

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Antonín Šípek

Varianty chromozomu 9 u člověka – od normy k patologii

Epidemiologie a význam v klinické genetické praxi

Variants of human chromosome 9 – from norm to pathology

Epidemiology and significance for medical genetics

Dizertační práce

Školitel: MUDr. Aleš Panczak, CSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

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

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

V Praze, 26. června 2019

MUDr. Antonín Šípek

.....

Identifikační záznam:

ŠÍPEK, Antonín. Varianty chromozomu 9 u člověka - od normy k patologii: Epidemiologie a význam v klinické genetické praxi. [Variants of human chromosome 9 – from norm to pathology: Epidemiology and significance for medical genetics]. Praha, 2019. 99 s., 2 příl. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN. Vedoucí práce MUDr. Aleš Panczak, CSc.

Poděkování: *V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli, MUDr. Aleši Panczakovi, CSc. za trpělivé a komplexní vedení v průběhu řešení práce, a stejně tak i konzultantce MUDr. Romaně Mihalové za veškerou pomoc s laboratorní částí projektu a dále i Ing. Nikole Kaspříkové, PhD. za pomoc se statistickou analýzou pro naše společné publikace. Velké poděkování patří pracovníkům laboratoří našeho pracoviště i dalších pracovišť, kde jsem prováděl sběr dat, za maximální pomoc s dohledáváním recentních i historických informací.*

Dále děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy za finanční podporu našeho projektu, především pak jeho molekulárně cytogenetické části (úspěšně řešený projekt č. 565312: Molekulárně cytogenetická charakteristika variant heterochromatinové oblasti lidského chromozomu 9).

Zvláště pak musím poděkovat prof. Thomasi Liehrovi z Ústavu pro humánní genetiku v německé Jeně, za zprostředkování studijního pobytu v jeho laboratoři a jeho nedocenitelné rady v oblasti molekulárně cytogenetické diagnostiky.

Na závěr nesmím opominout poděkovat své manželce Janě a celé své rodině za velkou trpělivost a podporu v průběhu celé doby řešení této práce.

1 Obsah

1	Obsah	5
3	Seznam zkratek	7
4	Souhrn	9
5	Summary	10
6	Úvod	11
6.1	Historické aspekty cytogenetické diagnostiky	11
6.2	Lidský karyotyp a stavba lidských chromozomů	12
6.3	Chromozomové abnormality	15
6.3.1	Numerické chromozomové abnormality	15
6.3.2	Strukturní chromozomové aberace	16
6.3.3	Varianty lidských chromozomů	19
6.4	Varianty chromozomu 9	23
6.5	Pericentrická inverze chromozomu 9 a její klinický význam	26
7	Cíle práce, hypotézy	33
7.1	Epidemiologická část:	33
7.2	Molekulárně-cytogenetická část:	33
7.3	Klinicko-genetická část:	33
8	Metodika	34
8.1	Epidemiologická studie:	34
8.1.1	Databáze vytvořené v rámci ÚBLG 1. LF UK a VFN	36
8.1.2	Databáze vytvořené v rámci OLG TN	38
8.1.3	Databáze vytvořené v rámci Sanatoria Pronatal	39
8.1.4	Metody deskriptivní epidemiologie	39
8.1.5	Odhady populační incidence inv(9)	40
8.2	Molekulárně cytogenetická analýza	41
8.3	Testování asociace variant chromozomu 9 s lidskými patologiemi	44

8.4	Databáze	45
8.5	Statistické zpracování.....	45
9	Výsledky	46
9.1	Četnost variant chromozomu 9 v laboratorních souborech a přehled indikací k cytogenetickému vyšetření	46
9.2	Odhad populační četnosti inv(9)	52
9.3	Vyhodnocení poměru pohlaví v laboratorních a speciálních souborech	52
9.4	Četnost variant chromozomu 9 u osob s reprodukční poruchou.....	56
9.5	Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy vybraných případů variant chromozomu 9	59
9.5.1	Galerie vybraných výsledků molekulárně cytogenetického vyšetření v našem souboru	61
10	Diskuse.....	66
10.1	Epidemiologie variant chromozomu 9	66
10.2	Molekulárně cytogenetická diagnostika	70
10.3	Možné klinické asociace.....	74
10.3.1	Reprodukční porucha.....	75
10.3.2	Vyšší riziko narození potomka s Downovým syndromem.....	78
10.3.3	Další možné asociace.....	78
10.4	Poslání pro současnou praxi	79
11	Závěr	81
12	Literatura.....	84
13	Přílohy.....	99

3 Seznam zkratek

- AMC – Aminocentéza (odběr plodové vody)
- BAC – Bacterial artificial chromosome (umělý bakteriální chromozom)
- BP – Base pairs (páry bází)
- CEP – Centromeric enumeration probe (centromerická sonda)
- CGH – Comparative genomic hybridization (komparativní genomová hybridizace)
- CI – Confidence Interval (konfidenční interval)
- CNV – Copy number variant (varianta počtu kopií)
- DNA – Deoxyribonukleová kyselina
- FISH – Fluorescenční in situ hybridizace
- FK – Fetální krev
- GAUK – Grantová agentura Univerzity Karlovy
- inv(9) – Pericentrická inverze chromozomu 9 (není-li specifikováno jinak – je myšlena variantní forma inv(9)(p12q13))
- ISCN – International System for Human Cytogenetic Nomenclature
- MB – Megabáze
- MD – Morbus Down (Downův syndrom)
- MKN-10 – 10. revize Mezinárodní klasifikace nemocí
- NGS – Next generation sequencing (sekvenování nové generace)
- NRP – Náhradní rodinná péče
- OLG TN – Oddělení lékařské genetiky, Thomayerova nemocnice
- OMIM – Online Mendelian Inheritance in Men
- PMR – Psychomotorická retardace
- RNA – Ribonukleová kyselina

SLG ČLS JEP – Společnost lékařské genetiky a genomiky České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

TN – Thomayerova nemocnice

ÚBLG 1. LF UK a VFN – Ústav biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

VFN – Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

WES – Whole exome sequencing (celoexomové sekvenování)

4 Souhrn

Heterochromatinové varianty lidského chromozomu 9 představují jedny z nejčastějších variant lidského karyotypu. Variabilita zasahuje oblast velkého bloku konstitutivního pericentrického heterochromatinu chromozomu 9, tvořenou různými typy repetitivních DNA sekvencí. Tyto varianty je možné studovat z pohledu populačně epidemiologického, molekulárně cytogenetického i klinicko genetického.

V rámci celého našeho projektu byla provedena epidemiologická studie výskytu pericentrické inverze chromozomu 9 (*inv(9)*) a dalších variant chromozomu 9 na šesti různých souborech laboratorních dat, zahrnujících vyhodnocení více než 26 000 záznamů - naše publikovaná studie je svým rozsahem stále největší na světě. Celkovou četnost *inv(9)* jsme vyčíslili na 1,6 %, celkovou četnost všech heterochromatinových variant chromozomu 9 pak na 3,3-3,9 %. Případy *inv(9)* byly obecně častější u žen, rozdíl pohlaví ale nebyl statisticky významný.

Molekulárně cytogenetická část projektu vycházela z vlastní metodiky využívající kombinaci tří komerčně dostupných FISH sond, ředěných ve specifickém poměru. Kombinace těchto sond umožňuje bližší diagnostiku jednotlivých subvariant chromozomu 9, které není možné rozlišit pomocí G-/C-pruhování v optickém mikroskopu. Touto metodou jsme vyšetřili celkem 49 případů heterochromatinových variant chromozomu 9 a další 3 případy přestavby chromozomu 9 zasahující do heterochromatinové oblasti. Vyšetření se osvědčilo i pro indikace v rámci rutinní laboratorní diagnostiky.

Při vyhodnocení možných klinických dopadů variant chromozomu 9 jsme se soustředili na idiopatickou reprodukční poruchu. Vyhodnotili jsme četnost heterochromatinových variant chromozomů 1, 9, 16 a Y u párů s idiopatickou reprodukční poruchou a tyto četnosti jsme porovnali s četností stejných variant v kontrolní skupině zdravých plodů, prenatálně karyotypovaných kvůli pokročilému věku jejich matek. Prokázali jsme, že heterochromatinové varianty jsou obecně častější právě u osob s reprodukční poruchou. Výsledek byl statisticky významný zejména pro varianty chromozomu 9, a to zejména u žen. Příčiny tohoto opakovaně referovaného fenoménu nejsou známy, klíčem k rozřešení letité otázky by mohlo být propojení podrobnější molekulárně cytogenetické diagnostiky a bližší analýza reprodukčních problémů s přihlédnutím právě k různým typům subvariant chromozomu 9.

Klíčová slova: Chromozom 9, FISH, reprodukční porucha, karyotyp, inv(9)

5 Summary

Heterochromatin variants of human chromosome 9 belong to the most common variabilities of human karyotype. The variability involves the large block of constitutive heterochromatin in the pericentric region of chromosome 9, which is composed of various types of repetitive DNA sequences. Those variants can be studied from population epidemiologic, molecular cytogenetic and clinical genetic point of view.

We have performed a broad epidemiologic study of the incidence of pericentric inversion of chromosome 9 (*inv(9)*) and other variants of chromosome 9 in 6 different laboratory cohorts, which included the evaluation of more than 26.000 of cytogenetic reports, the study we published is currently the largest in the world. We expressed the overall incidence of *inv(9)* to be 1.6% and the total incidence of variants of chromosome 9 to be 3.3-3.9%. *Inv(9)* was more common in females, however the difference was not statistically significant.

Molecular cytogenetic part of the project was based on our own diagnostic approach, which involved the combination of three different commercial FISH probes. Combination of those probes allowed us to differentiate particular subvariants of chromosome 9, which cannot be analyzed only by using G- or C-banding. Using our method, we tested 49 carriers of chromosome 9 heterochromatin variant and 3 other individuals with different rearrangements of chromosome 9 involving the pericentric region. The methodology proved to be useful even for some routine diagnostic cases.

For the analysis of possible clinical association, we targeted mainly the idiopathic reproductive failure. We evaluated the incidence of heterochromatin variants of chromosomes 1, 9, 16 and Y in couples with idiopathic reproductive failure and compared the results to the incidence of the same variants in the control group of healthy fetuses that were karyotyped prenatally only because of the advanced age of their mothers. We have proved that the heterochromatin variants are more common among individuals with idiopathic reproduction failure; the results were significant mainly for the variants of chromosome 9 and especially in females. The explanation for this repeatedly reported phenomenon is not available right now, the key for the solution for this long-standing question may be the fusion of advanced molecular-cytogenetic diagnostics and further analysis of corresponding reproduction impairment – focusing different subvariants of chromosome 9.

Keywords: Chromosome 9, FISH, reproduction failure, karyotype, inv(9)

6 Úvod

6.1 Historické aspekty cytogenetické diagnostiky

Klinická genetika je samostatným medicínským oborem, který využívá moderních poznatků molekulární biologie a propojuje je s klasickou – formální genetikou a samotnou medicínou. Klinická genetika představuje jednu z nejtěsnějších fúzí výzkumu a klinické praxe, se kterou se v medicíně setkáváme. Bylo tomu tak i v historii, která v případě klinické genetiky není – v porovnání s jinými medicínskými obory – nikterak dlouhá, nicméně je třeba zdůraznit, že i tak trvá již šest desítek let. Varianty chromozomu 9 a jeho pericentrická inverze jsou odborné veřejnosti známy již skoro padesát let a pohled na jejich vznik i klinický význam prošel významným vývojem. K ozřejmění historických souvislostí proto nabízíme krátký historický přehled vývoje klinické cytogenetické diagnostiky.

Objev základní struktury DNA (Watson a Crick, 1953), spojený se jmény Jamese Watsona, Francise Cricka, Maurice Wilkinse a Rosalindy Franklinové, otevřel cestu k obrovskému rozvoji molekulární biologie, která v současné době posouvá klinickou genetickou diagnostiku na dosud nevídanou úroveň. Přesto to byl jiný objev v polovině stejné dekády, který stál na začátku klinicko-genetické laboratorní diagnostiky a zatímco éra molekulárně genetické diagnostiky měla teprve přijít, éra lékařské cytogenetiky právě začínala. V roce 1956 byla publikována zásadní práce autorů Tjio a Levan, která jako první správně prezentovala počet 46 chromozomů v lidských diploidních buňkách. Tím bylo ukončeno přibližně 30 let trvající období, kdy bylo konsenzuálně uznáváno jako správné číslo 48 (v přehledu Kottler, 1974). Jako klíčový se pro rozvoj cytogenetického vyšetření u člověka ukázal pokrok v samotném zpracování vzorku pro vyšetření – jmenujme například využití kolchicinu pro zastavení mitózy ve fázi metafáze, hypotonizaci vzorku a využití roztakového preparátu pro lepší vizualizaci (v přehledu Harper, 2006).

Nedlouho potom se začala psát již éra klinicko – cytogenetické diagnostiky. Přelomový byl rok 1959, kdy byla publikována již o pár měsíců dříve oznámená chromozomální příčina Downova syndromu (trizomie chromozomu 21 – Lejeune at al. 1959), následně pak byly publikovány práce britských autorů o gonozomálních aneuploidiiích – Turnerově syndromu (Ford et al., 1959) a Klinefelterově syndromu (Jacobs a Strong, 1959) a hned v následujícím roce pak byly popsány zbylé dvě hlavní autozomální trizomie – trizomie chromozomu 13 („D trisomy“) (Patau et al., 1960) a trizomie chromozomu 18 („E trisomy“) (Edwards et al., 1960) a také Filadelfský chromozom (zatím bez přesného určení

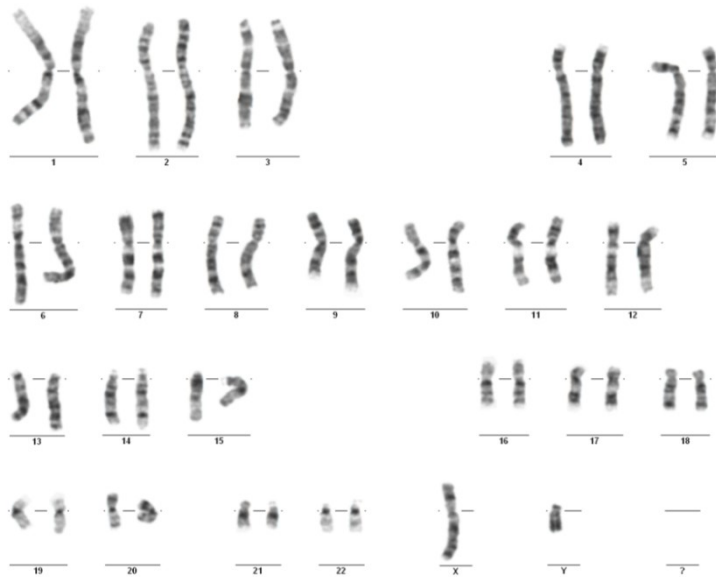
jeho původu) u chronické myeloidní leukemie (Nowell a Hungerford, 1960). Další objevy samozřejmě následovaly. Byly výrazně usnadněné nově zavedenou metodikou kultivace lymfocytů ze vzorku periferní krve (Moorhead et al., 1960). Jako poslední z této skupiny jmenujme popis delece krátkého ramene chromozomu 5 jakožto příčiny syndromu kočičího křiku (Lejeune et al., 1963) a dále se budeme podrobněji věnovat vývoji vyšetřovacích metod.

V ryze pionýrské době 60. let dvacátého století bylo poměrně obtížné rozlišovat konkrétní chromozomy, a to zejména skupiny C. Výrazný pokrok znamenalo zavedení pruhovacích technik vizualizace chromozomů, které velmi usnadnily identifikaci jednotlivých chromozomů a také jejich drobnějších strukturních přestaveb. Jako první se objevilo Q-pruhování (Caspersson al., 1970), které ovšem vyžadovalo fluorescenční mikroskopii. Následně Pardue a Gall (1970) popsali syté barvení centromerických oblastí (jak již dnes víme bohatých na repetitivní sekvence) myších chromozomů Giemsovým barvivem, čímž dali základ metodě známé dnes jako C-pruhování. Nejrozšířenější metodou a dosud zlatým standardem vyšetření karyotypu se stalo využití trypsinu v přístupu dnes všeobecně známém jako G-pruhování. G-pruhování umožnilo velmi dobré rozlišení chromozomů a na rozdíl od Q-pruhování nevyžaduje fluorescenční mikroskopii (Seabright, 1971, Kajii et al., 1972). Již jen stručně zmíníme rozvoj molekulární cytogenetiky. První využití fluorescenční in situ hybridizace (FISH) se datuje od poloviny osmdesátých let dvacátého století (Pinkel et al., 1986). Začátkem devadesátých let minulého století se pak se stoupajícím tlakem na zpřesnění diagnostiky drobných chromozomových přestaveb objevila metoda komparativní genomové hybridizace (CGH) (Kallioniemi et al., 1992), ve své původní podobě měla metoda takřka „jepičí život“ a byla brzy nahrazena metodou array-CGH (Pinkel et al., 1998), čímž se otevřela současná éra chromozomálních microarray.

6.2 Lidský karyotyp a stavba lidských chromozomů

Lidský karyotyp (Obrázek 6.1) se skládá ze 46 chromozomů (23 párů), z nichž 22 chromozomů (označené čísly 1- 22) jsou chromozomy nepohlavní (**autozomy**) a poslední pár jsou pohlavní chromozomy (**gonozomy** – u muže přítomné v kombinaci XY a u ženy v kombinaci XX). V lidském karyotypu se vyskytují tři typy chromozomů – chromozomy metacentrické, submetacentrické a akrocentrické. Podle mezinárodní cytogenetické

nomenklatury (ISCN¹) jsou chromozomy rozděleny do následujících skupin podle velikosti a struktury:



Obrázek 6.1 – Mužský karyotyp se zachycenou variantou chromozomu 9 – pericentrickou inverzí, karyotyp 46,XY,inv(9)(p12q13). G-pruhování.

Skupina A (chromozomy 1, 2, 3) obsahuje velké chromozomy, chromozomy 1 a 3 jsou metacentrické; chromozom 2 je submetacentrický.

Skupina B (chromozomy 4, 5) obsahuje velké submetacentrické chromozomy.

Skupina C (chromozomy 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X) obsahuje střední submetacentrické chromozomy, vč. chromozomu X.

Skupina D (chromozomy 13, 14, 15) obsahuje středně velké akrocentrické chromozomy se satelity.

Skupina E (chromozomy 16, 17, 18) obsahuje malé submetacentrické chromozomy.

Skupina F (chromozomy 19, 20) obsahuje malé metacentrické chromozomy.

Skupina G (chromozomy 21, 22, Y) obsahuje malé akrocentrické chromozomy se satelity (do této skupiny je rovněž řazen submetacentrický chromozom Y, který satelity nenese).

¹ V průběhu mnoha let, kdy jsme se problematikou variability lidského chromozomu 9 zabývali, byly v platnosti celkem 4 různé edice (2005, 2009, 2013 a 2016) mezinárodní nomenklatury ISCN. V této práci bude jednotně citováno poslední vydání nomenklatury z roku 2016 i s ohledem na to, že zatím nedošlo v námi odkazovaných situacích (obecná cytogenetika, variabilní oblasti a jejich zápis) k zásadnější změně.

Chromozomy jsou komplexem DNA a různých typů proteinů (obecné označení chromatin), základní stavební jednotkou je nukleozom, tvořený histonovým oktamerem, který obtáčí 146 nukleotidů (Luger et al., 1997). Celkově je ale struktura chromozomu rozdělena do dvou hlavních strukturně-funkčních oblastí – **euchromatinu** a **heterochromatinu**. Klasické rozdělení říká, že euchromatin je dekonenzovaná, transkripčně aktivní součást chromatinu, zatímco heterochromatin je denzní a transkripčně neaktivní (Tamaru, 2010). Na molekulární úrovni je rozdíl mezi euchromatinem a heterochromatinem mnohem komplexnější, založený na modifikacích nukleozomu. Euchromatin má zpravidla zvýšenou acetylaci histonů H3 a H4 a zvýšenou metylaci 4. lysinu histonu 3 (H3K4me) (Noma et al., 2001). Na druhou stranu heterochromatin je charakterizován hypoacetylací histonů, hypermethylací 9. lysinu histonu 3 (H3K9me), přítomností specifického heterochromatinového proteinu 1 (HP1) a metylací cytosinových nukleotidů (5mC) (Richards a Elgin, 2002; Volpe et al., 2002; Suzuki et al., 2008; Luijsterburg et al., 2009); úlohu při regulaci exprese v heterochromatinových oblastech může mít i RNA-interference (Volpe et al., 2002). Modifikace histonů nejsou důležité pouze pro organizaci euchromatinu a heterochromatinu, ale i v samotném euchromatinu významně ovlivňují genovou expresi, hovoříme o tzv. „histonovém kódu“, kterému dosud zcela nerozumíme (Prakash a Fournier, 2018).

Heterochromatinové oblasti lze rozdělit na fakultativní heterochromatin (reverzibilní uspořádání) a konstitutivní heterochromatin, který je přítomen trvale (Trojer a Reinberg, 2007). Konstitutivní heterochromatin nalezneme v lidském karyotypu v oblasti centromer a telomer, dále na krátkých ramenech akrocentrických chromozomů a nakonec také v oblastech velkého bloku konstitutivního heterochromatinu na dlouhém ramenu chromozomů 1, 9, 16 a Y (Huisinga et al., 2006; Wyandt et al., 2017). V oblastech centromer a velkých bloků konstitutivního heterochromatinu typicky nacházíme různé typy repetitivních – satelitních DNA sekvencí (přehled podle Wyandt et al., 2017):

- **Alfa-satelitní DNA:** monomer 171 bp, centromerická oblast všech lidských chromozomů.
- **Beta-satelitní DNA:** monomer 68 bp, centromerická oblast chromozomů 1, 9, 13, 14, 15, 21, 22 a Y.
- **Gama-satelitní DNA:** monomer 220 bp, pericentrická oblast chromozomů 8, X a Y.

- **I-satelitní DNA:** monomer 25-48 bp, zejména pericentromerická oblast chromozomů 3, 4, 13, 14, 15, 21, 22 a Y.
- **II-satelitní DNA:** monomer 5 bp, zejména heterochromatinová oblast 1q a 16q, dále pericentromerická oblast chromozomů 2 a 10.
- **III-satelitní DNA:** monomer 5 bp, oblasti 13p, 14p, 15p, 21p, 22p, a heterochromatin v oblastech 1q, 9q a Yq.

6.3 Chromozomové abnormality

Klasicky je možné chromozomové abnormality rozdělit do dvou základních skupin na odchylky v počtu chromozomů (obecně označované jako **numerické chromozomové abnormality**) a odchylky ve struktuře chromozomů (obecně označované jako **strukturní chromozomové aberace**) (Gardner a Amor, 2018). Chromozomové aberace mohou být přítomné v celé zárodečné linii jedince (v důsledku abnormální chromozomové výbavy jedné z gamet použité při fertilizaci), méně často je jedinec složený ze dvou a více buněčných linií s odlišnou chromozomovou výbavou (většinou jde o normální a patologickou linii) hovoříme pak o **mozaicismu** nebo vzácněji o **chimérismu**. Při mozaicismu se jedná o buněčné linie s odlišnou chromozomovou výbavou; většinou jde o normální a patologickou linii, kdy linie s chromozomovou odchylkou vzniká v průběhu mitotického dělení buněk, nejčastěji v rámci časného prenatálního vývoje. Chimérismus je situace, kdy je jedinec (chiméra) tvořen alespoň dvěma liniemi ze dvou různých jedinců (embryí), které ale nutně nemusejí mít odlišnou chromozomální výbavu (ve smyslu normy a patologie), ovšem může jít o dvě linie s normálním karyotypem, ale různým gonozomálním komplementem. (Conlin et al., 2010).

6.3.1 Numerické chromozomové abnormality

Numerické abnormality mohou postihnout celou chromozomovou sadu, obecně se znásobení celé sady nad diploidní normu označují jako **polyploidie**. U člověka jde nejčastěji o triploidii (69 chromozomů) či tetraploidii (92 chromozomů). Obě tyto odchylky jsou u člověka neslučitelné s postnatálním životem a setkáme se s nimi prakticky jen u tkání potracených plodů či v rámci prenatální diagnostiky. Pokud numerická abnormalita zasáhne pouze jeden chromozom – hovoříme o **aneuploidii**, ztrátu jednoho chromozomu z daného páru nazýváme **monozomie**, pokud je přítomna nadpočetná třetí kopie určitého chromozomu – pak mluvíme o **trizomii**. Prakticky jedinou s postnatálním životem slučitelnou monozomií je u člověka Turnerův syndrom (45,X), mezi hlavní

trizomie patří u člověka hlavně syndromy Downův (trizomie chromozomu 21), Edwardsův (trizomie chromozomu 18) a Patauův (trizomie chromozomu 13) a dále pak trizomie gonozomů, syndromy Klinefelterův (47,XXY), syndrom dvou Y (47,XYY) a syndrom tří X (47,XXX). Aneuploidie dalších chromozomů se u člověka mohou projevit v mozaikové formě, často může jít o získané abnormality vzniklé v nádorových liniích (Gersen a Keagle, 2013; Gardner a Amor, 2018).

6.3.2 Strukturní chromozomové aberace

Strukturní chromozomové aberace jsou velmi početnou a rozmanitou skupinou variabilních chromozomových přestaveb, které většinou vznikají jako následek chromozomálního zlomu bez úspěšné reparační. Strukturní aberace můžeme rozdělit také do dvou hlavních skupin a to přestaveb **nebalancovaných** a přestaveb **balancovaných**.

Nebalancované strukturní aberace jsou obecně definovány jako chromozomové přestavby, jejichž následkem došlo ke ztrátě nebo znásobení původního množství genetického materiálu. Do této skupiny řadíme (dle Gersen a Keagle, 2013; Gardner a Amor, 2018):

- **Delece:** V případě delece je část chromozomu zcela ztracena, následkem je pak většinou parciální monozomie dané oblasti. Podle místa vzniku mohou být delece intersticiální (dva zlomy na témže chromozomu a následná ztráta celého vyštěpeného fragmentu) nebo terminální, kdy dojde pouze k jednomu zlomu a ztrátě terminální oblasti. Delece mohou vznikat jako součást komplexnějších přestaveb, například jako reciproké delece-duplikace následkem nerovnoměrného crossing-overu (Robinson et al, 1998).
- **Duplikace:** Duplikace představují situace, kdy je určitá část chromozomu naopak zduplikována a nejčastěji vede ke vzniku parciální trizomie dané oblasti. Často nacházíme prosté tandemové duplikace, kdy jsou duplikované oblasti chromozomů umístěné za sebou. Vyskytují se také oblasti invertovaných duplikací, většinou spojených s terminálními delecemi, které jsou většinou následkem abnormální reparační zlomů spojených s tvorbou U-smyčky (Hermetz et al., 2014).
- **Izochromozom:** Izochromozom je tvořen pouze dlouhými či pouze krátkými rameny, spojenými v centromere, což s ohledem na množství genetického materiálu vede k delecí jednoho ramene a duplikaci ramene druhého. Klasická představa o vzniku této aberace – tedy abnormální rozchod chromatid v rámci jaderného dělení a vznik chromozomů tvořených pouze dlouhými, respektive krátkými rameny je

pravděpodobně reálnou příčinou jen v malém procentu případů vzniku izochromozomu. Mnohem častější je pak zřejmě formace (již výše zmíněné) U-smyčky během reparační zmlou na obou chromatidách, vedoucí ve skutečnosti k formaci **dicentrického chromozomu** – respektive **izodicentrického chromozomu** (Rowe et al., 2009).

- Samotný **dicentrický chromozom** je situace, kdy následkem chromozomové přestavby (či event. vzniku neocentromery) nacházíme dvě centromery na jednom chromozomu. Takovýto útvar může samozřejmě významně narušit průběh mitotického/meiotického dělení, často proto dochází k inaktivaci jedné z těchto centromer (Simpson et al., 2012).
- **Ring (prstenčitý) chromozom:** Prstenčitý chromozom je velmi specifický typ chromozomové aberace, kdy dochází k fúzi obou ramen chromozomu za tvorby skutečného prstence. Klasická představa o vzniku ring chromozomu předpokládala zlom na obou ramenech chromozomu s následnou ztrátou terminálních oblastí obou ramen včetně telomer a fúzí, která zapříčiní vznik prstence. Novější studie ovšem ukazují, že k fúzi obou ramen za vzniku ring chromozomu může docházet i bez delecí terminálních oblastí obou ramen (tedy nemusí jít nutně o nebalancovanou chromozomovou aberaci), či může jít o následek komplexnější chromozomové přestavby – opět zahrnující terminální delecii a invertovanou duplikaci (Guilherme et al., 2011).
- **Marker chromozomy:** Drobné, nadpočetné chromozomy nejasného původu jsou při cytogenetickém vyšetření označovány jako marker chromozomy. Marker chromozomy jsou často tvořeny heterochromatinovými sekvencemi, mohou ale obsahovat i kódující sekvence, čímž způsobují duplikace dané kódující oblasti. Marker chromozomy mohou být při buněčném dělení nestabilní, závisí na přítomnosti a funkci centromery, často je proto nacházíme v mozaice (Liehr et al., 2004).

Mezi **balancované strukturní aberace** řadíme následující přestavby (dle Gersen a Keagle, 2013; Gardner a Amor, 2018):

- **Robertsonské translokace:** Jde o přestavby zahrnující dva akrocentrické chromozomy (u člověka chromozomy 13, 14, 15, 21, 22), které ztrácejí krátká ramena a dojde k fúzi dlouhých ramen obou akrocentrů v oblasti centromery za vzniku jediného metacentrického či submetacentrického chromozomu (komplementární chromozom tvořený pouze krátkými rameny může teoreticky

existovat, ale většinou je acentrický, a proto nestabilní). Nejčastější jsou rob(13;14) a rob(14;21) (Jin et al., 2010). Přestože jsou při tomto typu přestavby části chromozomů ztraceny, nejsou nenahraditelné (repetitivní DNA, geny pro ribozomální RNA), a proto tyto přestavby považujeme za balancované aberace.

