

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Markéta Dvořáková

Hodnocení záchytu abnormálních genetických variant metodami cytogenomiky u jedinců
s poruchami autistického spektra

Evaluation of the detection of abnormal genetic variants by cytogenomic methods in
individuals with autism spectrum disorder

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Slámová, Ph.D.

Praha, 2025

Prohlášení:

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

V Praze, 29. 04. 2025

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce RNDr. Zuzaně Slámové, Ph.D. nejen za odborné vedení, připomínky a čas věnovaný této práci, ale také za úsilí vynaložené k předání praktických zkušeností při výzkumu v laboratoři. Rovněž děkuji vedoucí cytogenetického oddělení ÚBLG 2. LF UK a FN v Motole, RNDr. Drahůši Novotné za umožnění vypracování této práce a veškerou pomoc. Nemalé poděkování patří i dalším členům oddělení, kteří se na pomoci s výzkumem a zhotovením práce podíleli, a rovněž mé rodině, která mne při psaní podporovala.

Abstrakt:

Poruchy autistického spektra jsou velmi komplexní a heterogenní skupinou obtíží ovlivňující fyzický a psychický stav jedince na mnoha různých úrovních. Nezanedbatelná je rovněž prevalence autismu, která je odhadována na 0,5–3,5 % populace. Na etiologii poruch autistického spektra se podílí nejen faktory prostředí, ale také genetické faktory. Významný podíl těchto genetických aspektů tvoří varianty v počtu kopií. V závislosti na jejich lokaci v genomu a zasažení konkrétních genů mohou mít tyto varianty různé klinické důsledky. U osob s poruchami autistického spektra jsou některé z abnormálních variant pozorovány signifikantně častěji.

Hlavní náplní této diplomové práce je pomocí vybraných cytogenomických metod (karyotypování, fluorescenční *in-situ* hybridizace a array komparativní genomové hybridizace) detekovat abnormální varianty v genomu jedinců s poruchou autistického spektra a následně tyto nálezy zhodnotit dle klinického dopadu. Práce obsahuje podrobný výčet, hodnocení a analýzu abnormálních variant nalezených u souboru jedinců s autismem či dalšími neurovývojovými obtížemi. Věnuje se zasaženým chromozomovým lokusům a funkcím jednotlivých genů. Práce se rovněž zabývá charakterizací zkoumaného souboru pacientů s ohledem na prevalenci autismu mezi pohlavími či zátěží jedinců a celých rodin neurovývojovými onemocněními. V závěru práce jsou uvedeny kazuistiky vybraných pacientů.

Práce rovněž zkoumá vztah mezi genetickými aspekty, autismem a mnohými dalšími neurovývojovými obtížemi (např. porucha pozornosti s hyperaktivitou, depresivní porucha, obsedantně-kompulzivní porucha, schizofrenie či epilepsie). Byla testována hypotéza zjišťující, zda se abnormální genetické varianty vyskytují častěji u pacientů s autismem a zmíněnými komorbidními obtížemi než u pacientů s izolovaným autismem. Námi shromážděná data tuto hypotézu nepodpořila, avšak mohou naznačovat možný trend 2,24krát vyšší pravděpodobnosti výskytu abnormální varianty u pacientů s neurovývojovými komorbiditami než u pacientů bez těchto přidružených obtíží. Je diskutováno možné ovlivnění výsledků značnou šíří variability, jež je pro poruchy autistického spektra charakteristická.

Klíčová slova:

Poruchy autistického spektra (PAS), varianty v počtu kopií (CNV), neurovývojová onemocnění (NVO), array komparativní genomová hybridizace (array CGH)

Abstract:

Autism spectrum disorders are a complex and heterogeneous group of difficulties affecting the physical and psychological state of an individual on many different levels. The prevalence of autism is also notable, estimated at 0.5–3.5 % of the population. Not only environmental factors but also genetic factors are involved in the etiology of autism spectrum disorders. Large proportion of these genetic aspects is represented by copy number variants. Depending on their location in the genome and the specific genes affected, these variants can have different clinical consequences. Some of these abnormal variants are observed significantly more often in individuals with autism spectrum disorders.

The main focus of this diploma thesis is to use selected cytogenomic methods (karyotyping, fluorescent *in-situ* hybridization and array comparative genomic hybridization) to detect abnormal variants in the genome of individuals with autism spectrum disorder and then to evaluate these findings according to clinical impact. The paper includes a detailed enumeration, evaluation and analysis of abnormal variants found in a cohort of individuals with autism or other neurodevelopmental difficulties. It focuses on the affected chromosomal loci and the function of individual genes. The paper also summarizes the characterization of the studied patient population with regard to the prevalence of autism between genders or the burden of neurodevelopmental disorders on individuals and entire families. Case reports of selected patients are also presented at the end of the thesis.

The paper also investigates the relationship between genetic aspects, autism and many other neurodevelopmental disorders (e.g. attention deficit hyperactivity disorder, depressive disorder, obsessive-compulsive disorder, schizophrenia or epilepsy). A hypothesis was tested to determine whether abnormal genetic variants are more common in patients with autism and these comorbid conditions than in patients with isolated autism. Our data did not support this hypothesis, but may suggest a possible trend of a 2.24-fold higher likelihood of an abnormal variant occurring in patients with neurodevelopmental comorbidities than in patients without these associated difficulties. The possible influence of the considerable range of variability that characterizes autism spectrum disorders on these results is discussed.

Keywords:

Autism spectrum disorders (ASD), copy number variants (CNVs), neurodevelopmental disorders (NDD), array comparative genomic hybridization (array CGH)

Seznam použitých zkratk

aCGH	komparativní genomová hybridizace na čipu (Array Comparative Genomic Hybridization)
AD	autozomálně dominantní dědičnost
ADD	porucha pozornosti (Attention Deficit Disorder)
ADHD	porucha pozornosti s hyperaktivitou (Attention Deficit Hyperactivity Disorder)
AR	autozomálně recesivní dědičnost
AR_P	přenašečství autozomálně recesivního onemocnění
BAP	širší autistický fenotyp (Broader Autism Phenotype)
BMI	index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
BP	zlomové místo (Breaking Point)
bpn	bez patologického nálezu
CCD	zařízení pro snímání obrazové informace (Charge-Coupled Device)
CI	interval spolehlivosti (Confidence Interval)
ClinGen	databáze Clinical Genome
CNV	varianty v počtu kopií (Copy Number Variants)
DAPI	fluorescenční barvivo 4',6-diamidin-2-fenyлиндol
dbVAR	databáze strukturních variant (Database of Genomic Structural Variation)
DECIPHER	databáze genetických variant (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources)
del	delece
DGV	genetická databáze benigních variant (Database of Genomic Variants)
<i>dn</i>	<i>de novo</i> , nově vzniklé
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dup	duplikace
DZ	dizygotní (dvojvaječná)
EPI	epilepsie
FISH	fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace
fMRI	zobrazení funkční magnetickou rezonancí (functional Magnetic Resonance Imaging)
FN	fakultní nemocnice
gDNA	genomová DNA

GMDS-ER	nástroj hodnocení psychomotorického vývoje u dětí (Griffiths Mental Developmental Scales-Extended Revised)
GWAS	celogenomová asociační studie (Genome-Wide Association Study)
HFLP	varianty s vysokou frekvencí v populaci a nízkou penetrancí (High-Frequency Low-Penetrant)
HLA	hlavní histokompatibilní komplex (Human Leucocyte Antigen)
ID	inteligenční deficit
inv	inverze
ISCA	soubor standardů pro použití cytogenomických čipů (International Standards for Cytogenomic Arrays)
ISCN	mezinárodní systém pro cytogenetickou nomenklaturu člověka (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature)
kb	kilobáze
LCR	repetitivní sekvence o nízkém počtu opakování (Low Copy Repeats)
<i>mat</i>	maternální (mateřský) původ
mar	marker chromozom
Mb	megabáze
metyl-CpG	methylované cytosin-fosfát-guanin sekvence
mFISH	mnohobarevná (multicolor) fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace
M-CHAT	modifikovaný kontrolní seznam pro autismus u batolat (The Modified Checklist for Autism in Toddlers)
MIA	maternální imunitní aktivace
miRNA	malé (micro) nekódující molekuly ribonukleové kyseliny
MKN	mezinárodní klasifikace nemocí
MLPA	multiplexní ligázová amplifikace sond (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí (Magnetic Resonance Imaging)
MZ	monozygotní (jednovaječná)
NCBI	portál The National Center for Biotechnology Information
NGS	sekvenování nové generace (Next-Generation Sequencing)
NVO	neurovývojové onemocnění / neurovývojové obtíže
OCD	obsedantně-kompulzivní porucha (Obsessive-Compulsive Disorder)
OMIM	genetická databáze Online Mendelian Inheritance in Man
OR	poměr šancí (Odds Ratio)

OVŘ	opožděný vývoj řeči
p	krátké raménko chromozomu
<i>par</i>	parentální (rodičovský) původ
PAS	porucha autistického spektra
<i>pat</i>	paternální (otcovský) původ
PAT	patogenní
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
P_BEN	pravděpodobně benigní
PMV	psychomotorický vývoj
P_PAT	pravděpodobně patogenní
PW-AS	Prader-Willi / Angelman (chromozomový region asociovaný s těmito syndromy)
q	dlouhé raménko chromozomu
SSC pufr	pufrační fyziologický roztok s citrátem sodným (Saline-Sodium Citrate)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (Single Nucleotide Polymorphism)
SNV	jednonukleotidová varianta (Single Nucleotide Variant)
TE pufr	Tris/EDTA pufr (roztok tris(hydroxymethyl)aminometanu a kyseliny ethylendiamintetraoctové)
TP-PCR	metoda PCR pro detekci expanze trinukleotidových repetit (Triplet Repeat Primed Polymerase Chain Reaction)
UCSC	genomový prohlížeč Univerzity v Santa Cruz (University of California, Santa Cruz)
ÚBLG 2. LF	Ústav biologie a lékařské genetiky 2. Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy
UV-VIS	oblast ultrafialového a viditelného spektra záření (Ultraviolet-Visible)
VUS	varianty nejasného klinického významu (Variants of Uncertain Significance)
WES	metoda celoexomového sekvenování (Whole-Exome Sequencing)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XV_P	přenašečství X-vázaného onemocnění

Obsah

1 ÚVOD.....	1
2 PORUCHY AUTISTICKÉHO SPEKTRA	2
2.1 Společné znaky PAS a poruch s autismem spojovaných	2
2.1.1 Komorbidity PAS	3
2.2 Poruchy spojené s autismem.....	3
2.3 Základní epidemiologické údaje o PAS	6
3 ETIOLOGIE A BIOLOGICKÁ PODSTATA PAS	7
3.1 Neurobiologie PAS	7
3.2 Faktory ovlivňující etiologii PAS	8
3.2.1 Faktory prostředí.....	8
3.2.2 Imunologické faktory.....	9
3.2.3 Genetické faktory	10
4 GENETICKÉ NÁLEZY U PAS.....	11
4.1 Jevy pozorované při záchytu patogenních variant	11
4.1.1 Charakter přítomných variant.....	11
4.1.2 Varianty v počtu kopií (CNV).....	11
4.1.3 High-frequency low-penetrant varianty (HFLP).....	12
4.1.4 Second hit a multiple hit model.....	12
4.2 Konkrétní lokusy genomu asociované s PAS	12
4.2.1 Jednotlivé geny a jejich charakter ve vztahu k PAS.....	13
4.3 Souběh PAS a genetických syndromů	14
4.3.1 Aneuploidie	14
4.3.2 Mikrodeleční syndromy	15
4.3.3 Ostatní syndromy.....	16
4.4 Společné rizikové lokusy v etiologii PAS a neuropsychiatrických poruch.....	18
4.5 Mitochondriální dědičnost u PAS	19
4.6 Epigenetická dědičnost u PAS	19
5 METODY PRO VYŠETŘOVÁNÍ ABNORMÁLNÍCH GENETICKÝCH VARIANT A PRO STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ PRÁCE	21
5.1 Karyotypování	21
5.2 Fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace (FISH)	22
5.3 Komparativní genomová hybridizace na čipu (aCGH).....	23

5.4 Statistické metody využívané k charakterizaci souboru a testování zvolené hypotézy	25
6 CÍLE PRÁCE	26
7 MATERIÁL A METODY	27
7.1 Charakteristika a statistické zpracování souboru	27
7.1.1 Pohlaví	27
7.1.2 Věk.....	27
7.1.3 Zastoupení jednotlivých diagnóz PAS.....	28
7.1.4 Osobní a rodinná zátěž neurovývojovými obtížemi	28
7.2 Vyšetřované vzorky a postup vyšetřování souboru	30
7.2.1 Vyšetřované vzorky	30
7.2.2 Postup vyšetřování souboru	31
7.3 Vyšetřovací metody	31
7.3.1 Karyotypování	31
7.3.2 Fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace	34
7.3.3 Microarray komparativní genomová hybridizace	38
7.3.4 Stanovení klinické významnosti CNV.....	42
7.4 Metody statistického testování zvolené hypotézy.....	43
8 VÝSLEDKY.....	44
8.1 Karyotypování	44
8.2 Fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace	45
8.3 Array CGH	47
8.4 Vztah četnosti abnormálních genetických variant a výskytu přidružených vad u pacientů s PAS.....	55
9 DISKUZE.....	56
9.1 Charakter zkoumaného souboru	56
9.1.1 Pohlaví jedinců	56
9.1.2 Věk jedinců	56
9.1.3 Diagnózy v rámci PAS.....	58
9.1.4 Zátěž přidruženými NVO u jedinců s PAS.....	58
9.1.5 Rodinná zátěž NVO.....	60
9.2 Charakter pozorovaných genetických aspektů	61
9.2.1 Záchyt abnormálních variant.....	61
9.2.2 Hodnocení abnormálních variant.....	63
9.2.3 Konkrétní lokusy a zasažené geny.....	69

9.3 Přínosy a limity použitých metod	71
9.4 Testovaná hypotéza.....	73
9.5 Kazuistiky.....	76
9.5.1 Pacientka 155	76
9.5.2 Pacient 236	78
9.5.3 Pacient 248	80
10 ZÁVĚR.....	82
Seznam použité literatury	84

1 Úvod

Mezinárodní klasifikace nemocí definuje poruchy autistického spektra (PAS) jako neurovývojové a pervazivní, tedy všepřonikající obtíže. Společným rysem diagnóz spadajících pod PAS jsou repetitivní chování a potíže v komunikaci a v sociálních interakcích. Komorbidně se také mnohdy vyskytují další neurovývojová či fyzická onemocnění. PAS jsou tak velice heterogenní skupinou obtíží zasahujících do mnoha rovin osobnosti jedince. Tato rozmanitost fenotypového projevu se rovněž zrcadlí v rozmanitosti genetických aspektů etiologie autismu. Předchozí genetické studie pozorovaly nespočet různých abnormálních variant v genomu jedinců s PAS. Významnou složku této diverzity genomu tvoří varianty v počtu kopií (copy number variants, CNV – delece či amplifikace). Geny zasažené těmito změnami se účastní mnoha důležitých neurobiologických či buněčných procesů (např. regulace synaptické plasticity, neurotransmise, metabolismu mitochondrií či fungování cytoskeletu). Každý soubor osob s PAS tak může představovat geneticky jedinečný celek.

Cílem diplomové práce je odhalit, popsat a zhodnotit abnormální genetické varianty v genomu souboru 360 pacientů s PAS, kteří byli vyšetřeni v ambulanci klinické genetiky v nemocnici v Motole v letech 2022–2025. K detekci variant byly použity tři odlišné cytogenetické metody – karyotypování, fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH) a komparativní genomová hybridizace na čipu (array comparative genome hybridization, aCGH). Práce se také pokusila charakterizovat tento soubor pacientů, porovnat výhody a limity použitých metod a zaměřila se na prozkoumání otázky, zda se abnormální genetické varianty vyskytují častěji u pacientů s PAS a komorbidními neurovývojovými obtížemi než u pacientů s izolovaným autismem.

Mnoho genetických mechanismů uplatňujících se v etiologii PAS však navzdory současným pokročilým diagnostickým metodám zůstává neobjasněno. Tato práce má tak formou studia nalezených genetických variant a následného porovnání výsledků s poznatky předchozích studií za cíl přispět k rozšíření našeho poznání.

2 Poruchy autistického spektra

Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10) používaná především v Evropě včetně České republiky ke stanovování diagnóz označuje PAS jako poruchy neurovývojové a pervazivní, tedy všepřonikající. Častým společným rysem PAS a syndromů s PAS spojovaných jsou obtíže v komunikaci a v sociálních interakcích (Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10, 2023). Světová zdravotnická organizace (WHO) popisuje PAS jako soubor přetrvávajících obtíží v sociálních dovednostech – v iniciaci sociální interakce, schopnosti jejího udržení či v komunikaci. Dále popisuje repetitivní vzory chování, které mohou být netypické v kontextu věku či sociokulturního prostředí jedince. Takové vzorce chování (anebo zájmy osoby s PAS) bývají značně rigidní, často úzce omezené nebo specifické a daný jedinec je nepřizpůsobuje situaci přiměřeně (World Health Organization: ICD-11, 2023).

V neoborné komunikaci je běžně používán obecný jednoslovný a zastřešující pojem „autismus“. Problematika jeho vymezení je ale složitější a vyžaduje hlubší vhled do tématu. Pod kategorii PAS spadají dvě poruchy (dětský a atypický autismus). S autismem ale bývají spojovány další syndromy a poruchy s autistickými znaky nebo ty, u nichž se autismus často paralelně vyskytuje jako komorbidita. Definici autismu ztěžuje také fakt, že v recentní i starší literatuře nalezneme různé pohledy na kategorizaci poruch autistického spektra. Zmínit lze například Aspergerův syndrom, jenž dle Mezinárodní klasifikace nemocí nespadá pod PAS, avšak některé jeho formy bývají (nesprávně) označovány jako tzv. „vysokofunkční autismus“. Taktéž z důvodu častého překryvu projevů autismu s dalšími zejména neurovývojovými onemocněními (NVO) je stanovení diagnózy a odlišení autismu od poruch s podobnými projevy komplikovanější.

2.1 Společné znaky PAS a poruch s autismem spojovaných

Kromě výše zmíněných potíží nalézáme u jedinců s PAS také asociaci s mnoha dalšími závažnými znaky, například v chování nebo vnitřním prožívání. Jedná se o sebepoškozování, agresivní chování, deprese, úzkost, podrážděnost, sociální a specifické fobie nebo například i genderový nesoulad a mnoho dalších průvodních obtíží (Cooper a kol., 2023; Dell’Osso a kol., 2019; Hollocks a kol., 2019; Fodstad a kol., 2012). Byly také pozorovány například až sebevražedné sklony. Ve studii Dell’Osso a kol. (2019) vykazovali pacienti s PAS a osoby s autistickými rysy signifikantně vyšší prevalenci sebevražedného chování oproti zdravé

kontrole. Agresivní a sebepoškozující jednání nemusí postihovat jen dospělé a starší děti s PAS, ale může se vyskytovat už i u velmi malých dětí ve věku několika měsíců (Fodstad a kol., 2012).

Častým jevem u dětí s PAS je tzv. „autistický regres“, kdy dítě do 3 let věku (typicky kolem 18.–24. měsíce) začne vykazovat regres ve vývoji, který dosud probíhal standardně. Regres se projeví ztrátou schopností a dovedností, které jedinec již v předchozím vývoji nabyl (Thompson a kol., 2019).

Ačkoli existuje mnoho společných znaků pro PAS, zůstávají tyto poruchy velice heterogenní a variabilní skupinou. Thorová (2006, s. 31) popisuje takovou variabilitu slovy: „Symptomy se kombinují v nesčetných variacích, a tak prakticky nenajdeme dvě děti se stejnými projevy.“

2.1.1 Komorbidita PAS

Poměrně častým přidruženým znakem PAS je inteligenční deficit (ID) a psychomotorické opožďení. Studie týmu Rydzewska a kol. (2018) odhadla prevalenci ID u dospělých s PAS v různých věkových kategoriích vždy na hodnotu kolem 30 %.

Rovněž lze uvést metaanalýzu Hollocks a kol. (2019), která přinesla souhrnný odhad přítomnosti některé formy úzkostné poruchy a depresivní poruchy u dospělých s PAS. Prevalenci úzkostné poruchy odhadla na 42 % a depresivní poruchy na 37 %. Také se PAS vyskytuje v kombinaci s obsedantně kompulzivní poruchou (OCD). Odhad prevalence souběhu OCD a PAS u dospělých ve jmenované metaanalýze činil 27 %. Přidružená může být také epilepsie, porucha pozornosti s hyperaktivitou (ADHD), bipolární porucha, panická porucha, poruchy příjmu potravy, psychózy, schizofrenní poruchy a jiné druhy mentálního a fyzického postižení (Hollocks a kol., 2019; Huke a kol., 2013; Lukmanji a kol., 2019; Polderman a kol., 2014; Stahlberg a kol., 2004).

PAS může být asociována nejen s duševními obtížemi, ale také s fyzickými problémy, mezi které patří částečná až úplná ztráta sluchu nebo zraku a další tělesná postižení (Rydzewska a kol., 2018).

2.2 Poruchy spojené s autismem

Dle klasifikace MKN-10 zahrnuje pojem „poruchy autistického spektra“ dětský autismus a atypický autismus. Dalšími poruchami spojovanými s autismem jsou pak Aspergerův

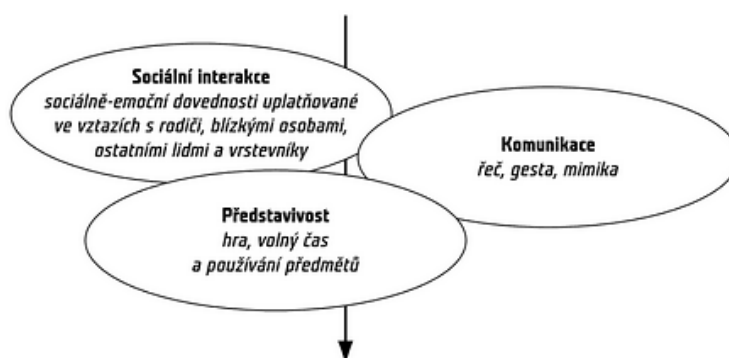
syndrom, Rettův syndrom, dětská dezintegrační porucha a jiné pervazivní vývojové poruchy (MKN-10, 2023). Přehled jednotlivých diagnóz shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1 Pervazivní vývojové poruchy. Přehled jednotlivých diagnóz. (Vytvořeno dle MKN-10 (2023)).

Poruchy duševní a poruchy chování	
Poruchy psychického vývoje	
F84 – Pervazivní vývojové poruchy	
F84.0	Dětský autismus
F84.1	Atypický autismus
F84.2	Rettův syndrom
F84.3	Jiná dětská dezintegrační porucha
F84.4	Hyperaktivní porucha sdružená s mentální retardací a stereotypními pohyby
F84.5	Aspergerův syndrom
F84.8	Jiné pervazivní vývojové poruchy
F84.9	Pervazivní vývojová porucha NS

Dětský autismus

Dětský autismus se projevuje do tří let věku dítěte. Hlavními projevy jsou narušení komunikace, sociálních interakcí a přítomnost stereotypních vzorců chování, které probíhají vždy stejně. Může být přítomen také souběh s úzkostmi, agresivitou či poruchami spánku (Národní zdravotnický informační portál ČR, 2024). U dětského autismu dochází k postižení ve formě tzv. autistické triády, která zahrnuje výše zmíněné potíže v komunikaci, potíže v sociální interakci a potíže v představivosti (na jejímž podkladě pak vznikají rigidní omezené a repetitivní vzorce chování) (Thorová, 2016, s. 59). Autistickou triádu představuje obrázek 1.



Obrázek 1 Triáda postižených oblastí u PAS. (Převzato z Thorová (2016, s. 60)).

Atypický autismus

Atypický autismus je heterogenní diagnostická jednotka, u které nemusí být naplněna všechna diagnostická kritéria, jako je tomu u dětského autismu. Jedinec tedy zpravidla nemá narušené všechny tři složky autistické triády anebo závažnost a frekvence příznaků nenaplnuje

diagnostická kritéria. Atypický autismus bývá diagnostikován u jedinců s těžkým či hlubokým ID a u jedinců s těžkou vývojovou receptivní poruchou řeči. Posledním možným kritériem může být projev autismu až po 3. roce života (MKN-10, 2024a; Thorová, 2016, s. 186).

Aspergerův syndrom

Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10 popisuje Aspergerův syndrom jako kvalitativní narušení sociálních interakcí napodobující autismus. Bývají přítomny omezené zájmy stereotypního charakteru. Aspergerův syndrom se od autismu odlišuje nepřítomností opoždění ve vývoji řeči a v kognitivních schopnostech. Může být ale přítomna nemotornost (MKN-10, 2024b).

Rettův syndrom

Rettův syndrom je porucha vyskytující se u dívek, která se obvykle projeví kolem 7.–24. měsíce věku. Vývoj jedince zprvu probíhá normálně. V pozdějších fázích se však objevuje částečná ztráta řeči, porucha obratnosti při chůzi a zástava růstu hlavy. Dále dochází ke ztrátě schopnosti vykonávat účelné pohyby rukama a jsou naopak přítomné stereotypní kroutivé pohyby. Typické bývají také spontánní hyperventilace. Je dotčen i vývoj po stránce sociální a vývoj hraní. Postižení ústí v těžký inteligenční deficit (MKN-10, 2024c).

Dětská dezintegrační porucha

U dětské dezintegrační poruchy taktéž dochází k náhlému regresi v dosud standardním vývoji. Stejně jako u autismu dochází k potížím s komunikací a se sociálními interakcemi. Průvodním znakem bývá ztráta zájmu o okolí a stereotypní motorické projevy (MKN-10, 2024d).

Jiné pervazivní vývojové poruchy

Jiné pervazivní vývojové poruchy je název diagnózy bez přesné definice, užívané vzácně a sdružující jedince s heterogenními symptomy. Jedná se o osoby s narušenou autistickou triádou, ale ne do takové míry, aby diagnóza odpovídala konkrétní formě autismu, nebo o jedince se silně narušenou představivostí a schopností rozeznávat hranici mezi realitou a fantazií (Thorová, 2016, s. 207–208).

Autistické rysy

V lékařských zprávách se můžeme setkat také s pojmem „autistické rysy“ či „širší autistický fenotyp“ (v angličtině zkratkou BAP – „broader autism phenotype“). Jsou to blíže nedefinované pojmy užívané pro velmi různorodou skupinu jedinců. Může se ale jednat o falešně negativní

závěr (u osob, jimž náleží diagnóza dětský či atypický autismus, i když nemají typické vyjádření fenotypu), i o falešně pozitivní závěr (u osob, které netrpí žádnou formou autismu, ale například mohou mít poruchy expresivní složky řeči, syndrom získané afázie, poruchu emocí nebo těžké formy poruchy aktivity a pozornosti). Nabízí se tedy diagnózu pacienta po nějaké době vývoje revidovat (McDonald, 2021; Thorová, 2016, s. 211–212). (Thorová, 2016, s. 211–212).

2.3 Základní epidemiologické údaje o PAS

Odhad prevalence PAS v populaci se v literatuře obvykle pohybuje kolem 1 či 2 %, jak je tomu například u práce Lai a kol. (2014). Nové poznatky přinesla recentní metaanalýza týmu Salari a kol. (2022). V celosvětovém měřítku byla prevalence odhadnuta na 0,6 %. Prevalence PAS vypočtené touto metaanalýzou pro konkrétní kontinenty pak vykazovaly tyto hodnoty: Asie 0,4 %, Amerika 1 %, Evropa 0,5 %, Afrika 0,5 %, Austrálie 1,7 %. Například ve Švédsku se ale frekvence zastoupení v populaci vyšplhala dokonce až na hodnotu 3,5 %. Za rozdílnými hodnotami můžeme pravděpodobně hledat příčiny nejen v různém charakteru studovaných populací, ale také v nestejně dostupnosti zdravotnické péče, v povědomí o PAS či to, jak jsou v daném regionu autismus a jednotlivé diagnózy definovány (Salari a kol., 2022).

U frekvence výskytu autismu nalézáme jistou závislost na pohlaví jedinců. Pozorovaný poměr zastoupení PAS u chlapců a dívek se pohybuje obvykle v rozmezí hodnot 2:1 a 8:1, vždy s převahou zastoupení u chlapců (Icasiano a kol., 2004; Fombonne a Grandjean, 1997). Novější metaanalýza z roku 2017 zkoumala 54 prevalencečních studií a na základě užšího výběru z nich (těch s vysokou kvalitou metodologických přístupů) zjistila, že poměr pravděpodobně nejvíce odrážející skutečnost se blíží hodnotě 3:1 (Loomes a kol., 2017). Ačkoli výsledný poměr chlapců a dívek s PAS může být v závislosti na mnohých faktorech rozdílný, faktem zůstává, že významně častěji jsou autismem postiženi chlapci.

3 Etiologie a biologická podstata PAS

V současné době jsou PAS zkoumány mnoha obory, jako je neuroanatomie, neurochemie, neuropsychiatrie, neurofyzilogie, genetika nebo imunologie. Významná variabilita v projevech s sebou nese i variabilitu v příčinách, a z tohoto důvodu je objasňování příčin PAS komplikovanější a různé studie poskytují různé vědecké závěry (Thorová, 2016, s. 44). Na základě vědeckého bádání je tedy možné označit povahu autismu za multifaktoriální.

3.1 Neurobiologie PAS

Dosud provedené studie zkoumají strukturní i funkční charakteristiky nervové soustavy (především mozku) a nabízí poznatky nejen ze studia vzorků zdravých jedinců, ale i osob s PAS. Hojně studovaný je například tzv. sociální mozek, tedy neurální sítě, které se podílí na sociální percepci. Studie Lahnakoski a kol. (2012) na zdravých jedincích objevila pomocí fMRI analýzy (funkční magnetické rezonance) zapojení do sociální percepce a kognice oblasti *sulcus temporalis posterior superior* a dalších neuronových sítí. Pozdější práce týmu Kim a kol. (2015) se zaměřila na porovnání funkce sociálního mozku u jedinců s PAS a u zdravé kontroly. U osob s PAS byla po vystavení sociálním podnětům nalezena nižší aktivace např. v oblasti pravé amygdaly či pravého *gyrus frontalis inferior* než u zdravých jedinců.

Strukturním faktorům se věnovala například studie Ecker a kol. (2012), která našla spojitost mezi objemem šedé hmoty kůry mozkové a etiologií PAS. Jedinci s PAS vykazovali ve srovnání s kontrolami signifikantně zvýšený objem šedé hmoty v anteriorní temporální a dorsolaterální prefrontální oblasti a naopak významně snížený objem v okcipitální a mediální parietální oblasti kůry.

Další autoři se ve svém výzkumu zaměřili na míru konektivity mezi různými částmi mozku. Byla objevena snížená míra synchronizace (funkční konektivity) u osob s PAS mezi frontální a parietální oblastí oproti kontrolní skupině. Pozorována byla také dysgeneze *corpus callosum*. Důsledkem oslabené konektivity v korových oblastech je pak nižší míra integrace informací (Just a kol., 2007). Zmíněné práce jsou jen malým výsekem studií, avšak mozek je velice komplexní orgán skýtající nepřehledné množství možností zkoumání na různých úrovních.

3.2 Faktory ovlivňující etiologii PAS

Výzkum etiologie autismu se zaměřuje na tři kategorie faktorů – genetické faktory, imunologické faktory a faktory prostředí.

3.2.1 Faktory prostředí

Vyvíjející se mozek je orgán velmi senzitivní, a tak se probíhající studie zaměřují především na prenatální či perinatální vlivy potenciálně zvyšující riziko rozvoje PAS. Paleta zkoumaných faktorů vnějšího a vnitřního prostředí matky a plodu je velmi široká.

K riziku rozvoje PAS může přispívat stres matky v období těhotenství. Bylo zjištěno, že může rovněž korelovat se závažností projevů a také se podílet na výskytu širšího autistického fenotypu v běžné populaci (Varcin a kol., 2017). Tato studie objevila signifikantní závislost závažnosti PAS a psychické zátěže matky (rozvod, ztráta práce, ztráta blízké osoby), zejména pokud se jednalo o vícenásobné stresové události.

Některé studie našly vyšší frekvenci výskytu PAS u dětí matek užívajících léky jako například antiepileptika, zejména obsahující valproát (Christensen a kol., 2013). Vyšší frekvence znaků PAS byla dokumentována také u embryopatií způsobených thalidomidem (Strömmland a kol., 1994), u Möbiova syndromu po užívání misoprostolu (syntetický prostaglandin) (Bandim a kol., 2003), a s autismem se také někdy setkáváme u fetálního alkoholového syndromu potomků matek požívajících alkohol v těhotenství (Lange a kol., 2017). Riziko rozvoje PAS může přinést i užívání antibiotických preparátů (Lee a kol., 2019).

Další studie se zaměřují na roli výživy. Metaanalýza prospektivních studií Wang a kol. (2020) odhaduje, že děti se sníženou hladinou vitamínu D v novorozeneckém období a děti matek, které měly sníženou hladinu vitamínu D, mohou mít až o 54 % vyšší riziko rozvoje PAS. Vitamín D má v těle mnoho funkcí, přičemž byla vyslovena i hypotéza, že regulace exprese genů hrajících roli v etiologii autismu může být senzitivní k vitamínu D3 (Trifonova a kol., 2019). U dětí s PAS (ale např. i s ADHD) byla detekována nižší hladina také omega-3 polynenasycených mastných kyselin (kyselina eikosapentaenová, kyselina dokosaheptaenová) než u zdravých dětí s neurotypickým vývojem (Parletta a kol., 2016).

Výzkum si také všímá odlišností ve skladbě mikrobioty v trávicím traktu pacientů s PAS. Jako příklad lze uvést studii Tomova a kol. (2015), kde odlišnost skladby mikrobiomu dětí s PAS od mikrobiomu zdravé kontroly (včetně zdravých sourozenců) spočívala ve změně poměru zastoupení kmenů bakterií *Bacteroidetes* / *Firmicutes* a naopak ve zvýšeném

zastoupení bakterie *Lactobacillus* spp. Experimentální práce Sharon a kol. (2019) transplantovala lidskou mikrobiotu do trávicího traktu myši zvlášť od zdravých dárců a od dárců s autismem. Myši s mikrobiomem od pacienta s PAS vykazovaly změny v chování oproti myším od zdravých dárců.

Za možným ovlivněním etiologie autismu mohou stát i faktory jako život těhotné v blízkosti polí ošetřovaných pesticidy nebo v místě znečištění vzduchu hustou dopravou (Becerra a kol., 2013; Shelton a kol., 2014).

Zvýšené riziko rozvoje PAS pro druhorozeného potomka může přinést také krátký interval (méně než 1 rok) mezi dvěma porody (Gunnes a kol., 2013) nebo vyšší věk rodičů (Parner a kol., 2012). V druhé jmenované studii byly navíc děti s PAS častěji narozené předčasně a s nižší porodní váhou.

Existují také výzkumy postnatálních podmínek a faktorů, které mohou přispívat k zvýšenému riziku rozvoje PAS. Jedním z nich je například kojení. Metaanalýza Tseng a kol. (2019) zjistila, že děti, kterým byla diagnostikována PAS, byly kojeny statisticky méně často oproti dětem bez autismu. Postnatální vlivy, o kterých se v souvislosti s příčinami autismu diskutuje, které ale nakonec nebyly průkazně potvrzeny, jsou například vakcinace (ani s aditivou jako thimerosal či rtuť) nebo expozice antibiotikům (Lee a kol., 2019; Taylor a kol., 2014).

3.2.2 Imunologické faktory

Velkou zkoumanou skupinou rizikových faktorů jsou různé imunitní procesy. Vývoj nervové soustavy plodu může být narušen aktivací imunitního systému matky (MIA – maternální imunitní aktivace), například cestou produkce prozánětlivých molekul (McEwan a kol., 2023). Prospektivní studie Goines a kol. (2011) našla zvýšené hladiny cytokinů IFN- γ , IL-4 a IL-5 v těhotenství v séru matek dětí s PAS a zvýšené hladiny cytokinů IL-2, IL-4 a IL-6 u matek dětí s jiným vývojovým opožděním bez PAS. K podobnému nálezu dospěla i studie analyzující koncentrace cytokinů v plodové vodě (Abdallah a kol., 2013).

Nepříznivý imunologický profil a zvýšené riziko pro neurovývojové onemocnění potomka lze nalézt u matek postižených lupénkou či astmatem (Croen a kol., 2019) nebo při infekci patogenem. Ve studii Atladóttir a kol. (2010) byla nalezena souvislost PAS s infekcí matky vyžadující hospitalizaci v průběhu těhotenství, konkrétně s virovou infekcí v 1. trimestru nebo s bakteriální infekcí ve 2. trimestru. Nicméně jiné studie naznačují, že spíše než o samotnou

kauzalitu mezi infekcí patogenem a následným rozvojem PAS může jít o rizikový faktor ve formě horečky matky vyvolané daným onemocněním (Brucato a kol., 2017).

Zvažovaný je i efekt charakteru stravy matky a jejího celkového nutričního statusu na vývoj nervové soustavy plodu. Nedostatečná výživa, která může vést k nedostatku živin pro správný vývoj plodu. Rovněž nadbytek živin (při vysokém BMI) může prostřednictvím produkce prozánětlivých molekul imunitním systémem matky poškodit vývoj nervové soustavy plodu (Monthé-Drèze a kol., 2019; Neves a kol., 2020).

Dalším imunologickým faktorem v etiologii autismu mohou být mateřské protilátky. V práci Braunschweig a kol. (2007) byly měřeny hladiny protilátek matek proti specifickým proteinům v mozku plodu. Ve skupině matek dětí s autismem byly oproti kontrolním skupinám pozorovány tyto protilátky signifikantně častěji.

3.2.3 Genetické faktory

Třetí skupinou, která je součástí podstatně rozmanitého souboru rizikových faktorů pro rozvoj PAS, je genetická výbava jedince.

O vlivu genetických faktorů svědčí například výzkumy autismu u dvojčat, studium funkcí jednotlivých genů a širších oblastí genomu a další. Již v roce 1977 byl pozorován soubor 21 stejnopohlavních párů monozygotních (MZ) a dizygotních (DZ) dvojčat, z nichž alespoň jedno z každého páru trpělo dětským autismem. Monozygotní dvojčata vykazovala u autismu konkordanci 36 % oproti nulové konkordanci u dizygotních dvojčat, a u kognitivních abnormalit byla pozorována konkordance 82 % pro MZ dvojčata a 10 % pro DZ dvojčata (Folstein a Rutter, 1977). Novější výzkumy, například Rosenberg a kol. (2009), poskytují ohledně významné role genetických faktorů podobné závěry. V této studii byla u dvojčat do 18 let pozorována konkordance pro autismus, přičemž u MZ dvojčat byla podstatně vyšší (88 %) než u DZ dvojčat (31 %).

Lze také studovat dědičnost autismu. Odhad heritability se obvykle pohybuje v rozmezí 60-90 % (Tick a kol., 2016), někdy se dokonce blíží až k hodnotě 98 % (Colvert a kol., 2015).

Studií, které měly za cíl prozkoumat roli genetických aspektů v etiologii autismu, bylo až doposud provedeno mnoho. Některé z nich, vybrané pro účely této podkapitoly, demonstrují důležitost zaměření pozornosti vědeckého bádání genetickým směrem.

