

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Ústav biologie a lékařské genetiky

Nikola Petříková

**Analýza klinických parametrů pacientů
s autismem a mentální retardací
indikovaných na vyšetření metodou SNP
array**

Bakalářská práce

Praha 2014

Autor práce: **Nikola Petříková**

Vedoucí práce: **MUDr. Markéta Vlčková**

Oponent práce: **MUDr. Aleš Panczak, CSc.**

Datum obhajoby: **28.5.2014**

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením MUDr. Markéty Vlčkové, uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 28.4.2014

Nikola Petříková

Bibliografický záznam

PETŘÍKOVÁ, Nikola. *Analýza klinických parametrů pacientů s autismem a mentální retardací indikovaných na vyšetření metodou SNP array*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav biologie a lékařské genetiky, 2014. 71 s. Vedoucí bakalářské práce MUDr. Markéta Vlčková.

Abstrakt

Práce se zabývá analýzou klinických parametrů pacientů trpících poruchou autistického spektra vyšetřených pomocí DNA mikročipů. Teoretická část je zaměřena na definování autismu a jeho jednotlivých podtypů, dále na dosud známé genetické příčiny této pervazivní vývojové poruchy a nakonec na možnosti laboratorní diagnostiky jejich genetických příčin. Mezi příčiny autismu se řadí varianty počtu kopií různých částí genomu, které lze efektivně diagnostikovat vyšetřením pomocí DNA čipů. Náš soubor čítal celkem 98 pacientů s diagnostikovaným autismem či s autistickými rysy. U všech pacientů byla provedena analýza pomocí mikročipů HumanCytoSNP-12 od firmy Illumina. U všech pacientů ze souboru byla následně provedena retrospektivní analýza několika sledovaných klinických parametrů dostupných ve zdravotnické dokumentaci. Všechna získaná data byla statisticky zpracována s cílem zjistit případné závislosti. K další podrobnější analýze pak byly vybrány dvojice parametrů, u kterých již byla určitá korelace v minulosti popsána v literatuře, nebo jsme u nich závislost očekávali. V některých případech se naše výsledky shodovaly s údaji udávanými v literatuře, v některých nikoliv. Dále bylo zkoumáno, zda existuje významný rozdíl mezi skupinou pacientů, u kterých byla zjištěna aberace, která s vysokou pravděpodobností způsobuje jejich postižení, a skupinou pacientů, u nichž nebyla nalezena žádná klinicky významná aberace. Mezi těmito dvěma skupinami nebyl nalezen žádný významný rozdíl. Nakonec jsou podrobněji popsáni 3 pacienti, u kterých byla nalezena kauzální aberace, tedy mikrolece/mikroduplikace, která již byla popsána u více pacientů s poruchou autistického spektra. Konkrétně se jednalo o často nalézanou duplikaci regionu 15q11-q13, delecii genu *NSD1* a duplikaci genu *MECP2*.

Klíčová slova

Autismus, SNP array, CNV, mikrolece, mikroduplikace, klinické parametry, vztah genotyp-fenotyp

Abstract

This bachelor thesis deals with the analysis of clinical features in patients with autism spectrum disorders who were investigated using DNA microarrays. The introductory section is focused on the definition of autism and its subtypes, on currently known genetic causes of this neurodevelopmental disorder and on the possibilities of the laboratory diagnosis. Autism is likely caused by CNV occurring in different loci of the human genome, which can be efficiently diagnosed using DNA microarrays. This technique enables the detection of many CNV, but in most cases only common population polymorphisms can be identified. Our group consisted of 98 patients who suffered from some subtype of autism spectrum disorder. All patients were investigated using the microarray HumanCytoSNP-12 manufactured by Illumina. A retrospective analysis of clinical features of interest that were found in the medical documentation of the patients was performed. Statistical analysis of the data was performed to find possible associations. Specific pairs of features were compared in more detail. Features with known correlation previously published in the literature or features where a correlation could be expected were selected for this detailed analysis. Some findings were concordant with the published data, but some were not. Finally, it was determined whether there is a significant difference between the group of patients in whom an aberration associated with autism was identified and the group with no clinically relevant aberration. No significant association was found. Three patients are described in detail. These patients carried a causal aberration – a microdeletion/microduplication, which was described previously in several autistic patients. Namely it was a 15q11-q13 duplication, a deletion of the *NSD1* gene and a *MECP2* duplication.

Keywords

Autism spectrum disorders, SNP array, CNV, microdeletion, microduplication, clinical features, genotype-phenotype correlation

Poděkování

Nejvíce bych chtěla poděkovat MUDr. Markétě Vlčkové za veškerý čas, který mi věnovala, trpělivost a odborné vedení. Bylo velmi příjemné pracovat na této práci právě s ní. Dále bych chtěla vyjádřit velké poděkování Prof. Ing Zdeňku Sedláčkovi, DrCs., Mgr. Mírcě Hančářové a Mgr. Elišce Karáskové za veškeré připomínky, cenné rady a pomoc s vytvářením této práce. Děkuji i Mgr. Janě Drábové za její čas a zkušenosti, které mi věnovala během praxe v laboratoři a MUDr. Markétě Havlovicové za poskytnutí dokumentace o pacientech a odbornou korekturu. Zejména pak děkuji Ing. Pavlu Zimmermannovi za vyhotovení statistické analýzy V neposlední řadě patří obrovské poděkování i mým rodičům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

OBSAH

Seznam zkratek.....	7
Úvod	8
1 Přehled poznatků	9
1.1 Poruchy autistického spektra.....	9
1.1.1 Dětský autismus	12
1.1.2 Atypický autismus.....	12
1.1.3 Aspergerův syndrom	12
1.1.4 Rettův syndrom.....	13
1.1.5 Jiná desintegrační porucha v dětství	13
1.1.6 Hyperaktivní porucha spojená s mentální retardací a stereotypními pohyby	13
1.2 Komorbidity autismu	13
1.3 Diagnostika autismu	14
1.3.1 Škála CARS (Childhood autism rating scale).....	15
1.3.2 Škála ADI-R (Autism Diagnostic Interview-Revised).....	15
1.4 Genetické příčiny autismu	16
^{1.4.1} Cytogeneticky detekovatelné chromozomální abnormality	16
1.4.2 Varianty v počtu kopií (Copy number variants, CNV)	17
1.4.2.1 Duplikace 15q11.2-q13.....	18
1.4.2.2 CNV v oblasti 16p11.2.....	20
1.4.3 Známé monogenní choroby asociované s autismem	21
1.4.3.1 Syndrom fragilního X	21
1.4.3.2 Rettův syndrom.....	22
1.4.3.3 Tuberózní skleróza	22
1.4.4 Geny mutované u idiopatického autismu	23
1.4.4.1 Geny <i>NLGN3</i> a <i>NLGN4</i>	23
1.4.4.2 Gen <i>SHANK3</i>	24
1.4.4.3 Gen <i>FOXP2</i>	24
1.5 Možnosti laboratorní diagnostiky genetických příčin autismu.....	24
1.5.1 Karyotypizace.....	24
1.5.2 MLPA	25
1.5.3 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH).....	25
1.5.4 DNA čipy	26
1.5.4.1 Array CGH	26
1.5.4.2 SNP array	27
2 Cíle práce.....	28
3 Materiál a metody	29
3.1 Materiál.....	29
3.2 Metody	31
4 Výsledky	33
4.1 Analýza klinických parametrů u souboru pacientů	33
4.1.1 Pohlaví pacientů	33
4.1.2 Průběh gravidity a perinatální anamnéza	33
4.1.3 Psychomotorický vývoj a regres ve vývoji.....	35
4.1.4 Agresivita	36
4.1.5 Poruchy spánku.....	36
4.1.6 Typ autismu.....	37