- **Reciproké translokace:** Reciproké translokace jsou přestavby zahrnující dva chromozomy různých párů, na jejichž ramenech dojde ke zlomu a následně dojde k výměně uvolněných fragmentů mezi oběma chromozomy. Přestavba může zahrnovat i více chromozomů.
- **Jumping translokace:** Tzv. skákající translokace (český termín se prozatím širěji nepoužívá) jsou zvláštním typem reciprokých translokací, kdy je určitý chromozomový segment translokován do více oblastí na různých chromozomech, velmi často v rámci chromozomové mozaiky. Tento typ aberace je považován za jeden z projevů chromozomální instability, ostatně je také velmi často nalézán v karyotypu nádorových buněk.
- **Inzerce:** V případě inzerce jde vždy o komplexní přestavbu, zahrnující vznik minimálně tří zlomů; díky dvěma zlomům na jednom chromozomu dojde k uvolnění fragmentu a ten je včleněn do oblasti zlomu na jiném místě, buď na stejném chromozomu (výsledkem je intrachromozomální inzerce), nebo na chromozomu jiného páru (inzerce interchromozomální). (Gu et al., 2016).
- **Inverze:** U inverze dochází ke dvěma zlomům na jednom chromozomu, vyštěpený úsek následně rotuje o 180 stupňů a je připojen zpět – v invertované pozici jako součást procesu nehomologního spojení konců v procesu reparace dvouřetězcového zlomu. Často ale dochází také ke vzniku inverzí mechanismem nealelní homologní rekombinace v místech ohraničených invertovanými repetitivními sekvencemi (Puig et al., 2015). Pokud je součástí invertovaného úseku centromera – hovoříme o pericentrické inverzi, pokud centromera zasažena není, poté je inverze označena jako paracentrická.

Přestože jsou balancované chromozomové aberace teoreticky „balancované“, tedy nejsou primárně (v limitech rozlišení optického mikroskopu) doprovázeny ztrátou/znásobením genetické informace, jejich dopad na svého nositele nemusí být vždy zcela nulový. Je třeba zmínit následující:

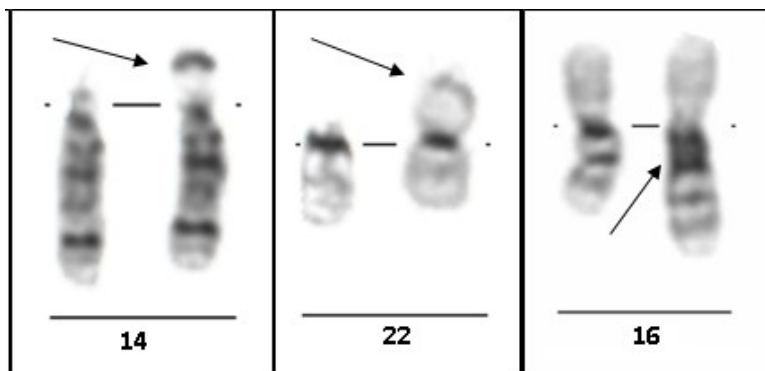
1. Nález v optickém mikroskopu může vykazovat zdánlivou balancovanost nálezu (reciproké translokace, inverze, inzerce), ale pomocí molekulárně cytogenetické metody microarray je i v těchto případech možné zjistit abnormality charakteru

CNV, a to i v případech familiárního přenosu této chromozomové aberace. Je nutné ovšem zdůraznit, že ne každá submikroskopická CNV je přímo spojena s patologickým fenotypem (Sismani et al., 2008).

2. I přes zdánlivou balancovanost na úrovni karyotypu může samotná oblast zlomu způsobit narušení genové exprese. Známe je například narušení sekvence významného genu pro koagulační faktor VIII rekurentní inverzí vedoucí k těžkému typu hemofilie A (Bagnall et al., 2002). U recipročných translokací pak typicky dochází ke vzniku fúzních genů, které se často uplatňují v procesu nádorové transformace buňky (Nambiar a Raghavan, 2011).
3. V neposledním případě je třeba uvést možné klinické dopady na reprodukci. Přítomnost balancované přestavby je spojena s biologickým rizikem narušení meiotického dělení a tím pádem gametogeneze. Díky narušenému párování homologních chromozomů během profáze prvního meiotického dělení u nositelů translokací, inverzí či inzercí je možné očekávat vznik gamet s nebalancovanou (rekombinovanou) chromozomální výbavou (segmentálními delecemi či duplikacemi). Zatím ne zcela jednoznačně je přijímána teorie tzv. interchromozomálního efektu, kdy se spekuluje, že přítomnost balancované chromozomové přestavby může narušit meiotické dělení tím způsobem, že zvýší riziko abnormálního rozchodu dalších chromozomových párů, a tím může dojít ke vzniku numerických aberací typu aneuploidií (např. Martin, 2008). Podrobněji je, s ohledem na hlavní téma práce, biologické riziko inverzí diskutováno v kapitole věnované cíleně inv(9).

6.3.3 Varianty lidských chromozomů

Během šesti desítek let historie klinické cytogenetiky byla řada strukturních odchylek lidských chromozomů vyhodnocena jako varianty bez klinického významu. Jde zejména o délkové varianty v oblastech chromozomů tvořených repetitivními sekvencemi DNA (vybrané příklady dále komentovaných variant ukazuje Obrázek 6.2). Tyto změny jsou běžně zachycovány jako variantní nálezy během vyšetření karyotypu v optickém mikroskopu. Mezinárodní cytogenetická nomenklatura tyto změny uvádí v přehledu variabilních oblastí lidských chromozomů, který předkládáme níže v Tabulce 6.1.



Obrázek 6.2 - Příklady variant lidských chromozomů při vyšetření v optickém mikroskopu pomocí G- pruhování, variabilní oblast označena šipkou. Zleva: 14ps+, 22pstk+, 16qh+ (podle Šípek Jr et al., 2012).

Chromozom	Varianta / Oblast	Chromozom	Varianta / Oblast
1	q12 inv(p13q21)	13	p
2	inv(p11.2q13)	14	p
3	inv(p11.2q12)	15	p
4		16	q11.2 inv(p11.2q12.1)
5		17	
6	p11.1	18	
7		19	inv(p12q13.1)
8		20	
9	q12 inv(p12q13) inv(p12q21)	21	p
10	inv(p11.2q21.2)	22	p
11		X	
12		Y	inv(p11.2q11.2)

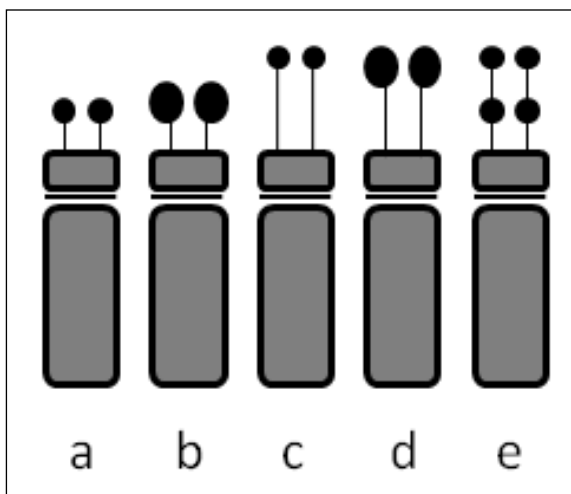
Tabulka 6.1 – Přehled vybraných variabilních oblastí v lidském karyotypu (upraveno podle ISCN a Šípek Jr et al., 2012)

Obecně jsou nálezy těchto variant považovány za klinicky nevýznamné, proto například doporučení Evropské cytogenetické asociace (E.C.A., 2012) uvádí, že by se nálezy těchto variant neměly uvádět do výsledkových zpráv určených pro indikující lékaře, ale pouze do laboratorní dokumentace (stejně se vyjadřuje i Silva et al., 2019). Obecně se ale zkušenosti a přístup cytogenetiků k těmto variantám liší (Brothman et al., 2006).

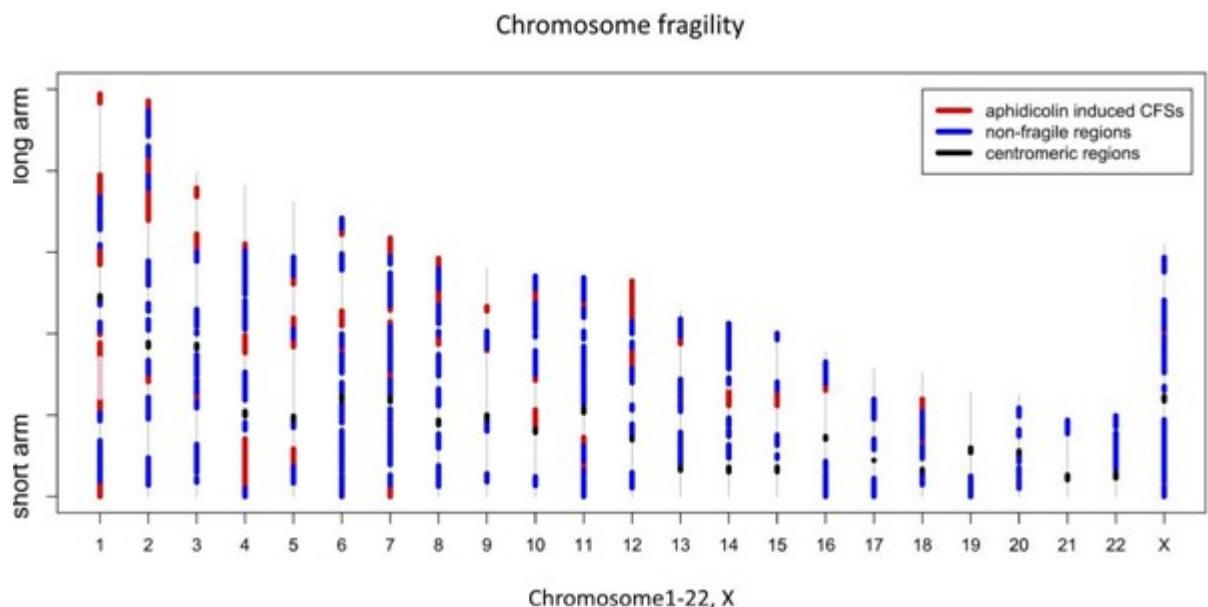
Varianty lidských chromozomů lze rozdělit do několika hlavních skupin:

1. **Délkové varianty chromozomů s velkým blokem konstitutivního heterochromatinu**, který konkrétně nacházíme především na dlouhém ramenu chromozomů 1, 9, 16 a Y. Jak již bylo uvedeno výše, jde o oblasti tvořené repetitivními sekvencemi, které neobsahují žádné (dosud známé) významné geny. Prodloužení či zkrácení těchto oblastí je při vyšetření v optickém mikroskopu možné provést pomocí porovnání délky této oblasti s krátkým ramenem chromozomu 16 (16p) – prodloužení je hodnoceno jako qh⁺ varianta, zkrácení pak jako qh⁻ varianta (Liehr, 2016).
2. **Variabilita délky a struktury krátkých ramen akrocentrických chromozomů** (v lidském karyotypu chromozomy 13, 14, 15, 21 a 22). Také v těchto oblastech nacházíme různé typy repetitivních sekvencí, včetně repeticí genů pro 8S, 5.8S a 28S rRNA (Agrawal a Ganley, 2018). Variabilita zahrnuje různou velikost a počet satelitů a také charakter sekundární konstriktce (stalk – stopka), rozlišení výraznějších variant a patologických přestaveb může být v rámci optické mikroskopie někdy i obtížné (popisovali jsme podrobněji – Šípek Jr et al., 2012). Podrobněji jsou tyto varianty shrnuty na Obrázku 6.3.
3. **Tzv. variantní inverze**, což je skupina několika pericentrických inverzí, jejichž klinický význam je považován za nulový a své nositele by tak neměly ohrožovat ani teoretickým biologickým rizikem spojeným s reprodukcí. Do této skupiny je řazena především nejčastější pericentrická inverze chromozomu 9, tedy klasicky inv(9)(p12q13). Inv(9) je možné v širším slova smyslu považovat rovněž za heterochromatinovou variantu, neboť je invertován právě velký heterochromatinový blok chromozomu 9. Méně často jsou reportovány i pericentrické inverze heterochromatinového bloku na chromozomech 1, 16 a Y. Nejčastější z „ne-heterochromatinových“ inverzí je pak inv(2)(p11.2q13), považovaná rovněž za nevýznamnou variantu. Méně často se pak vyskytuje například inv(3)(p11.2q12), inv(5)(p13q13) a inv(10)(p11.2q12) (Brothman et al., 2006, Gardner a Amor, 2018).
4. **Variabilní místa chromozomové fragility**, tedy místa v karyotypu, která mají tendenci k rozvolňování, ale mohou být rovněž oblastmi preferenčního vzniku chromozomových zlomů. Ačkoliv oblasti, jako např. FRAXA, FRAXE (syndrom fragilního X-chromozomu), či FRA11B (Jacobsenův syndrom) jsou spojeny s rozvojem patologického fenotypu, desítky dalších fragilních oblastí jsou

považovány za oblast variabilního výskytu fragility bez jasné spojitosti s jinými klinickými syndromy (Fungtammasan et al., 2012; Gersen a Keagle, 2013). Přehled těchto oblastí je uveden na Obrázku 6.4



Obrázek 6.3 – Variabilita útvarů na krátkém ramenu akrocentrického chromosomu (vybrané příklady): a) norma; b) ps+ (zvětšené satelity); c) pstk+ (prodloužené stopky); d) pstk+ps+ (zvětšené satelity na prodloužených stopkách); e) pss (dvojitě satelity). Převzato z publikace Šípek Jr et al., 2012.



Obrázek 6.4 – Znázornění (červeně) 76 běžných fragilních oblastí v lidském karyotypu zjištěných na základě indukce fragility pomocí afidikolinu. Nefragilní oblasti jsou znázorněny modře, oblasti centromer černě (převzato z Fungtammasan et al., 2012).

6.4 Varianty chromozomu 9

Hlavním tématem práce jsou varianty lidského chromozomu 9, proto je na tomto místě představíme podrobněji. Všechny se týkají oblasti pericentromerického heterochromatinu (přehledně též Tabulka 6.2).

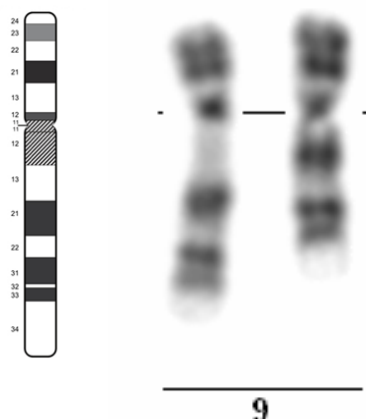
Zápis dle ISCN	Slovní popis
9qh+	Zvětšený heterochromatinový úsek chromozomu 9
9qh-	Zmenšený heterochromatinový úsek chromozomu 9
9ph	Heterochromatin na krátkém ramenu chromozomu 9
9phqh	Heterochromatin na krátkém i dlouhém ramenu chromozomu 9
inv(9)(p12q13)	Pericentrická inverze chromozomu 9 (častější, "krátká" varianta)
inv(9)(p12q21)	Pericentrická inverze chromozomu 9 ("dlouhá" varianta)

Tabulka 6.2 – Přehled hlavních variant lidského chromozomu 9. Převzato z publikace Šípek et al., 2012.

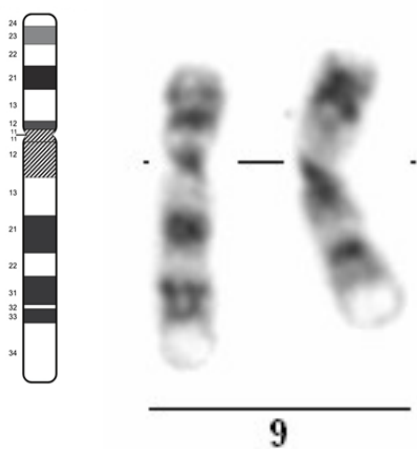
Podle nomenklatury ISCN je můžeme rozdělit do tří hlavních skupin:

1. Délkové varianty heterochromatinu na 9q12, označované jako 9qh+ (prodloužení) nebo 9qh- (zkrácení). ISCN nomenklatura přesné porovnání pro potřeby hodnocení neuvádí, obecně je doporučeno porovnávat délku této oblasti s krátkým ramenem chromozomu 16 (Liehr, 2016). Ilustračně Obrázek 6.5.
2. Abnormální uložení heterochromatinu, v ISCN nomenklatuře popisované jako 9ph (doslovně – heterochromatin uložený na krátkém ramenu chromozomu 9) a 9phqh (doslovně – heterochromatin uložený na krátkém i dlouhém ramenu chromozomu 9). Tyto varianty jsou obecně v literatuře referovány velmi zřídka, nepochybně za to může i nejednoznačná definice v ISCN nomenklatuře. Přesun heterochromatinu na krátké rameno chromozomu 9 je totiž přesně ta situace, kterou pozorujeme i u pericentrické inverze chromozomu 9, pro kterou ale existuje vlastní zápis. Nemělo by docházet k situacím, kdy je přítomnost inverze označena jako 9ph varianta, přesto se s nimi můžeme setkat (například Belangero et al., 2009).
3. Pericentrická inverze chromozomu 9, zahrnující heterochromatinový blok 9q12. V současné době je tento nálezný dle nomenklatury nejčastěji zapisován jako inv(9)(p12q13), obrázek 6.6. Zvláště ve starších textech je možné nalézt alternativní zápisy jako je inv(9)(p11q12), případně inv(9qh). Vzácněji je také

uváděna rozsáhlejší inverze $\text{inv}(9)(\text{p}12\text{q}21)$, v současné době je spíše doporučeno využít molekulárně cytogenetickou klasifikaci (Kosyakova et al., 2013).



Obrázek 6.5 – Délkové varianty chromozomu 9, méně častý nález dvou různých délkových variant u jedné osoby. Na fotografii vlevo je homolog s prodlouženým heterochromatinem ($9\text{qh}+$), vpravo je pak homolog s abnormálně zkráceným heterochromatinem ($9\text{qh}-$). V levé části schématu je ideogram chromozomu 9 ve stejném rozlišení.



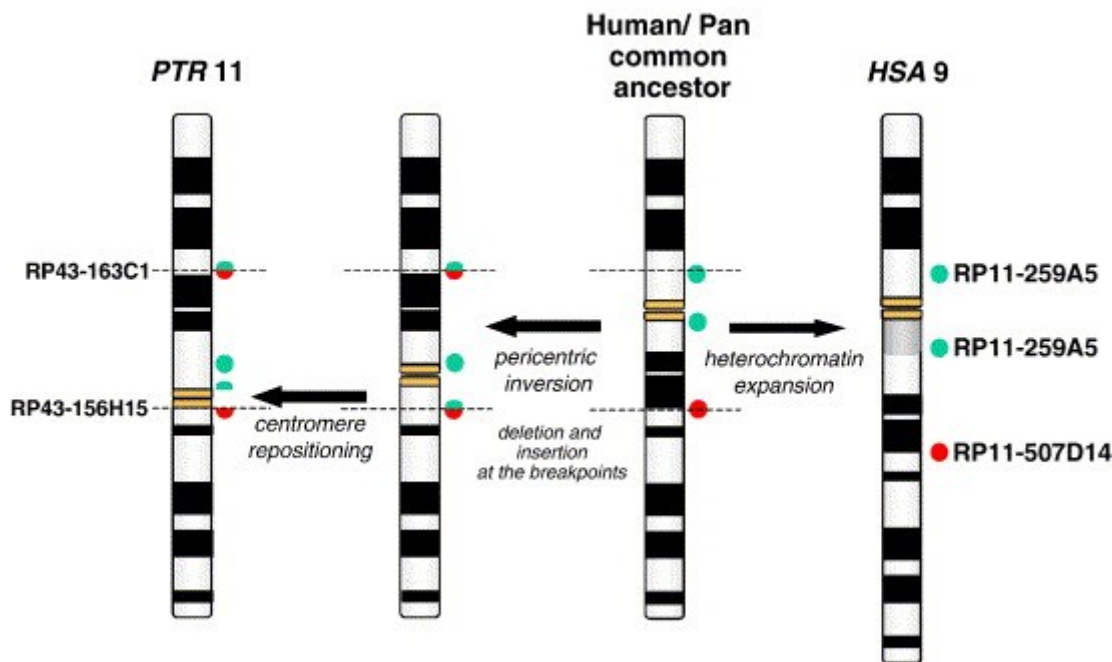
Obrázek 6.6 - Pericentrická inverze chromozomu 9 v nejběžnější podobě, hodnocená dle ISCN nomenklatury jako $\text{inv}(9)(\text{p}12\text{q}13)$. Normální chromozom 9 je na fotografii vlevo, invertovaný homolog je na fotografii vpravo. V levé části schématu je ideogram chromozomu 9 ve stejném rozlišení.

V mnoha ohledech je výše uvedené rozdělení podle mezinárodní nomenklatury ISCN nedokonalé a neumožňuje podrobnější rozdělení variant chromozomu 9 s ohledem na jejich molekulárně cytogenetickou charakteristiku. Již v polovině 90. let minulého století se objevily studie, které poukázaly na dynamickou strukturu pericentromerické oblasti

chromozomu 9, tvořené zejména alfa-satelitními, beta-satelitními a III-DNA satelitními sekvencemi. Na základě analýzy těchto oblastí pomocí FISH bylo popsáno několik různých subvariant v této oblasti, které předtím za použití G-pruhování či C-pruhování nebylo možné blíže rozlišit (Ramesh a Verma, 1996; Samonte et al., 1996). Velice důležitý byl objev homologních sekvencí v oblasti 9p12 a 9q13 – tedy na obou hranicích pericentromerické oblasti (Park et al., 1998). Tento objev byl potvrzen a dále rozpracován skupinou cytogenetiků vedených profesorem T. Liehrem (Starke et al., 2002), kteří s pomocí multipróbové FISH diagnostiky s využitím mikrodisekčních sond popsali celkem 12 různých variant heterochromatinové oblasti chromozomu 9. Zatím poslední práce tohoto týmu (Kosyakova et al., 2013) pak na základě extenzivního využití různých typů FISH sond (vlastní mikrodisekční sondy a četné BAC sondy) navrhuje novou molekulárně cytogenetickou klasifikaci variant chromozomu 9 – s celkem 17 různými typy nálezů:

- 4 různé typy inverze
- 3 různé délkové varianty 9qh
- 3 různé délkové varianty 9ph
- 3 různé typy dicentrického chromozomu 9
- 2 různé typy duplikací v pericentromerické oblasti chromozomu 9
- 2 typy délkové varianty centromery chromozomu 9

Obecně je oblast 9p12-q13 považována za velmi specifickou, právě pro její stavbu, ve které hrají klíčovou roli různé typy repetitivních sekvencí (alfa-, beta- a III- satelitní sekvence). Přítomnost repetitivních sekvencí na obou hranicích této oblasti lze dávat do spojitosti s možným vznikem inverze této oblasti například mechanismem nealelní homologní rekombinace (Puig et al., 2015). Je velmi pravděpodobné, že tato oblast je velmi náchylná k přestavbám (Kosyakova et al., 2013). V databázi DECIPHER (Firth et al., 2009) má tato oblast přibližně 27,7 MB (9:41000001-68700000) a obsahuje 79 genů, z nichž ovšem pouze 10 jsou protein kódující geny a pouze tři z nich jsou vedeny v databázi OMIM (*FOXD4L2*, *SPATA31A4*, *SPATA31A7*), žádný z nich není veden jako tzv. „morbid gene“, přímo spojený s fenotypem známého geneticky podmíněného onemocnění. Evolučně je jistě zajímavý fakt, že u šimpanze (*Pan troglodytes*) je prakticky totožná oblast chromozomu 11 (homologního k lidskému chromozomu 9) invertována – viz Obrázek 6.7 (Kehrer-Sawatzki et al., 2005).



Obrázek 6.7 – Schéma vývoje lidského chromozomu 9 (HSA 9) a chromozomu 11 šimpanze (PTR 11) z homologního chromozomu předpokládaného společného předka (převzato z Kehrer-Sawatzki et al., 2005).

Z populačních četností různých variant chromozomu 9 je nejčastěji uváděna právě jen četnost $inv(9)$, a to z logického důvodu - hodnocení délkových variant (např $9qh+/9qh-$) může být zatíženo subjektivitou hodnotitele, a proto mohou být výsledné četnosti délkových variant obtížně porovnatelné. U $inv(9)$ se odhady populační četnosti pohybují přibližně mezi 1-4 %, byly popsány i rozdíly v četnosti mezi různými etniky (blíže viz Tabulka 6.3).

6.5 Pericentrická inverze chromozomu 9 a její klinický význam

Ze všech zmiňovaných variant chromozomu 9 je $inv(9)$ zřejmě nejvýznamnější variantou, alespoň s přihlédnutím k četnosti literárních ohlasů. První cílený popis $inv(9)$ publikoval Wahrman se spolupracovníky (Wahrman et al., 1972), relativně častá inverze (na leckdy blíže neupřesněném chromozomu skupiny C) byla však cytogenetikům známa již nějakou dobu, proto byl relativně brzy vysloven názor, že jde o variantní nález (Mutton a Daker, 1973). Obecně je ale přítomnost chromozomové inverze potenciálně riziková, proto bylo v průběhu let opakovaně (jinými) vysloveno podezření na možnou (klinickou) spojitost s různými typy lidských patologií.

Práce	Velikost vzorku	Četnost inv(9)	Typ vzorku	Poznámka
<i>Metaxotou et al. 1978</i>	600	4 %	Postnatální diagnostika	Neselektovaná populace indikovaná k cytogenetickému vyšetření
<i>Hsu et al., 1987</i>	2334	0,73 %	Prenatální diagnostika	Běloši
<i>Hsu et al., 1987</i>	1795	3,57 %	Prenatální diagnostika	Afroameričané
<i>Hsu et al., 1987</i>	1737	2,42 %	Prenatální diagnostika	Hispanci
<i>Hsu et al., 1987</i>	384	0,26 %	Prenatální diagnostika	Asiaté
<i>Serra et al. 1990</i>	5568	0,97 %	Postnatální diagnostika	Vlastní soubor, neselektovaná populace indikovaná k cytogenetickému vyšetření
<i>Serra et al. 1990</i>	600	2,83 %	Postnatální diagnostika	Rodiče dětí s Downovým syndromem
<i>Serra et al. 1990</i>	7613	0,85 %	Postnatální diagnostika	Metaanalýza - Novorozenci
<i>Serra et al. 1990</i>	18884	0,95 %	Postnatální diagnostika	Metaanalýza – Všechny osoby
<i>Yamada, 1992</i>	1513	1,65 %	Postnatální diagnostika	Zdraví dobrovolníci
<i>Yamada, 1992</i>	1246	1,52 %	Prenatální i postnatální diagnostika	Jedinci s Downovým syndromem
<i>Teo et al., 1995</i>	2448	1,2 %	Prenatální diagnostika	Neselektovaná populace indikovaná k cytogenetickému vyšetření
<i>Teo et al., 1995</i>	1058	0,6 %	Postnatální diagnostika	Neselektovaná populace indikovaná k cytogenetickému vyšetření
<i>Demirhan et al., 2008</i>	15528	1,01 %	Postnatální diagnostika	Neselektovaná populace indikovaná k cytogenetickému vyšetření
<i>Sheth et al., 2013</i>	4859	0,51 %	Postnatální diagnostika	Jedinci s reprodukční poruchou
<i>Yuksel et al., 2017</i>	4168	1,70 %	Postnatální diagnostika	Neselektovaná populace indikovaná k cytogenetickému vyšetření

Tabulka 6.3 – Přehled vybraných prací s přehledem populační/laboratorní incidence inv(9) v různých typech souborů. V některých pracích je uvedeno více vzorků.

Párování chromozomů s balancovanými přestavbami způsobuje problém během profáze I. meiotického dělení, kdy se párují oba zduplikované homology daného chromozomového páru za vzniku bivalentu, čímž je splněn předpoklad provedení crossing-overu. Změna

pořadí jednotlivých chromozomálních oblastí na jednom homologu (způsobená inverzí) vede k abnormálnímu párování a vzniku tzv. inverzní smyčky (Obrázek 6.8). Po proběhnutí crossing-overu za této konstelace může docházet k tzv. rekombinační aneuzomii, tedy vzniku gamet s nebalancovanou chromozomální výbavou, která má charakter parciální delecce jednoho ramene a parciální duplikace druhého ramene příslušného chromozomu (Balíček, 2001; Anton et al., 2005).

