

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**  
Autoreferát dizertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

Varianty chromozomu 9 u člověka - od normy k patologii

*Epidemiologie a význam v klinické genetické praxi*

**MUDr. Antonín Šípek**

Praha, 2019

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

**Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie**

**Předseda oborové rady: doc. RNDr. Dana Holá, Ph.D.**

**Školící pracoviště: Ústav biologie a lékařské genetiky, Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze**

**Školitel: MUDr. Aleš Panczak, CSc.**

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

# 1 Obsah

1	Obsah.....	3
2	Souhrn .....	4
3	Summary .....	5
4	Úvod.....	6
4.1	Variety chromozomu 9 .....	6
4.2	Pericentrická inverze chromozomu 9 a její klinický význam .....	9
5	Cíle práce, hypotézy .....	11
5.1	Epidemiologická část:.....	11
5.2	Molekulárně-cytogenetická část: .....	11
5.3	Klinicko-genetická část: .....	11
6	Metodika.....	12
6.1	Epidemiologická studie.....	12
6.1.1	Databáze vytvořené v rámci ÚBLG 1. LF UK a VFN .....	12
6.1.2	Databáze vytvořené v rámci OLG TN.....	14
6.1.3	Databáze vytvořené v rámci Sanatoria Pronatal .....	14
6.2	Molekulárně cytogenetická analýza.....	15
6.3	Testování asociace variant chromozomu 9 s lidskými patologiemi.....	17
6.4	Statistické zpracování .....	17
7	Výsledky.....	18
7.1	Četnost variant chromozomu 9 v laboratorních souborech a přehled indikací k cytogenetickému vyšetření.....	18
7.2	Odhad populační četnosti inv(9).....	19
7.3	Vyhodnocení poměru pohlaví v laboratorních a speciálních souborech.....	20
7.4	Četnost variant chromozomu 9 u osob s reprodukční poruchou.....	20
7.5	Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy vybraných případů variant chromozomu 9....	24
8	Závěr.....	27
9	Použitá literatura.....	30
10	Seznam publikací autora.....	34
10.1	K tématu dizertační práce .....	34
10.1.1	Práce s IF .....	34
10.1.2	Práce bez IF .....	34
10.2	Publikace mimo téma dizertační práce .....	35
10.2.1	Práce s IF .....	35
10.2.2	Práce bez IF .....	35
11	Seznam konferenčních příspěvků k tématu dizertační práce.....	40
11.1	Mezinárodní konference (mimo Slovenskou republiku) .....	40
11.2	Konference pořádané v České a Slovenské republice .....	41

## 2 Souhrn

Heterochromatinové varianty lidského chromozomu 9 představují jedny z nejčastějších variant lidského karyotypu. Variabilita zasahuje oblast velkého bloku konstitutivního pericentrického heterochromatinu chromozomu 9, která je tvořena 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)***

### 3 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)***

## 4 Úvod

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, typicky jsou to oblasti velkého bloku konstitutivního heterochromatinu v oblastech 1q, 9q, 16q a Yq a dále pak krátká ramena akrocentrických chromozomů (13p, 14p, 15p, 21p, 22p), známé jsou i některé variantní inverze (Gardner a Amor, 2018). Tyto změny jsou běžně zachycovány jako variantní nálezy během vyšetření karyotypu v optickém mikroskopu, podle mezinárodní cytogenetické nomenklatury ISCN (citujeme poslední vydání z roku 2016) jde o varianty normálního karyotypu a například dle doporučení Evropské cytogenetické agentury by ani neměly být uváděny do výsledkové zprávy pro indikujícího lékaře (E.C.A., 2012).

### 4.1 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 4.1).

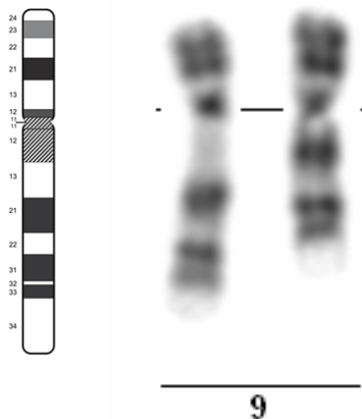
Zápis dle ISCN	Slovní popis
9qh+	Zvětšený heterochromatinový úsek chromozomu 9
9qh-	Zmenšený heterochromatinový úsek chromozomu 9
9ph	Heterochromatin na krátkém ramenu chromozomu 9
9phqh	Heterochromatin na krátkém i dlouhém ramenu chromozomu 9
inv(9)(p12q13)	Pericentrická inverze chromozomu 9 (častější,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

Tabulka 4.1 – Přehled hlavních variant lidského chromozomu 9. Převzato z publikace Šípek Jr et al., 2012.

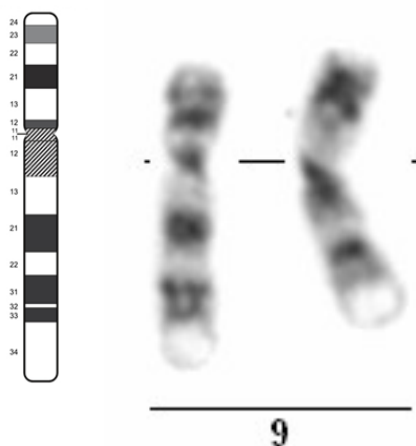
Podle nomenklatury ISCN je můžeme rozdělit do tří hlavních skupin:

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 4.1.

