerů a také různým statistickým nastavením hodnocení získaných výsledků a následným managementem těhotné – kombinovaný test, kombinovaný kontingenční test, kombinovaný test jako součást integrovaného testu.

Tab. 2 Markery 1. trimestru a jejich senzitivita v závislosti na týdnu těhotenství (*Palomaki G. E. et al., 2007*)

Markery 1. trimestru - senzitivita (při 5% FPR)				
Parametr/týden	11.	12.	13.	Průměr v 11. - 13. týdnu
NT	63	61	56	60
PAPP-A	42	36	29	36
Free β -hCG	32	37	43	37
Věk matky, PAP-A, Free β -hCG	67	66	66	66
Věk matky, NT, Free β -hCG	85	83	81	83

Tab. 3 Průměrné hodnoty mediánů u plodů s Downovým syndromem (*Palomaki G. E. et al., 2007*)

Hodnoty markerů (MoM) u plodů s Downovým syndromem v 1. trimestru těhotenství				
Parametr/týden	10	11	12	13
Free β	1,72	1,82	1,98	2,21
PAPP-A	0,40	0,46	0,51	0,58
NT		2,18	1,92	1,69

2.2.3.1 *Kombinovaný test*

Základním způsobem provádění screeningu v 1. trimestru je vyšetření, skládající se ze dvou biochemických markerů (PAPP-A, free β HCG) a měření nuchální translucence (NT). Další možností jak jednoduše zvýšit senzitivitu tohoto typu screeningu je přidání dalšího biochemického markeru: PIGF – placentárního růstového faktoru. V praxi se zatím tento biochemický parametr vyšetřuje velmi sporadicky. Zavedením PIGF se teoreticky zvýší senzitivita screeningu o 1–6 %, přičemž je doporučen odběr PIGF až na konci 1. trimestru. Výsledek tohoto screeningu je považován za definitivní vyjádření rizika. V tomto případě se používá jeden cut-off, zpravidla

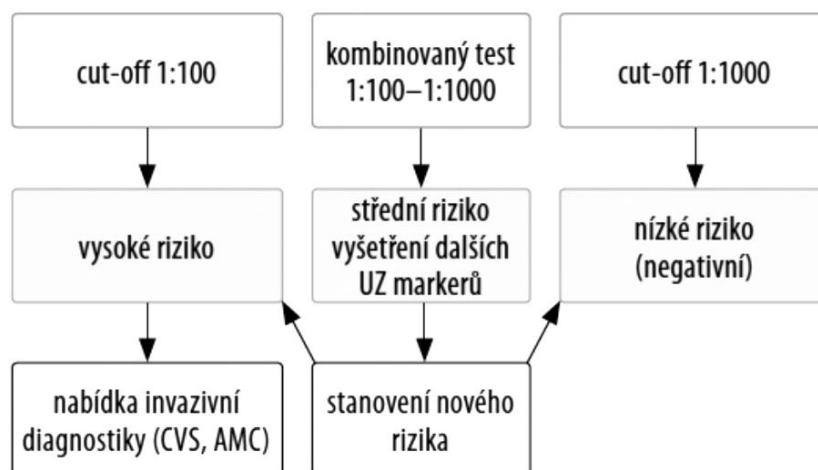
je to hodnota rizika 1 : 300, která rozděluje těhotné ženy do vysoce rizikové skupiny a ženy s nízkým rizikem.

Ženám s pozitivním výsledkem screeningu je nabídnuto provedení invazivního zákroku a poté genetické vyšetření získaného biologického materiálu. Pokud je dostupné provedení odběru choriových klků, tak se mu dává z časových důvodů přednost před provedením aminocentézy. Odběr plodové vody se obvykle provádí až po ukončeném 1. trimestru těhotenství. Toto uspořádání screeningu má zhruba 85% senzitivitu pro záchyt plodů s Downovým syndromem při 5% falešné pozitivitě.

2.2.3.2 Kombinovaný kontingenční test

Pokud se k vyšetřovaným parametrům kombinovaného testu přidají další ultrazvuková vyšetření a změní se způsob hodnocení získaných výsledků rizik, tak hovoříme o tzv. kontingenčním uspořádání kombinovaného testu. K těmto ultrazvukovým vyšetřením patří ověření přítomnosti nosní kůstky (NB), dopplerovské vyšetření trikuspidální regurgitace (TR), vyšetření ductus venosus (DV), měření fronto-maxillo-faciálního úhlu (FMF) a eventuálně detekce aberantní pravé podklíčkové arterie (ARSA).

Z pohledu hodnocení výsledků jsou v tomto případě stanoveny dvě hodnoty cut-off, které rozdělí těhotné ženy do tří skupin (obr. 16). První cut-off je zpravidla určen rizikem 1 : 100 a výsledky s vyšším rizikem jsou označeny jako pozitivní. V těchto případech se ženám nabízí provedení invazivního zákroku a genetická diagnostika. Druhý cut-off je nastaven zpravidla pro riziko 1 : 1000. Ženy, které mají výsledek rizika nacházející se v intervalu mezi 1 : 100 až 1 : 1000, jsou dále vyšetřovány pomocí uvedených ultrazvukových markerů a jejich riziko je znovu číselně vyjádřeno. U části žen se tímto způsobem potvrdí opodstatněnost provedení invazivního zákroku, kterým je zpravidla odběr choriových klků. Druhá část žen se naopak provedení invazivního zákroku, díky dalším ultrazvukovým vyšetřením, vyhne a jejich definitivní výsledek screeningu je negativní.



Obr. 16 Schematické znázornění provádění kombinovaného kontingenčního testu (Společnost lékařské genetiky ČLS JEP, 2014)

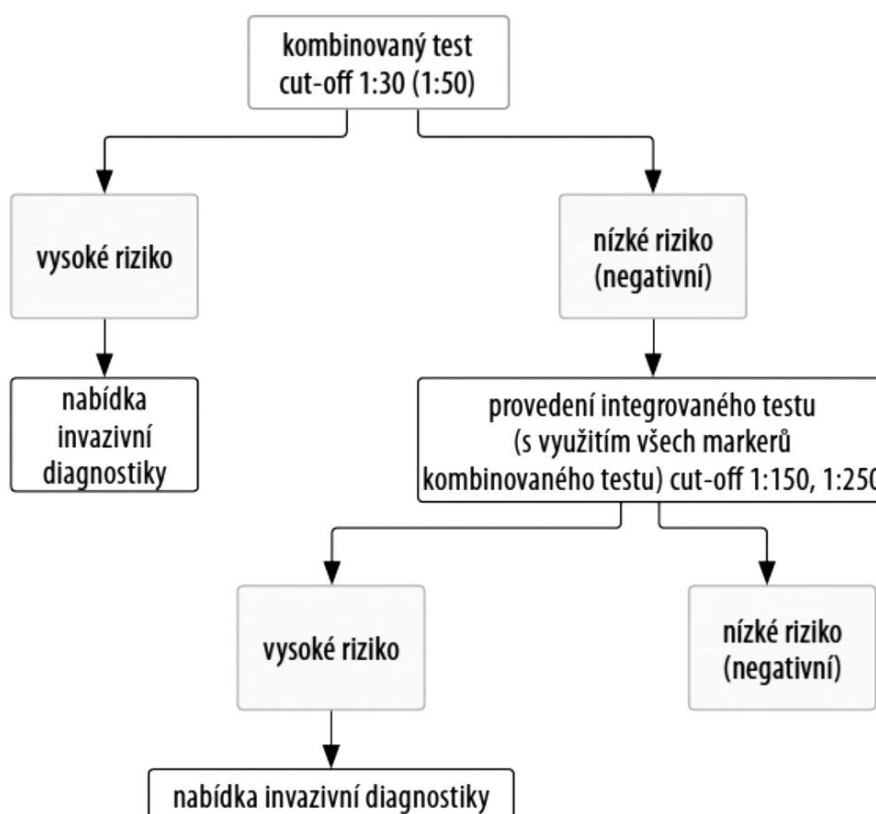
Výsledek screeningu u žen, jehož hodnota rizika je nižší než 1 : 1000, je považován za negativní a u těchto žen není třeba provádět genetické invazivní vyšetření. V praxi je ovšem problematické zavedení plošného screeningu tohoto typu, zejména z důvodu jeho dostupnosti pouze ve vysoce specializovaných centrech, časové náročnosti provádění většího počtu ultrazvukových vyšetření a také díky skutečnosti, že ne u všech těhotných žen lze tyto parametry spolehlivě a reprodukovatelně změřit. Dle počtu použitých UZ markerů je senzitivita tohoto typu screeningu vyšší než 90 % při 5% falešné pozitivitě.

2.2.3.3 *Kombinovaný test jako součást integrovaného testu – sekvenční integrovaný test* (Loucký J. et al., 2015)

Kombinovaný test, jak v základním uspořádání, tak s rozšířenou paletou UZ markerů, může být i součástí tzv. integrovaného testu, který spojuje vyšetření provedená v 1. a 2. trimestru těhotenství do jednoho výsledku (obr. 17). V případě tzv. plně integrovaného testu se výsledek kombinovaného testu v 1. trimestru samostatně nehodnotí a získané výsledky biochemických a ultrazvukových vyšetření se vyhodnocují až po provedení dalších biochemických vyšetření ve 2. trimestru. Tento způsob hodnocení screeningu má sice statisticky nejvyšší účinnost, ale nereaguje na jasně pozitivní výsledky kombinovaného testu v 1. trimestru a z pohledu těhotných žen může být vnímán jako stresující. Sekvenční forma integrovaného testu tuto nevýhodu odstraňuje, přičemž je zachována vysoká senzitivita screeningového protokolu. Uspořádání

sekvenční formy integrovaného testu vychází ze statistických hodnocení, podle kterých je u kombinovaného testu v prvním trimestru stanoven cut-off, označující jako pozitivní pouze ženy s extrémně vysokým rizikem. Zpravidla se používá hranice 1 : 30, nebo 1 : 50.

Ve skupině pozitivních výsledků je ženám nabídnuto provedení invazivního výkonu (biopsie choriových klků – CVS) a už se neprovádějí další screeningová vyšetření ve druhém trimestru. Ženy s negativním výsledkem v 1. trimestru pokračují do druhého trimestru, kde je jim proveden odběr krve a biochemická stanovení hCG, uE3 a AFP, ev. inhibinu A. Výsledek screeningu je vyjádřen jako jedno riziko vypočítané ze všech provedených biochemických testů a ultrazvukových měření. Výhodou tohoto typu screeningu je vysoká senzitivita (> 90 %) a to i v případě, že nelze v prvním trimestru z objektivních důvodů vyšetřit kompletní spektrum UZ markerů. Nevýhodou je skutečnost, že těhotná žena se výsledek screeningu dozví o něco později než v případě samostatného kombinovaného testu.



Obr. 17 Schematické znázornění provádění kombinovaného testu v rámci sekvenčního integrovaného testu

2.2.3.4 Biochemické markery v 1. trimestru jako součást sérového integrovaného testu

Pokud neexistuje možnost kvalitního ultrazvukového vyšetření ženy v 1. trimestru těhotenství, je možno algoritmus screeningu založit pouze na vyšetřování biochemických parametrů. Sérový integrovaný test využívá standardních screeningových biochemických vyšetření v 1. i 2. trimestru těhotenství. Zpravidla se provádí vyšetření PAPP-A v 1. trimestru a tento výsledek se integruje po provedení biochemických testů ve druhém trimestru do jednoho výsledného rizika. Senzitivita tohoto testu je zhruba srovnatelná se základním kombinovaným testem prováděným v 1. trimestru, tedy kolem 85 % při 5% falešné pozitivitě.

2.2.4 Screening ve 2. trimestru, integrovaný test, triple test, kvadruple test

Screening ve druhém trimestru těhotenství je založen na provádění biochemických vyšetření. V současné době je možno tento typ screeningu provádět a vyhodnocovat samostatně, nebo jako součást integrovaného testu. Samostatné provádění, zejména v případě triple testu, je dnes už považováno za nedostatečnou screeningovou metodu, a pokud neexistuje možnost integrace výsledků, tak je upřednostňován kombinovaný test v 1. trimestru. Lepší parametry než triple test, má kvadruple test, který využívá pro výpočet rizika také výsledek stanovení inhibinu A (Wald N. J. et al., 2004). Bohužel v České republice se toto vyšetření prakticky neprovádí, a tak i využití screeningu ve formě kvadruple testu je zanedbatelné.

Těhotenský screening ve druhém trimestru je historicky starší než prvotrimestrální screening. Výpočet rizika postižení plodu je prováděn pouze na základě výsledků biochemických vyšetření. V tomto období těhotenství je možné provádět vyšetření hCG (volné b podjednotky nebo celkového hCG), alfa-fetoproteinu, nekonjugovaného estriolu, příp. inhibinu A (tab. 4, 5) (Wald N. J. et al., 1996). Tato biochemická vyšetření mohou být hodnocena buď izolovaně pouze v rámci vyjádření rizika ve 2. trimestru, nebo se mohou stát součástí integrovaného testu. Tato vyšetření se provádějí od 15. do 22. týdne těhotenství. Výsledek vyšetření musí být dostupný tak, aby v případě pozitivního výsledku screeningu a potvrzeného závažného nálezu pomocí diagnostické metody bylo možno těhotenství ukončit do 24. týdne těhotenství. Je ovšem smysluplnější, aby se tato vyšetření ve druhém trimestru prováděla co možná nejdříve, tzn. spíše na jeho začátku, optimálně v 15. nebo 16. týdnu. Na rozdíl od biochemických parametrů vyšetřovaných v 1. trimestru se senzitivita druhotrimestrálních biochemických markerů v průběhu těhotenství nijak nemění.

Tab. 4 Markery 2. trimestru - senzitivita (15. - 18. týden) (při 5% FPR) (Wald N. J. et al., 2004)

Parametr ve 2. trimestru	Senzitivita
AFP	42 %
uE3	52 %
free β hCG	61 %
total hCG	53 %
Inhibin-A	59 %

Tab. 5 Hodnoty markerů (MoM) u plodů s Downovým syndromem ve 2. trimestru těhotenství

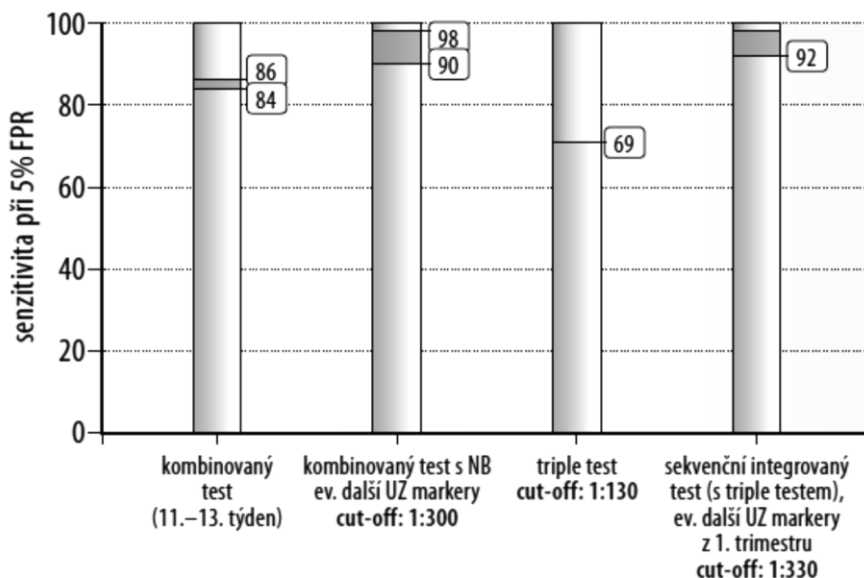
Parametr ve 2. trimestru	
AFP	0,74
uE3	0,61
hCG	1,91
Inhibin-A	2,00

2.2.5 Srovnání screeningových programů při 5 % FPR, s nastavením cutt-off a stanovením dalších podmínek

Objektivní srovnání efektivity screeningových programů by mělo být součástí volby vhodné screeningové strategie. Těhotná žena by v rámci sledování svého těhotenství měla být informována o výhodách a nevýhodách či úskalích jednotlivých screeningových programů (obr. 18, tab. 6) (Lubušký M. et al., 2018). Vzájemná závislost senzitivity a falešné pozitivivity umožňuje srovnání efektivity jednotlivých screeningových testů. Umožňuje také modelaci efektivity konkrétního screeningového testu, tedy sledování, jakým způsobem se mění např. falešná pozitivita při snižování či zvyšování senzitivity screeningového testu.