4 Genetické nálezy u PAS

PAS jsou fenotypově heterogenní soubor a nejínak je tomu i z hlediska genetiky. Aspektů, které vědce přivádí na možnou souvislost PAS s genetickými predispozicemi, je celá řada.

4.1 Jevy pozorované při záchytu patogenních variant

4.1.1 Charakter přítomných variant

Z hlediska genetického původu variant nalézáme v genomu pacientů s PAS *de novo* varianty i varianty zděděné od rodiče. U PAS jsou popisovány zejména missense a nonsense mutace. Mechanismus potenciální patogenity se realizuje prostřednictvím delece (ztráty genetického materiálu) nebo amplifikace (zmnožení genetického materiálu; De Rubeis a kol., 2014; Ghafouri-Fard a kol., 2023). Mutace se mezi sebou mohou lišit i svým rozsahem. Mohou být bodové (single nucleotide variants, SNV) či zasahovat větší úsek (copy number variants, CNV).

4.1.2 Varianty v počtu kopií (CNV)

Pro některá místa v genomu jsou rozdíly v počtu kopií mezi jedinci typické a vyskytují se jako CNV polymorfismy (definované frekvencí v populaci vyšší než 1 %). U pacientů (nejen) s autismem však může být v některém úseku pozorováno patologické zmnožení či naopak nedostatek počtu kopií. Jako příklad lze uvést studii Sebat a kol. (2007), která objevila CNV asociované s PAS u 10 % pacientů s PAS, ale jen u 3 % příbuzných 1. stupně a u 1 % zdravé kontroly. Dosavadní poznatky o konkrétních CNV ve vztahu k PAS shrnuje tabulka 2.

Tabulka 2 Varianty v počtu kopií asociované s PAS. (Převzato a přeloženo z Shishido a kol. (2014). Del – delece, dup – duplikace, mat – maternální, pat – paternální, PAS – poruchy autistického spektra, OCD – obsedantně kompulzivní porucha. Data pochází ze studií Cooper a kol. (2011); Devlin a Scherer (2012); Malhotra a Sebat (2012); Pinto a kol. (2010); Sanders a kol. (2011)).

CNV lokus	Frekvence u PAS (n = 2120)	Frekvence u vývojových poruch (n = 15767)	Frekvence v kontrolách (n = 8329)	Asociace s PAS	Další poruchy v daném lokusu
1q21	0,2 %	0,5 %	< 0,1 %	dup	schizofrenie (del)
5p15.2	0,1 %	–	0 %	del	nově nalezený region asociovaný s PAS
7q11.23	0,2 %	0,4 %	0 %	dup	Williamsův-Beurenův syndrom (del)
15q11-13	0,1 %	0,3 %	0 %	del, dup	Praderův-Williho syndrom (pat del), Angelmanův syndrom (mat del), PAS (mat dup)
15q13	0,2 %	0,4 %	< 0,1 %	dup	schizofrenie (del), bipolární porucha (dup)
16p11.2	0,8 %	0,5 %	< 0,1 %	del, dup	schizofrenie (del), bipolární porucha, OCD (dup)
17p11.2	0,2 %	0,2 %	0 %	dup	syndrom Smithové-Magenisové (del)
22q11.2	0,1 %	0,9 %	0 %	del, dup	DiGeorgeův syndrom, schizofrenie (del)

4.1.3 High-frequency low-penetrant varianty (HFLP)

High-frequency low-penetrant variants (HFLP) je označení pro vysokofrekvenční varianty v genomu s nízkou penetrancí. Jedná se o CNV, které vykazují penetranci nižší než 10 % a frekvenci ve zdravé populaci vyšší než 0,1 %. Tyto varianty tak přináší relativně malé riziko patogenity a jsou zároveň v populaci u zdravých jedinců relativně běžné. I přesto ale může být na základě jejich přítomnosti v genomu pacienta vysloveno podezření, že se podílejí na rozvoji daného onemocnění (Maya a kol., 2020).

4.1.4 Second hit a multiple hit model

V genetice a molekulární biologii se používá pojem „second hit“ nebo „multiple hit“ model, v češtině známé také jako „teorie dvojího zásahu“ nebo „teorie vícečetného zásahu“. Tyto pojmy popisují jev, při kterém dojde současně k více změnám v genotypu jedince, což následně vyústí v negativní dopad na fenotyp. Zároveň ale v případě přestavby pouze v jedné z těchto částí genomu by nemusel být dopad na fenotyp patrný. Až přítomnost obou či více rizikových faktorů naráz tak může vyvolat patologický stav nebo přispívat k zhoršené symptomatologii projevů. Model dvojího či vícečetného zásahu byl popsán i v souvislosti s etiologií autismu, jako například v práci Leblond a kol. (2012). Práce pozorovala pacienty s *de novo* delecemi v genu *SHANK2* (jež je kandidátním genem v souvislosti s autismem) a zároveň zděděnými CNV v úseku 15q11–q13 rovněž popisovanými jako potenciálně asociované s neuropsychiatrickými onemocněními.

Někdy však nemusí oba zásahy představovat změnu jen na genetické úrovni. V kombinaci s mutací v genomu může působit i rizikový environmentální faktor, například maternální imunitní aktivace, jak uvedla studie na potkanech Maroon a kol. (2024).

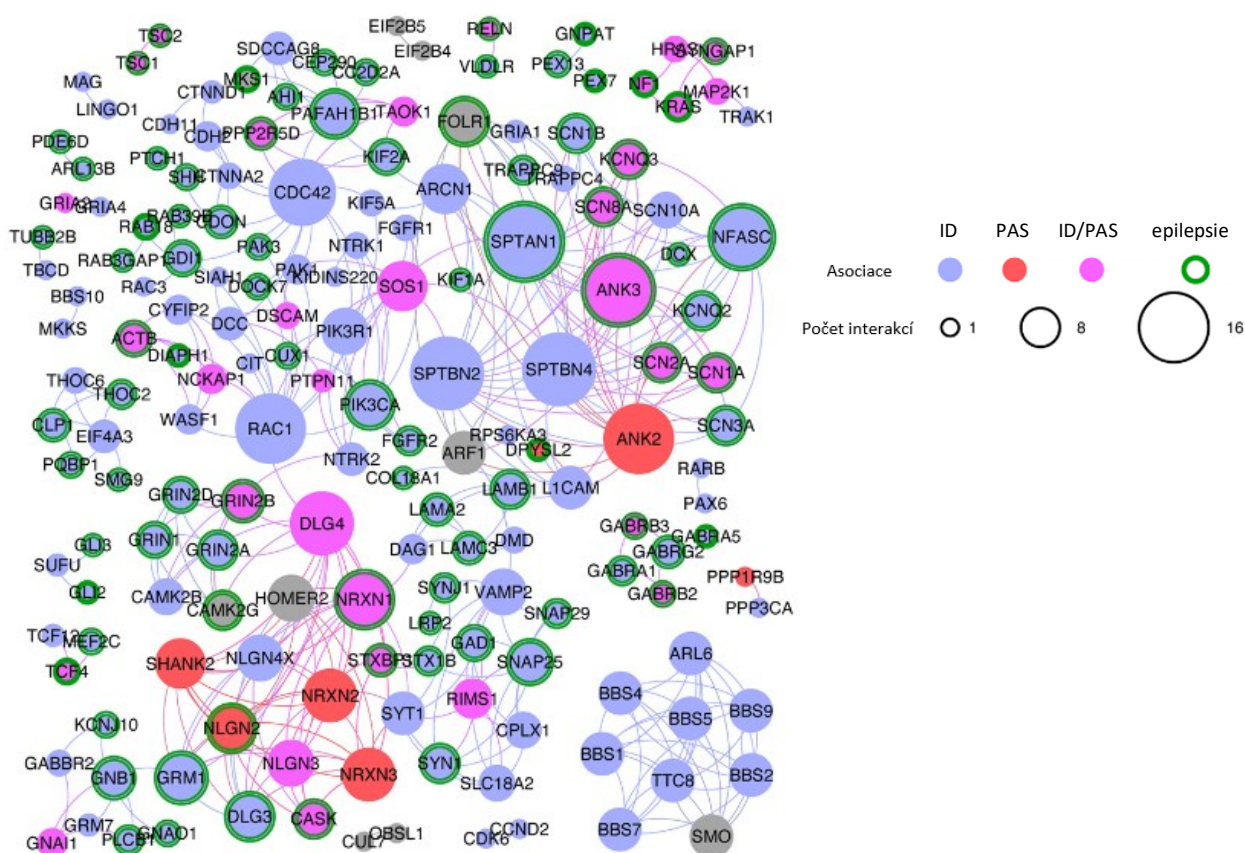
4.2 Konkrétní lokusy genomu asociované s PAS

Lokusy, které mohou být asociovány s etiologií PAS, lze najít napříč celým lidským genomem. Rozsáhlá studie rodin z USA a Kanady se zaměřila na genom těch členů, kteří trpěli autismem nebo vykazovali širší autistický fenotyp. Nalezla možnou spojitost autismu s lokusy 1p36.22, 2p13.1, 6q27, 8q24.22, 9p21.3, 9q31.2, 12p13.31, 15q13.3, 16p13.2, 18q21.1, 22q13.1 nebo Xp22.1 (Woodbury-Smith a kol., 2018). Touto problematikou se však zabývá mnoho různých studií, které zkoumají asociaci množství dalších lokusů s PAS a tento výčet tak není kompletní.

4.2.1 Jednotlivé geny a jejich charakter ve vztahu k PAS

K pochopení situace pomůže objasnění funkce kandidátních genů. Za geny podílející se na etiologii autismu byly označeny geny účastníci se tvorby a fungování synapsí, transkripce, splicingu, remodelace chromatinu či výstavby napěťově ovládaných iontových kanálů (De Rubeis a kol., 2014). Další zkoumanou skupinou jsou geny zodpovědné za imunitní procesy (Arenella a kol., 2023). Byly nalezeny také některé alely systému HLA I., II. i III. třídy, které se vyskytují u jedinců s PAS častěji než u kontrolních vzorků populace (Lee a kol., 2006; Mostafa a Shehab, 2010; Torres a kol., 2006). Všechny uvedené geny zasahují do života a fungování organismu zcela zásadním způsobem a na mnoha různých úrovních.

Rozmanitost a komplexnost genetického pozadí neurovývojových poruch a také bohatost interakcí mezi produkty některých vybraných genů ilustruje obrázek 2. Z obrázku lze také vyzkoušet, že některé geny sdílí možnou asociaci s několika poruchami současně – například *ANK3* je asociován s poruchou autistického spektra, inteligenčním deficitem a epilepsií (Leblond a kol., 2021).



Obrázek 2 Síť protein-proteinových interakcí. Schéma znázorňuje proteiny (produkty genů), u kterých bylo vysloveno podezření na asociaci s neurovývojovými poruchami, konkrétně s poruchami autistického spektra (červeně), inteligenčním deficitem (modře), PAS a ID zároveň (fialově) a epilepsií (v zeleném okraji). Uvedená čísla představují měřítko četnosti vzájemných interakcí vyjádřené zároveň velikostí kruhu. (Převzato a přeloženo z Leblond a kol. (2021)).

Výčet konkrétních genů, u nichž jsou udávány možné asociace s autismem, by byl velmi rozsáhlý. Následující informace o funkcích genů byly převzaty z databází NCBI a OMIM, záznamy o výskytu jejich mutací u pacientů s PAS jsou uvedeny u každého genu zvlášť.

RBFOX1 (MIM* 605104; lokus 16p13.3) – kóduje mRNA splicing faktor, účastní se alternativního splicingu genů regulujících vývoj mozku (Hamada a kol., 2016).

CACNA1D (MIM* 114206; lokus 3p21.1) – kóduje $\alpha 1D$ podjednotku napěťově ovládaného vápníkového kanálu (De Rubeis a kol., 2014).

SCN2A (MIM* 182390; lokus 2q24.3) – kóduje $\alpha 2$ podjednotku napěťově ovládaného sodíkového kanálu (Spratt a kol., 2019; Weiss a kol., 2003).

NRXN1*, *NRXN2*, *NRXN3 (MIM* 600565, 600566, 600567; lokusy 2p16.3, 11q13.1, 14q24.3q31.1) – rodina genů kódující neurexiny – receptorové a adhezivní molekuly synapsí (Wang a kol., 2018).

ANK2*, *ANK3 (MIM* 106410, 600465, lokusy 4q25q26, 10q21.2) – kódují rodinu ankyrinových proteinů spojujících integrální proteiny buněčné membrány s podkladovým spektrin-aktinovým cytoskeletem – účastní se tak procesů jako buněčná motilita, proliferace či udržování membránových domén (Kawano a kol., 2022).

SHANK2*, *SHANK3 (MIM* 603290, 606230; lokusy) – kódují synaptické proteiny, které fungují jako molekulární lešení v synapsích (Boccuto a kol., 2013; Leblond a kol., 2012).

4.3 Souběh PAS a genetických syndromů

Poruchy autistického spektra či jejich znaky byly pozorovány u osob s různými mikrodelečními a mikroduplikačními syndromy, aneuploidie mi či u osob se syndromy zapříčiněnými mutací jediného genu (single gene disorders).

4.3.1 Aneuploidie

Downův syndrom (MIM# 190685)

Downův syndrom je postižení způsobené trizomií chromozomu 21. Fenotyp často zahrnuje vrozené vývojové vady orgánů, zejména srdce a orgánů trávicí soustavy, zvýšené riziko leukémie, poškození sluchu, hypotonii, polydaktylii, krátké široké paže. U pacientů se vyskytuje rovněž ID či PAS. Charakteristická kraniofaciální dysmorfie se projevuje především přítomností mikrocefalie, plochého nosu a epikantu očních víček (Databáze OMIM, 2023a; Spinazzi a kol., 2023).

Turnerův syndrom (ORPHA# 881)

Turnerův syndrom je podmíněn monozomií chromozomu X (45,X). Fenotyp podobný Turnerovu syndromu je pozorován také u těchto nálezů v karyotypu: u mozaikové formy monozomie X (45,X/46,XX), izochromozomu X nebo u ring chromozomu X. Pacientky vykazují růstovou retardaci způsobenou haploinsuficiencí genu *SHOX*. Mezi příznaky se řadí neplodnost, vrozené kardiovaskulární vady, autoimunitní poruchy, defekty ledvin či jater. Ojediněle byl pozorován souběh s PAS (Björlin Avdic a kol., 2021; Databáze Orphanet, 2021a).

4.3.2 Mikrodeleční syndromy

Angelmanův syndrom (MIM# 105830)

Angelmanův syndrom je nejčastěji způsoben delecí v úseku 15q11-q13 na maternálním chromozomu v kombinaci s imprintingem na druhé alele (od otce) ve stejném úseku. V menším počtu případů se jedná o uniparentální disomii úseku, poruchu methylace či o mutace v genu *UBE3A* pro ubiquitin-protein ligázu E3A (MIM* 601623). Syndrom je charakterizovaný inteligenčním deficitem, atypickými behaviorálními vzorci a znaky PAS, absencí řeči, poruchami pohybu či rovnováhy. Nápadným znakem jsou také záchvaty smíchu (Burnside a kol., 2011; Databáze OMIM, 2023b).

Praderův-Williho syndrom (MIM# 176270)

Praderův-Williho syndrom je definován delecí ve stejném úseku chromozomu 15 jako je tomu u Angelmanova syndromu (tedy 15q11-q13), avšak na paternálním chromozomu a imprintingem na maternální alele. Rovněž byl u některých pacientů pozorován narušený methylační profil oblasti považovaný za další možnou příčinu syndromu. Zasaženými geny zodpovědnými za fenotyp Praderova-Williho syndromu jsou především *SNRPN* (MIM* 182279) či *NDN* (MIM* 602117). Projevy syndromu bývají ID, PAS, svalová hypotonie, obezita, hypogonadismus (Bennett a kol., 2015; Databáze OMIM, 2023c).

Syndrom Phelanové-McDermidové (MIM# 606232)

Syndrom Phelanové-McDermidové je mikrodeleční syndrom zasahující oblast 22q13, kde leží gen *SHANK3* (MIM* 606230). Kromě genu *SHANK3* mohou být zasažené navíc geny *ARSA* (MIM* 607574), *ACR* (MIM* 102480) a/nebo *RABL2B* (MIM* 605413) (Levy a kol., 2022). Mezi projevy syndromu patří novorozenecká hypotonie, celkové vývojové opoždění, poruchy či úplná absence řeči, PAS a další psychické i fyzické obtíže (Databáze OMIM, 2022a; Oberman a kol., 2015).

Syndrom Smithové-Magenisové (MIM# 182290)

Syndrom Smithové-Magenisové je ve většině případů způsoben intersticiální delecí v oblasti 17p11.2. Ve zbylých případech je na vině samotná mutace genu *RAI1* (MIM* 607642) ležícího v této oblasti. Projevy syndromu bývají brachycefalie, plochý obličej, opoždění řeči, znaky PAS, ztráta sluchu nebo poruchy spánku (Databáze OMIM, 2017a; Osório a kol., 2015).

Williamsův-Beurenův syndrom (MIM# 194050)

Podstatou Williamsova-Beurenova syndromu je delece v úseku 7q11.23, kde leží 28 známých genů. Jedná se o multisystémové onemocnění, jež se vyznačuje například srdečními vadami a kardiovaskulárními problémy, zubními anomáliemi, potížemi se sluchem, růstovým opožděním a dalšími obtížemi. Přítomná může být rovněž PAS. Navzdory inteligenčnímu deficitu mívají pacienti dobré komunikační schopnosti a velmi přátelskou povahu. Na základě typické morfologie obličeje – širokých úst, plných tváří a rtů, hvězdčového vzoru na duhovce – se někdy používá označení „skřítků“ či „elfů“ obličej (Databáze OMIM, 2020a; Osório a kol., 2015).

Mikrodeleční syndromy 22q11.2 (MIM# 188400 a 192430)

Deleci v oblasti 22q11.2 nalézáme u několika syndromů, které se vyznačují velmi podobnými symptomy. Jedná se o velokardiofaciální syndrom (MIM# 192430), Takaův syndrom a nejznámější DiGeorgův syndrom (MIM# 188400). Klíčová je ztráta (resp. haploinsuficience) genu *TBX1* (MIM* 602054) ležícího v této oblasti. Soubor obtíží zahrnuje hypoplázii brzlíku a příštítných tělísek, z čehož následně plyne deficit T-lymfocytů (náchylnost k infekcím) a hypokalcémie. Přítomné jsou i vrozené vady srdce a velkých cév, například Fallotova tetralogie. Typickým projevem jsou rozštěpové vady patra či rtů a vyskytuje se také vývojové opoždění, ID, znaky PAS či nižší vzrůst (Antshel a kol., 2007; Databáze OMIM, 2022b, 2020b). Delece v oblasti 22q11.21 vznikají ve většině případů (> 90 %) *de novo* (Rogdaki a kol., 2020).

4.3.3 Ostatní syndromy

Rettův syndrom (MIM# 312750)

Rettův syndrom je X-vázané onemocnění, při kterém je mutací poškozen gen *MECP2* (MIM* 300005) v lokusu Xq28 (kódující methyl-CpG-binding protein-2). K symptomatologii patří regres ve vývoji, ztráta řeči, stereotypní pohyby zejména horními končetinami, mikrocefalie a ID (Databáze OMIM, 2023d; Kaufmann a kol., 2012).

Smithův-Lemliho-Opitzův syndrom (MIM# 270400)

Smithův-Lemliho-Opitzův syndrom je onemocnění vzniklé na podkladě homozygotní (případně složeně heterozygotní) mutace genu *DHCR7* (MIM* 602858) v lokusu 11q13, který kóduje sterol delta-7-reduktázu. Výsledkem je narušený metabolismus cholesterolu. Syndrom se projevuje inteligenčním deficitem, hypotonií, mikrognacií, polydaktylií či syndaktylií, poruchami pohlavního vývoje, hypoplázií ledvin, PAS a dalšími obtížemi (Databáze OMIM, 2024a; Thurm a kol., 2016).

Möbiův syndrom (MIM# 157900)

Möbiův syndrom, Möbiova sekvence nebo také syndrom kamenné tváře jsou označení pro vrozenou obrnu hlavových nervů, nejčastěji VI. a VII. (*n. abducens*, *n. facialis*), projevující se ztuhlostí v obličeji a potížemi s pohyby oka, ID; mohou se vyskytnout i znaky PAS, potíže se žvýkáním či anomálie ve vývoji mozkových struktur. Jasná příčina onemocnění nebyla zatím identifikována, předpokládá se vliv genetických i environmentálních faktorů (např. prenatální expozice teratogenům). Na genetické úrovni byly pozorovány *de novo* mutace genů *PLXND1* (3q21.3; MIM* 604282) a *REV3L* (6q22; MIM* 602776) nebo přestavby v oblasti 13q12.2-q13 (Databáze OMIM, 2023e; Databáze Orphanet, 2021b; Johansson a kol., 2001).

Sotosův syndrom (MIM# 117550)

Sotosův syndrom je způsobený heterozygotní mutací v genu *NSD1* (MIM* 606681) nebo delecí v oblasti 5q35, která tento gen zahrnuje. Mezi symptomy patří nadměrný růst a urychlený kostní věk, akromegalie, zvětšená lebka, ID, PAS nebo také vrozené srdeční vady (Databáze OMIM, 2022c; Riccioni a kol., 2024).

Cohenův syndrom (MIM# 216550)

Příčinou Cohenova syndromu je mutace v genu *COH1* (MIM* 607817) v lokusu 8q22 (homozygotní nebo složeně heterozygotní mutace). K projevům se řadí například ID, obezita, mikrocefalie, progresivní retinopatie a další oční vady, pozorován byl i PAS (Databáze OMIM, 2023f; Howlin a kol., 2005).

Joubertův syndrom (MIM# 614464)

Joubertův syndrom vzniká na základě mutace genu *CEP41* (MIM* 610523) v lokusu 7q32. Je charakterizovaný psychomotorickým opožděním, ID, hypotonií, ataxií, variabilně se může vyskytnout rovněž PAS, polydaktylie nebo poruchy dýchání (Bulgheroni a kol., 2016; Databáze OMIM, 2023g).

Syndrom De Langeové (MIM# 122470, 300590, 610759, 614701, 300882, 620568)

Syndrom de Langeové nebo také Cornelia de Lange syndrom se dělí do několika typů, z nichž každý má různou genetickou příčinu. Nalezeny byly mutace genů *NIPBL* (5p13; MIM* 608667), *SMC1A* (Xp11; MIM* 300040), *SMC3* (10q25; MIM* 606062), *RAD21* (8q24; MIM* 606462), *HDAC8* (Xq13; MIM* 300269) nebo *BRD4* (19p13; MIM* 608749). Fenotyp může zahrnovat růstové a psychomotorické opoždění, ID, PAS, malformace končetin, rozštěpové vady patra (Databáze OMIM, 2024b, 2023b, 2023i, 2022d, 2021a, 2020c; Moss a kol., 2012).

Syndrom Noonanové (MIM# 163950 pro subtyp 1)

Syndrom Noonanové, podobně jako syndrome de Langeové, je skupinou poruch s heterogenním genetickým podkladem. Identifikovány byly mutace genů *PTPN11* (12q24; MIM* 176876), *LZTR1* (22q11; MIM* 600574), *KRAS* (12p12; MIM* 190070), *SOS1* (2p22; MIM* 182530), *RAF1* (3p25; MIM* 164760), *NRAS* (1p13; MIM* 164790), *BRAF* (7q34; MIM* 164757) a další. Syndrom se řadí mezi tzv. RASopatie, při kterých dochází k poškození genů pro komponenty RAS/MAPK signální dráhy. Společnými rysy různých podtypů syndromu Noonanové jsou především malý vzrůst a vrozené srdeční vady, pozorovány byly i PAS (Adviento a kol., 2014; Databáze OMIM, 2022e).

Syndrom fragilního X (MIM# 300624)

Syndrom fragilního X je způsoben mutací v genu *FMRI* (Xq27.3; MIM* 309550) mechanismem expanze trinukleotidů CGG (s 200 a více opakováními) v kombinaci s abnormální metylací. Následkem poruchy funkce tohoto genu bývá ID. Může se vyskytnout také PAS, hypermobilita kloubů, skolióza a různé další obtíže. Vizualními projevy syndromu jsou typicky podlouhlý obličej, zvětšené uši a výrazné čelisti (Databáze OMIM, 2022f; Lubbers a kol., 2022).

4.4 Společné rizikové lokusy v etiologii PAS a neuropsychiatrických poruch

Různá pozorování naznačují, že genetické aspekty autismu mohou být úzce spjaty s genetickými aspekty některých dalších neuropsychiatrických onemocnění, zejména ADHD a schizofrenie, případně bipolární či depresivní poruchy. Hovoří se například o společných rizikových lokusech. Pozorování podporuje fakt, že zmíněné neuropsychiatrické poruchy se někdy vyskytují společně (Hollocks a kol., 2019; Polderman a kol., 2014; Stahlberg a kol., 2004).

Společná riziková místa v genomu pro PAS, ADHD, schizofrenii, bipolární a depresivní poruchu popisuje např. metaanalýza Smoller a kol. (2013). Ta našla asociaci určitých jednonukleotidových polymorfismů (SNP) se všemi vyjmenovanými poruchami. Zejména SNP pro podjednotky napětově řízených vápníkových kanálů (geny *CACNA1C*, *CACNB2*; MIM* 114205 a 600003).

4.5 Mitochondriální dědičnost u PAS

Vzhledem ke klíčovému postavení mitochondrií v metabolismu buněk a organismu celkově, mohou deficity ve fungování mitochondrií či defekty v mitochondriálním genomu zásadně ovlivnit vývoj a zdravotní stav jedince. Doklady o pozorování mitochondriálních poruch tak existují i u pacientů s autismem. Jedná se zejména o defekty v dýchacím řetězci a oxidativní fosforylaci, například v enzymových komplexech I nebo II (Weissman a kol., 2008).

4.6 Epigenetická dědičnost u PAS

Epigenetika je velmi aktuální vědní disciplínou, jejíž poznatky jsou využitelné i ve výzkumu etiologie autismu. Diskutovanými mechanismy jsou například methylace DNA, modifikace histonů a remodelace chromatinu nebo deregulace microRNA. Důsledkem těchto dějů je typicky změna exprese genetické informace.

Methylace DNA je proces, který obvykle vede k umlčení exprese dané nukleotidové sekvence. Roli methylace v genové expresi lze detailněji demonstrovat i na některých genech, kterým se tato práce již věnovala v předchozích kapitolách (4.2.1 a 4.4). Například exprese genu *SHANK3*, u kterého se předpokládá asociace s PAS, a jehož mutace je zásadní v patogenezi syndromu Phelanové-McDermidové, je silně regulována pomocí oblastí CpG ostrůvků (úseků DNA s velkou mírou methylace) (Uchino a Waga, 2013). Významné může být například také narušení genu *MECP2* (viz Rettův syndrom), což je gen kódující methyl-binding protein 2. Methyl-vázající proteiny pak hrají roli v methylaci dalších genů díky své schopnosti vazby k methylované DNA nebo schopnosti rekrutace korepresorů transkripce (Databáze OMIM, 2021b; Peters a kol., 2013).

Epigenetické procesy mohou být ovlivněny i mutacemi v genech, které kódují histonové proteiny. To lze pozorovat na příkladu genu *HIST1H1E* (MIM* 142220), u kterého bylo vysloveno podezření na možnou souvislost s PAS a s deficitem intelektu. Produkt tohoto genu je histonový linkerový protein H1 zodpovědný za spojování a balení nukleozomů, tedy

v důsledku za vyšší organizaci chromatinu. Mutaci v tomto genu pozorovala například studie Duffney a kol. (2018), která našla *de novo* delecii v *HIST1H1E* vedoucí ke snížení exprese tohoto genu u chlapce s PAS.

Ke vzniku NVO včetně PAS může také přispět deregulace syntézy microRNA. MicroRNA (miRNA) jsou molekuly se schopností posttranskripční modifikace genové exprese, kterou realizují prostřednictvím RNA interference. Studie Vaccaro a kol. (2018) našla některé konkrétní miRNA u pacientů s PAS signifikantně častěji up-regulované nebo down-regulované oproti zdravé kontrole (např. miR34c-5p, miR92a-2-5p, miR19-b-1-5p a další).

Epigenetická studie Davide a kol. (2023), zaměřená především na proces methylace, našla signifikantně zvýšený epigenetický drift (hromadění chyb v epigenetických vzorech v průběhu života organismu) u vzorků krve a mozkové tkáně pacientů s PAS oproti vzorkům zdravé kontroly. Studie rovněž objevila vzácné epigenetické změny ve 41 genech. Některé z těchto genů byly v literatuře již dříve označeny jako asociované s PAS, většina těchto epigeneticky modifikovaných genů (35) však v souvislosti s autismem zkoumána ještě nebyla. Autoři studie věří, že díky funkci a vlivu těchto genů na procesy nezbytné pro správný vývoj nervové soustavy – transkripce, oxidativní metabolismus v mitochondriích, syntéza lipidů, vznik a modelace neuronových výběžků, tvorba synapsí apod – by tyto výsledky mohly být pro budoucí výzkum velmi zajímavé.

5 Metody pro vyšetřování abnormálních genetických variant a pro statistické zpracování výsledků práce

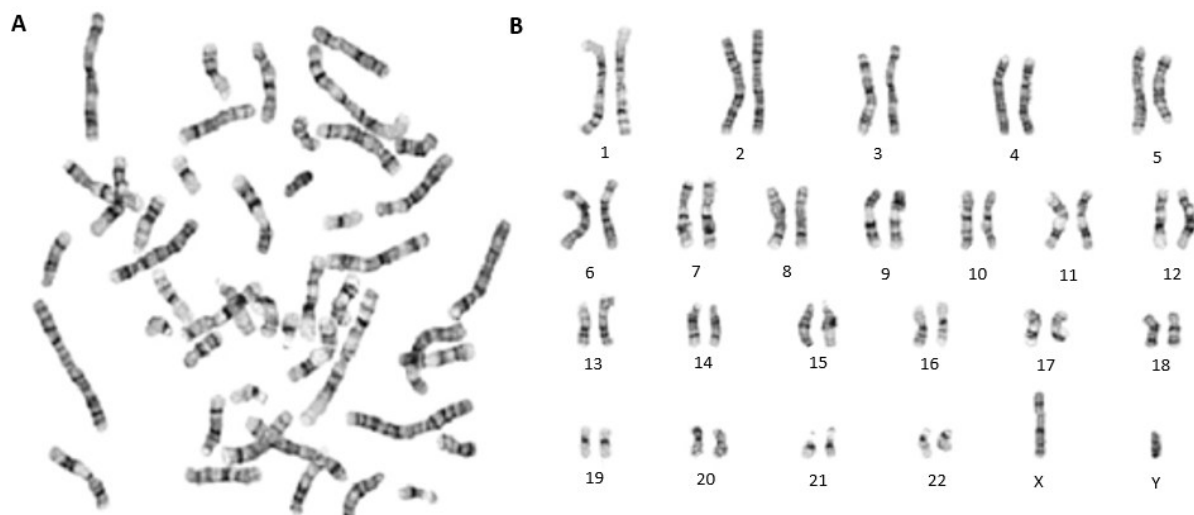
5.1 Karyotypování

Karyotypování je již poměrně dlouho známou metodou tzv. konvenční cytogenomiky, například metoda G-pruhování je známá od 70. let minulého století (Sanchez a kol., 1973). Pro svoji relativní jednoduchost a nízkou cenu je to ale metoda v klinické praxi stále hojně využívaná. Výstupem metody je vizualizace souboru jaderného genetického materiálu buněk, což umožní následný cytogenomický rozbor a zhodnocení případných numerických či strukturních abnormalit daného karyotypu.

Pro metodu karyotypování se preparáty nejčastěji zhotovují z kultivovaných lymfocytů periferní krve (u kterých je potřeba indukce dělení pomocí fytohemaglutininu), amniocytů nebo choriocytů. Pro pozorování chromozomů ve světelném mikroskopu je nutno buněčný cyklus kultivovaných buněk zastavit v metafázi mitotického dělení, ve které je chromatin plně spiralizovaný a je barvitelný. Následuje fixace mitóz na sklíčko a takto připravený preparát je následně inkubován v roztoku enzymu trypsinu. Trypsin naruší proteinovou strukturu chromozomů a umožní tak jejich barvitelnost. Barvitelnost různých úseků chromozomů závisí na uspořádání heterochromatinu a euchromatinu. Čím je koncentrace proteinů v daném úseku větší (a tedy genový obsah menší – charakteristické pro heterochromatin), tím se zde uchytí více barvy a oblast se barví tmavěji. Naopak genově bohaté oblasti s menším zastoupením proteinů (euchromatin) se barví světleji. Výsledkem jsou tak příčné pruhy. Pro barvení se používá nejčastěji barvivo Giemsa-Romanowski (G-pruhování) nebo Wrightovo barvivo.

Po obarvení chromozomů se sestavuje tzv. karyogram – zobrazení chromozomů seřazených a očíslovaných po párech homologů podle velikosti (od největších k nejmenším s výjimkou párů 21 a 22). Příklad karyogramu zachycuje obrázek 3. Pruhování (počet pruhů a jejich uspořádání) je pro každý chromozom charakteristické a umožňuje tak odhalit genetické přestavby. Pruhy (a rovněž chromozomové přestavby) se popisují podle aktuálně platného mezinárodního systému pro cytogenetickou nomenklaturu člověka (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ISCN).

Výhodou této metody je již zmiňovaná dostupnost a možnost vyšetření celého genomu najednou. Za nevýhodu může být považována možnost použití jen pro detekci úseků větších než 5 Mb, jelikož rozlišovací schopnost metody je 5–10 Mb (Shen a kol., 2016).



Obrázek 3 Mužský karyotyp (46,XY) vizualizovaný pomocí G-pruhování. Vlevo (A) je zobrazení původního rozložení chromozomů tak, jak jej lze pozorovat v mikroskopu, vpravo (B) je zobrazení chromozomů uspořádaných do karyogramu. (Převzato z Roshtkhari a Setarehdan (2008)).

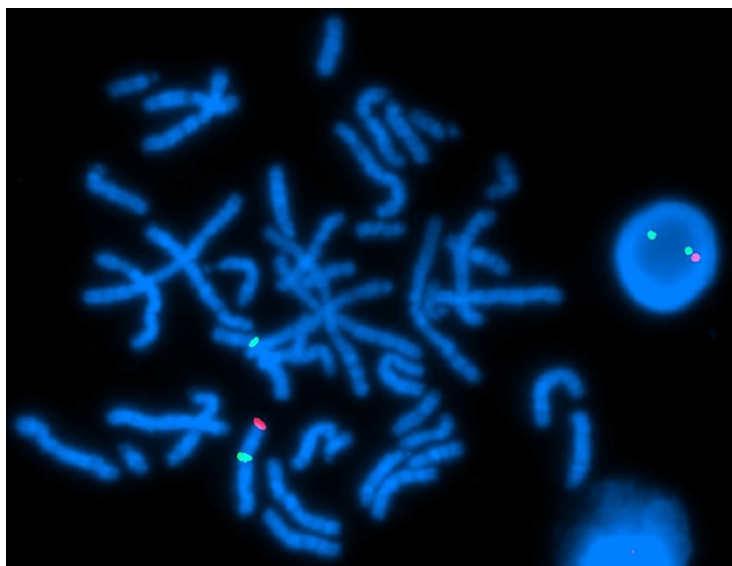
5.2 Fluorescenční *in-situ* hybridizace (FISH)

Metoda FISH je metodou molekulární cytogenomiky. Spočívá v hybridizaci fluorescenčně značených sond ke komplementární sekvenci vyšetřované DNA. Slouží tak ke zjištění přítomnosti a k lokalizaci konkrétního úseku DNA pomocí vizualizace v podobě fluorescenčního signálu. Rovněž je využívána k určení počtu kopií sekvence v buňkách nebo ke zjištění původu marker chromozomu. K vyšetřování vzorků pomocí metody FISH lze na rozdíl od karyotypování použít mimo metafázní chromozomy také interfázní jádra, neboť sondy jsou schopny proniknout jadernými póry a vázat se na interfázní DNA.

Základem metody je denaturace DNA vzorku a značené sondy a následná hybridizace jednořetězců DNA. Hybridizace je pojem označující spojení dvou vláken jiných molekul DNA na základě komplementarity bazí, v tomto případě spojení vlákna vyšetřované DNA a vlákna značené sondy. Označení „*in-situ*“ (na místě) odkazuje na skutečnost, že k hybridizaci dochází přímo ve vyšetřovaném materiálu, nikoli na izolované DNA. Pro zobrazení veškerého genetického materiálu se přidává také nespecifické fluorescenční kontrastní barvivo, které funguje jako interkalační činidlo vázající se do malého žlábků DNA, nejčastěji DAPI.

Příprava preparátů pro FISH je obdobná jako u karyotypování, liší se jen princip barvení. Mnoho sond je dnes již komerčně dostupných. Sonden se dělí na lokus specifické, satelitní (centromerické, subtelomerické) a malovací. K zachycení diagnostických či kontrolních signálů se používá fluorescenční mikroskop s různými barevnými filtry. Výsledný obraz může vypadat například tak, jak zachycuje obrázek 4.

Významnou výhodou této metody je její specifita, respektive specifita sond. Na to se však váže nevýhoda metody v podobě možnosti vyšetření jen té cílové DNA, se kterou je daná sonda komplementární (tedy je třeba dopředu znát cíl našeho zkoumání). Rovněž není možné identifikovat přesný rozsah aberace. Rozlišovací schopnost metody je cca 100 kb (Silva a kol., 2019).



Obrázek 4 Výsledek vyšetření metodou FISH. Zobrazeny jsou metafázni chromozomy a interfázni jádro. Fluorescenční signály značí přítomnost 2 chromozomů X (centromerická sonda – zelená) a genu SRY (lokus specifická sonda – červená). Jedná se tedy o konstituci XX s translokací genu SRY pocházejícího z chromozomu Y na chromozom X. Tento stav ústí v mužský fenotyp s ženskou konstitucí pohlavních chromozomů. (Převzato z Ibrahim a kol. (2023)).

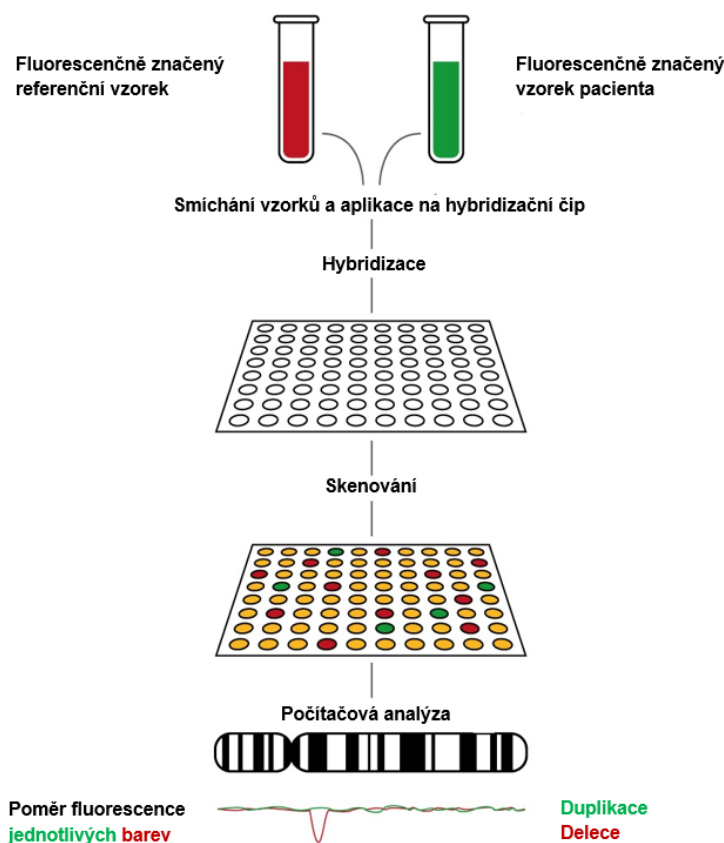
5.3 Komparativní genomová hybridizace na čipu (aCGH)

Array CGH je metodou molekulární cytogenomiky. Je založena na kvantitativním porovnávání genomu pacienta a referenční genomové DNA (normální kontroly). Oba genomy jsou značené odlišnými fluorescenčními barvami a hybridizují se současně na čipu.