Riziko rekombinační aneuzomie není ovšem pro všechny pericentrické inverze stejné, procento rekombinovaných chromozomů je možné nejnadhěji sledovat ve spermiích mužů – nositelů pericentrické inverze. Rizikovost nejčastějších typů pericentrických inverzí shrnul ve svém přehledu Morel se spolupracovníky (2007) – přehledně Tabulka 6.4. Námí sledovaná inv(9) je zde uvedena s 0% rizikem rekombinace, což je v souladu s tím, že nejsou literární zmínky o případech takovéto klasické rekombinace u rodiče – nositele inv(9) a také se takto vyjadřuje základní cytogenetická literatura (Gersen a Keagle, 2013; Gardner a Amor, 2018). Na druhé straně existují ale kazuistické případy, kdy došlo k transgenerační změně varianty a to v několika případech i velmi významné. Velmi atypický rekombinovaný chromozom 9 s duplikací zasahující i do pruhu 9p13 popsal Malinverni se spolupracovníky (2016). Nositelka tohoto chromozomu měla výrazné fenotypové projevy zahrnující psychomotorickou retardaci a kraniofaciální dysmorfii, její otec byl nositelem běžné varianty inv(9). Zřídka se také setkáme s popisem vzniku rekombinovaného chromozomu 9 u nositelů paracentrických inverzí chromozomu 9 (např. Worsham et al., 1989; Phelen et al., 1993), které ale s klasickou pericentrickou inverzí nijak nesouvisí a jejich rizika by se neměla zaměňovat. Ačkoliv není kauzální mechanismus znám - je reprodukční porucha objektivně nejčastěji zmiňovaným klinickým problémem u osob s inv(9) (například Boué et al., 1975; Uehara et al., 1992; Srebniak et al., 2004; Mozdarani et al., 2007; Collodel et al., 2006).

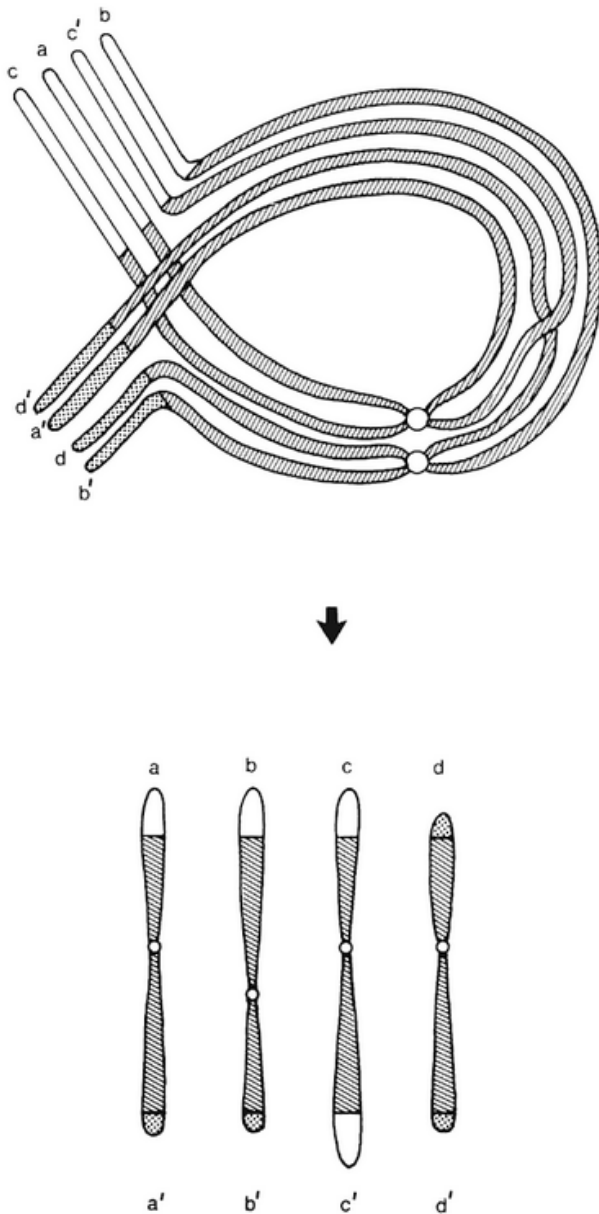
Kromě reprodukčních poruch byla opakovaně zmíněna možná asociace inv(9) a vyššího rizika zplazení potomka s Downovým syndromem (Serra et al., 1990; Parmar a Sira, 2003). Zde je zvažována možná úloha tzv. interchromozomálního efektu, kdy přítomnost invertovaného chromozomu (ale i dalších balancovaných přestaveb) jednoho páru v průběhu meiotického dělení zvyšuje riziko abnormálního rozchodu dalších chromozomů, tedy vzniku gamet monozomických/dizomických pro chromozomy dalších párů (Caer et al., 2008; v přehledu Anton et al., 2011). Tento efekt dokumentoval u nositele inv(9) Amiel s kolegy (2001) a částečně i Murthy a Prabhakara (1990). Naopak Colls se spolupracovníky (1997) ve stejné situaci interchromozomální efekt nepozorovali.

V recentní a rozsáhlé studii chromozomálních nálezů u osob referovaných k asistované reprodukci byla existence interchromozomálního efektu víceméně zpochybněna, neboť nositelé inverzí nevykazovali vyšší procento vzniku aneuploidních embryí a to včetně nositelů inv(9) (Young et al., 2019).

Další klinické asociace jsou u inv(9) popisovány již spíše jen kazuisticky. Výjimku ještě tvoří schizofrenie, jejíž možné asociaci s inv(9) se v devadesátých letech minulého století věnovalo více autorů (např. Nanko, 1993; Lee et al., 1998; Kunugi et al., 1999; Miyaoka et al., 1999), konkrétní kauzální mechanismus ale nebyl prokázán.

V literatuře se setkáváme i s popisem *de novo* vzniklých inv(9), a to nejčastěji v případě hematologických malignit, kdy zvýšenou frekvencí nově vzniklých aberací lze očekávat (Betz et al., 2005), zde je tedy inv(9) popsána jako jednoznačně získaná aberace (Udayakumar et al., 2009). V obecné rovině pak souvislost inv(9) a hematologického onemocnění diskutují i další autoři (Keung et al., 2003; Vijay et al., 2016), kauzalita opět dosud prokázána nebyla. Dále se setkáme i se zmínkami o *de novo* inv(9) u dětí s různými typy vrozených vad (Rao et al., 2006; Jeong et al., 2010), opět jen kazuisticky. Právě četné případy kazuistik možné asociace inv(9) a určité vrozené vady či syndromu jsou poslední hlavní skupinou hypotetických klinických asociací inv(9). Ani zde nebyl v žádném případě dosud prokázán konkrétní případ kauzality, v přehledu výběr různých prací shrnuje Tabulka 6.5.

Vzácně je reportována inv(9) v homozygotní kombinaci a nezdá se, že by tento nález byl spojen s nějakým jasným klinickým problémem (Cotter et al., 2007), byť byly publikovány i asociace tohoto vzácného (teoretická populační frekvence je přibližně 0,000225 - 0,0004) nálezu s anomálním prenatálním vývojem (Khaleghian et al., 2006; Sharony et al., 2007) či reprodukční poruchou (Ceylan et al., 2008).



Obrázek 6.8 – Teoretické schéma rekombinační aneuzomie v případě pericentrické inverze. Na schématu v horní části obrázku je zobrazena rekombinační smyčka, ve spodní části pak teoretický vznik 4 různých chromatid – první dva případy jsou balancované (normální chromozom, respektive chromozom s původní inverzí), druhé dva případy jsou chromozomy s nebalancovanou přestavbou (parciální delece části jednoho ramene a parciální duplikace ramene druhého). Upraveno podle Gardner a Amor, 2018.

Inverze	Rozsah invertované oblasti (v %)	Nerekombinované (%)		Rekombinované (%)		Reference
		Normální	Invertované	dup(p)/del(q)	dup(q)/del(p)	
inv(1)(p31q12)	30	45,9	54,1	0	0	Martin et al., 1994
inv(1)(p31q12)	30	99,62		0,25	0,13	Jaarola et al., 1998
inv(1)(p36q32)	81	82,5		8,7	7,3	Yakut et al., 2003
inv(1)(p36.3q43)	95	68,12		11,59	18,84	Morel et al., 2007
inv(2)(p11q13)	10	99,43		0	0	Morel et al., 2007
inv(2)(p11.2q13)	10	100		0		Anton et al., 2005
inv(2)(p23q33)	71	60,98		20,22	17,49	Mikhaail-Philips et al., 2004
inv(3)(p11q11)	5	57,7	42,3	0	0	Balkan et al., 1983
inv(3)(p25q21)	60	37,6	31,6	13,5	17,3	Martin, 1991
inv(4)(p16q21)	42	99,22		0,78		Anton et al., 2005
inv(6)(p23q25)	80	45,7		19,18	18,67	Anton et al., 2002
inv(7)(p13q36)	65	37,9	37,1	7,1	17,1	Navarro et al., 1993
inv(8)(p12q21)	31	97		1,00	0,44	Morel et al., 2007
inv(8)(p12q24.1)	61	60,94		19,99	17,72	Morel et al., 2007
inv(8)(p23q22)	62	47,5	41,1	5,7	5,7	Martin, 1993
inv(8)(p23q22)	62	86,87		6,25	6,88	Jaarola et al., 1998
inv(9)(p11q13)	16	51,3	48,7	0	0	Colls et al., 1997
inv(10)(p13q22.3)	47	96,59		3,41		Anton et al., 2005
inv(12)(p11q23)	51	91,41		3,98	3,52	Morel et al., 2007
inv(17)(p13.1q25.3)	89	73		0,8	0,6	Mikhaail-Philips et al., 2005
inv(20)(p12.3q13.33)	84	80,00		9,92	8,32	Morel et al., 2007
inv(20)(p13q11.2)	51	53,8	46,2	0	0	Jenderny et al., 1992

Tabulka 6.4 – Přehled pericentrických inverzí s ohledem na jejich biologické chování při spermatogenezi (vyjádřeno % nálezů spermií s normálním karyotypem a % s rekombinovanými chromozomy). Inverze s více jak 1% zastoupením rekombinantních spermií vyznačeno červeně, inv(9) tučně. Upraveno podle Morel et al., 2007.

Autor	Sledovaná choroba	Případů	Poznámka
<i>de la Chapelle et al., 1974</i>	žádná, popsány děti s vrozenými vadami	35	u žen s inv(9) pozorována vyšší plodivost než u mužů s inv(9)
<i>Boué et al., 1975</i>	reprodukční porucha	10	3 ženy, 7 mužů (1 z mužů homozygot pro inv(9))
<i>Metaxotou et al., 1978</i>	žádná	25	nejvíce (7) osob s diagnózou infertilita (28 %)
<i>Fuenmayor et al., 1981</i>	ektodermální dysplázie	3	u jedné osoby: 46,XX, inv(9)(p13q21)
<i>Serra et al., 1990</i>	riziko Downova syndromu u potomků	17	300 rodin s výskytem MD: inv(9) zachycena u 11 žen a 6 mužů
<i>Uehara et al., 1992</i>	reprodukční porucha	12	poměr pohlaví: F/M = 3/9
<i>Nanko, 1993</i>	schizofrenie	1	jediný případ
<i>Lee et al., 1998</i>	schizofrenie	1	karyotyp 46, XX, inv(9)(p11q13)
<i>McCandless et al., 1998</i>	bipolární porucha	2	Popsána inv(9)(p11q21) u otce a jeho dcery se stejným psychiatrickým postižením
<i>Kunugi et al., 1999</i>	schizofrenie	10	inv(9)(p11q13) - všechny případy
<i>Baltaci et al., 1999</i>	Walker-Warburgův syndrom	1	inv(9)(p11q13) - homozygotní stav
<i>Miyaoka et al., 1999</i>	mozková cysta, schizofrenie	1	karyotyp 46, XX, inv(9)(p11q13)
<i>Wan et al., 1999</i>	esenciální trombocytopenie	1	získaná - inv(9)(p11q13)[3]/46,XY[11]
<i>Stanojević et al., 2000</i>	Goldenharův syndrom	1	Dívka, inv(9)(p11q13)
<i>Keung et al., 2003</i>	akutní leukémie (5x akutní myeloidní leukémie)	6	ve všech případech pravděpodobně vrozená inv(9)
<i>Parmar a Sira, 2003</i>	Downův syndrom u potomka	1	matka - karyotyp 45, XX t(21q;22q), inv(9)(p11q11)
<i>Demirhan a Taştemir, 2003</i>	schizofrenie	2	celkem 5 případů heteromorfizmů chromozomu 9: inv(9) a 9qh+ (5,2%)
<i>Srebniak et al., 2004</i>	reprodukční porucha	1	46,XY, inv(2)(p11q13), inv(9)(p11q13)
<i>Betz et al., 2005</i>	hematologické abnormality	2	oba případy získaná inv(9)(p11q13) v mozaice
<i>Rao et al., 2006</i>	vrozené vady u dětí	27	karyotyp inv(9)(p12q13)
<i>Collodel et al., 2006</i>	reprodukční porucha u mužů	18	inv(9) byla u 3,8 % neplodných mužů
<i>Ramegowda et al., 2007</i>	vrozená vada srdeční	2	inv(9)(p11q13) - oba případy
<i>Mozdarani et al., 2007</i>	sterilita / infertilita	16	poměr pohlaví: F/M = 1/15
<i>Ceylan et al., 2008</i>	primární sterilita	1	inv(9)(p11q13) - homozygotní stav
<i>Demirhan et al., 2008</i>	žádná, popsány děti s vrozenými vadami	157	Nejčastější indikační diagnózou byly spontánní potraty (30,6 %)
<i>Udayakumar et al., 2009</i>	akutní myeloidní leukémie	1	získaná - inv(9)(p13q12), inv(9)(p13q12), del(9)(p11p21)
<i>Cheung a Wong, 2009</i>	hypoplázie optického nervu	1	kazuistika
<i>Pavelic et al., 2010</i>	mikrocefalie, dysmorfie, akutní leukémie	1	kazuistika, inv(9)(p12q13)mat
<i>Jeong et al., 2010</i>	různé typy strukturních vrozených vad	8	všech osm případů inv(9)(p11q13) vzniklo <i>de novo</i>
<i>Güre, 2015</i>	vrozený hallux varus	1	inv(9)(p11q12), prenatalní záchyt (aminocentéza)
<i>Vijay et al., 2016</i>	hematoonkologická onemocnění	2	v jednom případě referována rozsáhlejší inverze - inv(9)(p22q34)
<i>Sotoudeh et al., 2017</i>	obojetný genitál	1	kazuistika

Tabulka 6.5 – Přehled vybraných prací zmiňujících možnou asociaci inv(9) a určité klinické patologie. Řazeno od nejstaršího textu k nejnovějšímu

7 Cíle práce, hypotézy

Práce se věnuje heterochromatinovým variantám lidského chromozomu 9 z více pohledů. Struktura cílů a příslušné hypotézy jsou tak rozděleny do tří hlavních částí.

7.1 Epidemiologická část:

- **Cíl:** Hlavním cílem této práce bylo vytvořit rozsáhlou databázi případů variant lidského chromozomu 9 a to z retrospektivních dat – záznamů několika vybraných cytogenetických laboratoří a na speciálních souborech odhadnout populační četnost variant chromozomu 9.
- **Hypotéza:** Zahraniční studie uvádějí heterochromatinové varianty jako relativně časté populační nálezy (jednotky procent). Rozsáhlejší studie prováděné na české populaci ovšem chybí, předpokladem bylo, že varianty chromozomu 9 budou nalezeny alespoň u 1 % populace.

7.2 Molekulárně-cytogenetická část:

- **Cíl:** Hlavním cílem v této části bylo navrhnout (na základě zahraničních zkušeností) a zavést jednoduchou metodiku multipróbové FISH určenou k bližší charakterizaci heterochromatinových variant chromozomu 9 bez nutnosti využívat mikrodisekční sondy.
- **Hypotéza:** Předpokládali jsme nalezení optimální kombinace jednoduchých – komerčně dodávaných sond k vytvoření vlastního diagnostického „kitu“ pro pokročilejší, ale snadno dostupnou molekulárně cytogenetickou diagnostiku heterochromatinových variant chromozomu 9.

7.3 Klinicko-genetická část:

- **Cíl:** Ověření možné asociace heterochromatinových variant chromozomu 9 s vyšším rizikem reprodukčních poruch.
- **Hypotéza:** Nalezení vyššího zastoupení heterochromatinových variant chromozomu 9 u osob vyšetřovaných z důvodu idiopatické reprodukční poruchy oproti četnosti stejných variant v kontrolní skupině.

8 Metodika

V souladu s cíli je problematika heterochromatinových variant lidského chromozomu 9 studována ze tří různých pohledů. Proto jsou jednotlivé okruhy metodických postupů uvedeny po řadě a zvlášť.

8.1 Epidemiologická studie:

Pro epidemiologickou část studie byla využita data získaná z archivů cytogenetických laboratoří tří pracovišť lékařské genetiky. Jde o tato pracoviště:

- Ústav biologie a lékařské genetiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, Cytogenetická laboratoř (dále jen ÚBLG 1. LF UK a VFN)
- Oddělení lékařské genetiky Thomayerovy nemocnice, Cytogenetická laboratoř (dále jen OLG TN)
- Oddělení lékařské genetiky, Sanatorium Pronatal, Cytogenetická laboratoř (dále jen Sanatorium Pronatal).

Všechna tato pracoviště provádějí rutinní – klinickou cytogenetickou diagnostiku.

Výsledky vyšetření jsou dle zvyklostí archivovány, a to leckdy i po mnoho let. Archivy cytogenetických laboratoří těchto tří pracovišť nám byly zpřístupněny pro výzkumnou činnost na základě naší oficiální žádosti. Pro upřesnění je třeba dodat, že jsme se žádostí oslovili i jiná pracoviště, z toho u dalších čtyř pracovišť (dvou pražských a dvou mimopražských) jsme po kladné odpovědi vedení jednotlivých pracovišť rovněž získali určitá data. Pro publikační účely a nakonec i pro účely této práce však tato data nakonec nemohla být využita, hlavními důvody byly:

- Neúplnost databází (některé roky/případy nebyly v archivech dostupné).
- Neúplnost informací (procento případů bez uvedené klinické indikace bylo významně velké).
- Nejednoznačné zápisy výsledků (interní dokumentace neumožňovala blíže upřesnit typ zachycené varianty, šlo například o poznámky typu „varianta chromozomu 9“).
- Nejasnosti ohledně hodnocení/zápisu variant chromozomu 9 (v archivu pracoviště střídání období, kdy byly varianty zaznamenávány a období, kdy varianty nebyly součástí definitivního výsledku).



Soubory s inv(9): #1inv, #2, #3

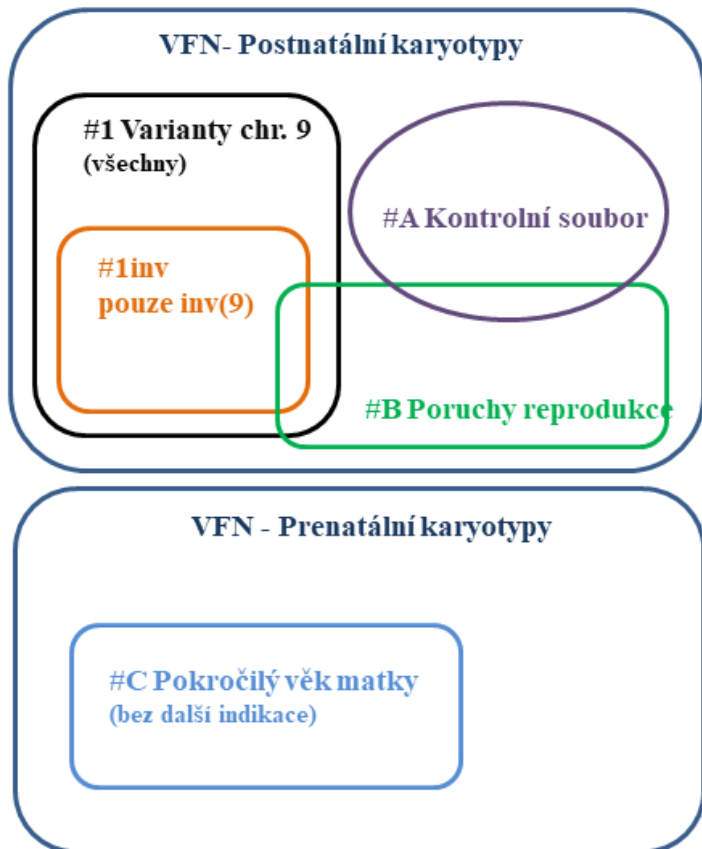
Populační soubory: #C, #D, #E

Reprodukční porucha: #B

Kontrolní soubor: #A



Schéma 8.1 – Přehledné zobrazení jednotlivých typů souborů a jejich provázanost



Laboratoře, jejichž data nakonec využíváme, měly nejpodrobnější (a dohledatelné) informace o klinických indikacích a rovněž styl hodnocení variant a jejich zápisů byl konzistentní (na všech třech pracovištích bylo navíc možné konzultovat metodiku hodnocení a zápisu variant chromozomu 9 – a to v „dobách historických“). V práci se tak držíme publikovaných dat z těchto tří laboratoří. Pro potřeby různých částí výzkumu bylo vytvořeno hned několik specifických databází – souborů (graficky viz též Schéma 8.1). V rámci našich publikací jsou v některých případech využita data za kratší časové období, než je uvedeno v následujícím přehledu.

8.1.1 Databáze vytvořené v rámci ÚBLG 1. LF UK a VFN

Obecná charakteristika pracoviště: Cytogenetická laboratoř ÚBLG 1. LF UK a VFN je přímo napojená na ambulanci lékařské genetiky stejného pracoviště. Jde o pracoviště s neselektovaným příjmem, které provádí diagnostiku jak u dětí, tak i u dospělých, a to včetně párů s poruchou reprodukce. Pracoviště přijímá vzorky i z dalších oddělení VFN v Praze.

Základní soubor (#1) - Databáze veškerých variant lidského chromozomu 9

- Časové období: 1986-2016 (31 let)
- Celkem záznamů za období: **14 078**
- Celkem případů zařazených do databáze: **464**
- Typ materiálu: krev (periferní, velmi vzácně fetální krev)
- Indikace v rámci pracoviště: smíšené indikace, zahrnující jak variabilní pediatrické indikace, tak i široké spektrum indikací spojených s lidskou reprodukcí.
- Kritéria pro zařazení: uzavřené vyšetření karyotypu jedince (bez rozdílů věku a pohlaví) z periferní (vzácně fetální) krve, jehož výsledkem je nález jakékoliv heterochromatinové varianty lidského chromozomu 9 (pericentrická inverze, délkové varianty, kombinované varianty).
- Důvody k nezařazení/vyřazení: duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku (zvláště u starších záznamů).
- Hlavní zaznamenané proměnné: typ vyšetření, indikace, věk, pohlaví, výsledek vyšetření.

Podsoubor (#1inv) - Databáze případů pericentrické inverze chromozomu 9

- Časové období: 1986-2016 (31 let)
- Celkem záznamů za období: **14 078**
- Celkem případů zařazených do databáze: **215**
- Typ materiálu: krev (periferní, velmi vzácně fetální krev)
- Indikace v rámci pracoviště: smíšené indikace, zahrnující jak variabilní pediatrické indikace, tak i široké spektrum indikací spojených s lidskou reprodukcí.

- Kritéria pro zařazení: uzavřené vyšetření karyotypu jedince (bez rozdílu věku a pohlaví) z periferní (raritně fetální) krve, jehož výsledkem je nálezn jakékoliv variantní formy inverze chromozomu 9.
- Důvody k nezařazení/vyřazení: duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku (zvláště u starších záznamů).
- Hlavní zaznamenané proměnné: typ vyšetření, indikace, věk, pohlaví, výsledek vyšetření.

Speciální soubor (#A) – kontrolní skupina osob s normálním výsledkem cytogenetického vyšetření:

- Časové období: 1987-2011 (25 let)
- Celkem záznamů za období: **10 835**
- Celkem případů zařazených do databáze: **661**
- Typ materiálu: krev (periferní, velmi vzácně fetální krev)
- Indikace v rámci pracoviště: smíšené indikace, zahrnující jak variabilní pediatrické indikace, tak i široké spektrum indikací spojených s lidskou reprodukcí.
- Kritéria pro zařazení: uzavřené vyšetření karyotypu jedince (bez rozdílu věku a pohlaví) z periferní (raritně fetální) krve, jehož výsledkem je normální karyotyp (bez jakýchkoliv patologií i bez jakýchkoliv variant). Zařazování případů do souboru bylo provedeno metodou náhodného výběru s využitím jednotného výběrového kroku (n = 10) (například Brewer et al., 1963), pokud případ vyhověl podmínkám pro zařazení a nebyly naplněny podmínky pro vyřazení.
- Důvody k nezařazení/vyřazení: duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku (zvláště u starších záznamů).
- Hlavní zaznamenané proměnné: typ vyšetření, indikace, věk, pohlaví, výsledek vyšetření.

Speciální soubor (#B) – Skupina osob s idiopatickou reprodukční poruchou

- Časové období: 2007 - 2010 (4 roky)
- Celkem záznamů za období: **2 467**
- Celkem případů zařazených do databáze: **1 036**
- Typ materiálu: krev (pouze periferní krev)
- Kritéria pro zařazení: úspěšně dokončené cytogenetické vyšetření prováděné z důvodu idiopatické reprodukční poruchy charakteru sterility a/nebo infertility u osob obou pohlaví, bez ohledu na výsledek karyotypu (norma/varianta/patologie).
- Důvody k nezařazení/vyřazení: duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku, vyšetření karyotypu z důvodu reprodukční poruchy při přítomnosti jiné známé/suspektní příčiny.
- Hlavní zaznamenané proměnné: typ vyšetření, indikace, věk, pohlaví, výsledek vyšetření.

Speciální soubor (#C) – Skupina plodů vyšetřených v rámci prenatalní diagnostiky z důvodu pokročilého věku matky

- Časové období: 2003 - 2011 (9 let)
- Celkem záznamů za období: **2 970**
- Celkem případů zařazených do databáze: **1 064**

- Typ materiálu: plodová voda
- Kritéria pro zařazení: úspěšně dokončené cytogenetické vyšetření provedené u plodů, kde jediným důvodem k invazivní prenatalní diagnostice (v tomto případě pouze k odběru plodové vody) a karyotypizaci byl pokročilý věk matek (35 let a více v době porodu), a to bez ohledu na výsledek karyotypu (norma/varianta/patologie).
- Důvody k nezařazení/vyřazení: případy plodů, kde byla mimo pokročilý věk matky jako indikace zároveň popsána abnormalita screeningového či ultrazvukového vyšetření, duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku.
- Hlavní zaznamenané proměnné: typ vyšetření, indikace, věk (matky), pohlaví (plodu), výsledek vyšetření.

8.1.2 Databáze vytvořené v rámci OLG TN

Obecná charakteristika pracoviště: Cytogenetická laboratoř OLG TN je přímo napojená na ambulanci lékařské genetiky stejného pracoviště. Také zde jde o pracoviště s neselektovaným příjmem, značnou část pacientů tvoří děti, pracoviště provádí ale i cytogenetická vyšetření u dospělých, opět včetně párů s reprodukční poruchou. Pracoviště vyšetřuje vzorky i pro další oddělení Thomayerovy nemocnice.

Základní soubor (#2) – Databáze případů pericentrické inverze chromozomu 9

- Časové období: 1981-2012 (32 let)
- Celkem záznamů za období: **9 138**
- Celkem vybraných případů: **143**
- Typ materiálu: krev (periferní, velmi vzácně fetální krev)
- Indikace: smíšené indikace, zahrnující jak variabilní pediatrické indikace, tak i široké spektrum indikací spojených s lidskou reprodukcí.
- Kritéria pro zařazení: uzavřené vyšetření karyotypu jedince (bez rozdílu věku a pohlaví) z periferní (raritně fetální) krve, jehož výsledkem je nález jakékoliv variantní formy inverze chromozomu 9.
- Důvody k nezařazení/vyřazení: duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku.

Speciální soubor (#D) – Skupina dětí arbitrárně cytogeneticky vyšetřovaných v souvislosti s jejich zařazením do programu náhradní rodinné péče

- Časové období: 1997-2011 (15 let)
- Celkem záznamů za období: **4 427**
- Celkem případů zařazených do databáze: **814**
- Typ materiálu: krev (pouze periferní krev)
- Kritéria pro zařazení: vyšetření karyotypu indikované u dětí v rámci jejich arbitrárního genetického vyšetření před zařazením do programu náhradní rodinné péče („dětí určené k adopci“), bez ohledu na výsledek karyotypu (norma/varianta/patologie).
- Důvody k nezařazení/vyřazení: duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku (zvláště u starších záznamů).

8.1.3 Databáze vytvořené v rámci Sanatoria Pronatal

Obecná charakteristika pracoviště: Cytogenetická laboratoř v rámci Sanatoria Pronatal je součástí pracoviště asistované reprodukce a oproti dvěma předchozím pracovištím je zde limitované spektrum indikací, mezi kterými významně převažují osoby s reprodukční poruchou (sterilita či infertilita) a dárci pohlavních buněk.

Základní soubor (#3) – Databáze případů pericentrické inverze chromozomu 9

- Časové období: 2002 - 2011 (10 let)
- Celkem záznamů za období: **7 053**
- Celkem vybraných případů: **120**
- Typ materiálu: krev (pouze periferní krev)
- Indikace: omezené spektrum indikací, zaměřené prakticky výhradně na osoby s reprodukční poruchou, osoby podstupující asistovanou reprodukci a potenciální dárce gamet.
- Kritéria pro zařazení: uzavřené vyšetření karyotypu jedince (bez rozdílu věku a pohlaví) z periferní krve, jehož výsledkem je nález jakékoliv variantní formy inverze chromozomu 9.
- Důvody k nezařazení/vyřazení: duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku.

Speciální soubor (#E) – Skupina dárců pohlavních buněk

- Časové období: 2002 - 2011 (10 let)
- Celkem záznamů za období: **7 053**
- Celkem případů zařazených do databáze: **2 288**
- Typ materiálu: krev (pouze periferní krev)
- Kritéria pro zařazení: vyšetření karyotypu u dárkyní oocytů či dárců spermií, bez ohledu na výsledek karyotypu (norma/varianta/patologie).
- Důvody k nezařazení/vyřazení: duplicita záznamu (opakovaná vyšetření), nejasný zápis výsledku.