4.1.7	Úroveň mentální retardace.....	37
4.1.8	Přítomnost dysmorfických rysů a vrozených vývojových vad	38
4.1.9	Poruchy růstu.....	38
4.1.9.1	Tělesná výška	38
4.1.9.2	Tělesná hmotnost.....	39
4.1.9.3	Obvod hlavy	39
4.1.10	Epilepsie	40
4.1.11	Výsledek MRI CNS.....	40
4.1.12	Rodinná anamnéza	41
4.1.13	Kategorie nálezu na SNP array.....	42
4.2	Korelace vybraných klinických parametrů a porovnání pacientů dle výsledků SNP array	43
4.2.1	Asociace jednotlivých parametrů v celém souboru.....	43
4.2.2	Tíže MR u jednotlivých typů autismu.....	43
4.2.3	Vztah pohlaví a tíže mentální retardace	44
4.2.4	Vztah pohlaví a typu autismu.....	45
4.2.5	Vztah opoždění časného psychomotorického vývoje a MR	45
4.2.6	Výskyt epilepsie a nález na MRI	46
4.2.7	Asociace klinických parametrů s výsledky SNP array.....	47
4.3	Kazuistiky vybraných pacientů s kauzální aberací.....	49
4.3.1	Pacient 1 (aut012p)	49
4.3.2	Pacientka 2 (aut038p).....	50
4.3.3	Pacient 3 (aut070p)	51
5	Diskuze.....	52
5.1	Analýza klinických parametrů celého souboru.....	52
5.1.1	Asociace jednotlivých parametrů v celém souboru.....	52
5.1.2	Poměr pohlaví	52
5.1.3	Průběh gravidity a perinatální anamnéza	52
5.1.4	Psychomotorický vývoj a regres ve vývoji.....	53
5.1.5	Autoagresivita/heteroagresivita	53
5.1.6	Poruchy spánku.....	53
5.1.7	Typ autismu.....	54
5.1.8	Tíže mentální retardace.....	54
5.1.9	Poruchy růstu	54
5.1.10	Epilepsie	54
5.1.11	Výsledek MRI CNS.....	55
5.1.12	Rodinná anamnéza	55
5.1.13	Kategorie nálezu na SNP array.....	55
5.2	Korelace vybraných klinických parametrů v souboru a porovnání pacientů dle výsledků SNP array.....	56
5.2.1	Asociace jednotlivých parametrů v celém souboru.....	56
5.2.2	Tíže MR u jednotlivých typů autismu.....	56
5.2.3	Vztah pohlaví a tíže mentální retardace	56
5.2.4	Vztah pohlaví a typu autismu.....	57
5.2.5	Výskyt opoždění časného psychomotorického vývoje a přítomnosti MR.....	57
5.2.6	Výskyt epilepsie ve vztahu k nálezu na MRI	57
5.2.7	Asociace klinických parametrů s výsledky SNP array.....	57
5.3	Porovnání klinických parametrů vybraných pacientů s publikovanými údaji.....	59
5.3.1	Pacient 1 (aut012p) - Sotosův syndrom.....	59
5.3.2	Pacientka 2 (aut038p) -maternální duplikace 15q11-q12.....	59
5.3.3	Pacient 3 (aut070p) - duplikace genu MECP2	60
6	Závěr	61

Referenční seznam	63
Seznam příloh	69
Přílohy	70

SEZNAM ZKRATEK

AIC	Akaikeho kritéria
AS	Angelmanův syndrom
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder, hyperkinetická porucha
BAC	Bacterial Artificial Chromosome, umělý bakteriální chromozom
CGH, aCGH	Komparativní genomová hybridizace / array CGH (na čipu)
CNS	Centrální nervová soustava
CNV	Copy Number Variant, varianta v počtu kopií
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DGV	Database of Genomic Variants
EEG	Elektroencefalogram
FISH	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FNM	Fakultní nemocnice v Motole
IQ	Intelligenční kvocient
IVF	<i>In vitro</i> fertilizace
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MKN-10	Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. revize
MR	Mentální retardace
MRI	Magnetická rezonance
OHL	Obvod hlavy
PAS	Poruchy autistického spektra
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PMV	Psychomotorický vývoj
PWS	Syndrom Prader-Willi
SNP	Single Nucleotide Polymorphism

ÚVOD

První diagnosticky popsané případy autismu se objevily ve 40. letech 20. století. Za více než 70 let se pohled na toto onemocnění velice změnil. Zprvu se předpokládalo, že příčinou vzniku této poruchy je citově chladné chování rodičů vůči dítěti. Autisté byli umístováni do speciálních ústavů a terapie byla zaměřena především na matky. Trvalo přibližně 20 let, než byla tato teorie vyvrácena. Příčina většiny případů autismu zůstává stále neznámá, je zde však značný pokrok, mimo jiné díky možnosti celogenomových studií pomocí DNA mikročipů. Použitím této analytické metody lze nalézt v genomech pacientů aberace, které ještě nebyly v literatuře popsány. Jako u všech výzkumných studií je i v tomto případě snaha objevit kauzální geny, jenž mají podíl na rozvoji této pervazivní vývojové poruchy a zlepšit tak prenatální a postnatální diagnostiku. V literatuře byla popsána řada mikrodelecí a mikroduplikací určitých lokusů, které se pojí s autismem. Žádná z nich se však nevyskytuje u více než 3% pacientů, a naprostá většina je ještě mnohem vzácnější. Zatím se i v případě autismu potýkáme s problémem, že po identifikaci aberace nemáme k dispozici žádnou léčbu a pacienti s autismem jsou léčeni pouze symptomaticky. Jako jedno z možných řešení se nabízí „opravit“ poškozený genom. Tímto směrem se vyvíjí genové inženýrství, ale je to stále hudba budoucnosti.

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila nejdříve na základní poznatky o autismu, včetně rozdělení do jednotlivých podtypů, popsání současně se vyskytujících onemocnění a genetickou podstatu této poruchy, kde popisuji i nejčastější syndromy, u nichž se autismus vyskytuje jako jeden ze symptomů. V závěru teoretické části jsem uvedla některé laboratorní metody, jež jsou nápomocny v diagnostice.

V praktické části se zabývám nejdříve popisem a porovnáním různých parametrů u celého souboru pacientů a dále jako příklad podrobněji rozebírám tři pacienty, u kterých byla nalezena patogenní aberace.

V diskuzi nejdříve porovnávám zdokumentované poznatky o klinických parametrech autistů se zjištěnými poznatky u našeho souboru a dále srovnávám fenotyp a symptomy tří vzorových pacientů s ostatními jedinci, u kterých byla nalezena identická submikroskopická aberace.

1 PŘEHLED POZNATKŮ

1.1 Poruchy autistického spektra

Termín „poruchy autistického spektra“ (PAS) je v odborné literatuře používán jako synonymum pro autismus. Do této kategorie řadíme dětský autismus, Aspergerův syndrom a atypický autismus. PAS patří mezi pervazivní vývojové poruchy (viz následující podkapitoly).

Autismus je neurovývojová porucha, která je charakterizována narušenou komunikací a to na verbální i nonverbální úrovni, deficitem empatických schopností, poruchami představitosti, opakovanými a omezenými vzorci chování. Postižení jedinci nejsou primárně schopni navázat sociální interakce. Podezření na toto onemocnění se vyslovuje většinou kolem 36. měsíce života, kdy je zaznamenán především opožděný vývoj řeči. Skupina pacientů s PAS je velice heterogenní, pokud jde o kognitivní schopnosti či každodenní dovednosti [1]. Mezi 36. měsícem a 5. rokem života je sociální izolace a repetitivní chování nejvíce vyjádřeno. Po tomto období se řečové schopnosti mohou rapidně zlepšit, nebo zůstanou na úrovni několika málo slov či frází [2]. U zhruba jedné třetiny dětí s autismem se nikdy nevyvine plnohodnotná řeč a většina těchto dětí se ani nepokouší o jiné prostředky komunikace, jako jsou gestikulace nebo oční kontakt [3]. Mezi autisty lze však nalézt i prvotřídní vědce. Nutno ale dodat, že nadprůměrně inteligentních autistů je velice malé procento.

V posledních dvou dekadách stoupá incidence PAS. Tento nárůst je nejvíce přisuzován většímu povědomí o autismu mezi laickou i odbornou veřejností a mírnějším klasifikačním kritériím, ale nelze vyloučit ani skutečný absolutní nárůst incidence způsobený dosud nepopsanými faktory. Nejnovější studie provedena ve Spojených státech amerických stanovuje prevalenci autismu u 8 letých dětí na 14.7/1000, což znamená, že jedno dítě z 68 trpí autismem [4].

Častěji bývají autismem postiženi chlapci než dívky a to v poměru 4:1. Incidence Aspergerova syndromu je dokonce 15x vyšší u chlapců, což bývá vysvětlováno nedokonalými diagnostickými kritérii, která jsou založena především na charakteristických behaviorálních odchylkách více vyjádřených u chlapců, takže dívky zůstávají v mnoha případech nedignostikované [5]. Dalším vysvětlením, které bývá udáváno, je, že geny, jejichž specifické alely mají za následek některou z PAS, se nacházejí na chromozomu X a tudíž jsou více postiženi hemizygotní muži. Jedná se ovšem pouze o teorie a skutečný důvod velkého rozdílu mezi pohlavími nebyl zcela objasněn [5].