Čip bývá sklíčko sloužící jako nosič mnoha krátkých oligonukleotidových fragmentů fungujících jako sondy. Každá sonda je na čipu zastoupena ve více kopiích a dohromady mohou pokrývat celý genom. Čipy se ale mohou lišit délkou sond a rovněž i hustotou pokrytí, což jsou faktory určující rozlišovací schopnost této metody. Vyrábí se taktéž čipy optimalizované pro

vyšetřování konkrétních poruch či syndromů. Výsledek hybridizace porovnávaných genomů se sondami se projeví jako fluorescenční signál, jehož intenzita je v každém bodě čipu hodnocena pomocí laserového skeneru. Převažující signál vyšetřovaného vzorku značí amplifikaci daného úseku, převažující signál kontrolní DNA značí delecí úseku vyšetřované DNA a vyrovnané intenzity obou genomů tvoří fúzní signál (bez numerické odchylky testovaného vzorku oproti kontrole). K zobrazení výsledků se využívá počítačový software a k vyhodnocení patogenity variant a jejich případných klinických a fenotypových aspektů pak různé online genetické databáze. Nalezené varianty jsou hodnoceny dle mezinárodně uznávané klasifikace jako benigní, pravděpodobně benigní, patogenní, pravděpodobně patogenní a není-li k dispozici dostatek relevantních informací, lze je označit jako VUS – varianty nejasného klinického významu (variants of uncertain significance). Stručný princip a popis metody microarray CGH ilustruje obrázek 5.

Velkým přínosem této metody je její rozlišení. Rozlišení se může lišit v závislosti na čipu, avšak obvykle se pohybuje kolem 20–200 kb. Lze identifikovat poměrně přesný rozsah mikroleceí a mikroduplikací. Rovněž není obvykle potřeba kultivace buněk. Naopak mezi nevýhody patří nemožnost odhalit balancované přestavby, podstatu strukturních přestaveb, uniparentální disomie nebo nízkofrekvenční mozaicismus (Silva a kol., 2019).



Obrázek 5 Schéma ilustrující princip metody array CGH. (Převzato a přeloženo z Frost a van Campen (2024)).

5.4 Statistické metody využívané k charakterizaci souboru a testování zvolené hypotézy

K charakterizaci zkoumaného souboru jsou nejčastěji využívány základní nástroje popisné statistiky (aritmetický průměr, modus, medián, minimum a maximum) umožňující sumarizaci a interpretaci dat (Minařík, 2000).

Pro testování zvolené hypotézy (viz. kapitola 6 a kapitola 7.4), která porovnává dvě kategoriální proměnné, se využívají nástroje exaktních statistických testů – chí kvadrát testu a Fisherova testu. Chí-kvadrát test sleduje nezávislost kategoriálních proměnných prostřednictvím nulové a alternativní hypotézy. Nulová hypotéza (H_0) obvykle tvrdí, že mezi proměnnými není žádná závislost, zatímco alternativní hypotéza (H_1) tvrdí, že mezi proměnnými nějaký vztah existuje. Výsledkem je statistika χ^2 (přesněji odhad) vyjadřující rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými frekvencemi hodnot v tabulce. Následně je vypočtena p -hodnota udávající pravděpodobnost, že by rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými frekvencemi vznikl náhodně.

Použitím Fisherova testu statistické významnosti lze vypočítat přesnou hodnotu p , v tomto případě odchylku od nulové hypotézy. Nulová hypotéza zde představuje nezávislý vztah dvou veličin a tedy že pozorované frekvence odpovídají vypočteným očekávaným frekvencím.

Základem je kontingenční tabulka sloužící jako nástroj pro sumarizaci dat a následné porovnání vztahu statistických znaků. Chí-kvadrát test se používá především v případech, kdy jsou očekávané četnosti v buňkách kontingenční tabulky výchozích dat dostatečně vysoké (většinou nad 5). Naopak použití Fisherova testu je vhodné při malých četnostech v buňkách kontingenční tabulky. Pro oba testy tedy platí, že pokud je p -hodnota menší než hladina významnosti, obvykle stanovená na 5 % (0,05), je nulová hypotéza zamítnuta a předpokládá se vzájemná závislost proměnných. Užitečnou statistickou hodnotou u obou testů je také odds-ratio (OR) odrážející sílu vztahu mezi proměnnými, respektive poměr pravděpodobností. Je možné také vypočítat interval spolehlivosti (CI) neboli rozpětí hodnot, ve kterém se s určitou pravděpodobností, obvykle 95 %, nachází skutečná hodnota odhadovaného parametru (Kim, 2017).

6 Cíle práce

Hlavním cílem této diplomové práce je detekce a hodnocení abnormálních genetických variant u jedinců s poruchami autistického spektra pomocí metod cytogenomiky. Práce si klade za cíl poskytnout ucelenou charakteristiku vybraného souboru jedinců s PAS z genetického hlediska a tím přispět k prohloubení pochopení vztahu mezi etiologií autismu a genetickými aspekty. Přehled jednotlivých cílů práce shrnuje následující seznam:

1. Provést vyšetření genomů jedinců z definovaného souboru s důrazem na vyšetření pomocí metody array CGH. Rovněž provést vyšetření karyotypováním a u vybraných případů FISH.
2. Statisticky charakterizovat vybraný vyšetřovaný soubor pomocí nástrojů popisné statistiky a rozřídít podle pohlaví, obdržené diagnózy, výsledku vyšetření (nález / bez patologického nálezu) a zahrnout informace o případných příbuzenských vztazích.
3. Analyzovat a statisticky zpracovat data o abnormálních genetických variantách získaná z vyšetření jedinců s PAS nebo s PAS v kombinaci s dalšími komorbiditami. Popsat a rozřídít nálezy podle:
 - charakteru detekované CNV (amplifikace / delece)
 - lokalizace varianty (na základě cytogenetických pruhů a počátečních a koncových pozic sond na čipu)
 - minimálního rozsahu
 - hodnocení nálezu (benigní, pravděpodobně benigní, patogenní, pravděpodobně patogenní, VUS, HFLP, přenašečství AR či X-vázaných poruch)
 - pokud je to možné, určit původ varianty (maternální, paternální, *de novo*)

Porovnat nálezy s dosud publikovanými studiemi.

4. Porovnat mezi sebou výsledky analýz genomů získaných uvedenými odlišnými metodami a posoudit jejich přínos pro vyšetřování genomů jedinců s PAS.
5. Zaměřit se podrobněji na genetické faktory v etiologii PAS a komorbidních NVO prostřednictvím exaktního statistického testování hypotézy: „Abnormální genetické varianty hodnocené jako patogenní, pravděpodobně patogenní či VUS se častěji vyskytují u pacientů s komorbidními neurovývojovými onemocněními než u pacientů s izolovanou PAS.“. Výsledky následně zhodnotit a porovnat s poznatky dřívějších studií.
6. Uvést případy nálezů u vybraných pacientů formou kazuistik.

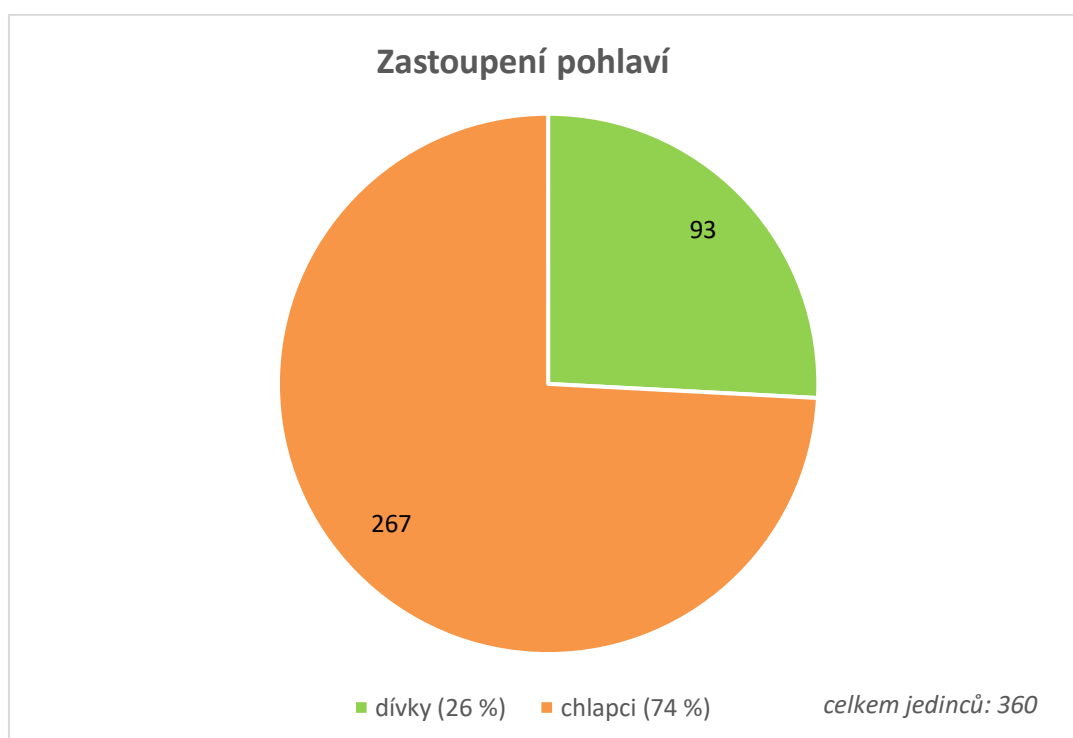
7 Materiál a metody

7.1 Charakteristika a statistické zpracování souboru

Soubor sestával z celkového počtu 360 pacientů s PAS, kteří přišli do ordinace lékařů – klinických genetiků do Fakultní nemocnice v Motole v letech 2022–2025.

7.1.1 Pohlaví

Z těchto celkových 360 jedinců bylo 93 ženského pohlaví (26 %) a 267 mužského pohlaví (74 %; obrázek 6). Takové rozložení odpovídá poměru přibližně 1:3 (přesněji 1:2,87).



Obrázek 6 Graf znázorňující poměr zastoupení pohlaví v analyzovaném souboru.

7.1.2 Věk

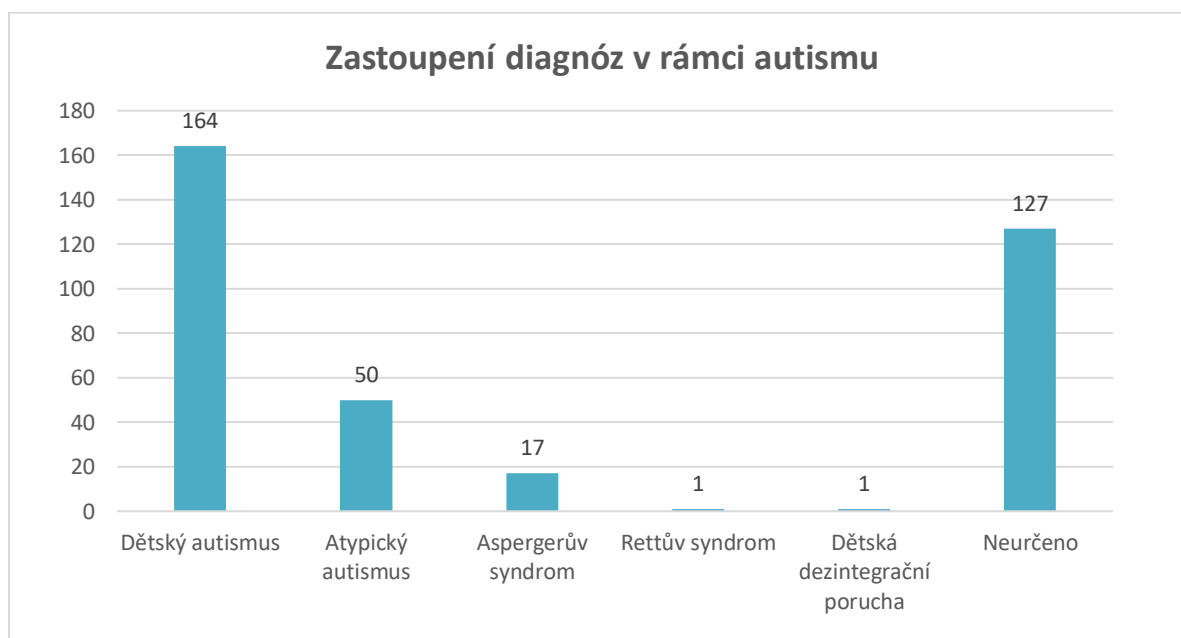
Stáří nejmladšího jedince v době prvního vyšetření klinickým genetikem bylo 13 měsíců, stáří nejstaršího jedince pak 42 let. Průměrný věk se rovnal 7,2 roku. Medián první návštěvy činil 5 let a 1 měsíc a modus 3 roky věku (viz tabulka 3). Nejčastěji se tedy dítě s PAS v doprovodu dospělých poprvé dostavilo do genetické ambulance ve věku 3 let, což bývá věk, ve kterém je obvykle již dobře patrna manifestace projevů PAS (např. tzv. „autistický regres“, viz kapitola 2.1).

Tabulka 3 Věk pacientů v době jejich prvního vyšetření lékařem – klinickým genetikem.

věk v době prvního vyšetření
nejmladší pacient: 13 měsíců = 1 rok a 1 měsíc
nejstarší pacient: 504 měsíců = 42 let
průměrný věk pacientů (aritmetický průměr): 86,83 měsíce = 7,2 roku
střední hodnota věku pacientů (medián): 61,5 měsíce = 5 let a 1 měsíc
nejčastější věk pacientů (modus): 36 měsíců = 3 roky

7.1.3 Zastoupení jednotlivých diagnóz PAS

Obrázek 7 představuje graf rozložení jednotlivých diagnóz pacientů v rámci poruch autistického spektra.



Obrázek 7 Zastoupení jednotlivých diagnóz PAS.

V souboru dominovalo zastoupení dětského autismu (164 jedinců), následované zastoupením atypického autismu (50 jedinců). Diagnózu Aspergerův syndrom obdrželo 17 jedinců. V souboru se vyskytl jeden případ Rettova syndromu a jeden případ dětské dezintegrační poruchy. U zbylých pacientů nebylo v lékařských zprávách specifikováno, o jaký konkrétní typ PAS se jedná.

7.1.4 Osobní a rodinná zátěž neurovývojovými obtížemi

Komorbidní NVO k PAS zahrnovaly ADHD / ADD, ID, specifické poruchy učení (dyslexie, dysgrafie, dysortografie, dyskalkulie), dyspraxii, OCD, depresivní poruchu, úzkostnou

poruchu, tikovou poruchu (např. Tourettův syndrom), schizofrenii, poruchu osobnosti, specifické fobie, poruchy příjmu potravy (mentální anorexie, mentální bulimie) a další obtíže rodinných příslušníků podobné obtížím probanda (PAS, poruchy řeči a jejího vývoje, psychomotorické opoždění). Přidružené NVO k PAS bylo popsáno u 65,8 % (237 pacientů), zatímco PAS bez přidružených neurovývojových obtíží byla zaznamenána u 34,2 % (123 jedinců). Pozitivní rodinná anamnéza stran NVO u pacientů s PAS (ať už samotným či s neurovývojovými komorbiditami) byla v souboru nalezena v nadpoloviční většině případů (52,2 %) – u 189 pacientů. Z toho ve 129 případech pozitivní rodinné anamnézy trpěl proband s PAS i dalšími přidruženými NVO, u probandů s PAS bez komorbidit byla pozitivní rodinná anamnéza odhalena téměř 2x méně často, v 60 případech. Tabulka 4 se věnuje osobní a rodinné zátěži stran NVO a tabulka 5 uvádí informace o zastoupení dvou nejčastějších NVO v tomto souboru (ADHD / ADD a ID). Tabulka 6 mapuje osobní a rodinnou zátěž týkající se epilepsie. Epilepsie nebyla v souboru pacientů s PAS vzácným jevem, proto je jí věnována celá tabulka 6. Na základě oddělení epilepsie v mezinárodní klasifikaci nemocí MKN-10 od neurovývojových poruch, je epilepsie i v této práci vyčleněna samostatně. Epilepsie byla zaznamenána v 10,3 % případů pacientů s PAS (u 37 jedinců). Z těchto 37 jedinců mělo pozitivní rodinnou anamnézu stran epilepsie 9 pacientů. Pacientů s PAS, kteří sami epilepsií netrpěli, ale v jejich rodině byl zaznamenán výskyt epilepsie, bylo 40. Souhrnem se tak v celém souboru vyskytlo 49 případů rodinného výskytu epilepsie.

Tabulka 4 Osobní a rodinná zátěž NVO u pacientů s PAS. V horní (bílé) části je uvedena osobní zátěž – komorbidní NVO k PAS. Spodní část (zelená) uvádí informace o rodinné zátěži – výskytu PAS či jiných NVO v rodině pacienta.

PAS + jiné NVO	237 (65,8 %)
PAS samotný	123 (34,2 %)
celkem pacientů	360
PAS s dalším NVO, genealogie pro PAS či jiná NVO pozitivní	129
PAS s dalším NVO, sporadický výskyt	108
PAS sám, genealogie pro PAS či jiná NVO pozitivní	60
PAS sám, sporadický výskyt	63
celkem pacientů	360
celkem případů pozitivní genealogie	189 (52,5 %)

Tabulka 5 Tabulka mapující zastoupení nejčastějších NVO v souboru a konkrétní počty zasažených jedinců.

	jedinci	zastoupení
ID	193	53,6 %
ADD/ADHD	112	31,1 %

Tabulka 6 Osobní a rodinná zátěž epilepsií (EPI) u pacientů s PAS. V horní (světle zelené) části je uvedena osobní zátěž – komorbidní EPI k PAS. Spodní část (tmavší zelená) uvádí informace o rodinné zátěži – výskytu EPI v rodině pacienta.

PAS + EPI	37
PAS bez EPI	323
celkem pacientů	360
komorbidní EPI u pacientů s PAS	10,3 %
PAS s EPI, genealogie stran EPI pozitivní	9
PAS s EPI, sporadický výskyt EPI	28
PAS bez EPI, genealogie stran EPI pozitivní	40
PAS bez EPI, genealogie stran EPI negativní	283
celkem pacientů	360
celkem případů pozitivní genealogie stran EPI	49

Ve vyšetřovaném souboru bylo zahrnuto i šest sourozeneckých dvojic (včetně dvou párů monozygotních dvojčat) a jedna sourozenecká trojice. Ve všech těchto případech vykazovali sourozenci velmi podobný fenotyp, jak detailněji přibližuje tabulka 18.

7.2 Vyšetřované vzorky a postup vyšetřování souboru

7.2.1 Vyšetřované vzorky

Soubor sestával z celkového počtu 360 pacientů s PAS, kteří byli vyšetřeni klinickým genetikem v rámci Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol v letech 2022–2025. Primárním materiálem u všech vzorků souboru byla periferní krev. Potřebné množství periferní krve k vyšetření se liší v závislosti na konkrétní metodě. Pro vyšetření karyotypu a FISH bylo zapotřebí 3 ml periferní krve, u novorozenců 1–2 ml. Pro vyšetření array CGH bylo třeba 4 ml periferní krve, u novorozenců 1–2 ml. Pro eliminaci koagulace krve byly vzorky určené k vyšetření karyotypu uchovávány ve zkumavkách s obsahem lithium-heparinu a vzorky určené k vyšetření array CGH v K₃EDTA zkumavkách (zkumavky se stěnami preparovanými tri-draselnou solí EDTA – kyseliny etylendiamin tetraoctové).

7.2.2 Postup vyšetřování souboru

Konkrétní postup a sled vyšetření závisí vždy na unikátních okolnostech stavu daného pacienta. Obvyklé schéma laboratorního vyšetření pacientů s PAS probíhalo následujícím způsobem:

1. vyšetření karyotypu
2. vyšetření syndromu fragilního X chromozomu metodou PCR a TP-PCR
3. FISH
4. array CGH
5. další vyšetření metodami molekulární genetiky, např. NGS, WES, MLPA apod.

U drtivé většiny pacientů s neurovývojovými obtížemi je sekvenční postup vyšetřování započat vyšetřením karyotypu. Následným krokem, zejména u pacientů s ID, je vyšetření syndromu fragilního X molekulární metodou PCR / TP-PCR, jelikož syndrom fragilního X je (u chlapců) z genetického hlediska nejčastější příčinou deficitu intelektu (Crawford a kol., 2020). Ve většině případů je dalším krokem vyšetření array CGH. Při podezření na konkrétní syndromy, mutace v konkrétních genech nebo např. při negativním nálezu všech předchozích metod se v posledním kroku v některých případech přistupuje k vyšetření dalšími metodami molekulární genetiky, jako jsou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) nebo metody sekvenování nové generace (NGS). O indikaci ke konkrétním vyšetřením a jejich pořadí rozhoduje lékař a může se u různých pacientů lišit.

7.3 Vyšetřovací metody

Následující kapitola uvádí podrobné pracovní postupy, dle kterých byly prováděny metody pro vyšetřování abnormálních genetických variant v cytogenomické laboratoři. Rovněž jsou vždy uvedeny použité chemikálie a speciální vybavení, které tyto metody vyžadují. Samotnému cytogenomickému vyšetření předchází zpracování vzorků krve, pro některá vyšetření kultivace buněk, následně izolace DNA. Tyto laboratorní úkony provedli u všech vzorků zkušeni pracovníci ÚBLG 2. LF UK. Informace o chemikáliích a přístrojích potřebných pro tyto procedury nebudou v následujícím shrnutí použité metodiky cytogenomických vyšetření zahrnuty.

7.3.1 Karyotypování

Vyšetření karyotypu bylo provedeno u 331 (z celkových 360) pacientů. Karyotyp všech těchto pacientů byl analyzován zkušenými pracovníky ÚBLG 2. LF UK a FN v Motole; u 144 z nich jsem pod dohledem zkušeného pracovníka provedla reanalýzu karyotypu za účelem osvojení si

metody. U 29 pacientů vyšetření karyotypováním provedeno nebylo. Důvodem neprovedení vyšetření byl obvykle nezáměr u samoplátců (některých pacientů zahraničního původu), nebo bylo rovnou přistoupeno k array CGH, pokud pacient s PAS neměl ve fenotypu nápadnější odchylky a nebyl tak předpoklad pozitivního nálezu v karyotypu. Vstupním materiálem u všech vyšetření karyotypováním byla periferní krev.

Použité chemikálie a technické vybavení

Tabulka 7 Přehled použitých chemikálií pro metodu karyotypování.

Příprava vzorku a fixace
Hypotonický roztok 0,075M KCl (3,8 g práškového KCl na 1000 ml destilované vody)
Fixační směs – ledová kyselina octová, methanol 1:3
Příprava barvicí směsi
Práškový trypsin (1:250)
Fosfátový pufr (0,1 mol/l o pH 6,8)
Roztok versen-trypsinu (6 ml 2,5% trypsinu, 400 ml versenu)
Wrightovo barvení
Wrightova eosinmetylenová modř
Gurrův pufr
Mikroskopování
Imerzní olej

Tabulka 8 Přehled speciálních přístrojů a pomůcek použitých pro metodu karyotypování.

Příprava vzorku a fixace
Cytogenomický přístroj HANABI
Mikroskopování a zobrazení výsledků
Optický mikroskop Leica DM2500 a snímací zařízení CoolCube MetaSystems
Karyotypovací software MetaSystems Ikaros

Postup práce

Příprava preparátu:

1. Před samotnou fixací jsou buňky z odebraného biologického materiálu kultivovány a vzorky jsou dále zpracovány pro účely následných vyšetření. Kultivace lymfocytů periferní krve je třídní proces, jehož základem je přidání kultivačního média a fytohematoglutininu k plné periferní krvi. Kultivace je ukončena colcemidem zastavujícím mitotické dělení buněk v metafázi.

Fixace:

2. Zkumavky s kultivovanými vzorky krve centrifugujeme 10 minut při 1000 otáčkách za minutu.
3. Odsajeme supernatant.
4. Resuspendujeme sediment v hypotonickém roztoku KCl (0,075M) zahřátém na 37 °C.
5. Inkubujeme 25 minut v termostatu při 37 °C.
6. Přidáme 15 kapek fixační směsi a promícháme.
7. Inkubujeme 10 minut při 37 °C.
8. Centrifugujeme 10 minut při 1000 otáčkách za minutu.
9. Odsajeme supernatant.
10. Za současného protřepávání přidáváme po kapkách fixační směs, cca 10 ml.
11. Centrifugujeme 10 minut při 1000 otáčkách za minutu.
12. Fixaci opakujeme 3 – 4x, dokud není supernatant čirý a bezbarvý.
13. Po posledním odsátí přidáme několik kapek fixace a ze vzniklé suspenze kápneme dvě kapky na podložní sklíčko.
14. Sklíčko protáhneme nad plamenem a dosušíme na plotýnce při 37 °C nebo sušíme v přístroji HANABI po dobu 105 vteřin.
15. Pomocí inverzního mikroskopu zhodnotíme hustotu a kvalitu mitóz, v případě potřeby suspenzi naředíme a postup opakujeme s dalšími skly od bodu 12.

Wrightovo barvení:

16. Nejprve rozpustíme 0,3 g práškového trypsinu (1:250) ve 100 g fosfátového pufru a zahřejeme na pokojovou teplotu (cca 21 °C) / při použití tekuté formy pipetujeme 1 ml 2,5% roztoku versen-trypsinu do zkumavek a doplníme do 100 ml fosfátovým pufrem.
17. Preparát fixovaný na sklíčku ponoříme na několik vteřin do kyvety s roztokem trypsinu o pokojové teplotě. Doba je kontrolována na prvních sklech každého vzorku a eventuálně podle potřeby upravována.
18. Následně sklíčko na několik vteřin ponoříme postupně do dvou kyvet naplněných vždy 100 ml fosfátového pufru.
19. Sklíčko ve vodorovné poloze přelijeme barvicím roztokem (na jedno sklíčko 0,9 ml Wrightovy eosinmethylenové modři a 3 ml Gurrova pufru) a ponecháme působit po

dobu několika minut (čas stanovujeme empiricky nejprve podle jednoho sklíčka a dále optimalizujeme).

Mikroskopování a hodnocení:

20. Pro hodnocení mitóz používáme optický mikroskop. Obarvený preparát prohlédneme nejprve pod zvětšením 100 – 150x.
21. V případě nalezení metafáze potenciálně vhodné k analýze kápneme na sklíčko imerzní olej a pomocí imerzního objektivu pozorujeme mitózu v celkovém zvětšení 1000 – 1500x.
22. Zhodnotíme mitózu pomocí cytogenomických parametrů – počet chromozomů, konstituce pohlavních chromozomů, délka chromozomů, počet a poloha chromozomových pruhů.
23. Zapišeme souřadnice polohy vhodné mitózy na sklíčku a zjištěnou konstituci karyotypu do pracovního protokolu. Takto numericky a strukturně hodnotíme u každého jedince obvykle 20 mitóz.
24. Vybrané mitózy nasnímáme pomocí CCD kamery, zobrazíme v počítačovém softwaru MetaSystems Ikaros a sestavíme karyogram sloužící jako dokumentace provedeného vyšetření.

7.3.2 Fluorescenční *in-situ* hybridizace

Provedla jsem dvě vyšetření metodou FISH u jediného pacienta (pacienta 327) s podezřením na zvětšený blok heterochromatinu v satelitní oblasti krátkého raménka chromozomu 15, které vyplynulo z předchozího vyšetření karyotypu. Vyšetření bylo provedeno s cílem ověřit, zda úsek neobsahuje některé geny. Jako kontrolní sonda pro chromozom 15 byla použita sonda Aquarius Microdeletion Probe Prader-Willi/Angelman (lokus *SNRPN*) od výrobce Cytocell. Pro vyšetření satelitní oblasti 15p byla použita sonda Acro-P-Arm Probe ve směsi s centromerickou sondou Aquarius Satellite Enumeration Probe (lokus D15Z4) rovněž od výrobce Cytocell. Vyšetření metodou FISH bylo z důvodu možné kauzality nálezu pro fenotyp zahrnující PAS indikováno u dalších dvou pacientů souboru. Přehled provedených vyšetření i důvod jejich provedení je uveden v tabulce 9. Vstupním materiálem pro všechna vyšetření byla periferní krev.

Tabulka 9 Přehled provedených vyšetření metodou FISH.

pac.	typ použité sondy	důvod vyšetření
17	centromerická (chr. 15)	objasnění původu marker chromozomu
	centromerická (chr. 13/21)	
	centromerická (chr. 14/22)	
	centromerická mFISH	
26	centromerická (chr. 9)	ověření přítomnosti mozaiky trisomie chr. 9
	subtelomerická (chr. 9)	
327	lokus-specifická (chr. 15)	ověření původu nadbytečného gen. materiálu a vyloučení strukturní přestavby v rámci chr. 15
	satelitní (chr. 15)	
	centromerická sonda (chr. 15)	

Použité chemikálie a technické vybavení

Tabulka 10 Přehled použitých chemikálií pro metodu FISH.

Příprava preparátu
Fixační roztok – ledová kyselina octová, methanol 1:3
Odvodnění
Pufr SSC 2x koncentrovaný (saline-sodium citrate, roztok chloridu sodného a citronanu sodného; pH 7,0)
0,05% roztok Tween 20 (polysorbát 20; výrobce Sigma Aldrich)
Ethanol o koncentracích 80 %, 96 % a 100 %
Aplikace sond
Hybridizační pufr (součást setů komerčně vyráběných DNA sond; výrobce Cytocell)
Aquarius Microdeletion Probe Prader-Willi/Angelman (LPU 005; výrobce Cytocell)
Aquarius Satellite Enumeration Probe (LPE 015G; výrobce Cytocell)
Acro-P-Arm Probe (LPE NOR; výrobce Cytocell)
Odmytí
Pufr SSC 0,4x koncentrovaný (pH 7,0)
Pufr SSC 2x koncentrovaný (pH 7,0)
0,05% roztok Tween 20 (výrobce Sigma Aldrich)
Aplikace DAPI
DAPI Antifade (součást setů komerčně vyráběných DNA sond; výrobce Cytocell)

Tabulka 11 Přehled speciálních přístrojů a pomůcek použitých pro metodu FISH.

Příprava preparátu
Diamantové pero
Mikroskop s fázovým kontrastem Meopta DN 816 Bi
Odvodnění
Topná deska Stuart SD160 nebo Thermometer VD-1M
Aplikace sond
Izolační a fixační lepidlo Fixo gum (výrobce Marabuwerke GmbH)
Topná deska Stuart SD160 nebo Thermometer VD-1M
Denaturace a hybridizace sond a cílové DNA
Přístroj Thermobrite
Odmytí
Vodní lázeň Nüve BM302
Teploměr pro kontrolu teploty vodní lázně
Aplikace DAPI
Fixační lak
Mikroskopování a zobrazení výsledků
Fluorescenční mikroskop Zeiss Axioimager Z1 s CCD kamerou MetaSystems
Software MetaSystems ISIS

Postup práce

Příprava preparátu:

1. Pro vyšetření FISH jsou používány nativní nebo kultivované buňky z odebraného primárního biologického materiálu. Je vytvořena buněčná suspenze a provedena fixace na podložní sklíčko. Postup fixace je obdobný jako u fixace preparátů pro karyotypování (viz kapitola 7.3.1). Hustotu suspenze (kvalitu a rozložení mitóz na podložním sklíčku) ověříme pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Pokud je suspenze příliš hustá, rozředíme ji fixačním roztokem a protřepeme. Pokud je suspenze naopak příliš řídká, zahustíme ji centrifugací po dobu 10 minut při 1000 otáčkách za minutu a poté odebereme takové množství supernatantu, aby byl výsledný objem suspenze menší než výchozí. Na podložním sklíčku křížkem vyznačíme diamantovým perem vhodné místo pro pozdější aplikaci hybridizačních sond – místo s kvalitními mitózami a ideální hustotou suspenze. Takto zpracované preparáty jsou uchovávány v chladničce při teplotě +2 °C až +8 °C.

Odvodnění:

2. Preparát (sklíčko se vzorkem) ponoříme za pokojové teploty (cca 21 °C) na 2 minuty do roztoku (pufru) 2x SSC + 0,05% Tween.

3. Následně preparát odvodňujeme vzestupnou alkoholovou řadou – vždy po 2 minutách v 80%, 96% a 100% roztoku ethanolu.
4. Preparát necháme oschnout v šikmé poloze a posléze jej umístíme na topnou desku vyhřátou na 37 °C.

Aplikace sond:

5. DNA sondy (uchovávané v mrazničce) v případě potřeby naředíme hybridizačním pufrem dle návodu od výrobce.
6. Pipetou aplikujeme sondu na podložní sklíčko – množství sondy je určeno rozměrem krycího sklíčka, pro sklíčko 15x15 mm je třeba pipetovat 2,9 µl roztoku.
7. Překryjeme krycím sklíčkem a přitlačíme pomocí pinzety tak, aby se kapka rozlila po celém povrchu krycího sklíčka a nikde (zejména při okrajích sklíčka) nezůstaly vzduchové bubliny.
8. Kolem okrajů krycího sklíčka nanese vrstvu těsnicího lepidla Fixo gum.
9. Preparát zakryjeme (chráníme před světlem) a necháme několik minut na topné desce vyhřáté na 37 °C, dokud nedojde k úplnému zaschnutí lepidla.

Denaturace a hybridizace sond a cílové DNA:

10. Vzorky vložíme do přístroje Thermobrite, který zajišťuje vhodné podmínky pro průběh denaturace i hybridizace cílové DNA a DNA sond – inkubujeme při 75 °C 3 minuty, posléze při 37 °C cca 19 hodin.

Odmytí:

11. Následujícího dne odstraníme pinzetou z preparátů lepidlo a sejmem krycí sklíčko.
12. Podložní sklíčko se vzorky ponoříme na 2 minuty do vodní lázně s roztokem 0,4x SSC vyhřátým na teplotu 72 °C (teplotu ověříme teploměrem).
13. Následně preparát vložíme na dobu 1 minuty při pokojové teplotě do roztoku 2x SSC + 0,05% Tween.
14. Preparát necháme v šikmé poloze oschnout.

Aplikace DAPI:

15. Na křížkem označené místo nanese roztok DAPI Antifade v množství 4,2 µl a překryjeme krycím sklíčkem 18x18 mm. Opatrně na krycí sklíčko zatlačíme pomocí

vrstvy buničiny, aby se roztok rovnoměrně rozlil po celé ploše krycího sklíčka. Případný přebytek roztoku buničinou odsajeme.

16. Na okraje krycího sklíčka nanese se fixační lak pro zabránění vyschnutí a možnému posunu krycího sklíčka.

17. Hotový preparát ponecháme před mikroskopováním cca 10 minut ve tmě, do úplného zaschnutí fixačního laku.

Mikroskopování a hodnocení:

18. Analýzu diagnostických a kontrolních fluorescenčních signálů provádíme v tmavé místnosti s využitím fluorescenčního mikroskopu a softwaru MetaSystems ISIS. Reprezentativní mitózy nasnímáme pomocí CCD kamery a archivujeme.

7.3.3 Microarray komparativní genomová hybridizace

Vyšetření metodou array CGH bylo provedeno u všech 360 pacientů v souboru. Z těchto jsem pod dohledem zkušeného pracovníka ÚBLG 2. LF UK a FN v Motole provedla 144 vyšetření na 18 čípech. Vstupním materiálem pro vyšetření byla ve všech případech izolovaná DNA z periferní krve.

Použité chemikálie a technické vybavení

Tabulka 12 Přehled použitých chemikálií pro metodu array CGH.

Příprava vzorku
1x TE pufr (<i>Tris-HCl + disodná sůl EDTA; pH 8,0; výrobce Sigma Aldrich</i>)
Fluorescenční značení
Random Primer (<i>součást kitu SureTag Complete DNA Labeling Kit; výrobce Agilent</i>)
5x reakční pufr (<i>součást kitu SureTag Complete DNA Labeling Kit; výrobce Agilent</i>)
10x dNTPs (<i>deoxyribonukleotidtrifosfáty; součást kitu SureTag Complete DNA Labeling Kit; výrobce Agilent</i>)
Fluorochrom Cy-3 (<i>cyanin3; součást kitu SureTag Complete DNA Labeling Kit; výrobce Agilent</i>)
Fluorochrom Cy-5 (<i>cyanin5; součást kitu SureTag Complete DNA Labeling Kit; výrobce Agilent</i>)
Exo (-) Klenow (<i>Klenowův fragment DNA polymerázy; součást kitu SureTag Complete DNA Labeling Kit; výrobce Agilent</i>)
Referenční DNA (<i>ženská, mužská; výrobce Kreotech</i>)
Hybridizace
Blokovací činidlo Cot-1 DNA (<i>1 mg/ml; výrobce Agilent</i>)
Blokovací činidlo 10x aCGH Blocking Agent (<i>součást kitu Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit; výrobce Agilent</i>)
Pufr 2x HI-RPM Hybridization Buffer (<i>součást kitu Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit; výrobce Agilent</i>)
Odmytí
Odmývací pufr 1 – Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 1 (<i>výrobce Agilent</i>)
Odmývací pufr 2 – Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 2 (<i>výrobce Agilent</i>)

Tabulka 13 Přehled speciálních přístrojů a pomůcek použitých pro metodu array CGH.

Příprava vzorku
UV-VIS spektrofotometr NanoDrop 8000 (výrobce NanoDrop)
Fluorescenční značení
Termocykler (výrobce Agilent)
Purifikace značené DNA
Purifikační kolonky se sběrnými zkumavkami (součást kitu SureTag Complete DNA Labeling Kit; výrobce Agilent)
Vakuový koncentrátor (Thermo Scientific Savant SpeedVac; výrobce Thermo Fisher Scientific)
Hybridizace
Kovová svorka na hybridizační komůrky (výrobce Agilent)
Pogumovaná hybridizační těsnící skříčka (hybridizační maska; výrobce Agilent)
Microarray čip formátu 8x60K SurePrint CGH 8x60K G3 ISCA (výrobce Agilent)
Hybridizační pec (výrobce Agilent)
Odmytí
Inkubátor (Mini H2200-H-E; výrobce myTemp)
Magnetická míchačka a míchadlo
Skenování a analýza dat
Ochranný plastový nosič na microarray čip (výrobce Agilent)
Laserový skener SureScan Microarray Scanner (výrobce Agilent)
Software CytoGenomics 5.1.2.1 (výrobce Agilent)

Postup práce

Příprava vzorku:

1. Pro vyšetření microarray CGH jsou používány vzorky izolované genomové DNA (gDNA) pocházející nejčastěji z periferní krve. Izolace DNA z periferní krve se provádí přímo bez nutnosti kultivace buněk. Izolace DNA je proces založený na lýzi jaderných buněk a následné extrakci a purifikaci DNA z lyzátu. Pro aCGH je třeba dosáhnout vysoké čistoty a integrity izolované gDNA (se spektrofotometrickými poměry $260/280 > 1,8$ a $260/230 > 2$). Koncentrace DNA by měla být 50 ng/μl – ověříme spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop a v případě vyšší koncentrace naředíme pufrům 1X TE (pH 8,0) do objemu 20 μl. Výchozí množství gDNA pro formát microarray 8x60K je minimálně 0,2 μg.