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 nálezn dle nomenklatury nejčastěji zapisován jako  $inv(9)(p12q13)$ , obrázek 4.2. Zvláště ve starších textech je možné nalézt alternativní zápisy jako je  $inv(9)(p11q12)$ , případně  $inv(9qh)$ . Vzácněji je také uváděna rozsáhlejší inverze  $inv(9)(p12q21)$ , v současné době je spíše doporučeno využít molekulárně cytogenetickou klasifikaci (Kosyakova et al., 2013). V tomto textu nejčastější variantu inverze odkazujeme obecně jako „ $inv(9)$ “.



*Obrázek 4.1 – Délkové varianty chromozomu 9, méně častý nálezn dvou různých délkových variant u jedné osoby. Na fotografii vlevo je homolog s prodlouženým heterochromatinem (9qh+), vpravo je pak homolog s abnormálně zkráceným heterochromatinem (9qh-). V levé části schématu je ideogram chromozomu 9 ve stejném rozlišení.*



Obrázek 4.2 – Pericentrická inverze chromozomu 9 v nejběžnější podobě, hodnocená dle ISCN nomenklatury jako *inv(9)(p12q13)*. 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



## 4.2 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). Inv(9) se podle různých odhadů vyskytuje přibližně u 1-1,5 % osob (Serra et al., 1990).

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. 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. Po proběhnutí crossing-overu za této konstelace může docházet k tzv. rekombinační aneuzomii, tedy vzniku gamet s nebalancovanou chromozomální výbavou, která má charakter parciální delece 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 nejsnadněji sledovat ve spermiích mužů – nositelů pericentrické inverze. Rizikovost nejčastějších typů pericentrických inverzí shrnul ve svém přehledu Morel se spolupracovníky (2007). Námi 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).

Kromě reprodukčních poruch byla opakovaně zmíněna možná asociace inv(9) a vyššího rizika zplození 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 případech hematoonkologických 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 hematoonkologického 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.

## 5 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.

### 5.1 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.

### 5.2 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.

### 5.3 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.

## 6 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.

### 6.1 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, respektive VFN)
- Oddělení lékařské genetiky Thomayerovy nemocnice, Cytogenetická laboratoř (dále jen OLG TN, respektive TN)
- Oddělení lékařské genetiky, Sanatorium Pronatal, Cytogenetická laboratoř (dále jen Sanatorium Pronatal, respektive Pronatal).

Pro potřeby různých částí výzkumu bylo vytvořeno hned několik specifických databází – souborů (graficky viz též Schéma 6.1). V rámci našich publikací jsou v některých případech využita data za kratší časové období, než je uvedeno v následujícím přehledu.

#### 6.1.1 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.

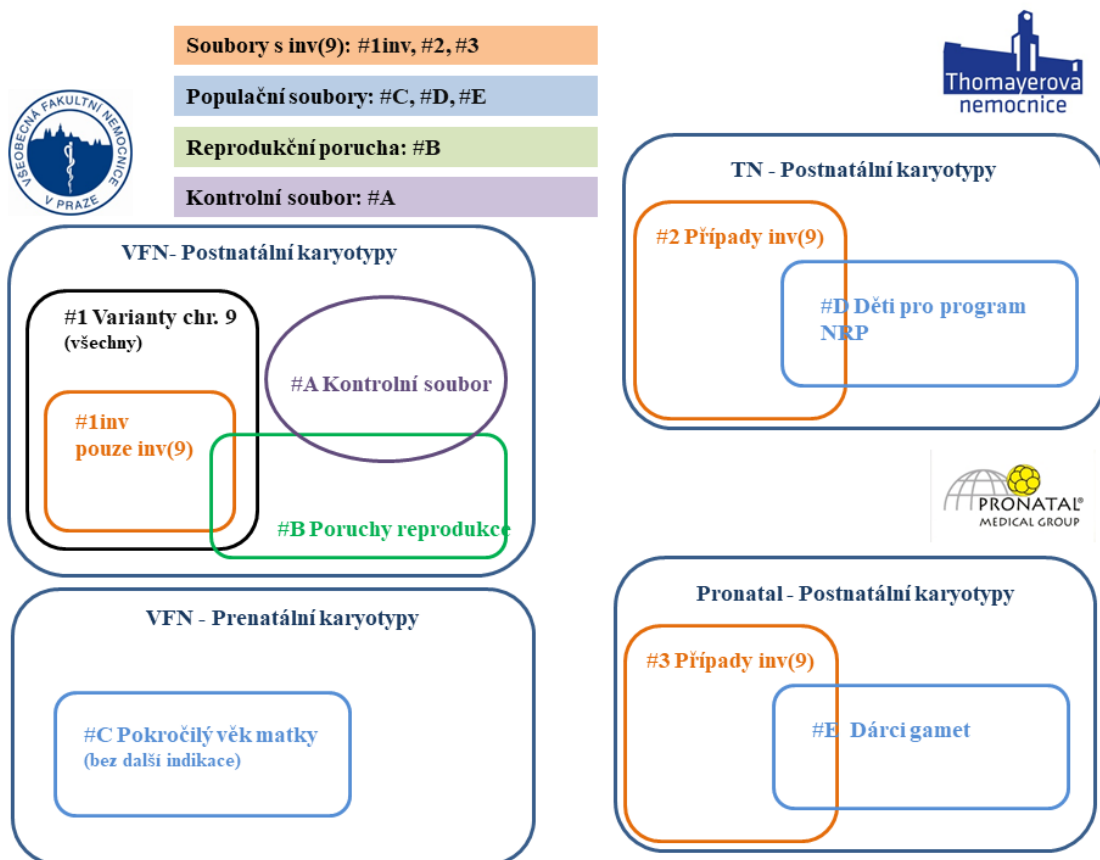


Schéma 6.1 – Přehled základních souborů v našem projektu.