Snižování či zvyšování senzitivity souvisí s nastavením cut-off (hranice pozitivivity). Cut-off je hodnota rizika vyjádřená matematicky, která soubor sledovaných těhotných žen rozděluje na ženy s vysokým rizikem postižení plodu a ženy s rizikem nízkým. Pro objektivní srovnání

jednotlivých screeningových testů se zpravidla zafixuje jeden sledovaný parametr (např. 5 % FPR) a sleduje se, jak se u jednotlivých screeningových testů mění hodnoty parametru druhého souvisejícího – senzitivity.



Obr. 18 Grafické znázornění efektivity screeningových testů při 5 % FPR (Lubušký M. et al., 2018)

Tab. 6 Srovnání efektivity screeningových testů pro 5 % FPR a odpovídající nastavení cut-off (Lubušký M. et al., 2018)

Test	Cut-off	DR (%) senzitivita při 5% FRH	Riziko postižení plodu při cut-off (%)	Screeningový program neodhalí postižený plod (%)	Poznámka
Kombinovaný test (11. - 13. týden)	1 : 260	84-86	0,38	14-16	Senzitivita se mění v závislosti na odběru biochemických markerů. Časnější odběr krve senzitivitu mírně zvyšuje.
Kombinovaný test + další UZ markery (NB, TR, DV, FMF úhel) (11. - 13. týden)	1 : 300	90 (>90)	0,33	2-10	Nelze provádět populačně s vyšetřením všech UZ parametrů. U části žen nelze vyšetřit z objektivních důvodů všechny uváděné UZ markery.
Triple test	1 : 130	69	0,76	31	Provádí se při pozdním záchytu gravidity, nebo jako součást sekvenčního integrovaného testu

Sekvenční integrovaný test (s triple testem)	1 : 330	92 (>92)	0,3	<8	Cut-off v prvním trimestru musí být nastaven 1 : 30 - 1 :50. Senzitivita tohoto typu screeningu se zvyšuje nad 92%, pokud jsou v algoritmu výpočtu při integraci uvedeny další UZ markery.
--	---------	----------	-----	----	--

2.3 Neinvazivní prenatální testování

2.3.1 Úvod

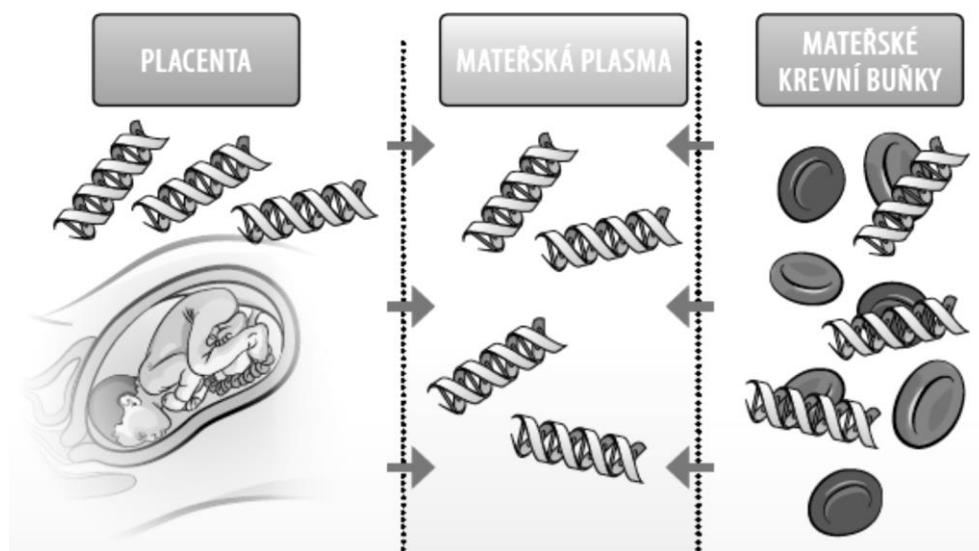
Současné screeningové metody, které se snaží odhalit zvýšené riziko přítomnosti nejčastějších geneticky podmíněných vývojových vad plodu, jsou založeny na měření biochemických nebo ultrazvukových markerů. V průběhu těhotenství fetoplacentární jednotka produkuje určité biochemické látky, jejichž hladina se odlišuje u postižených a nepostižených těhotenství. Je zajímavé, že dodnes neexistuje spolehlivé a jednoznačné vysvětlení, proč u postižených těhotenství zpravidla dochází buď ke zvýšení, nebo ke snížení hladiny sledovaných biochemických látek.

Nejčastějším geneticky podmíněným onemocněním plodu je Downův syndrom, tedy trizomie chromozomu 21. Žádný z biochemických markerů, který se ke stanovení rizika přítomnosti této trizomie používá, není přitom geneticky kódován přímo na chromozomu 21. Podobným způsobem můžeme hodnotit i vztah biochemických parametrů k dalším nejčastějším genetickým onemocněním, kterými jsou Edwardsův syndrom (trizomie chromozomu 18) a Patauův syndrom (trizomie chromozomu 13).

S rozvojem ultrazvukové diagnostiky dochází od 90. let minulého století k začleňování ultrazvukových markerů do screeningových protokolů. Také v tomto případě se určitým způsobem odlišují výsledky, které jsou nalezeny u nepostižených plodů, od výsledků s postiženým těhotenstvím. Jak biochemické, tak ultrazvukové screeningové markery můžeme souhrnně označit jako tzv. surogátní parametry, které mají souvislost s fenotypem nenarozeného dítěte.

Nejnovější způsob testování je, na rozdíl od výše uvedeného, založen přímo na analýze genetické výbavy plodu. Zásadním objevem v této oblasti byla práce Dennise Lo et al., publikovaná v roce 1997. Autoři (Lo Y. M. et al., 1997) v ní popsali přítomnost genetické výbavy plodu v mateřské plasmě a séru (obr. 19).

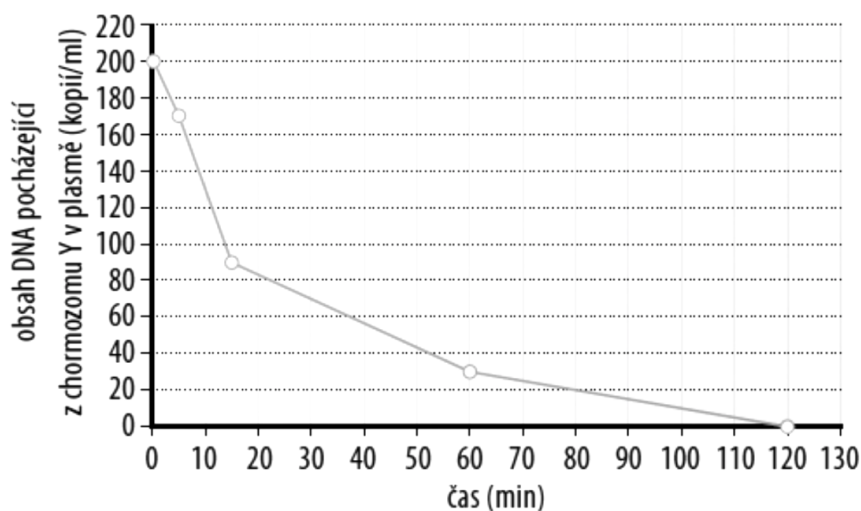
Tento převratný objev vyvolal snahu mnoha vědeckých týmů o jednoznačnou identifikaci genetického statutu plodu, který by mohl být jednoduše realizován prostřednictvím pouhého odběru krve nastávající matky. Tím byl dán základ pro tzv. neinvazivní prenatalní testování (NIPT).



Obr. 19 Schematické znázornění přechodu fetální a maternální extracelulární DNA do krevního oběhu matky

2.3.2 Genetická výbava plodu v krevním oběh matky

V následujících letech se bohužel ukázalo, že oddělení genetické výbavy plodu od genetické výbavy matky a její posouzení z pohledu možných genetických onemocnění není jednoduchou a snadnou záležitostí. Objevilo se několik konceptů, které se o to snažily, ale významnější posun v této oblasti nastal až po roce 2008, kdy byla popsána metoda masivního paralelního genomického sekvenování DNA plodu v mateřské plasmě (Chiu R. W. K. et al., 2008). V té době došlo také k popisu některých základních vlastností krátkých fragmentů volné extracelulární fetální DNA (cffDNA). Její obsah bývá zjednodušeně označován jako fetální frakce. Bylo zjištěno, že fetální frakci lze detekovat v krvi matky zhruba od čtvrtého týdne těhotenství. Obsah této fetální extracelulární DNA v poměru k extracelulární DNA matky je řádově v jednotkách procent. Důležitou vlastností těchto malých fragmentů DNA je také jejich poměrně krátká doba přetrvávání v krevním oběhu matky, která je menší než 24 hodin (obr. 20).

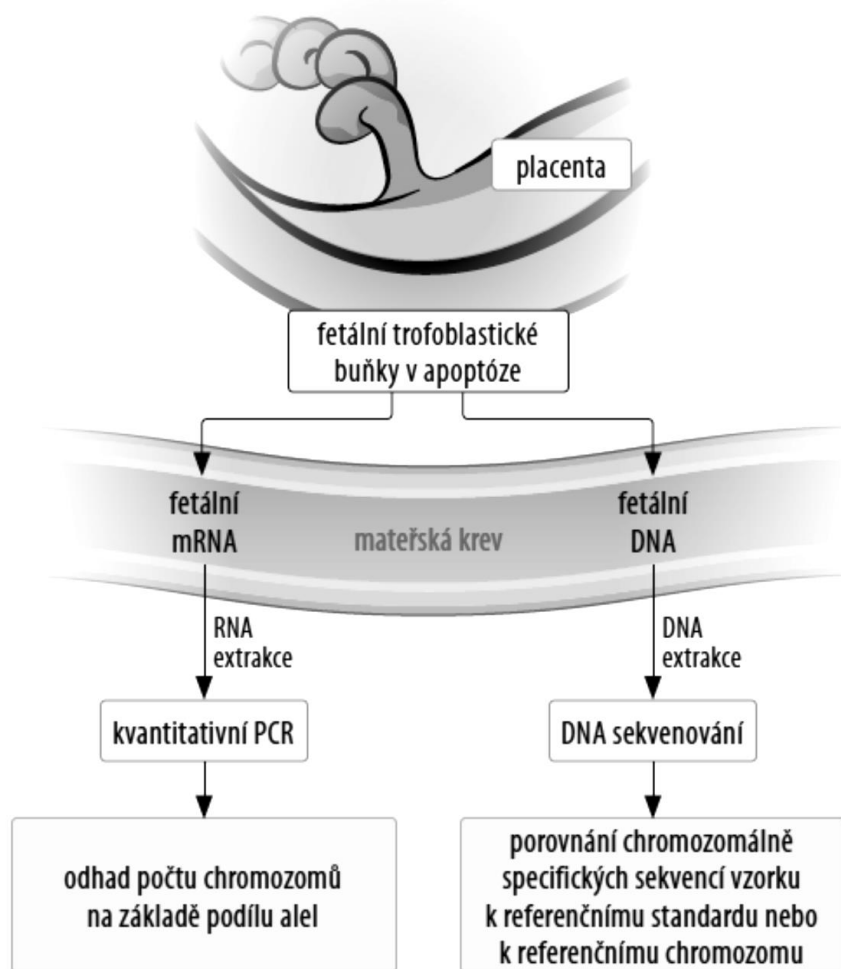


Obr. 20 Pokles obsahu extracelulární DNA fetálního původu po porodu (Lo Y. M. et al., 1999)

Druhou možností, jak se do krevního oběhu matky dostává genetická výbava plodu, jsou intaktní fetální buňky (Wright C., 2009). V tomto případě se ovšem jedná o částice zastoupené v řádu tisíců až setin procenta, v porovnání s množstvím buněk pocházejících od matky. Tyto intaktní fetální buňky jsou detekovatelné zhruba od 7. týdne těhotenství. Jejich diagnostický význam je ovšem ovlivněn skutečností, že v krvi matky mohou přetrvávat více než dvě desetiletí a tedy nejsou vhodné jako prostředek pro sledování následujících těhotenství.

2.3.3 Extracelulární mateřská DNA

Z hlediska biologického původu vzniká extracelulární DNA při apoptóze buněk trofoblastu. Způsob detekce je založen na sekvenování těchto malých fragmentů DNA, které při procesu apoptózy trofoblastických buněk vznikají a následně se dostávají do krevního oběhu matky (obr. 21).



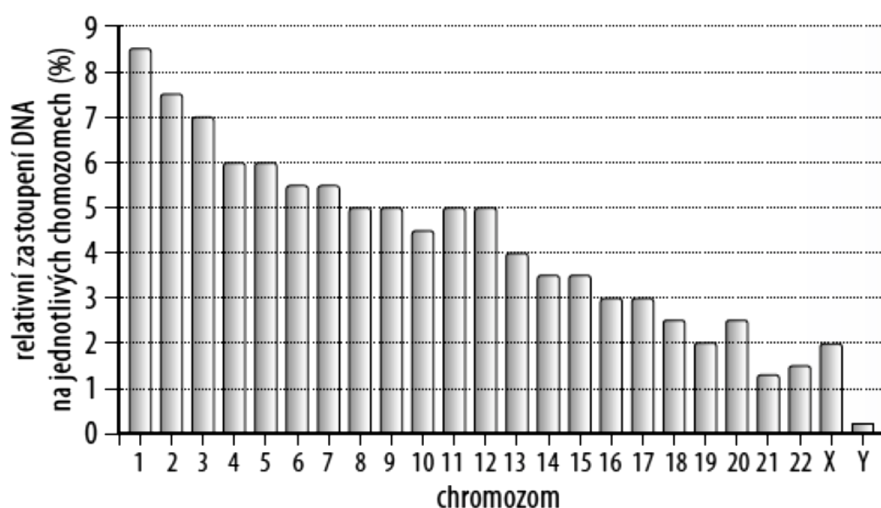
Obr. 21 Apoptóza buněk trofoblastu a průchod genetické informace plodu do krve matky s možnostmi detekce

Sekvenací se určí jaký chromozomální původ má každý konkrétní fragment, a tedy je možno určit poměrné zastoupení genetického materiálu asociovaného s určitým chromozomem.

Základní vlastnosti volné extracelulární DNA: (Lo Y. M. D., Chiu R. W. K., 2012)

- V plasmě matky lze identifikovat jak mateřskou extracelulární DNA, tak extracelulární DNA fetálního původu.
- Extracelulární DNA je tvořena relativně malými fragmenty (150–200 nukleových bází). Tyto cirkulující fragmenty reprezentují kompletní genetickou informaci.
- Fetální DNA je placentárního původu.
- Maternální DNA pochází z červených krvinek. Fetální DNA tvoří 4–25 % z celkové mimobuněčné DNA (průměrně ~10 %).

Relativní zastoupení genetického materiálu obsaženého v jednotlivých chromozomech je známo (obr. 22). V tomto případě musíme vzít ovšem do úvahy, že kromě volné extracelulární DNA fetálního původu se v krevním oběhu matky vyskytuje také volná extracelulární DNA mateřského původu. Zjednodušeně řečeno, při přiřazení jednotlivých fragmentů k určitému chromozomu nehraje v tomto případě roli mateřský nebo fetální původ fragmentu, ale celkové množství genetického materiálu, které je s tímto určitým chromozomem asociováno. Aby sekvence těchto krátkých úseků DNA přinesla uspokojivé výsledky z hlediska klinické interpretace a skutečného popisu stavu těhotenství, vzhledem k hledaným genetickým onemocněním, je třeba také stanovit relativní zastoupení fetální frakce, tedy podílu volné extracelulární fetální DNA vzhledem k celkovému množství extracelulární DNA.