Riziko opakování pro sourozence dítěte s autismem se pohybuje v rozmezí 3 - 10 % [6]. Důležitým aspektem je zde i pohlaví dítěte, přičemž riziko je větší, když je prvním postiženým potomkem dívka. Přesto pouze 2 - 3 % rodin má více než jedno postižené dítě [2]. Tento fakt je ale pravděpodobně ovlivněn odmítnutím dalšího těhotenství. Pokud jsou v rodině postiženy 2 děti a více, je riziko opakování pro další těhotenství 33 - 50 % [6].

Za největší mystifikaci je považována britská studie z roku 1998 vedena Wakefieldem a spol., která označila vakcinaci proti spalničkám, příušnicím a zarděnkám za viníka autismu. Autor byl shledán vinným ze střetu zájmů a neetického chování. Studie bývá označována jako promyšlený podvod a má dodnes katastrofální následky, jelikož se rodiče bránili proti očkování svých dětí ze strachu, že se u nich rozvine autismus. Bylo provedeno celkem 14 studií, které vyloučily jakoukoliv souvislost mezi tímto očkováním a autismem [7].

„V rodinách osob postižených autismem se často vyskytují příbuzní, u nichž je popisován tzv. širší autistický fenotyp. Jedná se především o behaviorální odchylky, jako jsou zvýšená úzkostnost, impulzivita, přecitlivělost, podrážděnost, excentricita, samotářství, nesmělost, problémy se socializací a společenskou komunikací, nebo sklon k pedanství či rigidita.“ [8]

Při zkoumání aktivity různých částí mozku se zjistilo, že oblast, která je u zdravých kontrol aktivní při vnímání lidských obličejů, je u autistů v takovéto situaci neaktivní. Dále byla provedena studie, kde byly zkoumány autistické rysy u jedinců s agenezí corpus callosum a bylo zjištěno, že výrazné procento vyšetřovaných překročilo prahovou hodnotu v diagnostické škále pro autismus. Autoři této studie doporučují, aby u těchto jedinců byl zaveden screening autismu [9].

Negenetické příčiny autismu jsou popisovány zejména v souvislosti s působením chemických látek, které mohou negativně ovlivnit vývoj mozku. Největší vliv je patrný v prvním trimestru gravidity. Zvýšená pravděpodobnost rozvoje autismu byla prokázána u expozice talidomidu, misoprostolu, kyselině valproové a chlorpyrifosu. Nebezpečnými mohou být i virová onemocnění, zejména zarděnky, u nichž klinické a epidemiologické studie dokázaly asociaci mezi infekcí v časně fázi gravidity a autismem [10].

Co se týče léčby, je velice důležité si uvědomit, že deficit sociálních vztahů je vrozený, nejedná se o sekundární poruchu a nikdy nedojde k úplné nápravě tohoto handicapu. Pomocí léků lze do určité míry upravit doprovodné klinické příznaky jako je agresivita, sebepoškozování, nepozornost a sklony k obsesivně kompulzivnímu chování. Účinnost léčiv je přisuzována úpravě množství neurotransmiterů v synapsích, a to především serotoninu, dopaminu a pravděpodobně norepinefrinu a acetylcholinu [11]. Dalším z neurotransmiterů podílejících se nejspíše na rozvoji autismu je oxytocin. Byla zjištěna snížená hladina tohoto hormonu u lidí trpících autismem. Výzkum se proto zaměřuje i na tuto oblast a byla navržena řada analogů oxytocinu (př. karbetocin).

Zvláštní skupinu tvoří tzv. autismus s regresem. *„Autistickou regresi lze definovat jako závažný vývojový obrat zpět, kdy se u dítěte částečně nebo úplně ztrácejí již získané vývojové dovednosti, především v oblasti řeči, ale i sociálního chování, nonverbální komunikace, hry, a někdy i kognitivních schopností.“* [8] Udává se, že v jednom ze tří případů registrují rodiče u svého dítěte regres v řeči během 18. a 24. měsíce života, zatímco ke ztrátě motorických dovedností nedojde [12]. V 5 - 8 % se regres řeči vyskytne později, a to mezi třetím a desátým rokem, kdy se řeč již plně vyvinula a dítě celkově působilo mentálně normálním dojmem. Tento stav je znám pod pojmem dětská desintegrační porucha a jedná se o závažnější stav, než je ten spojený s regresem v časném věku [11].

Rozdělení pervazivních vývojových poruchy podle platné revize MKN-10:

- Dětský (infantilní) autismus, též Kannerův syndrom F 84.0
- Atypický autismus F 84.1
- Rettův syndrom F 84.2
- Jiná desintegrační porucha v dětství F 84.3
- Hyperaktivní porucha spojená s mentální retardací a stereotypními pohyby F 84.4
- Aspergerův syndrom F 84.5
- Pervazivní poruchy jiné F 84.8 a nespecifikované F 84.9

1.1.1 Dětský autismus

Tento typ tvoří jádro PAS a je též označován jako Kannerův syndrom. Neurovývojové abnormality se manifestují před dovršením 3. roku života, ale syndrom může být diagnostikován ve všech věkových skupinách. Problémy se musí projevit v každé ze tří složek tzv. diagnostické triády zahrnující zhoršené reciproční sociální dovednosti, poruchu verbální a nonverbální komunikace a narušený vývoj představitosti. Navíc se u postižených dětí s poměrně vysokou frekvencí objevují i další nespecifické příznaky jako poruchy spánku, omezené stravovací návyky, různé typy fobií, agresivita a také autoagresivita, která se vyskytuje často v asociaci s těžkou mentální retardací. Projevy autismu se mění s věkem, přičemž hlavní aspekty jako poruchy socializace a komunikace přetrvávají [8].

1.1.2 Atypický autismus

Atypický autismus se diagnostikuje v případě, že jsou první symptomy zaznamenány až po 3. roce života, dále potom když nejsou splněny všechny tři okruhy diagnostických kritérií. *„Nejčastěji se jedná o děti s těžkými stupni MR, u nichž se s ohledem na nízkou úroveň fungování nemohou specifické kvalitativní dysfunkce plně projevit.“* [13]

1.1.3 Aspergerův syndrom

Aspergerův syndrom se též řadí mezi PAS, má však svá vlastní diagnostická kritéria. Mezi základní klinické příznaky se řadí nedostatek empatie, pedantsky přesná a jednotvárná řeč, nápadná nemotornost, potíže s navazováním přátelství a hluboký zájem o určitou věc. U dětí s Aspergerovým syndromem se nevyskytují motorické stereotypy typické pro dětský autismus. Postižení se vyznačují celkově dobrým nebo často až nadprůměrným intelektem a adekvátními vyjadřovacími schopnostmi. I zde se mohou vyskytovat výjimky v podobě lehkého opoždění. Aspergerův syndrom by však neměl být diagnostikován u pacientů s IQ nižším než 70. *„V neposlední řadě odborné informace poukazují na skutečnost, že je mnohem rozšířenější než klasický autismus a lze ho diagnostikovat i u dětí, u nichž nikdo nevyslovil domněnku, že by mohly být autistické.“* [14]

1.1.4 Rettův syndrom

Viz kapitola 1.4.3.2.

1.1.5 Jiná desintegrační porucha v dětství

Tato porucha je charakteristická tím, že nejdříve dochází u dítěte k normálnímu vývoji, ale poměrně rychle (během několika měsíců) dojde k významné ztrátě získaných dovedností.

1.1.6 Hyperaktivní porucha spojená s mentální retardací a stereotypními pohyby

Jedná se o poruchu, u které se nevyskytují problémy se socializací autistického typu. Hyperaktivita bývá někdy v adolescenci nahrazena hypoaktivitou a u pacienta se může vyskytnout navíc i sebepoškozování.

1.2 Komorbidity autismu

„Nejčastější psychiatrickou komorbiditou u dětského autismu je mentální retardace (MR), a to asi v 75% případech, přičemž bývá upřesňováno, že asi 30% autistických pacientů spadá do pásma mírné a středně těžké MR a 45% do pásma těžké a hluboké MR.“ [8]

Podle tíže rozdělujeme MR na několik typů (Tabulka 1). Podle tíže asociované MR rozdělujeme autismus na nízkofunkční (těžká a hluboká MR), středně funkční (lehká a středně těžká MR) a vysoce funkční (bez MR). S tímto rozdělením koreluje i přítomnost komunikativní řeči.