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

- Časové období: 1986-2016 (31 let)
- Celkem záznamů za období: **14 078**
- Celkem případů (variant) zařazených do databáze: **464**

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

- Časové období: 1986-2016 (31 let)
- Celkem záznamů za období: **14 078**
- Celkem případů (inverze) zařazených do databáze: **215**

### **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**
- 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.

### **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**
- 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).

***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).

### **6.1.2 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 (inverze): **143**

***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**

### **6.1.3 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 (inverzí): **120**

### ***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**

## **6.2 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.

Náš základní protokol je vyobrazen na schématu 6.2. Využívá celkem tři FISH sond, 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

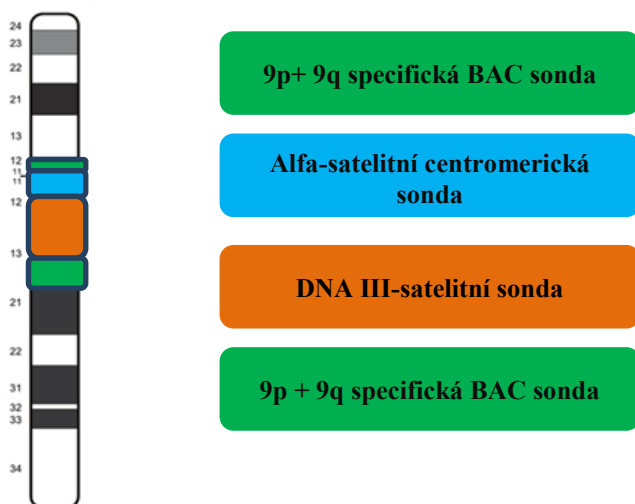
vybrány tyto sondy (uvádíme konkrétní komerčně dostupné sondy, které poskytovaly výsledky v dostatečné kvalitě):

- 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), nejčastěji byly využívány tyto dva klony:
  - 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)

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). S ohledem na ekonomičnost se nám nejvíce osvědčilo připravovat sondu pro vyšetření tří skel (celkový objem 18  $\mu$ l) v poměru: 10  $\mu$ l LSI pufru + 1  $\mu$ l CEP 9 sondy + 1  $\mu$ l zvolené BAC sondy (od Pentagen) + 6  $\mu$ l III satelitní centromerické sondy (ready to use). Vodu jsme nepoužívali. Z této směsi jsme použili 6  $\mu$ 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 6.2 – 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.*

### 6.3 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 v kontrolním souboru osob ze stejného pracoviště (soubor #A). 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 variant 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.

### 6.4 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.

## 7 Výsledky

### 7.1 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 7.1.

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

*Tabulka 7.1 – 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 %.

Dalším výstupem z této části studie byl soubor všech případů inv(9) zachycených ve všech třech laboratořích (tedy soubory #1inv + #2 + #3) – po vyloučení případů, kdy byla inv(9) přítomná spolu s jasnou chromozomální patologií. Tento soubor čítá celkem 461 osob (272 žen a 189 mužů, F/M = 1,44), rozdělení všech indikačních diagnóz je v Tabulce 7.2.

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

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

Tabulka 7.2 – Zastoupení jednotlivých indikací k vyšetření karyotypu u osob s pericentrickou inverzí chromozomu 9 na všech třech pracovištích (soubory #1inv, #2 a #3).

## 7.2 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 7.3.

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 (dárci 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 7.4. 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.

### **7.3 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): F/M = 1,44. Protože se tento nápadný rozdíl mezi četnostmi 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 7.4.

### **7.4 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).

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 %). Podrobnosti shrnuje Tabulka 7.5.

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	<b>1,55 %</b>	105	5943	1,77 %	65	4990	1,30 %	0,052 (0,988 - 1,891)
OLG TN (#2)	1981 - 2011	131	8 611	<b>1,52 %</b>	66	4553	1,45 %	65	4058	1,60 %	0,597 (0,630 - 1,297)
Sanatorium Pronatal (#3)	2002 - 2011	121	7 053	<b>1,71 %</b>	82	4562	1,79 %	39	2491	1,57 %	0,564 (0,768 - 1,716)
<b>Celkem</b>		<b>421</b>	<b>26597</b>	<b>1,58 %</b>	<b>252</b>	<b>15058</b>	<b>1,67 %</b>	<b>169</b>	<b>11539</b>	<b>1,46 %</b>	<b>0,181</b> <b>(0,937 - 1,400)</b>

Tabulka 7.3 – 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	<b>1,84 %</b>	41	2092	<b>1,96 %</b>	1	196	<b>0,51 %</b>	0,257 (0,654 - 158,39)
Děti program NRP (#D)	14	814	<b>1,72 %</b>	7	380	<b>1,84 %</b>	7	434	<b>1,61 %</b>	1,0 (0,339 - 3,862)
Plody matek starších 35 let (#C)	12	1064	<b>1,13 %</b>	8	551	<b>1,45 %</b>	4	513	<b>0,78 %</b>	0,389 (0,498 - 8,555)
<b>Celkem</b>	68	4166	<b>1,63 %</b>	56	3023	<b>1,85 %</b>	12	1143	<b>1,05 %</b>	0,075 (0,938 - 3,660)

Tabulka 7.4 – 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).