Obr. 22 Zastoupení genetické výbavy mezi jednotlivými chromozomy

Stanovení obsahu fetální frakce je významným prvkem pro posouzení kvality výsledku. Pokud by totiž zastoupení fetální frakce u vzorku kleslo pod určitou hranici, tak její nižší obsah může ovlivnit interpretaci výsledků. Předpokládejme například provedení testu na stanovení přítomnosti nejfrekventovanější trizomie na chromozomu 21, tedy Downova syndromu. Obsah fetální frakce s přítomností trizomie bezprostředně ovlivňuje množství genetického materiálu, který souvisí s chromozomem 21. Čím vyšší je obsah fetální frakce, tím spolehlivější je rozlišení těhotenství s trizomií a samozřejmě také nepostiženého těhotenství. V případě, že se obsah fetální frakce blíží hodnotě kolem 4 % z celkového množství extracelulární DNA, je nárůst zastoupení genetického materiálu asociovaného s chromozomem 21 zanedbatelný a nemusí jednoznačně odlišit

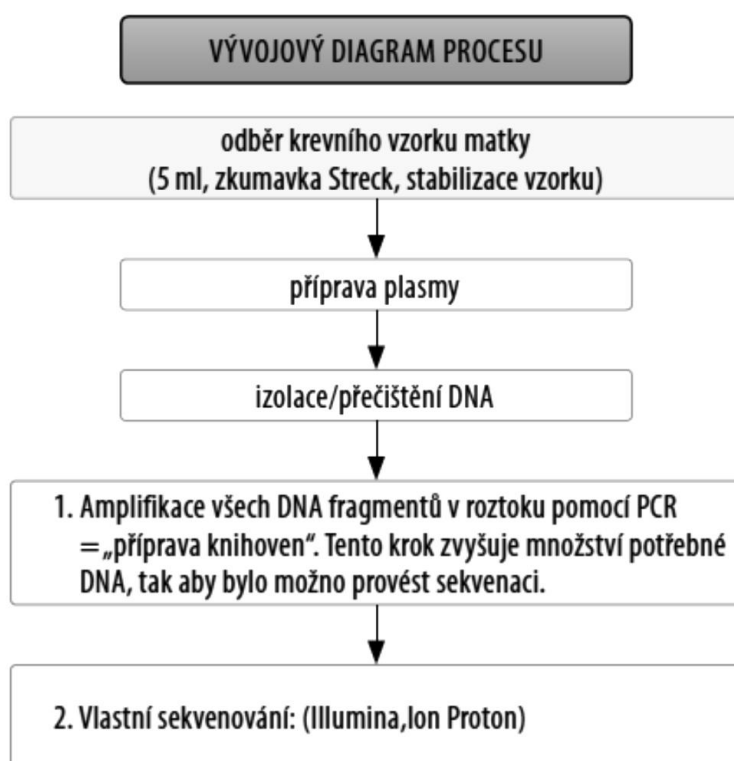
přítomnost nadbytečného chromozomu u přítomné trizomie. Při matematické interpretaci výsledků měření tak může dojít k nesprávnému klinickému závěru, v tomto případě k falešně negativnímu výsledku (tab. 7).

Tab. 7 Princip rozlišení postiženého těhotenství na základě různého obsahu fetální frakce

Fetální karyotyp	% DNA fetálního původu	% DNA maternálního původu	Očekávané relativní zastoupení chromozomu 21 %
euploidní	jakékoli (0-100)	jakékoli (0-100)	1,500
Downův syndrom	0	100	1,500
Downův syndrom	5	95	1,537
Downův syndrom	10	90	1,575
Downův syndrom	15	85	1,613
Downův syndrom	20	80	1,650

2.3.4 Základní principy využití NIPT a implementace v praxi

První studie, které byly provedeny s cílem ověřit možnosti využití neinvazivního testování v běžné klinické praxi, vycházely ze souborů těhotných žen s vyšším rizikem přítomnosti hledaného genetického onemocnění. Výsledky (Palomaki G. E. et al., 2011) těchto studií demonstrovaly výrazně lepší výsledky než je tomu u běžných, stávajících screeningových metod. Později bylo provedeno také několik studií, které se snažily prokázat, že tento způsob testování je vhodný pro obecnou populaci (Norton M. E. et al., 2012), tedy nemusí být prováděn pouze u vysoce rizikových těhotenství (obr. 23). Ze všech těchto studií vyllynulo několik základních poznatků. NIPT je považováno za screeningový a nikoliv diagnostický test, který má ovšem výrazně lepší parametry než běžně prováděný screening.

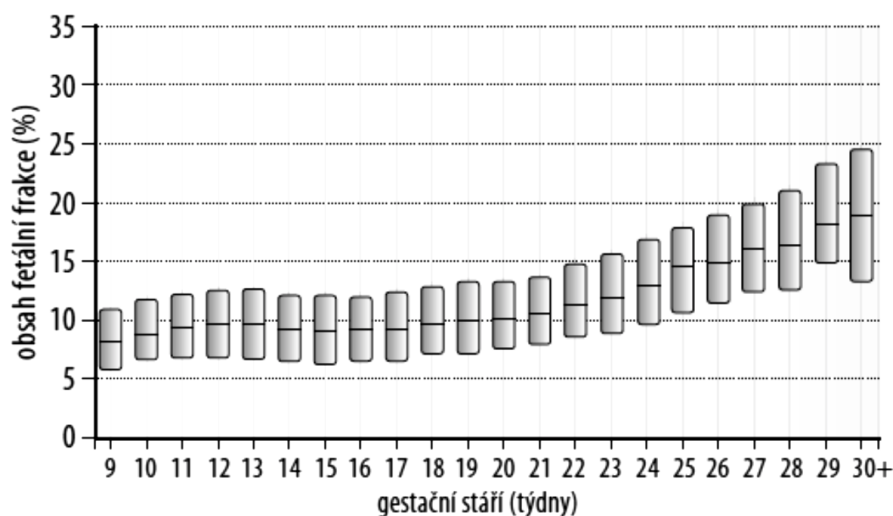


Obr. 23 Schematické znázornění postupu při provádění NIPT

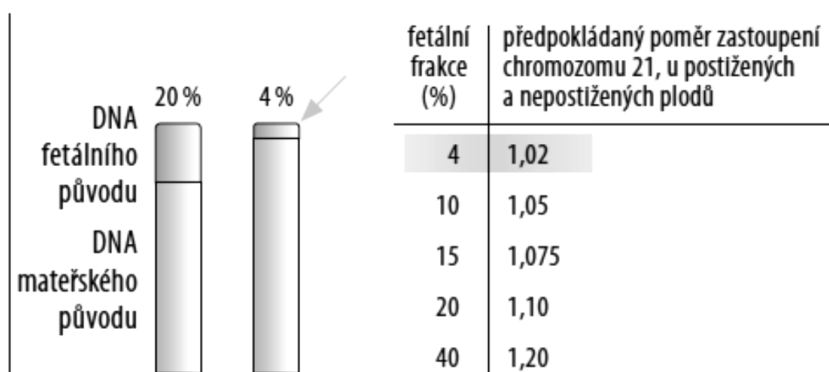
Senzitivita NIPT se blíží 100 % při velmi nízké falešné pozitivitě. Jedním z důvodů, proč senzitivita v provedených studiích nebyla 100 %, může být placentární mosaicismus, syndrom mizejícího dvojčete nebo nádorové onemocnění u matky. PPV – pozitivní prediktivní hodnota NIPT je násobně lepší než u běžného typu screeningu. Uvádí se, že může být 10× až 20× vyšší oproti integrovanému nebo kombinovanému testu.

Pozitivní výsledek je třeba vždy nutně ověřit prostřednictvím AMC, či CVS. Z důvodů vyloučení placentárního mosaicismu je vhodné provést AMC (Committee on Practice Bulletins, 2016).

Limitujícím faktorem pro provedení NIPT je minimální množství fetální frakce. Její obsah by neměl být v krvi matky nižší než 4 % z celkového objemu extracelulární DNA. Tomuto požadavku odpovídá zhruba 9. – 10. týden těhotenství. Obsah fetální frakce vzrůstá s týdnem těhotenství (obr. 24). Nižší obsah se nachází zpravidla u obézních žen (obr. 25).



Obr. 24 Závislost obsahu fetální frakce na týdnu gestačního stáří (Bianchi D. W., Wilkins-Haug L., 2014)



Při nižším obsahu fetální frakce je poměr zastoupení chromozomu 21 u postižených a nepostižených plodů nižší, a tím se snižuje rozlišovací schopnost NIPT

Obr. 25 Význam fetální frakce (Canick J. A. et al., 2013)

V případě selhání testu může být jednou z příčin právě nižší obsah fetální frakce a v tomto případě je řešením druhý odběr s určitým časovým odstupem.

S prováděním screeningu pomocí NIPT se objevuje množství otázek, které souvisejí s etickou a filozofickou stránkou tohoto typu testování (Gregg A. R. et al., 2013). Rozšiřující se spektrum genetických onemocnění, které NIPT testy zahrnují, vyvolává řadu otázek souvisejících s možností ukončení těhotenství kvůli přítomnosti určitého genetického onemocnění. Ne všechna genetická onemocnění jsou neslučitelná se životem a v mnoha případech je velmi

obtížné odhadnout míru postižení u nenarozeného dítěte. Přínosem negativního výsledku NIPT je ujištění těhotné, že plod je s vysokou pravděpodobností v pořádku. Naopak falešně pozitivní výsledek může vést u těhotných k úzkosti a stresu při čekání na definitivní výsledek pomocí diagnostických metod.

Ve velmi malém počtu případů může dojít pomocí NIPT také k nalezení falešně negativního výsledku, čehož výsledkem může být nesprávný medicínský management dalšího průběhu těhotenství, případně až narození dítěte s genetickou vadou.

Neexistuje zcela jednotný názor, v jakém režimu by mělo být NIPT do procesu vyšetřování těhotných žen zavedeno. Z pohledu screeningu nejčastějších genetických vad by NIPT mohlo nahradit současné screeningové metody, ale není vhodné, aby nebylo u těhotných prováděno ultrazvukové vyšetření, které může odhalit další vady u plodu, které nelze pomocí NIPT odhalit. Nabízet NIPT jako alternativu běžného screeningu tedy lze, ale za předpokladu, že bude provedeno i ultrazvukové vyšetření plodu. Je možné použít NIPT také jako test pro ženy s pozitivním výsledkem screeningu v I. trimestru. V takovém případě je výhodou, že se sníží množství invazivních výkonů a tím i riziko potratu zdravého plodu. Nevýhodou je, že se nezvýší záchyt plodů např. s Downovým syndromem nad hodnotu záchytu pomocí screeningu v I. trimestru.

Zvýšení záchytu plodů s trizomií se snaží řešit kombinace současných screeningových metod s NIPT (obr. 26), kdy cut-off (hranice positivity) u screeningu v I. trimestru je nastavena např. na hodnotu 1 : 800. Ženám s vyšším rizikem by bylo možno nabídnout NIPT a při tomto uspořádání by vzrostl záchyt hledaných genetických onemocnění, ale nezvýšilo by se množství souvisejících invazivních výkonů. Na druhé straně vyšší počet pozitivních výsledků po provedení prvotrimestrálního screeningu (před provedení NIPT) bude v první fázi zřejmě psychicky zatěžovat více žen z obavy, že jejich screening nedopadl dobře. Tento postup bývá označován jako reflexní DNA testování. Takové uspořádání kombinace prvotrimestrálního screeningu a NIPT s sebou ovšem nese riziko snížení záchytu jiných chromozomálních aberací, které nejsou u plodu pomocí NIPT vyšetřovány.

V případě závažného ultrazvukového nálezu u plodu (např. vysoká hodnota NT) je vhodné nabídnout přímo invazivní vyšetření a nikoliv NIPT. V případě, že součástí výsledku NIPT bude také stanovení pohlaví plodu, neměl by tento výsledek být z etických důvodů sdělován před ukončením 12. týdne gravidity.

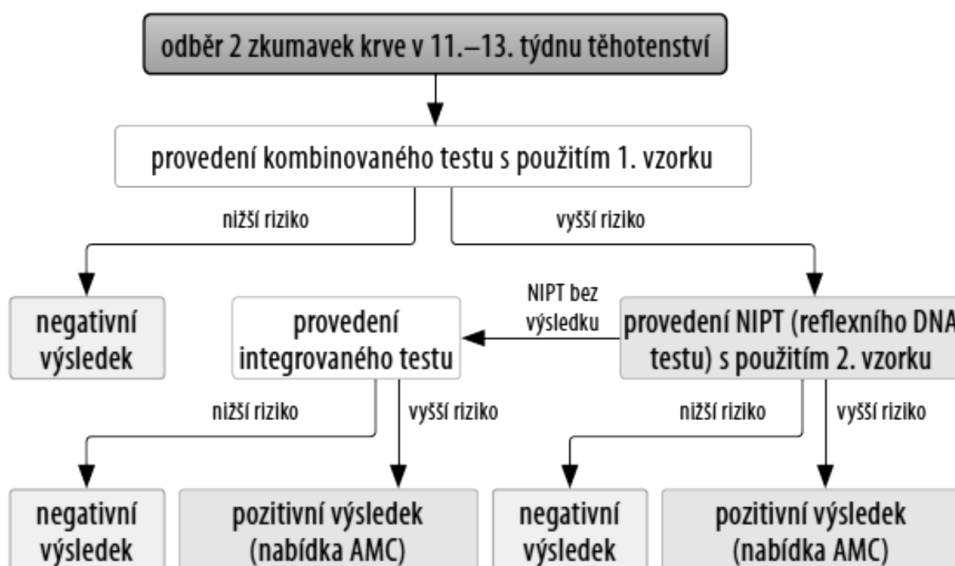
Přesnost výsledků stanovení abnormalit pohlavních chromozomů (SCA) je nižší než např. přesnost stanovení přítomnosti trizomie 21 nebo trizomie 18. Důvodem může být placentární

mosaicismus, nebo mosaicismus plodu, mosaicismus pohlavních chromozomů matky, případně odchylky na chromozomu X u matky.

Značná část populace s abnormalitami pohlavních chromozomů není v průběhu života vůbec diagnostikována. V některých případech se na jejich onemocnění přijde jenom díky reprodukčním problémům v dospělosti. Polovina nálezů SCA, zjištěných pomocí NIPT, má normální výsledek karyotypu, což ukazuje na určitý etický problém použití NIPT v oblasti abnormalit pohlavních chromozomů. Výsledky SCA získané pomocí NIPT mohou v určitých případech vést zbytečně ke stigmatizaci plodu kvůli přítomnosti odchylky, která se ve skutečnosti nebude nijak fenotypově prezentovat

Pomocí NIPT lze detekovat i některé mikrodeleční syndromy, ale z pohledu klinické genetiky je obtížné pracovat s možnou variabilitou výsledného fenotypu. V případě některých mikrodelečních syndromů s mírným projevem je třeba otestovat i rodiče. Tyto příklady ukazují obtížnost genetických konzultací některých výsledků získaných NIPT.

NIPT by nemělo být nabízeno jako DTC (Direct To Consumer) test, ale naopak by mělo být nabízeno prostřednictvím kvalifikovaného zdravotnického personálu. Těhotná žena by měla mít možnost získat dostatek informací o charakteru NIPT testu, znát jeho možnosti, ale také vědět o jeho limitacích. Měla by vědět, že v případě pozitivního výsledku NIPT, je doporučeno provedení invazivního zákroku pro potvrzení, či vyvrácení diagnózy.



Obr. 26 Možné schéma uspořádání kombinace běžného screeningu a NIPT (reflexní DNA testování (Wald N. J., 2018))

2.3.5 Souhrn

NIPT je mnohem přesnější test pro stanovení běžných autosomálních aneuploidií než kombinovaný nebo integrovaný test. Přesto nemůže být pozitivní výsledek považován za definitivní diagnózu, a to z důvodu možného placentárního příspěvku k obsahu cff DNA (placentární mosaicismus, mizející dvojče, tumor). Před provedením ukončení těhotenství je doporučeno pozitivní výsledek ověřit pomocí invazivního testu, preferována je aminocentéza. Mnohem lepší parametry NIPT v porovnání s běžným screeningem by neměly vést ke snížení úrovně podávaných informací před provedením testu. Měly by být naopak detailně vysvětleny výhody a limitace tohoto typu testování každé těhotné ženě.