Fluorescenční značení:

2. Do každé reakční mikrozkuavky napipetujeme 13 μl vzorku gDNA pacienta (u formátu čipu 8x60K pracujeme s osmi mikrozkuavkami ve stripu pro vzorky pacientů a s dalšími osmi pro vzorky referenční DNA) a přidáme 2,5 μl Random Primeru. Opakovaným pipetováním dobře promícháme.

3. Vzorky vložíme do termocykleru a inkubujeme 10 minut při 98 °C s následnou udržovací teplotou 4 °C.
4. Vzorky odstředíme v centrifuze 1 minutu při 6 000 x g.
5. Připravíme si značící Master Mix – na jednu reakci je potřeba: 5 µl 5x reakčního pufru + 2,5 µl 10x dNTPs + 1,5 µl fluorescenční barvy cyaninu Cy-3 nebo Cy-5 + 0,5 µl fragmentu DNA polymerázy Exo (-) Klenow. Klenowův fragment DNA polymerázy udržujeme stále na ledu.
6. Do reakčních zkumavek (mikrozkumavek se vzorky gDNA pacientů a kontrol a Random Primerem) přidáme 9,5 µl značícího Master Mixu tak, aby vyšetřované a referenční vzorky byly značeny odlišnými fluorescenčními barvami (Cy-3 či Cy-5).
7. Mikrozkumavky opět vložíme do termocykleru a inkubujeme s nastavením: 2 hodiny při 37 °C, 10 minut při 65 °C, následná udržovací teplota 4 °C.

Purifikace značené gDNA:

8. Vzorky odstředíme v centrifuze 1 minutu při 6 000 x g.
9. Pro purifikaci využijeme pro každý vzorek purifikační kolonku, kterou vložíme do sběrné mikrozkumavky. Do každé kolonky přidáme 430 µl pufru 1xTE (pH 8,0) a značenou gDNA (celý objem). Kolonku víčkem uzavřeme.
10. Vzorky odstředíme po dobu 10 minut při 14 000 x g při pokojové teplotě. Posléze vyjmeme kolonku, odstraníme eluát a kolonku opět umístíme do stejné mikrozkumavky, tentokrát však opačně orientovanou (tak, aby se při centrifugaci využila druhá strana filtru).
11. Do každé kolonky přidáme 480 µl pufru 1xTE (pH 8,0).
12. Vzorky odstředíme po dobu 10 minut při 14 000 x g při pokojové teplotě.
13. Odstraníme eluát a kolonku umístíme dnem vzhůru do nové sběrné mikrozkumavky.
14. Odstředíme 1 minutu při 1 000 x g při pokojové teplotě.
15. Takto purifikovaný vzorek zkoncentrujeme ve vakuové centrifuze při 65 °C po dobu 15 minut při 60 otáčkách za minutu.
16. Přidáme 1xTE do objemu 10 µl a důkladně protřepeme (vortexujeme).
17. Odebereme 1,5 µl od každého vzorku a pomocí přístroje NanoDrop určíme výtěžek a specifickou aktivitu (inkorporaci fluorochromů).

Hybridizace:

18. V nové mikrozkuhavce zkombinujeme 8 μ l vyšetřovaného a 8 μ l příslušného referenčního vzorku (každý značen odlišným fluorochromem) tak, aby celkový výsledný objem činil 16 μ l. Toto provedeme u všech vyšetřovaných vzorků.
19. Ke vzorkům o objemu 16 μ l přidáme postupně vždy 2 μ l blokovacího činidla Cot-1 DNA (1 mg/ml); 4,5 μ l blokovacího činidla 10x aCGH Blocking Agent; 22,5 μ l pufru 2x HI-RPM Hybridization Buffer. Promícháme a krátce odstředíme.
20. Vzorky inkubujeme v termocykleru 3 minuty při 98 °C a poté 30 minut při 37 °C.
21. Vzorky odstředíme na centrifuze po dobu 1 minuty při 6 000 x g.
22. Do spodní části kovové svorky na hybridizační komůrky vložíme těsnící sklíčko (sklíčko s gumovými těsněními, tzv. hybridizační maska) značkou nahoru.
23. Do oddělených prostorů masky pomalu aplikujeme 42 μ l hybridizační vzorkové směsi.
24. Čip umístíme opatrně aktivní stranou dolů na hybridizační masku.
25. Vzniklé hybridizační komůrky v prostoru vytvořeném oběma skly zajistíme vrchní stranou kovové svorky a pevně utáhneme šroubem svorky.
26. Je třeba zajistit, aby v žádné komůrce nebyla nepohyblivá vzduchová bublina. Svorkou proto několikrát vertikálně otočíme, smočíme celý povrch prostorů komůrek a v případě nalezení nepohyblivých bublin poklepeme na kovovou část svorky.
27. Sestavené komůrky v kovové svorce umístíme do rotačního nosiče hybridizační pece a zatížení nosiče vyvážíme na protilehlé straně.
28. Hybridizujeme při 67 °C, 20 otáčkách za minutu a po dobu alespoň 16 hodin.

Odmytí:

29. Promývací pufr 2 předem vytemperujeme v inkubátoru na 37 °C.
30. Pro promývání čipu je zapotřebí tří různých dóz. Dózu č. 1 naplníme pufrem 1 o pokojové teplotě.
31. Do dózy č. 2 umístíme vložku na podložní skla a magnetické míchadlo, na míchačku postavíme dózu 1. Vyjmeme kovovou svorku s komůrkami z hybridizační pece a zkontrolujeme hladinu směsi, která by i po hybridizaci měla zaplňovat nadpoloviční většinu komůrek.
32. Vyjmeme kovovou svorku s komůrkami z hybridizační pece a zkontrolujeme hladinu směsi, která by i po hybridizaci měla zaplňovat nadpoloviční většinu komůrek.

33. Rozebereme kovovou svorku – položíme ji na rovný povrch, povolíme šroub, odejmeme vrchní část svorky a vyjmeme hybridizační komůrky tvořené oběma skly.
34. Sklo s microarray a sklo s těsněním (maskou) přilehlé k sobě uchopíme společně uprostřed dlouhé strany a bez oddělování vložíme do dózy č. 1 s promývacím pufrem 1.
35. Mezi stále ponořená sklíčka vložíme špičku pinzety a opatrně od čipu oddělíme masku, již necháme klesnout ke dnu.
36. Sklíčko uchopíme za konec s kódem, kývavým pohybem v kapalině opláchneme zbytky hybridizační směsi z jeho povrchu a spěšně ponoříme do dózy č. 2 s promývacím pufrem 1 (tak, aby při kontaktu se vzduchem nezaschlo). Zapneme magnetickou míchačku na 350 otáček za minutu po dobu 5 minut.
37. Nachystáme si dózu č. 3. s promývacím pufrem 2 zahřátým na 37 °C. Vložíme do ní sklíčko s microarray a inkubujeme 1 minutu.
38. Čip pinzetou opatrně a pomalu vytáhneme z dózy č. 3 (je třeba minimalizovat vznik kapek na sklíčku) a vložíme ho do ochranného plastového nosiče.

Skenování a analýza:

39. Plastový nosič s microarray čipem vložíme po odmytí do laserového skeneru SureScan Microarray Scanner a ihned skenujeme (aby nedošlo ke snížení intenzity fluorescenčního signálu).
40. Pomocí softwaru CytoGenomics 5.1.2.1 zobrazíme výsledný obraz microarray. Zhodnotíme kvalitu čipu a posléze analyzujeme nalezené varianty a porovnáváme je s daty internetových genetických databází.

7.3.4 Stanovení klinické významnosti CNV

Pro zhodnocení klinického významu nalezených CNV byl využíván interpretační postup podle Gijsbers a kol. (2011). Tento postup vychází z poznatků čtyř studií (Bruno a kol., 2009; Buysse a kol., 2009; Gijsbers a kol., 2009; Koolen a kol., 2009) zabývajících se vyšetřováním pacientů s ID, narušeným psychomotorickým vývojem a vrozenými vývojovými vadami pomocí metody aCGH. Konkrétní potřebné informace byly získávány z internetových genetických databází.

Prvním krokem bylo porovnání nalezené varianty s variantami uvedenými v databázích DGV (<http://dgv.tcag.ca>) a dbVAR (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar>). Na základě těchto dat lze určit, jestli není příslušná CNV benigní a běžně přítomná u zdravé populace. Další krok spočíval v prověření, zda není varianta spojená s již popsáním mikródelečním či

mikroduplikačním syndromem. Následně byla posouzena velikost a genový obsah oblasti nalezené varianty pomocí genomových prohlížečů UCSC (<https://genome.ucsc.edu>), Ensembl (<https://www.ensembl.org>) a GeneScout (<https://genescout.omim.org>). Informace o funkci zasažených genů byly čerpány z databází OMIM (<https://www.omim.org>), Orphanet (<https://www.orpha.net>) nebo GeneCards (<https://www.genecards.org>). Pokud nebyl u nalezené varianty vyloučen možný patogenní charakter (s přihlédnutím k případné variabilní expresivitě poruchy či její neúplné penetranci), byla každá CNV porovnána s variantami uvedenými v následujících databázích: DECIPHER (<https://www.deciphergenomics.org>), ClinGen (<https://www.clinicalgenome.org>), ISCA (sloučená s platformou ClinGen, search.clinicalgenome.org) či ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) a rovněž v publikacích nalezených pomocí internetového vyhledávače PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Pro odlišení a porovnání benigních variant v populaci byla rovněž využívána databáze DGV (Database of Genomic Variants; <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). Pokud to bylo možné, byl dodatečným vyšetřením určen rodičovský původ varianty (zděděná či *de novo*). Na základě všech získaných informací byla posuzována možnost souvislosti nalezené CNV s fenotypem nositele dané varianty. Výsledkem tohoto interpretačního procesu bylo vždy zařazení dané varianty do finální kategorie významnosti (benigní, pravděpodobně benigní, patogenní, pravděpodobně patogenní, VUS).

7.4 Metody statistického testování zvolené hypotézy

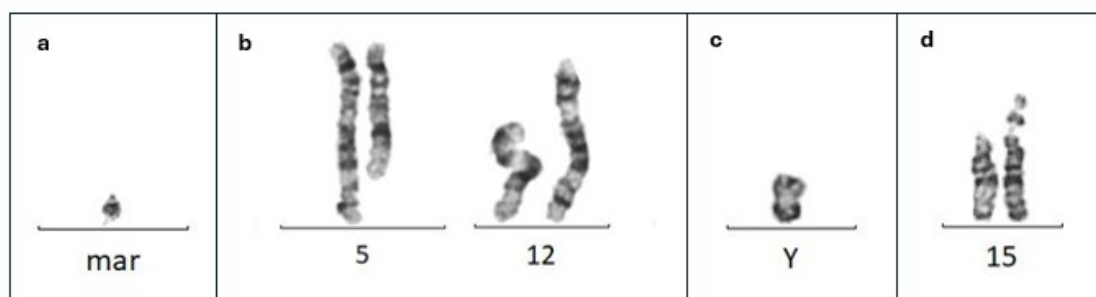
Pro účely hlubšího vhledu do problematiky fenotypové a genotypové komplexity PAS jsme zkoumali případnou souvislost výskytu abnormálních genetických variant s fenotypem daných jedinců se zaměřením na NVO. Pokud pacient mimo PAS nevykazoval žádné z NVO, byl jeho případ označen za „izolovaný autismus“. V opačném případě se jednalo o „kombinované postižení“. U sledování přítomnosti abnormálních varianty v genomu jedinců jsme se zaměřili na kategorie aberací zhodnocených jako PAT, P_PAT a VUS, u kterých je nejvyšší předpoklad případné korelace s fenotypem. Kontingenční tabulkou shrnující počty jedinců ve vymezených skupinách je tabulka 17. Pro testování hypotézy byly použity testy chí-kvadrát test a Fisherův exaktní test. V této analýze byly v jedné kategorii pozorovány relativně nízké četnosti (min. hodnota 8), což by mohlo ovlivnit spolehlivost výsledků χ^2 testu, a proto byl jako doplňkový test použit Fisherův exaktní test, jež je vhodný zejména pro malé četnosti. Cílem použití obou testů bylo podpořit sílu statistického hodnocení. Oba testy byly provedeny pomocí softwarového programu RStudio.

8 Výsledky

8.1 Karyotypování

Z celkového počtu 331 provedených vyšetření pomocí karyotypování byly nalezeny čtyři abnormální varianty (u čtyř různých pacientů), což činí 1,21 % z celkového počtu provedených vyšetření. Tři z těchto variant byly hodnoceny jako pravděpodobně benigní a jednalo se o tyto nálezy – přítomnost marker chromozomu, inverze na chromozomu Y a zvětšený heterochromatinový blok na chromozomu 15. Jeden případ byl pak hodnocen jako aberace nejasného klinického významu, který představoval zjevně balancovanou reciprokou translokaci mezi chromozomy 5 a 12.

Pozorované abnormální varianty zachycuje obrázek 8 a další podrobnosti o těchto variantách jsou shrnuty v tabulce nálezů (tabulka 14).



Obrázek 8 Parciální karyotypy vyobrazující pozorované abnormální změny. Zleva: marker chromozom obsahující heterochromatinovou oblast centromery chromozomu 5 (a), reciproká translokace mezi dlouhými raménky chromozomů 5 a 12 (b), pericentrická inverze na chromozomu Y (c), zvětšený heterochromatinový blok v satelitní oblasti krátkého raménka chromozomu 15 (d).

Tabulka 14 Přehled nalezených variant pomocí vyšetření karyotypováním. P_BEN – pravděpodobně benigní; del – delece.

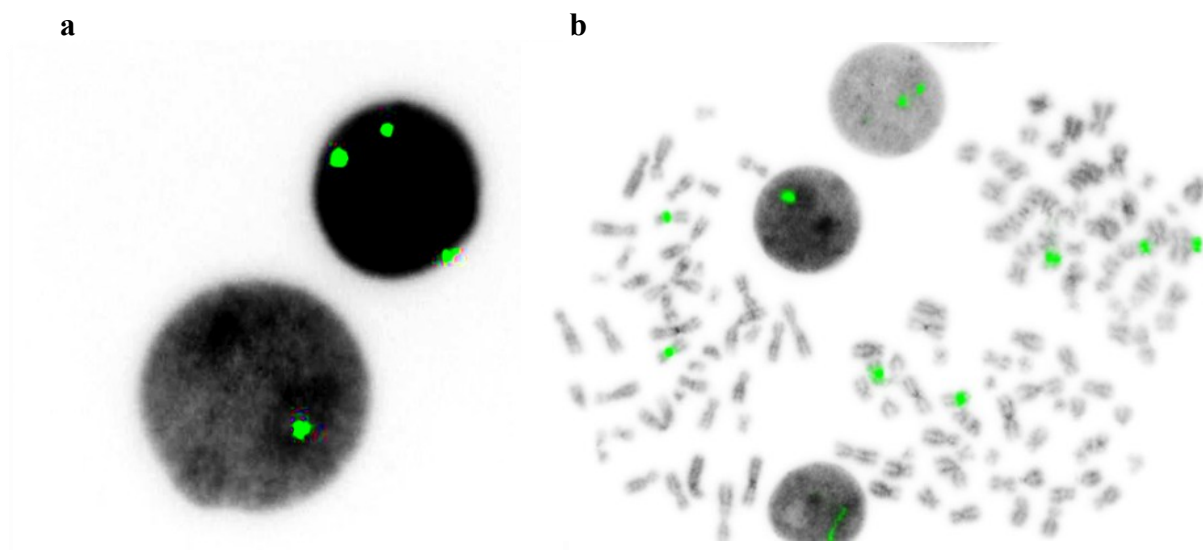
pac.	nález	hodnocení	poznámka
17	47,XY,+mar[5]/46,XY[40]	P_BEN	marker chromozom obsahující heterochromatinovou oblast v mozaikovém stavu (11 %)
90	46,XY,t(5;12)(q13.3;q15)dn	NEJASNÉ	zjevně balancovaná reciproká translokace, nelze vyloučit možnost disrupce genů či regul. oblastí, popř. poziční efekt
112	46, X,inv(Y)	P_BEN	pericentrická inverze na chr. Y, která je ve většině případů benigní
327	46,XY,15pstk+ps+	P_BEN	zvětšený heterochromatinový blok v satelitní oblasti krátkého raménka chr. 15

8.2 Fluorescenční *in-situ* hybridizace

Vyšetření genomu pomocí metody FISH bylo provedeno u třech pacientů za účelem upřesnění nálezu zjištěného jinou metodou. Jednalo se o pacienty 17, 26 a 327.

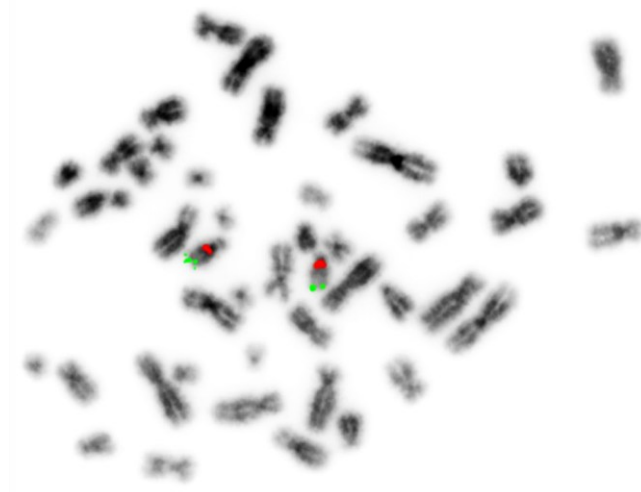
U pacienta 17 bylo na základě předchozího vyšetření karyotypu vysloveno podezření na přítomnost marker chromozomu obsahujícího heterochromatinovou oblast centromery nadpočetného chromozomu v mozaikovém stavu. Frekvence mozaiky byla stanovena na 11 %. Při vyšetření FISH byla použita nejprve lokus-specifická sonda chromozomu 15 (gen *SNRPN*) a sondy pro detekci centromery akrocentrických chromozomů 13, 14, 15, 21 a 22. Tyto chromozomy bývají nejčastěji zastoupeny mezi nalézánými marker chromozomy (Crolla a kol., 2005). Vyšetření FISH nicméně přítomnost centromery žádného z nich nepotvrdilo. Následně bylo provedeno vyšetření metodou centromerické mnohobarevné FISH, kterou bylo stanoveno, že se jedná o marker chromozom sestávající pouze z centromery chromozomu 5.

Pacientka 26 byla metodou FISH vyšetřována na základě výsledku dříve provedeného vyšetření array CGH, které naznačilo přítomnost přibližně 23% mozaikové formy trizomie chromozomu 9. Vyšetření FISH potvrdilo přítomnost mozaiky buněčné linie 47,XX,+9, a navíc odhalilo i přítomnost další buněčné linie, 45,XX,-9. Výsledné poměry zastoupení obou patologických buněčných linií oproti normální dizomické linii byly po provedení FISH stanoveny na cca 20 % trizomie 9 a cca 8 % monozomie 9. Přítomnost těchto buněčných linií, jak ji zachytilo vyšetření FISH, je zobrazena na následujících fotografiích (obrázek 9a, 9b).

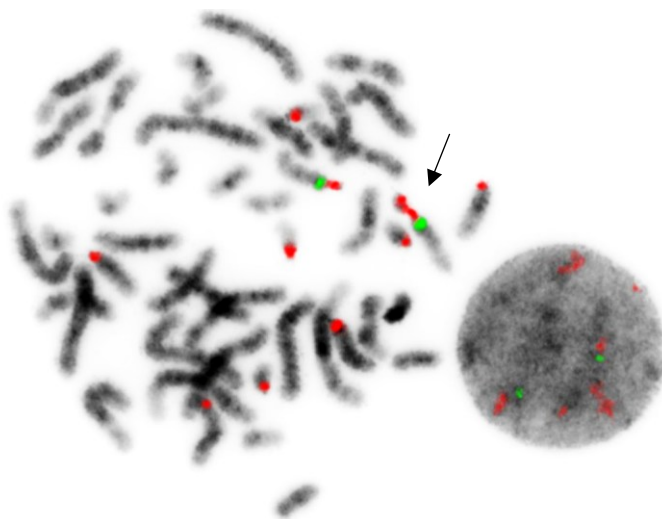


Obrázek 9a, 9b Výsledek vyšetření FISH u pacientky 26 – odlišné počty signálů značící monozomii, dizomii a trizomii chromozomu 9 zachycené na interfázních jádrech a mitózách pomocí centromerické sondy pro chromozom 9 (zeleně).

Při vyšetření pacienta 327 pomocí metody karyotypování byla zjištěna přítomnost nadpočetné sekundární konstriktce a materiálu satelitní oblasti krátkého raménka chromozomu 15. Bylo tedy provedeno cílené vyšetření FISH za účelem ověření původu nadbytečného materiálu a vyloučení možné komplexní přestavby v rámci chromozomu 15 a přítomnosti relevantních genů. Jednalo se o dvě hybridizace. První zahrnovala směs sond pro lokus (gen) *SNRPN* (region PW-AS syndromů), centromeru chromozomu 15 a subtelomeru 15q. Použitím těchto sond bylo prokázáno, že v nadbytečné oblasti se nenacházejí kódující sekvence 15q spojené s abnormálním fenotypem (obrázek 10). Druhá hybridizace byla provedena se směsí sond pro mikrosatelitní oblasti krátkých ramen akrocentrických chromozomů a centromerické sondy pro chromozom 15. Tímto vyšetřením bylo prokázáno, že nadbytečný materiál pochází ze satelitní oblasti krátkých ramen akrocentru, (obrázek 11).



Obrázek 10 Výsledek první hybridizace u pacienta 327 – zelené signály pochází ze subtelomerických oblastí chr. 15, červené signály z pericentrické oblasti *SNRPN*, u kterých nebylo prokázáno zmnožení v oblasti satelitu 15p.



Obrázek 11 Výsledek druhé hybridizace u pacienta 327 – červené signály vizualizují satelitní oblasti akrocentrických chromozomů, zelené signály představují centromeru chromozomů 15. Chromozom označený šipkou obsahuje zmnožený materiál v satelitní oblasti.

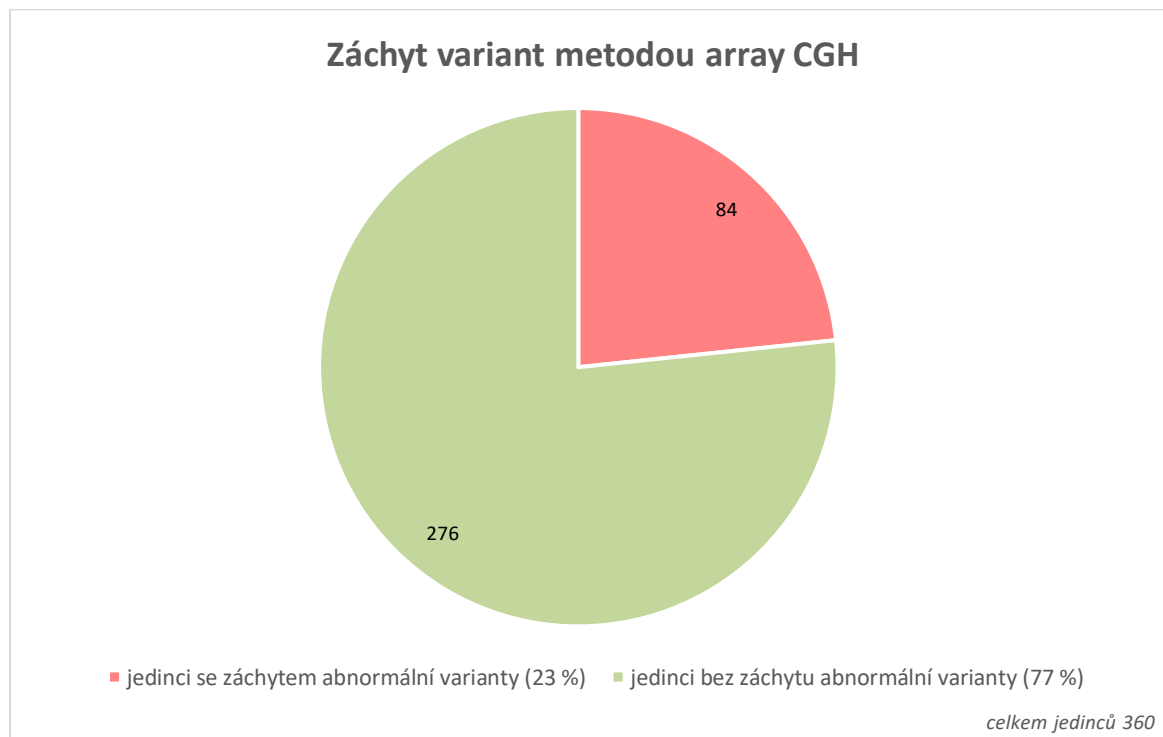
Souhrnný přehled nálezů uvádí následující tabulka (tabulka 15).

Tabulka 15 Přehled nalezených variant pomocí vyšetření FISH; P_BEN – pravděpodobně benigní; PAT – patogenní.

pac.	nález	hodnocení	poznámka
17	47,XY,+mar.ish der(5)(D5Z2+)	P_BEN	marker obsahující centromeru chr. 5
26	nuc ish (D9Z4x3)[66/334]/(D9Z4x1)[25/334]/(D9Z4x2)[243/334]	PAT	20 % jader mozaiky trizomie chr. 9; 8 % jader mozaiky monozomie chr. 9
327	46,XY,15ps+.ish 15(NOR++;D15Z4+;SNRPN+;D15S936+)	P_BEN	nadbytečný genetický materiál satelitního původu

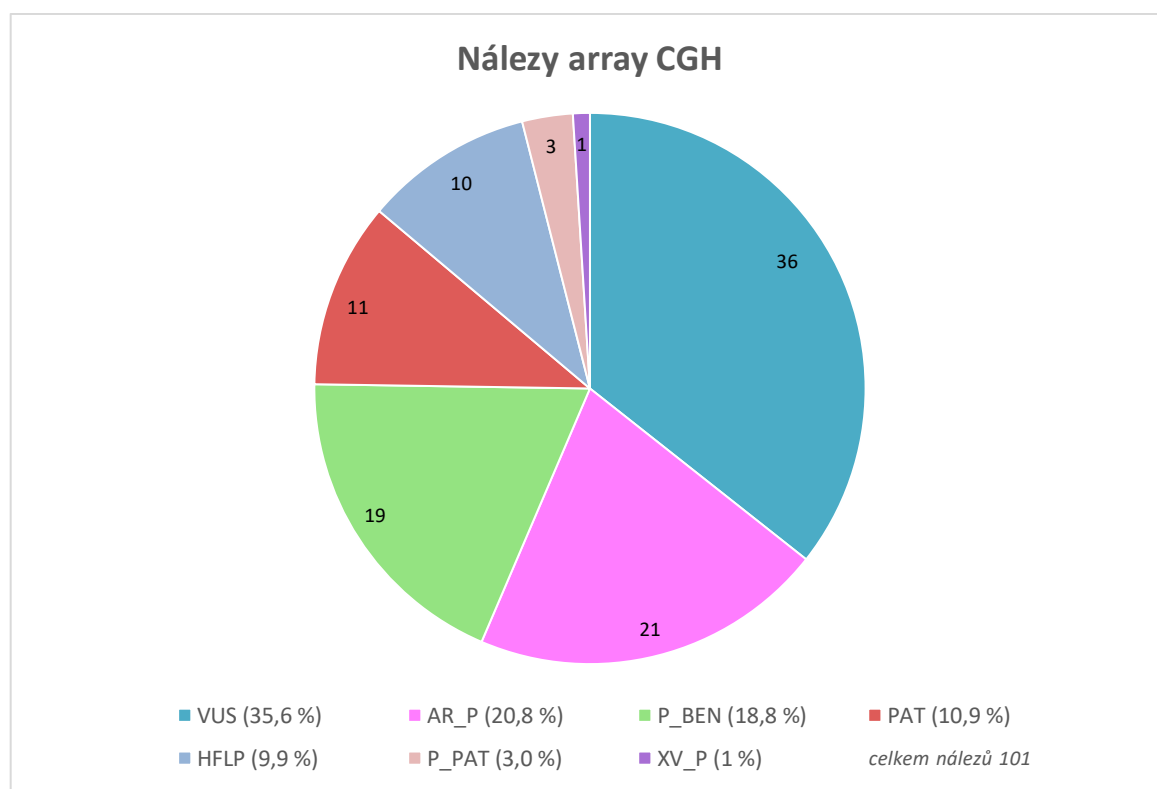
8.3 Array CGH

Vyšetření genomu pomocí metody array CGH bylo provedeno u všech 360 pacientů v souboru. U 84 jedinců byla nalezena abnormální CNV, což představuje 23,3 % ze všech pacientů s PAS. Někteří pacienti byli nositeli více variant, a tak celkový počet nálezů byl roven 100. Záchyt variant metodou array CGH ilustruje následující graf (obrázek 12).



Obrázek 12 Záchyt abnormálních genetických variant pomocí metody array CGH.

Největší podíl z nálezů abnormálních variant tvořily varianty nejasného klinického významu, VUS, u kterých je obtížné spolehlivě definovat dopad na fenotyp (např. z nedostatku informací o konkrétní variantě v genetických databázích nebo z důvodu nedostatečně prozkoumané a publikované funkce zasaženého genu. Varianty VUS představují 35,6 % nálezů (36 variant). Druhými nejčastěji zachycenými abnormálními nálezy, ve 20,8 % případů (21 variant), byla přenašečství AR onemocnění. Patogenní nález byl zachycen v 10,9 % případů (11 variant). HFLP varianta byla nalezena v 9,9 % případů (10 variant) a pravděpodobně patogenní nález ve 4 % případů (3 varianty). Jeden pacient byl přenašečem X-vázaného onemocnění, které tak představovalo téměř 1 % všech nálezů. U 18,8 % (19 abnormálních variant) se jednalo o pravděpodobně benigní nález. Konkrétní počty takto hodnocených variant uvádí graf na obrázku 13 a přehled všech nalezených variant metodou aCGH uvádí tabulka 16.



Obrázek 13 Rozložení hodnocení nálezů abnormálních variant nalezených metodou array CGH. VUS – varianta nejasného klinického významu, AR_P – přenašečství autozomálně recesivního onemocnění, P_BEN – pravděpodobně benigní, HFLP – High-Frequency Low-Penetrant aberace, PAT – patogenní, P_PAT – pravděpodobně patogenní, XV_P – přenašečství X-vázaného onemocnění.

Tabulka 16 Přehled nalezených variant pomocí vyšetření array CGH. Varianty jsou uvedeny vždy v minimálním rozsahu. *P_BEN* – pravděpodobně benigní, *HFLP* – High-Frequency Low-Penetrant aberace, *PAT* – patogenní, *P_PAT* – pravděpodobně patogenní, *VUS* – varianta nejasné klinické significance, *XV_P* – přenašečství X-vázaného onemocnění; *del* – delece, *dup* – duplikace, *sy* – syndrom, *AD* – autozomálně dominantní. Hvězdička označuje pacienty a varianty v jejich genotypu, které jsou podrobněji popsány v kazuistikách (viz kapitola 9.5 Kazuistiky).

pac.	nález	zasazené geny	hodnocení	poznámka
3	arr[GRCh37]1q25.1(174396221_174784484)x1 (388,0 kb)	<i>RABGAP1L</i>	VUS	12.–19. exon
4	arr[GRCh37]15q13.3(31972646_32509926)x3 <i>pat</i> (537,0 kb)	<i>CHRNA7</i>	HFLP	při max. rozsahu navíc 1.–2. exon <i>OTUD7A</i>
	arr[GRCh37]16p13.3(6819602_6977980)x1 <i>mat</i> (158,0 kb)	<i>RBFOX1</i>	HFLP	3. intron, resp. 1. exon alternativního transkriptu
5	arr[GRCh37]15q15.3(43851548_43951301)x1 (100,0 kb)	<i>CATSPER2</i> , <i>STRC</i>	AR_P	přenašečství hluchoty, resp. poruchy reprodukce u mužů
8	arr[GRCh37]16p12.2(21475060_21728426)x1 (253,0 kb)	<i>OTOA</i>	AR_P	přenašečství hluchoty
12	arr[GRCh37]5p15.33(100416_658210)x3 <i>pat</i> (558,0 kb)	6 genů	VUS	
	arr[GRCh37]16q22.1(68694254_69178612)x1 <i>mat</i> (484,0 kb)	5 genů	VUS	
	arr[GRCh37]22q13.33(51123491_51178264)x1 <i>dn</i> (55,0 kb)	<i>SHANK3</i> , <i>ACR</i> , (<i>RABL2B</i>)	VUS	oblast sy Phelan-McDermid
13	arr[GRCh37]5p15.33(100416_658210)x3 <i>pat</i> (558,0 kb)	6 genů	VUS	
	arr[GRCh37]16q22.1(68694254_69178612)x1 <i>mat</i> (484,0 kb)	5 genů	VUS	
	arr[GRCh37]22q13.33(51123491_51178264)x1 <i>dn</i> (55,0 kb)	<i>SHANK3</i> , <i>ACR</i> , (<i>RABL2B</i>)	VUS	oblast sy Phelan-McDermid
26	arr(9)x3 <i>dn</i> [0,23]	všechny geny chr. 9	PAT	~ 23% mozaika trizomie chromozomu 9
30	arr[GRCh37]9p24.3(204193_340142)x3 (135,0 kb)	<i>DOCK8</i>	P_BEN	1.–12. exon
32	arr[GRCh37]15q11.2(22765628_23300287)x1 <i>dn</i> (534,6 kb)	<i>NIPA1</i> , <i>NIPA2</i> , <i>TUBGCP5</i> , <i>CYFIP1</i>	HFLP	rekurentní del BP1-BP2
	arr[GRCh37]16p13.3(7535741_7611521)x3 <i>pat</i> (75,7 kb)	<i>RBFOX1</i>	VUS	5. exon

38	arr[GRCh37]Xp11.3(43829336_43831908)x3 (2,6 kb)	NDP	P_BEN	1. intron
40	arr[GRCh37]4q22.3(96185471_97912757)x1 <i>pat</i> (1720,0 kb)	12 genů	VUS	
47	arr[GRCh37]2q37.3(242119079_243087750)x1 <i>mat</i> (970,0 kb)	15 genů	VUS	
50	arr[GRCh37]8p22(15967647_16043322)x1 (76,0 kb)	MSR1	P_BEN	2.–8. exon
	arr[GRCh37]16p11.2(31986127_33773163)x3 (1790,0 kb)	–	P_BEN	
51	arr[GRCh37]Xp22.33/Yp11.32(291285/241285_487476/437476)x3 (196,0 kb)	PPP2R3B	P_BEN	
52	arr[GRCh37]7p15.3(22423692_22918741)x1 <i>pat</i> (495,0 kb)	IL6	VUS	
55	arr[GRCh37]2q13(110862477_110964737)x1 (102,2 kb)	NPHP1, MALL	AR_P	přenašečství poruch funkce ledvin
56	arr[GRCh37]16p11.2(29592783_30190568)x1 <i>mat</i> (513,0 kb)	22 genů	PAT	16p11.2 mikrolečň sy, zlomová místa BP4-BP5
65	arr[GRCh37]2p16.3(51180561_51201469)x1 (20,9 kb)	NRXN1	HFLP	
71	arr[GRCh37]Xp22.31(6488721_8097511)x3 (1609,0 kb)	STS	HFLP	
73	arr[GRCh37]9q34.11(131750254_131888940)x1 (139,0 kb)	6 genů	AR_P	přenašečství několika AR chorob
74	arr[GRCh37]Xp22.31(6488721_8097511)x3 (1609,0 kb)	STS	HFLP	
78	arr[GRCh37]15q13.3(32065000_32509926)x3 <i>pat</i> (445,0 kb)	CHRNA7	VUS	při max. rozsahu navíc 1.–2. exon OTUD7A
84	arr[GRCh37]Xp11.22(53904538_54049316)x3 (145,0 kb)	PHF8	VUS	
87	arr[GRCh37]17q23.3(61954172_61969780)x1 <i>pat</i> (16,0 kb)	GH2	VUS	
90	arr[GRCh37]5q13.2(68975303_70647478)x1 (1672,0 kb)	SMN1 / SMN2	AR_P	susp. přenašečství spinální muskulární atrofie, může se však jednat o pseudogen SMN2 s vysokou homologií k SMN1

92	arr[GRCh37]11p15.1(16419113_16497834)x1 pat (78,7 kb)	–	VUS	možné ovlivnění přilehlého genu <i>SOX6</i>
109	arr[GRCh37]Xp22.2(12483090_12801637)x3 pat (318,0 kb)	<i>FRMPD4</i>	XV_P	2.–17. exon
116	arr[GRCh37]10q25.2(114534908_114824747)x1 (289,9 kb)	<i>TCF7L2</i>	VUS	1.–5. exon
119	arr[GRCh37]9p24.3(224405_500584)x3 pat (276,0 kb)	<i>DOCK8, KANK1</i>	VUS	2.–48. exon <i>DOCK8</i> , 1. exon <i>KANK1</i>
120	arr[GRCh37]2q14.2(121484726_122179726)x3 mat (495,0 kb)	<i>GLI2, CLASP1</i>	VUS	3.–14. exon <i>GLI2</i> , 9.–41. exon <i>CLASP1</i>
122	arr[GRCh37]Yq11.223q11.23(25296950_26435098)x1 (1138,0 kb)	<i>DAZ1, DAZ2 / DAZ3, DAZ4</i>	P_BEN	zachování 2 funkčních kopií <i>DAZ</i>
140	arr[GRCh37]3p25.3(10309518_11282617)x1 (973,0 kb)	<i>GHRL, ATP2B2, SLC6A1</i>	VUS	
142	arr[GRCh37]Yq11.223q11.23(25296950_26344878)x1 (1047,0 kb)	<i>DAZ1, DAZ2 / DAZ3, DAZ4</i>	P_BEN	zachování 2 funkčních kopií <i>DAZ</i>
143	arr[GRCh37]22q11.21(18706001_18984519)x1 (278,0 kb)	<i>PRODH</i>	P_BEN	
145	arr[GRCh37]Xq28(153287517_153541289)x2 dn (254,0 kb)	5 genů	PAT	<i>MECP2</i> -duplikační sy
146	arr[GRCh37]2q33.1(198658270_200717129)x4 dn (2060,0 kb)	3 geny	VUS	rozsáhlá triplikace, genově chudá oblast
147	arr[GRCh37]2q14.3(125075087_126068410)x3 mat (993,0 kb)	<i>CNTNAP5</i>	VUS	4.–24. exon
148	arr[GRCh37]17q25.1(71847837_72606952)x4 pat (759,0 kb)	11 genů	VUS	
155*	arr[GRCh37]2p16.3(51066578_51510961)x1 mat (444,0 kb)	<i>NRXN1</i>	P_PAT	1.–5. exon
158	arr[GRCh37]5q13.2(69238677_70587018)x1 (686,0 kb)	<i>SMN1 / SMN2</i>	AR_P	susp. přenašečství spinální muskulární atrofie, může se však jednat o pseudogen <i>SMN2</i> s vysokou homologií k <i>SMN1</i>
160	arr[GRCh37]2q23.1(149060704_149151023)x1 mat (90,3 kb)	<i>MBD5</i>	P_PAT	4. exon
162	arr[GRCh37]13q13.3(36885662_37705100)x3 pat (819,0 kb)	7 genů	VUS	