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)	<b>15 (1,5)</b>	3 (0,6)	7 (1,5)	<b>10 (1,0)</b>
9qh+	22 (4,4)	18 (3,4)	<b>40 (3,9)</b>	8 (1,5)	13 (2,7)	<b>21 (2,1)</b>
9qh-	3 (0,6)	1 (0,2)	<b>4 (0,4)</b>	4 (0,8)	4 (0,8)	<b>8 (0,8)</b>
inv(9)(p12q13)	8 (1,6)	10 (1,9)	<b>18 (1,7)</b>	6 (1,2)	3 (0,6)	<b>9 (0,9)</b>
inv(9)(p12q21)	0 (0,0)	0 (0,0)	<b>0 (0,0)</b>	1 (0,2)	0 (0,0)	<b>1 (0,1)</b>
16qh+	13 (2,6)	13 (2,5)	<b>26 (2,5)</b>	10 (1,9)	7 (1,5)	<b>17 (1,7)</b>
16qh-	0 (0,0)	0 (0,0)	<b>0 (0,0)</b>	0 (0,0)	2 (0,4)	<b>2 (0,2)</b>
Yqh+	-	9 (1,7)	-	-	4 (0,8)	-
Yqh-	-	15 (2,8)	-	-	14 (2,9)	-
<b>Celkem</b>	<b>56 (11,1)</b>	<b>71 (13,4)</b>	<b>127 (12,3)</b>	<b>32 (6,2)</b>	<b>54 (11,3)</b>	<b>86 (8,6)</b>

Tabulka 7.5 – 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 (viz též Tabulka 7.6):

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 7.6 – 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).

### 7.5 Výsledky molekulárně cytogenetické analýzy vybraných případů variant chromozomu 9

V rámci našeho projektu bylo vyšetřeno celkem 52 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 vyšetření bylo provedeno ze vzorku periferní žilní krve.

V rámci prenatalní diagnostiky byly oba vyšetřené plody mužského pohlaví, v rámci postnatalní 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).



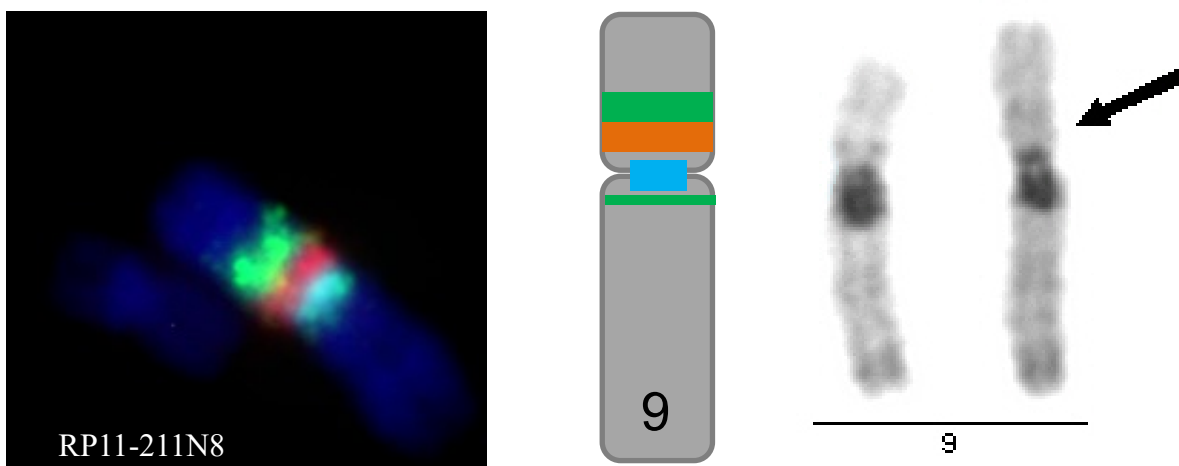
Pokud jde o zachycené varianty, pak v celkem 35 případech šlo o samotný nález inv(9), ve 4 případech o 9qh- a ve 4 případech o 9qh+. Ve zbylých případech šlo o následující situace.

- Jeden případ nálezu varianty chromozomu 9 na obou homologích
- Jeden případ inv(9) a patologické chromozomální abnormality nesouvisející s chromozomem 9
- Tři případy duplikace v pericentromerické oblasti chromozomu 9, z toho jednou ve spojitosti s inv(9)
- Jeden případ dicentrického chromozomu 9
- Tři případy paracentrické inverze chromozomu 9, suspektně zasahující do pericentromerické oblasti.