Pokud je NIPT nabízeno pro stanovení přítomnosti určitých konkrétních genetických vad (T21, T18, T13), je třeba si uvědomit, že výsledek testu nevylučuje možnost existence jiných závažných nálezů na dalších chromozomech. Tato informace by měla být jasně prezentována nastávajícím rodičům v rámci konzultace před provedením testu. Možnost existence těchto nálezů by měla být zmíněna a těhotná žena by o nich měla vědět.

Neinvazivní testování by mělo podléhat kontrole kvality, která by měla zahrnovat také nelaboratorní aspekty celého procesu – poskytování informací, konzultace, vzdělávání pracovníků, systematické vyhodnocování všech aspektů screeningového procesu, zajištění rovnosti přístupu a ustanovení strategie pro další inovace prenatálního screeningu.

Výhody a nevýhody související s různým uspořádáním a uvedením NIPT do screeningového procesu by neměly být posuzovány jenom z technologického a ekonomického pohledu, ale především z pohledu výhod a nevýhod, které mohou přinést pro rozhodování těhotné a jejího partnera. Významný je také pohled, jak se zavedení NIPT promítne při vyhodnocení výsledků screeningového procesu a jak bude akceptován celospolečensky.

S přihlédnutím k tomu, že se sekvenční technologie vylepšují a zlevňují, existuje velmi vážný požadavek na odborné společnosti, aby diskutovaly možné budoucí sociální aspekty prenatálního screeningu. Z dosavadních zkušeností v této oblasti vyplývá, že z etických důvodů by NIPT mělo zahrnovat pouze testování závažných vrozených a dětských onemocnění.

3 HYPOTÉZA, CÍLE PRÁCE

3.1 Hypotéza

Konvenční screening Downova syndromu u nenarozených plodů je možno v současné době provádět při různém gestačním stáří plodu v 1. a 2. trimestru těhotenství. Pro tento typ screeningu se využívá zejména stanovení biochemických markerů a v 1. trimestru je možné provádět také ultrazvuková měření. V České republice se ve druhém trimestru zpravidla stanovují tři biochemické parametry AFP, hCG a uE3 v rámci tzv. triple testu, případně po integraci s výsledky v prvním trimestru, v rámci tzv. integrovaného testu. Na mnoha renomovaných zahraničních pracovištích (USA, Velká Británie, Itálie, Německo) se ve druhém trimestru vyšetřuje čtvrtý biochemický parametr inhibin A. Pokud jsou výsledky vyhodnocovány izolovaně v rámci druhého trimestru, tak je screeningový test označován, v analogii k triple testu, jako kvadruple test. Je možné jej také doplnit v rámci kompletního integrovaného testu, obsahujícího inhibin A. V naší studii jsme se na vysoce rizikové populaci těhotných žen snažili ověřit, zda přidáním inhibinu A může dojít ke změně (zlepšení) screeningového parametru prediktivní hodnoty pozitivního testu, přičemž tato změna by měla být iniciována změnou distribuce rizik přítomnosti Downova syndromu v testovaných skupinách těhotných žen.

3.2 Cíle práce

Na základě výše uvedené hypotézy byly stanoveny následující cíle práce:

1. Zavést metodu stanovení inhibinu A včetně validace analytických parametrů.
2. Stanovit sérové hladiny inhibinu A v souboru gravidních žen.
3. Ověřit, zda může přidání inhibinu A ovlivnit stratifikaci rizika výskytu Downova syndromu u těhotných žen s pozitivním výsledkem screeningu u triple testu a integrovaného testu.
4. Určit, jaká je statistická významnost příspěvku inhibinu A ve skupině žen s pozitivním výsledkem screeningu Downova syndromu.
5. Vyhodnotit, zda může výsledek inhibinu A ovlivnit praktické provádění tohoto typu screeningu (ovlivnit prediktivní hodnotu pozitivního testu u dvou zkoumaných screeningových programů).

4 SOUBORY, MATERIÁL A METODY

4.1 Vyšetřované soubory těhotných žen

Srovnání výsledků screeningu Downova syndromu bylo provedeno ve dvou skupinách těhotných žen. Všechny těhotné ženy zařazené do studie podepsaly informovaný souhlas.

První skupina zahrnovala ženy, které absolvovaly screening ve 2. trimestru ve formě triple testu a jejich výsledek screeningu byl pozitivní – riziko přítomnosti hledaného onemocnění plodu bylo vyšší nebo rovno 1 : 300. V této skupině bylo testováno celkem 277 těhotných žen. Druhá skupina těhotných žen absolvovala integrovaný test a do této skupiny bylo zahrnuto 91 těhotných žen, které měly pozitivní výsledek screeningu. Pro integrovaný test jsme použili hranici positivity 1 : 150 (tab. 8).

Tab. 8 Základní demografická data souborů vyšetřovaných žen

parametr	Triple test (skupina A)	Integrovaný test (skupina B)	p-value
N	277	91	
Věk (roky)	33,86 (30,15; 36,56)	35,62 (32,85;37,76)	0,002
Hmotnost (kg)	67 (60;76)	68 (61;78)	0,866
Gestační stáří (dny)	113 (109;116)	112 (110;115)	0,077

4.2 Výpočet rizika přítomnosti Downova syndromu

Pro stanovení rizika přítomnosti Downova syndromu jsme použili počítačový program Alpha (Logical Medical Systems, 2018), který vypočítává riziko jak v prvním, tak ve druhém trimestru těhotenství. Ve skupině těhotných žen, které absolvovaly triple test, se pro výpočet rizika standardně používají biochemické parametry AFP, celkové HCG a uE3. Kromě toho je pro vyhodnocení třeba znát věk těhotné, přesné gestační stáří určené pomocí ultrazvuku, datum odběru krevního vzorku a hmotnost těhotné. Ve skupině těhotných žen, které absolvovaly integrovaný, test se navíc vyhodnocují při stanovení rizika dva biochemické parametry v 1. trimestru těhotenství – PAPP A a free β HCG. Dále se pro výpočet provádí také ultrazvukové měření nuchální translucence (The Fetal Medicine Foundation, 2018).

4.3 Stanovení inhibinu A

Pro stanovení inhibinu A jsme použili soupravu Beckman Coulter Access Inhibin A (Beckman Coulter, 2018). Souprava je určena pro IVD. Stanovení je založeno na paramagnetické částicové chemiluminiscenční imunoanalýze dimerického inhibinu A v lidském séru a plazmě (heparin a EDTA) jako pomůcka při diagnóze a monitorování různých hormonálních reprodukčních poruch. Koncentraci inhibinu A stanovenou touto soupravou lze použít v kombinaci s HCG, AFP a koncentracemi nekonjugovaného estriolu k vyhodnocení rizika Downova syndromu (trizomie 21). Tento přístup byl ověřen na bázi multivariační analýzy (MacRae A. R. et al., 2003).

Všechny vzorky krve těhotných žen byly do laboratoře dopraveny během dne, kdy byl proveden odběr krve (Walker B. S. et al., 2017). Následně byla provedena separace séra a vzorky byly do doby stanovení uchovány v lednici. Z hlediska stability je inhibin A stabilním analytem, jehož stanovení lze provést ze vzorku krve nebo séra uchovávaného při 4° C po dobu několika dnů, aniž by došlo k ovlivnění vlastního výsledku stanovení a tím také k ovlivnění výsledku rizika přítomnosti hledaného genetického onemocnění.

Stanovení Access Inhibin A je sekvenční dvoustupňová imunoenzymatická („sendvičová“) analýza. Do reakční kyvety se přidává 70 µl vzorku, který se inkubuje s paramagnetickými částicemi spárovanými s myší monoklonální protilátkou anti-inhibinu A. Přebytečný vzorek a reagentie se odstraní vymytím. Do reakční směsi se poté přidá konjugát alkalické fosfatázy s monoklonální protilátkou anti-inhibin A (myší) za účelem detekování inhibinu A navázaného na částice během předchozí inkubace. Po inkubaci v reakční kyvetě se materiály navázané na pevnou fázi udržují v magnetickém poli, zatímco nenavázané materiály se odplaví. Poté se do kyvety přidá chemiluminiscenční substrát Lumi-Phos* 530 a světlo generované reakcí se změří luminometrem. Produkce světla je přímo úměrná koncentraci inhibinu A ve vzorku. Množství analytu ve vzorku se stanoví z uložené vícebodové kalibrační křivky.

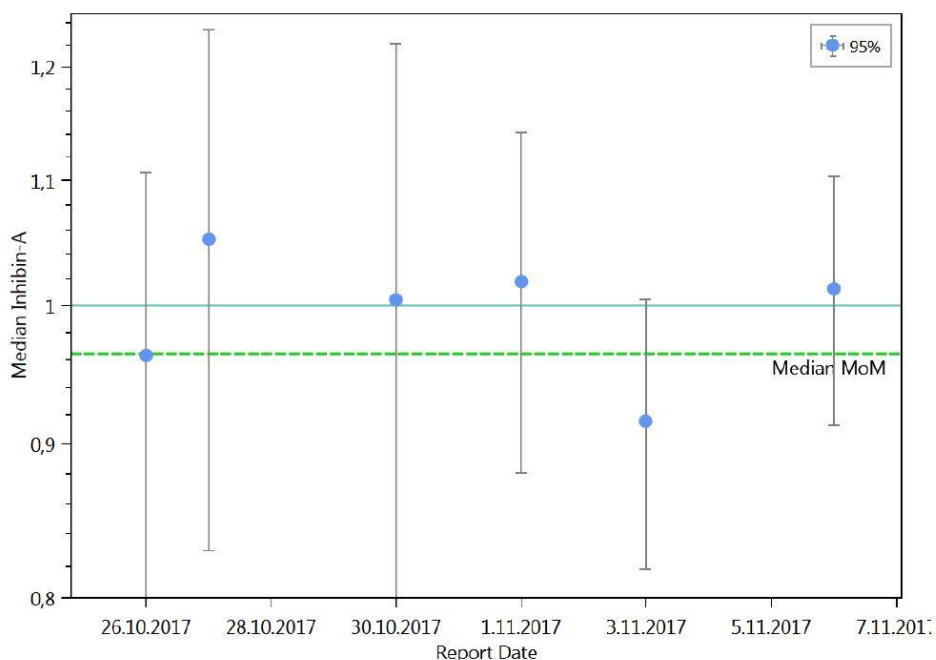
Výsledky stanovení inhibinu A jsou vyjádřeny v pg/ml. Pro konverzi do SI jednotek platí vztah $1 \text{ IU/mL (WHO 91/624)} = 26,7 \text{ pg/mL}$. Nejnižší detekovatelná hladina inhibinu A odlišitelná od nuly (Access Inhibin A Calibrator S0) s 95 % spolehlivostí je $< 1 \text{ pg/ml}$. Tato hodnota se určí zpracováním kompletní sedmibodové kalibrační křivky, kontrol a 10 replikátů nulového kalibrátoru u vícenásobných stanovení. Hodnota analytické senzitivity se vypočítá z křivky v místě, který představuje dvě směrodatné odchylky od průměrného naměřeného signálu nulového kalibrátoru. Vzorky je možno měřit v analytickém rozsahu $1 \text{ pg/ml} - 1500 \text{ pg/ml}$. Z praktického hlediska nás pro

účely našeho měření zajímalo koncentrační rozmezí od zhruba 50 pg/ml do 500 pg/ml, které odpovídá očekávaným hladinám inhibinu A u těhotných žen ve druhém trimestru těhotenství.

Výrobce Beckman Coulter deklaruje u této diagnostické soupravy některé další parametry, jako kontrolu linearity při ředění vzorků, opakovatelnost měření, mezilehlou preciznost měření a deklaruje také negativní interferenci s vybranými léčivými, jejichž použití přichází do úvahy v průběhu těhotenství. Podobným způsobem byla výrobcem testována možná zkřížená reaktivita u vybraných proteinů (aktiviny, AFP, hCG, LH, Prolaktin, folistatin) a nebyla zjištěna žádná signifikantní zkřížená reakce.

4.4 Výpočet revidovaného rizika přítomnosti Downova syndromu.

Pro účely prenatalního testování je nutné mít stanovené mediány hodnot inhibinu A pro jednotlivé týdny těhotenství, ve kterých se měření provádí. Počítačový program Alpha, který jsme pro výpočet rizika použili, hodnoty mediánů pro použitou metodiku Beckman Coulter obsahoval. Vlastní měření vzorků jsme prováděli v 6 bězích a vždy jsme v programu Alpha verifikovali u dané skupiny měření námi získané hodnoty mediánu. Program umožňuje vyhodnocení kvality provedených biochemických měření po výpočtu rizika přítomnosti Downova syndromu a v tomto ohledu všechna měření vyhověla požadovaným kritériím a nacházela se v 95 % intervalu spolehlivosti. (obr. 27).



Obr. 27 Analýza MoM v měřených skupinách inhibinu A v použitém programu Alpha – výstup ze statistického modulu programu

Násobky mediánu (MoM) u jednotlivých skupin měření jsou uvedeny v tabulce 9. Celkový MoM všech provedených měření byl 0,96. Vzhledem k tomu, že získané hodnoty inhibinu A splňovaly kvalitativní předpoklady pro začlenění do prenatalního screeningu, byly naměřené hodnoty inhibinu A použity k výpočtu revidovaného rizika přítomnosti Downova syndromu. Statistické srovnání původních a revidovaných rizik je detailně popsáno v části Výsledky.

Tab. 9 Verifikace MoM v měřených skupinách inhibinu A

Skupina měřených vzorků	Počet vzorků ve skupině	MoM
1	42	0,96
2	25	1,05
3	17	1,00
4	60	1,02
5	117	0,92
6	112	1,01
Celkem	373	0,96

4.5 Statistické metody

Data byla s ohledem na distribuci prezentována jako medián a interkvartilové rozpětí IQR (dolní kvartil-horní kvartil) v případě spojitých proměnných. V případě kategorických proměnných byla data prezentována formou čtyřpolní kontingenční tabulky jako absolutní, případně relativní četnosti. Pro testy hypotéz o vlivu skupiny (triple vs. integrovaný test) na spojitou proměnnou byl použit Wilcoxonův dvouvýběrový test (proc npar1way). Pro validaci a následnou analýzu dat byl použit statistický software SAS 9.4; 2016 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

4.6 Použitý materiál

Sérum těhotných žen ve 2. trimestru těhotenství

Diagnostická souprava pro stanovení inhibinu A, Beckman Coulter, Acces, A 36097

Kontrolní vzorky Access Inhibin A QC (QC1-QC3), 2 vials/level, 6 x 2,5 mL, A36100

Kalibrátory Access Inhibin A Calibrators (S0-S6), 7 x 2,5 mL, A36098

Souprava ředícího roztoku, A79783 (Pro použití se systémem UniCel DxI s funkcí ředění.)