8.1.4 Metody deskriptivní epidemiologie

Základní charakteristika souborů variant chromozomu 9 byla provedena na třech základních souborech (**#1**, respektive **#1inv**, **#2** a **#3**) a to následujícím způsobem:

- Stanovení laboratorních incidencí inv(9), případně dalších variant chromozomu 9 (četnost varianty / všechna vyšetření za dané období).
- Stanovení poměru pohlaví osob s inv(9).
- Zhodnocení klinických indikací u osob s inv(9), případně s dalšími variantami.
Rozdělení těchto indikací do následujících skupin:

- **Darování pohlavních buněk:** potenciální dárci gamet, u kterých bylo v předepsaném protokolu přistoupeno k cytogenetickému vyšetření.
- **Downův syndrom v rodinné anamnéze:** osoby vyšetřované (např. v souvislosti s plánováním gravidity) kvůli výskytu Downova syndromu v rodině.
- **Náhradní rodinná péče:** děti vyšetřované cytogeneticky před zařazením do programu náhradní rodinné péče.
- **Ověření karyotypu:** osoby vyšetřované z důvodu přítomnosti chromozomové přestavby (patologie, či nápadnější varianty) u nejbližších příbuzných. Případy, kdy tímto chromozomovým nálezem byla varianta chromozomu 9, jsou vyčleněny zvlášť (viz níže).
- **Ověření varianty chromozomu 9 v rodinné anamnéze:** osoby vyšetřované z důvodu přítomnosti varianty chromozomu 9 u nejbližších příbuzných.
- **Psychomotorická a mentální retardace:** osoby (děti) vyšetřované kvůli různým odchylkám psychického a/nebo mentálního vývoje.
- **Porucha růstu a vývoje:** osoby (děti) vyšetřované kvůli abnormálnímu (většinou malému) vzrůstu či poruše sexuálního vývoje.
- **Porucha spermatogeneze:** muži s patologickým spermioqramem.
- **Sterilita a infertilita:** osoby (muži i ženy) vyšetřované pro idiopatickou reprodukční poruchu (muži s jasnou poruchou spermioqramu jsou řazeni zvlášť – viz výše) charakteru sterility (nedaří se otěhotnět) či infertility (nedaří se donosit plod).
- **Vrozené vývojové vady:** osoby (děti) se strukturními vývojovými vadami či malformačními syndromy.
- **Vrozené vývojové vady v rodinné anamnéze:** osoby vyšetřované z důvodu přítomnosti somatické vývojové vady/malformačního syndromu (Downův syndrom jako samostatná indikační skupina uveden výše) u nejbližších příbuzných.
- **Jiné:** osoby vyšetřované z jiných důvodů (indikace hematologické, imunologické, onkologické a další).

8.1.5 Odhady populační incidence inv(9)

Populační četnost inv(9) jsme odhadovali na základě laboratorní četnosti případů inv(9) ve třech speciálních souborech (soubory #C, #D, #E). Četnost byla stanovena jako počet

případů s nálezem inv(9) / počet všech případů v daném speciálním souboru. Incidence byla stanovena jak celkově, tak i zvlášť pro mužské a ženské pohlaví. Rozdíl četností inv(9) u mužů a žen byl následně statisticky zhodnocen (metodika statistické analýzy viz dále).

Všechny tři soubory představují „zdravé“ jedince, kde indikací k vyšetření byly důvody přímo nesouvisející se zdravotním stavem jedince. Konkrétně:

- **#C:** indikací k vyšetření plodů byl pouze pokročilý věk matek, případy s patologickým výsledkem biochemického screeningového vyšetření či s patologickým nálezem ultrazvukového vyšetření byly vyřazeny.
- **#D:** indikace k vyšetření dětí je sociálního charakteru, na základě zvyklostí bylo u dětí určených k zařazení do programu náhradní rodinné péče indikováno genetické vyšetření (jehož součástí bylo vyšetření karyotypu).
- **#E:** indikací k vyšetření potenciálních dárců gamet je jejich zájem stát se dárci. K cytogenetickému vyšetření jsou nicméně zpravidla indikovány pouze osoby, které splní určité podmínky stran osobní i rodinné anamnézy (můžeme je tedy považovat za klinicky zdravé osoby).

8.2 Molekulárně cytogenetická analýza

Hlavním cílem této části projektu bylo navrhnout, otestovat a optimalizovat molekulárně cytogenetickou metodiku, využívající metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s využitím více sond (mutlipróbová FISH). Hlavní podmínky (vycházející z aktuálních možností naší laboratoře) byly následující:

- Metodika musí být přínosnější pro rozlišení jednotlivých (sub)variant chromozomu 9 nežli klasické C-pruhování.
- Metodika musí být založena na běžně (komerčně) dostupných sondách.
- Vybrané sondy musí být využitelné v rámci standardizovaného a jednotného protokolu (zejména v oblasti denaturace, hybridizace aj.) pro FISH diagnostiku.
- Metodika musí poskytovat jednoznačné a dobře identifikovatelné signály bez nežádoucích cross-hybridizací.

Vzorky k vyšetření byly získány od vybraných osob s nálezem varianty lidského chromozomu 9, které byly vyšetřeny v cytogenetické laboratoři ÚBLG 1. LF UK a VFN či Genetického oddělení Sanatoria Pronatal. Vlastní vyšetření pomocí multipróbové FISH

bylo prováděno v rámci výzkumného projektu financovaného Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (projekt č. 565312 *Molekulárně cytogenetická charakteristika variant heterochromatinové oblasti lidského chromozomu 9*), schváleného Etickou komisí VFN v Praze.

Do projektu byly vybírány osoby podle následujícího klíče:

- Přítomna je pericentrická inverze a/nebo délková varianta heterochromatinu chromozomu 9 zjištěná v rámci předchozího cytogenetického vyšetření. Písemný souhlas probanda s doplňkovým molekulárně-cytogenetickým (FISH) vyšetřením v rámci výše uvedeného výzkumného projektu.
- Dostupnost vzorku buněčné suspenze z předchozího vyšetření, případně ochota probanda podstoupit nový odběr venózní krve.

I po skončení tříletého výzkumného projektu bylo toto vyšetření dále prováděno, a to u nově zachycených případů varianty chromozomu 9 na našem pracovišti (ÚBLG 1. LF UK a VFN), pokud byl vysloven souhlas těchto osob s využitím vzorku k vyšetření v rámci výzkumu. Během následujících let bylo toto naše vyšetření vyžádáno jako doplněk rutinního cytogenetického vyšetření pro upřesnění nálezu v osmi případech, kdy šlo i o ne-variantní přestavby chromozomu 9, které určitým způsobem zasahovaly námi vyšetřovanou oblast. Celkem bylo takto vyšetřeno 52 osob s různými variantami či přestavbami.

Náš základní protokol je vyobrazen na schématu 8.2. Využívá celkem tři FISH sondy, které poskytují čtyři signály na (normálním) chromozomu 9. Jde o kombinaci alfa satelitní centromerické sondy, DNA-III satelitní sondy a specifické BAC (Bacterial Artificial Chromosome) sondy z RP-11 (RPCI-11) knihovny (Osoegawa et al., 2001). Cíleně byly vybrány tyto sondy (uvádíme konkrétní komerčně dostupné sondy, které poskytovaly výsledky v dostatečné kvalitě):

- Alfa-satelitní centromerická sonda specifická pro chromozom 9 – CEP9 (fluorochrom: SpectrumAqua), výrobce: Abbott Molecular Inc, Des Plaines, USA.
- DNA-III satelitní sonda specifická pro chromozom 9 (fluorochrom: ZyOrange), výrobce: ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Německo.
- BAC (původně BlueGnome Ltdm Cambridge, UK, dnes Illumina, San Diego, Kalifornie, USA), fluorochrom: SpectrumGreen)

- BlueFISH probe, Specifikace: RP11-211N8 (9p11.2, přesná pozice na chromozomu 9 dle GRCh37/hg19: 46,808,015-46,947,613, velikost: 139,599 bp)
- BlueFISH probe, Specifikace: RP11-45O22 (9p12, přesná pozice na chromozomu 9 dle GRCh37/hg19: 41,665,371-41,867,393, velikost 202,023 bp)
- BlueFISH probe, Specifikace: RP11-402N8 (9p13.1, přesná pozice na chromozomu 9 dle GRCh37/hg19: 38,804,004-38,851,913; velikost 47,910 bp)
- BlueFISH probe, Specifikace: RP11-211E19 (9q21, přesná pozice na chromozomu 9 dle GRCh37/hg19: 70,091,000-71,043,000; velikost 952,000 bp) (Kosyakova et al., 2013)

Základním materiálem pro vyšetření byla buněčná suspenze pro cytogenetické vyšetření získaná ze vzorku periferní krve podle standardních laboratorních postupů dle doporučení a protokolů uvedených v publikaci Human Chromosomes: principles and techniques (Verma et Babu, 1995).

Vlastní FISH analýza probíhala podle standardního pracovního postupu pro FISH diagnostiku v Cytogenetické laboratoři Ústavu biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN (PP-UBLG-50-007, verze 3 – Příloha 1). S ohledem na ekonomičnost se nám nejvíce osvědčilo připravovat sondu pro vyšetření tří skel (celkový objem 18 μ l) v poměru: 10 μ l LSI pufru + 1 μ l CEP 9 sondy + 1 μ l zvolené BAC sondy (od Pentagen) + 6 μ l III satelitní centromerické sondy (ready to use). Vodu jsme nepoužívali. Z této směsi jsme použili 6 μ l na jedno vyšetření - pod krycí sklo 18x18 mm. Vlastní vyšetření bylo provedeno ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse 90i, obrazová analýza pak v systému analýzy obrazu: LUCIA 1.6.1 (Laboratory Imaging s.r.o.).

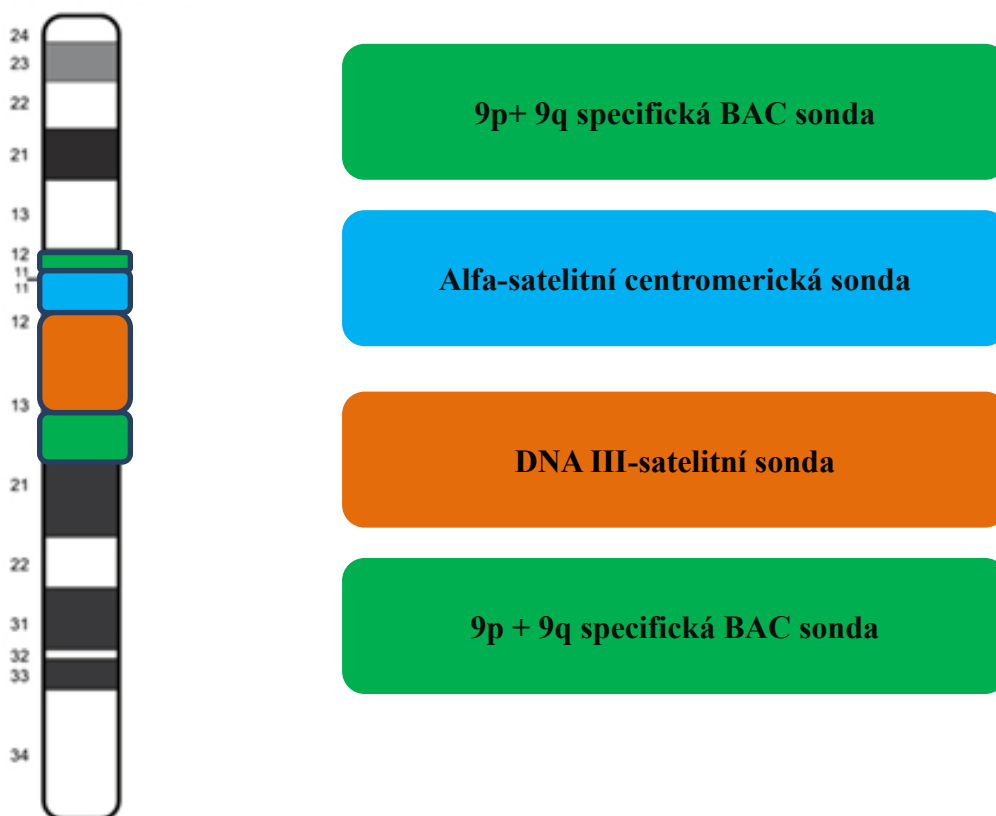


Schéma 8.2 – Naše metodika FISH vyšetření variantního chromozomu 9 s využitím tří komerčně dostupných FISH sond. Barvy na schématu odpovídají zvolenému fluorochromu. Zvolené BAC sondy hybridizují na homologních oblastech pericentromerické oblasti chromozomu 9, jejich signál je tak rozdvojen do oblastí 9p12 a 9q13.

8.3 Testování asociace variant chromozomu 9 s lidskými patologiemi

Testování možných asociací variant lidského chromozomu 9 s různými typy lidských patologií bylo provedeno dvoufázově. V první fázi jsme porovnávali četnost jednotlivých skupin indikací u osob s inv(9) z dat ÚBLG 1. LF UK a VFN (soubor #1inv) a porovnali je s četností stejných indikačních skupin (skupiny jsou již uvedeny podrobně v kapitole 8.2) v kontrolním souboru osob ze stejného pracoviště (soubor #A). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

Z této první fáze studie (v souladu s literaturou) se jako nejpravděpodobnější asociace ukázala skupina sterility a infertility – obecně tedy idiopatické reprodukční poruchy. Ve druhé fázi jsme tedy přistoupili k cílenému porovnání četností heterochromatinových variant lidských chromozomů ve skupině osob vyšetřovaných z důvodů idiopatické reprodukční poruchy (speciální soubor #B) a četností stejných polymorfismů ve skupině

plodů, vyšetřovaných pouze z důvodu pokročilého věku (35 let a více v době porodu) jejich matek (soubor #C). Rozdíly v četnosti těchto variant mezi oběma skupinami byly následně statisticky vyhodnoceny.

Hodnoceny byly varianty všech čtyř lidských chromozomů s velkým blokem konstitutivního heterochromatinu vedené v ISCN nomenklatuře jako varianty, tedy:

- 1qh+
- 1qh-
- 9qh+
- 9qh-
- inv(9)(p12q13)
- 16qh+
- 16qh-
- Yqh+
- Yqh-

8.4 Databáze

Základní i specifické soubory byly vedeny v tabulkovém procesoru MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Vzhledem k citlivosti údajů byly databáze chráněny heslem. Ve stejném programu byly prováděny i základní deskriptivní analýzy souborů.

8.5 Statistické zpracování

Pokročilé statistické zhodnocení bylo provedeno v programech GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) a v programu R (R Development Core Team, <http://www.r-project.org/>). Většina výpočtů využila Fisherův test přesné shody, konkrétní informace jsou uvedeny u každé skupiny výsledků v kapitole Výsledky). Hodnoty p nižší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

9 Výsledky

9.1 Četnost variant chromozomu 9 v laboratorních souborech a přehled indikací k cytogenetickému vyšetření

Nejprve uvádíme výsledky deskriptivní analýzy laboratorního souboru veškerých variant chromozomu 9 z archivu ÚBLG 1. LF UK a VFN (soubor #1). V rámci veškerých vyšetření karyotypu za období 31 let byla některá z variant chromozomu 9 nalezena celkem u 464 osob z 14 078 provedených vyšetření (laboratorní incidence 3,29 %). Z tohoto množství bylo 267 žen (57,5 %) a 197 mužů (42,5 %), poměr pohlaví F/M = 1,35.

Pericentrická inverze chromozomu 9 (inv(9)) byla nalezena celkem u 215 osob (128 žen a 87 mužů, F/M = 1,47), délkové varianty chromozomu 9 pak u 254 osob, z toho 142 žen a 112 mužů (F/M = 1,27). Prodloužení heterochromatinu (9qh+) bylo detekováno u 206 osob (118 žen a 88 mužů, F/M = 1,34) a zkrácení heterochromatinového bloku (9qh-) bylo nalezeno u 48 osob (24 žen a 24 mužů, F/M = 1,00). Pro úplnost (a vysvětlení rozdílu mezi celkovými počty) je třeba dodat, že u dvou žen a dvou mužů byla nalezena jak inv(9), tak i některá z délkových variant. Vše je shrnuto v Tabulce 9.1.

	inv(9)	9qh+	9qh-	Délkové varianty	Všechny varianty
Muži	87	88	24	112	197
Ženy	128	118	24	142	267
Celkem	215	206	48	254	464
F/M ratio	1,47	1,34	1,00	1,27	1,36

Tabulka 9.1 – Počty mužů a žen a poměr pohlaví podle typu varianty chromozomu 9. Celkové součty s drobnou odchylkou, neboť u několika osob byla nalezena inverze i délková varianta zároveň. (VFN, soubor #1).

Laboratorní incidence inv(9) ve sledovaném období byla 1,53 %, laboratorní incidence 9qh+ byla 1,46 % a laboratorní incidence 9qh- byla 0,3 %.

U 30 osob (13 žen a 17 mužů) byla některá z variant chromozomu 9 nalezena v kombinaci s další chromozomovou odchylkou, kterou již bylo jednoznačně možné označit za patologický nález. Mezi těmito patologiemi bylo celkem 8 numerických odchylek autozomů, 7 numerických odchylek gonozomů a 11 strukturních chromozomových aberací.

Pro hodnocení indikačních diagnóz však tyto osoby s jinou chromozomální patologií nemohly být zařazeny, čímž se celkový počet osob v souboru snížil na 434 (254 žen a 180 mužů). Celkové zastoupení jednotlivých indikačních diagnóz (v absolutních i relativních číslech ukazuje Tabulka 9.2.

Pro lepší porovnání se soubory #2 a #3 také v tomto místě vyčleňujeme podskupinu souboru #1 a to podsoubor #1_{inv}, který obsahuje pouze případy inv(9). Jak již bylo uvedeno výše, šlo o 215 osob, po vyřazení případů, kde je přítomna patologická změna karyotypu, pak šlo o 201 osob (120 žen a 81 mužů), zastoupení jednotlivých typů indikačních diagnóz je v tabulce 9.3.

Indikační diagnóza	Počet (n)	Zastoupení (%)
Náhradní rodinná péče	1	0,23
Ověření varianty chromozomu 9 v rodinné anamnéze	31	7,14
Darování pohlavních buněk	11	2,53
Porucha spermatogeneze	8	1,84
Downův syndrom v rodinné anamnéze	9	2,07
Ověření karyotypu	12	2,76
Porucha růstu a vývoje	30	6,91
Psychomotorická a mentální retardace	29	6,68
Vrozená vývojová vada v rodinné anamnéze	29	6,68
Vrozené vývojové vady	55	12,67
Jiná diagnóza	35	8,06
Sterilita a infertilita	184	42,40
Celkem	434	100,00

Tabulka 9.2 – Zastoupení jednotlivých indikací k vyšetření karyotypu u osob s variantami chromozomu 9 (VFN, soubor #1).

Obdobné analýzy byly provedeny i pro základní soubory z dalších dvou pracovišť (soubory #2 a #3). Tyto soubory se od souboru #1 odlišují tím, že obsahují pouze případy osob se zachycenou inv(9), nikoliv případy délkových variant chromozomu 9. Hlavním důvodem pro tento omezený výběr byly příliš velké nehomogenity při zápisu/hodnocení délkových variant chromozomu 9 ve sledovaném časovém období.

Indikační diagnóza	Počet (n)	Zastoupení (%)
Náhradní rodinná péče	0	0,00
Ověření varianty chromozomu 9 v rodinné anamnéze	27	13,43
Darování pohlavních buněk	7	3,48
Porucha spermatogeneze	2	1,00
Downův syndrom v rodinné anamnéze	7	3,48
Ověření karyotypu	4	1,99
Porucha růstu a vývoje	14	6,97
Psychomotorická a mentální retardace	15	7,46
Vrozená vývojová vada v rodinné anamnéze	9	4,48
Vrozené vývojové vady	26	12,94
Jiná diagnóza	14	6,97
Sterilita a infertilita	76	37,81
Celkem	201	100,00

Tabulka 9.3 – Zastoupení jednotlivých indikací k vyšetření karyotypu u osob s pericentrickou inverzí chromozomu 9 (VFN, soubor #1inv).

V rámci souboru #2 bylo zachyceno 143 případů inv(9), z toho bylo 72 žen a 71 mužů (F/M ratio = (1,01). Laboratorní incidence inv(9) ve sledovaném období = 1,56 %. Ve třech případech byla spolu s inv(9) zachycena i jasná chromozomální patologie (1x Downův syndrom, 1x Klinefelterův syndrom, 1x reciproká translokace), ohledně indikačních diagnóz tak byla dále posuzována již jen skupina 140 zbylých případů (z toho 71 žen a 69 mužů). Výsledné spektrum indikačních diagnóz v souboru #2 shrnuje Tabulka 9.4.

Indikační diagnóza	Počet (n)	Zastoupení (%)
Náhradní rodinná péče	14	10,00
Ověření varianty chromozomu 9 v rodinné anamnéze	4	2,86
Darování pohlavních buněk	0	0,00
Porucha spermatogeneze	1	0,71
Downův syndrom v rodinné anamnéze	4	2,86
Ověření karyotypu	7	5,00
Porucha růstu a vývoje	3	2,14
Psychomotorická a mentální retardace	20	14,29

Vrozená vývojová vada v rodinné anamnéze	8	5,71
Vrozené vývojové vady	25	17,86
Jiná diagnóza	17	12,14
Sterilita a infertilita	37	26,43
Celkem	140	100,00

Tabulka 9.4 – Zastoupení jednotlivých indikací k vyšetření karyotypu u osob s pericentrickou inverzí chromozomu 9 (TN, soubor #2).

Posledním z těchto základních souborů je soubor #3 ze Sanatoria Pronatal. V rámci tohoto souboru bylo zachyceno celkem 121 případů inv(9), z toho bylo 82 žen a 39 mužů (F/M Ratio 2,10), laboratorní incidence inv(9) ve sledovaném období byla 1,71 %. Z posuzování indikačních diagnóz byl vyřazen jediný případ (spolu s inv(9) byla přítomna mozaika Turnerova syndromu), dále tak bylo analyzováno 120 případů (81 žen a 39 mužů). Přehledně jsou absolutní i relativní počty jednotlivých indikačních diagnóz znázorněny v Tabulce 9.5.

Indikační diagnóza	Počet (n)	Zastoupení (%)
Náhradní rodinná péče	0	0,00
Ověření varianty chromozomu 9 v rodinné anamnéze	0	0,00
Darování pohlavních buněk	42	35,00
Porucha spermatogeneze	8	6,67
Downův syndrom v rodinné anamnéze	0	0,00
Ověření karyotypu	0	0,00
Porucha růstu a vývoje	0	0,00
Psychomotorická a mentální retardace	0	0,00
Vrozená vývojová vada v rodinné anamnéze	5	4,17
Vrozené vývojové vady	0	0,00
Jiná diagnóza	7	5,83
Sterilita a infertilita	58	48,33
Celkem	120	100,00

Tabulka 9.5 – Zastoupení jednotlivých indikací k vyšetření karyotypu u osob s pericentrickou inverzí chromozomu 9 (Pronatal, soubor #3).

Celkovým výstupem z této části studie je soubor všech případů inv(9) (bylo provedeno vyhledání možných duplicit – osob vyšetřených opakovaně ve více laboratořích – pomocí rodného čísla, ale žádné duplicity nebyly nalezeny). Tento výsledný soubor (tedy soubory #1inv + #2 + #3) čítá celkem 461 osob (272 žen a 189 mužů, F/M = 1,44), rozdělení všech indikačních diagnóz je v Tabulce 9.6.

Indikační diagnóza	VFN	TN	Pronatal	Celkem	%
Náhradní rodinná péče	0	14	0	14	3,04
Ověření varianty chromozomu 9 v rodinné anamnéze	27	4	0	31	6,72
Darování pohlavních buněk	7	0	42	49	10,63
Porucha spermatogeneze	2	1	8	11	2,39
Downův syndrom v rodinné anamnéze	7	4	0	11	2,39
Ověření karyotypu	4	7	0	11	2,39
Porucha růstu a vývoje	14	3	0	17	3,69
Psychomotorická a mentální retardace	15	20	0	35	7,59
Vrozená vývojová vada v rodinné anamnéze	9	8	5	22	4,77
Vrozené vývojové vady	26	25	0	51	11,06
Jiná diagnóza	14	17	7	38	8,24
Sterilita a infertilita	76	37	58	171	37,09
Celkem	201	140	120	461	100,00

Tabulka 9.6 – Zastoupení jednotlivých indikací k vyšetření karyotypu u osob s pericentrickou inverzí chromozomu 9 na všech třech pracovištích (soubory #1inv, #2 a #3).

Obecně lze zkonstatovat, že nejčastější indikační diagnózou na všech pracovištích byla „Sterilita a infertilita“, u dalších typů diagnóz se již více či méně projevuje specifičnost jednotlivých pracovišť (laboratoří) s ohledem na jejich změřením (popsáno v Metodice a komentováno v Diskusi).

Dále byl vytvořen speciální soubor kontrol – osob s normálním karyotypem a to z archivu na pracovišti VFN (speciální soubor #A). Jde o soubor 661 osob (337 žen a 324 mužů; F/M ratio 1,04) u kterých byly rovněž zaznamenány indikační diagnózy, jejichž rozložení je znázorněno v tabulce 9.7. Také zde je nejčastější indikační diagnózou „sterilita a infertilita“, ovšem s nižší frekvencí oproti souboru osob s inverzí (#1inv).

Indikační diagnóza	Počet (n)	Zastoupení (%)
Náhradní rodinná péče	1	0,15
Ověření varianty chromozomu 9 v rodinné anamnéze	3	0,45
Darování pohlavních buněk	13	1,97
Porucha spermatogeneze	15	2,27
Downův syndrom v rodinné anamnéze	25	3,78
Ověření karyotypu	38	5,75
Porucha růstu a vývoje	45	6,81
Psychomotorická a mentální retardace	51	7,72
Vrozená vývojová vada v rodinné anamnéze	58	8,77
Vrozené vývojové vady	100	15,13
Jiná diagnóza	98	14,83
Sterilita a infertilita	214	32,38
Celkem	661	100,00

Tabulka 9.7 – Zastoupení jednotlivých indikací k vyšetření karyotypu u osob s normálním nálezem - kontrolní soubor (VFN, soubor #A).

Statistické vyhodnocení rozdílu mezi četností jednotlivých indikací bylo provedeno mezi soubory získanými z VFN a to konkrétně #1inv (Tabulka 9.3) a #A (Tabulka 9.7).

Podrobná analýza proběhla v rámci záznamů do uzavřeného roku 2011 a byla publikována v naší práci z roku 2015 (Šípek Jr et al., 2015). Pomocí Fisherova testu byl statisticky významný rozdíl v indikačních diagnózách prokázán v jediném případě, a to v případě ověřování karyotypu („Ověření karyotypu“ + „Ověření varianty chromozomu 9 v rodinné anamnéze“) s p -hodnotou $p = 0,0004319$ a 95% intervalem spolehlivosti pro poměr šancí 1,51-4,60. Tento výsledek byl očekávaný (varianty jsou v drtivé většině případů zděděné od jednoho z rodičů a v určitých dobách byl význam nález varianty chromozomu 9 u potomka ověřován vyšetřením karyotypu obou rodičů – proto tato závislost) a dále jej nekomentujeme.

Podrobnější analýza jednotlivých indikačních diagnóz dle závislosti na pohlaví prokázala, že v případě nejčastější (a s ohledem na hlavní hypotézy projektu také nejvýznamnější) indikační diagnózy – bylo potvrzeno statisticky vyšší zastoupení diagnózy reprodukční poruchy u žen s inv(9), u mužů tento trend prokázán nebyl; *p*-hodnota z Fisherova testu je 0,0039 a 95% interval spolehlivosti pro poměr šancí je 1,30 až 4,74.

9.2 Odhad populační četnosti inv(9)

V rámci výše uvedených souborů případů **#1inv**, **#2** a **#3** byla v rámci každé laboratoře hodnocena tzv. laboratorní incidence inv(9), tedy procento případů inv(9) ze všech vyšetřovaných osob v uvedeném časovém období.

V rámci kompletních souborů (za plné časové období, jak je popsáno v Metodice) byly tyto incidence inv(9):

- VFN: 1,53 %
- TN: 1,56 %
- Pronatal: 1,71 %

Laboratorní incidence do ukončeného roku 2011 byly publikovány v rámci naší studie z roku 2015 (Šípek Jr et al, 2015) a jsou shrnuty v Tabulce 9.8.

Populační incidence inv(9) byla s využitím tří speciálních souborů (**#C**, **#D** a **#E**) odhadnuta takto:

- **#C** (plody matek starších 35 let věku) s četností inv(9) = 1,13 %
- **#D** (děti zařazené do programu náhradní rodinné péče) s četností inv(9) = 1,72 %
- **#E** (dárce gamet) s četností inv(9) = 1,84 %

Celková incidence inv(9) v těchto třech specifických souborech osob nevyšetřovaných pro podezření na patologický klinický stav byla 1,63 %. Podrobnosti jsou shrnuty v Tabulce 9.9. Jak vyplývá z obou tabulek, zjištěné celkové laboratorní i teoreticky populační incidence se významně nelišily (a to ani statisticky), rozdíly jsou ale patrné v incidencích inv(9) u mužského a ženského pohlaví, a tyto rozdíly tudíž byly dále analyzovány.