Tabulka 1. Typy mentální retardace

Typ MR	Hodnota IQ	Odpovídá věku	Samostatnost
Lehká	50 - 69	9 - 12 let	Ano
Střední	35 - 49	6 - 9 let	Ano/Ne
Těžká	20 - 34	3 - 6 let	Ne
Hluboká	<20	0 - 3 roky	Ne

Druhou nejčastější komorbiditou autismu je epilepsie. Vyskytuje se téměř u třetiny pacientů s PAS [15]. Prevalence epilepsie u jedinců s Aspergerovým syndromem činí 3,9 % [16]. Vzhledem k tomu, že v celé populaci je epilepsie diagnostikována pouze u 2 % osob, lze považovat asociaci mezi těmito dvěma poruchami za signifikantní. Vyšetření pomocí EEG lokalizovalo neobvyklou aktivitu ve frontálním laloku u zhruba poloviny pacientů. Bylo zjištěno, že 85 % záchvatů se u autistů objeví před dovršením 10 let. U dětí se záchvatovitým onemocněním je horší schopnost socializace a komunikace než u dětí bez záchvatů. Dále se výzkum zaměřil na vztah mezi autistickou regresí a epilepsií, přičemž většina autorů udává, že epilepsie a epileptiformní abnormality v EEG jsou častější u autistů s regresem. V souvislosti s tím byla vyslovena hypotéza, že abnormality na EEG mohou hrát kauzální roli ve vzniku autistické regrese. Tato hypotéza byla však vyvrácena [17]. U autistů s MR je prevalence epilepsie cca 3x vyšší než u autistů bez MR [18]. Další studie dokazuje, že epilepsie je mnohem častěji přítomna u jedinců s velmi omezenými řečovými schopnostmi [19].

1.3 Diagnostika autismu

Diagnostika autismu je klinická. Nebyl objeven žádný biochemický marker, pomocí kterého by bylo možné provádět screening autismu. *„Základem diagnostiky je kvalitní pozorování, které je založeno na dobré znalosti obvyklých projevů poruch autistického spektra a porovnání konkrétních projevů dítěte.“* [20] *„Pokud má být ale zachycen co největší počet dětí v co nejranějším věku, je zapotřebí, aby co nejširší počet odborníků byl schopen v populaci vyslovit alespoň podezření na poruchu autistického spektra.“* [8]

K dispozici je řada posuzovacích škál, podle nichž může být autismus diagnostikován, či alespoň vyjádřeno podezření na tuto poruchu.

1.3.1 Škála CARS (*Childhood autism rating scale*)

V České republice je tato semistrukturovaná posuzovací škála nejvíce používána. Slouží zároveň k orientačnímu stanovení závažnosti postižení. Pomocí CARS lze klasifikovat děti, které dosáhly alespoň 18 měsíců mentálního věku, přičemž vyvinutá řeč není podmínkou. Škála se skládá z 15 položek, z nichž každá může být ohodnocena maximálně 4 body. Celkové skóre je získáno sečtením bodů z jednotlivých oblastí. V případě, že je dosaženo 30 a více bodů, je dítě diagnostikováno jako autistické. V nejasných případech je třeba použít podrobnější škály. Vyhotovení škály CARS trvá zhruba hodinu a je tedy vhodná pro screening pacientů [8].

Příklady behaviorálních oblastí, které jsou posuzovány:

- vztah k lidem - primární charakteristika autismu, zájem o kontakt s druhými lidmi
- imitace - schopnost napodobovat verbální i neverbální chování
- emocionální reakce - přiměřenost reakcí na vnější podněty
- adaptace na změny - přizpůsobení se nové situaci
- motorika - koordinace pohybů těla, motorické stereotypy, autoagresivita

1.3.2 Škála ADI-R (*Autism Diagnostic Interview-Revised*)

Jedná se o strukturovaný rozsáhlý dotazník hodnotící 93 specifických projevů dítěte. Je vyplňován odborníkem na základě informací získaných od rodičů či jiné pečující osoby. Test je rozdělen do tří hlavních kategorií: sociální interakce, komunikace a stereotypní chování. Autismus je diagnostikován, pokud součet bodů v jednotlivých oblastech stanovený speciálním algoritmem dosáhne minimální prahové hodnoty. Jedná se o velice spolehlivý test, jehož nevýhodou a tedy překážkou v zavedení do klinické praxe je dlouhá doba administrace - okolo 2 hodin [8].

Další posuzovací škály jsou např. ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule) - v některých zemích nejužívanější, TPBA (Transdisciplinary Play-Based Assessment), ABC (Autism Behavior Checklist) či CHAT (Checklist for Autism in Toddlers).

1.4 Genetické příčiny autismu

Řada epidemiologických studií poukazuje na značný vliv genetických faktorů v etiologii PAS. Na základě studií dvojčat byla prokázána mnohem vyšší konkordance u monozygotních dvojčat, čímž se potvrdil větší vliv genetických faktorů ve srovnání s faktory prostředí. Míra konkordance pro autismus byla stanovena na téměř 90 % u monozygotních dvojčat a 2 - 10 % u dizygotních dvojčat, což činí autismus jedním z nejvíce geneticky ovlivněných neurovývojových onemocnění [2].

Nedávna celogenomová analýza případů autismu vzniklých *de novo* naznačuje, že k autistickému fenotypu může individuálně přispívat až 1000 genů [21]. Nelze ovšem říci, že se jedná o striktně geneticky danou poruchu, jelikož shoda u monozygotních dvojčat nedosahuje 100% a na postižení se tedy nejspíše podílejí, obdobně jako u jiných onemocnění, i negenetické faktory. Genetická i fenotypová heterogenita tohoto onemocnění činí výzkum velmi komplikovaným.

Znamé genetické příčiny autismu zahrnují:

- Cytogeneticky detekovatelné chromozomální abnormality
- CNV - submikroskopické delece a duplikace
- Znamé monogenní choroby asociované s PAS
- Geny mutované u idiopatického autismu

1.4.1 *Cytogeneticky detekovatelné chromozomální abnormality*

▪ Cytogeneticky detekovatelné chromozomální abnormality jsou nalézány zhruba u 2 - 6 % pacientů s PAS [22]. Do této skupiny řadíme aneuploidie, nebalancované chromozomální přestavby a další abnormality identifikovatelné pomocí cytogenetických popř. molekulárně cytogenetických metod. Ve shodě s očekáváním bývají nebalancované chromozomální abnormality nacházeny především u autistických dětí, které mají přidružené dysmorfické rysy [22]. Cytogeneticky detekovatelné abnormality byly nalezeny téměř na každém chromozomu, jedná se ovšem vždy o velice raritní případy. Seznam všech těchto abnormalit je k dispozici na stránkách <http://projects.tcag.ca/autism/>. Často nalézány strukturálními aberacemi jsou delece 2q37, 22q11.2 a 22q13.3. Co se týče numerických aberací, je incidence autismu zvýšena i u pacientů postižených Downovým syndromem, kde činí minimálně 7 % [23].

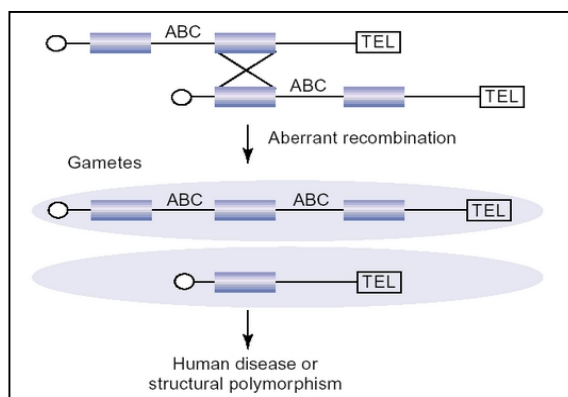
Autismus byl též zjištěn u pacientek s Turnerovým syndromem. Ačkoliv byl autismus popsán i u dalších numerických aberací gonozomů jako je Klinefelterův syndrom, superfemale a supermale, nebyla v těchto případech prokázána signifikantní asociace.