Substrát Access Substrate, 81906

Promývací roztok UniCel DxI Wash Buffer II, A16793

Zkumavka alikvotační Sarstedt

Pasteurova pipeta jednorázová

Pipeta Amersham, EL34605

4.7 Přístrojové vybavení a software k vyhodnocení rizika přítomnosti Downova syndromu

Centrifuga Eppendorf 5702R

Třepačka Heidolph

Automatický imunochemický analyzátor Uni Cell DxI 800, Beckman Coulter

Chladicí zařízení Gorenje HS 3966

Mrazicí box Liebherr Premium,

Výpočetní technika

Software Alpha,

5 VÝSLEDKY

Celkový soubor zahrnoval 368 těhotných žen, z čehož 277 (75,3 %) bylo testováno pomocí screeningového testu, označovaného jako triple test (skupina A) a 91 těhotných žen (24,7 %) bylo testováno pomocí screeningového testu, označovaného jako integrovaný test (skupina B). U obou skupin se z pohledu iniciálního rizika u daného screeningového protokolu jednalo výhradně o pozitivní výsledky. V případě triple testu (skupina A) byl použit detekční limit (cut-off) 1 : 300, v případě integrovaného testu (skupina B) byl použit detekční limit (cut-off) 1 : 150. Medián věku těhotných žen ve skupině 1 byl 33,9 let (IQR - 30,2; 36,6); (IQR - Inter Kvartilové Rozmezí). Medián inhibinu A byl 121,4 pg/ml; (IQR - 88,9; 174,7), medián hmotnosti byl 67 kg (IQR - 60; 76), medián gestačního stáří byl 113 dnů (IQR - 109; 116), zjištěný medián rizika bez inhibinu A byl 0,01 (IQR - 0,006; 0,025), což znamená riziko 1/100 pro případ žen testovaných triple testem. Po použití výsledků inhibinu A a rekalkulaci rizika byl medián rizika stanoven na 0,003 (IQR - 0,001; 0,008). Ve skupině B byl věkový medián 35,6 roku (IQR - 32,9; 37,8), hladina inhibinu A byla 148,2 pg/ml (IQR - 96,2; 208,5), váha 68 kg (IQR - 61; 78), gestační stáří 112 dnů (IQR - 110; 115) a stanovený medián rizika bez inhibinu A byl 0,02 (IQR - 0,01; 0,04), což znamená riziko 2/100 v případě pacientek, které měly proveden integrovaný test. Po změření inhibinu A u těchto pacientek a přepočtu rizika byl medián rizika stanoven na hodnotu 0,006 (IQR - 0,002; 0,022). Výše uvedené údaje jsou uvedeny v tabulce 10.

Tab. 10 Základní demografická data vyšetřovaných žen a hodnoty inhibinu A

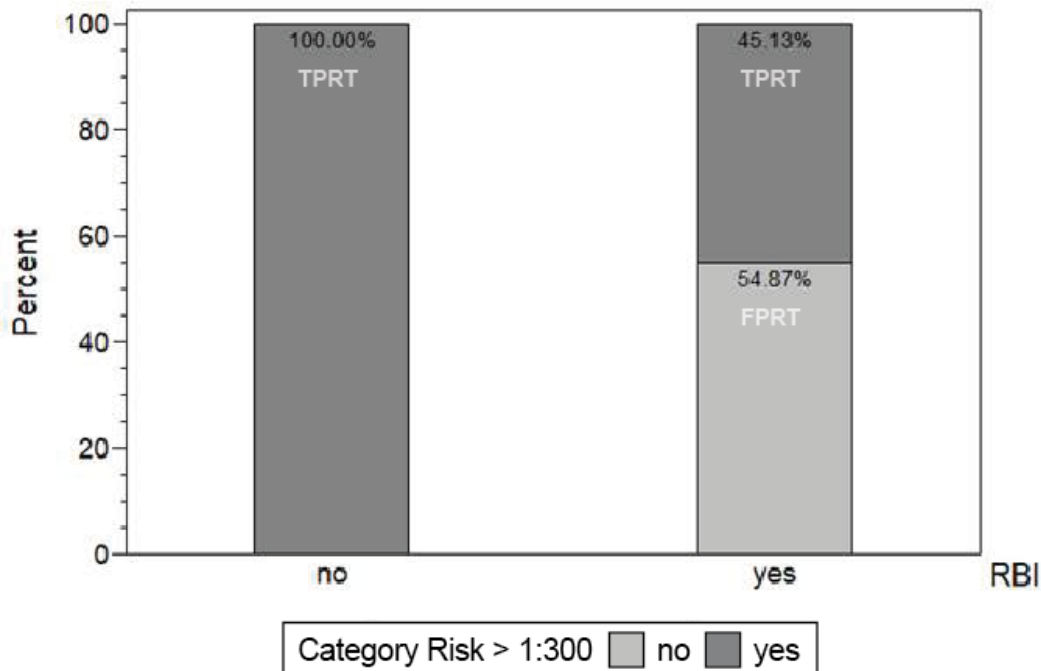
parametr	Triple test (skupina A)	Integrovaný test (skupina B)	p-value
N	277	91	
Věk (roky)	33,86 (30,15; 36,56)	35,62 (32,85;37,76)	0,002
Hmotnost (kg)	67 (60;76)	68 (61;78)	0,866
Gestační stáří (dny)	113 (109;116)	112 (110;115)	0,077
Riziko D.S. bez inhibinu A	0,018 (0,006;0,025)	0,011 (0,011;0,040)	
Inhibin A (pg/ml)	121,41 (88,88;174,71)	148,21 (96,21;208,5)	0,016
Riziko s inhibinem A celkové	0,003 (0,001;0,008)	0,006 (0,002;0,022)	

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl ve věku těhotných žen (p -value = 0,002), v hladině inhibinu A (p -value = 0,016). Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v případě hmotnosti těhotných žen a v případě gestačního stáří (p -value = 0,866, respektive p -value = 0,077).

Výsledky revidovaných rizik po přidání inhibinu A do screeningových testů (triple test a integrovaný test) jsme po přepočtu rozdělili do dvou kategorií, které jsme označili jako „true positive risk“ a „false positive risk“. Toto označení jsme zvolili pro srovnání rizik vypočtených v původních screeningových protokolech bez inhibinu A a revidovaných rizik v protokolech s inhibinem A. Toto označení nijak nesouvisí s falešnou pozitivitou samotných screeningových protokolů.

5.1 Srovnání skupin rizik u triple testu bez inhibinu A a s inhibinem A

Zjistili jsme, že po přidání inhibinu A a výpočtu nového rizika u triple testu zůstalo ve skupině žen, které měly riziko vyšší nebo rovno hodnotě 1/300, 125 žen (45,1 %). Tuto skupinu jsme označili jako „true positive risk - triple (TPRT)“. V případě, že riziko bylo po přidání inhibinu A nižší, méně než 1/300, tak jsme tuto skupinu označili jako „false positive risk - triple (FPRT)“. V této skupině bylo 152 těhotných žen (54,9 %) (obr. 28).



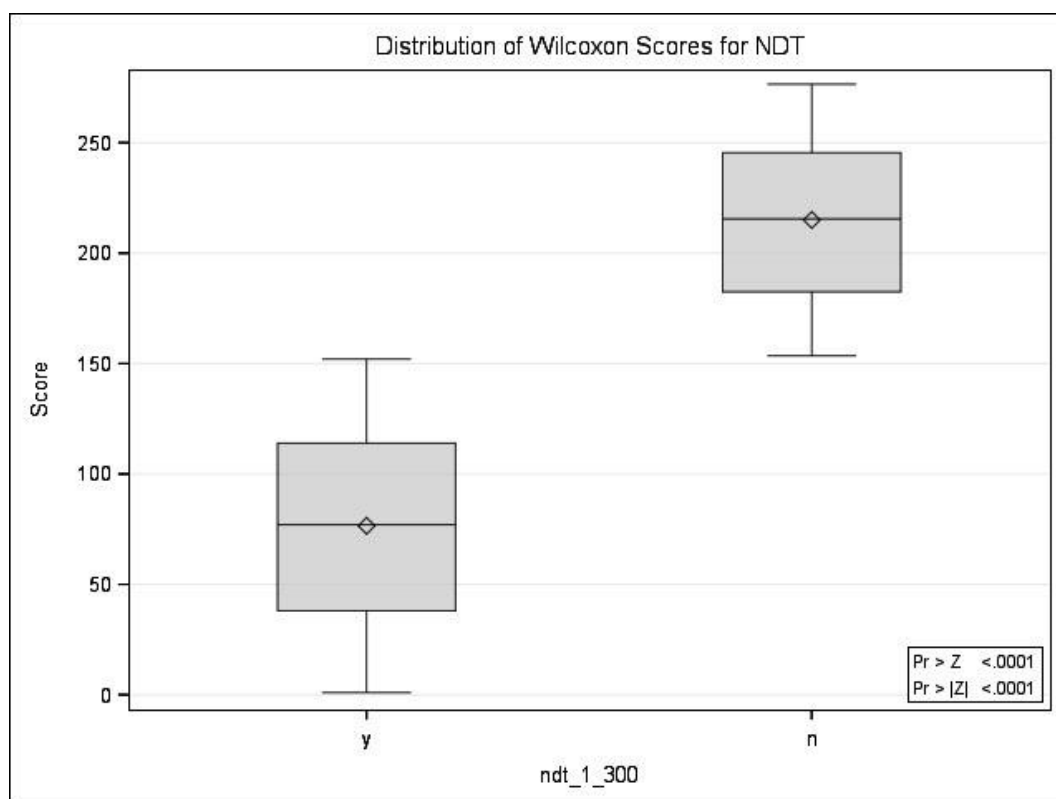
Obr. 28 Sloupcový graf skupin rizik triple testu bez inhibinu A a s inhibinem A.

Levý sloupec znázorňuje (obr. 28) všechna pozorování s rizikem vyšším nebo rovno 1/300 (platí pro protokol bez inhibinu A). Pravý sloupec značí revidované riziko s inhibinem A a poměr

pacientů, kteří mají riziko stále vyšší než 1/300 (TPRT) k pacientům, jejichž riziko pro přepočtu s inhibinem A je už nižší než cut-off 1/300 (FPRT). Lze tedy konstatovat, že po přidání inhibinu A do screeningové protokolu a výpočtu nových rizik došlo k významné změně v počtu pozitivních výsledků. Detekční limit zůstal stejný, tedy 1 : 300, ale z původně 277 pozitivních výsledků zůstalo pozitivních jenom 125. Naopak u 152 těhotných žen se pozitivní výsledek screeningu po přidání inhibinu A změnil na negativní.

5.2 Uspořádání hodnot rizik u triple testu ve skupině s inhibinem A

Jak bylo uvedeno výše, tak po přidání inhibinu A ve skupině těhotných žen, které absolvovaly triple test, došlo k vytvoření dvou skupin výsledků rizik. Při zachování rozhodovacího limitu 1 : 300 zůstalo ve skupině pozitivních výsledků (TPRT) 125 těhotných žen a 152 těhotných žen (FPRT) mělo po přidání inhibinu A výsledek screeningu negativní. Následující statistické zpracování a graf (obr. 29) ukazují, že po přidání inhibinu A došlo k významnému rozdělení rizik mezi skupinami TPRT a FPRT

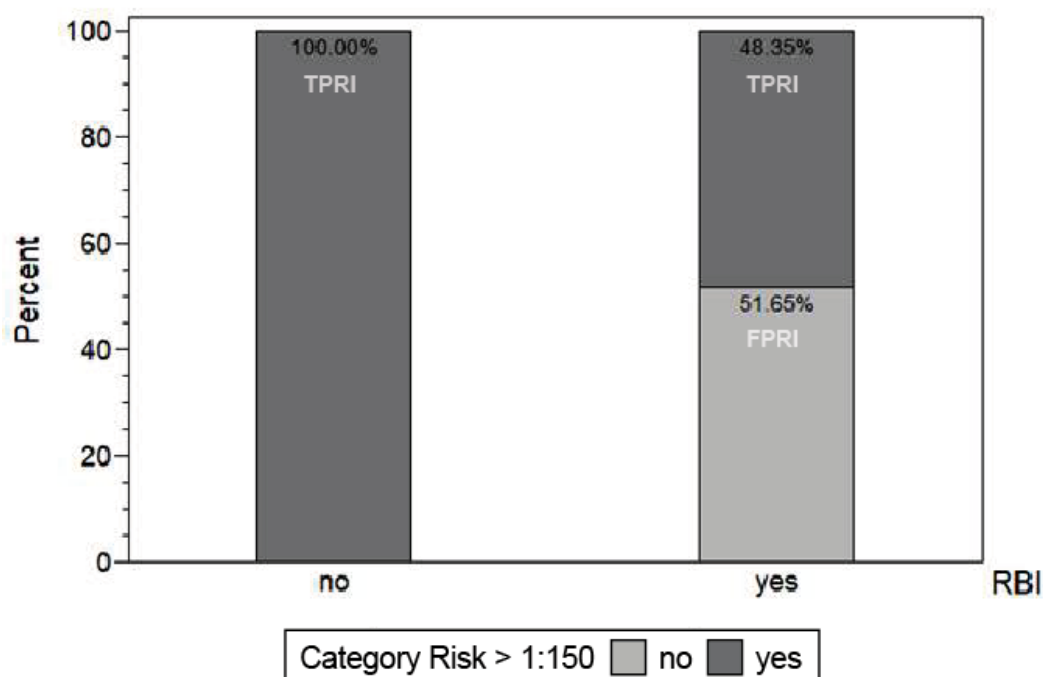


Obr. 29 Krabicový graf skóru (pořadí uspořádaných hodnot) Wilcoxonova dvouvýběrového testu. *ndt_1_300* značí riziko s inhibinem u triple testu.

Graf (obr. 29) je kategorizovaný podle proměnné falešně pozitivní riziko, kde y = riziko bylo menší než stanovená hladina 1/300 (FPRT), n = riziko bylo větší než stanovená hladina 1/300 (TPRT). Z grafu je patrné, že čím nižší je pořadí dané hodnoty, tím nižší je také riziko. Střední hodnota pořadí u FPRT byla 76,5 a u TPRT byla střední hodnota pořadí 215. Rozdělení rizik do dvou skupin (FPRT vs. TPRT), po přepočítání s vlivem inhibinu A, zřetelně ukazuje, že tento biochemický parametr má na odhad rizika statisticky signifikantní vliv. Medián rizika ve skupině TPRT byl 0,09 (IQR - 0,005; 0,025) a medián ve skupině FTRP byl po přidání inhibinu A a výpočtu nového rizika 0,0014 (IQR - 0,0007; 0,025), p-value byla menší než 0,0001. Na základě výše uvedených výsledků lze předpokládat, že zavedení inhibinu A do screeningového protokolu triple testu ovlivní distribuci rizik takovým způsobem, že skupina původně pozitivních výsledků se rozpadne na skupiny dvě. V jedné zůstanou pozitivní výsledky, jejichž střední hodnota rizika bude vyšší než v původní skupině bez inhibinu A. Ve druhé skupině budou výsledky, které se po přidání inhibinu A stanou negativními a jejich střední hodnota rizika bude významně za hranicí rozhodovacího limitu 1 : 300

5.3 Srovnání skupin rizik u integrovaného testu bez inhibinu A a s inhibinem A

Stejný přístup jsme použili v případě integrovaného testu, kde původní hranice rizika pro rozdělení výsledků do skupin „pozitivní“ a „negativní“ byla stanovena na 1/150. Změna rozhodovacího limitu je v případě integrovaného testu dána skutečností, že u integrovaného testu je využíváno více screeningových parametrů. Jedná se o ultrazvukové vyšetření nuchální translucence a stanovení PAPP A v prvním trimestru, ke kterým se přidávají po integraci biochemické markery testované ve druhém trimestru (triple test). Díky většímu počtu markerů je pro dosažení odpovídající senzitivity screeningu možno snížit rozhodovací limit na 1 : 150. „True positive risk - integrated (TPRI)“ byl po přidání inhibinu A detekován ve 44 (48,4 %) případech. Riziko po rekalkulaci bylo v tomto případě tedy stále vyšší nebo rovno 1/150.