9.3 Vyhodnocení poměru pohlaví v laboratorních a speciálních souborech

Jak již bylo uvedeno výše, ve všech třech souborech osob s inv(9), tedy **#1inv**, **#2** a **#3**, byla zachycena vyšší četnost inv(9) u žen, poměr pohlaví byl v celkovém souboru všech

případů s inv(9) (Tabulka 9.6) $F/M = 1,44$. Protože se tento nápadný rozdíl mezi četností inv(9) u mužského a ženského pohlaví nápadně opakoval, obrátili jsme k němu pozornost a podrobněji jej analyzovali.

Hlavní cílem bylo zhodnotit, zda je nalezený kvantitativní rozdíl mezi počtem případů inv(9) u ženského a u mužského pohlaví statisticky významný a zda případně existují i rozdíly v poměru pohlaví mezi jednotlivými laboratorními soubory. Statistická analýza byla provedena opět v rámci naší publikované studie na případech do ukončeného roku 2015 (Šípek Jr et al, 2015), přehledná tabulka z tohoto článku je vložena jako Tabulka 9.8.

Při vyhodnocení Cochran-Mantel-Haenszelovým testem se závislost mezi pohlavím a výskytem inv(9) při stratifikaci podle laboratoře neprokázala ($p = 0,205$). Obdobně se při vyhodnocení Fisherovým testem neprokázala statisticky vyšší četnost inv(9) u žen ani pro data jedné každé laboratoře zvlášť, ani při vyhodnocení dat ze všech laboratoří dohromady – v tomto případě byla p -hodnota z Fisherova testu 0,181 a 95% interval spolehlivosti pro poměr šancí 0,937 až 1,400 (podrobněji Tabulka 9.8).

Poměr pohlaví byl také přesněji hodnocen v rámci tří speciálních souborů, které byly jinak využity k odhadu populační četnosti – a to (viz výše) souborů #C (plody matek starších 35 let věku), #D (děti zařazované do programu náhradní rodinné péče) a #E (dárci gamet).

Při testování Cochran-Mantel-Haenszelovým testem se závislost mezi četností inv(9) u obou pohlaví a různým typem populačního souboru neprokázala ($p = 0,118$). Vyšší četnost inv(9) u ženského pohlaví v jednotlivých populačních souborech se (opět) neukázala být statisticky významnou a statisticky významné nebylo ani vyšší zastoupení ženského pohlaví v celkovém součtu všech tří populačních souborů, byť zde již byl výsledek Fisherova testu blízko hranici statistické významnosti ($p = 0,075$; 95% CI = 0,938 - 3,66). Také tato analýza je součástí naší publikace z roku 2015 (Šípek Jr et al, 2015) a přehled výsledků pro jednotlivé soubory je uveden v Tabulce 9.9.

Zhodnocení poměru pohlaví u dalších variant chromozomu 9, tedy délkových variant 9qh+ a 9qh- bylo provedeno orientačně pouze v rámci základního souboru #1 (Tabulka 9.1), ale nebylo dále statisticky analyzováno ani publikováno (jakkoli i zde, a na menších počtech osob, se zastoupení žen jeví vyšší).

Pracoviště (označení souboru)	Období	Celkem			Ženy			Muži			F/M poměr
		Případy inv(9)	Všechny záznamy	Laboratorní četnost (%)	Případy inv(9)	Všechny záznamy	Laboratorní četnost (%)	Případy inv(9)	Všechny záznamy	Laboratorní četnost (%)	<i>P</i> hodnota (95% CI pro OR)
ÚBLG 1, LF UK a VFN (#1inv)	1986 - 2011	170	10 933	1,55 %	105	5943	1,77 %	65	4990	1,30 %	0,052 (0,988 - 1,891)
OLG TN (#2)	1981 - 2011	131	8 611	1,52 %	66	4553	1,45 %	65	4058	1,60 %	0,597 (0,630 - 1,297)
Sanatorium Pronatal (#3)	2002 - 2011	121	7 053	1,71 %	82	4562	1,79 %	39	2491	1,57 %	0,564 (0,768 - 1,716)
Celkem		421	26597	1,58 %	252	15058	1,67 %	169	11539	1,46 %	0,181 (0,937 - 1,400)

Tabulka 9.8 – Přehled laboratorních incidencí pericentrické inverze chromozomu 9 ve všech třech zúčastněných laboratořích a zhodnocení celkového souboru včetně celkové laboratorní četnosti. Poměr pohlaví byl hodnocen pomocí Fisherova testu pro každou laboratoř zvlášť i v rámci celkových výsledků, vyšší zastoupení ženského pohlaví u nalezených nositelů inv(9) není statisticky významné (převzato z publikace Šípek Jr et al., 2015).

Speciální soubor (označení souboru)	Celkem			Ženy			Muži			F/M rozdíl
	Případy inv(9)	Všechny záznamy	Laboratorní četnost (%)	Případy inv(9)	Všechny záznamy	Laboratorní četnost (%)	Případy inv(9)	Všechny záznamy	Laboratorní četnost (%)	P hodnota (95% CI pro OR)
Dárci gamet (#E)	42	2288	1,84 %	41	2092	1,96 %	1	196	0,51 %	0,257 (0,654 - 158,39)
Děti program NRP (#D)	14	814	1,72 %	7	380	1,84 %	7	434	1,61 %	1,0 (0,339 - 3,862)
Plody matek starších 35 let (#C)	12	1064	1,13 %	8	551	1,45 %	4	513	0,78 %	0,389 (0,498 - 8,555)
Celkem	68	4166	1,63 %	56	3023	1,85 %	12	1143	1,05 %	0,075 (0,938 - 3,660)

Tabulka 9.9 – Přehled incidencí pericentrické inverze chromozomu 9 ve třech speciálních souborech. V prvních dvou souborech jde o postnatálně vyšetřované vzorky (dospělí dárci pohlavních buněk – soubor #E a děti určené k zařazení do programu náhradní rodinné péče – soubor #D), třetím (soubor #C) je soubor plodů prenatalně vyšetřených pro pokročilý věk jejich matek. Poměr pohlaví byl hodnocen pomocí Fisherova testu pro každý soubor zvlášť a následně i celkově, vyšší zastoupení ženského pohlaví u nalezených nositelů inv(9) není ani zde statisticky významné (převzato z publikace Šípek Jr et al., 2015).

9.4 Četnost variant chromozomu 9 u osob s reprodukční poruchou

Pro testování hypotézy o zvýšené četnosti variant chromozomu 9 u osob s reprodukční poruchou charakteru sterility či infertility byly vytvořeny dva speciální soubory a to soubor osob vyšetřovaných pro idiopatickou reprodukční poruchu (VFN, soubor #B, n = 1036) a jako kontrolní pak soubor plodů vyšetřovaných pouze pro pokročilý věk jejich matek (35 let a více v době porodu) (VFN, soubor #C, n = 995).

S ohledem na robustnost studie jsme se v souboru zaměřili nejen na varianty chromozomu 9, ale na všechny varianty chromozomů s velkým blokem konstitučního heterochromatinu, tedy chromozomy 1, 9, 16 a Y. Mimo chromozom 9, kde je pericentrická inverze relativně častým nálezem, šlo u dalších tří chromozomů pouze o délkové varianty, tedy qh+ respektive qh-. Porovnání těchto souborů bylo základem naší publikované studie možné souvislosti reprodukční poruchy a heterochromatinových chromozomových variant publikované v roce 2014 (Šípek Jr et al., 2014).

U osob ve skupině s reprodukčními poruchami jsme podle očekávání našli četné případy s patologickými chromozomovými odchylkami, které většinou reprodukční neúspěchy vysvětlovaly samy o sobě. Stejně tak i ve skupině plodů vyšetřovaných pro pokročilý věk matky jsme (i přes negativitu screeningových vyšetření) našli různé numerické i strukturní aberace. Jelikož tyto patologie nesouvisí přímo s problematikou variant, nebudeme je detailně rozebírat, jejich přehled přináší Tabulka 9.10.

Zachycené patologie	Reprodukční porucha soubor #B (n = 1036)	Vyšetřované plody soubor #C (n = 995)
	Zastoupení (%)	Zastoupení (%)
Robertsonské translokace	2 (0,19)	3 (0,30)
Reciproké translokace	10 (0,97)	4 (0,40)
Downův syndrom	0 (0,00)	4 (0,40)
Turnerův syndrom	1 (0,10)	3 (0,30)
Klinefelterův syndrom	4 (0,39)	3 (0,30)
Jiné gonozomální aneuploidie	4 (0,39)	0 (0,00)
Jiné strukturní aberace	5 (0,48)	4 (0,40)
Celkem	26 (2,51)	21 (2,11)

Tabulka 9.10 – Přehled patologických nálezů zjištěných během vyšetření karyotypu v obou speciálních souborech #B (VFN, osoby s idiopatickou reprodukční poruchou) a #C (VFN, plody vyšetřované pro pokročilý věk jejich matek) (převzato z publikace Šípek Jr et al., 2014).

Dále byla vyhodnocena četnost jednotlivých typů heterochromatinových variant v obou souborech. Celkově byly heterochromatinové varianty zachyceny u 127 osob s reprodukční poruchou (12,3 %), ale jen u 86 plodů (8,6 %). Varianty chromozomu 9 byly přítomné u 62 osob s reprodukční poruchou (5,9 %), a byly tak v tomto souboru nejčastějšími ze všech 4 sledovaných chromozomů. Stejně tomu bylo i v rámci kontrolní skupiny plodů, i zde byly nejčastěji zachyceny varianty chromozomu 9, a to ve 39 případech (3,9 %). Nejčastější z těchto variant chromozomu 9 bylo prodloužení heterochromatinu (9qh+) a to ve 40 případech (3,9 %) v souboru #B a v 21 případech (2,1) % v souboru #C. Dále to byla inv(9) – zachycená v 18 případech (1,7 %) v souboru #B a v 10 případech (1,0 %) v souboru #C. Nejméně častou variantou bylo zkrácení heterochromatinu (9qh-), které jsme našli u 4 případů (0,4 %) v souboru #B a v 8 případech (0,8 %) v souboru #C. Heterochromatinové varianty dalších chromozomů zde již podrobněji nebudeme rozebírat, ale v přehledu je ukazuje Tabulku 9.11.

Heterochromatinová varianta Zastoupení (%)	Reprodukční porucha #B			Vyšetřované plody #C		
	Ženy (n = 506)	Muži (n = 530)	Celkem (n = 1,036)	Ženy (n = 518)	Muži (n = 477)	Celkem (n = 995)
1qh+	10 (2,0)	5 (0,9)	15 (1,5)	3 (0,6)	7 (1,5)	10 (1,0)
9qh+	22 (4,4)	18 (3,4)	40 (3,9)	8 (1,5)	13 (2,7)	21 (2,1)
9qh-	3 (0,6)	1 (0,2)	4 (0,4)	4 (0,8)	4 (0,8)	8 (0,8)
inv(9)(p12q13)	8 (1,6)	10 (1,9)	18 (1,7)	6 (1,2)	3 (0,6)	9 (0,9)
inv(9)(p12q21)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,2)	0 (0,0)	1 (0,1)
16qh+	13 (2,6)	13 (2,5)	26 (2,5)	10 (1,9)	7 (1,5)	17 (1,7)
16qh-	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (0,4)	2 (0,2)
Yqh+	-	9 (1,7)	-	-	4 (0,8)	-
Yqh-	-	15 (2,8)	-	-	14 (2,9)	-
Celkem	56 (11,1)	71 (13,4)	127 (12,3)	32 (6,2)	54 (11,3)	86 (8,6)

Tabulka 9.11 – Přehled všech heterochromatinových variant chromozomů 1, 9, 16 a Y nalezených při vyšetření karyotypu v obou speciálních souborech #B (VFN, osoby s idiopatickou reprodukční poruchou) a #C (VFN, plody vyšetřované pro pokročilý věk jejich matek). Uváděny jsou celkové počty i počty u mužského a ženského pohlaví zvlášť. Za fyziologické situace je chromozom Y přítomen pouze u mužů, tudíž jeho varianty jsou pouze u mužského pohlaví (převzato z publikace Šípek Jr et al., 2014).

Jak vyplývá z výše uvedeného, heterochromatinové varianty byly opravdu častější ve sledovaném souboru osob s idiopatickou reprodukční poruchou (**#B**) oproti kontrolnímu souboru (**#C**). Tento trend byl statisticky vyhodnocen pomocí Fisherova testu a byly zjištěny následující statisticky významné nálezy:

1. Vyšší četnost všech heterochromatinových variant (jako celku) u skupiny (všech) osob s reprodukční poruchou oproti kontrolní skupině.
2. Při hodnocení této závislosti u mužského a ženského pohlaví zvlášť vycházela tato závislost statisticky významná pouze u ženského pohlaví, nikoliv u mužů.
3. Pokud byla tato závislost hodnocena pouze pro jednotlivé chromozomy, byla statisticky vyšší četnost prokázána pouze u variant chromozomu 9. Byť i varianty chromozomů 1, 16 a Y byly zastoupeny častěji u osob s reprodukční poruchou, nebyl tento trend statisticky významný.
4. Při podrobnějším rozdělení jednotlivých variant chromozomu 9 na tři hlavní typy byla statisticky vyšší četnost prokázána pouze pro 9qh+. U inv(9) a 9qh- nebyl rozdíl mezi posuzovanými soubory statisticky významný.
5. Při opakování analýzy (sub 3) a (sub 4) pro mužské a ženské pohlaví zvlášť jsme opět zjistili statistickou významnost pouze u ženského pohlaví. Tedy vyšší četnost variant chromozomu 9 jako celku a 9qh+ jako konkrétní varianty byla statisticky významná pouze u žen s reprodukční poruchou, nikoliv u mužů.

Statistická analýza	Všechny heterochromatinové varianty	Varianty chromozomu 9			
		Celkem	9qh+	9qh-	inv(9)
Ženy	$p = 0,004$ (1,22 - 3,27)	$p = 0,046$ (1,00 - 3,46)	$p = 0,009$ (1,23 - 7,60)	$p = 1$ (0,11 - 4,46)	$p = 0,8$ (0,37 - 3,83)
Muži	$p = 0,32$ (0,82 - 1,86)	$p = 0,46$ (0,68 - 2,42)	$p = 0,59$ (0,57 - 2,82)	$p = 0,2$ (0 - 2,27)	$p = 0,1$ (0,76 - 17,3)
Obě pohlaví	$p = 0,006$ (1,12 - 2,08)	$p = 0,05$ (1,00 - 2,38)	$p = 0,026$ (1,06 - 3,35)	$p = 0,257$ (0,11 - 1,79)	$p = 0,184$ (0,76 - 4,24)

Tabulka 9.12 – Výsledky statistického zhodnocení vyšší četnosti heterochromatinových variant ve skupině osob s reprodukční poruchou. Vyhodnocení bylo provedeno zvlášť pro muže a pro ženy, varianty chromozomu 9 (v celém souboru nejčastější) jsou hodnoceny jako celek i každá zvlášť; statisticky významné hodnoty jsou uvedeny tučně (převzato z publikace Šípek Jr et al., 2014).

Přehledně jsou výsledky statistické analýzy včetně hodnot p a 95% intervalu pro poměr šancí uvedeny v Tabulce 9.12.

9.5 Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy vybraných případů variant chromozomu 9

V rámci našeho projektu bylo vyšetřeno celkem 52 různých osob s různými variantami či přestavbami chromozomu 9. Ve dvou případech šlo o vyšetření v rámci prenatalní diagnostiky (1x plodová voda, 1x fetální krev), zbylých 50 případů bylo provedeno ze vzorku periferní žilní krve.

V rámci prenatalní diagnostiky byly oba vyšetřené plody mužského pohlaví, v rámci postnatální diagnostiky pak bylo vyšetřeno výrazně více žen (41) než mužů (9). Nejčastěji bylo vyšetření provedeno pouze v rámci výzkumného projektu (nikoli na základě indikace genetika), ale v 8 případech (16 %) bylo toto vyšetření vyžádáno indikujícím genetikem jako doplněk již provedeného rutinního cytogenetického a molekulárně cytogenetického vyšetření k upřesnění diagnózy.

Celkem 24 osob (18 žen a 6 mužů) bylo primárně cytogeneticky vyšetřováno pro reprodukční poruchu charakteru sterility či infertility, druhou nejčastější indikační diagnózou pak bylo zvažované dárcovství pohlavních buněk (18 žen a 1 muž). U dvou malých chlapců bylo důvodem cytogenetického vyšetření podezření na chromozomální syndrom (pro přítomné vrozené vady). Dva případy vyšetření v rámci prenatalní diagnostiky byly z důvodu komplexu vývojových vad u plodu, respektive pokročilého věku matky, v obou případech šlo o vyšetření vyžádané jako doplněk rutinní diagnostiky a v obou případech byl stejnou (naší) metodou vyšetřen i rodič, u kterého byla varianta chromozomu 9 nalezena (shodou okolností v obou případech to bylo matka). Dále jsme vyšetřovali ještě dva případy, kdy byl ověřován nálezy varianty chromozomu 9 u potomka vyšetřením rodičů (i zde to byly v obou případech matky). V posledním případě šlo o zdravou dobrovolnici z našeho oboru (znalou svého karyotypu), které za poskytnutý vzorek i na tomto místě velice děkujeme. Přehled našich výsledků je v Příloze číslo 2, kde jsou také uvedena naše identifikační čísla (ID) jednotlivých případů, na které v dalším textu odkazujeme.

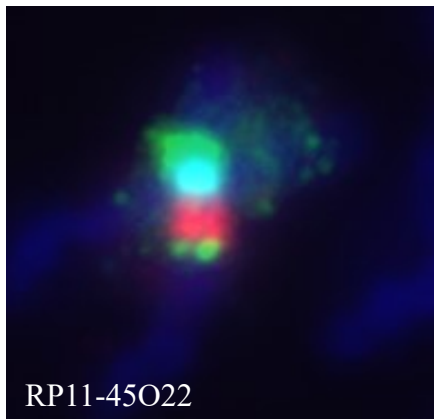
Pokud jde o zachycené varianty, pak v celkem 35 případech šlo o samotný nálezy $inv(9)$, ve 4 případech o $9qh-$ a ve 4 případech o $9qh+$. Ve zbylých případech šlo o následující situace.

- Jeden případ nálezu varianty chromozomu 9 na obou homolozích (ID: 19)
- Jeden případ inv(9) a patologické chromozomální abnormality nesouvisející s chromozomem 9 (ID: 49)
- Tři případy duplikace v pericentromerické oblasti chromozomu 9, z toho jednou ve spojitosti s inv(9) (ID: 1, 3, 6)
- Jeden případ dicentrického chromozomu 9 (ID: 32)
- Tři případy paracentrické inverze chromozomu 9, suspektně zasahující do pericentromerické oblasti (ID: 7, 31, 41).

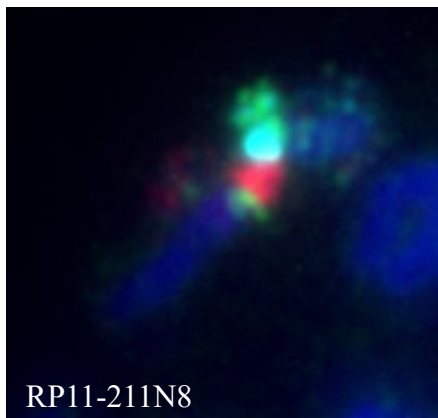
Vyšetřené případy jsme se pokusili klasifikovat podle práce Kosyakové (2013) a to zejména případy inv(9). Vzhledem k použití odlišných sond, není její metodika 100% přenositelná, základní principy hodnocení velikosti homologních sekvencí v oblasti 9p12 a 9q13 ale zůstávají stejné, proto je orientační porovnání jistě možné. Během mé stáže přímo na Institut für Humangenetik Univerzity v Jeně u profesora Liehra jsem měl možnost 5 našich vzorků (ID: 1, 3, 4, 5, 31) vyšetřit souběžně i jejich metodikou a naše hodnocení tak upřesnit. Zároveň jsme také diskutovali i přenositelnost naší a jejich metodiky do klinické praxe. Mezi 38 případy inv(9) jsme tak celkem 30 z nich vyhodnotili jako variantu 1, zbylých osm pak jako variantu 2.

Ve 3 případech byla přítomnost nálezu varianty na chromozomu 9 ověřována vyšetřením rodičů (dvojice případů 10 a 11, 32 a 33, 51 a 52), ve dvou případech šlo o stejnou variantu zděděnou od matky, v jednom případě šlo o velmi neobvyklý nález *de novo* vzniklého dicentrického chromozomu 9, přičemž matka byla nositelkou „normální“ inv(9). Podrobnější vyšetření tohoto případu bohužel nebylo možné, neboť matka odmítla další odběr na doplňující vyšetření v rámci výzkumu.

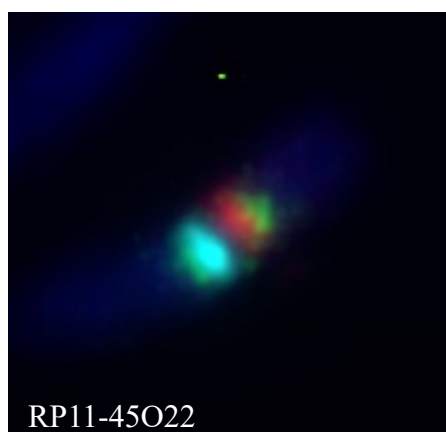
9.5.1 Galerie vybraných výsledků molekulárně cytogenetického vyšetření v našem souboru



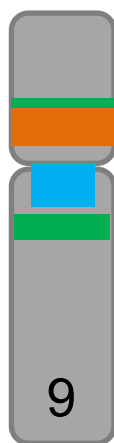
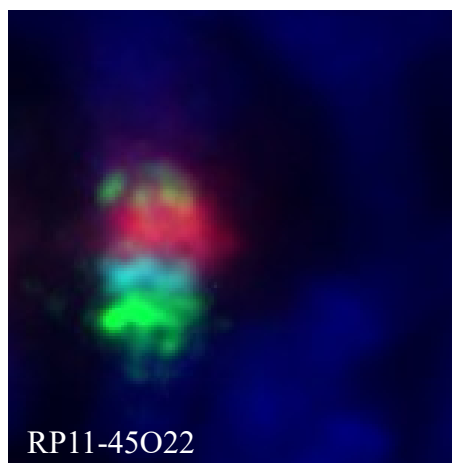
Obrázek 9.1 – Kontrola 1 - Výsledek FISH diagnostiky u zdravé osoby s normálním karyotypem (46,XY), zdravý muž, 43 let, využita BAC sonda RP11-45O22 (zelený signál).



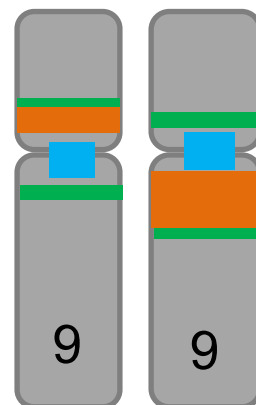
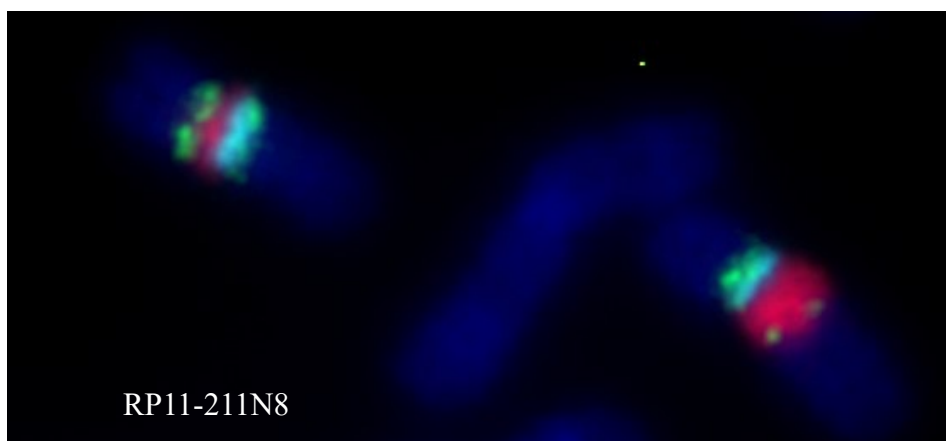
Obrázek 9.2 – Kontrola 2 - Výsledek FISH diagnostiky u zdravé osoby s normálním karyotypem (46,XY), zdravý muž, 43 let (stejná osoba jako v případě Kontroly 1), využita BAC sonda RP11-211N8 (zelený signál).



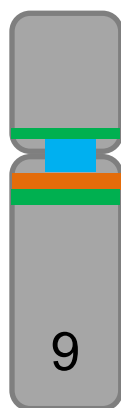
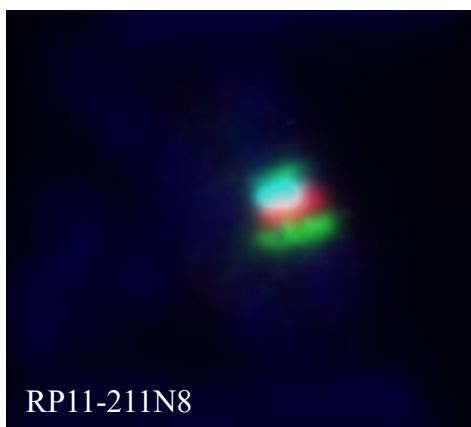
Obrázek 9.3 - Výsledek FISH diagnostiky u 41 letého muže s reprodukční poruchou (ID: 8), karyotyp 46,XY,inv(9)(p12q13), pravděpodobná klasifikace dle Kosyakova et al., 2013: inv(9) **var 1** (obdobná síla zeleného signálu na 9p i 9q).



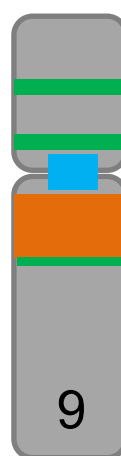
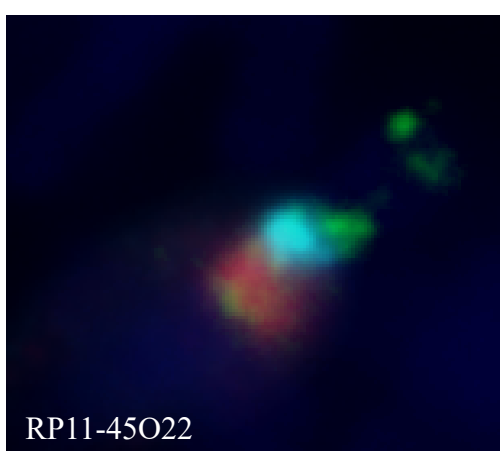
Obrázek 9.4 – Výsledek FISH diagnostiky u 33 leté ženy s reprodukční poruchou (ID: 49), karyotyp 46,XX,inv(9)(p12q13),t(15;22)(q26.1;p12), pravděpodobná klasifikace dle Kosyakova et al., 2013: inv(9) var 2 (síla zeleného signálu na 9p < 9q).



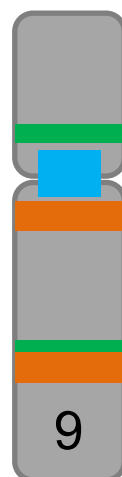
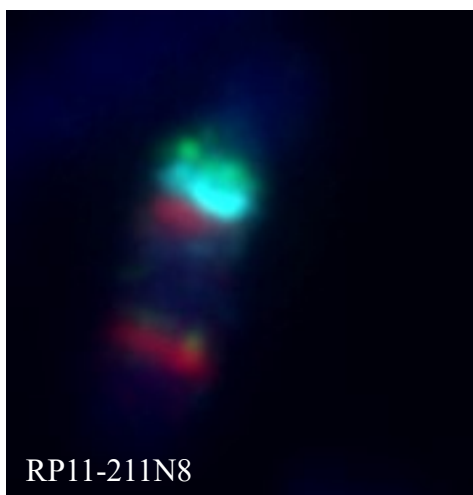
Obrázek 9.5 – Výsledek FISH diagnostiky u 24leté dárkyně oocytů (ID: 19), karyotyp 46,XX,inv(9)(p12q13),9qh+ (varianta obou dvou homologů, inverze je na chromozomu vlevo), pravděpodobná klasifikace dle Kosyakova et al., 2013: inv(9) var 1 a 9qh+.



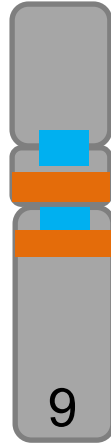
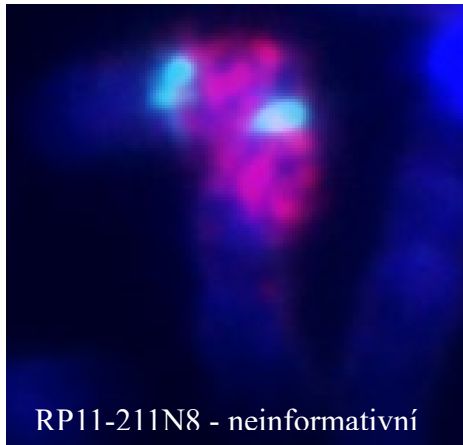
Obrázek 9.6 – Výsledek FISH diagnostiky u 21leté dárkyně oocytů (ID: 37), karyotyp 46,XX,9qh-
pravděpodobná klasifikace dle Kosyakova et al., 2013: 9qh-



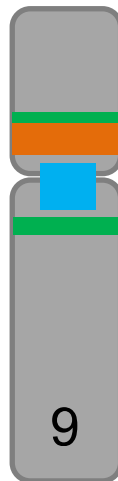
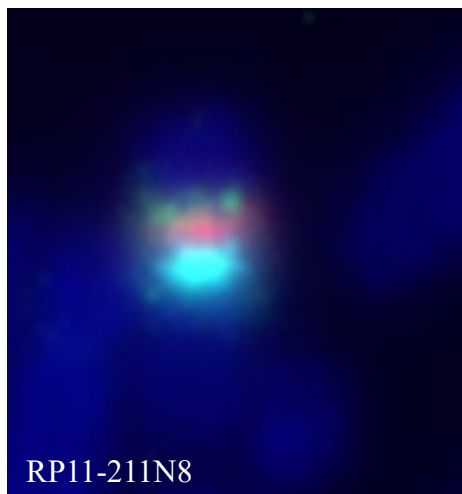
Obrázek 9.7 – Výsledek FISH diagnostiky u ročního chlapce s psychomotorickou retardací a kraniofaciální dysmorfii (ID: 41), karyotyp 47,XYY,inv(9)(p12p24), FISH vyšetření potvrdilo místo zlomu v oblasti 9p12, kde hybridizuje sonda RP11-45O22.