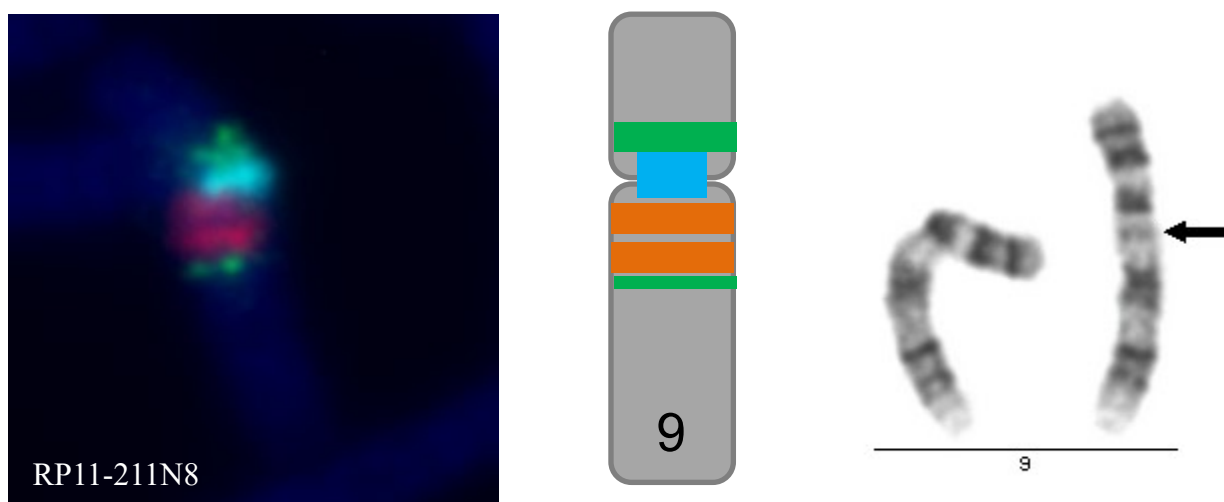
Vyšetřené případy jsme se pokusili klasifikovat podle práce Kosyakové (2013) a to zejména případy inv(9). Vzhledem k použití odlišných sond, není její metodika 100% přenositelná, základní principy hodnocení velikosti homologních sekvencí v oblasti 9p12 a 9q13 ale zůstávají stejné, proto je orientační porovnání jistě možné. 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, 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.

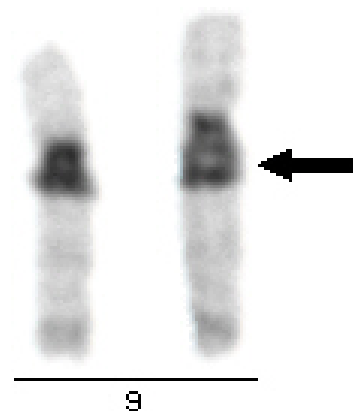
Výsledky vyšetření dvou zajímavých přestaveb pomocí naší metodiky ukazují obrázky 7.1 a 7.2.



Obrázek 7.1 – 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 7.2 – 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).



## 8 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 nekomplikovanější. 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.

## 9 Použitá literatura

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Balíček P. Pericentrické inverze lidských chromozomů a jejich rizika. *Čas lék čes,* 2001; 140(2):38-42.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Brewer KRW. A Model of Systematic Sampling with Unequal Probabilities. *Australian Journal of Statistics.* 1963, 1(5):5-13.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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).
- 10) Gardner RJMcK, Amor DJ. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling: 5th Edition, Oxford University Press, Oxford, 2018; 728 s.

- 11) Gersen SL, Keagle MB The Principles of Clinical Cytogenetics: 3rd Edition, Springer, Berlin 2013;569 s.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Lee KB, Kunugi H, Nanko S. Familial schizophrenia with pericentric inversion of chromosome 9: a case report. *Schizophr Res.* 1998; 32(2):123-6.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. ISCN 2016 - An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Murthy SK, Prabhakara K. Mitotic disturbances associated with inversion 9qh. A case report. *Ann Genet.* 1990; 33(3):169-72.
- 23) Mutton DE, Daker MG. Pericentric inversion of chromosome 9. *Nat New Biol.* 1973; 241(107):80.
- 24) Nanko S. Schizophrenia with pericentric inversion of chromosome 9: a case report. *Jpn J Psychiatry Neurol.* 1993; 47(1):47-9.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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,
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.



- 33) 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. Lék. 2012; 4:205-208.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) Verma RS, Babu A. *Human Chromosomes: Principles and Techniques 2nd Edition*, McGraw-Hill, New York, 1995; 419 s.
- 38) 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.
- 39) Wahrman J, Atidia J, Goitein R, Cohen T. Pericentric inversions of chromosome 9 in two families. *Cytogenetics*. 1972; 11(2):132-144.
- 40) 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.

## 10 Seznam publikací autora

### 10.1 K tématu dizertační práce

#### 10.1.1 Práce s IF

- 1) **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. **(IF 1.044)**
- 2) **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. **(IF 2.967)**

#### 10.1.2 Práce bez IF

- 1) **Šípek, A. jr., Panczak, A., Mihalová, R., Sobotka, V., Lonský, P., Gregor, V.: Incidence pericentrické inverze chromosomu 9 v české populaci.** *Demografie*. 2013; 55, č. 1, s. 81-85.
- 2) **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, 92, č. 4, s. 205-209.
- 3) **Šípek, A. jr., Mihalová, R., Celbová, L., Panczak, A.: Cytogenetické varianty v klinické pediatrické praxi.** *Pediatr. praxi*, 2012; 13, č. 6, s. 398-400.
- 4) **Šípek, A. jr., Mihalová, R., Celbová, L., Suttrová, E., Panczak, A.: Varianty chromosomu 9 v novorozenecké populaci a jejich klinický význam.** *Neonatologické listy* 2012, 18, č. 2, s. 11-13.