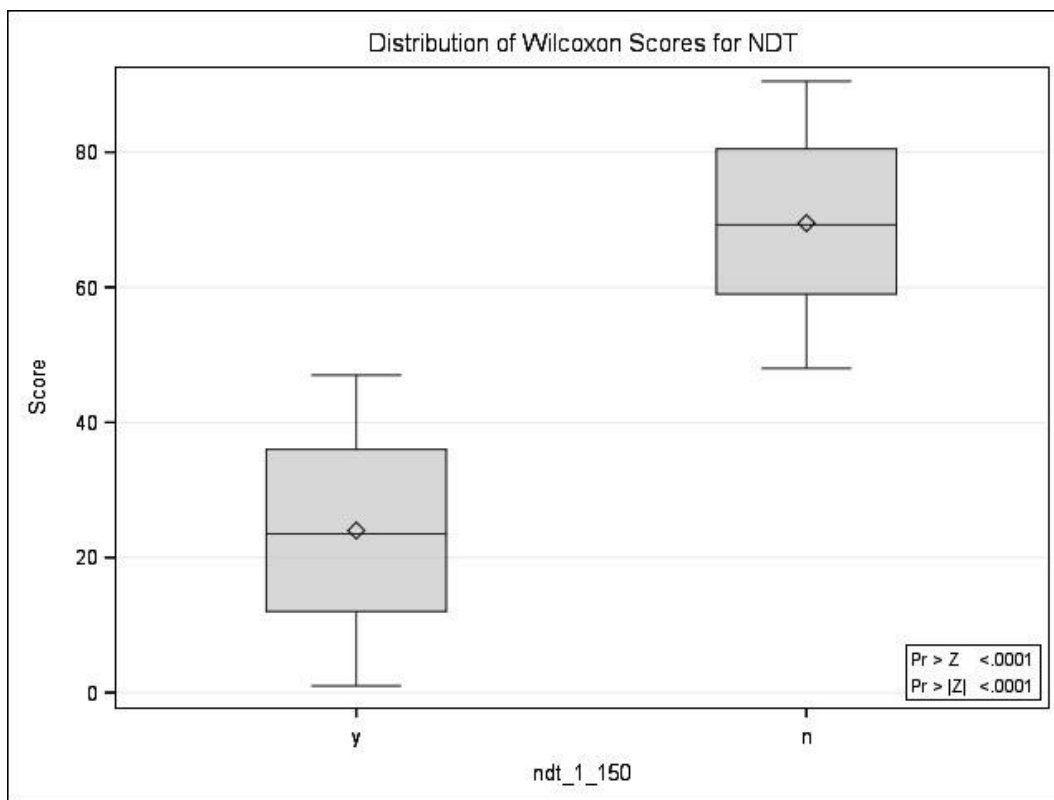


Obr. 30 Sloupcový graf skupin rizik integrovaného testu bez inhibinu A a s inhibinem A

Levý sloupec znázorňuje (obr. 30) všechna pozorování s rizikem vyšším nebo rovno 1/150 (platí pro protokol bez inhibinu A). Pravý sloupec značí revidované riziko s inhibinem A a poměr pacientů, kteří mají riziko stále vyšší než 1/150 (TPRI) k pacientům, jejichž riziko pro přepočtu s inhibinem A je už nižší než cut-off 1/150 (FPRI). Lze tedy konstatovat, podobně jako v případě triple testu, že po přidání inhibinu A do screeningové protokolu integrovaného testu a výpočtu nových rizik došlo k významné změně v počtu pozitivních výsledků. Detekční limit zůstal zachován, tedy 1 : 150, ale z původně 91 pozitivních výsledků bylo nadále pozitivních pouze 44. Naopak u 47 těhotných žen se pozitivní výsledek integrovaného testu po přidání inhibinu A změnil na negativní. Tato skupina žen by se v běžné screeningové praxi vyhnula dalšímu testování, ať už by se jednalo o provedení NIPT, nebo o provedení invazivní diagnostiky.

5.4 Uspořádání hodnot rizik u integrovaného testu ve skupině s inhibinem A

Stejně jako v případě triple testu jsme analyzovali rozdělení rizik mezi dvěma skupinami výsledků screeningu, které vznikly po přidání inhibinu A do screeningového protokolu integrovaného testu. Při zachování rozhodovacího limitu 1 : 150 zůstalo ve skupině pozitivních výsledků (TPRT) 44 těhotných žen a 47 těhotných žen (FPRT) mělo po přidání inhibinu A výsledek screeningu negativní. Následující statistické zpracování a graf (obr. 31) ukazují, že po přidání inhibinu A došlo k významnému rozdělení rizik mezi skupinami TPRT a FPRT.



Obr. 31 Krabicový graf skóru (pořadí uspořádaných hodnot) Wilcoxonova dvouvýběrového testu. *ndt_1_150* značí riziko s inhibinem u integrovaného testu.

Graf (obr. 31) je kategorizovaný podle proměnné falešně pozitivní riziko, kde y = riziko bylo menší než stanovená hladina 1/150 (FPRI), n = riziko bylo větší než stanovená hladina 1/150 (TPRI). Také z toho grafu, podobně jako u triple testu, je patrné, že čím nižší je pořadí dané hodnoty, tím menší je dané riziko. Střední hodnota pořadí u FPRI byla 24 a u TPRI byla 69,5. Medián rizika byl pro TPRI roven 0,024 (IQR - 0,0125; 0,0697). V případě výsledků rizika, které se po rekalkulaci zařadily do skupiny „false positive risk - integrated“ FPRI byl medián rizika 0,0024 (IQR - 0,0013; 0,0036) a v této skupině bylo 47 (51,6%) těhotných žen. Také v tomto případě došlo po přidání inhibinu A do screeningové protokolu k signifikantnímu rozdělení rizik do dvou skupin. V jedné zůstanou pozitivní výsledky, jejichž střední hodnota rizika byla vyšší než v původní skupině bez inhibinu A. Ve druhé skupině byly výsledky, které se po přidání inhibinu A staly negativními a jejich střední hodnota rizika byla významně za hranicí rozhodovacího limitu 1 : 150

6 DISKUSE

Obečným problémem všech screeningových programů využívaných v lékařské praxi jsou falešně pozitivní výsledky hledaných onemocnění tam, kde reálně onemocnění není přítomno. Stejným problémem jsou také případy, kdy onemocnění je přítomno, ale screeningovým testem není odhaleno, tedy situace, kdy výsledek screeningu je falešně negativní. Pokud je určitý test nebo vyšetření zvažováno pro využití v medicínském screeningu, tak musí být zřejmé, jaké onemocnění hledáme a s jakou frekvencí se vyskytuje ve zkoumané populaci, s jakou pravděpodobností jej odhalíme a s jakou pravděpodobností se nám to nepodaří. Pokud je screeningový test založen na vyšetření jednoho konkrétního parametru, tak se jedná o jednoduchý systém, jehož efektivita je zpravidla jednoduše stanovitelná. V případě prenatalního screeningu, zaměřeného na přítomnost Downova syndromu u nenarozených plodů, je situace komplikovanější. Vychází to ze skutečnosti, že je k dispozici několik biochemických parametrů, které mohou být vyšetřovány v různých stadiích těhotenství. Každý z těchto biochemických parametrů má svou vlastní senzitivitu a pravděpodobnostní koeficient (Leck I., Wald N. J., 2000), který určuje, s jakou pravděpodobností samostatně provedený test zachytí hledané onemocnění. Při využití více parametrů je celková pravděpodobnost dána součinem jednotlivých pravděpodobnostních koeficientů. Pokud provádíme biochemická vyšetření v 1. trimestru, tak si navíc musíme být vědomi, že v průběhu zhruba čtyř týdnů, kdy může být vyšetření provedeno, se efektivita jednotlivých vyšetření mírně mění (Palomaki G. E. et al., 2007). V prvním trimestru těhotenství, tedy při gestačním stáří plodu mezi 10. týdnem a nultým dnem až 13. týdnem a šestým dnem, je ovšem nejlepším samostatně prováděným screeningovým vyšetření měření nuchální translucence (NT) (FMF – Fetal Medicine Foundation). Vzhledem k tomu, že se jedná o ultrazvukové měření, jehož výsledkem je reálné číslo, tak je možno s ním statisticky pracovat stejným způsobem jako s výsledky biochemických vyšetření. Při porovnání biochemických výsledků a výsledků získaných při UZ měřeních je třeba si uvědomovat naprosto zásadní rozdíl z pohledu kontroly kvality. U biochemických měření se zpravidla jedná o výsledky, u kterých je zaručena vysoká míra reprodukovatelnosti, což vychází z provádění těchto testů na automatizovaných systémech. Kvalita ultrazvukových měření je daleko více závislá na konkrétním operátorovi a značný vliv má erudice ultrazvukového specialisty. Z praxe je patrné, že ani u jednoho konkrétního operátora nelze zaručit, že výsledek měření u jednoho těhotenství, provedený několikrát po sobě bude identický, resp. bude splňovat požadavky na přijatelnou reprodukovatelnost. V tomto případě ovšem může hrát roli nejen subjektivní vjem odečtu měření, ale také poloha plodu a tzv. ultrazvuková viditelnost, která je ovlivněna

např. hmotností těhotné ženy. Z výše uvedeného je patrné, že ačkoliv jsou výsledky biochemických testů používaných pro screening Downova syndromu u plodu o něco méně efektivní než měření NT, tak jejich dobrá reprodukovatelnost je činí při provádění tohoto typu screeningu nezastupitelnými. V prvním trimestru se rutinně používají dva biochemické markery PAPP – A a free β -hCG. V posledních letech se objevil další nadějný biochemický test, který je možno vyšetřovat v prvním trimestru a tím je PIGF. Využití PIGF je ovšem ve větší míře spojeno se stanovením rizika vzniku preklampsie (Verlohren S. et al., 2012). Určitou organizační komplikací při provádění kombinovaného testu s využitím PIGF je skutečnost, že je vhodné vzorek krve těhotné ženy vyšetřovat až v probíhajícím 14. týdnu (Wald N. J. et al., 2013), a tak by bylo potřeba provést dva odběry krve. V případě PAPP A a free beta HCG je v optimálním případě doporučován odběr v 11. nebo 12. týdnu těhotenství. Načasování doby odběru prvotrimestrálních biochemických látek vychází ze stanovení nejvyšších senzitivit těchto markerů vzhledem ke gestačnímu stáří plodu. Z pohledu těhotné ženy je kombinovaný test výhodným screeningovým testem, protože se výsledek screeningu dozví už v časnějším stádiu těhotenství. Na druhé straně je třeba vzít do úvahy, že určitým omezujícím faktorem je dostupnost kvalitního UZ vyšetření a zejména zajištění porovnatelnosti těchto ultrazvukových měření mezi jednotlivými pracovišti (operátory). V minulých letech byla efektivita kombinovaného testu v porovnání s výsledky z reálné praxe mírně nadhodnocována. Reálnou situaci zřejmě dobře dokumentují výsledky získané v rámci tzv. NEXT Study (Norton M. E. et al., 2015), kdy byla porovnávána efektivita kombinovaného testu a neinvazivního testu Harmony. Na souboru téměř dvaceti tisíc těhotných se prokázalo, že senzitivita kombinovaného testu nedosáhla ani 80 %. Dalším faktorem, který je třeba při hodnocení efektivity kombinovaného testu vzít do úvahy, je fakt, že zhruba jedna třetina těhotenství nesoucí postižený plod Downovým syndromem samovolně zanikne mezi prvním a druhým trimestrem těhotenství (Macintosh M. C. et al., 1995). Tato skutečnost statisticky ovlivňuje posouzení skutečné efektivity screeningu, která by samozřejmě měla být vztažena k těhotenství, které je ukončeno porodem.

Poněkud jiná situace je ve druhém trimestru těhotenství, kdy pro účely screeningu Downova syndromu jsou rutinně využívány pouze biochemické látky. V České republice se už od první poloviny devadesátých let stanovují AFP, uE3 a hCG v rámci tzv. triple testu. Je zajímavé, že ačkoliv v mnoha zemích světa (např. Velká Británie, USA, Německo a Itálie) se stanovuje jako čtvrtý parametr inhibin A, tak v České republice se tento test nikdy nestal standardní součástí biochemického prenatalního testování, a to i přes skutečnost, že efektivitu screeningu zvyšuje. Testování biochemických parametrů ve druhém trimestru může být ovšem také součástí integrovaného testu, který je nejefektivnější konvenční screeningovou strategií, tedy screeningem

neprováděným na bázi NIPT. V tomto případě se výsledek screeningu vyhodnocuje na základě souhrnného využití prvo i druhotrimetrálních markerů. Cílem naší studie bylo ověření, zda v našich podmínkách může inhibin A, jako čtvrtý biochemický marker vyšetřovaný ve druhém trimestru těhotenství, vylepšit provádění prenatalního screeningu Downova syndromu. Jak už bylo řečeno výše, posuzování efektivity screeningového protokolu se provádí srovnáním senzitivity, falešné pozitivivity, ev. vyjádřením pozitivní prediktivní hodnoty screeningového testu. Screeningem by mělo být objeveno, co možná nejvíce těhotenství, které mají postižený plod s hledaným onemocněním, ale na druhé straně je žádoucí, aby se zbytečně neprováděla další vyšetření na základě falešně pozitivních výsledků. Právě vysoké procento falešně pozitivních výsledků je nežádoucím jevem při provádění jakéhokoliv screeningu (Leck I., Wald N. J., 2000). Naše studie prokázala, že využití inhibinu A jako dalšího biochemického parametru má významný vliv na distribuci kalkulovaných rizik přítomnosti Downova syndromu jak u triple testu, tak u a integrovaného testu. Významnou roli při vyhodnocovací výsledků screeningu hraje také nastavení rozhodovacích limitů u jednotlivých screeningových programů. Snížení počtu falešně pozitivních výsledků příznivě ovlivňuje kvalitu prenatalního testování. V prvním případě může dojít ke snížení počtu zbytečně provedených invazivních zákroků (CVS, aminocentéza). Pokud by konvenční screeningový test byl použit v kombinaci s neinvazivním DNA testováním, tak lepší stratifikace rizika postižení plodu může přispět k efektivnějšímu využití NIPT. Je ovšem zřejmé, že pro celkové objektivní posouzení efektivity inhibinu A ve screeningových protokolech musí být testována obecná populace v daleko větším počtu těhotných žen. Musí být také vyhodnoceny informace o přítomnosti, či nepřítomnosti hledaného genetického onemocnění u plodů zkoumaných těhotenství (Wald N. J. et al., 2004; Malone F. D. et al., 2005).

Naše studie byla navržena tak, aby ověřila, jaká část pozitivních výsledků prenatalního screeningu Downova syndromu se změní na negativní po přidání inhibinu A. Výsledky potvrzují, že přidání inhibinu A jak do triple testu, tak do integrovaného testu významně sníží počet pozitivních výsledků a tím také počet zbytečně provedených invazivních zákroků a souvisejících genetických analýz. Díky velikosti testovaných souborů a uspořádání studie nebylo možné prokázat, jak se změní celková senzitivita a falešná pozitivita sledovaných screeningových protokolů. Pro tento účel by bylo třeba vyšetřit několik tisíc těhotenství, včetně prokázaných případů poškození plodu a celá studie by musela obsahovat výsledky screeningu celé populace, tedy ne jenom u výsledků s vysokým rizikem. Veškeré případy postižených plodů by musely být identifikovány buď pomocí prenatalní diagnostiky (CVS, aminocentéza a následná genetická analýza), nebo sledováním genetického statusu narozených dětí. U části těhotenství v naší studii

byla provedena invazivní diagnostika na základě výsledků screeningu bez inhibinu A. U některých těhotenství se nám podařilo získat informaci o stavu dítěte po narození. Jednalo se pouze o část těhotenství, což je popsáno níže.

Při pozitivním výsledku screeningu je těhotným ženám zpravidla nabídnuta invazivní diagnostika. V naší skupině těhotných, které absolvovaly triple test, byla provedena u 56 žen. Po přidání inhibinu A do výpočtu rizika a rozdělení žen do dvou skupin, s rizikem vyšším než 1 : 300 (TPRT) a nižším než 1 : 300 (FPRT), bylo v obou skupinách 28 žen, u nichž byla provedena invazivní diagnostika. Ve skupině TPRT byla potvrzena dvě těhotenství s Downovým syndromem, tedy jak samotný triple test, tak kvadruple test (triple test s inhibinem A) správně odhalily těhotenství s postiženým plodem. Ve druhé skupině FPRT, která měla původně pozitivní riziko a po přidání inhibinu A se riziko změnilo na negativní, bylo invazivní diagnostikou odhaleno jedno těhotenství s postiženým plodem. V tomto případě rekalkulace rizika s inhibinem A poskytla nesprávně negativní výsledek, který byl ovšem významně ovlivněn vysokou hladinou AFP. Ve skupině pacientek, které absolvovaly integrovaný test, byla invazivní diagnostika provedena u 39 žen. Po přidání inhibinu A do výpočtu rizika a rozdělení žen do dvou skupin, s rizikem vyšším než 1 : 150 (TPRI) a nižším než 1 : 150 (FPRI), bylo v první skupině 21 těhotných a ve druhé skupině 18 žen, u nichž byl proveden invazivní zákrok. Ve skupině TPRI byla potvrzena dvě těhotenství s Downovým syndromem. V tomto případě integrovaný test i integrovaný test s inhibinem A správně odhalily těhotenství s postiženým plodem. Ve druhé skupině FPRI, která měla původně pozitivní riziko a po přidání inhibinu A se riziko změnilo na negativní, bylo invazivní diagnostikou odhaleno jedno těhotenství s postiženým plodem. V tomto případě rekalkulace rizika s inhibinem A poskytla nesprávně negativní výsledek, který byl zřejmě ovlivněn jasně negativním UZ vyšetřením.