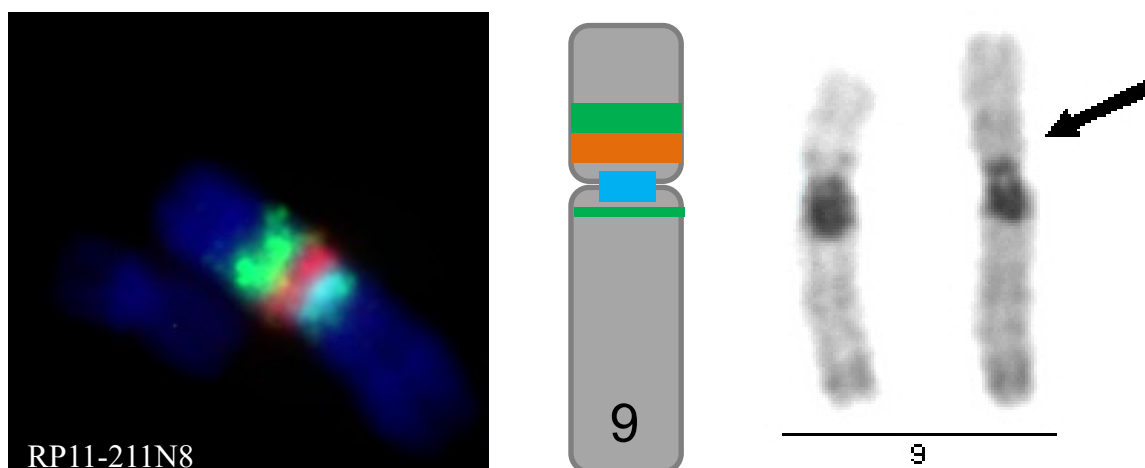
Obrázek 9.8 – Výsledek FISH diagnostiky u 34leté ženy s reprodukční poruchou (ID: 7), karyotyp 46,XX,inv(9)(q12q31.1), FISH vyšetření potvrdilo místo zlomu v oblasti 9q12 v místě heterochromatinového bloku.



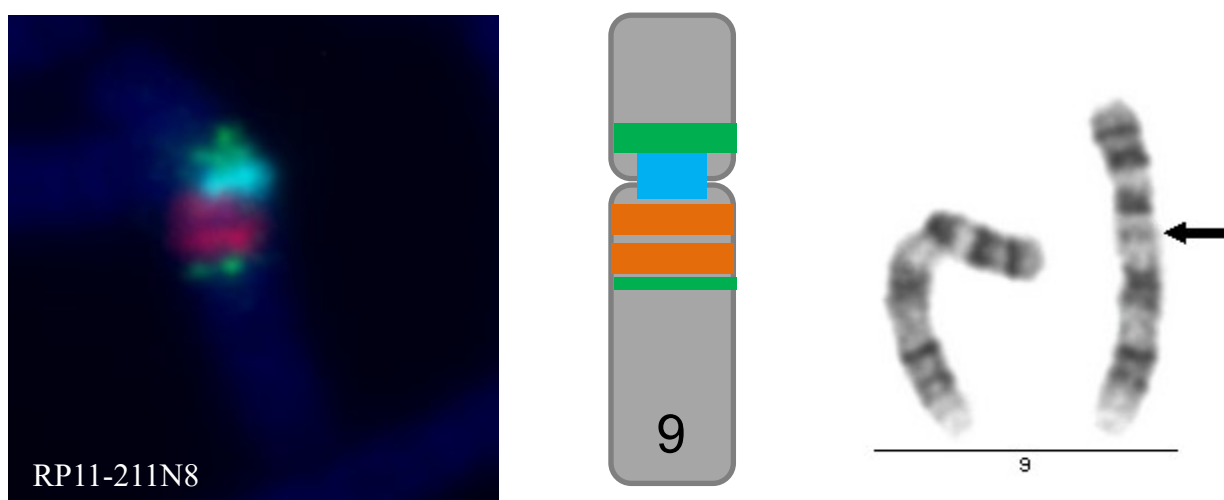
Obrázek 9.9 – Výsledek FISH diagnostiky u plodu vyšetřovaného čistě pro věk matky vyšší 35 let (ID: 32). Nález dicentrického chromozomu 9, 46,XY,dic(9)(pter->q13::p12->qter), array-CGH negativní, signál BACové sondy bohužel neinformativní. Pro nedostatek materiálu z AMC nebylo možno opakovat a postnatální odběr chlapce na výzkumné vyšetření matka odmítla.



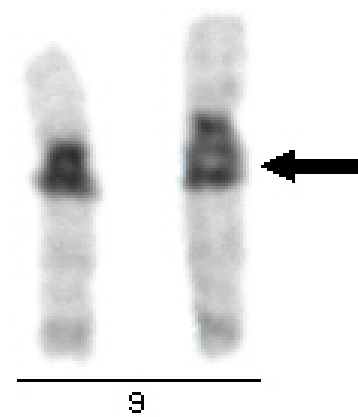
Obrázek 9.10 – Výsledek FISH diagnostiky u 37leté matky předchozího případu (ID: 33), karyotyp 46,XX,inv(9)(p12q13), otec chlapce měl normální karyotyp, pravděpodobná klasifikace dle Kosyakova et al., 2013: inv(9) var 1.



Obrázek 9.11 – Výsledek FISH diagnostiky u 25leté potenciální dárkyně oocytů (ID: 6), karyotyp 46,XX,dup(9)(p12p12),inv(9)(p12q13), pravděpodobná klasifikace dle Kosyakova et al., 2013: 9ph+ inv(9) var1.



Obrázek 9.12 – Výsledek FISH vyšetření u 27leté potenciální dárkyně pohlavních buněk (ID:1), indikační karyotyp: 46,XX,dup(9)(q12q21.11), klasifikace dle Kosyakova et al., 2013: dup(9) var 1
Pro srovnání uváděny výsledky G-pruhování a C-pruhování (obojí poskytl Mgr. Lonský, Sanatorium Pronatal).



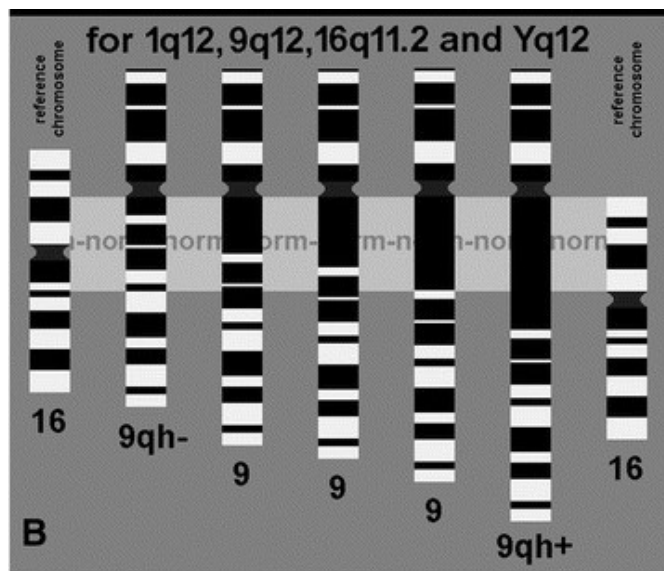
10 Diskuse

10.1 Epidemiologie variant chromozomu 9

Stanovení laboratorních incidencí variant chromozomu 9 a odhad pravděpodobné populační frekvence byly jedny z hlavních cílů celého našeho projektu. Naše epidemiologické studie se zaměřily hlavně na nejvýznamnější variantu chromozomu 9 – tedy jeho pericentrickou inverzi – inv(9). Důvody k tomuto výběru jsou jednoduché – určení délkové varianty chromozomu 9, stejně jako i délkové varianty dalších chromozomů s velkým blokem konstitučního heterochromatinu (1, 16 a Y), je mnohem více zatíženo subjektivním názorem hodnotitele, nežli určení pericentrické inverze, jejíž vzhled je zcela charakteristický a při správném zhodnocení karyotypu v optickém mikroskopu by neměla uniknout. Ačkoliv pravidla pro klasifikaci délkových variant heterochromatinu existují již více než čtyři desítky let (Patil a Lubs, 1977), kdy bylo navrženo krátké rameno chromozomu 16 jako marker normální délky heterochromatinového bloku na 1q, 9q, 16q a Yq, dodnes není tato klasifikace zcela dořešena a přijímána. V mezinárodní cytogenetické nomenklatuře (ISCN) není například ani v poslední verzi upřesněno, jakým způsobem qh+ a qh- varianty (které jinak ISCN nomenklatura uznává) hodnotit a jakou délkovou jednotku použít za normu. Navíc – jak upozorňuje profesor Liehr (Liehr, 2016) – v rámci posledních vydání ISCN nomenklatury se dokonce i liší délka variabilních oblastí karyotypu na uvedených ideogramech, což obecně podporuje nejednoznačnost v hodnocení délky heterochromatinového bloku (nejen) chromozomu 9. Ve výše citované práci Liehr (2016) navrhuje rovněž klasifikaci s využitím délky krátkého ramene chromozomu 16, s tím, že je-li hodnocený qh blok daného chromozomu delší, měla by být varianta zaznamenána jako qh+, pokud je naopak qh blok kratší nežli jedna polovina délky krátkého ramene chromozomu 16, měla by být varianta označena jako qh- (Obrázek 10.1). Dále je nutné zmínit, že podle současných guidelines Evropské cytogenetické asociace (ECA) není doporučeno uvádět nálezy chromozomových variant (tedy i varianty chromozomu 9) do výsledku cytogenetického vyšetření, aby se zabránilo případným nejasnostem při interpretaci výsledku indikujícím lékařem. Zápis varianty by měl být zachován v laboratorní dokumentaci pro případnou kontrolu (ECA, 2012; Silva et al., 2019).

Z výše uvedených důvodů byly naším primárním zdrojem pro vyhledávání případů s variantou chromozomu 9 laboratorní záznamy. Ambulantní záznamy (klinické zprávy)

byly konzultovány pouze v situaci, kdy nebyla indikační diagnóza uvedena nebo byla nejasná.



Obrázek 10.1 – Posuzování délky heterochromatinového bloku chromozomu 9 pomocí krátkého ramene chromozomu 16. Pokud heterochromatinový blok přesáhne délkou krátké rameno chromozomu 16, označí se tento nálezn jako 9qh+. Pokud je naopak heterochromatinový blok kratší než 1/2 krátkého ramene chromozomu 9, je nálezn označen jako 9qh- (upraveno podle Liehr, 2016).

V rámci první fáze projektu byl sběr dat proveden celkem na 5 různých pracovištích lékařské genetiky, na dvou z těchto pracovišť ale byly zjištěny tak výrazné nehomogenity v zápisech a uvádění nejen délkových variant chromozomu 9, ale i u $inv(9)$, že jsme data z těchto dvou pracovišť nemohli do studie zařadit. Pokud jde o základní soubory, které jsme nakonec využili pro naše analýzy, pouze v rámci našeho mateřského pracoviště byla zjištěna spolehlivá kontinuita při zápisech a uvádění délkových variant chromozomu 9. Proto pouze v rámci VFN (soubor #1 a dále i speciální soubory #B a #C) jsme dále analyzovali i četnosti délkových variant.

Pro naši publikaci (Šípek Jr et al., 2015) shrnující základní epidemiologické charakteristiky jsme nakonec vybrali pouze soubory s $inv(9)$. Incidenci $inv(9)$ jsme počítali ve vztahu k osobám, tedy vypočítali jsme, kolik procent osob v daném souboru neslo $inv(9)$. Zdánilivě naprosto jasný a jednoznačný koncept, ale vzácně lze ve starší literatuře objevit i

výpočet incidencí ve vztahu k počtu vyšetřených chromozomů – a jelikož je chromozom 9 přítomen v lidských buňkách dvakrát (úplná monozomie či trizomie chromozomu 9 je letální), potom každá osoba přidá do souboru hned dva chromozomy 9, což se na celkové incidenci významně promítne. U nás tento přístup použili Balíček a Žižka (1974). V rámci naší studie byla celková incidence inv(9) v našich třech laboratorních souborech s neselektovaným spektrem pacientů indikovaných k cytogenetickému vyšetření 1,61 %; dílčí hodnoty v jednotlivých laboratořích byly: VFN: 1,53 %; TN: 1,56 %; Pronatal: 1,71 %. Laboratoř Sanatoria Pronatal měla jako jediná selektovanější spektrum pacientů (převážně jen osoby s reprodukční poruchou a potenciální dárci gamet), rozdíl v incidenci ale nebyl výrazný oproti oběma dalším laboratořím (ve VFN a TN).

Obecnou nevýhodou laboratorních souborů je skutečnost, že osoby jsou většinou karyotypovány kvůli podezření na určitou patologii, nejde tak o zcela ideální populační vzorek. Pokud by sledovaná varianta měla opravdu vyšší četnost u osob s určitými klinickými obtížemi, mohla by být celková incidence odhadovaná na takovémto souboru zkreslena. Řada autorů takovýto soubor nicméně používá (např. Metaxotou et al. 1978; Serra et al., 1990; Teo et al., 1995; Demirhan et al., 2008; Yuksel et al., 2017). Z výše uvedených důvodů jsme dále analyzovali četnost inv(9) i ve třech speciálních souborech, které byly rovněž vytvořeny ze záznamů uvedených tří laboratořích, ale právě se speciálním ohledem na indikaci k vyšetření.

Prvním ze speciálních souborů byl soubor plodů, které byly vyšetřeny pouze na základě pokročilého věku matek (při normálním výsledku biochemického i ultrazvukového screeningu). V České republice je věková indikace k invazivní prenatalní diagnostice 35 let a více v době porodu, a přestože se pro nabídku invazivní prenatalní diagnostiky z čistě věkové indikace rozhoduje každým rokem méně a méně těhotných, jde stále o platnou a využívanou indikaci (Šípek Jr et al., 2011; Šípek Jr et al., 2018). Neselektovaný vzorek prenatalně vyšetřených karyotypů (nejčastěji stejně jako v našem souboru – ze vzorků získaných odběrem plodové vody) využívají různí autoři (např. Hsu et al., 1987; Yamada, 1992; Teo et al., 1995), nicméně i u prenatalně vyšetřovaných vzorků může být výběr případů zkreslený skutečností, že k invazivní prenatalní diagnostice jsou primárně indikována těhotenství s abnormálním výsledkem biochemického či ultrazvukového vyšetření, což v důsledku může ovlivnit spektrum chromozomálních abnormalit v takovém souboru. Proto jsme náš soubor omezili právě jen na indikaci čistě věkovou. Výsledná četnost inv(9) v tomto našem vzorku byla 1,13 %.

Druhým speciálním souborem byly děti zařazované do programu náhradní rodinné péče (NRP). Jde o dnes již historický soubor (vyšetření z let 1997-2011), kdy bylo v rámci vyšetření dětí před zařazením do programu NRP na základě zvyklostí prováděno genetické vyšetření, jehož součástí bylo vyšetření karyotypu. Na základě platného doporučení SLG ČLS JEP z roku 2014 (SLG, 2014) je do budoucna genetické vyšetření doporučeno již jen u dětí, u kterých existuje jiná (tj. medicínská) indikace k tomuto vyšetření, další rozšíření tohoto vzorku tak nepřipadalo v úvahu. Ve své podstatě jde o velmi zajímavý vzorek jedinců, kteří byli karyotypováni pouze kvůli sociální anamnéze a nikoliv zdravotnímu problému. V nám známé literatuře nebyl obdobný soubor publikován. Incidence inv(9) v tomto souboru byla 1,72 %.

Poslední speciální soubor představují dárci a dárkyně pohlavních buněk. Potenciální dárci a dárkyně pohlavních buněk musí vyhovět speciálnímu protokolu (aktuální doporučení SLG, 2018), jehož součástí je kromě zhodnocení zdravotního stavu i řada laboratorních vyšetření, včetně karyotypizace. Takovýto soubor lze tedy rovněž považovat za vzorek zdravé populace. Celková incidence inv(9) mezi dárci/dárkyněmi pohlavních buněk byla 1,84 %. V nám známé literatuře jsme nenalezli obdobný typ souboru, srovnání tedy není možné.

Můžeme konstatovat, že námi zjištěné incidence inv(9) se významně nelišily ani mezi soubory laboratorními, ani mezi specifickými populačními soubory (rozdíly byly statisticky testovány, ale nebyly významné). Celková incidence okolo 1,6 % je plně v souladu a v rozmezí četnosti inv(9) uváděné v písemnictví, kde se pohybuje přibližně mezi 1-4 % (přehledně Tabulka 6.3 v úvodu). Velmi podobnou četnost 1,65 % zaznamenal také Yamada (1992) na populačním souboru 1513 zdravých dobrovolníků a Yuksel et al. (2017) na neselektovaném laboratorním souboru 4168 osob. Turečtí autoři publikovali laboratorní četnost 1,01 % v neselektovaném souboru 15 528 osob (Demirhan et al., 2008). V metaanalýze, kterou publikoval Serra se spolupracovníky (1990), byly výsledné četnosti inv(9) lehce pod jedním procentem – a to 0,85 % v novorozeneckých souborech a 0,95 % ve všech postnatálních souborech. Výrazně vyšší četnost inv(9) publikoval již v roce 1978 Metaxotou se spolupracovníky a to 4 % na neselektovaném souboru 600 laboratorních případů. Nabízí se vysvětlit tyto rozdíly jako výraz etnické příslušnosti vyšetřovaných. Na potenciální rozdíly v četnosti inv(9) mezi různými etniky upozornila práce Hsu et al. z roku 1987, kdy byla na neselektovaném souboru prenatalně vyšetřených vzorků nejvyšší četnost inv(9) zjištěna u Afroameričanů (3,57 %) a nejnižší naopak u Asiátů (0,26 %).

Rozdíly mezi těmito hodnotami mohou odrážet skutečné rozdíly v populačně-etnické incidenci inv(9), mohou být ale způsobeny také nereprezentativním charakterem vzorku, u malých vzorků může svou roli hrát také lokálně zvýšená incidence při efektu zakladatele či zvýšené frekvenci příbuzenských sňatků.

Dále jsme zjistili vyšší četnost inv(9) u žen, nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný, s výjimkou žen s reprodukční poruchou, jak bude ještě diskutováno dále. Obecně byla vyšší četnost inv(9) u žen uváděna i dalšími autory (Yamada, 1992; Demirhan et al., 2008; Sheth et al., 2013; Yuksel et al., 2017), ale celkově nejde o jednoznačný a významný trend, alespoň nikoliv na velkých neselektovaných sbořech, ne vždy je navíc zastoupení podle pohlaví uváděno (např. Serra et al., 1990).

10.2 Molekulárně cytogenetická diagnostika

Molekulárně cytogenetická analýza variant chromozomu 9 je – v porovnání s problematikou jejich epidemiologie a/nebo možných klinických asociací – mnohem užším tématem, které je v literatuře řešeno relativně vzácně. Téma je to ovšem velmi důležité, neboť většina prací, které diskutují četnosti variant chromozomu 9 nebo jejich možnou asociaci s poruchami reprodukce, či dokonce jinými fenotypovými projevy, vychází z výsledků klasického vyšetření karyotypu pomocí G-pruhování, které ale nemůže objektivizovat jednotlivé subvarianty těchto variant. Dynamika repetitivních sekvencí v pericentromerické oblasti chromozomu 9 je podrobněji řešena od poloviny devadesátých let minulého století (Ramesh a Verma, 1996; Samonte et al., 1996), kdy bylo prokázáno, že za různými typy variant viditelných při použití G-pruhování jsou variability délky a uspořádání různých typů repetitivních sekvencí a zároveň také důležitý fakt, že varianty, které se při hodnocení karyotypu v optickém mikroskopu zdají stejné, mají ve skutečnosti různou strukturu při vyšetření pomocí FISH. Tuto problematiku v současnosti studuje hlavně pracoviště v německé Jeně, pod vedením profesora T. Liehra, klíčové jsou jejich publikace z roku 2002 a 2014 (Starke et al., 2002; Kosyakova et al., 2013), kde bylo popsáno 12, respektive 17 různých variant pericentromerické oblasti chromozomu 9. Práce Kosyakové z roku 2013 je prozatím považována za referenční pro popis a diagnostiku těchto variant, doporučení pro tuto podrobnější diagnostiku včetně klasifikace jsou pak uvedeny i v Liehrově monografii věnované právě variantám lidských chromozomů (Liehr, 2013).

Náš přístup k molekulárně cytogenetické analýze vycházel z literární rešerše provedené na přelomu let 2010 a 2011. Vycházeli jsme zejména z prací Starke et al., 2002 a Kehrer-Sawatzki et al., 2005, s ohledem na metodiku BAC pak také Vree et al., 2009. Naše laboratoř nebyla vybavená na přípravu vlastních mikrodisekčních sond, a proto bylo cílem vytvořit metodiku založenou pouze na komerčně dostupných sondách. U většiny našich případů byla jako BAC-sonda použita RP11-45O22 či RP11-211N8, obě sondy fungovaly velice dobře a umožnily nám blíže charakterizovat různé typy variant, jak bylo prezentováno v sekci výsledky. Na omezeném množství vzorků jsme provedli srovnávací vyšetření postupně oběma BAC sondami, v žádném případě ale nebyl výsledek našeho hodnocení odlišný, sondy tak byly nadále používány synonymně a to zejména s ohledem na ekonomičnost plánovaných výzkumných vyšetření a jejich blížící se expiraci.

Mnohem podrobnější přístup s využitím různých BAC sond byl publikován v roce 2011 (Joseph-George et al., 2011), ale velký průlom v takto zacílených studiích znamenala výše citovaná práce Kosyakové, která byla publikována (z našeho pohledu až) v průběhu druhého roku řešení našeho tříletého projektu GAUK, kdy již byla většina z námi prezentovaných případů vyšetřena naší původní metodikou. Vzhledem k významu práce Kosyakové a spol., především s ohledem na navrženou klasifikaci, jsme provedli v poslední fázi molekulárně cytogenetické části našeho projektu i několik vyšetření s dokoupenými BAC sondami RP11-402N8 a RP11-211E19, ale ani při jejich použití jsme objektivně nezaznamenali jediný zásadní rozdíl v hodnocení, který by nás vedl k rozhodnutí překlasifikovat dříve vyšetřené případy. S ohledem na homogenitu rozvyšetřovaného souboru pacientů jsme tak již metodiku neměnili.

Celkově považujeme molekulárně cytogenetickou část našeho projektu za splněnou a to zejména s ohledem na omezené technické a finanční možnosti, které nemohly plně konkurovat zahraničním pracovištím. Podařilo se nám vyšetřit celkem 52 osob s přestavbou chromozomu 9, přičemž ve 49 případech šlo o variantu pericentromerické oblasti, zbylé tři případy byly paracentrické inverze, které ale zasahovaly právě do oblasti pericentromerického heterochromatinu a molekulárně cytogenetická analýza byla (úspěšně) použita pro potvrzení místa zlomu. Rozsahem je tak naše práce prakticky totožná s první souhrnnou publikací kolegů z Jeny (Starke et al., 2002), kteří publikovali výsledky u 48 případů varianty chromozomu 9 a dalších tří případů jiné přestavby chromozomu 9. Naopak s jejich další studií celkem 334 případů variant chromozomu 9 (Kosyakova et al., 2013) se rozsah našeho souboru nemůže srovnávat, dlužno ovšem přiznat, že jde o největší

dosud publikovaný soubor v této oblasti, do kterého zaslalo vzorky množství dalších pracovišť ze západní i východní Evropy. Není nám známo, že by (kdekoli) byla od této doby publikována další obdobně zaměřená studie.

Byť je náš soubor méně jak šestinový rozsahem, výsledky porovnáваме s prací Kosyakova et al., 2013, kterou jsme na jiném místě označili za referenční. Vzhledem k rozdílným sondám nemůžeme kompletně implementovat klasifikaci dle článku Kosaykové a spol. (2013), přesto jsme se snažili alespoň pro inv(9) provést rozdělení subvariant podle stejného klíče. V obou souborech byla nejčastěji zachycenou variantou inv(9), v našem souboru v 77,5 %, v německé práci 49,4 %. Pokud jde o subvarianty inv(9), bylo v německé práci prakticky stejné zastoupení varianty 1 a varianty 2 (var 1/var 2 = 101/98), zatímco v našem souboru byla varianta 1 výrazně častější (var 1/var 2 = 30/8). V našem souboru osob s inv(9) převažovaly ženy (30 žen/8 mužů; poměr 3,75:1), v německé práci byly rovněž častěji vyšetřovány nosičky inv(9), převaha žen ale nebyla tak výrazná (100 žen/79 mužů). V našem souboru byla druhou nejčastější variantou variabilita délky 9qh oblasti (9qh+/9qh-), celkem 16,3 %, stejně tak v německé publikaci (23,9 %). Další varianty, tedy varianty 9ph, duplikace, dicentrické chromozomy, abnormity centromery se v našem souboru vyskytly již jen raritně, v německém souboru jde také o vzácnější nálezy, ale vzhledem k rozsahu studie jde až o desítky případů. V našem souboru i v německé publikaci byla nečastější indikací původního vyšetření karyotypu idiopatická reprodukční porucha. Vzhledem k malému počtu vyšetření v našem souboru nebyla dále prováděna cílená analýza zaměřená na častější typ určité (sub)varianty u osob vyšetřovaných pro určitou klinickou diagnózu (v našem případě tedy nejčastěji pro reprodukční poruchu). Můžeme konstatovat, že naše metodika se velmi osvědčila pro detailnější charakterizaci neobvyklých variant s duplikacemi v pericentromerické oblasti chromozomu 9, kdy námi zavedené FISH vyšetření pomohlo k upřesnění benigní povahy nálezu. Zároveň jsme úspěšně vyšetřili několik případů paracentrické inverze se zlomem v oblasti pericentromerického heterochromatinu.

Molekulárně cytogenetické studie variant chromozomu 9 mají obrovský potenciál posunout klasické studie, založené pouze na výsledku vyšetření karyotypu, zcela novým a přesnějším směrem. Molekulárně cytogenetické vyšetření variant chromozomu 9 však obecně nebývá standardní součástí vyšetřovacích postupů, i když by podle některých autorů, a je to i náš názor, mělo být (Liehr, 2013). Z vlastní zkušenosti můžeme konstatovat, že hlavní limitací podobné studie je již samotné získání vhodných vzorků.

Pokud jsme z našich epidemiologických souborů odhadli celkovou četnost heterochromatinových variant chromozomu 9 na cca 3,5 %, znamená to, že v cytogenetické laboratoři s jinak spíše nadprůměrným počtem 500 vyšetření vzorků z periferní krve ročně by bylo teoreticky zachyceno až 17,5 případů heterochromatinové varianty chromozomu 9 za rok. Při určité nejednoznačnosti klasifikace délkových variant heterochromatinu, kterou jsme již obecně diskutovali výše, lze proto očekávat, že budou zachyceny především inv(9) a dále výrazné délkové abnormality nebo jiné, vzácné varianty. Přestože jsme tímto způsobem náš požadavek o spolupráci na výzkumném projektu neformulovali, byla zde (vesměš pochopitelná) tendence pracovníků spolupracujících genetických pracovišť nabízet nám preferenčně případy „zajímavých“ variant, což byly právě především inv(9), duplikace a atypické délkové varianty.

Další nevýhodou je skutečnost, že na rozdíl od molekulárně genetické analýzy, kdy je často po dokončení rutinně prováděného vyšetření stále dostupný zamražený vzorek DNA k eventuální další analýze v rámci výzkumu, v případě cytogenetického, případně FISH vyšetření je dostupnost původního materiálu (ve formě buněčné suspenze) velmi omezená, neboť tento typ vzorku není obecně nabízen (a určen) k dlouhodobé archivaci. Z tohoto důvodu jsme přišli o celou řadu případů, kdy byla rutinním cytogenetickým vyšetřením (klasický karyotyp) zachycena varianta chromozomu 9, zároveň ale již nebyl k dispozici materiál z původního vyšetření a zpětné oslovení vyšetřených osob se žádostí o účast ve výzkumném projektu – spojenou s novým odběrem – mělo naprosto mizivou odezvu; k opakovanému odběru se dostavil jediný člověk z desítek oslovených. Většina našich vzorků tak byla získána až v průběhu trvání projektu, kdy nám zúčastněné cytogenetické laboratoře (ÚBLG 1. LF UK a VFN a Pronatal) uchovávaly příslušné buněčné suspenze, než jsme získali dodatečný souhlas s vyšetřením v rámci výzkumu (zde byla úspěšnost mnohem vyšší, cca 60%, i tak jsme ale řadu souhlasů k dodatečnému vyšetření nesehnali). Odmítnutí (i odložené) postnatálního odběru ze strany rodičů bylo důvodem nedovyšetření asi nejzajímavější varianty v našem souboru – dicentrického chromozomu 9, který vznikl pravděpodobně přestavbou maternálního chromozomu s prostou inv(9). Malinverni et al. (2016) popsali velmi atypický chromozom 9, s duplikacemi v oblasti 9p13, které byly detekovány pomocí microarray. Dívka s tímto chromozomem měla výrazné fenotypové projevy zahrnující psychomotorickou retardaci a kraniofaciální dysmorfii, otec dívky byl nositelem běžné inv(9).