1.4.2 Varianty v počtu kopií (Copy number variants, CNV)

Definice vymezuje pojem CNV jako segmenty DNA o velikosti minimálně 1 kb, jejichž kopie se v genomu vyskytují ve variabilním počtu vzhledem k počtu kopií referenčního genomu [24]. Velikost CNV je spíše orientační a byla definována zejména na základě rozlišovací schopnosti metody array-CGH, díky které došlo k popsání této strukturní variability. Je nutné odlišovat CNV na jedné straně od polymorfismů typu SNP, které představují záměnu na úrovni pouze jednoho nukleotidu, a na druhé straně od mikroskopicky pozorovatelných abnormalit.

Bylo provedeno mnoho studií, kde byly popsány velké delece a duplikace, které zjevně nebyly spjaty s žádnou chorobou, a i když CNV zahrnují geny, neznamená to nutně, že budou mít za následek geneticky podmíněnou poruchu. Pro orientaci v CNV slouží např. Databáze genomových variant (Database of Genomic Variants, DGV), kde jsou katalogizované CNV běžně se vyskytující u zdravé populace. Tato databáze je pravidelně aktualizována a v současné době obsahuje kolem 2 500 000 popsáných CNV. Velikost CNV se nejčastěji pohybuje v rozmezí 1-10 kb.

Jedním z mechanismů vzniku CNV je nealelická homologní rekombinace (Obrázek 1), kdy dojde nejdříve k přiblížení a následně ke crossing-overu mezi dvěma nealelickými úseky DNA, které obsahují téměř stejnou sekvenci nukleotidů. Tyto oblasti se nazývají segmentální duplikace a jejich vznik je předstupněm vzniku CNV.



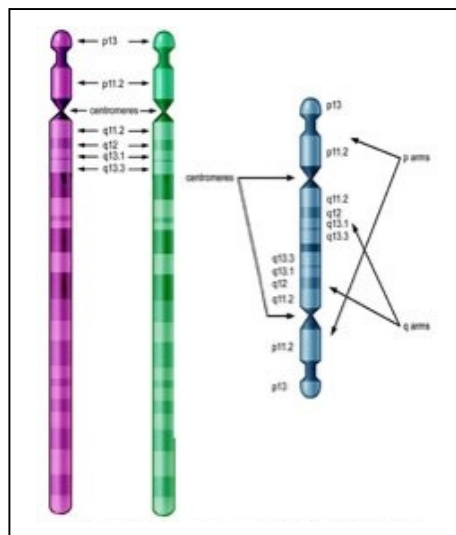
Obrázek 1. Princip vzniku nealelické homologní rekombinace

(<https://eichlerlab.gs.washington.edu/research.html>)

Poslední nezávislé studie dokládají, že u asi 10 % pacientů s PAS bývají nalezeny klinicky signifikantní CNV [6]. Žádná z popsaných CNV se však nevyskytuje ve více než 3 % případů. Specifikaci nejčastěji nalézáných odchylek u autismu pomocí mikročipové analýzy ukazuje Tabulka 2. Nejčastěji nalézanou CNV je duplikace 15q11.2 -q13 [22]. Dále se mezi nejčastěji se vyskytující CNV u autismu řadí aberace 16p11.2, popsané u 0,5-1% pacientů [6].

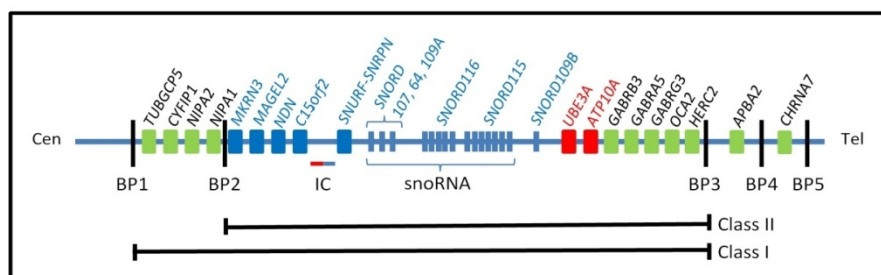
1.4.2.1 Duplikace 15q11.2-q13

Podle odhadů několika studií může být 1 - 3% všech případů autismu důsledkem duplikace regionu 15q11.2-q13 [22] Nejčastější jsou intersticiální duplikace nebo nadpočetný pseudodicentrický invertovaný duplikovaný chromozom 15 (Obrázek 2).



Obrázek 2. Dva normální chromozomy 15 a jeden izodicentrický chromozom15
(<http://www.dup15q.org/dup15q-genetics-overview.html>)

Duplikace 15q11.2-q13 bývají často submikroskopické, a proto bývají řazeny mezi CNV. Častý vznik delecí či duplikací v této oblasti je podmíněn její genomovou strukturou. Syndromy Angelman (AS) a Prader-Willi (PWS) jsou způsobovány delecemi právě v tomto regionu. Více než 4 Mb dlouhý PWS/AS kritický region má dva běžně se vyskytující body zlomu (breakpoints, BP) ležící proximálně na chromozomu 15 (BP1, BP2) a jeden ležící distálně (BP3). Na základě toho jsou delece rozděleny do třídy I a třídy II (Obrázek 3). Tyto body zlomů leží uvnitř segmentálních duplikací [25].



Obrázek 3: Rozdělení do tříd podle bodu zlomu

(http://www.imprinting-disorders.eu/?page_id=276)

Duplikace 15q11.2-q13 vzniká ve většině případů *de novo*. Důležitým aspektem je, zda je duplikovaný segment původem maternální či paternální. Duplikace 15q maternálního původu má za následek výskyt autistických rysů a různé stupně opoždění vývoje, zatímco pouze několik případů duplikace 15q11.2-q13 paternálního původu bylo popsáno v souvislosti s autismem.

Hlavní vliv na autistický fenotyp u pacientů s maternální duplikací 15q11.-13 by mohla mít nadměrná exprese genu *UBE3A*, který hraje kritickou roli v normálním vývoji nervového systému. Tento gen je v mozku exprimován pouze z maternální alely. V ostatních tkáních je exprimován bialelicky. Dalším genem v této oblasti, který by se mohl podílet na rozvoji autismu, je *GABRB3*, kódující receptory pro inhibitory neurotransmiterů. Je exprimován z maternální i paternální alely.

Existuje specializované sdružení pro pacienty s tímto syndromem a jejich rodiče, a to Dup15q Alliance (<http://www.dup15q.org>).

1.4.2.2 CNV v oblasti 16p11.2

Mikrodelece v tomto regionu byly popsány zhruba u 0,5 % pacientů s autismem a u podobného procenta pacientů byly popsány duplikace v této oblasti. Jak delece, tak duplikace bývají o rozsahu zhruba 500 kb a jsou obklopeny zhruba 147 kb dlouhými segmentálními duplikacemi, které jsou navzájem z více jak 99 % identické. Kritický úsek obsahuje asi 24 genů a segmentální duplikace minimálně další tři geny. Kandidátními geny na základě exprese v mozkové tkáni by mohly být zejména *MAPK3*, *MAZ*, *DOC2A* a *SEZ6L2*. [26]

Tabulka 2. Nejčastěji nalézané CNV u pacientů s PAS [6,12,27]

Region	Název	Poloha	CNV	OMIM	Geny
1q	AUTS11	1q41-q42	del	610836	<i>MARK1</i>
2q	AUTS5	2q31.1	del, dup	606053	<i>SLC25A12</i>
3q	AUTS16	3q24	del, dup	613410	<i>SLC9A9</i>
7q	AUTS1	7q22.1	del	209850	<i>RELN</i>
7q	AUTS2	7q11.22		607270	Prozatím neznámý
7q	AUTS9	7q31.2	del, dup	611015	<i>FOXP2, WNT2</i>
7q	AUTS10	7q35-q36	del	611016	<i>EN2, CNTNAP2</i>
11q	AUTS18	11q13.3-q13.3		613436	<i>CHD8</i>
11q	AUTS17	11q13.3-q13.4	del	613436	<i>SHANK2</i>
12q	AUTS13	12q14.2		610908	Prozatím neznámý
13q	AUTS3	13q14.2-q14.1	del	608049	<i>5-HTR2A</i>
15q	AUTS4	15q11-q13	dup	608636	<i>UBE3A, SNRPN, CHRNA7</i>
16p	AUTS14A	16p11.2	del	611913	Prozatím neznámý
16p	AUTS14B	16p11.2	dup	614671	Prozatím neznámý
17q	AUTS6	17q11.2	del	609378	<i>SLC6A4</i>
17q	AUTS7	17q21.3	del, dup	610676	<i>ITGB3</i>
21p	AUTS12	21p13-q11		610838	Prozatím neznámý
Xp	AUTSX2	Xp22.31	del, dup	300495	<i>NLGN4</i>
Xq	AUTSX1	Xq13.1	del, dup	300425	<i>NLGN3</i>
Xq	AUTSX3	Xq28	del	300496	<i>MECP2</i>

1.4.3 Známé monogenní choroby asociované s autismem

Autismus či širší autistický fenotyp se často vyskytuje jako jeden ze symptomů monogenních chorob - nejvíce bývá dáván do spojitosti se syndromem fragilního X, Rettovým syndromem a tuberózní sklerózou. Autismus bývá popisován i u některých dědičných metabolických poruch. Např. u pacientů se Smith-Lemli-Opitzovým syndromem je incidence autismu 50 - 86 % a nedávno provedená studie zjistila, že 5,7 % pacientů s pozdě diagnostikovanou fenylketonurií splňovalo diagnostická kritéria pro PAS na rozdíl od 0 % s časně diagnostikovanou a léčenou fenylketonurií [22]. Podobné známé monogenní poruchy však objasňují pouze 2 - 5 % případů autismu [22].