## 10.2 Publikace mimo téma dizertační práce

### 10.2.1 Práce s IF

- 1) Šípek, A., Gregor, V., Šípek, A. Jr., Friedová, N., Klaschka, J., Malý, M., Jírová, J.: **Spina bifida v České Republice, incidence a prenatální diagnostika.** *Cesk Slov Neurol* 2019; 115(4): 1– 5 Přijato k publikaci 5. 6. 2019. **(IF 0.508)**
- 2) Šípek, A., Gregor, V., Horáček, J., Šípek, A. Jr., Klaschka, J., Malý, M.: **Prevalence vybraných vrozených vad v České republice – vývojové vady centrálního nervového systému a zažívacího traktu.** *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie.* 2015, 64(1):47-53. **(IF 0.500)**
- 3) Šípek, A., Gregor, V., Horáček, J., Šípek, A. Jr.: **National Registry of Congenital Anomalies of the Czech Republic: commemorating 50 years of the official registration.** *Cent Eur J Public Health.* 2014, 22(4):287-8. **(IF 0.800)**
- 4) Šípek, A. Jr., Grodecká, L., Baxová, A., Cibulková, P., Dvořáková, M., Mazurová, S., Magner, M., Zeman, J., Honzík, T., Freiburger, T.: **Novel FBN1 gene mutation and maternal germinal mosaicism as the cause of neonatal form of Marfan syndrome.** *Am J Med Genet A.* 2014, 164A(6):1559-64. **(IF 2.264)**
- 5) Šípek, A., Gregor, V., Horáček, J., Šípek, A. jr., Langhammer, P.: **Prevalence vybraných vrozených vad v České republice: vývojové vady ledvin, srdce a vrozené chromozomové aberace** *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 62, 2013, č. 3, s. 112-128. **(IF 0.500)**

### 10.2.2 Práce bez IF

- 1) Friedová, N., Mihalová, R., Hřčková, L., Kučerová, H., Kaspříková, N., Janashia, M., Calda, P., Šípek A. Jr. **Chromozomové aberace jako příčina časných reprodukčních ztrát: zhodnocení 233 případů.** *Actual Gyn.* 2019;11:23-26.
- 2) Šípek, A., Gregor, V., Šípek, A. Jr., Klaschka, J., Malý, M., Jírová, J. **Vrozené vady u narozených dětí v České republice v období 1994–2015.** *Časopis lékařů českých.* 2019, 158(1): 9-14.

- 3) **Šípek, A. Jr. Editorial** *Časopis lékařů českých*. 2019, 158(1):3.
- 4) **Šípek, A. Jr., Gregor, V., Friedová, N., Šípek, A. Národní registr vrozených vad České republiky a četnost vrozených vad kůže. Referátový výběr z dermatovenerologie (2002, Print)**. 2018, 60(5):6-10.
- 5) **El-Lababidi, N., Houštěk, S., Šochman, P. Šípek, A. Jr., Frühauf, P. Wilsonova choroba v dětském věku – dvě kazuistiky. Gastroenterologie a hepatologie**. 2018, 72(6):486-489.
- 6) **Šípek, A. Jr., Gregor, V., Šípek, A. Prenatální diagnostika chromosomových aberací v České republice: Aktuální data a významné trendy. Časopis lékařů českých**. 2018, 157(3):137-140.
- 7) **Šípek, A. Jr., Gregor, V., Šípek, A. Dermatologické projevy jako součást geneticky podmíněných chorob a syndromů. Referátový výběr z dermatovenerologie**. 2017, 59(5): 30-35.
- 8) **Šípek, A. Jr., Gregor, V., Šípek, A. Současné možnosti genetické diagnostiky v medicíně. Referátový výběr z dermatovenerologie**. 2017, 59(4): 25-30.
- 9) **Calda, P., Břešťák, M., Šípek, A. Jr., Machala, L.: Aktuální gynekologie a porodnictví. Doporučený postup. Practicus (Praha)**. 2016, 15(3):25-26.
- 10) **Calda, P., Břešťák, M., Šípek, A. Jr., Machala, L.: Odpověď autorů článku Stanovisko k managementu těhotenství při podezření na infekci virem Zika. Actual Gyn**. 2016; 8:40-41
- 11) **Calda, P., Břešťák, M., Šípek, A. Jr., Machala, L.: Stanovisko k managementu těhotenství při podezření na infekci virem Zika Česká společnost pro ultrazvuk v porodnictví a gynekologii ([www.csupg.cz](http://www.csupg.cz)) Actual Gyn**. 2016; 8:26-28.
- 12) **Šípek, A. Jr., Gregor, V., Horáček, J., Šípek, A.: Mezinárodní den vrozených vad. Časopis lékařů českých**. 2015, 154(2):101.