Pokud jde o jinak velmi rozšířenou metodiku chromozomální microarray, její využití pro bližší detekci různých variant chromozomu 9 se v tuto chvíli nejeví jako užitečné. V našem soboru bylo u tří případů varianty chromozomu 9 v rámci rutinní diagnostiky rovněž provedeno array-CGH vyšetření, ve všech třech případech s normálním nálezem (alespoň pokud jde o chromozom 9, neboť v jednom případě detekovalo přítomnost aneuploidie XYY). Abnormální array-CGH profil v pericentromerické oblasti chromozomu 9 u vybraných případů variant chromozomu 9 popisovali Wang a Boyar (2016), ovšem je nutno dodat že s využitím detailnějšího čipu, než je využíván při rutinní diagnostice submikroskopických chromozomových aberací. Další publikace se k využití microarray v bližší diagnostice variant chromozomu 9 staví spíše skepticky (Cho et al., 2011; Joseph-George et al., 2011; Kosyakova et al., 2013), relativně vysoká citlivost rutinně používaných čipů pro oblasti vysoce repetitivních sekvencí ostatně není ani doporučována (Silva et al., 2019). Na druhou stranu, díky metodě microarray je možné detekovat ty případy, kdy zdánlivě variantní chromozom 9 je ve skutečnosti nebalancovanou přestavbou – jako tomu bylo v případě, který publikovali Malinverni et al. (2016), kdy se přestavba v optickém mikroskopu zprvu jevila jako klinicky nevýznamná inv(9).

10.3 Možné klinické asociace

Heterochromatinové varianty lidských chromozomů jsou známé již celá desetiletí a jejich možné souvislosti s lidskými chorobami jsou zkoumány od prvního využití pruhovacích technik. S ohledem na technologické možnosti genetické laboratorní diagnostiky 70. a 80. let minulého století je nutno zdůraznit, že šlo o dobu pionýrskou, kdy byly nálezy veškerých strukturních odchylek jednotlivých chromozomů zpočátku hodnoceny jako zcela nové nálezy, s potenciálními dopady na fenotyp jedince. Dilema, které známe dobře i dnes v souvislosti s nálezy variant nejasného významu v rámci NGS vyšetření. Možné klinické souvislosti různých typů chromozomálních variant jsou za ta dlouhá léta zmiňovány v desítkách různých publikací. Přestože již relativně brzy po jejich popisu byl vysloven názor, dnes většinový, že jde o varianty bez přímých fenotypových dopadů (Mutton a Daker, 1973; Müller et al., 1975), četné publikace se k tomuto tématu opakovaně vracejí a téma tak zůstává otevřené a popravdě také poněkud kontroverzní. Největší pozornosti se z heterochromatinových variant vždy dostávalo přímo inv(9), tím pádem i nejvíce publikací se zaměřuje právě na možné klinické asociace této inverze. V úvodním přehledu byly vybrané publikace takovýchto asociací již zmíněny (Tabulka 6.5), nyní se zaměříme detailněji na jednotlivé diagnostické skupiny.

10.3.1 Reprodukční porucha.

Již od sedmdesátých let dvacátého století je opakovaně zmiňována možná spojitost inv(9) a idiopatické reprodukční poruchy charakteru sterility (neschopnost otěhotnět) či infertility (opakované potrácení). Teoretická spojitost se samozřejmě nabízí, úloha pericentrických inverzí v etiologii sterility/infertility je známá. V průběhu profáze prvního meiotického dělení je v přítomnosti invertovaného chromozomu během párování s jeho homologem tvořena inverzní smyčka, díky které může dojít po crossing-overu k abnormálnímu rozchodu chromozomů a následně tedy ke vzniku gamet s nebalancovanou chromozomální výbavou (rekombinační aneuzomie), což je biologickou příčinou sterility/infertility páru. Leckdy může dojít i k narození potomka s parciální trizomií/monozomií daného chromozomu (Balíček, 2001; Gardner a Amor, 2018). U inv(9) není obecně rekombinační aneuzomie popisována (např. Morel et al., 2007). Ani v našem základním souboru #**linv** vytvořeném pro analýzu četnosti variant chromozomu 9 nebyla nalezena situace, kdy by bylo u nositele inv(9) uvedeno narození potomka s chromozomem 9 rekombinovaným klasickým způsobem (parciální delece na jednom ramenu a parciální duplikace na ramenu druhém). V recentní studii Young et al., 2019 reportuje vznik rekombinovaného chromozomu 9 u embrya, kdy matka byla nositelkou inv(9)(p11q13). Podle přiložené fotodokumentace se však jedná spíše o duplikaci v oblasti pruhu p12, což by stále více odpovídalo transgenerační změně varianty heterochromatinové oblasti nežli vzniku patologické přestavby chromozomu 9; podrobnosti z dané práce ale vyčíst nelze. Jediným případem transgenerační změny struktury chromozomu 9 v našem souboru byl již zmiňovaný případ vzniku dicentrického chromozomu 9 u matky - nosičky inv(9). Podobný případ s duplikací oblasti 9p byl dokumentován i v literatuře (Malinverni et al., 2016) – konkrétně šlo o duplikaci zasahující i do pruhu 9p13 s atypickým výsledkem vyšetření microarray. Nositelka tohoto parciálně duplikovaného chromozomu měla výrazné fenotypové projevy zahrnující psychomotorickou retardaci a kraniofaciální dysmorfii, její otec byl nositelem normální inv(9). Pro porovnání, v našem případě byl array-CGH profil v normě a chlapec se narodil bez jakýchkoliv nápadností.

Z výše uvedeného nicméně vyplývá, že rekombinační aneuzomie jistě není vysvětlením hypotetického rizika reprodukční poruchy u osob s inv(9). Mnozí autoři přesto o určitém - nespécifickém ovlivnění párování chromozomů 9 v profázi prvního meiotického dělení spekulují. V literatuře je možné najít relativně velké množství kazuistik reprodukční poruchy u nositelů i nositelek inv(9), které se ale k možnému mechanismu, kterým inv(9)

ovlivnila reprodukci páru, blíže nevyjadřují (například Boué et al., 1975; Uehara et al., 1992; Srebniak et al., 2004; Mozdarani et al., 2007; Collodel et al., 2006). Dále se setkáváme se studii, kde je inv(9) popisována jako relativně častý nález u osob vyšetřovaných cytogeneticky kvůli reprodukční poruše. Tyto studie sice vycházejí ze souboru několika stovek osob s reprodukční poruchou (či jinou diagnózou) (např. Mozdarani et al., 2007; Demirhan et al., 2008; Moghbelinejad et al., 2018), zároveň ale chybí porovnání s kontrolním souborem, které by toto tvrzení podpořilo.

Uehara se spolupracovníky (1992) publikoval jednu z prvních studií, která při hodnocení reprodukčního rizika u nositelů inv(9) využila kontrolní skupinu (plody vyšetřované v rámci prenatalní diagnostiky), v jeho práci byla inv(9) výrazně častější u mužů s reprodukční poruchou, nikoliv však u žen. Akbaş et al. (2012) našli statisticky vyšší četnost heterochromatinových variant u párů s reprodukční poruchou, oproti kontrole, kterou tvořily osoby s normální reprodukční anamnézou (alespoň jedno dítě), které byly karyotypovány z jiné lékařské indikace.

V posledních 15 letech se objevují studie, které podrobněji hodnotí rozdíl v četnosti heterochromatinových variant chromozomu 9, ale i 1, 16 a Y (a většinou také délkových/strukturních variant satelitů akrocentrických chromozomů) u osob s reprodukční poruchou a tato četnost se porovnává s kontrolní skupinou (různě definovanou). Madon et al. (2005) publikovali zvýšenou četnost heterochromatinových variant chromozomů 1, 9, 13, 14, 15, 16, 21, 22 a Y u osob s reprodukční poruchou, prokázali zvýšenou četnost 9qh+ varianty, inv(9) byla častější u žen. Sahin s kolegy (2008) publikovali vyšší zastoupení chromozomových variant ve skupině osob s reprodukční poruchou (jako kontrolu využili neselektovaný soubor plodů vyšetřených pomocí odběru plodové vody), nejčastější variantou v souboru byla inv(9). Velmi podrobnou studii s propracovaným kontrolním souborem osob bez reprodukční poruchy publikovali Minocherhomji et al. (2009) a prokázali statisticky vyšší zastoupení chromozomových variant u osob s reprodukční poruchou, opět zde hrála významnou roli 9qh+ varianta, výsledky pro inv(9) nebyly statisticky významné. Ve studii zaměřené pouze na inv(9) neprokázali Dana a Stoian (2012) vyšší zastoupení inv(9) u osob s reprodukční poruchou oproti kontrolní skupině (neselektovaný vzorek plodů), inv(9) byla častější u mužů.

Do této skupiny patří i naše práce z roku 2014 (Šípek Jr et al., 2014). Také my využíváme soubor výsledků karyotypizace z prenatalní diagnostiky jako relativně snadno dosažitelnou

kontrolní skupinu, ale oproti předchozím studiím jsme tuto skupinu omezili na „zdravé“ plody, respektive na plody, které byly karyotypovány pouze z věkové indikace matek (tedy věk těhotné 35 let nebo více v době porodu), aniž by měly (dle dostupné dokumentace) patologický výsledek biochemického či ultrazvukového screeningového vyšetření (jak již bylo diskutováno výše). Rovněž jsme chromozomové varianty zúžili na varianty chromozomů s velkým blokem heterochromatinu – tedy na varianty chromozomů 1, 9, 16 a Y. I v našem souboru jsme prokázali vyšší zastoupení chromozomových variant jako celku u osob s reprodukční poruchou, výsledek byl statisticky významný. Při bližší analýze se ukázalo, že statisticky významně vyšší zastoupení platí pouze pro varianty chromozomu 9 a to konkrétně 9qh+ variantu (podobně jako u Madon et al., 2005 a Minocherhomji et al., 2009). Nález inv(9) se sice u reprodukční poruchy vyskytoval častěji, ale výsledek nebyl statisticky významný. Varianty chromozomu 9 byly v souboru osob s reprodukční poruchou častější u žen a tento poměr byl rovněž statisticky významný.

Také v následujících letech se objevily další práce se stejnou tematikou, které rovněž zmiňují heterochromatinové varianty v souvislosti s neplodností. Xiaojuan et al. (2016) uvádějí výrazně horší výsledky při asistované reprodukci u nositelů chromozomových variant. Cheng se spolupracovníky (2017) publikoval rozsáhlou studii na 19950 sterilních žen a našli vyšší zastoupení 9qh+ a inv(9) oproti kontrolnímu souboru. Tempest a Simpson v zajímavém komentáři (2017) shrnují, že v současné době je potřeba věnovat problematice heterochromatinových variant v souvislosti s lidskou reprodukcí více pozornosti, zároveň ale upozorňují, že tento typ (výše citovaných) studií pravděpodobně již poznání dále neposune a je zapotřebí více se zaměřit na objasnění možné kauzality, aby bylo možné přijít s konkrétními doporučeními pro klinickou praxi. V některých dalších článcích se setkáme i s otevřeně odvážným tvrzením, že heterochromatinové varianty jsou jednoznačně spojené s vyšším rizikem poruchy reprodukce (např. Zhang et al., 2013; Morin et al., 2017), můžeme však konstatovat, že se spíše jedná o články v periodických zaměřených obecně či na gynekologicko-porodnický pohled na tematiku. Na druhé straně je zároveň třeba uvést, že některé recentnější studie výše uvedené asociace nepotvrzují, například Wilson et al. (2017) nenalezli vyšší zastoupení délkových variant chromozomů 1, 9, 16 a Y (nehodnotili inv(9)) u potomků osob podstupivších asistovanou reprodukci z důvodu reprodukční poruchy oproti potomkům počatým spontánně. Hong et al. (2011) a s odstupem Young et al. (2019) pak neprokázali žádné negativní ovlivnění cyklů asistované reprodukce u nositelů heterochromatinových variant.

10.3.2 Vyšší riziko narození potomka s Downovým syndromem

Některé (dřívější) studie zmiňují u nositelů inv(9) také zvýšené riziko narození potomka s Downovým syndromem (Serra et al., 1990; Parmar a Sira, 2003). Tato pozorování se odvolávají na tzv. interchromozomální efekt, což je situace, kdy při přítomnosti chromozomové přestavby typu translokace či inverze dojde k narušení rozchodu chromozomů v rámci meiotického dělení a teoreticky se tak pro nositele této přestavby zvyšuje riziko různých chromozomálních aneuploidií, včetně Downova syndromu (Anton et al., 2010). V roce 1990 popsali Murthy a Prabhakara narušení meiotického dělení (předčasná separace centromer, endoreplikace, polyploidizace) u pacientky s inv(9). Vyšší zastoupení dizomických spermií u nositele inv(9) publikoval v roce 2001 Amiel se spolupracovníky. Naopak v publikaci Colls et al. z roku 1997 nebyl u nositele inv(9) interchromozomální efekt pozorován. V literatuře posledních let není interchromozomální efekt přímo u nositelů inv(9) publikován, naopak Young et al. (2019) ve své rozsáhlé studii pacientů podstupujících asistovanou reprodukci neprokázali významný interchromozomální efekt ani u nositelů translokací ani u nositelů inverzí (včetně inv(9)).

10.3.3 Další možné asociace

Existuje velké množství prací, které zmiňují možnou asociaci inv(9) s nejrůznějšími typy diagnóz, bohužel pouze na principu kazuistik bez objasnění kauzality (opět viz Tabulka 6.5). Dvě asociace byly zmiňovány častěji a to konkrétně schizofrenie a onkohematologické diagnózy.

O možné souvislosti inv(9) a schizofrenie vzniklo několik prací v devadesátých letech minulého století (Nanko, 1993; Lee et al., 1998; Kunugi et al., 1999; Miyaoka et al., 1999). V tu dobu se ještě spekulovalo, že inverze může v oblastech zlomu narušovat gen, jehož narušená exprese bude ke vzniku schizofrenie predisponovat. Žádný takový gen v těchto oblastech ale nikdy objeven nebyl a další práce o možné souvislosti inv(9) a schizofrenie se v posledních dvou desetiletích již neobjevily.

Asociaci inv(9) s hematologickými, či konkrétně hematoonkologickými diagnózami se objevuje v literatuře rovněž opakovaně. Zvláště v této souvislosti se také objevují zmínky o získané inv(9). Wan et al. (2000) prokázali získanou inv(9) v mozaice u pacienta s esenciální trombocytémií. Keung et al. (2003) prokázali vrozenou inv(9) u šesti pacientů s akutní myeloidní leukémií. Udayakumar s kolegy (2009) našli získanou inv(9)(p13q12) a del(9)(p21) u pacientky s akutní myeloidní leukémií. Suh a spolupracovníci (2010)

popsali inv(9) u 4 korejských pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Obecně ani zde ale nebyla prokázána kauzální souvislost ať již v případě vrozené či získané inv(9). Problematika získaných inv(9) u hematologických onemocnění ale může obecně spíše souviset s potenciální nestabilitou této oblasti (zejména za situace obecně zvýšené chromozomové nestability)

De novo inv(9) je v literatuře vzácně zmíněna i u dětí s různými typy vrozených vad (Rao et al., 2006; Jeong et al., 2010), opět jen kazuisticky. V této souvislosti je třeba opakovat, že i mikroskopický nález inv(9) může ve skutečnosti skrývat komplikovanější přestavbu, která by mohla být ve skutečnosti nebalancovanou přestavbou (odhalitelnou až pomocí microarray vyšetření, které by ale dnes již mělo být u dětí s PMR a dysmorfii vyšetřením standardním), jak tomu bylo v případě, který publikoval Malinverni se spolupracovníky (2016).

Ani další kazuistiky neprokázaly kauzální souvislost inv(9) a konkrétního syndromu. Namátkou z těchto publikací ještě jmenujme syndrom Walker-Warburg (Baltaci et al., 1999), Goldenharův syndrom (Stanojević et al., 2000), syndrom Cornelié de Langeové (Demirhan et al., 2008) či vrozený hallux varus (Güre, 2015).

10.4 Poslání pro současnou praxi

Obecně je možné shrnout, že ačkoliv jsou varianty chromozomu 9 včetně inv(9) základními cytogenetickými autoritami (ECA, 2012; Silva et al., 2019) považovány za benigní varianty karyotypu, není výzkum v této oblasti zcela dokončen a téma je tak opakovaně předmětem nových studií i po cca 45 letech. Četné studie zmiňující možnou souvislost s konkrétními vrozenými vadami či syndromy nebyly následovány průkazem genových defektů v oblastech „zlomů“, proto je v současnosti považujeme spíše za překonané a zůstává zde tak spíše jen hypotetická souvislost s reprodukční poruchou. Průzkum mezi 226 americkými cytogenetiky publikovaný v roce 2006 (Brothman et al., 2006) ukazuje, že ačkoliv je inv(9) dlouhodobě považována za variantu, většina dotázaných (75 %) by ji ale uváděla ve své výsledkové zprávě – viz Obrázek 10.2. Obdobný průzkum v posledním desetiletí nebyl publikován, dá se ale spekulovat, že pod vlivem výše citovaných doporučení se obecný postoj cytogenetiků k uvedeným variantám poněkud změnil.

Hlavními otázkami zůstává mechanismus vzniku těchto variant na molekulární úrovni, tedy proč v některých případech tyto varianty vznikají *de novo* či mění svůj charakter a zda v některých případech nemůže variantní struktura této oblasti opravdu zvyšovat pravděpodobnost atypického průběhu meiotického dělení a tedy i gametogeneze. Jisté je, že pokud takovýto vliv existuje, bude nejspíše sám o sobě málo významný, neboť zcela objektivně i z našeho výzkumu vyplývá, že velké množství osob s těmito variantami žádné zásadní problémy nemá. Je ovšem možné, že zde jde o určitý aditivní efekt, který spolu s dalšími geneticky podmíněnými faktory může u určitých osob opravdu k reprodukční poruše přispívat. V současné době nevidíme velký prostor ani velký důvod pro změnu současných doporučení ohledně postupu u případů nositelů variant chromozomu 9. Konkrétnější nová doporučení bude možné stanovit, až pokud budou odhaleny hypotetické kauzální souvislosti.

Chromosomal Region	Percentage of Participants Responding "Yes"	
	Consider Heteromorphism	Would Report
Prominent acrocentric short arms	91	36
Prominent acrocentric satellites	95	26
Double acrocentric satellites	95	33
Increased acrocentric stalks	95	24
Double acrocentric stalks	95	33
inv(1)(p13q21)	46	86
inv(2)(p11.2q13)	51	95
inv(3)(p11.2q12)	46	84
inv(3)(p12q12)	33	91
inv(3)(p13q12)	28	95
inv(5)(p13q13)	27	97
inv(9)(p12q13)	86	75
inv(10)(p11.2q11.2)	35	91
inv(16)(p11.2q12.1)	47	89
inv(Y)(p11.2q11.2)	50	95
1,9,16 or Yqh+ or qh-	97†	24†

* CyRC indicates Cytogenetics Resource Committee.
† Participants responded virtually the same for each of these regions.
Other regions reported by multiple participants: increased size of any centromere, 6ph+, inv(9)(p11q12), 9ph+, 18qh+, inv(19)(p12)(q13.1).

Obrázek 10.2 – Výsledky ankety mezi americkými cytogenetiky ohledně jejich názoru na různé varianty lidského karyotypu. V prvním sloupci je v % vyjádřena četnost názoru, že jde o heteromorfismus (variantu), ve druhém sloupci je procentuální souhlas s tím, že by měl být příslušný nález zapsán do finálního výsledku (upraveno podle Brothman et al., 2006).

11 Závěr

Problematika variant chromozomu 9 byla v předložené práci hodnocena ze tří různých pohledů a ke každému z nich jsme si stanovili určité cíle a hypotézy.

V **epidemiologické části** se nám podařilo nashromáždit dosud (k červnu 2019) největší publikovanou databázi případů inv(9) a publikovat její charakteristiky. Populační incidenci inv(9) jsme odhadli přibližně na 1,6 %; délkové varianty chromozomu 9 (které byly sledovány jen v menším množství souborů) mají obecně četnost vyšší – přibližně 2 %, celkovou četnost variant chromozomu 9 tak odhadujeme v rozmezí 3,3-3,9 %.

Varianty chromozomu 9 byly častější u ženského pohlaví, rozdíl ale nebyl jasně patrný ve všech analyzovaných souborech a v žádném z nich nebyl statisticky významný. Naproti tomu, statisticky významné výsledky ve spojitosti s četností variant chromozomu 9 u ženského pohlaví byly získány pouze ve speciálních analýzách zaměřených na možnou souvislost s poruchami reprodukce (zmíněny dále).

Můžeme shrnout, že epidemiologická část projektu splnila stanovené cíle a četnosti inv(9) a variant chromozomu 9 získané analýzou v české populaci odpovídají stanovené hypotéze.

V **molekulárně cytogenetické části projektu** se nám díky grantu GAUK podařilo získat prostředky na zavedení speciální FISH metodiky, v rámci které bylo pomocí kombinace tří různých sond možné bližším způsobem (oproti klasickému karyotypu) charakterizovat konkrétní varianty chromozomu 9. Zároveň jsme splnili cíl, aby tato metodika vycházela pouze z běžně komerčně nabízených sond a byla tak snadno dostupná pro (nej)širší využití.

V rámci projektu jsme za použití kombinace FISH sond vyšetřili více než pět desítek případů variantního chromozomu 9. Ve většině případů šlo o vyšetření v rámci experimentu, ovšem v několika případech jsme metodiku využili k upřesnění nálezu u reálného klinického případu, kde rutinní cytogenetická diagnostika neumožňovala blíže rozhodnout o závažnosti nalezené přestavby. Zaváděnou metodiku a její výsledky jsme průběžně prezentovali formou (nejčastěji posterových) konferenčních sdělení.

Tedy, i tento laboratorně experimentální cíl byl splněn. Skutečnost, že jsme byli již i po skončení projektu osloveni z několika externích laboratoří s rutinní žádankou o doplnění

molekulárně cytogenetické analýzy atypicky variantního chromozomu 9, je toho nejlepším důkazem.

Klinicko genetická část projektu byla ve své podstatě nejkomplikovanější. Obecně byly a jsou varianty chromozomu 9 považovány za klinicky nevýznamné varianty, avšak jejich možná souvislost s poruchami reprodukce je neustále a opakovaně cílem různých studií. V souladu s vytyčenými cíli jsme i my ověřovali možné klinické asociace variant chromozomu 9.

Zjistili jsme, že idiopatická reprodukční porucha je obecně nejčastějším důvodem k cytogenetickému vyšetření u osob s inv(9). Při porovnání četnosti indikačních diagnóz osob s nálezem inv(9) a osob, u kterých byl potvrzen normální karyotyp (kontrolní soubor), bylo prokázáno, že osoby s inv(9) jsou kvůli reprodukční poruše opravdu vyšetřovány častěji, tato závislost byla ale statisticky významná pouze u žen.

Tento fenomén byl potvrzen i studií zaměřenou na četnost všech heterochromatinových variant u osob vyšetřovaných pro idiopatickou reprodukční poruchu. Výsledné četnosti byly porovnány s četnostmi v kontrolní skupině (plodů vyšetřovaných cytogeneticky pouze na základě věkové indikace u jejich matek). Tato studie ukázala, že heterochromatinové varianty jsou u osob s idiopatickou reprodukční poruchou opravdu přítomny častěji, tato závislost byla statisticky významná pro varianty všech chromozomů (1, 9, 16 a Y) jako celek, pro všechny varianty chromozomu 9 jako celek a dále konkrétně pro 9qh+ variantu. Pokud byly závislosti testovány pro obě pohlaví zvlášť, byla statistická významnost výše uvedených závislostí prokázána opět pouze u ženského pohlaví.

Naše práce tak ze dvou různých pohledů potvrdila nálezy i jiných autorů, kteří připouštějí zatím nevysvětlený fenomén možné souvislosti nálezu varianty chromozomu 9 a vyššího rizika reprodukční poruchy ve smyslu sterility či infertility. Tato závislost není očividně nijak silná a pravděpodobně je významnější u žen – nositelek varianty chromozomu 9. Vysvětlení tohoto fenoménu na buněčné/molekulární úrovni je v tuto chvíli ovšem stále jen předmětem spekulací.

Také cíle klinicko genetické části projektu byly splněny a danou hypotézu jsme potvrdili. Shrnujeme:

1. Varianty chromozomu 9 jsou relativně častým nálezem při rutinním cytogenetickém vyšetření. Podle současných doporučení nejsou (jakožto benigní

varianty) velmi často ani uváděny na výsledkovém listu cytogenetického vyšetření. Jejich nález při rutinním vyšetření tak při absenci doporučených postupů není indikací k žádnému dalšímu vyšetření či speciálnímu klinickému doporučení.

2. Atypické varianty chromozomu 9 je možné blíže klasifikovat pomocí C-pruhování, ale tento postup je většinou nedostatečný, proto je s výhodou použít FISH metodiku s využitím více sond k posouzení charakteru konkrétní varianty. Metody typu microarray většinou nemohou typ přestavby blíže klasifikovat. Z našeho pohledu by bylo vhodné doplnit podrobnější FISH vyšetření u všech případů atypické varianty chromozomu 9, u které bude microarray vyšetřením vyloučena patologická CNV. Další variantou by bylo provádět toto doplňkové vyšetření alespoň v případech, kdy byla důvodem k vyšetření reprodukční porucha (viz dále).
3. Na základě našich studií i výsledků dalších autorů je jasné, že v tuto chvíli nemáme dostatek indicií k přehodnocení variant chromozomu 9 z neškodných variant na nálezy s potenciální patogenitou. Z našich dat je evidentní, že naprostá většina variant chromozomu 9 je opravdu zcela benigních a na lidskou reprodukci má vliv jen malé procento těchto variant (například varianty atypické stavby, které nemusí být při rutinním vyšetření karyotypu snadné rozlišit), nebo je nepříznivý vliv těchto variant na reprodukci natolik nízký, že se projeví jen v několika málo případech bez ohledu na typ varianty, například na základě dalších spolupřítomných faktorů genetické i ne-genetické povahy, nebo zda jde jen o náhodnou korelaci bez jakékoliv kauzality. Tyto otázky musíme zatím nechat nezodpovězené, ale určitě bychom neměli přestat odpovědi hledat.
4. Vzhledem k současnému vývoji genetické laboratorní diagnostiky lze očekávat, že v řadě indikací bude rutinní vyšetření karyotypu G-pruhováním v optickém mikroskopu nahrazeno vyšetřením typu microarray, případně doplněným o široké NGS vyšetření (například charakteru WES). V oblasti reprodukční medicíny je však pravděpodobné, že rutinní vyšetření karyotypu zůstane i po dobu následující dekády zachováno, neboť jde i v tuto chvíli o prakticky jedinou metodiku zachycující balancované chromozomální přestavby a nízkofrekvenční mozaicismus, tedy potenciálně významné příčiny reprodukční poruchy. Díky tomu bude detekce variant chromozomu 9 zachována i nadále a bylo by vhodné doplnit další studie.

12 Literatura

- 1) Agrawal S, Ganley ARD. The conservation landscape of the human ribosomal RNA gene repeats. *PLoS One*. 2018; 13(12):e0207531.
- 2) Akbaş H, İsi H, Oral D, Türkyılmaz A, Kalkanlı-Taş S, Simşek S, Balkan M, Sakar MN, Fidanboy M, Alp MN, Budak T. Chromosome heteromorphisms are more frequent in couples with recurrent abortions. *Genet Mol Res*. 2012;11(4):3847-51.
- 3) Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet*. 2001; 46:245–50.
- 4) Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Risk assessment and segregation analysis in a pericentric inversion inv6p23q25 carrier using FISH on decondensed sperm nuclei. *Cytogenet Genome Res*. 2002; 97(3-4):149-54.
- 5) Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet Genome Res*. 2005; 111(3-4):297-304.
- 6) Anton E, Vidal F, Blanco J. Interchromosomal effect analyses by sperm FISH: incidence and distribution among reorganization carriers. *Syst Biol Reprod Med*. 2011; 57:268–78.
- 7) Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002; 99(1):168-74.
- 8) Balíček P, Žižka J. Polymorfismus konstitutivního heterochromatinu lidských chromosomů. Nález u 109 pacientů. *Čas lék čes*. 1976; 115(47):1463-1467.
- 9) Balíček P. Pericentrické inverze lidských chromozomů a jejich rizika. *Čas lék čes*, 2001; 140(2):38-42.
- 10) Balkan W, Burns K, Martin RH. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet*. 1983; 35(4):295-7.
- 11) Baltaci V, Ors R, Kaya M, Balci S. A case associated with Walker Warburg syndrome phenotype and homozygous pericentric inversion 9: coincidental finding or aetiological factor? *Acta Paediatr*. 1999; 88(5):579-83.