1.4.3.1 Syndrom fragilního X

Tento syndrom je způsobený genetickým defektem na chromozomu X a postihuje tedy častěji chlapce, kteří mají pouze jeden chromozom X. Do určité míry se může projevit i u žen přenašeček. Prevalence syndromu fragilního X je asi 1:2000, přičemž řada starších postižených mužů zůstává nediodagnostikovaných. Jedná se o nejčastější příčinu MR u mužů. Tato porucha je následkem elongace CGG repetice v genu *FMRI*. Pokud se triplet CGG opakuje méně než 50x, nejedná se o patologii. Jestliže se v genomu nachází 50-200 opakování, jedinci nemají klinické projevy syndromu, ale vzhledem k tendenci nárůstu počtu repetice z generace na generaci jsou považováni za přenašeče tzv. premutace [28]. U pacientů s více než 200 opakováními dojde ke změně metylace genu *FMRI* a tím k jeho inaktivaci. Produkt tohoto genu je mimo jiné velmi aktivní ve vývoji mozkové tkáně, a proto je jeho dysfunkce patrná zejména v této oblasti [29]. Expanze repetice je při vhodně zvolené kultivační metodě viditelná na karyotypu jako fragilní místo, z čehož je odvozen i název této poruchy. Asociace mezi syndromem fragilního X a autismem je dlouho známá. Téměř 20 % chlapců trpících syndromem fragilního X splňuje diagnostická kritéria pro autismus [30]. Nejméně u poloviny postižených dětí se vyskytují alespoň nějaké autistické rysy jako např.: vyhýbání se očnímu kontaktu, opoždění řeči, repetitivní chování a poruchy spánku. Je doporučeno, aby všichni chlapci s neobjasněným autismem byli testováni právě na syndrom fragilního X.

1.4.3.2 Rettův syndrom

Syndrom se téměř výhradně vyskytuje u dívek. Klasická forma Rettova syndromu je charakterizována zpočátku normálním psychomotorickým vývojem, který se mezi 6. až 18. měsícem života zastavuje a dochází i k regresi. Pro tento syndrom je typická, mikrocefalie, hypotonie a apraxie. Dívky s Rettovým syndromem často samostatně nechodí, nejsou schopny verbální komunikace a mohou se u nich vyskytovat epileptické záchvaty a poruchy spánku. Jedná se o heterogenní onemocnění, nejčastější genetickou příčinou tohoto syndromu jsou mutace v genu pro metyl-CpG vázící protein 2 (*MECP2*), který je lokalizován v oblasti Xq28. U dívek s diagnózou autismu a mutací v genu *MECP2* jsou popisovány dvě prevalentní mutace: R306C a T158M [6]. Postižení bývají různě závažná, jelikož *MECP2* je lokalizován na chromozomu X a má zde vliv proces lyonizace (procento inaktivovaných X chromozomů nesoucích mutovanou alelu). Bodové mutace v genu *MECP2* u chlapců jsou obvykle neslučitelné se životem. Těhotenství je buď potraceno, nebo dochází k úmrtí velmi časně po narození. Vzácně se však mohou vyskytovat i chlapci postižení Rettovým syndromem a to v případě, že je u nich přítomen nadpočetný chromozom X, nebo se jedná o XX muže, či je jejich tělo tvořeno více buněčnými liniemi - tzv. somatický mozaicismus [26]. U chlapců s PAS a MR jsou popisovány duplikace genu *MECP2*. Tento typ mutace nevede k projevům klasického Rettova syndromu a není pro chlapce prenatálně letální. Rettův syndrom bývá řazen mezi PAS. V České republice se ročně narodí asi 5-6 dívek postižených tímto syndromem.

1.4.3.3 Tuberózní skleróza

Tuberózní skleróza se vyskytuje u cca 4 % autistů a u asi 8 - 14 % autistů se záchvatovitým onemocněním. Jedná se o jedno z nečastějších monogenních onemocnění spojených s PAS. Tuto autozomálně dominantní chorobu způsobují mutace funkčně spřízněných genů *TSC1* (9q34.13) a *TSC2* (16p13.3). Choroba je charakterizovaná přítomností hamartomů v mozku, srdci, ledvinách, plicích a na kůži. Tyto změny mohou vést k epilepsii, potížím s učením, problémům v chování a dalším komplikacím. PAS, nízké IQ a infantilní spazmy jsou běžnější u pacientů, kteří mají mutaci v genu *TSC2*. Navíc pacienti, kteří trpí tuberózní sklerózou, mají velmi vysoké riziko rozvoje autismu, pokud jsou u nich přítomny nádory lokalizované v temporálním laloku mozku [31].

1.4.4 Geny mutované u idiopatického autismu

Autismus je komplexní onemocnění a v jeho vývoji je pravděpodobně zapojeno více minorgenů, jejichž vzájemnou nevýhodnou kombinací může dojít k rozvoji této poruchy. Některé z genů uvedených v Tabulce 3 tedy nebudou příčinou autismu, ale budou přispívat k zvýšení pravděpodobnosti jeho vzniku [32].

Tabulka 3. Některé geny asociované s autismem

Symbol genu	Lokus	Název proteinu
<i>NLGN3</i>	Xq28	Neurologin 3
<i>NLGN4</i>	Xp22.33	Neurologin 4
<i>NRXN1</i>	2p16.3	Neurexin 1
<i>SHANK3</i>	22q11	SH3 and multiple ankyrin repeat domains
<i>CNTNAP2</i>	7q36	Contactin-associated protein-like 2
<i>CNTN4 a CNTN3</i>	6p26-p25	Contactin 4 a Contactin 3
<i>PCDH10</i>	4q28	Protoadherin 10
<i>NRCAM</i>	7q31	Neuronal cell adhesion molekule
<i>MECP2</i>	Xq28	Methyl CpG-binding protein 1
<i>UBE3A</i>	15q11-q13	Ubiquitin protein ligase E3A
<i>DAIA</i>	3q	Deleted in autism
<i>A2BPI</i>	16p13	Ataxin 2-binding protein 1
<i>EN2</i>	7q36	Engrailed 2
<i>HOXA1</i>	17p15.3	Homebox A1
<i>HOXB1</i>	17q21-q22	Homebox B1
<i>RELN</i>	7q22	Reelin
<i>WNT2</i>	7q31	WENT2
<i>FOXP2</i>	7q31	Forkhead Box Protein P2

1.4.4.1 Geny *NLGN3* a *NLGN4*

Tyto geny kódují neurologiny - proteiny umístěné v tzv. postsynaptické denzitě v místě přenosu nervového signálu. Neurologiny tedy hrají roli ve fungování synapsí. Právě změny v synapsích byly popsány jako jedna z možných příčin autismu. Po provedení expresního profilování v mozkové tkáni dospělých mužů a žen bylo zjištěno, že se neurologiny vyskytují ve všech částech mozku bez větších rozdílů v jejich distribuci. Mutace v těchto genech byly popsány u více pacientů s autismem, potažmo Aspergerovým syndromem [33]. U jedinců s PAS a mutací v genech *NLGN3* či *NLGN4* nebývají typicky popisovány dysmorfické rysy. Analýza těchto genů by měla být zvažena u rodin se suspektní X-vázanou dědičností autismu [22].