- 13) **Šípek, A. Jr., Gregor, V., Horáček, J., Šípek, A.:** Významná výročí v oblasti registrace vývojových vad. Aktuální gynekologie a porodnictví. 2015, 7: 15-16.
- 14) **Šípek, A. Jr., Mihalová, R., Panczak, A., Hřčková, L., Janashia, M., Baxová, A., Zeman, J., Honzík, T., Kohoutová, M.** Význam klasického cytogenetického vyšetření v pediatrické praxi: zhodnocení 384 indikací Československá pediatrie. 2014, 69(5):283-290.
- 15) **Šípek, A. Jr., Vejražka, M., Štuka, Č., Štípek, S.:** WikiSkripta: on-line výukové materiály pro studium i praxi. Praktický lékař. 2013, 93(6):257-259.
- 16) **Šípek, A. jr., Gregor, V., Šípek, A., Calda, P.:** Primární prevence vrozených vad a úloha kyseliny listové. Actual Gyn. 2013, č. 5, s. 47-51.
- 17) **Šípek A., Gregor V., Horáček J., Šípek jr. A., Langhammer P.** Incidence vrozených vad u narozených dětí v České republice v období 1994–2010. Neonatologické listy 2013, 19, č. 1, s. 9-18.
- 18) **Šípek, A. jr., Šípek, A., Maňáková, E.:** Thalidomidová epidemie – 50 let poté. Čas Lék čes. 2012; 151, č. 12, s. 579-581.
- 19) **Šípek, A. jr., Šípek, A., Gregor, V., Macek, M. jr.:** Primární prevence vrozených vývojových vad. Prakt. Lék. 2012, 92, č. 9, s. 491-493.
- 20) **Šípek, A., Gregor, V., Horáček, J., Šípek, A. jr., Langhammer, P.:** Vývoj a změny incidencí vrozených vad u narozených dětí v České republice. Čes. Gynek. 2012, 77, č. 5 s. 424-436.
- 21) **Gregor V., Šípek A., Horáček J., Šípek A. jr., Langhammer P.:** Prenatální diagnostika vrozených vad v ČR – patnáctileté období. Čes. Gynek. 2012, 77, č. 5 s. 437-444.
- 22) **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, č. 3 s. 230-234.

- 23) *Gregor V., Šípek A., Horáček J., Šípek A. jr., Langhammer P.:* **Prenatální diagnostika vrozených vad v České republice – aktuální data.** *Prakt. Lék.* 2011, 91, č. 2, s. 85-90.
- 24) *Šípek A., Gregor V., Šípek A. jr., Hudáková J., Horáček J., Klaschka J., Skibová J., Langhammer P., Petržilková L., Klímová B., Peřinová B., Wiesnerová J.:* **Incidence vrozených srdečních vad v České republice – aktuální data.** *Čes. Gynek.* 2010, 75, č. 3 s. 221-242.
- 25) *Šípek A., Gregor V., Šípek A. jr., Horáček J., Vencálek O., Langhammer P., Petržilková L., Wiesnerová J.:* **Vrozené vady u narozených dětí v jednotlivých krajích České republiky v období let 1994 - 2007.** *Čes. Gynek.* 2010, 75, č. 1 s. 15-40.
- 26) *Šípek A., Gregor V., Horáček J., Štembera Z., Šípek A. jr., Klaschka J., Skibová J., Langhammer P., Petržilková L., Wiesnerová J.:* **Incidence vrozených vad u dětí z jednočetných a dvojčetných gravidit v České republice – aktuální data.** *Čes. Gynek.* 2009, 74, č. 5 s. 369-382.
- 27) *Šípek A., Gregor V., Horáček J., Mazánková V., Langhammer P., Šípek A. jr.:* **Historie a současnost registrace vrozených vad v České republice.** *Čas. Lék. čes.* 2009, 148, s. 505-509.
- 28) *Šípek A., Mališ J., Štěrba J., Mužík J., Gregor V., Štembera Z., Horáček J., Bajčiová V., Kepák T., Šípek A. jr., Langhammer P., Petržilková L., Vanková E., Wiesnerová J.:* **Nádorová onemocnění u dětí narozených s vrozenou vadou Aktuální data v České republice.** *Čes. Gynek.* 2009, 74, č. 2 s. 105-117.
- 29) *Gregor V., Šípek A., Šípek A. jr., Horáček J., Langhammer P., Petržilková L., Calda P.:* **Prenatální diagnostika chromozomálních aberací Česká republika: 1994 – 2007.** *Čes. Gynek.* 2009, 74, č. 1 s. 44-54.
- 30) *Šípek A., Gregor V., Šípek A. jr., Horáček J., Klaschka J., Skibová J., Langhammer P., Petržilková L., Wiesnerová J.:* **Vrozené vady v České republice v období 1994 – 2007.** *Čes. Gynek.* 2009, 74, č. 1 s. 31-44.

- 31) *Gregor V., Šípek A., Calda P., Šípek A. jr., Horáček J., Langhammer P., Petržílková L., Wiesnerová J.:* **Prenatální diagnostika vrozených vad diagnostikovaných ultrazvukem Česká republika 1994–2007.** Čes. Gynek. 2008, 73, č. 6 s. 340-350.
- 32) *Šípek A., Gregor V., Šípek A. jr., Horáček J., Langhammer P., Petržílková L., Wiesnerová J.:* **Vrozené vady v České republice v roce 2006.** Čes. Gynek. 2008, 73, č. 6 s. 331-340.
- 33) *Gregor V., Šípek A., Horáček J., Šípek A. jr., Langhammer P.:* **Analýza incidencí vrozených vad v České republice podle četnosti těhotenství.** Čes. Gynek. 2008, 73, č. 4 s. 199-208.
- 34) *Gregor V., Šípek A., Horáček J., Šípek A. jr., Langhammer P.:* **Prenatální diagnostika vybraných typů vrozených vad v České republice: 1994 - 2006.** Čes. Gynek. 2008, 73, č. 3 s. 169-178.
- 35) *Gregor V., Šípek A., Horáček J., Šípek A. jr., Langhammer P.:* **Přežívání dětí narozených s vrozenou vadou v průběhu 1. roku života.** Čes. Gynek. 2008, 73, č. 3 s. 163-169.