- 12) Belangero SI, Christofolini DM, Bianco B, Gava MM, Wroclawski ER, Barbosa CP. Male infertility related to an aberrant karyotype, 46,XY,9ph,9qh+. *Fertil Steril.* 2009; 91(6):2732.e1-3.
- 13) Betz JL, Behairy AS, Rabionet P, Tirtorahardjo B, Moore MW, Cotter PD. Acquired inv(9): what is its significance? *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 160(1):76-8.
- 14) Boronova I, Bernasovska J, Cakanova G, Ferenc P., Petrejckikova E, Szabadosova V. Heterochromatin Variants in Slovak Women with Reproductive Failure, *International Journal of Human Genetics* 2015; 15(1):1-5.
- 15) Boué J, Taillemite JL, Hazael-Massieux P, Léonard C, Boué A. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and reproductive failure in ten unrelated families. *Humangenetik.* 1975; 30(3):217-24.
- 16) Brewer KRW. A Model of Systematic Sampling with Unequal Probabilities. *Australian Journal of Statistics.* 1963, 1(5):5-13.
- 17) Brothman AR, Schneider NR, Saikevych I, Cooley LD, Butler MG, Patil S, Mascarello JT, Rao KW, Dewald GW, Park JP, Persons DL, Wolff DJ, Vance GH; Cytogenetics Resource Committee, College of American Pathologists/American College of Medical Genetics. Cytogenetic heteromorphisms: survey results and reporting practices of giemsa-band regions that we have pondered for years. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130(7):947-9.
- 18) Brothman, A.R., Schnedier, N.R., Saikevych, I., et al. Cytogenetic heteromorphisms: survey results and reporting practices of giemsa-band regions that we have pondered for years. *Arch Pathol Lab Med*, 2006, 130(7), p. 947–949.
- 19) Caer E, Perrin A, Douet-Guilbert N, Amice V, De Braekeleer M, Morel F. Differing mechanisms of meiotic segregation in spermatozoa from three carriers of a pericentric inversion of chromosome 8. *Fertil Steril.* 2008; 89:1637–40.
- 20) Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential banding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res.* 1970; 60:315–9.
- 21) Ceylan G, Ceylan C, Yuce H. A rare seen case with homozygosity for pericentric inversion of chromosome 9 and primary infertility. *Am J Case Rep.* 2008; 9:385-388.
- 22) Collodel G, Moretti E, Capitani S, Piomboni P, Anichini C, Estenoz M, Baccetti B. TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia.* 2006; 38(4):122-7.

- 23) Colls P, Blanco J, Martínez-Pasarell O, Vidal F, Egozcue J, Márquez C, Guitart M, Templado C. Chromosome segregation in a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(9)(p11q13), analyzed by using sperm karyotyping and two-color fluorescence in situ hybridization on sperm nuclei. *Hum Genet.* 1997; 99(6):761-5.
- 24) Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, Deardorff MA, Krantz ID, Hakonarson H, Spinner NB. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(7):1263-75.
- 25) Cotter PD, Babu A, McCurdy LD, Caggana M, Willner JP, Desnick RJ. Homozygosity for pericentric inversions of chromosome 9. Prenatal diagnosis of two cases. *Ann Genet.* 1997;40(4):222-6.
- 26) Dana M, Stoian V. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. *Maedica (Buchar).* 2012; 7(1):25-9.
- 27) de la Chapelle A, Schröder J, Stenstrand K, Fellman J, Herva R, Saarni M, Anttolainen I, Tallila I, Tervilä L, Husa L, Tallqvist G, Robson EB, Cook PJ, Sanger R. Pericentric inversions of human chromosomes 9 and 10. *Am J Hum Genet.* 1974; 26(6):746-66.
- 28) de Vree PJ, Simon ME, van Dooren MF, Stoevelaar GH, Hilkmann JT, Rongen MA, Huijbregts GC, Verkerk AJ, Poddighe PJ. Application of molecular cytogenetic techniques to clarify apparently balanced complex chromosomal rearrangements in two patients with an abnormal phenotype: case report. *Mol Cytogenet.* 2009; 2:15.
- 29) Demirhan O, Pazarbasi A, Suleymanova-Karahan D, Tanriverdi N, Kilinc Y. Correlation of clinical phenotype with a pericentric inversion of chromosome 9 and genetic counseling. *Saudi Med J.* 2008; 29(7):946-51.
- 30) Demirhan O, Taştemir D. Chromosome aberrations in a schizophrenia population. *Schizophr Res.* 2003; 65(1):1-7.
- 31) E.C.A. Permanent Working Group for Cytogenetics and Society, Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: A common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations. 2012. 33 s., Online: [https://www.e-ca.eu/files/downloads/Guidelines/E.C.A. General Guidelines Version-2.0.pdf](https://www.e-ca.eu/files/downloads/Guidelines/E.C.A._General_Guidelines_Version-2.0.pdf) (30.4.2019).

- 32) Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009 84(4):524-33.
- 33) Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome) *Lancet.* 1959;1959(i):711-3.
- 34) Fuenmayor HM, Roldan-París L, Bermúdez H. Ectodermal dysplasia in females and inversion of chromosome 9. *J Med Genet.* 1981; 18(3):214-7.
- 35) Fungtammasan A, Walsh E, Chiaromonte F, Eckert KA, Makova KD. A genome-wide analysis of common fragile sites: what features determine chromosomal instability in the human genome? *Genome Res.* 2012; 22(6):993-1005.
- 36) Gardner RJMcK, Amor DJ. *Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling: 5th Edition*, Oxford University Press, Oxford, 2018; 728 s.
- 37) Gersen SL, Keagle MB *The Principles of Clinical Cytogenetics: 3rd Edition*, Springer, Berlin 2013;569 s.
- 38) Gu S, Szafranski P, Akdemir ZC, Yuan B, Cooper ML, Magriñá MA, Bacino CA, Lalani SR, Breman AM1, Smith JL, Patel A, Song RH, Bi W, Cheung SW, Carvalho CM, Stankiewicz P, Lupski JR. Mechanisms for Complex Chromosomal Insertions. *PLoS Genet.* 2016; 12(11):e1006446.
- 39) Guilherme RS, Meloni VF, Kim CA, Pellegrino R, Takeno SS, Spinner NB, Conlin LK, Christofolini DM, Kulikowski LD, Melaragno MI. Mechanisms of ring chromosome formation, ring instability and clinical consequences. *BMC Med Genet.* 2011; 12:171
- 40) Gürel SA. Prenatal diagnosis of congenital hallux varus deformity associated with pericentric inversion of chromosome 9. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015; 41(4):628-30.
- 41) Harper PS. The discovery of the human chromosome number in Lund, 1955-1956. *Hum Genet.* 2006; 119(1-2):226-32.
- 42) Hermetz KE, Newman S, Conneely KN, Martin CL, Ballif BC, Shaffer LG, Cody JD, Rudd MK. Large inverted duplications in the human genome form via a fold-back mechanism. *PLoS Genet.* 2014; 10(1):e1004139.

- 43) Hong Y, Zhou YW, Tao J, Wang SX, Zhao XM. Do polymorphic variants of chromosomes affect the outcome of in vitro fertilization and embryo transfer treatment? *Hum Reprod.* 2011; 26(4):933-40.
- 44) Hsu LY, Benn PA, Tannenbaum HL, Perlis TE, Carlson AD. Chromosomal polymorphisms of 1, 9, 16, and Y in 4 major ethnic groups: a large prenatal study. *Am J Med Genet.* 1987; 26(1):95-101.
- 45) Huisinga KL, Brower-Toland B, Elgin SC. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma.* 2006; 115(2):110-22.
- 46) Cheng R, Ma Y, Nie Y, Qiao X, Yang Z, Zeng R1, Xu L2. Chromosomal polymorphisms are associated with female infertility and adverse reproductive outcomes after infertility treatment: a 7-year retrospective study. *Reprod Biomed Online.* 2017; 35(1):72-80.
- 47) Cheung RT, Wong AM. Optic nerve hypoplasia associated with chromosome 9 inversion. *Can J Ophthalmol.* 2009; 44(5):610-1.
- 48) Cho EH, Kang YS, Lee EH. Extra G-positive band at chromosome 9q13 as a recurrent heteromorphism in a Korean population. *Fetal Pediatr Pathol.* 2011; 30(4):257-9.
- 49) Jaarola M, Martin RH, Ashley T. Direct evidence for suppression of recombination within two pericentric inversions in humans: a new sperm-FISH technique. *Am J Hum Genet.* 1998; 63(1):218-24.
- 50) Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature.* 1959;183:302-3.
- 51) Jenderny J, Gebauer J, Röhrborn G, Rüger A. Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 20. *Hum Genet.* 1992; 89(1):117-9.
- 52) Jeong SY, Kim BY, Yu JE. De novo pericentric inversion of chromosome 9 in congenital anomaly. *Yonsei Med J.* 2010; 51(5):775-80
- 53) Jin H, Ping L, Jie Q, Ying L, Yongjian C. Translocation chromosome karyotypes of the Robertsonian translocation carriers' embryos. *Fertil Steril.* 2010; 93(4):1061-5.
- 54) Joseph-George AM, He Y, Marshall CR, Wong RC, MacDonald JR, Fahey CA, Chitayat D, Chun K, Ryan G, Summers AM, Winsor EJ, Scherer SW. Euchromatic 9q13-q21 duplication variants are tandem segmental amplifications of sequence reciprocal to 9q13-q21 deletions. *J Med Genet.* 2011; 48(5):317-22.

- 55) Kajii T, Oama K, Avirachan S, Avirachan TT. Trypsin banding of Giemsa-stained chromosomes. *Lancet*. 1972; 2(7790):1311-2.
- 56) Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992; 258:818–821.
- 57) Kehrer-Sawatzki H, Szamalek JM, Tänzer S, Platzer M, Hameister H. Molecular characterization of the pericentric inversion of chimpanzee chromosome 11 homologous to human chromosome 9. *Genomics*. 2005; 85(5):542-50.
- 58) Keung YK, Pettenati M, Hurd DD, Powell BL, Buss DH. Allogenic marrow grafts from unrelated donors with congenital pericentric inversion of chromosome 9. *Br J Haematol*. 2002; 116(1):237-8.
- 59) Khaleghian M, Azimi C. Homozygosity for pericentric inversions of chromosome 9 in a patient's parents with stillbirth-report of a new case and review of literature. *Irani J Public Health*. 2006; 35:22–27.
- 60) Kosyakova N, Grigorian A, Liehr T, Manvelyan M, Simonyan I, Mkrtychyan H, Aroutiounian R, Polityko AD, Kulpanovich AI, Egorova T, Jaroshevich E, Frolova A, Shorokh N, Naumchik IV, Volleth M, Schreyer I, Nelle H, Stumm M, Wegner RD, Reising-Ackermann G, Merkas M, Brecevic L, Martin T, Rodríguez L, Bhatt S, Ziegler M, Kreskowski K, Weise A, Sazci A, Vorsanova S, Cioffi Mde B, Ergul E. Heteromorphic variants of chromosome 9. *Mol Cytogenet*. 2013; 6(1):14.
- 61) Kottler M. From 48 to 46: cytological technique, preconception and the counting of human chromosomes. *Bull Hist Med*. 1974; 48:465–502
- 62) Kunugi H, Lee KB, Nanko S. Cytogenetic findings in 250 schizophrenics: evidence confirming an excess of the X chromosome aneuploidies and pericentric inversion of chromosome 9. *Schizophr Res*. 1999; 40(1):43-7.
- 63) Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol*. 2002; 14(3):286-98.
- 64) Lee KB, Kunugi H, Nanko S. Familial schizophrenia with pericentric inversion of chromosome 9: a case report. *Schizophr Res*. 1998; 32(2):123-6.
- 65) Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R. Trois cas de délétion partielle du bras court d'un chromosome 5. *CR Acad Sci (D)* 1963; 257:3098–3102.

- 66) Lejeune J., Gautier M. and Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences (Paris)*. 1959; 248:1721-1722.
- 67) Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 107(1-2):55-67.
- 68) Liehr T. *Benign and Pathological Chromosomal Imbalances: Microscopic and Submicroscopic Copy Number Variations (CNVs) in Genetics and Counseling*. 1st Edition. Academic Press, 2013; Cambridge, USA, 220 s.
- 69) Liehr T. Cytogenetically visible copy number variations (CG-CNVs) in banding and molecular cytogenetics of human; about heteromorphisms and euchromatic variants *Mol Cytogenet*. 2016; 9: 5.
- 70) Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997; 389(6648):251-60.
- 71) Luijsterburg MS, Dinant C, Lans H, Stap J, Wiernasz E, Lagerwerf S, Warmerdam DO, Lindh M, Brink MC, Dobrucki JW, Aten JA, Fousteri MI, Jansen G, Dantuma NP, Vermeulen W, Mullenders LH, Houtsmuller AB, Verschure PJ, van Driel R. Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J Cell Biol*. 2009; 185(4):577-86.
- 72) Madon PF, Athalye AS, Parikh FR. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11(6):726-32.
- 73) Malinverni AC, Colovati ME, Perez AB, Caneloi TP, Oliveira HR Jr, Kosyakova N, Liehr T, Hamid AB, Melaragno MI. Unusual Duplication in the Pericentromeric Region of Chromosome 9 in a Patient with Phenotypic Alterations. *Cytogenet Genome Res*. 2016; 150(2):100-105.
- 74) Martin RH. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update*. 2008; 14(4):379-90.
- 75) Martin RH, Chernos JE, Lowry RB, Pattinson HA, Barclay L, Ko E. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 1. *Hum Genet*. 1994; 93(2):135-8.
- 76) Martin RH. Analysis of sperm chromosome complements from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv(8)(p23q22). *Cytogenet Cell Genet*. 1993; 62(4):199-202.

- 77) Martin RH. Cytogenetic analysis of sperm from a man heterozygous for a pericentric inversion, inv (3) (p25q21). *Am J Hum Genet.* 1991; 48(5):856-61.
- 78) McCandless F, Jones I, Harper K, Craddock N. Intrafamilial association of pericentric inversion of chromosome 9, inv (9)(p11-q21), and rapid cycling bipolar disorder. *Psychiatr Genet.* 1998; 8(4):259-62.
- 79) McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. *ISCN 2016 - An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*
- 80) Metaxotou C, Kalpini-Mavrou A, Panagou M, Tsenghi C. Polymorphism of chromosome 9 in 600 Greek subjects. *Am J Hum Genet.* 1978; 30(1):85-9.
- 81) Mikhaail-Philips MM, Ko E, Chernos J, Greene C, Rademaker A, Martin RH. Analysis of chromosome segregation in sperm from a chromosome 2 inversion heterozygote and assessment of an interchromosomal effect. *Am J Med Genet A.* 2004; 127A(2):139-43.
- 82) Mikhaail-Philips MM, McGillivray BC, Hamilton SJ, Ko E, Chernos J, Rademaker A, Martin RH. Unusual segregation products in sperm from a pericentric inversion 17 heterozygote. *Hum Genet.* 2005;117(4):357-65.
- 83) Minocherhomji S, Athalye AS, Madon PF, Kulkarni D, Uttamchandani SA, Parikh FR. A case-control study identifying chromosomal polymorphic variations as forms of epigenetic alterations associated with the infertility phenotype. *Fertil Steril.* 2009; 92(1):88-95.
- 84) Miyaoka T, Seno H, Itoga M, Ishino H. A case of small cerebral cyst and pericentric inversion of chromosome 9 that developed schizophrenia-like psychosis. *Psychiatry Clin Neurosci.* 1999; 53(5):599-602.
- 85) Moghbelinejad S, Mozdarani H, Ghoraiean P, Asadi R. Basic and clinical genetic studies on male infertility in Iran during 2000-2016: A review. *Int J Reprod Biomed (Yazd).* 2018; 16(3):131-148.
- 86) Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res.* 1960; 20:613-6.
- 87) Morel F, Laudier B, Guérif F, Couet ML, Royère D, Roux C, Bresson JL, Amice V, De Braekeleer M, Douet-Guilbert N. Meiotic segregation analysis in spermatozoa of pericentric inversion carriers using fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod.* 2007; 22(1):136-41.

- 88) Morin SJ, Eccles J, Iturriaga A, Zimmerman RS. Translocations, inversions and other chromosome rearrangements. *Fertil Steril*. 2017; 107(1):19-26.
- 89) Mozdarani H, Meybodi AM, Karimi H. Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9) (p11q12)] on infertility. *Indian J Hum Genet*. 2007; 13(1):26-9.
- 90) Müller H, Klinger HP, Glasser M. Chromosome polymorphism in a human newborn population. II. Potentials of polymorphic chromosome variants for characterizing the idiogram of an individual. *Cytogenet Cell Genet*. 1975; 15(4):239-55.
- 91) Murthy SK, Prabhakara K. Mitotic disturbances associated with inversion 9qh. A case report. *Ann Genet*. 1990; 33(3):169-72.
- 92) Muthuvel A, Ravindran M, Chander A, Subbian C. Pericentric inversion of chromosome 9 causing infertility and subsequent successful in vitro fertilization. *Niger Med J*. 2016; 57(2):142-4.
- 93) Mutton DE, Daker MG. Pericentric inversion of chromosome 9. *Nat New Biol*. 1973; 241(107):80.
- 94) Nambiar M, Raghavan SC. How does DNA break during chromosomal translocations? *Nucleic Acids Res*. 2011; 39(14):5813-25.
- 95) Nanko S. Schizophrenia with pericentric inversion of chromosome 9: a case report. *Jpn J Psychiatry Neurol*. 1993; 47(1):47-9.
- 96) Navarro J, Benet J, Martorell MR, Templado C, Egozcue J. Segregation analysis in a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 7 (p13;q36) by sperm chromosome studies. *Am J Hum Genet*. 1993; 53(1):214-9.
- 97) Noma K, Allis CD, Grewal SI. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science*. 2001; 293(5532):1150-5.
- 98) Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic myelocytic leukaemia *Science*. 1960; 132:1497.
- 99) Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, Catanese JJ, de Jong PJ. A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Res*. 2001; 11(3):483-96.
- 100) Pardue ML, Gall JG. Chromosomal localisation of mouse satellite DNA. *Science*. 1970; 168:1356–8.

- 101) Park JP, Wojiski SA, Spellman RA, Rhodes CH, Mohandas TK. Human chromosome 9 pericentric homologies: implications for chromosome 9 heteromorphisms. *Cytogenet Cell Genet.* 1998; 82(3-4):192-4.
- 102) Parmar RC, Sira P. Prenatal diagnosis of partial trisomy 21 associated with maternal balanced translocation 46xx der 21 t(21q;22q) with pericentric inversion of chromosome 9. *J Postgrad Med.* 2003; 49(2):154-6.
- 103) Patil SR, Lubs HA. Classification of qh regions in human chromosomes 1, 9, and 16 by C-banding. *Hum Genet.* 1977. 38(1):35-8.
- 104) Pavelić J, Culić S, Culić V. Common acute lymphoblastic leukemia Ph⁺ following Langerhans cell histiocytosis in a multi-malformed child with INV (9) (p12;q13) (mat): case report. *Acta Med Okayama.* 2010; 64(4):263-5.
- 105) Phelan MC, Stevenson RE, Anderson EV Jr. Recombinant chromosome 9 possibly derived from breakage and reunion of sister chromatids within a paracentric inversion loop. *Am J Med Genet.* 1993; 15;46(3):304-8.
- 106) Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genet.* 1998; 20:207–211.
- 107) Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83:2934–2938.
- 108) Prakash K, Fournier D. Evidence for the implication of the histone code in building the genome structure. *Biosystems.* 2018; 164:49-59.
- 109) Ramegowda S, Savitha MR, Krishnamurthy B, Doddaiah N, Prasanth SN, Ramachandra NB. Association Between Pericentric Inversion in Chromosome 9 and Congenital Heart Defects. *Int J Hum Genet.* 2007;7(3):241-248.
- 110) Ramesh KH, Verma RS. Breakpoints in alpha, beta, and satellite III DNA sequences of chromosome 9 result in a variety of pericentric inversions. *J Med Genet.* 1996; 33(5):395-8.
- 111) Rao BV, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K. Pericentric inversion of chromosome 9[inv(9)(p12q13)]: Its association with genetic diseases. *Indian Journal of Human Genetics.* 2006; 12(3):129-132.
- 112) Richards EJ, Elgin SC. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell,* 2002; 108:489–500.

- 113) Robinson WP, Dutly F, Nicholls RD, Bernasconi F, Peñaherrera M, Michaelis RC, Abeliovich D, Schinzel AA. The mechanisms involved in formation of deletions and duplications of 15q11-q13. *J Med Genet.* 1998; 35(2):130-6.
- 114) Rowe LR, Lee JY, Rector L, Kaminsky EB, Brothman AR, Martin CL, South ST. U-type exchange is the most frequent mechanism for inverted duplication with terminal deletion rearrangements. *J Med Genet.* 2009; 46(10):694-702.
- 115) Sahin FI, Yilmaz Z, Yuregir OO, Bulakbasi T, Ozer O, Zeyneloglu HB. Chromosome heteromorphisms: an impact on infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25(5):191-5.
- 116) Samonte RV, Conte RA, Ramesh KH, Verma RS. Molecular cytogenetic characterization of breakpoints involving pericentric inversions of human chromosome 9. *Hum Genet.* 1996; 98(5):576-80.
- 117) Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet.* 1971; 2(7731):971-2.
- 118) Serra A, Brahe C, Millington-Ward A, Neri G, Tedeschi B, Tassone F, Bova R. Pericentric inversion of chromosome 9: prevalence in 300 Down syndrome families and molecular studies of nondisjunction. *Am J Med Genet Suppl.* 1990; 7:162-8.
- 119) Sharony R, Amiel A, Einy R, Fejgin M. Prenatal diagnosis of pericentric inversion in homologues of chromosome 9: a decision dilemma. *Am J Perinatol.* 2007; 24(2):137-40.
- 120) Sheth FJ, Liehr T, Kumari P, Akinde R, Sheth HJ, Sheth JJ. Chromosomal abnormalities in couples with repeated fetal loss: An Indian retrospective study. *Indian J Hum Genet.* 2013; 19(4):415-22.
- 121) Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, Rack K, Hastings R. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *Eur J Hum Genet.* 2019; 27(1):1-16.
- 122) Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, Papadopoulou E, Kanavakis E, Kosmaidou-Aravidou Z, Patsalis PC. Cryptic genomic imbalances in patients with de novo or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. *Mol Cytogenet.* 2008; 1:15.
- 123) Sotoudeh A, Rostami P, Nakhaeimoghadam M, Mohsenipour R, Rezaei N. Pericentric Inversion of Chromosome 9 in an Infant With Ambiguous Genitalia. *Acta Med Iran.* 2017; 55(10):655-657.

- 124) Společnost lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP. Aktualizace doporučeného postupu Genetické laboratorní vyšetření v reprodukční genetice. 2018 Online: <https://www.slg.cz/2018/aktualizace-doporuceneho-postupu-geneticke-laboratorni-vysetreni-v-reprodukcni-genetice> (30.4.2019)
- 125) Společnost lékařské genetiky a genomiky ČLS JEP. Genetická vyšetření dětí před umístěním do náhradní rodinné péče. 2014 Online: <https://www.slg.cz/2014/geneticka-vysetreni-deti-pred-umistenim-do-nahradni-rodinne-pece> (30.4.2019)
- 126) Srebniak M, Wawrzkiwicz A, Wiczowski A, Kaźmierczak W, Olejek A. Subfertile couple with inv(2),inv(9) and 16qh+. *J Appl Genet.* 2004; 45(4):477-9.
- 127) Stanojević M, Stipoljev F, Koprčina B, Kurjak A. Oculo-auriculo-vertebral (Goldenhar) spectrum associated with pericentric inversion 9: coincidental findings or etiologic factor? *J Craniofac Genet Dev Biol.* 2000; 20(3):150-4.
- 128) Starke H, Seidel J, Henn W, Reichardt S, Volleth M, Stumm M, Behrend C, Sandig KR, Kelbova C, Senger G, Albrecht B, Hansmann I, Heller A, Claussen U, Liehr T. Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10(12):790-800.
- 129) Stimpson KM, Matheny JE, Sullivan BA. Dicentric chromosomes: unique models to study centromere function and inactivation. *Chromosome Res.* 2012; 20(5):595-605.
- 130) Suh B, Song J, Kim J, Park TS, Choi JR. Constitutional pericentric inversion 9 in Korean patients with chronic myelogenous leukemia. *Korean J Lab Med.* 2010; 30(3):218-23.
- 131) Suzuki MM1, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008; 9(6):465-76.
- 132) Šípek A Jr, Mihalová R, Panczak A, Janashia M, Celbová L, Kohoutová M. Pokročilý věk matky jako indikace k provedení amniocentézy – zhodnocení karyotypu u 418 vyšetřených plodů. *Čes. Gynek.* 2011; 76(3): 230-234.
- 133) Šípek A Jr, Gregor V, Šípek A. Prenatální diagnostika chromosomových aberací v České republice: Aktuální data a významné trendy. *Čas. Lék. čes.* 2018; 157(3):137-140

- 134) Šípek A Jr, Mihalová R, Panczak A, Celbová L, Šípek A, Hazdrová I, Gregor V. Varianty lidských chromozomů a jejich význam z pohledu klinické genetiky. *Prakt. Léč.* 2012; 4: 205-208.
- 135) Šípek A Jr, Mihalová R, Panczak A, Hrčková L, Janashia M, Kaspříková N, Kohoutová M. Heterochromatin variants in human karyotypes: a possible association with reproductive failure. *Reprod Biomed Online.* 2014; 29(2):245-50.
- 136) Šípek A Jr, Panczak A, Mihalová R, Hrčková L, Suttrová E, Sobotka V, Lonský P, Kaspříková N, Gregor V. Pericentric Inversion of Human Chromosome 9 Epidemiology Study in Czech Males and Females. *Folia Biol (Praha).* 2015; 61(4):140-6.
- 137) Tamaru H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line. *Genes Dev.* 2010; 24(14):1465-78.
- 138) Tempest HG, Simpson JL. Why are we still talking about chromosomal heteromorphisms? *Reprod Biomed Online.* 2017; 35(1):1-2.
- 139) Teo SH, Tan M, Knight L, Yeo SH, Ng I. Pericentric inversion 9--incidence and clinical significance. *Ann Acad Med Singapore.* 1995; 24(2):302-4.
- 140) Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas.* 1956; 42:1-6
- 141) Trojer P, Reinberg D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell.* 2007; 28(1):1-13.
- 142) Udayakumar AM, Pathare AV, Dennison D, Raeburn JA. Acquired pericentric inversion of chromosome 9 in acute myeloid leukemia. *J Appl Genet.* 2009; 50(1):73-6.
- 143) Uehara S, Akai Y, Takeyama Y, Takabayashi T, Okamura K, Yajima A. Pericentric inversion of chromosome 9 in prenatal diagnosis and infertility. *Tohoku J Exp Med.* 1992; 166(4):417-27.
- 144) Verma RS, Babu A. *Human Chromosomes: Principles and Techniques* 2nd Edition, McGraw-Hill, New York, 1995; 419 s.
- 145) Vijay S, Narayanan G, Sarojam S, Raveendran SK, Hariharan S. Enigmatic Inv(9): A Case Report on Rare Findings in Hematological Malignancies. *Iran Red Crescent Med J.* 2016; 18(4):e25062.
- 146) Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science.* 2002; 297(5588):1833-7.

- 147) Wahrman J, Atidia J, Goitein R, Cohen T. Pericentric inversions of chromosome 9 in two families. *Cytogenetics*. 1972; 11(2):132-144.
- 148) Wan TS, Ma SK, Chan LC. Acquired pericentric inversion of chromosome 9 in essential thrombocythemia. *Hum Genet*. 2000; 106(6):669-70.
- 149) Wang JC, Boyar FZ. Chromosomal microarray analysis as the first-tier test for the identification of pathogenic copy number variants in chromosome 9 pericentric regions and its challenge. *Mol Cytogenet*. 2016; 10;9:64.
- 150) Watson, JD, Crick, FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953; 171:737-738.
- 151) Wilson A, Watt K, Ma S. The incidence of long heterochromatic polymorphism variants in infants conceived through assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online*. 2017; 35(2):219-224.
- 152) Worsham MJ, Miller DA, Devries JM, Mitchell AR, Babu VR, Surli V, Weiss L, Van Dyke DL. A dicentric recombinant 9 derived from a paracentric inversion: phenotype, cytogenetics, and molecular analysis of centromeres. *Am J Hum Genet*. 1989; 44(1):115–123.
- 153) Wyandt HE, Wilson GN, Tonk VS. *Human Chromosome Variation: Heteromorphism, Polymorphism and Pathogenesis* 2nd ed. Springer, New York, 2017; 490 s.
- 154) Xu X, Zhang R, Wang W, Liu H, Liu L, Mao B, Zeng X, Zhang X. The effect of chromosomal polymorphisms on the outcomes of fresh IVF/ICSI-ET cycles in a Chinese population. *J Assist Reprod Genet*. 2016; 33(11):1481-1486.
- 155) Yakut T, Acar H, Egeli U, Kimya Y. Frequency of recombinant and nonrecombinant products of pericentric inversion of chromosome 1 in sperm nuclei of carrier: by FISH technique. *Mol Reprod Dev*. 2003; 66(1):67-71.
- 156) Yamada K. Population studies of INV(9) chromosomes in 4,300 Japanese: incidence, sex difference and clinical significance. *Jpn J Hum Genet*. 1992; 37(4):293-301.
- 157) Young D, Klepacka D, McGarvey M, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Infertility patients with chromosome inversions are not susceptible to an inter-chromosomal effect. *J Assist Reprod Genet*. 2019; 36(3):509-516.
- 158) Yuksel S, Savaci S, Ekici C, Kurtoglu EL, Korkmaz S, Yesilada E. Prevalence of Pericentric Inversion of Chromosome 9 in Eastern Anatolia Region and Relationship to Reproductive Efficiency. *EJMO*. 2018; 2(1): 40-42.

- 159) Zhang C, Peng H, Hu Y. Twin Pregnancy Obtention of Patient with Nonmosaic Klinefelter's Syndrome and His Wife with Chromosome 9 Inversion by ICSI Treatment. *Int J Fertil Steril*. 2013; 7(2):142-6.

13 Přílohy

Příloha 1: Pracovní postup - Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) (PP-UBLG-50-007)

Příloha 2: Kompletní výsledky molekulárně cytogenetické části projektu.