164	arr[GRCh37]2q13(110862477_110964737)x1 (102,0 kb)	<i>NPHP1, MALL</i>	AR_P	přenašečství poruch funkce ledvin
166	arr[GRCh37]Yq11.223q11.23(25296950_26344878)x1 (1048,0 kb)	<i>DAZ1, DAZ2 / DAZ3, DAZ4</i>	P_BEN	zachování 2 funkčních kopií <i>DAZ</i>
172	arr[GRCh37]8q23.1(108743720_108894002)x3 (150,0 kb)	<i>RSPO2</i>	P_BEN	
174	arr[GRCh37]2q22.3(145217233_145250790)x1 <i>mat</i> (2142,0 kb)	<i>ZEB2</i>	VUS	2. intron
	arr[GRCh37]17q23.1q23.2(58172700_60315303)x1 <i>dn</i> (33,6 kb)	23 genů	PAT	17q23.1q23.2 mikrolečnický sy
187	arr[GRCh37]15q13.3(31972646_32509926)x1 <i>pat</i> (537,0 kb)	<i>CHRNA7, OTUD7A</i>	P_PAT	15q13.3 mikrolečnický sy
199	arr[GRCh37]8p11.22(38270235_38321370)x3 (51,0 kb)	<i>FGFR1</i>	P_BEN	2.–18. exon
201	arr[GRCh37]Yq11.223q11.23(25296950_26275993)x1 (979,0 kb)	<i>DAZ1, DAZ2 / DAZ3, DAZ4</i>	P_BEN	zachování 2 funkčních kopií <i>DAZ</i>
204	arr[GRCh37]5q13.2(69238677_69925345)x1 (686,7 kb)	<i>SMN1 / SMN2</i>	AR_P	susp. přenašečství spinální muskulární atrofie, může se však jednat o pseudogen <i>SMN2</i> s vysokou homologií k <i>SMN1</i>
	arr[GRCh37]15q15.3(43916972_43951301)x1 (34,3 kb)	<i>CATSPER2</i>	AR_P	přenašečství poruchy reprodukce u mužů
221	arr[GRCh37]15q11.2(22765628_23217514)x1 (451,0 kb)	<i>NIPA1, NIPA2, TUBGCP5, CYFIP1</i>	HFLP	
234	arr[GRCh37]1p36.33(2174247_2216475)x1 (42,0 kb)	<i>SKI</i>	P_BEN	1. intron
236*	arr[GRCh37]16p13.3(6539262_7260025)x1 <i>dn</i> (721,0 kb)	<i>RBFOX1</i>	VUS	3.–4. exon
	arr[GRCh37]15q11.2(22765628_23300287)x1 <i>pat</i> (534,0 kb)	<i>NIPA1, NIPA2, TUBGCP5, CYFIP1</i>	HFLP	
240*	arr[GRCh37]17q21.31(43706886_44351152)x1 <i>dn</i> (644,2 kb)	<i>KANSL1, CRHR1, MAPT, STH, SPPL2C</i>	PAT	Koolen-De Vries sy
242	arr[GRCh37]16p11.2(28843773_29031059)x3 (187,0 kb)	12 genů	HFLP	

245	arr[GRCh37]7q31.1(110990868_111092490)x1 <i>mat</i> (102,0 kb)	<i>IMMP2L</i>	VUS	3. intron
	arr[GRCh37]16p11.2(28843773_29031059)x3 <i>mat</i> (187,0 kb)	9 genů	HFLP	
247	arr[GRCh37]Xp22.33(219609_537016)x3 (317,0 kb)	–	P_BEN	
248*	arr[GRCh37]22q11.21(18894835_20311763)x1 <i>dn</i> (1410,0 kb)	46 genů	PAT	DiGeorge sy
252	arr[GRCh37]18p11.22p11.21(10664394_11904117)x3 (1239,0 kb)	<i>PIEZO2, GNAL</i>	VUS	
256	arr[GRCh37]Xp22.33/Yp11.32(1957675/1907675_2533931/2483931)x1 (576,0 kb)	<i>DHRX</i>	VUS	
257	arr[GRCh37]5q13.2(68703103_70587018)x1 (1884,0 kb)	<i>SMN1 / SMN2</i>	AR_P	susp. přenašečství spinální muskulární atrofie, může se však jednat o pseudogen <i>SMN2</i> s vysokou homologií k <i>SMN1</i>
267	arr[GRCh37]Xp22.33/Yp11.32(836076/786076_1118325/1068325)x3 (282,0 kb)	–	P_BEN	
274	arr[GRCh37]15q15.3(43916972_43951301)x1 (34,0 kb)	<i>CATSPER2</i>	AR_P	přenašečství poruchy reprodukce u mužů
280	arr[GRCh37]Yq11.223q11.23(24148107_28071741)x1 (3924,0 kb)	<i>DAZ1, DAZ2 / DAZ3, DAZ4</i>	P_BEN	zachování 2 funkčních kopií <i>DAZ</i>
281	arr[GRCh37]17q21.31(41646491_41634621)x3 (170,0 kb)	<i>ARL4D, ETV4, DHX8</i>	VUS	
295	arr[GRCh37]5q13.2(68791272_70587018)x1 (1796,0 kb)	<i>SMN1 / SMN2</i>	AR_P	susp. přenašečství spinální muskulární atrofie, může se však jednat o pseudogen <i>SMN2</i> s vysokou homologií k <i>SMN1</i>
299	arr[GRCh37]3p26.3(2294342_2665466)x3 (371,0 kb)	<i>CNTN4</i>	VUS	3.–4. exon
301	arr[GRCh37]2q13(110862477_110964737)x1 (102,0 kb)	<i>MALL, NPHP1</i>	AR_P	
302	arr[GRCh37]3q29(197230118_197335597)x3 (105,0 kb)	<i>BDH1</i>	P_BEN	
	arr[GRCh37]Yq11.223q11.23(25296950_28071741)x1 (2775,0 kb)	<i>DAZ1, DAZ2 / DAZ3, DAZ4</i>	P_BEN	zachování 2 funkčních kopií <i>DAZ</i>
304	arr[GRCh37]2q13(110862477_111128847)x1 (266,0 kb)	<i>NPHP1, MALL</i>	AR_P	
	arr[GRCh37]15q15.3(43851548_43951301)x1 (99,7 kb)	<i>CATSPER2</i>	AR_P	přenašečství poruchy reprodukce u mužů

309	arr[GRCh37]8p23.2p23.1(6161430_6353226)x1 (191,0 kb)	<i>MCPH1</i>	AR_P	susp. přenašečství mikrocefalie 1
310	arr[GRCh37]17p13.3(1184475_1602498)x3 (418,0 kb)	14 genů	PAT	17p13.3 mikroduplikační sy
315	arr[GRCh37]15q11.2q13.2(22765628_30653936)x3 <i>par</i> (7890,0 kb)	139 genů	PAT	15q11q13 mikroduplikační sy
316	arr[GRCh37]15q11.2q13.2(22765628_30653936)x3 <i>par</i> (7890,0 kb)	139 genů	PAT	15q11q13 mikroduplikační sy
317	arr[GRCh37]12p11.23(27306320_27760152)x1 <i>par</i> (453,8 kb)	<i>STK38L, ARNTL2, PPFIBP1</i>	VUS	
318	arr[GRCh37]12p11.23(27306320_27760152)x1 <i>par</i> (453,8 kb)	<i>STK38L, ARNTL2, PPFIBP1</i>	VUS	
319	arr[GRCh37]5p12(44506416_45414642)x3 (908,0 kb)	<i>HCN1</i>	VUS	4.– 8. exon
	arr[GRCh37]5q13.2(69238677_70587018)x1 (1 348,0 kb)	<i>SMN1 / SMN2</i>	AR_P	susp. přenašečství spinální muskulární atrofie, může se však jednat o pseudogen <i>SMN2</i> s vysokou homologií k <i>SMN1</i>
323	arr[GRCh37]15q15.3(43916972_43951301)x1 (34,3 kb)	<i>CATSPER2</i>	AR_P	přenašečství poruchy reprodukce u mužů
330	arr[GRCh37]16p13.3(6796846_6805752)x1 (8,9 kb)	<i>RBFOX1</i>	VUS	3. intron
331	arr[GRCh37]Xq25(124738242_126882197)x>3 (2143,0 kb)	–	P_BEN	rozsáhlá duplikace, genově chudá oblast
	arr[GRCh37]15q21.2(52332711_52447040)x1 (114,3 kb)	<i>GNB5</i>	AR_P	4.–13. exon, přenašečství Lodder-Merla sy
	arr[GRCh37]5q13.2(69732192_70386600)x1 (654,0 kb)	<i>SMN1 / SMN2</i>	AR_P	susp. přenašečství spinální muskulární atrofie, může se však jednat o pseudogen <i>SMN2</i> s vysokou homologií k <i>SMN1</i>
333	arr[GRCh37]Xp22.11(22050894_22863152)x3 (812,0 kb)	<i>PHEX</i>	VUS	
334	arr[GRCh37]5q13.2(69238677_69925345)x1 (686,0 kb)	<i>SMN1 / SMN2</i>	AR_P	susp. přenašečství spinální muskulární atrofie, může se však jednat o pseudogen <i>SMN2</i> s vysokou homologií k <i>SMN1</i>
340	arr[GRCh37]22q11.21(18375358_18628078)x3 (253,0 kb)	<i>MICAL1, MIR648, PEX26, TUBS8</i>	VUS	
358	arr[GRCh37]17p13.3(872943_1302394)x3 (429,3 kb)	15 genů	PAT	17p13.3 mikroduplikační sy
	arr[GRCh37]17p13.3(2339561_2826073)x3 (486,5 kb)		PAT	

8.4 Vztah četnosti výskytu abnormálních genetických variant a výskytu přidružených vad u pacientů s PAS

V této diplomové práci byla testována hypotéza: „Abnormální genetické varianty hodnocené jako patogenní, pravděpodobně patogenní či VUS se častěji vyskytují u pacientů s komorbidními neurovývojovými onemocněními než u pacientů s izolovanou PAS“.

Četnosti ve vymezených kategoriích shrnuje tabulka 17.

Tabulka 17 Počty jedinců s PAS s komorbidními NVO, počty jedinců s izolovanou PAS a výskyt abnormálních genetických variant v těchto skupinách. (+) značí přítomnost abnormální varianty, (–) její absenci.

	abnormální varianta (+)	abnormální varianta (–)	celkem
PAS s NVO	36	211	247
izolovaná PAS	8	105	113
celkem	44	316	360

Analýzou našich dat 2x2 kontingenční tabulky pomocí chí-kvadrát testu jsme získali následující výsledky (zaokrouhleno):

- χ^2 -kvadrát = 3,3913
- $p = 0,0655$
- OR $\approx 2,239$ (95% CI: 1,005 – 4,989)

Nulovou hypotézu tedy není možné na základě tohoto testu zamítnout.

Analýzou těchto dat pomocí Fisherova exaktního testu jsme získali výsledky (zaokrouhleno):

- $p = 0,0555$
- OR = 2,235 (95% CI: 0,976–5,769)

Nulovou hypotézu tedy není možné na základě tohoto testu zamítnout. Interpretace a diskuze těchto výsledků je uvedena v kapitole 9.4 Testovaná hypotéza.

9 Diskuze

9.1 Charakter zkoumaného souboru

9.1.1 Pohlaví jedinců

Jak již bylo popsáno v kapitole 2.3 pojednávající o epidemiologických údajích o autismu, byla pozorována závislost míry prevalence PAS na pohlaví jedinců. Ve studiích pracujících se souborem jedinců s PAS vždy dominovalo zastoupení chlapců, ač pozorovaný poměr postižených chlapců a dívek se mezi některými studiemi liší. Metaanalýza Loomes a kol. (2017) si položila za cíl prozkoumat prevalenční studie s vysokou kvalitou metodologických přístupů a odhalila, že poměr, který pravděpodobně nejvíce odráží skutečnou prevalenci mezi pohlavími, je poměr blízký se 3:1.

Náš soubor pacientů sestával z 267 jedinců mužského pohlaví a 93 jedinců ženského pohlaví. Toto rozložení odpovídá přesnému poměru 2,87:1 s převahou zastoupení chlapců/mužů. Tento poměr blízký se hodnotě 3:1 je tak zcela ve shodě se zmíněnými publikovanými údaji.

Důvody, proč je rozložení autismu v populaci přesně takové, zatím zůstávají neobjasněné. Vědci vyslovili několik teorií, proč se PAS mohou častěji vyskytovat u chlapců. Například studie Jacquemont a kol. (2014) našla signifikantně zvýšený počet delečních CNV a SNV (zvýšený mutační práh) u dívek s neurovývojovým onemocněním oproti chlapcům. Autoři tak předpokládají, že „mužský“ mozek je na změny v tomto ohledu citlivější a PAS se tak může projevit častěji, již při přítomnosti méně zásadních negativních faktorů. V našem souboru bylo mezi pacienty, kteří byli nositeli některé HFLP, VUS, pravděpodobně patogenní či patogenní varianty, 30 chlapců a 20 dívek a uvedený trend tedy nebyl z hlediska všech nalezených (delečních i amplifikačních) CNV pozorován. Žádná z podobných teorií zatím nebyla stanovena jako univerzálně platná a otázkou rovněž zůstává, zda vzhledem k multifaktoriální povaze autismu bude věda v budoucnu schopna takové odpovědi vůbec poskytnout.

9.1.2 Věk jedinců

Průměrný věk jedinců při stanovení diagnózy PAS globálně mezi lety 2012 a 2019 byl metaanalýzou Van 't Hof a kol. (2021) vypočten na 60,48 měsíce (přibližně 5 let), případně na 43,18 měsíce (přibližně 3,5 roku), pokud byly ve studiích zahrnuty jen děti do maximálně

10 let věku. Tyto údaje však pocházejí z analýzy studií ze 40 různých zemí světa a vzhledem k odlišným diagnostickým postupům napříč různými regiony lze předpokládat, že údaje nemusí přesně reflektovat hodnotu průměrného věku při stanovení diagnózy jen v rámci České republiky. V České republice byl v roce 2016 zaveden plošný screening projevů PAS cestou praktických lékařů pro děti a dorost jako součást všeobecné preventivní prohlídky v 18 měsících věku dítěte. Testování se provádí pomocí psychologického dotazníku M-CHAT (Modifikovaný kontrolní seznam pro autismus u batolat). Z průzkumu provedeného českými výzkumníky s údaji od 210 pediatrů vyplynulo, že 74,7 % z nich provádí screening včasného zachytu PAS (pomocí M-CHAT nebo rozhovoru s rodiči) a to převážně ve věku 18–24 měsíců (1,5–2 let) věku dítěte (Slepičková a kol., 2019). Dítě je obvykle následně odesláno k dalším specializovaným vyšetřením (zejména psychiatrickým, ale také psychologickým či neurologickým). Konečná diagnóza tak může být stanovena až po těchto upřesňujících vyšetřeních. Tato skutečnost by mohla být jedním z vysvětlení, proč se v našem souboru rodiče dostavili do genetické poradny nejčastěji až ve věku 3 let. Věk kolem 3 let je také dobou, kdy je manifestace projevů PAS již dobře patrna, například formou „autistického regrese“ (Thompson a kol., 2019).

Ačkoli tedy většinu jedinců souboru tvořila dětská populace, věkové rozpětí v době prvního vyšetření bylo v našem souboru široké. Pohybovalo se od 13 měsíců do 42 let. Jedinců, kterým bylo v době první návštěvy 18 let nebo více, bylo v souboru 23 (6,39 %). Nejčastější důvody pro příchod pacienta až v pokročilejším věku, pokud byly známy, byly v našem souboru následující: pacienta odeslal na genetickou konzultaci lékař jiné specializace, ať už za účelem samotného dovyšetření neurovývojové poruchy, nebo za účelem jiného genetického vyšetření (např. pro trombofilní mutace, mutace ovlivňující funkci pojivových tkání a podobně), kdy vzhledem k přítomnosti PAS bylo provedeno i vyšetření pro neurovývojové poruchy. Další častou situací bylo vyšetření jedince pro PAS již v dávné době a následná ztráta kontaktu s rodinou, která se však nyní s odstupem let dostavila a s ohledem na dostupnost nových diagnostických metod a rozšíření genetických databází bylo možné vyšetření doplnit či revidovat. Jedním z dalších důvodů bylo plánování rodičovství sourozence probanda či jiného člena rodiny a přání stanovit riziko dalšího výskytu NVO vyplývající z konkrétního genealogického záznamu. Dalším důvodem mohl být i méně výrazný fenotyp bez přidružených vrozených vývojových vad.

Příklad námi nalezených variant však dokládá, že použité metody (zejména vyšetření array CGH) umožní podrobnější poznání genomu pacienta v jakémkoli věku a mohou tak přinést zásadní posun na mnohdy zdlouhavé cestě za objasněním probandových obtíží.

9.1.3 Diagnózy v rámci PAS

V souboru se vyskytovali jedinci se všemi základními diagnózami spadajícími do PAS. Byly dokumentovány případy dětského autismu (164 jedinců), atypického autismu (50 jedinců), Aspergerova syndromu (17 jedinců), Rettova syndromu (jeden jedinec) a dětské dezintegrační poruchy (jeden jedinec). V rámci souboru osob s konkrétně stanovenou diagnózou tedy výrazně dominuje zastoupení dětského autismu, následované zastoupením atypického autismu. Naopak velmi ojedinělými případy byly Rettův syndrom a dětská dezintegrační porucha. Takový poměr rozložení reflektují i recentní prevalenční výzkumy, které odhadují četnost dětské dezintegrační poruchy na 1–9 případů na 100 000 narozených dětí a prevalenci Rettova syndromu na přibližně 5–10 případů na 100 000 narozených dívek. Jde tedy o velmi vzácné poruchy. Naproti tomu PAS (jako celek) se v populaci vyskytuje mnohonásobně častěji, s odhadem 1–7 případů na 200 narozených dětí (0,5–3,5 %; Mehra a kol., 2019; Petriti a kol., 2023; Salari a kol., 2022).

V mnohých případech nebyl u pacientů specifikován konkrétní typ autismu. Tento fakt může mít několik vysvětlení, například nedostatek informací v lékařských zprávách o výsledcích dřívějších specializovaných vyšetření (neurologické, psychologické, psychiatrické, logopedické a další). Příčinou mohl být příliš nízký věk či nespolupráce dítěte při vyšetřování, kdy byla diagnóza uzavřena obecně jako PAS bez specifikace typu, nebo byly pozorovány četné znaky PAS, ale stanovit konkrétní diagnózu spolehlivě zatím nebylo možné.

9.1.4 Zátěž přidruženými NVO u jedinců s PAS

Ve zkoumaném souboru měly dvě třetiny pacientů (65,8 %) k PAS přidruženou další neurovývojovou poruchu. Více než polovina pacientů (52,5 %) měla pro PAS či jiné NVO pozitivní genealogii, ať už se jednalo o sourozence probanda, jeho přímé předky či vzdálenější příbuzné. Nejčastějším komorbidním NVO u jedinců námi zkoumaného souboru byl ID (53,6 % jedinců v souboru) a ADHD nebo ADD (31,1 % jedinců v souboru; viz tabulka 5). Z dalších zachycených neurovývojových komorbidit lze zmínit například depresivní poruchu, úzkostnou poruchu, specifické poruchy učení, dyspraxii, tikové poruchy, OCD či schizofrenii. U zbývajících jedné třetiny pacientů se jednalo o izolovaný autismus.

Studie Baio a kol., (2018) se zaměřila na děti s PAS a pozorovala, že 31 % dětí splňovalo kritéria inteligenčního deficitu a u dalších 25 % dětí byly výsledky testování hraniční. Prevalenci inteligenčního deficitu u dětí s PAS studovala také práce týmu Postorino a kol. (2016). Inteligenci a vývoj dětí hodnotila pomocí dvou různých diagnostických nástrojů (škál GMDS-ER a Leiter-R) a výslednou frekvenci ID odhaduje na 47,6 %. Recentní studie Kucińska a kol. (2024) zaznamenala ID v analyzovaném souboru pacientů s PAS v 52 %.

Prevalenci ADHD u autismu sledovalo rovněž několik různých studií. Například práce Avni a kol. (2018) pozorovala 62,7% frekvenci výskytu ADHD u 260 dětí s PAS. Další práce zkoumající soubor o 4032 jedincích zaznamenala potvrzenou diagnózu ADHD u dětí s PAS v 59 % případů (Stevens a kol., 2016).

Mimo uvedené NVO jsem zvlášť hodnotila i prevalenci epilepsie, kterou jsme ve zkoumaném souboru pozorovali v 10,3 % případů. Metaanalýza Liu a kol. (2022) odhaduje na základě zkoumání 66 prevalenčních studií frekvenci výskytu epilepsie u pacientů s PAS na 10 %, což je tak ve shodě s naším pozorováním.

Domnívám se, že reálná míra zátěže pacientů NVO by mohla být ještě vyšší, pokud bychom provedli longitudinální studii a ověřovali tyto parametry s odstupem let u stejných, avšak již starších jedinců. Náš soubor je tvořen převážně velmi mladými jedinci (v době první návštěvy činil modus věku 3 roky, medián 5 let 1 měsíc a průměrný věk 7,2 roku). Není vyloučeno, že v průběhu dospívání se mohou u jedinců, námi hodnocených jako pacientů s izolovaným autismem, další NVO vyvinout či viditelněji projevit. Rovněž frekvence výskytu NVO v rodinách probandů by mohla být reálně ještě vyšší, neboť sběr těchto informací je mnohdy závislý jen na osobní výpovědi rodinných příslušníků doprovázejících probanda k vyšetření. V některých (byť spíše ojedinělých) případech nebylo možné genealogická data získat vůbec nebo jen částečně, pokud jeden nebo oba rodiče nebyli známi. Dalším důvodem, proč by například reálná frekvence ADHD/ADD v našem souboru mohla být ještě vyšší, a tím se přiblížit více k výsledkům dříve uvedených studií, je, že prevalenci ADHD jsem stanovila jen na základě počtu skutečně stanovených diagnóz. Nicméně u mnoha jedinců se vyskytovaly znaky jako hyperaktivita a potíže se soustředěním, ačkoli zatím diagnózu ADHD/ADD oficiálně neobdrželi. Přesný odhad prevalence ztěžuje také fakt, že mnoho znaků PAS, ADHD, ADD, ID, úzkostí a dalších NVO se vzájemně překrývá, a stanovení přesné diagnózy tak bývá i přes propracovaná diagnostická kritéria nesnadnou záležitostí. Proto se může stát, že různé studie poskytují mírně odlišné výsledky. Závěrem, na kterém se však všechna pozorování

(včetně této diplomové práce) shodnou, je, že autismus s sebou přináší mnohé přidružené neurovývojové obtíže v nemalé míře.

9.1.5 Rodinná zátěž NVO

Ve spojitosti s výskytem neurovývojových onemocnění je také zajímavý náhled do genealogického záznamu jedinců. Studie Xie a kol. (2019) zaznamenala u 63,1 % osob s PAS pozitivní rodinnou anamnézu (zaměřenou na rodiče jedinců) pro duševní a/nebo neurologická onemocnění. V našem souboru jsem se zaměřila nejen na rodiče a další příbuzné prvního stupně (sourozenci, případně potomci), ale také na vzdálenější příbuzné. V našem souboru byla prevalence PAS a dalších NVO v rodinách pacientů souhrnem 52,5 %. Toto číslo je nižší oproti hodnotě, ke které dospěla předchozí zmíněná studie na dětech s PAS a jejich rodičích, nicméně námi pozorovaná prevalence v rodinách je minimální hodnotou a reálné počty frekvencí NVO mohou být ještě vyšší – jak je také popsáno v předchozí kapitole, stejně jako u prevalence komorbidních NVO, i zde byly zdrojem informací pro zápis do lékařských zpráv osobní výpovědi příbuzných pacientů. Rovněž diagnostické postupy pro odhalování PAS se mohly v době dětství rodičů a prarodičů pacientů lišit od diagnostických postupů, které se používají dnes, kdy se možnosti spolu s povědomím o PAS neustále rozšiřují. Do prevalence NVO byli v této práci zahrnuti jen ti jedinci, u nichž byla stanovena oficiální diagnóza, nicméně mnohdy byl v lékařských zprávách záznam o přítomnosti znaků některého NVO u příbuzných probanda, nebo například pojem „širší autistický fenotyp“. Je tedy možné, že mnozí z těchto členů rodiny by diagnostická kritéria pro dané NVO splňovali, pokud by byli testování podrobeni.

Detailněji se lze také podívat na výskyt PAS a dalších NVO mezi sourozenci. Tabulka 18 uvádí kompletní přehled sourozeneckých párů (případně sourozenecké trojice) zahrnutých ve zkoumaném souboru s popisem pozorovaného genotypu a fenotypu. Případy párů monozygotních dvojčat (pacientky 12 a 13, pacienti 63 a 66) jsou velmi cenným zdrojem dat pro genetické výzkumy a umožňují studovat genotypo-fenotypové korelace daných nálezů a další genetické mechanismy (míra penetrance, variabilní expresivita apod.). V našem souboru byly oba páry vyšetřených dvojčat konkordantní pro uvedený fenotyp, což může potenciálně odrážet vyšší míru penetrance / nižší míru variability přítomných aberací. Minimálně 45 dalších pacientů mělo vlastního či polorodého sourozence (nezahrnutého do souboru) s obdobnými NVO. Odhaduji však, že reálné počty těchto sourozenců (z důvodů podobných těm uvedeným v předchozích dvou kapitolách o osobní a rodinné zátěži neurovývojovými onemocněními) by

mohly být ještě vyšší, než se nám na základě lékařských zpráv podařilo zachytit. Zvýšenou prevalenci neurovývojových, psychiatrických či neurologických obtíží u sourozenců pacientů s PAS pozorovaly například studie Fields a kol. (2024) a Lin a kol. (2022).

Tabulka 18 Sourozenské dvojice a trojice zahrnuté ve zkoumaném souboru, genotyp a fenotyp jedinců a jejich konkrétní příbuzenský vztah. OVŘ – opožděný vývoj řeči, EPI – epilepsie, bpn – bez patologického nálezu, AR – autozomálně recesivní. Symbol * označuje polorodé sourozence.

pac.	příbuzenství	fenotyp	genotyp
12	dvojče 1A	PAS, ADHD, OPMV, OVŘ, hypotonie, amblyopie	3x VUS (5p15.3, 16q22.1, 22q13.3)
13	dvojče 1B	PAS, OPMV, OVŘ, hypotonie, amblyopie	3x VUS (5p15.3, 16q22.1, 22q13.3)
63	dvojče 2A	PAS, ID, ADHD	bpn
66	dvojče 2B	PAS, ID, ADHD	bpn
148	sourozenec 3A	PAS, ID	VUS (17q25.1)
189	sourozenec 3B	PAS, ID, regres řeči	bpn
163	sourozenec 4A (*)	PAS, depresivní / panická porucha	bpn
164	sourozenec 4B (*)	PAS, ADHD, depresivní / panická porucha	přenašečství AR
165	sourozenec 4C (*)	PAS, ADHD, depresivní / panická porucha	bpn
185	sourozenec 5A	PAS, ID	bpn
186	sourozenec 5B	PAS, ID, OVŘ	bpn
315	sourozenec 6A	PAS, ID, ADHD	15q11.2q13.2 mikroduplikační sy
316	sourozenec 6B	PAS, ID, EPI	15q11.2q13.2 mikroduplikační sy
317	sourozenec 7A	PAS, ID, EPI, ADD, makrocefalie	VUS – v oblasti 12p11.23
318	sourozenec 7B	PAS, ID, makrocefalie	VUS – v oblasti 12p11.23

9.2 Charakter pozorovaných genetických aspektů

9.2.1 Záchyt abnormálních variant

Vyšetření karyotypu odhalilo v souboru 360 pacientů s PAS čtyři abnormální varianty – marker chromozom s heterochromatinovou oblastí centromery chromozomu 5 v mozaikovém stavu (11 %), reciprokou translokaci částí dlouhých ramének mezi chromozomy 5 a 12, pericentrickou inverzi na chromozomu Y a zvětšený heterochromatinový blok v satelitní oblasti chromozomu 15. Podrobnosti o těchto nálezech uvádí tabulka 14. Při dané velikosti souboru pacientů se tedy jedná o 1,1% záchyt. V dostupné literatuře jsou záznamy o záchytu chromozomových abnormalit u pacientů s PAS pomocí karyotypování také v řádu nízkých jednotek procent. Například studie Reddy (2005) našla abnormální varianty ve 3,3 % (14 nálezů ve vzorku 421 pacientů), kdy se jednalo o nadpočetné marker chromozomy,

translokace, inverze, ale také o duplikace a delece. Autoři další studie zachytili pomocí karyotypování na vzorku jedinců s PAS některou variantu v 0,8 % případů. Ze vzorku 500 osob byly v této studii zachyceny tři případy abnormální konstituce pohlavních chromozomů a jeden případ reciproké translokace mezi chromozomy 4 a 14 (Liao a kol., 2013). I přes nízké frekvence zachytu metodou karyotypování je skladba nalezených abnormálních variant vždy velmi rozmanitá.

Metoda FISH byla v námi vyšetřovaném souboru, podobně jako ve studii Al-Awadi a kol. (2023) nebo v již zmiňované studii Reddy (2005), použita k ověření podezření na specifické aberace či za účelem získání detailnějších informací doplňujících předchozí vyšetření. V souvislosti s neurovývojovými obtížemi byla provedena vyšetření u tří pacientů. V prvním případě za účelem objasnění původu marker chromozomu nalezeného při vyšetření karyotypováním, ve druhém případě potvrzení suspektní mozaikové formy trizomie chromozomu 9 zachycené metodou array CGH a ve třetím případě byla metoda FISH provedena pro objasnění původu nadbytečného heterochromatinového bloku v satelitní oblasti chromozomu 15. Vyšetření FISH tedy nebylo na souboru pacientů aplikováno plošně, a proto zde nebude diskutována procentuální frekvence zachytu abnormálních variant. Detailněji o diagnostickém přínosu metody však pojednává kapitola 9.3 Přínosy a limity použitých metod.

Posledním využitým přístupem pro zachyt abnormálních genetických variant pro tuto diplomovou práci bylo vyšetřování genomu jedinců za pomoci metody array CGH. V 360 analyzovaných vzorcích bylo nalezeno 101 abnormálních CNV u 84 jedinců, což představuje přibližně 23 % z celkového počtu všech vyšetřených pacientů. Počet nalezených variant v poměru k celkovému počtu provedených vyšetření, tedy záchytnost metody, činí přibližně 28 %. Tabulka 19 srovnává zachyt CNV pomocí array CGH u souboru jedinců s PAS, ke kterému dospěly nejrozumnější recentní studie. Výsledný zachyt CNV záleží vždy na mnoha faktorech, od charakteru souboru, přes formát a design použitých microarray čipů, až po konečné hodnocení nálezů, vymezení jejich kategorií a použitých databází.

Tabulka 19 Záchyt abnormálních variant (CNV) pomocí metody aCGH na souboru pacientů s PAS. N – počet nalezených variant, n – počet nositelů (pacientů) těchto variant. Údaj „záchyt – CNV“ byl vypočten jako procentuální poměr počtu nalezených CNV k celkovému počtu vyšetřovaných osob. Údaj „záchyt – pacienti“ byl vypočten jako procentuální poměr počtu nositelů nalezených variant k celkovému počtu vyšetřovaných osob. Informace o nálezech a souborech byly převzaty ze studií Annunziata a kol., 2023; Granata a kol., 2024; Kucińska a kol., 2024; Lovrečić a kol., 2018.

	tato diplomová práce	Kucińska a kol. (2024)	Granata a kol. (2024)	Annunziata a kol. (2023)	Lovrečić a kol. (2018)
soubor	360	180	122	209	150
nálezy	N = 101; n = 84	N = 40; n = 30	N = 46; n = 35	N = 117; n = 75	N = 26, n = 24
hodnocení	PAT, P_PAT, VUS, HFLP, AR_P/XV_P, P_BEN	PAT, P_PAT, VUS, P_BEN	PAT/P_PAT, VUS	PAT, VUS, P_BEN	PAT, VUS
formát čipu	8x60K	4x180K, 8x60K	4x180K	ISCA180K	8x60K
záchyt CNV (%)	28,1	22,2	37,7	56,0	17,3
záchyt pacienti (%)	23,3	16,7	28,7	35,9	16,0

Rozpětí záchytu na příkladu těchto prací je od 16 % do 35,9 % (tabulka 19). Naše studie se umísťuje přibližně uprostřed této škály a svými výsledky se tak reprezentativně řadí k výsledkům recentních podobně zaměřených studií.

9.2.2 Hodnocení abnormálních variant

Patogenní a pravděpodobně patogenní varianty

V námi testovaném souboru tvořily převážnou většinu patogenních a pravděpodobně patogenních CNV nálezy v oblastech spojených s různými genetickými syndromy. Konkrétně byly zachyceny: 16p11.2 proximální mikroleční syndrom (MIM# 611913), *MECP2* duplikační syndrom (MIM# 300260), 17q23.1q23.2 mikroleční syndrom (MIM# 613355), Koolen De-Vries syndrom (MIM# 610443), 22q11.21 mikroleční syndrom (DiGeorge syndrom, MIM# 188400 / velokardiofaciální syndrom, MIM# 192430), 15q11q13 mikroduplikační syndrom (MIM# 608636) a 17p13.3 mikroduplikační syndrom (MIM# 613215). Jako genetický syndrom je obvykle chápán komplexní soubor obtíží vzniklých na podkladě definované genetické aberace, přičemž charakter přítomných znaků je pro daný syndrom typický. Ukázalo se však, že v některých případech nemusí být vztah genetického stavu pacienta s fenotypovou prezentací syndromu zcela jednoznačný a může to být záležitost zasluhující hlubší rozbor.

Případ pacienta 248 demonstruje, že fenotyp nemusí být vždy jasným indikátorem přítomnosti konkrétního syndromu. Fenotypový projev tohoto chlapce zahrnoval poruchu sluchu, hypotonii, PAS a psychomotorické opoždění. V kraniofaciální morfologii nebyly pozorovány žádné abnormální znaky. Vyšetření array CGH však u pacienta odhalilo mikroleční syndrom 22q11.21 se zasaženými všemi klíčovými geny (*HIRA* (*600237), *TBX1* (MIM* 602054), *COMT* (MIM* 116790)). Tento syndrom obvykle obnáší nejen narušení psychomotorického vývoje dítěte a orgánové vady, ale mnohdy také nápadné fenotypové znaky, například rozštěpové vady patra a rtů a odchylky v kraniofaciální morfologii (Databáze OMIM, 2022b, 2020b). Ani zasažení všech kauzálních genů syndromu však u tohoto pacienta nevyústilo v projev všech těchto znaků. Variabilní fenotypová expresivita syndromu mikrolece 22q11.21 byla pozorována například ve studii McDonald-McGinn a kol. již v roce 1999, nicméně díky možnostem současných diagnostických metod lze odhalit podstatu onemocnění i u fenotypově méně výrazných jedinců, pokud jsou využity jako screeningový nástroj.

Dalším faktorem, se kterým je nutné při vyhledávání abnormálních variant počítat, je také míra penetrance daného syndromu. U některých onemocnění je známa konkrétní míra penetrance, na základě čehož lze predikovat manifestaci obtíží. Tento jev dobře ilustruje například 100% míra penetrance MECP2-duplikačního syndromu u chlapců (Cani a kol., 2022). Tento syndrom byl v našem souboru potvrzen u pacienta 145, v jehož anamnéze dominovaly stejné znaky, jaké rovněž popisuje zmíněná studie – psychomotorické opoždění, PAS, paleocerebelární symptomatologie, hypotonie a záchvaty s poruchou vědomí a cyanózou.

Naopak efekt snížené penetrance mnohdy maskuje přítomnost varianty u nepostiženého či velmi mírně postiženého rodiče, který ji posléze může přenést na svého potomka. Taková situace nastala například u pacienta 56, u kterého byl odhalen 16p11.2 proximální mikroleční syndrom. Tyto delece vykazují poměrně vysokou míru variability a především nekompletní penetranci (Databáze OMIM, 2020d). Ačkoli drtivá většina zachycených případů bývá původem *de novo* (jak pozorovali například autoři studie Shinawi a kol., (2010)), v našem případě se jednalo o delecii zděděnou od matky probanda, jejíž fenotyp však nevykazoval výrazně závažné znaky.

U některých syndromů vědci vyvinuli detailnější kategorizaci daných obtíží, jako například u syndromu mikroduplikace 17p13.3, který se dle zásahu konkrétních genů dělí do dvou subtypů. Pacienti s duplikovanými genem *YWHAE* (MIM* 605066), ale bez zásahu genu

PAFAH1B1 (MIM* 601545), spadají do syndromu mikroduplikace 17p13.3 I. třídy, kdežto pacienti s duplikací genu *PAFAH1B1* (ať už také s duplikací *YWHAE* či *CRK* (MIM* 164762) nebo bez ní) jsou řazeni do syndromu mikroduplikace 17p13.3 II. třídy (Bruno a kol., 2010). Dle tohoto rozdělení byl u pacientky 358 přítomen syndrom mikroduplikace 17p13.3 II. třídy. Autoři studie v porovnávání obou tříd syndromu nezůstali jen na úrovni genotypu, ale zaměřili se také na fenotyp. Předpokládají, že pacienti I. třídy syndromu mají větší tendenci vykazovat nadměrný růst a PAS, naopak pacienti spadající do II. třídy ve výzkumu vykazovali růstový deficit, psychomotorické opoždění a hypotonii. U pacientky s tímto syndromem v našem souboru byly pozorované rysy PAS, ID, hypotonie a opoždění růstu, což by nejen geneticky, ale také i fenotypově odpovídalo kategorii syndromu II. třídy. Syndrom mikroduplikace 17p13.3 byl zachycen v našem souboru také u pacienta 310, u kterého došlo k zasažení genů *YWHAE* a *CRK*, ne však genu *PAFAH1B1*. Jednalo se tedy o kategorii syndromu I. třídy. Pacient vykazoval nejen PAS, ale také rozštěp patra a rtu, která byla v některých případech pozorována také předchozími autory (Bruno a kol., 2010). Případy těchto dvou pacientů našeho souboru tak mohou sloužit jako podpora dat a pozorování již dříve provedených studií. Rovněž mohou ilustrovat, že klinické dopady konkrétního syndromu nezáleží jen na poloze v určitém kritickém regionu, ale také na zásahu konkrétních genů, který se u jednotlivých pacientů může i v rámci jediného onemocnění mírně lišit.