V roce 2012 byl do praxe uveden první screeningový test založený na sekvenaci extracelulární DNA plodu v krvi nastávající matky (NIPT) (Palomaki G. E. et al., 2011). Efektivita tohoto typu testování je v porovnání se všemi konvenčními screeningovými postupy výrazně vyšší, ale existuje několik důvodů, proč zřejmě v nejbližších letech nedojde k nahrazení konvenčních screeningových postupů za NIPT. Dostupnost tohoto typu testování je v porovnání s běžným biochemickým a ultrazvukovým vyšetřením omezenější, což vychází zejména z požadavků na přístrojové vybavení a erudici provádějících pracovníků. Dalším důvodem je také mnohem vyšší cena tohoto vyšetření v porovnání s běžnými biochemickými parametry. Alternativním způsobem využití NIPT je jeho začlenění do konvenčních screeningových postupů tak, aby došlo ke zlepšení základních charakteristik screeningu a přitom nedošlo k neúměrnému zvýšení nákladů na celkový

screeningový proces (Wald N. J., 2018). Z výše uvedených důvodů lze usuzovat, že zavedení inhibinu A do screeningového protokolu triple testu a integrovaného testu má stále svůj význam i v dnešní době, kdy jsou k dispozici sekvenační techniky. Zavedení inhibinu A do screeningového protokolu by se dle údajů Registru laboratoří zabývajících se screeningem VVV týkalo přibližně kolem 50 % těhotných žen v České republice (Registr laboratoří, 2018), tedy těch, které absolvují integrovaný test nebo triple test.

7 ZÁVĚR

V České republice není stanovení inhibinu A pro účely prenatalního screeningu prakticky prováděno. V rámci realizace této studie jsme zavedli stanovení inhibinu A a stanovili jsme sérové hladiny ve skupině těhotných žen s pozitivním výsledkem prenatalního screeningu. Pro toto stanovení jsme získali od těhotných žen informovaný souhlas.

První skupina testovaných těhotných žen v naší studii zahrnovala 277 žen, u kterých byl proveden triple test. Druhá skupina zahrnovala 91 těhotných žen, které prošly integrovaným testem. Po změření inhibinu A byl u všech výsledků proveden přepočítání rizika výskytu hledaného onemocnění a oba soubory byly statisticky porovnány. U části těhotných byla provedena také invazivní diagnostika, ale pro statistické hodnocení se jednalo o malé množství případů. Vzhledem k velikosti hodnoceného souboru a navrženému schématu nebylo cílem práce prezentovat komplexní dopad na všechny základní parametry screeningu – senzitivitu a falešnou pozitivitu, ale pouze posoudit vliv na distribuci rizik ve vysoce rizikových skupinách těhotných žen a tím posoudit možný vliv na pozitivní prediktivní hodnotu.

Námi získané výsledky byly publikovány v impaktované odborné literatuře a prokázaly, že:

- Přidání inhibinu A do screeningového protokolu triple testu a integrovaného testu významně ovlivňuje stratifikaci rizika výskytu Downova syndromu u plodů v těhotné populaci a snižuje počet pozitivních výsledků
- Jeho zavedení do screeningového protokolu statisticky významně ovlivňuje distribuci rizik ve skupině žen s pozitivním výsledkem screeningu Downova syndromu a vede k rozdělení výsledků do dvou skupin. První skupina zahrnuje výsledky, u kterých došlo k potvrzení positivity a druhá skupina zahrnuje těhotné ženy, jejichž výsledek rizika přítomnosti Downova syndromu u plodu se po přidání inhibinu A změnil na negativní. Rozdíl v distribuci rizik byl u obou testovaných skupin signifikantní.
- Lepší stratifikace rizik má praktický dopad pro provádění screeningu Downova syndromu v populaci, protože může přímo ovlivnit počet prováděných invazivních zákroků. Výsledky potvrzují, že zavedení inhibinu A do screeningového programu má významný vliv na prediktivní hodnotu pozitivního testu. Pro kompletní vyhodnocení významu inhibinu A by bylo třeba získat veškeré informace o výstupu těhotenství všech testovaných žen. Dále by bylo třeba studii rozšířit také o skupinu těhotných žen s negativním výsledkem testu.

8 SOUHRN

Prenatální testování je v současné době založeno na provádění ultrazvukového vyšetřování, stanovení některých biochemických látek a nejnověji také na analýze fragmentů mimobuněčné DNA plodu v krvi matky. Cílem této práce bylo ověření, zda stanovení inhibinu A u těhotných žen může přispět ke zpřesnění výsledků prenatálního screeningu (stanovení rizik) Downova syndromu a tím také ke snížení počtu zbytečně prováděných invazivních zákroků, případně k lepší stratifikaci rizik při rozhodování o využití neinvazivního DNA testování. Koncentrace inhibinu A byly měřeny pomocí paramagnetické částicové chemiluminiscenční imunoanalýzy na systému Access, Beckman Coulter. Vyhodnocení rizik screeningu bylo provedeno pomocí systému Alpha, LMS. Byly porovnávány výsledky u dvou skupin screeningových testů, triple testu a integrovaného testu. V prvním případě byla rizika v těchto dvou skupinách stanovena bez inhibinu A a zahrnovala pouze výsledky s vysokým rizikem. Následně byly do screeningových protokolů zahrnuty výsledky inhibinu A a stávající rizika byla revidována. První skupina screeningových testů (triple test) zahrnovala celkem 277 těhotných žen. Druhá skupina (integrovaný test) zahrnovala 91 těhotných žen. Výsledná rizika u těhotných byla bez stanovení inhibinu A vyšší nebo rovna 1 : 300 (triple test), resp. 1 : 150 (integrovaný test). Ve sledovaných skupinách bylo následně provedeno měření inhibinu A a byl proveden přepočítání rizik. V první skupině (triple test) došlo ke změně rizik na hodnoty nižší než 1 : 300 u 152 těhotných žen a ve druhé skupině (integrovaný test) u 47 těhotných žen. Všechny výsledky byly na konci studie porovnávány s výstupem těhotenství. Získané výsledky ukazují, že zahrnutí inhibinu A do screeningových protokolů významně ovlivňuje distribuci rizik při provádění screeningu Downova syndromu u těhotné populace.

9 SUMMARY

Currently, prenatal testing is based on an ultrasound examination, the testing of certain biochemical markers and most recently, also on the analysis of fragments from the extracellular DNA of the fetus in the mother's blood. The aim of this work was to verify whether inhibin A testing during pregnancy could help improve the results of prenatal screening (risk assessment) for Down syndrome and thus reduce the number of unnecessarily invasive procedures, or for better stratification of risks when deciding on non-invasive DNA testing. The concentrations of inhibin A were measured using chemiluminescent immunoassay with paramagnetic particles on the Access system from Beckman Coulter. Risk assessments of screenings were performed using Alpha software, LMS. The results were compared in two groups of screening tests, a triple test and an integrated test. In the first case, the risks in these two groups were determined without inhibin A and included only high-risk results. Subsequently, the inhibin A results were included in the screening protocols and the existing risks were revised.

The first group of screening tests (triple test) included a total of 277 pregnant women. The second group (integrated test) included 91 pregnant women. The resulting risk for pregnant women without the determination of inhibin A was higher or equal to 1 : 300 (triple test), respectively 1 : 150 (integrated test). Inhibin A was then measured in the monitored groups and the risk was recalculated. In the first group (triple test), the risk changed and was lower than 1 : 300 in 152 pregnant women and in the second group (the integrated test) in 47 pregnant women. At the end of the study, all results were compared to the outcome of the pregnancy. The results obtained, show that the inclusion of inhibin A in screening protocols significantly affect the distribution of risk in screenings for Down syndrome in the pregnant population.

10 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Baird D. T. and Smith K. B. (1993). Inhibin and related peptides in the regulation of reproduction. *Oxford reviews of reproductive biology*: **15**, 191–232.
2. BECKMAN COULTER. Beckman Coulter Diagnostics. Access Inhibin A, REF A36097 [online]. Beckman Coulter, Inc. ©2000-2018 (2018, May 25). Retrieved from: https://www.beckmancoulter.com/download/file/phxA83914F-CS_CZ/A83914F?type=pdf
3. Barth D. G. and Miyuki S. (2006). Intracellular trafficking. *WormBook, ed. The C. Elegans Research Community*. [online] Available at: <http://www.wormbook.org/chapters/www.intracellulartrafficking/intracellulartrafficking.html> [Accessed: 28-11-2018].
4. Barton D. E., Yang-Feng T. L., Mason A. J., Seeburg P. H. and Francke U. (1989). Mapping of genes for inhibin subunits α , β _A, and β _B on human and mouse chromosomes and studies of jsd mice. *Genomics*: **5**(1), 91–99.
5. Bestwick J. P., Huttly W. J. and Wald N. J. (2013). Detection of trisomy 18 and trisomy 13 using first and second trimester down's syndrome screening markers. *Journal of medical screening*: **20**(2), 57–65.
6. Bianchi D. W. and Wilkins-Haug L. (2014). Integration of noninvasive dna testing for aneuploidy into prenatal care: what has happened since the rubber met the road?. *Clinical chemistry*: **60**(1), 78–87.
7. Burger H. G. and Igarashi M. (1988). Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*: **2**(4), 391–2.
8. Canick J. A., Palomaki G. E., Kloza E. M., Lambert-Messerlian G. M. and Haddow J. E. (2013). The impact of maternal plasma dna fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenatal diagnosis*: **33**(7), 667–74.
9. Chiu R. W. K., Chan K. C. A., Gao Y., Lau V. Y. M., Zheng W., Leung T. Y., Foo C. H. F., Xie B., Tsui N. B. Y., Lun F. M. F., Zee B. C. Y., Lau T. K., Cantor C. R. and Lo Y. M. D. (2008). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of dna in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: **105**(51), 20458–63.
10. Committee on Practice Bulletins - Obstetrics, Committee on Genetics and the Society for Maternal-Fetal Medicine (2016). Practice bulletin no. 163: screening for fetal aneuploidy. *Obstetrics and gynecology*: **127**(5), 123–37.
11. Doherty G. J. and McMahon H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*: **78**, 857–902.
12. Fowler P., Evans L. W., Groome N. P., Templeton A. and Knight P. G. (1998). A longitudinal study of maternal serum inhibin-a, inhibin-b, activin-a, activin-ab, pro-alpha_C and follistatin during pregnancy. *Human reproduction (Oxford, England)*: **13**(12), 3530–6.

13. Good T., Weber P. S., Ireland J. L., Pulaski J., Padmanabhan V., Schneyer A. L., Lambert-Messerlian G., Ghosh B. R., Miller W. L. and Groome N. (1995). Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biology of reproduction*: **53**(6), 1478–88.
14. Gregg A. R., Gross S. J., Best R. G., Monaghan K. G., Bajaj K., Skotko B. G., Thompson B. H. and Watson M. S. (2013). ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*: **15**(5), 395–8.
15. Gupta M. K. and Chia S.-Y. (2013). Ovarian hormones: structure, biosynthesis, function, mechanism of action, and laboratory diagnosis. in *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*.: New York, NY: Springer New York, 1–30.
16. Hsueh A. J., Dahl K. D., Vaughan J., Tucker E., Rivier J., Bardin C. W. and Vale W. (1987). Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: **84**(14), 5082–6.
17. De Jong F. H. and Sharpe R. M. (1976). Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. *Nature*: **263**(5572), 71–72.
18. Kiserud C. E., Magelssen H., Fedorcsak P. and Fosså S. D. (2008). [Gonadal function after cancer treatment in adult men]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*: **128**(4), 461–5.
19. Leck I. and Wald N. J. (2000). Antenatal and neonatal screening. Oxford: Oxford University Press.
20. Ledger W. L. and Muttukrishna S. (2014). Inhibin, Activin and Follistatin in Human Reproductive Physiology. Edited by S. Muttukrishna. London: Imperial College Press.
21. Lo Y. M., Corbetta N., Chamberlain P. F., Rai V., Sargent I. L., Redman C. W. and Wainscoat J. S. (1997). Presence of fetal dna in maternal plasma and serum. *Lancet (London, England)*: **350**(9076), 485–7.
22. Lo Y. M., Zhang J., Leung T. N., Lau T. K., Chang A. M. Z. and Hjelm N. M. (1999). Rapid clearance of fetal dna from maternal plasma. *American journal of human genetics*: **64**(1), 218–24.
23. Lo Y. M. D. and Chiu R. W. K. (2012). Genomic analysis of fetal nucleic acids in maternal blood. *Annual review of genomics and human genetics*: **13**, 285–306.
24. LOGICAL MEDICAL SYSTEMS. Alpha Antenatal Screening Software. LMS [online]. Logical Medical Systems Ltd., ©2018 (2018, May 25). Retrieved from: <http://www.lmsalpha.com/>
25. Loucký J., Springer D. and Šubrt I. (2015). Doporučení o laboratorním screeningu vrozených vývojových vad v prvním a druhém trimestru těhotenství. *Klinická Biochemie a Metabolismus*: **23** (44)(1), 27–30.

26. Ľubušký M., Loucký J., Marková I., Vodička R., Procházka M. and Dvořák V. (2018). Genetická vyšetření v těhotenství. *Genetika v lékařské praxi*.: Praha: Galén.
27. Macintosh M.C., Wald N.J., Chard T., Hansen J., Mikkelsen M., Therkelsen A.J., Petersen G.B., Lundsteen C. (1995). Selective miscarriage of Down's syndrome fetuses in women aged 35 years and older. *Br J Obstet Gynaecol.* 102(10), 798-801.
28. MacRae A. R., Gardner H. A., Allen L. C., Tokmakejian S. and Lepage N. (2003). Outcome validation of the beckman coulter access analyzer in a second-trimester down syndrome serum screening application. *Clinical chemistry*: **49**(1), 69–76.
29. Makanji Y., Temple-Smith P. D., Walton K. L., Harrison C. A. and Robertson D. M. (2009). Inhibin b is a more potent suppressor of rat follicle-stimulating hormone release than inhibin a in vitro and in vivo. *Endocrinology*: **150**(10), 4784–4793.
30. Malone F. D., Canick J. A., Ball R. H., Nyberg D. A., Comstock C. H., Bukowski R., Berkowitz R. L., Gross S. J., Dugoff L., Craigo S. D., Timor-Tritsch I. E., Carr S. R., Wolfe H. M., Dukes K., Bianchi D. W., Rudnicka A. R., Hackshaw A. K., Lambert-Messerlian G., Wald N. J. *et al.* (2005). First-trimester or second-trimester screening, or both, for Down's syndrome. *The New England journal of medicine*: **353**(19), 2001–11.
31. Mason A. J., Hayflick J. S., Ling N., Esch F., Ueno N., Ying S.-Y., Guillemin R., Niall H. and Seeburg P. H. (1985). Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β . *Nature*: **318**(6047), 659–663.
32. Mason A. J., Niall H. D. and Seeburg P. H. (1986). Structure of two human ovarian inhibins. *Biochem Biophys Res Commun*: **135**, 957–964.
33. McCullagh D. R. (1932). Dual endocrine activity of the testes. *Science (New York, N.Y.)*: **76**(1957), 19–20.
34. McLachlan R. I., Healy D. L., Robertson D. M., Burger H. G. and de Kretser D. M. (1987). Circulating immunoreactive inhibin in the luteal phase and early gestation of women undergoing ovulation induction. *Fertility and sterility*: **48**(6), 1001–5.
35. Miyamoto K., Hasegawa Y., Fukuda M., Nomura M., Igarashi M., Kangawa K. and Matsuo H. (1985). Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32k daltons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*: **129**(2), 396–403.
36. Morris J. K., Wald N. J. and Watt H. C. (1999). Fetal loss in down syndrome pregnancies. *Prenatal diagnosis*: **19**(2), 142–5.
37. Muttukrishna S., George L., Fowler P. A., Groome N. P. and Knight P. G. (1995). Measurement of serum concentrations of inhibin-A (alpha-beta A dimer) during human pregnancy. *Clinical endocrinology*: **42**(4), 391–7.
38. Norton M. E., Brar H., Weiss J., Karimi A., Laurent L. C., Caughey A. B., Rodriguez M. H., Williams J., Mitchell M. E., Adair C. D., Lee H., Jacobsson B., Tomlinson M. W., Oepkes D., Hollemon D., Sparks A. B., Oliphant A. and Song K. (2012). Non-invasive