1.4.4.2 Gen *SHANK3*

Dalším z genů asociovaných s autismem je *SHANK3*, který je exprimován především v mozkové kůře a mozečku. Protein kódovaný tímto genem se váže přímo na neurologiny a jeho zásadní rolí je vytváření funkčních synapsí. Podílí se též na formaci, maturaci a zvětšení dendritických trnů. Byly objeveny delece, inserce i bodové mutace v genu *SHANK3* u pacientů s PAS. Navíc mutace v tomto genu byly nalezeny i u jedinců trpících ADHD či potížemi s řečí, stejně tak jako u nepostížených členů rodiny, což svědčí o tom, že se na rozvoji autismu podílí v souhře s ostatními predisponujícími geny [34].

1.4.4.3 Gen *FOXP2*

Jedná se o první gen, o němž se zjistilo, že je zodpovědný za rozvoj řeči u lidí. Bodová mutace typu missence v tomto genu byla popsána u jedinců se závažnou poruchou řeči ve třech generacích jedné rodiny. Nedostatečné množství produktu genu *FOXP2* v klíčovém stádiu embryogeneze má za následek patologický vývoj části nervové tkáně mozku, jež je důležitá pro vývoj řeči. Toto zjištění nasvědčuje tomu, že by zde mohla být souvislost s autismem [35].

1.5 Možnosti laboratorní diagnostiky genetických příčin autismu

1.5.1 Karyotypizace

Vyšetření karyotypu je základní cytogenetické vyšetření a bývá metodou první volby při podezření na geneticky podmíněné onemocnění, a to i z důvodu finanční dostupnosti. K provedení této metody je třeba získat chromozomy z metafázních jader dělících se buněk. Pro rozlišení jednotlivých chromozomů se používají pruhovací metody, nejčastěji G-pruhování. Principem této metody je částečná degradace chromozomů (konkrétně proteinových struktur), které je docíleno trypsinem, a následné obarvení Giemsovým roztokem. Jeden pruh na karyotypu odpovídá zhruba 5 - 10 Mb. Pomocí této metody můžeme odhalit větší strukturní aberace chromozomů. Nepřetržité zlepšování v cytogenetických postupech zahrnující i vysokorozlišovací techniky zvýšilo diagnostickou výtěžnost těchto metod u pacientů s PAS téměř na 3% [6].

1.5.2 MLPA

Zjednodušeným principem molekulárně genetické metody označované touto zkratkou (odvozenou od anglického názvu Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) je navázání oligonukleotidových sond rozdělených na dvě části na cílovou sekvenci DNA a jejich následná ligace a amplifikace. SONDY mají z každé strany úsek, který není komplementární s DNA, ale je komplementární s primery, se kterými se dále pracuje. Každá sonda navíc obsahuje tzv. stuffer sekvenci o různé předem definované délce. Pokud dojde na základě komplementarity k hybridizaci, části jsou spojeny pomocí ligázy a po denaturaci jsou sondy zmnoženy pomocí PCR. Všechny sondy jsou navrženy tak, aby se amplifikovaly shodným párem primerů. V konečné fázi se produkty oddělí kapilární elektroforézou, při které dojde i k odečtení koncentrace jednotlivých amplifikovaných úseků, které se díky stuffer sekvenci liší svou délkou.

Tato metoda se ukázala jako výhodná při rutinním screeningu známých chromozomálních abnormalit vyskytujících se u pacientů s MR, kde se jedná především o změny v subtelomerických oblastech. Během jedné reakce lze vyšetřit až 40 různých úseků DNA. Například komerčně dostupný kit P245 (MRC-Holland) pro vyšetření mikrodelečních syndromů zahrnuje celkem 23 oblastí v lidském genomu a lze pomocí něj diagnostikovat např. Sotosův syndrom, PWS/AS, Rettův syndrom a další. V případě autismu jsou dostupné speciální kity k detekci nejčastěji se vyskytujících mikrodelecí a mikroduplikací, např. kit P343-C1 (MRC-Holland) obsahuje sondy pro oblast 15q11-q13, 16p11.2 a gen *SHANK3*.

Jednou z modifikací této metody je metyl-senzitivní MPLA, kdy dochází k rozštěpení DNA restrikcími endonukleázami, které rozpoznají metylované úseky.

1.5.3 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

FISH je molekulárně cytogenetická metoda, jejímž principem je hybridizace fluorescenčně značené sondy, která je komplementární k vyšetřovanému úseku, na DNA chromozomů. Pro ověření správnosti hybridizace se používá sonda značená jiným barvivem, která je komplementární k jinému úseku na tomtéž chromozomu. K podbarvení (counterstaining) se nejčastěji používá DAPI, který zároveň vytvoří pruhování na chromozomech. Vyhodnocení probíhá za pomoci fluorescenčního mikroskopu, ve kterém pozorujeme interfázní jádra a chromozomy v mitóze. Navázané sondy se projeví hybridizačním signálem. Rozlišení FISH je cca 100 kb. Dříve se tato

metoda používala i pro vyšetřování subtelomerických oblastí chromozomů, což bývá dnes nahrazováno metodou MLPA.

1.5.4 DNA čipy

Molekulárně cytogenetické vyšetření pomocí mikročipů bylo vyvinuto pro vyhledávání delecí a duplikací v genomu člověka a umožňuje během jednoho experimentu analyzovat celý genom. Momentálně jsou využívány v klinickém testování dva typy mikročipů, a to array CGH a SNP array, využívající každý jinou techniku hledání i odečítání CNV. Jelikož bylo více CNV zaznamenáno u autistů s přidruženými nálezy, jako je mikrocefalie, epilepsie, vrozené vývojové vady, poruchy růstu či dysmorfické rysy a další, byla stanovena tzv. De Vriesova indikační kritéria (Tabulka 4), podle nichž se určuje, kteří pacienti by měli být vyšetřeni pomocí DNA čipů. Provádění analýzy pouze u osob, u kterých jsou k autismu přidruženy další vady, zvyšuje diagnostickou výtěžnost téměř na 30 % [6].

1.5.4.1 Array CGH

Komparativní genomová hybridizace na čipu (aCGH) je metoda, při níž dochází k navázání krátkých úseků DNA pacienta a kontroly na sondy ukotvené na pevném podkladu, nejčastěji na skle. Jednotlivé čipy se mezi sebou liší hustotou a typem použitých sond. Rozlišujeme BAC aCGH, kde jsou sondy získávány izolací z umělých bakteriálních chromozomů, a oligo aCGH, kde jsou oligonukleotidové sondy syntetizovány výrobcem přímo na čipu. Koncentrace a délka naštěpených úseků obou vzorků DNA je stejná. Každý vzorek je však označen jinou fluorescenční barvou. Kontrolní DNA je většinou získávána smísením DNA více osob, takže se referenční DNA jeví jako univerzální. Pokud se v genomu pacienta nachází mikrolece, kontrolní DNA má tento úsek v nadbytku oproti DNA pacienta a naváže se ve větším množství na sondu, která odpovídá danému úseku, a u této sondy bude převládat signál jedné barvy. Analogicky funguje metoda i pro mikroduplikace. Ve finále se čip vloží do speciálního vysokorozlišovacího skeneru, který detekuje intenzitu signálu fluorescenčních sond, přičemž na místech, kde se nenachází žádná přestavba, je intenzita signálů obou barviv ve zhruba stejném poměru. Software dodaný zpravidla firmou poskytující mikročipy vyhodnotí data na základě znalosti rozmístění sond v lidském genomu, a výsledkem je graf pro každý chromozom s nalezenými mikrolecemi a mikroduplikacemi.

Array CGH nahrazuje vysokorozlišovací chromozomové analýzy a metodu FISH ve vyšetřování autistických dětí, ale nedetekuje balancované přestavby. Rozlišovací schopnost aCGH se pohybuje už od několika stovek bazí. Rozšířené užívání aCGH v klinické praxi významně urychlilo detekci submikroskopických delecí a mikroduplikací (CNV), čímž se zvýšil počet případů autismu s objasněnou genetickou příčinou.

1.5.4.2 SNP array

Jedná se o novější typ čipů s vyšší rozlišovací schopností díky většímu počtu zahrnutých sond. Odhalí jak CNV, tak homozygotitu/heterozygotitu jednotlivých lokusů. Principem metody je hybridizace rozštěpených denaturovaných úseků DNA na připravené sondy, přičemž na každou sondu dojde zároveň za pomoci polymerázy k navázání jednoho značeného nukleotidu (př. A,T - Cyanine5; C,G - Cyanine3). Místo, kde má dojít k navázání nukleotidu je předem určeno tak, aby se jednalo o v populaci běžně se vyskytující SNP. Výsledkem jsou tedy dva grafy (Obrázek 4).