V literatuře byl popsán výskyt autismu, opoždění psychomotorického vývoje a dalších NVO u všech námi nalezených variant působících uvedená syndromová onemocnění (Al Ageeli a kol., 2014; Ballif a kol., 2010; Campbell a kol., 2018; Curry a kol., 2013; Koolen a kol., 2016; Peters a kol., 2013; Shinawi a kol., 2010). Míra prevalence autismu u takových jedinců se však napříč konkrétními syndromy značně liší. Zatímco asociace PAS a syndromu mikrolece 16p11.2 je relativně častější (např. ve studii Green Snyder a kol (2016)) byla PAS přítomna u 20 % jedinců), naproti tomu manifestace autismu u jiných syndromů může být mnohem vzácnější. Výskyt syndromu mikrolece 17q23.1q23.2 je sám o sobě velmi vzácný a jeho asociace s diagnózou PAS nebyla v literatuře zatím podrobně dokumentována. Pravděpodobně doposud nejrozsáhlejší studovaný soubor zahrnoval 7 pacientů s tímto syndromem a přítomné symptomy byly hodnoceny obecně jako vývojové opoždění (Ballif a kol., 2010). Záchyt této patogenní varianty u pacientky s psychomotorickým opožděním a rysy PAS v našem souboru je tak možné považovat za raritní záležitost.

Kromě všech výše zmíněných aberací spojených s etiologií genetických syndromů byl v našem souboru také jako patogenní hodnocen nález mozaikové formy monozomie a trizomie

chromozomu 9. Úplná aneuploidie autozomů bývá v drtivé většině neslučitelná se životem (Jia a kol., 2015), u živých jedinců pak bývá přítomna v mozaikové formě a mívá výrazné dopady na jejich fitness.

Za pravděpodobně patogenní byly na základě dostupné literatury a informací z genetických databází v našem souboru označeny 3 varianty (viz také tabulka 16). Ve všech případech se jednalo o delece exonů v genech zásadně ovlivňujících buněčné procesy – genech *NRXN1* (MIM* 600565), *MBD5* (MIM* 611472), *CHRNA7* (MIM* 118511) a *OTUD7A* (MIM* 612024).

Produkt genu *NRXN1* patří mezi neurexiny, tedy receptory buněčných povrchů, které svoji vazbou s neuroliginy vytváří vápníkově-dependentní komplex nervových synapsí a účastní se tak neurotransmise (Databáze OMIM, 2017b). Mutace v oblasti genu, která byla zasažena u pacientky 155 (tedy delece 1.–5. exonu) bývají spojovány s predispozicí k PAS, ID, epilepsii a schizofrenii (Cosemans a kol., 2020). Detailnější analýzu tohoto nálezu nabízí kapitola 9.5 Kazuistiky.

U pacienta 160 došlo k deleci 4. (nekódujícího) exonu genu *MBD5*, jehož produktem je protein s metyl-CpG vazebnou doménou účastnící se epigenetických procesů (např. prostřednictvím interakce s polycomb komplexem pro deubikvitinaci histonů; předpokládá se, že ovlivňuje genovou expresi, buněčnou diferenciaci a další) (National Center for Biotechnology Information, 2025). Studium klinických dopadů mutací tohoto genu přineslo rozličné poznatky. Gen je součástí syndromu mikrolece 2q23.1, mezi jehož projevy patří psychomotorické opoždění, hypotonie, ataxie, rysy PAS či záchvatovité stavy (Mullegama a kol., 2015). Disrupce a některé heterozygotní mutace genu způsobují AD intelektuální nedostatečnost (MIM# 156200) (Databáze OMIM, 2022g). I mutace pouze v nekódujících oblastech genu mohou v některých případech vést k podobnému fenotypovému projevu jako mutace v kódujících oblastech genu (Hodge a kol., 2014). Pacient našeho souboru zasažený delecí jediného nekódujícího exonu tohoto genu vykazoval velmi závažné kombinované postižení – dětský autismus, ADHD, těžký inteligenční deficit, makrosomii, makrocefalii, obezitu a nespecifickou kraniofaciální dysmorfii.

V genomu pacientky 187 byla nalezena delece v regionu 15q13.3 mikrolečného syndromu (MIM# 612001) zasahující gen *OTUD7A* (pro enzym deubikvitinázu) a *CHRNA7* (pro podjednotku nikotinového acetylcholinového receptoru). Syndrom se může pojit s různě vyjádřeným NVO – PAS, ID, epilepsií, schizofrenií, ADHD, poruchami nálad a dalšími.

Dominantními rysy fenotypu pacientky s touto delecí byly PAS a ID. Syndrom dle předchozích studií vykazuje nejen variabilní expresivitu, ale také nekompletní penetranci, a proto byl nález v našem souboru hodnocen jako pravděpodobně patogenní (Lowther a kol., 2015).

Některé námi nalezené pravděpodobně patogenní delece jsou v porovnání s nálezy delecí celých oblastí spojených s různými syndromy relativně malými aberacemi mnohdy omezenými na jediný gen či dokonce pouze jeho část (např. exon). Slouží tak jako dobrý příklad toho, že závažné klinické konsekvence může mít jakákoli alterace zasahující klíčový úsek genomu.

VUS a HFLP varianty

Zcela nejhojnějším typem abnormálního nálezu v našem souboru byly varianty typu VUS, které tvořily téměř 36 % veškerých zachycených variant. Tyto CNV představovaly deleční i amplifikační varianty různého rozsahu (od jednotek kb až po 2 Mb) v různých částech genomu. Pro velké množství těchto nálezů zde nebudou diskutovány jednotlivě, bude však provedena syntéza pozorovaných jevů či principů a uvedeny některé příklady.

Jak již napovídá samotné označení, fenotypový dopad těchto variant a jejich přímá příčinná souvislost s daným onemocněním nejsou obvykle dosud zcela objasněny. Důvodem, proč je jejich studium a interpretace obtížnější, může být dosud neobjasněná funkce zasaženého genu, či nezměrná rozmanitost charakteristik těchto variant (rozsah, lokalizace v genomu, povaha aberace, apod.). Svoji roli také hraje efekt variabilní expresivity a nekompletní penetrance mnohých variant. Na základě jedinečnosti každé varianty může být posléze obtížné nalézt dostatečně velký vzorek jejích nositelů a tím signifikantně prokázat korelaci s daným fenotypem.

Nicméně i přes tyto skutečnosti byly u pacientů s neurovývojovými onemocněními pozorovány některé typy aberací častěji (např. v určitých genech), což se ukázalo i v našem výzkumu. Jako příklad lze uvést VUS varianty v genu *RBFOX1*, které byly detekovány u třech pacientů našeho souboru. Jednalo se o tři odlišné intragenové mutace – delece i duplikace, *de novo* i parentálního původu, a také rozdílného rozsahu (nejmenší varianta byla o velikosti 8,9 kb a největší dosahovala 721 kb). Mutace genu *RBFOX1* u osob s PAS a dalšími NVO je hojně popisována v dostupné literatuře (Bill a kol., 2013; Hamada a kol., 2016; O’Leary a kol., 2022). Produkt genu *RBFOX1* je sestříhový faktor vázající motiv v mRNA, exprimovaný

v neuronech a účastníci se alternativního sestřihu, vývoje neuronálních sítí či regulace synaptické plasticity a excitability (Databáze OMIM, 2019).

Téměř 10 % námi zachycených abnormálních variant bylo hodnoceno jako HFLP. Zmínit lze např. varianty v genech *NIPAI1*, *NIPA2*, *TUBGCP5*, *CYFIPI1*, *NRXN1* odhalené u více pacientů souboru. Interpretace významu těchto variant bývá obtížná, jelikož se jedná o rekurentní varianty přítomné u velké části populace a zároveň vykazující sníženou penetranci. I přesto je u těchto variant zvažován možný dílčí efekt přispívající k rozvoji neurovývojových obtíží, například z důvodu jejich lokalizace v genech klíčových pro vývoj a fungování nervové soustavy (Maya a kol., 2020).

V některých případech je zvažováno možné vysvětlení patogenního působení varianty prostřednictvím modelu second-hit (dvojího zásahu), který předpokládá souhru efektu variant s dalšími genetickými či environmentálními faktory. Vliv dvojího zásahu uvažuje například studie Leblond a kol. (2012), která u tří pacientů s fenotypem PAS a delecí v genu *SHANK2* detekovala navíc mutace v dalších genech suspektně asociovaných s neuropsychiatrickými projevy – *CHRNA7* nebo *CYFIPI1*. Velice podobnou konstelaci – souběh variant (VUS či HFLP) v genu *CYFIPI1* nebo *CHRNA7* s variantou v dalším genu – jsme zachytili několikrát i v našem souboru. Ve všech třech případech se navíc jednalo o souběh s variantou v již zmíněném genu *RBFOX1*, což by mohlo poukazovat na jeho významné postavení mezi genetickými faktory potenciálně asociovanými s PAS. Více než jednu abnormální variantu (buť ne nutně jen hodnocených jako VUS, ale z celého okruhu variant patogenních, pravděpodobně patogenních, VUS či HFLP) neslo ve svém genomu 8 pacientů souboru (detailní přehled viz tabulka 16). Při hodnocení nalezených variant je tedy důležité se soustředit nejen na klinické dopady jednotlivých aberací, ale nahlížet na případ v širším kontextu, například zvážením možného synergického působení mutací prostřednictvím modelu dvojího zásahu.

Zajímavou rovinou komplexity genetických aspektů v etiologii autismu je také lokalizace zachycených VUS / HFLP variant. Nalezli jsme delece či duplikace jak v kódujících oblastech genů (exonech), ale i v nekódujících (intronech) a dokonce také v negenových oblastech, jako např. u nálezů intersticiální delece nacházející se těsně před genem *SOX6* (MIM* 607257) u pacienta 92. V některých případech je zvažován také například zásah některé regulační sekvence, která nemusí nutně ležet v blízkosti daného genu. Tak tomu bylo u pacienta 267, u kterého byla detekována duplikace v oblasti předpokládaného vzdáleného slabého

regulačního elementu genu *SHOX* (Bunyan a kol., 2016). Nicméně tato varianta (i jiné mutace genu *SHOX*) jsou vzhledem k jeho funkci pro fenotyp PAS / NVO považovány za benigní.

Ačkoli mnohdy může být interpretace klinických dopadů uvedených variant obtížnější, jejich vysoké zastoupení u pacientů s PAS a jinými NVO je činí nezanedbatelným faktorem ve studiu genetických příčin těchto obtíží.

Sekundární nálezy

V lidském genomu se může nacházet také mnoho variant, které pro fenotyp jejich nositele nemusí představovat zásadní riziko. V souboru zahrnutém do této práce byly nalezeny varianty podmiňující přenašečství autozomálně recesivních či X-vázaných chorob (př. spinální muskulární atrofie, různých forem hluchoty apod.), nebo varianty hodnocené jako pravděpodobně benigní nemající žádný klinický dopad, případně žádnou souvislost s pozorovaným fenotypem (př. varianty v genech *DAZ* účastnících se procesu spermatogeneze). Jako pravděpodobně benigní byly po porovnání s podobnými nálezy z genetických databází hodnoceny také nálezy většího rozsahu: pericentrická inverze na chromozomu Y, nadpočetný marker obsahující pouze centromeru chromozomu 5, zvětšený heterochromatinový blok v satelitní oblasti 15. chromozomu.

9.2.3 Konkrétní lokusy a zasažené geny

Patogenní, pravděpodobně patogenní, VUS a HFLP varianty jsme našli v mnoha různých lokalizacích napříč celým lidským genomem. Mezi zasažené regiony patřily:

1q25.1, 2p16.3, 2q14.2, 2q14.3, 2q22.3, 2q23.1, 2q37.3, 3p25.3, 3p26.3, 4q22.3, 5p12, 5p15.33, 7p15.3, 7q31.1, 9p24.3, 10q25.2, 11p15.1, 12p11.23, 13q13.3, 15q11.2, 15q11.2q13.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.3, 16q22.1, 17p13.3, 17q21.31, 17q23.1q23.2, 17q23.3, 17q25.1, 18p11.22p11.21, 22q11.21, 22q13.33, Xp11.22, Xp22.11, Xp22.31, Xp22.33/Yp11.32, Xq28.

Výskyt CNV v uvedených chromozomových regionech u pacientů s PAS byl v literatuře dobře dokumentován (Boccuto a kol., 2013; Chair a kol., 2024; Oikonomakis a kol., 2016; Trost a kol., 2022; Woodbury-Smith a kol., 2018; Zhang a kol., 2020). Zachytili jsme však i varianty v lokusech, které nejsou ve spojitosti s PAS uváděny zcela běžně. V tomto kontextu je zajímavý například nález u pacienta 319, u kterého došlo k delecí 4.–8. exonu genu *HCNI* (z anglického „hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1“; MIM* 602780) ležícího v oblasti 5p12. Patogenní varianty tohoto genu kódujícího draslíkový

kanál byly dobře popsány v souvislosti s epileptickými záchvaty (zejména s vývojovou epileptickou encefalopatií či AD generalizovanou epilepsií doprovázenou febrilními záchvaty) (Databáze OMIM, 2021c). Zmínky o asociaci mutací *HCN1* s PAS jsou spíše výjimkou. Tou je například práce Marini a kol., (2018), která studovala genotypo-fenotypovou korelaci u kohorty 41 pacientů s různými mutacemi genu *HCN1* hodnocenými jako patogenní, pravděpodobně patogenní či VUS. Dominantním fenotypem pro nosiče variant byly epileptické záchvaty, nicméně v souboru se vyskytly i 4 případy jedinců s PAS či ID bez přítomnosti záchvatovitěho onemocnění. Na základě hlubší analýzy pozorovaných mutací autoři navrhuji hypotézu, že zatímco varianty typu „gain-of-function“ (vedoucí k nadměrné funkci genu) mohou ústít v záchvatovitá onemocnění, varianty způsobující haploinsuficienci genu mohou predisponovat spíše k ID či PAS. Navíc u dvou pacientek, jejichž fenotyp zahrnoval PAS a NVO, ale ne epilepsii, byl zasažen 4. exon genu (delece), stejně jako v případě pacienta našeho souboru, u kterého nicméně došlo k duplikační mutaci. Lze tak konstatovat, že gen *HCN1* a jeho varianty různého charakteru by mohly být velmi zajímavým kandidátem pro budoucí výzkum.

Je možné se zaměřit nejen na širší lokalizaci CNV v rámci genomu, ale také na konkrétní geny, jež v daných oblastech leží. Námi zachycené abnormální varianty zasahovaly například následující vybrané geny:

ACR, ALG5, ARL4D, ARNTL2, ATP2B2, CA4, CDH1, CDH3, CHRNA7, CLASP1, CNTN4, CNTNAP5, COMT, CRHR1, CYFIP1, DHRSX, DHX8, DNAI2, DOCK8, ETV4, EXOSC8, GH2, GHRL, GLI2, GNAL, HCN1, HIRA, IL6, IMMP2L, KANK1, KANSL1, MAPT, MBD5, MICAL1, MIR648, NAA10, NIPA1, NIPA2, NRXN1, OPN1LW, OPN1MW, OPN1MW2, OTUD7A, PAFAH1B1, PDHA2, PEX26, PHEX, PIEZO2, PPFIBP1, PPM1D, RABGAP1L, RBFOX1, RFXAP, SDHA, SHANK3, SLC6A1, SLC9A3, SMAD9, SPART, SPPL2C, STH, STK38L, STS, TBX1, TBX2, TBX4, TBX1, TKTL1, TCF7L2, TUBGCP5, TUBS8, UNC5, YWHAЕ.

Mezi produkty těchto genů nalézáme například sestřihové faktory (*RBFOX1*), transkripční faktory (*SHANK3*), neurotransmiterové receptory (*CHRNA7*) a transportéry (*SLC6A1*) a podobně. Detailní rozbor funkcí těchto genů a jejich význam ve fyziologii buňky a organismu by zasluhoval samostatnou studii. Obecně je však možné vypořádat jejich zapojení do následujících procesů:

- geny regulující synaptickou plasticitu – př. *SHANK3, NRXN1, RBFOX1, SLC6A1*
- geny ovlivňující epigenetické procesy – př. *MBD5, KANSL1, RFXAP, COMT, TCF7L2*
- geny spojené s neurotransmiterovou signalizací – př. *CHRNA7, SLC6A1, CRHR1*

- geny zapojené do neurogeneze – př. *TBX1*, *PAFAH1B1*, *YWHAE*, *GLI2*, *ZEB2*, *MAPT*
- geny ovlivňující buněčný cytoskelet – př. *MAPT*, *CLASP1*, *DOCK8*, *TUBGCP5*, *TUBS8*
- geny zapojené do metabolismu mitochondrií – př. *SDHA*, *PDHA2*, *IMMP2L*
- geny regulující hormonální signalizaci a imunitní odpověď - př. *IL6*, *GH2*, *GHRL*

(Informace o jednotlivých genech byly převzaty z databáze OMIM – McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University 1966–2025).

Takto rozsáhlý výčet nalezených variant odráží, jak veliké je množství lokusů a genů zapojených do molekulárních drah ovlivňujících vývoj nervové soustavy a jak složité a rozmanité tyto procesy mohou být.

9.3 Přínosy a limity použitých metod

Genetická vyšetření jsme prováděli pomocí tří odlišných metod – karyotypování, FISH, aCGH. Každá z použitých metod je založena na jiném principu, což s sebou přináší i rozdíly v jejich užití a výstupech.

Mezi výhody karyotypování patří její relativní metodická, časová a cenová nenáročnost. Metoda slouží k zachycení případných větších numerických i strukturních abnormalit. Hlavní nevýhoda spočívá v nízké rozlišovací schopnosti, která činí 5–10 Mb (Shen a kol., 2016). Nicméně i přesto poskytuje karyotypování hodnotné informace o přítomnosti či absenci hrubých chromozomových odchylek v genomu pacienta. Na základě výsledků analýzy karyotypu je možné provést cílenější vyšetření (například pomocí FISH) a tím metoda slouží jako důležitá „křižovatka“ v procesu cytogenetické diagnostiky. Výskyt hrubých chromozomových odchylek bývá u souboru osob s PAS / NVO však obvykle poměrně nízký, což dokládají i naše výsledky (záchyt 1,21 %). Pro detailní vyšetření genomu pacienta tak není dostačující použití jen této jediné metody.

Druhou námi využitou metodou byla FISH. Významnou výhodou této metody je její specifita (specifita sond). S tím je ale také spojena nevýhoda nutnosti znát cíl našeho zkoumání předem, aby bylo možné vhodně zvolit, které sondy bude třeba pro vyšetření použít. Rozlišovací schopnost této metody je cca 100 kb, avšak přesný rozsah (velikost) aberace není možné na základě získaných fluorescenčních signálů určit (Silva a kol., 2019). Naopak kdy je metoda FISH pro kvantifikaci velmi užitečná, jsou případy určování přesné frekvence mozaikové linie v genomu pacienta, k čemuž jiné metody nejsou příliš vhodné. Toho jsme ve

studovaném souboru využili u vyšetřování pacientky 26 s nálezem monozomie a trizomie chromozomu 9 (obrázek 9a,b). Při interpretaci výsledků pozorování frekvence mozaikových linií je ale třeba zohlednit, že buněčné linie s aneuploidií autozomů mohou být znevýhodněny při buněčném dělení v průběhu kultivace, což může mít potenciálně vliv na zkreslení skutečného zastoupení abnormálních linií ve tkáni (Hulley a kol., 2003). Lze proto doporučit provádění vyšetření z nativní tkáně (nativního vzorku krve). Předností metody FISH je také její schopnost vizualizovat charakter strukturních přestaveb, což bylo přínosné zejména u vyšetření pacienta 327 s nálezem zmnoženého genetického materiálu satelitní oblasti 15. chromozomu (obrázek 10 a 11).

Stěžejním bodem ve vyšetřování souboru pro nás byla metoda array CGH. Je schopna detekovat aberace už na úrovni přibližně 20–200 kb, čímž výrazně rozšiřuje naše možnosti poznání (Silva a kol., 2019). Abnormální variantu jsme našli u více než pětiny pacientů (23 % jedinců). Významný přínos metody a následné softwarové analýzy výsledků spočívá také v možnosti identifikace konkrétních zasažených genů. Mezi nevýhody metody array CGH řadíme například nemožnost odhalení balancovaných přestaveb, jelikož je založena na kvantitativním porovnávání genomu pacienta s referenčním genomem. Rovněž není metoda vhodná k přesnému určení frekvence případné mozaikové linie, obzvláště v případech, kdy je v genomu přítomná monozomická a trizomická linie téhož chromozomu současně (jak tomu bylo u pacientky 26) – může dojít k vzájemnému vyrovnání signálů a tím ke zkreslení skutečného poměru zastoupení obou linií. Metoda array CGH je obecně schopna detekovat především vysokofrekvenční mozaiky, u mozaiky celých chromozomů přibližně nad 10 % (Scott a kol., 2010). U detekovaných aberací také nelze určit, na které alele chromozomu je lokalizována; princip metody je založen na hybridizaci nespecifických sond, které odrážejí celkový počet kopií, avšak bez rozlišení alelického původu. Pokud byla aberace zděděna od rodiče jedince, pro získání informace o alelickém původu aberace je třeba provést další vyšetření aCGH u obou rodičů jedince (Silva a kol., 2019). Čipy neobsahují sondy pokrývající oblasti kolem centromer a oblasti satelitů akrocentrických chromozomů (Coe a kol., 2007). Nevýhodou metody je tak nemožnost detekce přestaveb satelitů nebo detekce marker chromozomů obsahující jen centromeru a přilehlé oblasti. Avšak negativní nález z aCGH může vyloučit patogenní vliv markeru. V našem souboru tato situace nastala u pacienta 17 s markerem obsahujícím centromeru chromozomu 5 a pacienta 327 s přestavbou v satelitní oblasti chromozomu 15.

Metody cytogenomiky, včetně aCGH, neslouží k detekci nukleotidových expanzí v genomu. Literatura však uvádí, že k jedné z relativně častějších afekcí asociovaných s PAS u chlapců patří syndrom fragilního X, za který je zodpovědná právě expanze trinukleotidů (Kaufmann a kol., 2017). Syndrom fragilního X byl přítomen u jednoho pacienta v našem souboru. Pacient 76 byl chlapec s plnou mutací v genu *FMRI* (MIM* 309550) a fenotypem zahrnujícím dětský autismus, ID, ADHD, makrosomii a makrocefalii. Pomocí námi provedených vyšetřovacích metod však u tohoto pacienta žádné abnormální varianty zachyceny nebyly.

Dalším faktorem ovlivňujícím výsledný záchyt abnormálních variant u kohorty pacientů s konkrétním onemocněním může být také design a formát použitého čipu. Studie Kucińska a kol. (2024) provedla genetické vyšetření souboru 180 jedinců s PAS pomocí čipu 8x60K CytoSure Constitutional v3 Array a čipu 4x180K CytoSure Autism Research Array. Ukázalo se, že 12 CNV zachycených čipem formátu 4x180K designovaným speciálně pro výzkum variant asociovaných s PAS by klasický formát čipu 8x60K nedetekoval. Čtyři z těchto variant pak byly autory hodnoceny jako pravděpodobně patogenní. Je proto možné, že i v našem souboru by bylo odhaleno několik dalších variant, kdybychom použili jiný formát čipu, například specializovaný pro výzkumy pacientů s PAS. Nicméně formát používaný v naší laboratoři (SurePrint CGH 8x60K G3 ISCA; Agilent, USA) je široce využívanou a osvědčenou platformou pro klinickou diagnostiku umožňující detekci klinicky významných variant včetně těch spojených s NVO. Robustnost tohoto formátu čipu a jeho významný přínos pro genetickou diagnostiku i u pacientů s neurovývojovými obtížemi podporují také závěry předešlých studií (Vallespín a kol., 2013).

Každá z použitých metod je svými přínosy i limity jedinečná a každá je užitečná. Současnou kombinací více různých vyšetřovacích metod v genetické diagnostice navíc dosáhneme optimálnějších výsledků.

9.4 Testovaná hypotéza

Formulovali jsme hypotézu předpokládající, že abnormální genetické varianty se častěji vyskytují u pacientů s PAS a komorbidními NVO než u pacientů s izolovanou PAS. Zaměření hypotézy jsme si stanovili na základě dostupných či chybějících informací z předešlých studií. Některé publikace naznačují možnou souvislost výskytu charakteristických patogenních variant u pacientů s NVO, například ID, které mohou být přítomné také u pacientů s PAS (Bass a Skuse,

2018). Nicméně studií, které by byly velmi podobně či identicky zaměřené, jako je tato diplomová práce (charakterem souboru, použitými metodami, zvolenou formulací hypotéz apod.), není mnoho. Pro rozšíření dosavadních poznatků by proto mohlo být přínosné testovat hypotézu na souboru zahrnutém do této diplomové práce.

Některé studie se zaměřují pouze na procentuální porovnání pozorovaných četností CNV u různých skupin pacientů s PAS. Tak učinila například studie Kucińska a kol. (2024), která pozorovala 10,5% prevalenci klinicky relevantních CNV u jedinců s kombinovaným postižením oproti 3,1% prevalenci takovýchto variant u osob s izolovaným PAS. Statistické zhodnocení případných rozdílů mezi skupinami s izolovaným PAS a PAS s dalšími přidruženými obtížemi nebylo provedeno. V některých případech byly vědci v souvislosti s PAS a abnormálními genetickými variantami zkoumány pouze zcela konkrétní znaky. Signifikantně zvýšenou míru přítomnosti klinicky významných CNV objevili pomocí statistické analýzy chí kvadrát testu například u fenotypu PAS s mikrocefalií, kraniofaciální či jinou somatickou dysmorfii (Barone a kol., 2020). Studie Annunziata a kol. (2023) našla pomocí chí-kvadrát testování signifikantní závislost zvýšeného výskytu klinicky významných CNV u pacientů s PAS a kombinovanými obtížemi, nicméně rovněž byla zaměřena na PAS v souběhu s především fyzickými obtížemi. Pro svůj výzkum definovala „komplexní autismus“ dle autorů Miles a kol. (2005) jako přítomnost PAS a více než 6 dalších především fyzických znaků – např. závažné malformace končetin, viscerální malformace, závažné neuroradiologické změny, epileptické syndromy nebo přítomnost syndromů nedostatečného nebo nadměrného růstu. Naše studie se však zaměřila výhradně na NVO komorbidní PAS (ID, ADHD, OCD, epilepsie a další).

Výsledky testování hypotézy pomocí chí-kvadrát testu ukazují hodnotu statistiky $\chi^2 = 3,3913$ s p -hodnotou 0,0655. Tato hodnota je nad běžně používanou hladinou významnosti 0,05, což znamená, že nemůžeme zamítnout nulovou hypotézu a tedy nemáme dostatečný důkaz o tom, že v našem souboru existuje statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami izolované PAS a PAS s komorbidními NVO. Podobný výsledek poskytl i Fisherův exaktní test ($p = 0,0555$), který se také pohybuje těsně nad hranicí 0,05. Ačkoli však nebylo dosaženo statistické signifikance, p -hodnoty obou testů se pohybují velmi těsně nad hladinou statistické významnosti 0,05, což by mohlo značit určitou tendenci k asociaci mezi četností CNV a přidruženými NVO. Poměr šancí pro oba testy vychází obdobně, po zaokrouhlení $OR = 2,24$, což může naznačovat trend, že abnormální genetické varianty by mohly být přibližně 2,24x častější u pacientů s kombinovaným postižením než u pacientů s izolovanou PAS. Intervaly

spolehlivosti OR jsou však u obou testů široké. Zatímco interval spolehlivosti pro OR Fisherova testu nezahrnuje hodnotu 1 a výsledek tak nelze považovat za statisticky průkazný, interval spolehlivosti pro OR chí-kvadrát testu hodnotu 1 těsně nezahrnuje, což může naznačovat statisticky slabě významný efekt. Tato zjištění naznačují, že ačkoli jsme nenašli dostatečný statistický důkaz pro podporu stanovené hypotézy, výsledky poukazují na zajímavý trend. Je možné, že asociace mezi výskytem CNV a komorbidními NVO by byla lépe prokazatelná s větším vzorkem jedinců. Signifikantnější výsledky by mohla případně poskytnout jinak definovaná kritéria, např. analýza vztahu výskytu abnormálních CNV u pacientů s PAS zaměřená jen na jeden další vybraný fenotypový znak. Pokud by vykazoval silnější souvislost s četností abnormálních CNV než jiné, mohla by statistická analýza přinést rozhodnější závěry.

PAS i mnoho jiných NVO vykazují vysokou míru genetické a fenotypové heterogenity a také multifaktoriální charakter. Vzhledem k těmto aspektům PAS a NVO je pravděpodobné, že různé genetické i environmentální faktory mohou ovlivňovat fenotyp rozdílnými způsoby. Domnívám se, že se může jednat o významný faktor ovlivňující charakter analyzovaného souboru pacientů, který je tak pokaždé do jisté míry unikátní.

9.5 Kazuistiky

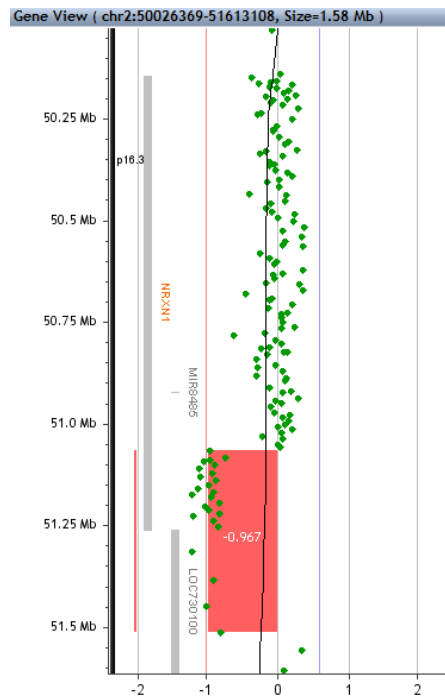
9.5.1 Pacientka 155

U pacientky 155 byla po narození pozorována centrální hypotonie. Psychomotorický vývoj probandky byl v některých ohledech opožděný, vývoj řeči byl také pomalý. V době vyšetření (ve věku 6,5 let) vykazovala dívka v řeči dyslálii a abnormální stavbu vět, nicméně disponovala bohatou slovní zásobou. Rodiče zaznamenali také obtíže v socializaci. Odborné vyšetření klasifikovalo dívčiny potíže jako vývojovou dysfázii a suspektní Aspergerův syndrom.

Genealogická anamnéza pacientky stran neurovývojových obtíží byla nevýznamná.

Objektivně byl u dívky zaznamenán vyšší vzrůst vzhledem ke genetické predispozici dle výšky rodičů. *Facies* byla posouzena jako mírně stigmatizovaná – prodloužený *tragus* s dvěma hrbolky, oční štěrby vřetenovitého tvaru, naznačený upslant, uši ventrálně rotované. Svaly trupu a končetin vykazovaly nižší tonus. Byly registrovány *pedes planovalgi*.

V rámci genetického vyšetřování byl u pacientky stanoven normální karyotyp 46,XX. Metodou array CGH byla nelezena maternálně zděděná delecí v oblasti 2p16.3 zasahující 1.–5. exonu genu *NRXN1* (obrázek 14; více viz také kapitola 4.2.1). Gen kóduje protein z rodiny neurexinů, což jsou receptorové a adhezivní molekuly synapsí. Svojí vazbou k neurotigninům vytváří vápníkově-dependentní komplexy účastnící se neurotransmise a synaptogeneze (Databáze The National Center for Biotechnology Information, 2025; Wang a kol., 2018). Varianty v genu *NRXN1* mají variabilní expresivitu a sníženou penetranci. Aberace s patogenním efektem na fenotyp pacienta tak může být zděděna i od rodiče s normálním nebo mírně abnormálním fenotypem. Ukázalo se, že může záležet i na lokalizaci intragenové delecí. Výzkum Cosemans a kol. (2020) pozoroval na základě studia kohorty 670 jedinců s NVO relativně vyšší penetranci delecí 6.–24. exonu genu *NRXN1* (32,4 %) oproti nižší pozorované penetranci delecí 1.–5. exonu (12,59 %). Delecí 6.–24. exonu byla častěji spojována s fenotypem ID a predispozicí ke schizofrenii, zatímco interpretace vlivu delecí exonů 1–5 je vědci považována za obtížnější a kauzální charakter aberace není zcela jasný. I přesto se u těchto variant předpokládá, že mohou predisponovat k rozvoji NVO. Maternálně zděděné delecí 1.–5. exonu genu (jejíž nositelkou byla i pacientka 155) byly pozorovány u pacientů s fenotypem PAS, ID či různými psychiatrickými obtížemi (psychózy, bludy; Cosemans a kol., 2020). Varianta byla na základě dostupných informací z literatury hodnocena u probandky pro daný fenotyp jako pravděpodobně patogenní.



Obrázek 14 Nalezená varianta u pacientky 155 – intragenová delece *NRXN1* v oblasti 2p16.3 o min. velikosti 444 kb.

Osa *X* – $\log_2$ poměr intenzit fluorescenčního signálu reprezentující změny v množství DNA (přítomnost CNV). Osa *Y* – genomická poloha v oblasti daného chromozomu (v hodnotách kb). Jednotlivé body – reprezentace sond, které měří změny počtu kopií v dané oblasti. Hodnota 0 odpovídá normálnímu počtu kopií; zatímco kladné hodnoty indikují amplifikaci, záporné hodnoty naznačují delecii. Barevná zóna – vyznačení oblasti se změnou v počtu kopií. Podél osy *Y* jsou vyznačeny zasažené geny.

9.5.2 Pacient 236

U pacienta 236 byla zaznamenána hypotonie a opoždění psychomotorického vývoje a obtíže ve vývoji a porozumění řeči. Specializovaná vyšetření diagnostikovala u chlapce inteligenční deficit, PAS a dyspraxii.

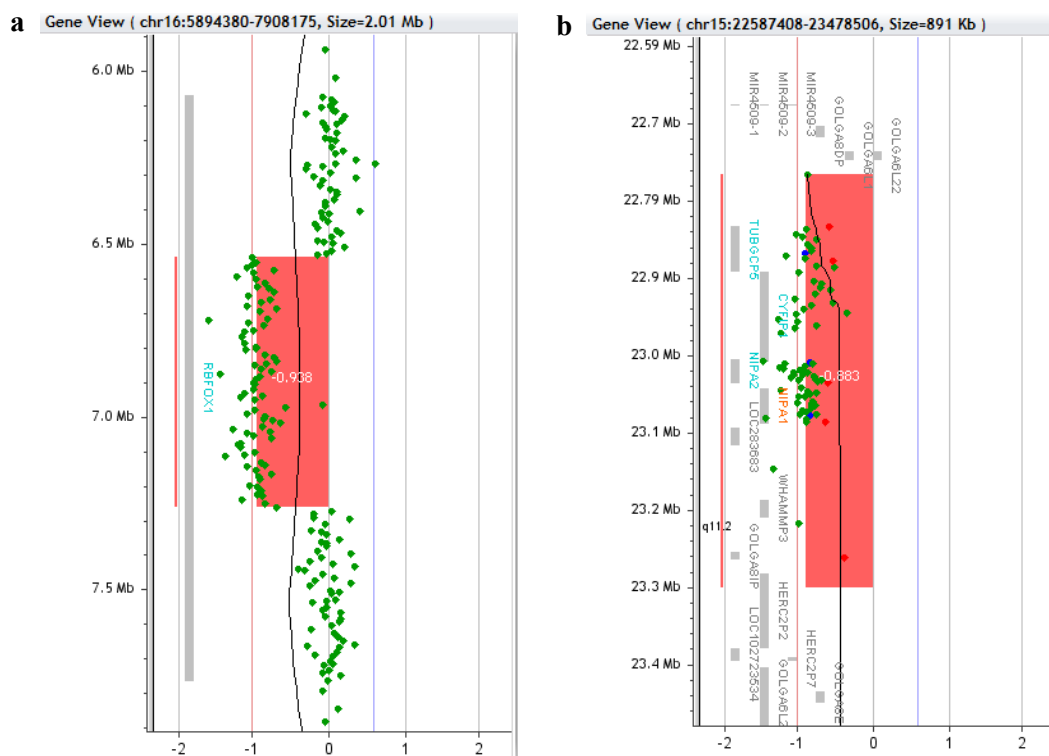
Genealogická data byla shledána jako pozitivní – sestra probanda trpěla obdobnými potížemi (vývojovou dysfázií), otec probanda vykazoval v dětství specifickou poruchu učení (dyslexii a dysgrafii).

Věk chlapce v době prvního vyšetření byl 3 roky a 1 měsíc. Ve fenotypu byl přítomen hypertelorismus, široké čelo a *pedes planovalgi*, jinak proband nevykazoval významnější dysmorfii.

Konvenční cytogenomické vyšetření probanda prokázalo normální mužský karyotyp. Výsledky analýzy genomu pomocí array CGH odhalily přítomnost několika potenciálně významných variant. Byla nalezena intragenová delece v oblasti 16p13.3 zasahující 3.–4. exon genu *RBFOX1* (obrázek 15a; více také viz kapitola 4.2.1), jehož delece jsou nalézány u osob s neurovývojovými onemocněními vč. PAS, ID a epilepsie. Produkt genu *RBFOX1* je sestříhový faktor exprimovaný v neuronech účastnící se alternativního sestříhu, vývoje neuronálních sítí a regulace synaptické plasticity a excitability (Databáze OMIM, 2019). Varianty v genu *RBFOX1* jsou považovány za varianty s neúplnou penetrancí a spíše než za příčinu bývají označovány za rizikový faktor pro rozvoj NVO, na kterém se s největší pravděpodobností podílejí i další genetické či negenetické faktory (Bill a kol., 2013; Kamien a kol., 2014; Lal a kol., 2013). Vzhledem k neúplné penetranci byla varianta hodnocena jako nejasná. Pozdější segregační analýzou (genomu rodičů) bylo zjištěno, že se u pacienta jednalo o variantu *de novo*. Zděděné i *de novo* mutace genu *RBFOX1* byly pozorovány například ve studii Griswold a kol. (2015).

Další zjištěná varianta – paternálně zděděná delece oblasti 15q11.2 – zasahuje vysoce konzervované geny *NIPAI*, *NIPA2* (MIM* 608145, MIM* 608146, geny pro hořčikové transportéry), *TUBGCP5* (MIM* 608147, gen pro komponentu tubulin-gamma komplexu účastnící se např. procesu nukleace mikrotubulů) a *CYFIP1* (MIM* 606322, gen pro komponentu regulačního proteinového WAVE komplexu účastnící se polymerace aktinu; viz obrázek 15b). Tato varianta je považována za „high-frequency low-penetrant (HFLP)“ aberaci a předpokládá se, že hraje doplňující roli k dalším genetickým a environmentálním faktorům, které mohou vyústit v poruchu neurálního vývoje (Jøneh a kol., 2019; Maya a kol., 2020b).

Genetický profil chlapce byl tedy celkově hodnocen a uzavřen jako abnormální s nálezem VUS / HFLP variant a na základě souběhu mutací v těchto genech zapojených do klíčových neurobiologických a buněčných procesů byl vysloven předpoklad možného uplatnění second-hit modelu.