- chromosomal evaluation (NICE) study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *American journal of obstetrics and gynecology*.: Elsevier Inc. **207**(2), 137.e1-8.
39. Norton M.E., Jacobsson B., Swamy G.K, Laurent L.C., Ranzini A.C, Brar H., Tomlinson M.W., Pereira L., Spitz J.L., Holleman D., Cuckle H., Musci T.J., Wapner R.J. (2015). Cell-free DNA Analysis for Noninvasive Examination of Trisomy: *The New England Journal of Medicine* **372**(17), 1589-1597
 40. Palomaki G. E., Kloza E. M., Lambert-Messerlian G. M., Haddow J. E., Neveux L. M., Ehrich M., van den Boom D., Bombard A. T., Deciu C., Grody W. W., Nelson S. F. and Canick J. A. (2011). DNA sequencing of maternal plasma to detect down syndrome: an international clinical validation study. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*: **13**(11), 913–20.
 41. Palomaki G. E., Lambert-Messerlian G. M. and Canick J. A. (2007). A summary analysis of Down syndrome markers in the late first trimester. *Advances in clinical chemistry*: **43**, 177–210.
 42. Petraglia F., Sawchenko P., Lim a T., Rivier J. and Vale W. (1987). Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta. *Science (New York, N.Y.)*: **237**(4811), 187–189.
 43. Polák P., Loucký J. and Tomek V. (2017). Prenatální diagnostika vrožených vývojových vad. Jessenius. Praha: Maxdorf (Jessenius).
 44. Registr laboratoří zabývajících se screeningem VVV. (2018, December 21). Retrieved from: <http://www1.lf1.cuni.cz/~dbezd/>
 45. Robertson D. M., Sullivan J., Watson M. and Cahir N. (1995). Inhibin forms in human plasma. *The Journal of endocrinology*: **144**(2), 261–9.
 46. Robertson D., Burger H. G., Sullivan J., Cahir N., Groome N., Poncelet E., Franchimont P., Woodruff T. and Mather J. P. (1996). Biological and immunological characterization of inhibin forms in human plasma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: **81**(2), 669–676.
 47. Savva G. M., Walker K. and Morris J. K. (2010). The maternal age-specific live birth prevalence of trisomies 13 and 18 compared to trisomy 21 (Down syndrome). *Prenatal diagnosis*: **30**(1), 57–64.
 48. Setchell B. P. and Jacks F. (1974). Inhibin-like activity in rete testis fluid. *The Journal of endocrinology*: **62**(3), 675–6.
 49. Společnost lékařské genetiky ČLS JEP (2014). Provádění všeobecného prenatálního screeningu vrožených vývojových vad. *Klinická biochemie a metabolismus*: **22 (43)**(1), 40–42.
 50. Stenvers K. L. and Findlay J. K. (2010). Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends in endocrinology and metabolism*. Elsevier: **21**(3), 174–80.
 51. Sugino K., Kurosawa N., Nakamura T., Takio K., Shimasaki S., Ling N., Titani K. and

- Sugino H. (1993). Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *The Journal of biological chemistry*: **268**(21), 15579–87.
52. THE FETAL MEDICINE FOUNDATION. FMF Certification. FMF [online]. The Fetal Medicine Foundation, ©2018 (2018, May 25). Retrieved from: <https://fetalmedicine.org/fmf-certification/certificates-of-competence/nuchal-translucency-scan>
 53. Verlohren S., Herraiz I., Lapaire O., et al. (2012) The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol*: **206**(1), 58.e1-8.
 54. Wald N. J., Densem J. W., George L., Muttukrishna S. and Knight P. G. (1996). Prenatal screening for Down's syndrome using inhibin-A as a serum marker. *Prenatal diagnosis*: **16**(2), 143–53.
 55. Wald N. J., Rodeck C., Hackshaw A. K. and Rudnicka A. (2004). SURUSS in perspective. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*: **111**(6), 521–531.
 56. Wald N. J. (2018). Prenatal reflex dna screening for trisomy 21, 18 and 13. *Expert review of molecular diagnostics*.: Taylor & Francis **18**(5), 399–401.
 57. Wald N. J. and Cuckle H. S. (1984). Open neural-tube defects. in Wald, N. J. (ed.) *Antenatal and neonatal screening*: 1st edn. Oxford: Oxford University Press, 25–73.
 58. Wald N. J. and Hackshaw A. K. (1997). Combining ultrasound and biochemistry in first-trimester screening for down's syndrome. *Prenatal diagnosis*: **17**(9), 821–9.
 59. Wald N.J., Bestwick J.P., Huttly W.J. (2013). Improvements in antenatal screening for Down's syndrome. *J Med Screen*: **(20)** 7–14
 60. Walker B. S., Barakauskas V. E., Grenache D. G. and Schmidt R. L. (2017). Effect of preanalytical factors on the stability of maternal serum biomarkers and calculated risk for trisomy 21, trisomy 18, and open neural tube defect. *The Journal of Applied Laboratory Medicine: An AACC Publication*: **1**(6), 690–701.
 61. Woodruff T. K., Lyon R. J., Hansen S. E., Rice G. C. and Mather J. P. (1990). Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology*: **127**(6), 3196–3205.
 62. Woodruff T. K., Krummen L. A., Chen S. A., DeGuzman G., Lyon R., Baly D. L., Allison D. E., Garg S., Wong W. L. and Hebert N. (1993a). Pharmacokinetic profile of recombinant human (rh) inhibin A and activin A in the immature rat. I. serum profile of rh-inhibin A and rh-activin A in the immature female rat. *Endocrinology*: **132**(2), 715–24.
 63. Woodruff T. K., Krummen L. A., Chen S. A., Lyon R., Hansen S. E., DeGuzman G., Covello R., Mather J. and Cossum P. (1993b). Pharmacokinetic profile of recombinant human (rh) inhibin A and activin A in the immature rat. II. tissue distribution of [¹²⁵i]rh-inhibin A and [¹²⁵i]rh-activin A in immature female and male rats. *Endocrinology*: **132**(2), 725–34.

64. Wright C. (2009). Cell-free fetal nucleic acids for non-invasive prenatal diagnosis. Report of the UK expert working group.
65. Ying S. Y. (1988). Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews*: **9**(2), 267–293.

11 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1 Hypotalamo-hypofyzárně-gonadální osa ženy	11
Obr. 2 Hypotalamo-hypofyzárně-gonadální osa muže	12
Obr. 3 Podjednotkové složení inhibinů a aktivinů.....	13
Obr. 4 Mechanismus působení aktivinů a inhibinů přes membránový receptor.....	15
Obr. 5 Mechanismus receptorem zprostředkované endocytózy za účasti klathrinu	16
Obr. 6 Prevalence trizomie 21, trizomie 18 a trizomie 13	18
Obr. 7 Příklad rozdělení hodnot biochemického markeru AFP v souboru těhotných se zdravým a postiženým plodem.....	20
Obr. 8 Příklad rozdělení hodnot biochemického markeru AFP v souboru těhotných se zdravým a postiženým plodem s přiřazeným vyjádřením rizika.....	20
Obr. 9 Vztah mezi senzitivitou a falešnou pozitivitou u screeningových testů (ROC křivka)	22
Obr. 10 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Downovým syndromem v 1. trimestru (FASTER Study).....	28
Obr. 11 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Downovým syndromem ve 2. trimestru.....	28
Obr. 12 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Edwardsovým syndromem v 1. trimestru	29
Obr. 13 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Edwardsovým syndromem ve 2. trimestru.....	29
Obr. 14 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Patauovým syndromem v 1. trimestru	30
Obr. 15 Hladiny biochemických markerů u těhotenství s Patauovým syndromem ve 2. trimestru.....	30
Obr. 16 Schematické znázornění provádění kombinovaného kontingenčního testu	34
Obr. 17 Schematické znázornění provádění kombinovaného testu v rámci sekvenčního integrovaného testu	35
Obr. 18 Grafické znázornění efektivity screeningových testů při 5 % FPR.....	38
Obr. 19 Schematické znázornění přechodu fetální a maternální extracelulární DNA do krevního oběhu matky.....	40
Obr. 20 Pokles obsahu extracelulární DNA fetálního původu po porodu	41
Obr. 21 Apoptóza buněk trofoblastu a průchod genetické informace plodu do krve matky s možnostmi detekce.....	42
Obr. 22 Zastoupení genetické výbavy mezi jednotlivými chromozomy	43
Obr. 23 Schematické znázornění postupu při provádění NIPT	45
Obr. 24 Závislost obsahu fetální frakce na týdnu gestačního stáří	46
Obr. 25 Význam fetální frakce	46
Obr. 26 Možné schéma uspořádání kombinace běžného screeningu a NIPT (reflexní DNA testování	48

Obr. 27 Analýza MoM v měřených skupinách inhibinu A v použitém programu Alpha – výstup ze statistického modulu programu	53
Obr. 28 Sloupcový graf skupin rizik triple testu bez inhibinu A a s inhibinem A.....	57
Obr. 29 Krabicový graf skóřů (pořadí uspořádaných hodnot) Wilcoxonova dvouvýběřového testu. ndt_1_300 značí riziko s inhibinem u triple testu.	58
Obr. 30 Sloupcový graf skupin rizik integrovaného testu bez inhibinu A a s inhibinem A	60
Obr. 31 Krabicový graf skóřů (pořadí uspořádaných hodnot) Wilcoxonova dvouvýběřového testu. ndt_1_150 značí riziko s inhibinem u integrovaného testu.	61
Tab. 1 Matematické vyjádřeni senzitivity a falešné pozitivita při prováděni screeningových testů	21
Tab. 2 Markery 1. trimestru a jejich senzitivita v závislosti na týdnu těhotenství.....	32
Tab. 3 Průměrné hodnoty mediánů u plodů s Downovým syndromem.....	32
Tab. 4 Markery 2. trimestru - senzitivita (15. - 18. týden).....	37
Tab. 5 Hodnoty markerů (MoM) u plodů s Downovým syndromem ve 2. trimestru těhotenství	37
Tab. 6 Srovnání efektivity screeningových testů pro 5 % FPR a odpovídající nastavení cut-off.....	38
Tab. 7 Princip rozlišení postiženého těhotenství na základě různého obsahu fetální frakce	44
Tab. 8 Základní demografická data souborů vyšetřovaných žen.....	51
Tab. 9 Verifikace MoM v měřených skupinách inhibinu A	54
Tab. 10 Základní demografická data vyšetřovaných žen a hodnoty inhibinu A.....	56

12 PŘÍLOHY

A) Publikace související s tématem dizertační práce

aa) Publikace s IF

1. Lambert-Messerlian G., Kloza E. M., Williams J., **Loucky J.**, O'Brien B., Wilkins-Haug L., Mahoney M. J., De Biasio P., Borrell A., Ehrich M., Van den Boom D., Bombard T.A. Deciu C., Palomaki G.E.: Maternal plasma DNA testing for aneuploidy in pregnancies achieved by assisted reproductive technologies, *Genetics in medicine*, 2014, 5, 419-422 (**IF 6,435**)
2. Springer D., **Loucky J.**, Potlukova E., Limanova Z., Zima, T.: Recommendations on prenatal screening around the world and connections to other diseases such as thyropathy. *Clinical chemistry and Laboratory Medicine*, *Clinical chemistry and Laboratory Medicine*, *Clin Chem Lab Med* 2011; 49, Special Suppl. (**IF 2,069**)
3. Springer D., **Loucky J.**, Tesner P., Cutka D., Stejskal D., Gregor V., Zima T.: Importance of the integrated test in the Down's syndrome screening algorithm, *Journal of Medical Screening*, 2018, 25, 114-118 (**IF 2,689**)
4. **Loucky J.**, Belaskova S., Prusa R., Kotaska K.: The effect of inhibin A on prenatal screening results for down syndrome in the high risk Czech pregnant women, *Clinical laboratory*, 2019 (**IF 1,03**), v tisku

ab) Publikace bez IF

1. **Loucký J.**, Springer D., Zima T.: Možnosti screeningu Downova syndromu v České republice. *Česká gynekologie*, 2008;73(3):160-2.
2. **Loucký J.**: Význam nejistoty měření při antenatálním screeningu Downova syndromu. *Actual Gyn.* 2010; 2, 5-9

3. **Loucký J**, Zemánek M.: Neinvazivní prenatalní diagnostika nejčastějších chromozomálních aneuploidii – od teorie k praxi. *Actual Gyn.* 2012; 4, 99-100
4. **Loucký J**, Zemánek M.: Neinvazivní prenatalní diagnostika nejčastějších chromozomálních aneuploidii – některé další aspekty. *Actual Gyn.* 2013; 5, 6-7
5. Šantavý J., Stejskal D., **Loucký J.**, Šubrt I., Všetická J., Gregor V., Macek M jr. Indikace genetických laboratorních vyšetření lidského zárodečného genomu. *Actual Gyn.* 2014; 6, 23-25
6. Šantavý J., Stejskal D., **Loucký J.**, Šubrt I., Všetická J., Gregor V., Macek M jr. Provádění všeobecného prenatalního screeningu vrozených vývojových vad. *Actual Gyn.* 2014; 6, 19-22
7. Springer D., **Loucký J.**, Zima T.: Screening Downova syndromu a jeho další perspektivy, *Postgraduální medicína* 2015, 2, 211-216
8. **Loucký J.**, Springer D., Šubrt I. (2015). Doporučení o laboratorním screeningu vrozených vývojových vad v prvním a druhém trimestru těhotenství. *Klinická Biochemie a Metabolismus* 2015; 23 (44) (1), 27–30.
9. **Loucký J.**: Prenatální screening vrozených vývojových vad plodu a biochemická diagnostika, in Průša R. et al.: *Průvodce laboratorními nálezy*, C 5.4 (1-24), Dr. Josef Raabe, Praha, 2012, ISBN 978-80-87553-68-8
10. Brdička R., Didden W.: *Genetika v klinické praxi*, Kapitola 6, Ľubušký M., **Loucký J.**, Marková I., Vodička R., Procházka M., Dvořák V.: *Genetická vyšetření v těhotenství*; Galen, Praha, 2015, ISBN 978-80-7492-182-7
11. Polák P., **Loucký J.**, Tomek V.: *Prenatální diagnostika vrozených vývojových vad*, Maxdorf Jesenius, Praha, 2017, ISBN 978-80-7345-499-9

B) Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce

ba) Publikace s IF

1. Dostal K., Prihoda J., Stoklasek S., **Loucky J.**, Pinkas J., Grossmann G., Ohms G.: Synthesis, properties and NMR Investigation of Phenylphosphonothioic Acid Bis-(Trimethylsilylamide) And 1,3-Bis(trimethylsilyl)-2,4-Diphenyl-2,4-Dithioxo-1,3,2-Lambda-5,4-Lambda-5-Diazadiphosphetidine. Zeitschrift fur Anorganische und Allgemeine Chemie, 1989 Sep, (576):54-64 (**IF 1,247**)
2. Oral I., Stejskal D., **Loucký J.**, Šišlák Z., Coufal Z., Mistrík J., Náplava R.: Impact of acute fluid restriction on levels of natriuretic peptides in patients on a chronic dialysis program. Journal Of Hypertension, 2005 Jun (23):368-369 (**IF 3,98**)

bb) Publikace bez IF

1. Oral I., Stejskal D., **Loucký J.**, Šišlák Z., Coufal Z., Mistrík J., Náplava R.: Impact of acute fluid restriction on levels of natriuretic peptides in patients on a chronic dialysis program. Vnitřní lékařství, 2004 Nov;50(11):812-7.