## 11 Seznam konferenčních příspěvků k tématu dizertační práce

### 11.1 Mezinárodní konference (mimo Slovenskou republiku)

- 1) Šípek, A. Jr., Panczak, A., Mihalová, R., Hřčková, L., Sobotka, V., Lonský, P., Kaspříková, N., Šípek, A., Gregor, V.: **Population incidence of the pericentric inversion of chromosome 9 in the Czech population. (poster)**, 41st ICBDSR Annual Meeting, Helsinki, Finsko, 13.-16.9.2014
- 2) Šípek, A. Jr., Panczak, A., Mihalová, R., Hřčková, L., Suttrová, E., Janashia, M., Lonský, P., Šípek, A., Kohoutová, M.: **Multiprobe FISH method for enhanced detection of chromosome 9 heterochromatin rearrangements. (poster)** ESHG Conference 2014, Milano, Itálie, 31.5.-3.6.2014.
- 3) Šípek A. Jr., Panczak A., Mihalová R., Hřčková L., Suttrová E., Šípek A., Lonský P., Janashia M., Kohoutová M. **Heterochromatin variants of chromosome 9: clinical aspects and method of molecular cytogenetic examination. (poster)** ESHG Conference 2013, Paris, Francie, 8.-11.6.2013.
- 4) Šípek A. Jr., Panczak A., Mihalová R., Celbová L., Janashia M., Kaspříková N a Kohoutová M: **Incidence and clinical significance of chromosomal abnormalities of heterochromatin area of human chromosome 9 (poster)**, 39th ICBDSR and 10th CCASN Joint Annual Scientific Meeting, Ottawa, Kanada, 30.10.-2.11.2012
- 5) Šípek A. Jr., Panczak A., Mihalová R., Gregor V., Lonský P., Sobotka V., Horáček J., Stejskal D., Šípek A.: **Pericentric inversion of chromosome 9 – back to epidemiological field work. (přednáška)** 38th Annual Meeting of the ICBDSR organization, WHO, Ženeva, Švýcarsko, 28-30. září 2011.
- 6) Šípek A. Jr., Panczak A., Mihalová R., Janashia M., Celbová L., Kohoutová M.: **Possible association of heterochromatin variants in human karyotype with reproduction failure. (poster)** European Human Genetics Conference 2011, Amsterdam, Holandsko



## 11.2 Konference pořádané v České a Slovenské republice

- 1) **Šípek A. Jr.,** Mihalová R, Panczak A, Hrčková L, Suttrová E., Lonský P, Šípek A., Janashia M, a Kohoutová M: **Heterochromatinová oblast chromozomu 9: Evoluční aspekty a možnosti molekulárně cytogenetické diagnostiky pro klinickou praxi (poster).** XXIV. Izakovičov memoriál, Donovaly, Slovensko, 26.-27.9.2013,
- 2) **Šípek A. Jr.,** Mihalová R, Panczak A, Hrčková L, Lonský P, Janashia M, a Kohoutová M: **Varianty lidského chromosomu 9 z klinického i evolučního hlediska 46. cytogenetická konference (přednáška),** Brno, 5.-6.9.2013,
- 3) **Šípek A. Jr.,** Panczak A, Mihalová R., Hrčková L, Suttrová E, Janashia M, a Kohoutová M: **Varianty lidského chromosomu 9 z klinického i evolučního hlediska. (přednáška)** Kaprasův den, Praha, 13.2.2013,
- 4) **Šípek A. Jr.,** Mihalová R., Panczak A., Celbová L., Suttrová E., Janashia M., Kohoutová M.: **Cytogenetické varianty chromosomu 9 - incidence, klinický význam a možnosti molekulárně cytogenetické analýzy. (poster),** XXIII. Izakovičov memoriál, Bratislava, 26.-28.9.2012
- 5) **Šípek A. Jr.,** Mihalová R., Panczak A., Celbová L., Suttrová E., Janashia M., Kohoutová M.: **Cytogenetické varianty chromosomu 9 - incidence, klinický význam a možnosti molekulárně cytogenetické analýzy. (přednáška)** 45. výroční cytogenetická konference, Olomouc, 13.-14.9.2012.
- 6) **Šípek A. Jr.,** Panczak A., Mihalová R., Celbová L., Janashia M., Kohoutová M.: **Zvýšené riziko reprodukčních poruch pro nositele heterochromatinových variant. (poster).** Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 44. výroční cytogenetická konference; Třeboň, 7. – 9. září 2011.
- 7) **Šípek A. Jr.,** Panczak A., Mihalová R., Celbová L., Janashia M.: **Zvýšené riziko reprodukčních poruch pro nositele heterochromatinových variant? (přednáška)** Seklův večer - Přednáškový večer SLČ v Praze; Lékařský dům, Praha, 5.3.2012