Obrázek 15 Varianty nalezené u pacienta 236 – intragenová delece *RBFOX1* v oblasti 16p13.3 o min. velikosti 721 kb (a) a intersticiální delece v oblasti 15q11.2 o min. velikosti 534 kb (b).

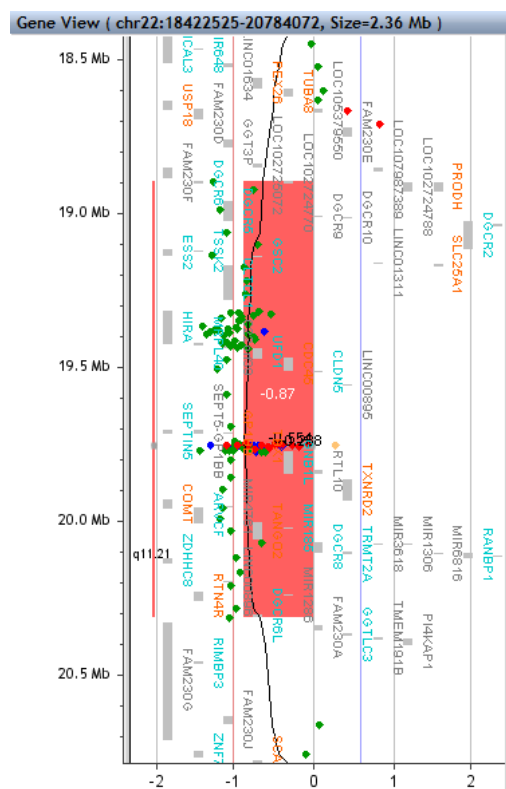
9.5.3 Pacient 248

Pacient 248 byl narozen v termínu z těhotenství komplikovaném polyhydramniem. Chlapec prodělal po porodu novorozeneckou sepsi s nutností antibiotické terapie. U chlapce byla diagnostikována percepční vada a centrální svalová hypotonie.

Psychomotorický vývoj vykazoval mírné opožďení s úplnou absencí řeči a znaky PAS.

Genealogicky významná byla blíže nediodnostikovaná porucha sluchu u otce probanda. Věk chlapce v době vyšetření byl 1 rok a 10 měsíců. Ve fenotypu nebyly shledány žádné výrazné odlišnosti, postava byla normostenická a hlava mesocefalická, bez znaků výrazné kraniofaciální dysmorfie.

Karyotyp byl normální mužský 46,XY. Metodou array CGH byla nalezena *de novo* intersticiální delece v oblasti 22q11.21 o min. velikosti 1,41 Mb zasahující 46 genů (viz. obrázek 16). Tato oblast je oblastí rekurentního delečního syndromu 22q11.21. Jednalo se o proximální deleci lemovanou segmentálními duplikacemi LCR22 A-B. Mezi zasaženými geny byly všechny kandidátní kauzální geny pro DiGeorgeův syndrom a velokardiofaciální syndrom – *HIRA* (MIM* 600237), *TBX1* (MIM* 602054) a *COMT* (MIM* 116790). Nález byl zhodnocen jako patogenní. Ačkoli rozsah aberace byl pro daný syndrom typický, fenotypově nevykazoval proband odchylky v kraniofaciální morfologii ani rozštěp patra či rtů, jak bývá u pacientů s touto afekcí popisováno. U syndromu byla pozorována variabilní expresivita a jeho fenotypová prezentace se tak může mezi nositeli této aberace lišit (Campbell a kol., 2018; McDonald-McGinn a kol., 1999). Různé vady sluchu byly u pacientů se syndromem mikrolece zaznamenány, avšak pozorovaná prevalence, předpokládané příčiny a konkrétní stanovené diagnózy se napříč studiemi velmi liší (Verheij, 2021). V případě pacienta 248 byla pomocí metody NGS (mimo rozsah a zaměření této práce) detekována pravděpodobně patogenní varianta v genu *ATP2B2* (MIM* 108733; lokus 3p25.3) paternálního původu pravděpodobně vysvětlující vadu sluchu u probanda (i jeho otce), která není důsledkem mikrolečního syndromu.



Obrázek 16 Varianta nalezená u pacienta 248 – delece v oblasti 22q11.21 o min. velikosti 1,41 Mb.

10 Závěr

Poruchy autistického spektra jsou širokou a velice heterogenní skupinou obtíží jak na úrovni jejich příčin, tak projevů. Etiologie autismu vykazuje multifaktoriální charakter, a tak se může často jednat o souhru vnějších (environmentálních) a vnitřních (genetických) faktorů. Genetické aspekty etiologie PAS jsou rovněž rozmanitým a komplexním souborem. Cílem diplomové práce bylo shromáždit kohortu pacientů s PAS a se zaměřením na fenotypové projevy autismu a různých dalších neurovývojových obtíží ji charakterizovat. Těžiště práce spočívalo v zachytu a analýze abnormálních genetických variant v genomu těchto pacientů.

Rozmanitost genetických aspektů PAS jsme popsali na základě nálezu mnoha různých variant zasahujících klíčové lokusy lidského genomu. Nápadným jevem bylo zapojení zasažených genů do důležitých buněčných procesů, zejména v neurogenezi, neurotransmisí, synaptogenezi či synaptické plasticitě. Byly zachyceny také případy mnohých mikrolečních i mikroduplikačních syndromů podtrhující skutečnost, že PAS jako diagnostická jednotka může být asociována s velkým množstvím faktorů a příčin. Podařilo se nám zachytit i případy tzv. modelu dvojího zásahu, kdy lze na základě přítomnosti vícera významných faktorů (genetických variant) současně předpokládat jejich synergický negativní vliv na fenotyp. Nejčastějším typem nálezu v našem souboru pacientů s PAS byly varianty typu VUS, u kterých zůstává mechanismus jejich ovlivnění fenotypu dosud ne zcela objasněn. Výzkumných studií a informací v databázích však neustále přibývá, a je tak možné se k variantám VUS vracet a podrobit jejich hodnocení reanalýze, dokud nebudou zařazeny mezi ostatní stupně klasifikace klinického významu variant.

Pro hlubší vhled do problematiky abnormálních genetických variant u pacientů s PAS, jejíž fenotypová manifestace může mít mnoho podob, bylo jedním z cílů práce také testovat hypotézu předpokládající, že potenciálně klinicky významné varianty v genomu (hodnocené jako patogenní, pravděpodobně patogenní, VUS) se častěji budou vyskytovat u pacientů s PAS a dalšími komorbidními NVO, než u pacientů bez přidružených NVO. Po statistické analýze dat bylo zhodnoceno, že ačkoli naznačují možnou podporu hypotézy, podle níž by pacienti s přidruženými NVO mohli být nositeli abnormální varianty 2,24x častěji než pacienti s izolovaným autismem, naše výsledky nemohou hypotézu jednoznačně podpořit. Je možné, že tento závěr vyplývá z velikosti souboru či námi zvolené definici sledovaných proměnných. Rovněž je však možné, že tato skutečnost pouze odráží vysokou míru heterogenity, variability a multifaktoriální povahu neurovývojových onemocnění.

Byl naplněn také poslední stanovený cíl – popsat vybrané genetické nálezy formou kazuistik pacientů. Konkrétní případy pacientů mohou mnohdy sloužit jako příhodná ilustrace faktu, že i přes velmi dobré možnosti současných diagnostických metod může být následná interpretace genetického nálezu v některých případech nesnadnou záležitostí.

Na diverzitě našich nálezů lze také demonstrovat, že nejširšího a nejdetailnějšího záchytu abnormálních variant docílíme pomocí kombinace různých vyšetřovacích metod, každá je svými přínosy (i limity) jedinečná. Nejvyšší procentuální záchyt abnormálních variant u osob s PAS a jinými NVO vykazovala metoda array CGH, což potvrzuje její nepostradatelnou roli v cytogenomických výzkumech souborů jedinců s neurovývojovými obtížemi.

Budoucnost genetického výzkumu PAS je perspektivní a skýtá mnoho příležitostí. Ať už se jedná o objasňování dosud nepopsaných genotypo-fenotypových korelací různých variant, o detekci zcela nových potenciálně významných variant či nalézání způsobů pro aplikaci poznatků do klinické praxe, případně personalizované medicíny.

Ačkoli nástroje vědy možná nikdy plně nepopíšou zcela všechny faktory, mechanismy a procesy zapojené do etiologie autismu, věříme, že výsledky naší práce a jejich diskuze pomohou přispět k hlubšímu vhledu do této problematiky.

Seznam použité literatury

- Abdallah, M.W., Larsen, N., Grove, J., Nørgaard-Pedersen, B., Thorsen, P., Mortensen, E.L., Hougaard, D.M., 2013. Amniotic fluid inflammatory cytokines: Potential markers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry*. 14, 528–538.
- Adviento, B., Corbin, I.L., Widjaja, F., Desachy, G., Enrique, N., Rosser, T., Risi, S., Marco, E.J., Hendren, R.L., Bearden, C.E., Rauen, K.A., Weiss, L.A., 2014. Autism traits in the RASopathies. *Journal Of Medical Genetics*. 51, 10–20.
- Al Ageeli, E., Drunat, S., Delanoë, C., Perrin, L., Baumann, C., Capri, Y., Fabre-Teste, J., Aboura, A., Dupont, C., Auvin, S., El Khattabi, L., Chantereau, D., Moncla, A., Tabet, A.-C., Verloes, A., 2014. Duplication of the 15q11-q13 region: Clinical and genetic study of 30 new cases. *European Journal of Medical Genetics*. 57, 5–14.
- Al-Awadi, B.Q.H., Al-Aadhami, M.A.W.S., Baqer, N.N., 2023. Chromosomal aberration detection in Iraqi children with autism. *Human Gene*. 38, 1–8.
- Annunziata, S., Bulgheroni, S., D'Arrigo, S., Esposito, S., Taddei, M., Saletti, V., Alfei, E., Sciacca, F.L., Rizzo, A., Pantaleoni, C., Riva, D., 2023. CGH Findings in Children with Complex and Essential Autistic Spectrum Disorder. *The Journal of Autism and Developmental Disorders*. 53, 615–623.
- Antshel, K.M., Aneja, A., Strunge, L., Peebles, J., Fremont, W.P., Stallone, K., AbdulSabur, N., Higgins, A.M., Shprintzen, R.J., Kates, W.R., 2007. Autistic Spectrum Disorders in Velo-cardio Facial Syndrome (22q11.2 Deletion). *The Journal of Autism and Developmental Disorders*. 1776–1786.
- Arenella, M., Fanelli, G., Kiemeny, L.A., McAlonan, G., Murphy, D.G., Bralten, J., 2023. Genetic relationship between the immune system and autism. *Brain, Behavior, & Immunity – Health*. 34, 100698.
- Atladóttir, H.Ó., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D.E., Lemcke, S., Abdallah, M., Parner, E.T., 2010. Maternal Infection Requiring Hospitalization During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *The Journal of Autism and Developmental Disorders*. 40, 1423–1430.
- Avni, E., Ben-Itzhak, E., Zachor, D.A., 2018. The Presence of Comorbid ADHD and Anxiety Symptoms in Autism Spectrum Disorder: Clinical Presentation and Predictors. *Frontiers in Psychiatry*. 9, 717.
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D.L., Maenner, M.J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Rosenberg, C.R., White, T., Durkin, M.S., Imm, P., Nikolaou, L., Yeargin-Allsopp, M., Lee, L.-C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R.T., Hewitt, A., Pettygrove, S., Constantino, J.N., Vehorn, A., Shenouda, J., Hall-Lande, J., 2018. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. US Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention. 2014 67.
- Ballif, B.C., Theisen, A., Rosenfeld, J.A., Traylor, R.N., Gastier-Foster, J., Thrush, D.L., Astbury, C., Bartholomew, D., McBride, K.L., Pyatt, R.E., Shane, K., Smith, W.E., Banks, V., Gallentine, W.B., Brock, P., Rudd, M.K., Adam, M.P., Keene, J.A., Phillips, J.A., Pfotenhauer, J.P., Gowans, G.C., Stankiewicz, P., Bejjani, B.A., Shaffer, L.G., 2010. Identification of a Recurrent Microdeletion at 17q23.1q23.2 Flanked by Segmental Duplications Associated with Heart Defects and Limb Abnormalities. *The American Journal of Human Genetics* 86. 454–461.

- Bandim, J.M., Ventura, L.O., Miller, M.T., Almeida, H.C., Costa, A.E.S., 2003. Autism and Möbius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 61, 181–185.
- Barone, R., Gulisano, M., Amore, R., Domini, C., Milana, M.C., Giglio, S., Madia, F., Mattina, T., Casabona, A., Fichera, M., Rizzo, R., 2020. Clinical correlates in children with autism spectrum disorder and CNVs: Systematic investigation in a clinical setting. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 80, 276–286.
- Bass, N., Skuse, D., 2018. Genetic testing in children and adolescents with intellectual disability. *Current Opinion in Psychiatry*. 31, 490.
- Becerra, T.A., Wilhelm, M., Olsen, J., Cockburn, M., Ritz, B., 2013. Ambient Air Pollution and Autism in Los Angeles County, California. *Environmental Health Perspectives*. 121, 380–386.
- Bennett, J.A., Germani, T., Haqq, A.M., Zwaigenbaum, L., 2015. Autism spectrum disorder in Prader–Willi syndrome: A systematic review. *American Journal of Medical Genetics*. 167, 2936–2944.
- Bill, B.R., Lowe, J.K., DyBuncio, C.T., Fogel, B.L., 2013. Orchestration of Neurodevelopmental Programs by *RBFOX1*. *International Review of Neurobiology*, Elsevier. 251–267.
- Björlin Avdic, H., Butwicka, A., Nordenström, A., Almqvist, C., Nordenskjöld, A., Engberg, H., Frisén, L., 2021. Neurodevelopmental and psychiatric disorders in females with Turner syndrome: a population-based study. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 13, 51.
- Boccuto, L., Lauri, M., Sarasua, S.M., Skinner, C.D., Buccella, D., Dwivedi, A., Orteschi, D., Collins, J.S., Zollino, M., Visconti, P., DuPont, B., Tiziano, D., Schroer, R.J., Neri, G., Stevenson, R.E., Gurrieri, F., Schwartz, C.E., 2013. Prevalence of *SHANK3* variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *European Journal of Human Genetics*. 21, 310–316.
- Braunschweig, D., Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertzpicciotto, I., Hansen, R., Croen, L., Pessah, I., Vandewater, J., 2007. Autism: Maternally derived antibodies specific for fetal brain proteins. *NeuroToxicology*. 29, 226–231.
- Brucato, M., Ladd-Acosta, C., Li, M., Caruso, D., Hong, X., Kaczaniuk, J., Stuart, E.A., Fallin, M.D., Wang, X., 2017. Prenatal exposure to fever is associated with autism spectrum disorder in the boston birth cohort. *Autism Research*. 10, 1878–1890.
- Bruno, D.L., Anderlid, B.M., Lindstrand, A., Van Ravenswaaij-Arts, C., Ganesamoorthy, D., Lundin, J., Martin, C.L., Douglas, J., Nowak, C., Adam, M.P., Kooy, R.F., Van Der Aa, N., Reyniers, E., Vandeweyer, G., Stolte-Dijkstra, I., Dijkhuizen, T., Yeung, A., Delatycki, M., Borgstrom, B., Thelin, L., Cardoso, C., Van Bon, B., Pfundt, R., De Vries, B.B.A., Wallin, A., Amor, D.J., James, P.A., Slater, H.R., Schoumans, J., 2010. Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *Journal of Medical Genetics*. 47, 299–311.
- Bruno, D.L., Ganesamoorthy, D., Schoumans, J., Bankier, A., Coman, D., Delatycki, M., Gardner, R.J.M., Hunter, M., James, P.A., Kannu, P., McGillivray, G., Pachter, N., Peters, H., Rieubland, C., Savarirayan, R., Scheffer, I.E., Sheffield, L., Tan, T., White, S.M., Yeung, A., Bowman, Z., Ngo, C., Choy, K.W., Cacheux, V., Wong, L., Amor, D.J., Slater, H.R., 2009. Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *Journal of Medical Genetics*. 46, 123–131.

- Bulgheroni, S., D'Arrigo, S., Signorini, S., Briguglio, M., Di Sabato, M.L., Casarano, M., Mancini, F., Romani, M., Alfieri, P., Battini, R., Zoppello, M., Tortorella, G., Bertini, E., Leuzzi, V., Valente, E.M., Riva, D., 2016. Cognitive, adaptive, and behavioral features in Joubert syndrome. *American Journal of Medical Genetics*. 170, 3115–3124.
- Bunyan, D.J., Baffico, M., Capone, L., Vannelli, S., Iughetti, L., Schmitt, S., Taylor, E., Herridge, A.A., Shears, D., Forabosco, A., Coviello, D.A., 2016. Duplications upstream and downstream of *SHOX* identified as novel causes of Leri–Weill dyschondrosteosis or idiopathic short stature. *American Journal of Medical Genetics*. 170, 949–957.
- Burnside, R.D., Pasion, R., Mikhail, F.M., Carroll, A.J., Robin, N.H., Youngs, E.L., Gadi, I.K., Keitges, E., Jaswaney, V.L., Papenhausen, P.R., Potluri, V.R., Risheg, H., Rush, B., Smith, J.L., Schwartz, S., Tepperberg, J.H., Butler, M.G., 2011. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Journal of Human Genetics*. 130, 517–528.
- Buyse, K., Delle Chiaie, B., Van Coster, R., Loeys, B., De Paepe, A., Mortier, G., Speleman, F., Menten, B., 2009. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: Lessons learned from a 1001 sample experience. *European Journal of Medical Genetics*. 52, 398–403.
- Campbell, I.M., Sheppard, S.E., Crowley, T.B., McGinn, D.E., Bailey, A., McGinn, M.J., Unolt, M., Homans, J.F., Chen, E.Y., Salmons, H.I., Gaynor, J.W., Goldmuntz, E., Jackson, O.A., Katz, L.E., Mascarenhas, M.R., Deeney, V.F.X., Castelein, R.M., Zur, K.B., Elden, L., Kallish, S., Kolon, T.F., Hopkins, S.E., Chadehumbe, M.A., Lambert, M.P., Forbes, B.J., Moldenhauer, J.S., Schindewolf, E.M., Solot, C.B., Moss, E.M., Gur, R.E., Sullivan, K.E., Emanuel, B.S., Zackai, E.H., McDonald-McGinn, D.M., 2018. What is new with 22q? An update from the 22q and You Center at the Children's Hospital of Philadelphia. *American Journal of Medical Genetics*. 176, 2058–2069.
- Cani, I., Muccioli, L., Mignani, F., Licchetta, L., Tinuper, P., Provini, F., Bisulli, F., 2022. MECP2 duplication syndrome: The electroclinical features of a case with long-term evolution. *Epilepsy & Behavior Reports*. 19, 100541.
- Chair, S.-Y., Chow, K.-M., Chan, C.W.-L., Chan, J.Y.-W., Law, B.M.-H., Waye, M.M.-Y., 2024. Structural Variations Identified in Patients with Autism Spectrum Disorder (ASD) in the Chinese Population: A Systematic Review of Case-Control Studies. *Genes*. 15, 1082.
- Christensen, J., Grønberg, T.K., Sørensen, M.J., Schendel, D., Parner, E.T., Pedersen, L.H., Vestergaard, M., 2013. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *The Journal of the American Medical Association*. 309, 1696.
- Coe, B.P., Ylstra, B., Carvalho, B., Meijer, G.A., MacAulay, C., Lam, W.L., 2007. Resolving the resolution of array CGH. *Genomics*. 89, 647–653.
- Colvert, E., Tick, B., McEwen, F., Stewart, C., Curran, S.R., Woodhouse, E., Gillan, N., Hallett, V., Lietz, S., Garnett, T., Ronald, A., Plomin, R., Rijdsdijk, F., Happé, F., Bolton, P., 2015. Heritability of Autism Spectrum Disorder in a UK Population-Based Twin Sample. *The Journal of the American Medical Association*. 72, 415–423.
- Cooper, G.M., Coe, B.P., Girirajan, S., Rosenfeld, J.A., Vu, T.H., Baker, C., Williams, C., Stalker, H., Hamid, R., Hannig, V., Abdel-Hamid, H., Bader, P., McCracken, E., Niyazov, D., Leppig, K., Thiese, H., Hummel, M., Alexander, N., Gorski, J., Kussmann, J., Shashi, V., Johnson, K., Rehder, C., Ballif, B.C., Shaffer, L.G., Eichler, E.E., 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature Genetics*. 43, 838–846.

- Cooper, K., Mandy, W., Butler, C., Russell, A., 2023. Phenomenology of gender dysphoria in autism: a multiperspective qualitative analysis. *Child Psychology Psychiatry*. 64, 265–276.
- Cosemans, N., Vandenhove, L., Vogels, A., Devriendt, K., Van Esch, H., Van Buggenhout, G., Olivie, H., De Ravel, T., Ortibus, E., Legius, E., Aerssens, P., Breckpot, J., R. Vermeesch, J., Shen, S., Fitzgerald, J., Gallagher, L., Peeters, H., 2020. The clinical relevance of intragenic *NRXN1* deletions. *Journal of Medical Genetics*. 57, 347–355.
- Crawford, H., Abbeduto, L., Hall, S.S., Hardiman, R., Hessel, D., Roberts, J.E., Scerif, G., Stanfield, A.C., Turk, J., Oliver, C., 2020. Fragile X syndrome: an overview of cause, characteristics, assessment and management. *Paediatrics and Child Health*. 30, 400–403.
- Croen, L.A., Qian, Y., Ashwood, P., Daniels, J.L., Fallin, D., Schendel, D., Schieve, L.A., Singer, A.B., Zerbo, O., 2019. Family history of immune conditions and autism spectrum and developmental disorders: Findings from the study to explore early development. *Autism Research*. 12, 123–135.
- Crolla, J.A., Youings, S.A., Ennis, S., Jacobs, P.A., 2005. Supernumerary marker chromosomes in man: parental origin, mosaicism and maternal age revisited. *European Journal of Human Genetics*. 13, 154–160.
- Curry, C.J., Rosenfeld, J.A., Grant, E., Gripp, K.W., Anderson, C., Aylsworth, A.S., Saad, T.B., Chizhikov, V.V., Dybose, G., Fagerberg, C., Falco, M., Fels, C., Fichera, M., Graakjaer, J., Greco, D., Hair, J., Hopkins, E., Huggins, M., Ladda, R., Li, C., Moeschler, J., Nowaczyk, M.J.M., Ozmore, J.R., Reitano, S., Romano, C., Roos, L., Schnur, R.E., Sell, S., Suwannarat, P., Svaneby, D., Szybowska, M., Tarnopolsky, M., Tervo, R., Tsai, A.C., Tucker, M., Vallee, S., Wheeler, F.C., Zand, D.J., Barkovich, A.J., Aradhya, S., Shaffer, L.G., Dobyns, W.B., 2013. The duplication 17p13.3 phenotype: Analysis of 21 families delineates developmental, behavioral and brain abnormalities, and rare variant phenotypes. *American Journal of Medical Genetics*. 161, 1833–1852.
- Databáze OMIM, 2024a. Smith-Lemli-Opitz syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2024b. Cornelia de Lange syndrome 3 with or without midline brain defects. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2024c. KAT8 regulatory NSL complex, subunit 1; KANSL1. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023a. Down syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023b. Angelman syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023c. Prader-Willi syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023d. Rett syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023e. Moebius syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023f. Cohen syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023g. Joubert syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023h. Cornelia de Lange syndrome 1. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2023i. Cornelia de Lange syndrome 6. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2022a. Phelan-McDermid syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2022b. DiGeorge syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].
- Databáze OMIM, 2022c. Sotos syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2022d. Cornelia de Lange syndrome 5. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2022e. Noonan syndrome 1. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2022f. Fragile X syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2022g. Intellectual developmental disorder, autosomal dominant; *MRDI*. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2021a. Cornelia de Lange syndrome 4 with or without midline brain defects. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2021b. Methyl-CpG-binding protein2; *MECP2*. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2020a. Williams-Beuren syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2020b. Velocardiofacial syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2020c. Cornelia de Lange syndrome 2. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2020d. 16p11.2 deletion syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2019. RNA-binding FOX1 homolog 1; *RBFox1*. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2017a. Smith-Magenis syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2017b. Neurexin I; *NRXN1*. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze OMIM, 2017c. Chromosome 15q11-q13 duplication syndrome. Johns Hopkins University. [Webová databáze].

Databáze Orphanet, 2021a. Turner syndrome. French National Institute of Health and Medical Research. [Webová databáze].

Databáze Orphanet, 2021b. Moebius syndrome. French National Institute of Health and Medical Research. [Webová databáze].

Databáze The National Center for Biotechnology Information, 2025. NRXN1 – neurexin 1 (human). National Center for Biotechnology Information. [Webová databáze].

Davide, G., Rebecca, C., Irene, P., Luciano, C., Francesco, R., Marta, N., Miriam, O., Natascia, B., Pierluigi, P., 2023. Epigenetics of Autism Spectrum Disorders: A Multi-level Analysis Combining Epi-signature, Age Acceleration, Epigenetic Drift and Rare Epivariations Using Public Datasets. *Current Neuropharmacology*. 21, 2362–2373.

De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A.P., Poultney, C.S., Samocha, K., Ercument Cicek, A., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Fu, S.-C., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P.F., Brownfeld, J.M., Cai, J., Campbell, N.G., Carracedo, A., Chahrour, M.H., Chiocchetti, A.G., Coon, H., Crawford, E.L., Crooks, L., Curran, S.R., Dawson, G., Duketis, E., Fernandez, B.A., Gallagher, L., Geller, E., Guter, S.J., Sean Hill, R., Ionita-Laza, I., Jimenez Gonzalez, P., Kilpinen, H., Klauck, S.M., Klevzon, A., Lee, I., Lei, J., Lehtimäki, T., Lin, C.-F., Ma'ayan, A., Marshall, C.R., McInnes, A.L., Neale, B., Owen, M.J., Ozaki, N., Parellada, M., Parr, J.R., Purcell, S., Puura, K., Rajagopalan, D., Rehnström, K., Reichenberg, A., Sabo, A., Sachse, M., Sanders, S.J., Schafer, C., Skuse, D., Stevens, C., Szatmari, P., Tammimies, K., Valladares, O., Voran, A., Wang, L.-S., Weiss, L.A., Jeremy Willsey, A., Yu, T.W., Yuen, R.K.C., Cook, E.H., Freitag, C.M., Gill, M., Hultman, C.M., Lehner, T., Palotie, A., Schellenberg, G.D., Sklar, P., State, M.W., Sutcliffe, J.S., Walsh, C.A., Scherer, S.W., Zwick, M.E., Barrett, J.C., Cutler, D.J., Roeder, K., Devlin, B., Daly, M.J., Buxbaum, J.D., 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 515, 209–215.

- Dell’Osso, L., Carpita, B., Muti, D., Morelli, V., Salarpi, G., Salerni, A., Scotto, J., Massimetti, G., Gesi, C., Ballerio, M., Signorelli, M.S., Luciano, M., Politi, P., Aguglia, E., Carmassi, C., Maj, M., 2019. Mood symptoms and suicidality across the autism spectrum. *Comprehensive Psychiatry*. 91, 34–38.
- Devlin, B., Scherer, S.W., 2012. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Current Opinion in Genetics & Development*. 22, 229–237.
- Duffney, L.J., Valdez, P., Tremblay, M.W., Cao, X., Montgomery, S., McConkie-Rosell, A., Jiang, Y., 2018. Epigenetics and autism spectrum disorder: A report of an autism case with mutation in H1 linker histone *HIST1H1E* and literature review. *American Journal of Medical Genetics*. 177, 426–433.
- Ecker, C., Suckling, J., Deoni, S.C., Lombardo, M.V., Bullmore, E.T., Baron-Cohen, S., Catani, M., Jezzard, P., Barnes, A., Bailey, A.J., Williams, S.C., Murphy, D.G.M., Brain Anatomy and Its Relationship to Behavior in Adults With Autism Spectrum Disorder: A Multicenter Magnetic Resonance Imaging Study. *Archives of General Psychiatry*. 69, 195–209.
- Fields, V.L., Tian, L.H., Wiggins, L.D., Soke, G.N., Overwyk, K., Moody, E., Reyes, N., Shapira, S.K., Schieve, L.A., 2024. Prevalence of Developmental, Psychiatric, and Neurologic Conditions in Older Siblings of Children with and without Autism Spectrum Disorder: Study to Explore Early Development. *The Journal of Autism and Developmental Disorders*. 1–13.
- Fodstad, J.C., Rojahn, J., Matson, J.L., 2012. The Emergence of Challenging Behaviors in At-Risk Toddlers with and without Autism Spectrum Disorder: A Cross-Sectional Study. *Journal of Developmental and Physical Disabilities*. 24, 217–234.
- Folstein, S., Rutter, M., 1977. Infantile Autism: A Genetic Study of 21 Twin Pairs. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 18, 297–321.
- Fombonne, E., Grandjean, H., 1997. Autism and Associated Medical Disorders in a French Epidemiological Survey. *The American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 36, 1561–1569.
- Frost, A., van Campen, J., 2024. Microarray (array CGH) — Knowledge Hub.GeNotes. [Webová stránka].
- Ghafouri-Fard, S., Pourtavakoli, A., Hussen, B.M., Taheri, M., Ayatollahi, S.A., 2023. A Review on the Role of Genetic Mutations in the Autism Spectrum Disorder. *Molecular Neurobiology*. 60, 5256–5272.
- Gijsbers, A.C., Lew, J.Y., Bosch, C.A., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., Van Haeringen, A., Den Hollander, N.S., Kant, S.G., Bijlsma, E.K., Breuning, M.H., Bakker, E., Ruivenkamp, C.A., 2009. A new diagnostic workflow for patients with mental retardation and/or multiple congenital abnormalities: test arrays first. *European Journal of Human Genetics*. 17, 1394–1402.
- Gijsbers, A.C.J., Schoumans, J., Ruivenkamp, C.A.L., 2011. Interpretation of Array Comparative Genome Hybridization Data: A Major Challenge. *Cytogenetic and Genome Research*. 135, 222–227.
- Goines, P.E., Croen, L.A., Braunschweig, D., Yoshida, C.K., Grether, J., Hansen, R., Kharrazi, M., Ashwood, P., 2011. Increased midgestational IFN-g, IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Molecular Autism*. 2, 1–11.
- Granata, P., Zito, A., Cocciadiferro, D., Novelli, A., Pessina, C., Mazza, T., Ferri, M., Piccinelli, P., Luoni, C., Termine, C., Fasano, M., Casalone, R., 2024. Unveiling genetic insights: Array-CGH and WES discoveries in a cohort of 122 children with essential autism spectrum disorder. *BMC Genomics*. 25, 1186.
- Green Snyder, L., D’Angelo, D., Chen, Q., Bernier, R., Goin-Kochel, R.P., Wallace, A.S., Gerdts, J., Kanne, S., Berry, L., Blaskey, L., Kushner, E., Roberts, T., Sherr, E., Martin,

- C.L., Ledbetter, D.H., Spiro, J.E., Chung, W.K., Hanson, E., Alupay, H., Aaronson, B., Ackerman, S., Ankenman, K., Anwar, A., Atwell, C., Bowe, A., Beaudet, A.L., Benedetti, M., Berg, J., Berman, J., Berry, L.N., Bibb, A.L., Blaskey, L., Brennan, J., Brewton, C.M., Buckner, R., Bukshpun, P., Burko, J., Cali, P., Cerban, B., Chang, Y., Cheong, M., Chow, V., Chu, Z., Chudnovskaya, D., Cornew, L., Dale, C., Dell, J., Dempsey, A.G., Deschamps, T., Earl, R., Edgar, J., Elgin, J., Olson, J.E., Evans, Y.L., Findlay, A., Fischbach, G.D., Fisk, C., Fregeau, B., Gaetz, B., Gaetz, L., Garza, S., Gerds, J., Glenn, O., Gobuty, S.E., Golembowski, R., Greenup, M., Heiken, K., Hines, K., Hinkley, L., Jackson, F.I., Jenkins, J., Jeremy, R.J., Johnson, K., Kanne, S.M., Kessler, S., Khan, S.Y., Ku, M., Kushner, E., Laakman, A.L., Lam, P., Lasala, M.W., Lee, H., LeGuerre, K., Levy, S., Cavanagh, A.L., Llorens, A.V., Campe, K.L., Luks, T.L., Marco, E.J., Martin, S., Martin, A.J., Marzano, G., Masson, C., McGovern, K.E., Keehn, R.M., Miller, D.T., Miller, F.K., Moss, T.J., Murray, R., Nagarajan, S.S., Nowell, K.P., Owen, J., Paal, A.M., Packer, A., Page, P.Z., Paul, B.M., Peters, A., Peterson, D., Poduri, A., Pojman, N.J., Porche, K., Proud, M.B., Qasmieh, S., Ramocki, M.B., Reilly, B., Roberts, T.P.L., Shaw, D., Sinha, T., Smith-Packard, B., Gallagher, A.S., Swarnakar, V., Thieu, T., Triantafallou, C., Vaughan, R., Visyak, N., Wakahiro, M., Wallace, A., Ward, T., Wenegrat, J., Wolken, A., 2016. Autism Spectrum Disorder, Developmental and Psychiatric Features in 16p11.2 Duplication. *The Journal of Autism and Developmental Disorders*. 46, 2734–2748.
- Griswold, A.J., Dueker, N.D., Van Booven, D., Rantus, J.A., Jaworski, J.M., Slifer, S.H., Schmidt, M.A., Hulme, W., Konidari, I., Whitehead, P.L., Cuccaro, M.L., Martin, E.R., Haines, J.L., Gilbert, J.R., Hussman, J.P., Pericak-Vance, M.A., 2015. Targeted massively parallel sequencing of autism spectrum disorder-associated genes in a case control cohort reveals rare loss-of-function risk variants. *Molecular Autism*. 6, 43.
- Gunnes, N., Surén, P., Bresnahan, M., Hornig, M., Lie, K.K., Lipkin, W.I., Magnus, P., Nilsen, R.M., Reichborn-Kjennerud, T., Schjølberg, S., Susser, E.S., Øyen, A.-S., Stoltenberg, C., 2013. Interpregnancy Interval and Risk of Autistic Disorder. *Epidemiology*. 24, 906–912.
- Hamada, N., Ito, H., Nishijo, T., Iwamoto, I., Morishita, R., Tabata, H., Momiyama, T., Nagata, K.-I., 2016. Essential role of the nuclear isoform of *RBFOX1*, a candidate gene for autism spectrum disorders, in the brain development. *Scientific Reports*. 6, 30805.
- Harzif, A.K., Andyra, A.F., Sayogo, A., Ummah, N., Puspawardani, A.R., Nurbaeti, P., Wiweko, B., 2024. Embryo response to aneuploidy through self-correction mechanism: a literature review. *Middle East Fertility Society Journal*. 29, 16.
- Hodge, J.C., Mitchell, E., Pillalamarri, V., Toler, T.L., Bartel, F., Kearney, H.M., Zou, Y.S., Tan, W.H., Hanscom, C., Kirmani, S., Hanson, R.R., Skinner, S.A., Rogers, R.C., Everman, D.B., Boyd, E., Tapp, C., Mullegama, S.V., Keelean-Fuller, D., Powell, C.M., Elsea, S.H., Morton, C.C., Gusella, J.F., DuPont, B., Chaubey, A., Lin, A.E., Talkowski, M.E., 2014. Disruption of *MBD5* contributes to a spectrum of psychopathology and neurodevelopmental abnormalities. *Molecular Psychiatry*. 19, 368–379.
- Hollocks, M.J., Lerh, J.W., Magiati, I., Meiser-Stedman, R., Brugha, T.S., 2019. Anxiety and depression in adults with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. *Psychological Medicine*. 49, 559–572.
- Howlin, P., Karpf, J., Turk, J., 2005. Behavioural characteristics and autistic features in individuals with Cohen Syndrome. *European Child & Adolescent Psychiatry*. 14, 57–64.
- Huke, V., Turk, J., Saeidi, S., Kent, A., Morgan, John.F., 2013. Autism Spectrum Disorders in Eating Disorder Populations: A Systematic Review. *European Eating Disorders Review*. 21, 345–351.

- Hulley, B.J., Hummel, M., Cook, L.L., Boyd, B.K., Wenger, S.L., 2003. Trisomy 8 mosaicism: Selective growth advantage of normal cells vs. growth disadvantage of trisomy 8 cells. *American Journal of Medical Genetics*. 116, 144–146.
- Ibrahim, A., Mullins, J., Cyrus, S., 2023. XX Male: Early Detection With Prenatal Testing. *Cureus*. 15, 1–6.
- Icasiano, F., Hewson, P., Machet, P., Cooper, C., Marshall, A., 2004. Childhood autism spectrum disorder in the Barwon region: A community based study. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 40, 696–701.
- Jacquemont, S., Coe, B.P., Hersch, M., Duyzend, M.H., Krumm, N., Bergmann, S., Beckmann, J.S., Rosenfeld, J.A., Eichler, E.E., 2014. A Higher Mutational Burden in Females Supports a “Female Protective Model” in Neurodevelopmental Disorders. *The American Journal of Human Genetics*. 94, 415–425.
- Jia, C.-W., Wang, L., Lan, Y.-L., Song, R., Zhou, L.-Y., Yu, L., Yang, Y., Liang, Y., Li, Y., Ma, Y.-M., Wang, S.-Y., 2015. Aneuploidy in Early Miscarriage and its Related Factors. *Chinese Medical Journal*. 128, 2772–2776.
- Johansson, M., Wentz, E., Fernell, E., Strömland, K., Miller, M.T., Gillberg, C., 2001. Autistic spectrum disorders in Möbius sequence: a comprehensive study of 25 individuals. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 43, 338–345.
- Jøneh, A.E., Douard, E., Moreau, C., Van Dijk, A., Passeggeri, M., Kooy, F., Puechberty, J., Campbell, C., Sanlaville, D., Lefroy, H., Richetin, S., Pain, A., Geneviève, D., Kini, U., Le Caignec, C., Lespinasse, J., Skytte, A.-B., Isidor, B., Zweier, C., Caberg, J.-H., Delrue, M.-A., Møller, R.S., Bojesen, A., Hjalgrim, H., Brasch-Andersen, C., Lemyre, E., Ousager, L.B., Jacquemont, S., 2019. Estimating the effect size of the 15Q11.2 BP1–BP2 deletion and its contribution to neurodevelopmental symptoms: recommendations for practice. *Journal of Medical Genetics*. 56, 701–710.
- Just, M.A., Cherkassky, V.L., Keller, T.A., Kana, R.K., Minshew, N.J., 2007. Functional and Anatomical Cortical Underconnectivity in Autism: Evidence from an fMRI Study of an Executive Function Task and Corpus Callosum Morphometry. *Cerebral Cortex*. 17, 951–961.
- Kamien, B., Lionel, A.C., Bain, N., Scherer, S.W., Hunter, M., 2014. Outfoxed by *RBFOX1*-A caution about ascertainment bias. *American Journal of Medical Genetics*. 164, 1411–1418.
- Kaufmann, W.E., Kidd, S.A., Andrews, H.F., Budimirovic, D.B., Esler, A., Haas-Givler, B., Stackhouse, T., Riley, C., Peacock, G., Sherman, S.L., Brown, W.T., Berry-Kravis, E., 2017. Autism Spectrum Disorder in Fragile X Syndrome: Cooccurring Conditions and Current Treatment. *Pediatrics*. 139, S194–S206.
- Kaufmann, W.E., Tierney, E., Rohde, C.A., Suarez-Pedraza, M.C., Clarke, M.A., Salorio, C.F., Bibat, G., Bukelis, I., Naram, D., Lanham, D.C., Naidu, S., 2012. Social impairments in Rett syndrome: characteristics and relationship with clinical severity. *Journal of Intellectual Disability Research*. 56, 233–247.
- Kawano, S., Baba, M., Fukushima, H., Miura, D., Hashimoto, H., Nakazawa, T., 2022. Autism-associated *ANK2* regulates embryonic neurodevelopment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 605, 45–50.
- Kim, H.-Y., 2017. Statistical notes for clinical researchers: Chi-squared test and Fisher’s exact test. *Restorative Dentistry and Endodontics*. 42, 152–155.
- Kim, S.-Y., Choi, U.-S., Park, S.-Y., Oh, S.-H., Yoon, H.-W., Koh, Y.-J., Im, W.-Y., Park, J.-I., Song, D.-H., Cheon, K.-A., Lee, C.-U., 2015. Abnormal Activation of the Social Brain Network in Children with Autism Spectrum Disorder: An fMRI Study. *Psychiatry Investigation*. 12, 37.

- Koolen, D.A., Pfundt, R., De Leeuw, N., Hehir-Kwa, J.Y., Nillesen, W.M., Neefs, I., Scheltinga, I., Sistermans, E., Smeets, D., Brunner, H.G., Van Kessel, A.G., Veltman, J.A., De Vries, B.B.A., 2009. Genomic microarrays in mental retardation: A practical workflow for diagnostic applications. *Human Mutation*. 30, 283–292.
- Kucińska, A., Hawuła, W., Rutkowska, L., Wysocka, U., Kępczyński, Ł., Piotrowicz, M., Chilarska, T., Wieczorek-Cichecka, N., Połatyńska, K., Przysło, Ł., Gach, A., 2024. The Use of CGH Arrays for Identifying Copy Number Variations in Children with Autism Spectrum Disorder. *Brain Sciences*. 14, 273.
- Lahnakoski, J.M., Glerean, E., Salmi, J., Jääskeläinen, I.P., Sams, M., Hari, R., Nummenmaa, L., 2012. Naturalistic fMRI Mapping Reveals Superior Temporal Sulcus as the Hub for the Distributed Brain Network for Social Perception. *Frontiers in Human Neuroscience*. 6.
- Lai, M.-C., Lombardo, M.V., Baron-Cohen, S., 2014. *Lancet*. 383, 896–910.
- Lal, D., Trucks, H., Møller, R.S., Hjalgrim, H., Koeleman, B.P.C., De Kovel, C.G.F., Visscher, F., Weber, Y.G., Lerche, H., Becker, F., Schankin, C.J., Neubauer, B.A., Surges, R., Kunz, W.S., Zimprich, F., Franke, A., Illig, T., Ried, J.S., Leu, C., Nürnberg, P., Sander, T., 2013. Rare exonic deletions of the *RBFOX1* gene increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia*. 54, 265–271.
- Lange, S., Rehm, J., Anagnostou, E., Popova, S., 2017. Prevalence of Externalizing Disorders and Autism Spectrum Disorder among Children with Fetal Alcohol Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-analysis. *Biochemistry and Cell Biology*. 1–41.
- Leblond, C.S., Heinrich, J., Delorme, R., Proepper, C., Betancur, C., Huguet, G., Konyukh, M., Chaste, P., Ey, E., Rastam, M., Anckarsäter, H., Nygren, G., Gillberg, I.C., Melke, J., Toro, R., Regnault, B., Fauchereau, F., Mercati, O., Lemièrre, N., Skuse, D., Poot, M., Holt, R., Monaco, A.P., Järvelä, I., Kantojärvi, K., Vanhala, R., Curran, S., Collier, D.A., Bolton, P., Chiocchetti, A., Klauck, S.M., Poustka, F., Freitag, C.M., Waltes, R., Kopp, M., Duketis, E., Bacchelli, E., Minopoli, F., Ruta, L., Battaglia, A., Mazzone, L., Maestrini, E., Sequeira, A.F., Oliveira, B., Vicente, A., Oliveira, G., Pinto, D., Scherer, S.W., Zelenika, D., Delepine, M., Lathrop, M., Bonneau, D., Guinchat, V., Devillard, F., Assouline, B., Mouren, M.-C., Leboyer, M., Gillberg, C., Boeckers, T.M., Bourgeron, T., 2012. Genetic and Functional Analyses of *SHANK2* Mutations Suggest a Multiple Hit Model of Autism Spectrum Disorders. *PLoS Genetics*. 8, 1–17.
- Leblond, C.S., Le, T.-L., Malesys, S., Cliquet, F., Tabet, A.-C., Delorme, R., Rolland, T., Bourgeron, T., 2021. Operative list of genes associated with autism and neurodevelopmental disorders based on database review. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 113, 1–11.
- Lee, E., Cho, J., Kim, K.Y., 2019. The Association between Autism Spectrum Disorder and Pre- and Postnatal Antibiotic Exposure in Childhood—A Systematic Review with Meta-Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 16, 1–10.
- Lee, L.-C., Zachary, A.A., Leffell, M.S., Newschaffer, C.J., Matteson, K.J., Tyler, J.D., Zimmerman, A.W., 2006. HLA-DR4 in Families With Autism. *Pediatric Neurology*. 35, 303–307.
- Levy, T., Foss-Feig, J.H., Betancur, C., Siper, P.M., Trelles-Thorne, M.D.P., Halpern, D., Frank, Y., Lozano, R., Layton, C., Britvan, B., Bernstein, J.A., Buxbaum, J.D., Berry-Kravis, E., Powell, C.M., Srivastava, S., Sahin, M., Soorya, L., Thurm, A., Kolevzon, A., the Developmental Synaptopathies Consortium, 2022. Strong evidence for genotype–phenotype correlations in Phelan-McDermid syndrome: results from the developmental synaptopathies consortium. *Human Molecular Genetics*. 31, 625–637.

- Li, M., Glass, J., Du, X., Dubbs, H., Harr, M.H., Falk, M., Smolarek, T., Hopkin, R.J., Zackai, E., Sheppard, S.E., 2021. Trisomy 9 mosaic syndrome: Sixteen additional patients with new and/or less commonly reported features, literature review, and suggested clinical guidelines. *American Journal of Medical Genetics*. 185, 2374–2383.
- Liao, H., Gau, S.S., Tsai, W., Fang, J., Su, Y., Chou, M., Liu, S., Chou, W., Wu, Y., Chen, C., 2013. Chromosomal Abnormalities in Patients With Autism Spectrum Disorders From Taiwan. *American Journal of Medical Genetics*. 162, 734–741.
- Lin, H.-C., Cheng, C.-M., Huang, K.-L., Hsu, J.-W., Bai, Y.-M., Tsai, S.-J., Chen, T.-J., Chen, M.-H., 2022. Developmental and mental health risks among siblings of patients with autism spectrum disorder: a nationwide study. *European Child & Adolescent Psychiatry*. 31, 1361–1366.
- Liu, X., Sun, X., Sun, C., Zou, M., Chen, Y., Huang, J., Wu, L., Chen, W.-X., 2022. Prevalence of epilepsy in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Autism*. 26, 33–50.
- Loomes, R., Hull, L., Mandy, W.P.L., 2017. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 56, 466–474.
- Lovrečić, L., Rajar, P., Volk, M., Bertok, S., Gnidovec Stražisar, B., Osredkar, D., Jekovec Vrhovšek, M., Peterlin, B., 2018. Diagnostic efficacy and new variants in isolated and complex autism spectrum disorder using molecular karyotyping. *Journal of Applied Genetics*. 59, 179–185.
- Lowther, C., Costain, G., Stavropoulos, D.J., Melvin, R., Silversides, C.K., Andrade, D.M., So, J., Faghfoury, H., Lionel, A.C., Marshall, C.R., Scherer, S.W., Bassett, A.S., 2015. Delineating the 15q13.3 microdeletion phenotype: a case series and comprehensive review of the literature. *Genetics in Medicine*. 17, 149–157.
- Lubbers, K., Stijl, E.M., Dierckx, B., Hagenaar, D.A., Ten Hoopen, L.W., Legerstee, J.S., De Nijs, P.F.A., Rietman, A.B., Greaves-Lord, K., Hillegers, M.H.J., Dieleman, G.C., Mous, S.E., ENCORE Expertise Center, 2022. Autism Symptoms in Children and Young Adults With Fragile X Syndrome, Angelman Syndrome, Tuberous Sclerosis Complex, and Neurofibromatosis Type 1: A Cross-Syndrome Comparison. *Frontiers in Psychiatry*. 13, 852208.
- Lukmanji, S., Manji, S.A., Kadhim, S., Sauro, K.M., Wirrell, E.C., Kwon, C.-S., Jetté, N., 2019. The co-occurrence of epilepsy and autism: A systematic review. *Epilepsy & Behavior* 98. 238–248.
- Malhotra, D., Sebat, J., 2012. CNVs: Harbingers of a Rare Variant Revolution in Psychiatric Genetics. *Cell*. 148, 1223–1241.
- Marini, C., Porro, A., Rastetter, A., Dalle, C., Rivolta, I., Bauer, D., Oegema, R., Nava, C., Parrini, E., Mei, D., Mercer, C., Dhamija, R., Chambers, C., Coubes, C., Thévenon, J., Kuentz, P., Julia, S., Pasquier, L., Dubourg, C., Carré, W., Rosati, A., Melani, F., Pisano, T., Giardino, M., Innes, A.M., Alembik, Y., Scheidecker, S., Santos, M., Figueiroa, S., Garrido, C., Fusco, C., Frattini, D., Spagnoli, C., Binda, A., Granata, T., Ragona, F., Freri, E., Franceschetti, S., Canafoglia, L., Castellotti, B., Gellera, C., Milanesi, R., Mancardi, M.M., Clark, D.R., Kok, F., Helbig, K.L., Ichikawa, S., Sadler, L., Neupauerová, J., Laššuthová, P., Štěrbová, K., Laridon, A., Brilstra, E., Koeleman, B., Lemke, J.R., Zara, F., Striano, P., Soblet, J., Smits, G., Deconinck, N., Barbuti, A., DiFrancesco, D., LeGuern, E., Guerrini, R., Santoro, B., Hamacher, K., Thiel, G., Moroni, A., DiFrancesco, J.C., Depienne, C., 2018. *HCNI* mutation spectrum: from neonatal epileptic encephalopathy to benign generalized epilepsy and beyond. *Brain*. 141, 3160–3178.

- Maroon, M., Haddad, F., Doornaert, E., Allman, B., Schmid, S., 2024. Investigating gene-environment interaction on attention in a double-hit model for Autism Spectrum Disorder. *PLoS ONE*. 19, 1–17.
- Maya, I., Basel-Salmon, L., Singer, A., Sagi-Dain, L., 2020a. High-frequency low-penetrance copy-number variant classification: should we revise the existing guidelines? *Genetics in Medicine*. 22, 1276–1277.
- Maya, I., Perlman, S., Shohat, M., Kahana, S., Yacobson, S., Tenne, T., Agmon-Fishman, I., Tomashov Matar, R., Basel-Salmon, L., Sukenik-Halevy, R., 2020b. Should We Report 15q11.2 BP1-BP2 Deletions and Duplications in the Prenatal Setting? *Journal of Clinical Medicine*. 9, 1–12.
- McDonald, T.A.M., 2021. The broader autism phenotype constellations–disability matrix paradigm: Theoretical model for autism and the broader autism phenotype. *Medical Hypotheses*. 146, 1–8.
- McDonald-McGinn, D.M., Larossa, D., Goldmuntz, E., Sullivan, K., Eicher, P., Gerdes, M., Moss, E., Wang, P., 1999. The variable expression of the chromosome 22q11.2 deletion: Findings in 216 patients. *Genetic Counseling*. 10, 96–97.
- McEwan, F., Glazier, J.D., Hager, R., 2023. The impact of maternal immune activation on embryonic brain development. *Frontiers in Neuroscience*. 17, 1–16.
- Mehra, C., Sil, A., Hedderly, T., Kyriakopoulos, M., Lim, M., Turnbull, J., Happe, F., Baird, G., Absoud, M., 2019. Childhood disintegrative disorder and autism spectrum disorder: a systematic review. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 61, 523–534.
- Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10, 2024a. F84.1 – Atypický autismus. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [Webová stránka].
- Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10, 2024b. F84.5 – Aspergerův syndrom. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [Webová stránka].
- Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10, 2024c. F84.2 – Rettův syndrom. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [Webová stránka].
- Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10, 2024d. F84.3 – Jiná dětská dezintegrační porucha. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [Webová stránka].
- Mezinárodní klasifikace nemocí MKN-10, 2023. MKN-10 klasifikace. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. [Webová stránka].
- Miles, J. h., Takahashi, T. n., Bagby, S., Sahota, P. k., Vaslow, D. f., Wang, C. h., Hillman, R. e., Farmer, J. e., 2005. Essential versus complex autism: Definition of fundamental prognostic subtypes. *American Journal of Medical Genetics Part A* 135A, 171–180.
- Minařík, B., 2000. Statistika I.: popisná statistika. 1. část, Vyd. 1. ed. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno.
- Monthé-Drèze, C., Rifas-Shiman, S.L., Gold, D.R., Oken, E., Sen, S., 2019. Maternal obesity and offspring cognition: the role of inflammation. *Pediatric Research*. 85, 799–806.
- Moraes, C.L.D., Bérigamo, N.A., Melo, N.C.E., Curado, R.M.D.O.F., Amaral, W.N.D., 2019. Complete trisomy of chromosome 9: karyotyping and morphological alterations in newborn. *Human Reproduction Archives*. 34, 1–5.
- Moss, J., Howlin, P., Magiati, I., Oliver, C., 2012. Characteristics of autism spectrum disorder in Cornelia de Lange syndrome. *Child Psychology Psychiatry*. 53, 883–891.
- Mostafa, G.A., Shehab, A.A., 2010. The link of C4B null allele to autism and to a family history of autoimmunity in Egyptian autistic children. *Journal of Neuroimmunology*. 223, 115–119.
- Mullegama, S., Alaimo, J., Chen, L., Elsea, S., 2015. Phenotypic and Molecular Convergence of 2q23.1 Deletion Syndrome with Other Neurodevelopmental Syndromes Associated with Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 7627–7643.

- Národní zdravotnický informační portál ČR, 2024. Autismus. NZIP.cz. [Webová stránka].
- National Center for Biotechnology Information, 2025. Methyl-CpG binding domain protein 5,*MBP5*; [Homo sapiens (human)]. NCBI Gene. [Webová databáze].
- Neves, P.A.R., Gatica-Domínguez, G., Santos, I.S., Bertoldi, A.D., Domingues, M., Murray, J., Silveira, M.F., 2020. Poor maternal nutritional status before and during pregnancy is associated with suspected child developmental delay in 2-year old Brazilian children. *Scientific Reports*. 10, 1–11.
- Oberman, L.M., Boccuto, L., Cascio, L., Sarasua, S., Kaufmann, W.E., 2015. Autism spectrum disorder in Phelan-McDermid syndrome: initial characterization and genotype-phenotype correlations. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 10, 1–9.
- Oikonomakis, V., Kosma, K., Mitrakos, A., Sofocleous, C., Pervanidou, P., Syrmou, A., Pampanos, A., Psoni, S., Fryssira, H., Kanavakis, E., Kitsiou-Tzeli, S., Tzetis, M., 2016. Recurrent copy number variations as risk factors for autism spectrum disorders: analysis of the clinical implications. *Clinical Genetics*. 89, 708–718.
- O’Leary, A., Fernández-Castillo, N., Gan, G., Yang, Y., Yotova, A.Y., Kranz, T.M., Grünewald, L., Freudenberg, F., Antón-Galindo, E., Cabana-Domínguez, J., Harneit, A., Schweiger, J.I., Schwarz, K., Ma, R., Chen, J., Schwarz, E., Rietschel, M., Tost, H., Meyer-Lindenberg, A., Pané-Farré, C.A., Kircher, T., Hamm, A.O., Burguera, D., Mota, N.R., Franke, B., Schweiger, S., Winter, J., Heinz, A., Erk, S., Romanczuk-Seiferth, N., Walter, H., Ströhle, A., Fehm, L., Fydrich, T., Lueken, U., Weber, H., Lang, T., Gerlach, A.L., Nöthen, M.M., Alpers, G.W., Arolt, V., Witt, S., Richter, J., Straube, B., Cormand, B., Slaterry, D.A., Reif, A., 2022. Behavioural and functional evidence revealing the role of *RBFOX1* variation in multiple psychiatric disorders and traits. *Molecular Psychiatry*. 27, 4464–4473.
- Osório, A., Sampaio, A., Regueiro, R.M., Heinze, E.G., Carracedo, Á., Prieto, M.F., 2015. Autism spectrum symptoms in Smith–Magenis syndrome and Williams syndrome: comparisons and contrasts. *International Journal of Developmental Disabilities*. 61, 49–55.
- Parletta, N., Niyonsenga, T., Duff, J., 2016. Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid Levels and Correlations with Symptoms in Children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Autistic Spectrum Disorder and Typically Developing Controls. *PLoS ONE*. 11, 1–11.
- Parner, E.T., Baron-Cohen, S., Lauritsen, M.B., Jørgensen, M., Schieve, L.A., Yeargin-Allsopp, M., Obel, C., 2012. Parental Age and Autism Spectrum Disorders. *Annals of Epidemiology*. 22, 143–150.
- Peters, S. U., Hundley, R.J., Wilson, A.K., Carvalho, C.M.B., Lupski, J.R., Ramocki, M.B., 2013. Brief Report: Regression Timing and Associated Features in *MECP2* Duplication Syndrome. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 43, 2484–2490.
- Peters, Sarika U., Hundley, R.J., Wilson, A.K., Warren, Z., Vehorn, A., Carvalho, C.M.B., Lupski, J.R., Ramocki, M.B., 2013. The Behavioral Phenotype in *MECP2* Duplication Syndrome: A Comparison With Idiopathic Autism. *Autism Research*. 6, 42–50.
- Petrìti, U., Dudman, D.C., Scosyrev, E., Lopez-Leon, S., 2023. Global prevalence of Rett syndrome: systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews*. 12, 1–9.
- Pinto, D., Pagnamenta, A.T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T.R., Correia, C., Abrahams, B.S., Almeida, J., Bacchelli, E., Bader, G.D., Bailey, A.J., Baird, G., Battaglia, A., Berney, T., Bolshakova, N., Bölte, S., Bolton, P.F., Bourgeron, T., Brennan, S., Brian, J., Bryson, S.E., Carson, A.R., Casallo, G., Casey, J., Chung, B.H.Y., Cochrane, L., Corsello, C., Crawford, E.L., Crossett, A., Cytrynbaum, C., Dawson, G., De Jonge, M., Delorme, R., Drmic, I., Duketis, E., Duque, F., Estes, A., Farrar, P., Fernandez, B.A., Folstein, S.E., Fombonne, E., Freitag, C.M., Gilbert, J.,

- Gillberg, C., Glessner, J.T., Goldberg, J., Green, A., Green, J., Guter, S.J., Hakonarson, H., Heron, E.A., Hill, M., Holt, R., Howe, J.L., Hughes, G., Hus, V., Igliozi, R., Kim, C., Klauck, S.M., Kolevzon, A., Korvatska, O., Kustanovich, V., Lajonchere, C.M., Lamb, J.A., Laskawiec, M., Leboyer, M., Le Couteur, A., Leventhal, B.L., Lionel, A.C., Liu, X.-Q., Lord, C., Lotspeich, L., Lund, S.C., Maestrini, E., Mahoney, W., Mantoulan, C., Marshall, C.R., McConachie, H., McDougle, C.J., McGrath, J., McMahon, W.M., Merikangas, A., Migita, O., Minshew, N.J., Mirza, G.K., Munson, J., Nelson, S.F., Noakes, C., Noor, A., Nygren, G., Oliveira, G., Papanikolaou, K., Parr, J.R., Parrini, B., Paton, T., Pickles, A., Pilorge, M., Piven, J., Ponting, C.P., Posey, D.J., Poustka, A., Poustka, F., Prasad, A., Ragoussis, J., Renshaw, K., Rickaby, J., Roberts, W., Roeder, K., Roge, B., Rutter, M.L., Bierut, L.J., Rice, J.P., Salt, J., Sansom, K., Sato, D., Segurado, R., Sequeira, A.F., Senman, L., Shah, N., Sheffield, V.C., Soorya, L., Sousa, I., Stein, O., Sykes, N., Stoppioni, V., Strawbridge, C., Tancredi, R., Tansey, K., Thiruvahindrapduram, B., Thompson, A.P., Thomson, S., Tryfon, A., Tsiantis, J., Van Engeland, H., Vincent, J.B., Volkmar, F., Wallace, S., Wang, K., Wang, Z., Wassink, T.H., Webber, C., Weksberg, R., Wing, K., Wittmeyer, K., Wood, S., Wu, J., Yaspan, B.L., Zurawiecki, D., Zwaigenbaum, L., Buxbaum, J.D., Cantor, R.M., Cook, E.H., Coon, H., Cuccaro, M.L., Devlin, B., Ennis, S., Gallagher, L., Geschwind, D.H., Gill, M., Haines, J.L., Hallmayer, J., Miller, J., Monaco, A.P., Nurnberger Jr, J.I., Paterson, A.D., Pericak-Vance, M.A., Schellenberg, G.D., Szatmari, P., Vicente, A.M., Vieland, V.J., Wijsman, E.M., Scherer, S.W., Sutcliffe, J.S., Betancur, C., 2010. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 466, 368–372.
- Polderman, T.J.C., Hoekstra, R.A., Posthuma, D., Larsson, H., 2014. The co-occurrence of autistic and ADHD dimensions in adults: an etiological study in 17 770 twins. *Translational Psychiatry*. 4, 1–7.
- Postorino, V., Fatta, L.M., Sanges, V., Giovagnoli, G., De Peppo, L., Vicari, S., Mazzone, L., 2016. Intellectual disability in Autism Spectrum Disorder: Investigation of prevalence in an Italian sample of children and adolescents. *Research in Developmental Disabilities*. 48, 193–201.
- Reddy, K.S., 2005. Cytogenetic abnormalities and fragile-x syndrome in Autism Spectrum Disorder. *BMC Medical Genetics*. 6, 1–16.
- Riccioni, A., Siracusano, M., Arturi, L., Scoppola, C., Ferrara, M., Frattale, I., Galasso, C., Gialloreti, L.E., Mazzone, L., 2024. Short report: Autistic symptoms in Sotos syndrome, preliminary results from a case-control study. *Research in Developmental Disabilities*. 145, 1–6.
- Rogdaki, M., Gudbrandsen, M., McCutcheon, R.A., Blackmore, C.E., Brugger, S., Ecker, C., Craig, M.C., Daly, E., Murphy, D.G.M., Howes, O., 2020. Magnitude and heterogeneity of brain structural abnormalities in 22q11.2 deletion syndrome: a meta-analysis. *Molecular Psychiatry*. 25, 1704–1717.
- Rosenberg, R.E., Law, J.K., Yenokyan, G., McGready, J., Kaufmann, W.E., Law, P.A., 2009. Characteristics and Concordance of Autism Spectrum Disorders Among 277 Twin Pairs. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 163, 907–914.
- Roshtkhari, M.J., Setarehdan, S.K., 2008. A novel algorithm for straightening highly curved images of human chromosome. *Pattern Recognition Letters*. 29, 1208–1217.
- Rydzewska, E., Hughes-McCormack, L.A., Gillberg, C., Henderson, A., MacIntyre, C., Rintoul, J., Cooper, S.-A., 2018. Prevalence of long-term health conditions in adults with autism: observational study of a whole country population. *BMJ Open*. 8, 1–11.
- Salari, N., Rasoulpoor, Shabnam, Rasoulpoor, Shna, Shohaimi, S., Jafarpour, S., Abdoli, N., Khaledi-Paveh, B., Mohammadi, M., 2022. The global prevalence of autism spectrum

- disorder: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Italian Journal of Pediatrics*. 48, 1–16.
- Sanchez, O., Escobar, J., Yunis, J., 1973. A simple G-banding technique. *Lancet*. 302, 1–269.
- Sanders, S.J., Ercan-Sencicek, A.G., Hus, V., Luo, R., Murtha, M.T., Moreno-De-Luca, D., Chu, S.H., Moreau, M.P., Gupta, A.R., Thomson, S.A., Mason, C.E., Bilguvar, K., Celestino-Soper, P.B.S., Choi, M., Crawford, E.L., Davis, L., Davis Wright, N.R., Dhodapkar, R.M., DiCola, M., DiLullo, N.M., Fernandez, T.V., Fielding-Singh, V., Fishman, D.O., Frahm, S., Garagaloyan, R., Goh, G.S., Kammela, S., Klei, L., Lowe, J.K., Lund, S.C., McGrew, A.D., Meyer, K.A., Moffat, W.J., Murdoch, J.D., O’Roak, B.J., Ober, G.T., Pottenger, R.S., Raubeson, M.J., Song, Y., Wang, Q., Yaspan, B.L., Yu, T.W., Yurkiewicz, I.R., Beaudet, A.L., Cantor, R.M., Curland, M., Grice, D.E., Günel, M., Lifton, R.P., Mane, S.M., Martin, D.M., Shaw, C.A., Sheldon, M., Tischfield, J.A., Walsh, C.A., Morrow, E.M., Ledbetter, D.H., Fombonne, E., Lord, C., Martin, C.L., Brooks, A.I., Sutcliffe, J.S., Cook, E.H., Geschwind, D., Roeder, K., Devlin, B., State, M.W., 2011. Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron*. 70, 863–885.
- Scott, S.A., Cohen, N., Brandt, T., Toruner, G., Desnick, R.J., Edelman, L., 2010. Detection of low-level mosaicism and placental mosaicism by oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Genetics in Medicine*. 12, 85–92.
- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamrom, B., Yoon, S., Krasnitz, A., Kendall, J., Leotta, A., Pai, D., Zhang, R., Lee, Y.-H., Hicks, J., Spence, S.J., Lee, A.T., Puura, K., Lehtimäki, T., Ledbetter, D., Gregersen, P.K., Bregman, J., Sutcliffe, J.S., Jobanputra, V., Chung, W., Warburton, D., King, M.-C., Skuse, D., Geschwind, D.H., Gilliam, T.C., Ye, K., Wigler, M., 2007. Strong Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism. *Science*. 316, 445–449.
- Sharon, G., Cruz, N.J., Kang, D.-W., Gandal, M.J., Wang, B., Kim, Y.-M., Zink, E.M., Casey, C.P., Taylor, B.C., Lane, C.J., Bramer, L.M., Isern, N.G., Hoyt, D.W., Noecker, C., Sweredoski, M.J., Moradian, A., Borenstein, E., Jansson, J.K., Knight, R., Metz, T.O., Lois, C., Geschwind, D.H., Krajmalnik-Brown, R., Mazmanian, S.K., 2019. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. *Cell*. 177, 1600–1618.
- Shelton, J.F., Geraghty, E.M., Tancredi, D.J., Delwiche, L.D., Schmidt, R.J., Ritz, B., Hansen, R.L., Hertz-Picciotto, I., 2014. Neurodevelopmental Disorders and Prenatal Residential Proximity to Agricultural Pesticides: The CHARGE Study. *Environmental Health Perspectives*. 122, 1103–1109.
- Shen, J., Wu, W., Gao, C., Ochinnikov, H., Qu, D., Xie, J., Gao, L., Zhou, Y., Cui, Y., Liu, J., 2016. Chromosomal copy number analysis on chorionic villus samples from early spontaneous miscarriages by high throughput genetic technology. *Molecular Cytogenetics*. 9, 1–7.
- Shinawi, M., Liu, P., Kang, S.H.L., Shen, J., Belmont, J.W., Scott, D.A., Probst, F.J., Craigen, W.J., Graham, B.H., Pursley, A., Clark, G., Lee, J., Proud, M., Stocco, A., Rodriguez, D.L., Kozel, B.A., Sparagana, S., Roeder, E.R., McGrew, S.G., Kurczynski, T.W., Allison, L.J., Amato, S., Savage, S., Patel, A., Stankiewicz, P., Beaudet, A.L., Cheung, S.W., Lupski, J.R., 2010. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *Journal of Medical Genetics*. 47, 332–341.
- Shishido, E., Aleksic, B., Ozaki, N., 2014. Copy-number variation in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 68, 85–95.

- Silva, M., De Leeuw, N., Mann, K., Schuring-Blom, H., Morgan, S., Giardino, D., Rack, K., Hastings, R., 2019. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *European Journal of Human Genetics*. 27, 1–16.
- Slepičková, L., Pančocha, K., Vaďurová, H., 2019. Časný záchyt poruch autistického spektra v ordinacích PLDD. [Webová stránka].
- Smoller, J.W., Kendler, K., Craddock, N., 2013. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *The Lancet*. 381, 1371–1379.
- Spinazzi, N.A., Santoro, J.D., Pawlowski, K., Anzueto, G., Howe, Y.J., Patel, L.R., Baumer, N.T., 2023. Co-occurring conditions in children with Down syndrome and autism: a retrospective study. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 15, 1–8.
- Spratt, P.W.E., Ben-Shalom, R., Keeshen, C.M., Burke, K.J., Clarkson, R.L., Sanders, S.J., Bender, K.J., 2019. The Autism-Associated Gene *SCN2A* Contributes to Dendritic Excitability and Synaptic Function in the Prefrontal Cortex. *Neuron*. 103, 673–685.
- Stahlberg, O., Soderstrom, H., Rastam, M., Gillberg, C., 2004. Bipolar disorder, schizophrenia, and other psychotic disorders in adults with childhood onset AD/HD and/or autism spectrum disorders. *Journal of Neural Transmission*. 111, 891–902.
- Stevens, T., Peng, L., Barnard-Brak, L., 2016. The comorbidity of ADHD in children diagnosed with autism spectrum disorder. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 31, 11–18.
- Strömmland, K., Nordin, V., Miller, M., Akerström, B., Gillberg, C., 1994. Autism In Thalidomide Embryopathy: A Population Study. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 36, 351–356.
- Taylor, L.E., Swerdfeger, A.L., Eslick, G.D., 2014. Vaccines are not associated with autism: An evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine*. 32, 3623–3629.
- Thompson, L., Gillberg, C., Landberg, S., Kantzer, A.-K., Miniscalco, C., Barnevik Olsson, M., Eriksson, M.A., Fernell, E., 2019. Autism With and Without Regression: A Two-Year Prospective Longitudinal Study in Two Population-Derived Swedish Cohorts. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 49, 2281–2290.
- Thorová, K., 2016. Poruchy autistického spektra: Rozšířené a přepracované vydání, Rozšířené a přepracované vydání. ed. Portál, Praha.
- Thorová, K., 2006. Poruchy autistického spektra: Rozšířené a přepracované vydání. Portál, Praha.
- Thorpe, J., Osei-Owusu, I.A., Avigdor, B.E., Tupler, R., Pevsner, J., 2020. Mosaicism in Human Health and Disease. *Annual Review of Genetics*. 54, 487–510.
- Thurm, A., Tierney, E., Farmer, C., Albert, P., Joseph, L., Swedo, S., Bianconi, S., Bukelis, I., Wheeler, C., Sarphare, G., Lanham, D., Wassif, C.A., Porter, F.D., 2016. Development, behavior, and biomarker characterization of Smith-Lemli-Opitz syndrome: an update. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 8, 1–10.
- Tick, B., Bolton, P., Happé, F., Rutter, M., Rijdsdijk, F., 2016. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 57, 585–595.
- Tomova, A., Husarova, V., Lakatosova, S., Bakos, J., Vlkova, B., Babinska, K., Ostatnikova, D., 2015. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiology & Behavior*. 138, 179–187.
- Torres, A.R., Sweeten, T.L., Cutler, A., Bedke, B.J., Fillmore, M., Stubbs, E.G., Odell, D., 2006. The Association and Linkage of the HLA-A2 Class I Allele with Autism. *Human Immunology*. 67, 346–351.

- Trifonova, E.A., Klimenko, A.I., Mustafin, Z.S., Lashin, S.A., Kochetov, A.V., 2019. The mTOR Signaling Pathway Activity and Vitamin D Availability Control the Expression of Most Autism Predisposition Genes. *IJMS* 20, 1–14.
- Trost, B., Thiruvahindrapuram, B., Chan, A.J.S., Engchuan, W., Higginbotham, E.J., Howe, J.L., Loureiro, L.O., Reuter, M.S., Roshandel, D., Whitney, J., Zarrei, M., Bookman, M., Somerville, C., Shaath, R., Abdi, M., Aliyev, E., Patel, R.V., Nalpathamkalam, T., Pellecchia, G., Hamdan, O., Kaur, G., Wang, Z., MacDonald, J.R., Wei, J., Sung, W.W.L., Lamoureux, S., Hoang, N., Selvanayagam, T., Deflaux, N., Geng, M., Ghaffari, S., Bates, J., Young, E.J., Ding, Q., Shum, C., D'Abate, L., Bradley, C.A., Rutherford, A., Aguda, V., Apresto, B., Chen, N., Desai, S., Du, X., Fong, M.L.Y., Pullenayegum, S., Samler, K., Wang, T., Ho, K., Paton, T., Pereira, S.L., Herbrick, J.-A., Wintle, R.F., Fuerth, J., Noppornpitak, J., Ward, H., Magee, P., Al Baz, A., Kajendirarajah, U., Kapadia, S., Vlasblom, J., Valluri, M., Green, J., Seifer, V., Quirbach, M., Rennie, O., Kelley, E., Masjedi, N., Lord, C., Szego, M.J., Zawati, M.H., Lang, M., Strug, L.J., Marshall, C.R., Costain, G., Calli, K., Iaboni, A., Yusuf, A., Ambrozewicz, P., Gallagher, L., Amaral, D.G., Brian, J., Elsabbagh, M., Georgiades, S., Messinger, D.S., Ozonoff, S., Sebat, J., Sjaarda, C., Smith, I.M., Szatmari, P., Zwaigenbaum, L., Kushki, A., Frazier, T.W., Vorstman, J.A.S., Fakhro, K.A., Fernandez, B.A., Lewis, M.E.S., Weksberg, R., Fiume, M., Yuen, R.K.C., Anagnostou, E., Sondheimer, N., Glazer, D., Hartley, D.M., Scherer, S.W., 2022. Genomic architecture of autism from comprehensive whole-genome sequence annotation. *Cell*. 185, 4409–4427.
- Tseng, P.-T., Chen, Y.-W., Stubbs, B., Carvalho, A.F., Whiteley, P., Tang, C.-H., Yang, Wei-Cheng, Chen, T.-Y., Li, D.-J., Chu, C.-S., Yang, Wei-Chieh, Liang, H.-Y., Wu, C.-K., Yen, C.-F., Lin, P.-Y., 2019. Maternal breastfeeding and autism spectrum disorder in children: A systematic review and meta-analysis. *Nutritional Neuroscience*. 22, 354–362.
- Uchino, S., Waga, C., 2013. *SHANK3* as an autism spectrum disorder-associated gene. *Brain and Development*. 35, 106–110.
- Vaccaro, T.D.S., Sorrentino, J.M., Salvador, S., Veit, T., Souza, D.O., De Almeida, R.F., 2018. Alterations in the MicroRNA of the Blood of Autism Spectrum Disorder Patients: Effects on Epigenetic Regulation and Potential Biomarkers. *Behavioral Sciences*. 8, 1–15.
- Vallespín, E., Palomares Bralo, M., Mori, M.Á., Martín, R., García-Miñaur, S., Fernández, L., de Torres, M.L., García-Santiago, F., Mansilla, E., Santos, F., M-Montañó, V.E., Crespo, M.C., Martín, S., Martínez-Glez, V., Delicado, A., Lapunzina, P., Nevado, J., 2013. Customized high resolution CGH-array for clinical diagnosis reveals additional genomic imbalances in previous well-defined pathological samples. *American Journal of Medical Genetics*. 161, 1950–1960.
- Van 't Hof, M., Tisseur, C., Van Berckeleer-Onnes, I., Van Nieuwenhuyzen, A., Daniels, A.M., Deen, M., Hoek, H.W., Ester, W.A., 2021. Age at autism spectrum disorder diagnosis: A systematic review and meta-analysis from 2012 to 2019. *Autism*. 25, 862–873.
- Varcin, K.J., Alvares, G.A., Uljarević, M., Whitehouse, A.J.O., 2017. Prenatal maternal stress events and phenotypic outcomes in Autism Spectrum Disorder. *Autism Research*. 10, 1866–1877.
- Verheij, E., 2021. Otorhinolaryngologic manifestations of 22q11.2 deletion syndrome: Utrecht University. 1–131.

- Wang, J., Gong, J., Li, L., Chen, Y., Liu, L., Gu, H., Luo, X., Hou, F., Zhang, J., Song, R., 2018. Neurexin gene family variants as risk factors for autism spectrum disorder. *Autism Research*. 11, 37–43.
- Wang, Z., Ding, R., Wang, J., 2020. The Association between Vitamin D Status and Autism Spectrum Disorder (ASD): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 13, 1–14.
- Weiss, L.A., Escayg, A., Kearney, J.A., Trudeau, M., MacDonald, B.T., Mori, M., Reichert, J., Buxbaum, J.D., Meisler, M.H., 2003. Sodium channels SCN1A, SCN2A and SCN3A in familial autism. *Molecular Psychiatry*. 8, 186–194.
- Weissman, J.R., Kelley, R.I., Bauman, M.L., Cohen, B.H., Murray, K.F., Mitchell, R.L., Kern, R.L., Natowicz, M.R., 2008. Mitochondrial Disease in Autism Spectrum Disorder Patients: A Cohort Analysis. *PLoS ONE*. 3, 1–6.
- Woodbury-Smith, M., Paterson, A.D., O'Connor, I., Zarrei, M., Yuen, R.K.C., Howe, J.L., Thompson, A., Parlier, M., Fernandez, B., Piven, J., Scherer, S.W., Vieland, V., Szatmari, P., 2018. A genome-wide linkage study of autism spectrum disorder and the broad autism phenotype in extended pedigrees. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 10, 1–9.
- World Health Organization: ICD-11, 2023. 6A02 Autism spectrum disorder. International Classification of Diseases: ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics. [Webová stránka].
- Xie, S., Karlsson, H., Dalman, C., Widman, L., Rai, D., Gardner, R.M., Magnusson, C., Schendel, D.E., Newschaffer, C.J., Lee, B.K., 2019. Family History of Mental and Neurological Disorders and Risk of Autism. *JAMA Network Open*. 2, 1–11.
- Zhang, S.Q., Fleischer, J., Al-Kateb, H., Mito, Y., Amarillo, I., Shinawi, M., 2020. Intragenic *CNTN4* copy number variants associated with a spectrum of neurobehavioral phenotypes. *European Journal of Medical Genetics*. 63, 1–7.
- Zhang, Y., Lei, Q., Liu, J., Lin, M., Luo, L., Li, T., Wang, Q., Zhou, C., 2020. Selective growth of mosaic cells in chromosomal analysis of chorionic villi by conventional karyotyping. *Molecular and Cellular Probes*. 51, 1–6.