Obrázek 4. Schéma výsledků analýzy SNP array

V případě, že je deletována určitá oblast na jednom z homologních chromozomů, dojde na prvním grafu k poklesu intenzity signálu a tento nálezn je potvrzen ztrátou heterozygotity právě v postiženém lokusu. Analogicky u duplikací dochází ke zvýšení intenzity signálu a nálezn je potvrzen výskytem genotypů BBA a AAB. SNP čipy dokážou odhalit uniparentální dizomii na rozdíl od klasické aCGH, kde nelze tento jev pozorovat, jelikož se nejedná o ztrátu ani zmnožení genetického materiálu.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo zanalyzovat klinická data souboru pacientů s PAS, u kterých bylo provedeno vyšetření metodou SNP array.

Cílem první části práce byla analýza vybraných klinických parametrů celého souboru pacientů. Sledované klinické parametry byly voleny jednak s ohledem na známou častou asociaci s PAS a jednak s ohledem na indikační kritéria k vyšetření SNP array (De Vriesova kritéria, viz Tabulka 4). Vzhledem k tomu, že se nejedná o náhodný výběr pacientů s PAS, ale o selektovaný soubor, bylo zjišťováno, jak (a zda vůbec) se pacienti v jednotlivých parametrech liší od běžně udávaných hodnot.

Cílem druhé části byla komplexní statistická analýza získaných dat s cílem zjistit, zda některé parametry nebudou vykazovat asociaci, dále korelace vybraných sledovaných parametrů, u kterých již v minulosti byla nějaká závislost publikována, nebo ji bylo lze očekávat, a zejména porovnání skupiny pacientů s pozitivním a negativním výsledkem SNP array.

Cílem třetí části byl podrobnější popis vybraných pacientů, u nichž byla metodou SNP array identifikována kauzální aberace, popis jejich klinické symptomatologie a porovnání s doposud publikovanými případy se stejnou aberací.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

Studie byla provedena na souboru čítajícím celkem 98 pacientů, kteří byli vyšetřováni na Oddělení klinické genetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol a na Dětské psychiatrické klinice 2. LF UK a FN Motol z důvodu podezření na poruchu autistického spektra v letech 2000 - 2013, a u kterých bylo provedeno vyšetření metodou SNP array. U všech těchto pacientů byly předchozími vyšetřeními vyloučeny časté známé genetické příčiny PAS, tedy cytogeneticky detekovatelné chromozomální aberace, syndrom fragilního chromozomu X a Rettův syndrom (poslední pouze u dívek, u části z nich pouze klinicky). Všichni pacienti měli zároveň negativní screening metabolických vad.

Věkové rozpětí pacientů bylo 1 - 20 let a v souboru bylo 74 chlapců a 24 děvčat. Průměrný věk, kdy se pacienti poprvé dostavili ke genetickému vyšetření, byl 7 let, medián 6 let, modus 4 roky.

Všichni pacienti prošli psychologickým vyšetřením a diagnóza PAS u nich byla potvrzována pomocí diagnostických škál CARS a ADI-R. Psychologickým a psychiatrickým vyšetřením byl rovněž upřesňován typ autistické poruchy. Tímto postupem byla diagnóza PAS potvrzena u 84 pacientů a jeden pacient byl zařazen jako jiná pervazivní vývojová porucha. V souboru bylo ponecháno i 13 pacientů, u kterých nebyla formálně potvrzena diagnóza pervazivní vývojové poruchy, ale kteří vykazovali zjevné autistické rysy a další fenotypové znaky, které vedly k indikaci vyšetření metodou SNP array. Indikace vycházely z De Vriesových indikačních kritérií (Tabulka 4), jednotlivé případy však byly posuzovány individuálně a v širším kontextu.

Tabulka 4. Indikační kritéria podle De Vriese [36] Pacient je indikován při skóre 3 a více.

Znak:	Body:
Rodinná anamnéza s mentální retardací: - kompatibilní s Mendelovskou dědičností (1) - nekompatibilní s Mendelovskou dědičností (2)	1-2
Prenatálně započatá růstová retardace	2
Postnatální růstové abnormality: - mikrocefalie (1) - malá postava (1) - makrocefalie (1) - vysoká postava (1)	max 2
Faciální stigmatizace	2
Jiné než faciální dysmorfie a kongenitální abnormality	1-2

Klinické parametry, které byly hodnoceny v našem souboru pacientů, jsou vypsány v Tabulce 5.

Tabulka 5: Hodnocené a porovnávané klinické parametry

Pohlaví pacienta
Průběh gravidity a perinatální anamnéza
Psychomotorický vývoj (PMV)
Regres ve vývoji řeči a/nebo motorice
Autoagresivita/Heteroagresivita
Poruchy spánku
Typ autismu s následujícími podkategoriemi:
o Dětský autismus (viz kap. 1.1.1)
o Atypický autismus (viz kap. 1.1.2)
o Aspergerův syndrom (viz kap 1.1.3)
o Jiná neurčená pervazivní vývojová porucha – pacienti s pervazivní vývojovou poruchou nespádající do předchozích tří kategorií
o Non F84 – pacienti s autistickými rysy, u kterých nebyla pervazivní vývojová porucha potvrzena
Přítomnost a úroveň MR s následujícími podkategoriemi:
o Lehká MR
o Středně těžká MR
o Těžká MR
o Tíže MR neurčena (pacienti s MR nejasné tíže)
Přítomnost dysmorfických rysů a vrozených vývojových vad
Poruchy růstu s následujícími podkategoriemi:
o Malý vzrůst
o Makrosomie
o Nadváha
o Mikrocefalie absolutní (obvod hlavy pod 3. percentilem) či relativní (obvod hlavy neodpovídající ostatním růstovým parametrům)
o Makrocefalie absolutní (obvod hlavy nad 97. percentilem) či relativní (obvod hlavy neodpovídající ostatním růstovým parametrům)
Epilepsie
Výsledek MRI CNS
Rodinná anamnéza s následujícími podkategoriemi:
o Postižení u sourozence
o PAS v širší rodině
o Širší autistický fenotyp v rodině
o Psychiatrické onemocnění v rodině
Kategorie nálezu na SNP array

3.2 Metody

Hodnocené parametry byly zjišťovány příslušnými odborníky a autorka spisu byla u některých vyšetření nebo stanovení přítomná.

Údaje o průběhu gravidity, perinatální anamnéze, psychomotorickém vývoji, regresi, autoagresivitě nebo heteroagresivitě a poruchách spánku byly získávány pohovorem s rodiči. Diagnóza PAS a typ autismu byly zjištěny psychologickým a psychiatrickým vyšetřením za použití škál CARS a ADI-R. Tíže MR byla zjišťována psychologickým vyšetřením. Dysmorfické rysy byly posuzovány při klinicko-genetickém vyšetření porovnáním fenotypu pacienta s fenotypem jeho přímých příbuzných, obvykle spolu se zhodnocením fotodokumentace z rodiny. Výskyt vrozených vývojových vad byl zjištěn klinickým vyšetřením či studiem záznamů předchozích vyšetření s využitím zobrazovacích metod, nejčastěji ultrazvuku, z dostupných lékařských zpráv. Růstové parametry pacientů byly získávány měřením prováděným sestrou z Oddělení klinické genetiky za použití standardních kalibrovaných měřidel. Přítomnost epilepsie byla zjišťována pohovorem s rodiči, neurologickým vyšetřením a vyšetřením EEG. MRI CNS bylo prováděno za standardních podmínek a vyhodnocení snímků bylo provedeno radiologem s příslušnou erudiicí. Údaje o rodinné anamnéze byly získány od rodičů pacienta prostřednictvím komplexního rodokmenového dotazníku. Analýza metodou SNP array byla prováděna na čípech HumanCytoSNP-12 od firmy Illumina, které obsahují asi 300 tisíc oligonukleotidů analyzujících SNPs a vybrané CNV. Vyhodnocení bylo provedeno algoritmy obsaženými v programech GenomeStudio a QuantiSNP. Nalezené aberace byly ověřeny pomocí jiné nezávislé metody (FISH, MLPA, array CGH na čípech SurePrint G3 human CGH array 2x400K firmy Agilent).

Data byla zadána do tabulkového procesoru Microsoft Excel od firmy Microsoft a z vyhotovené tabulky byla zpracovávána analýza souboru pacientů. Statistická analýza byla provedena pod vedením zkušeného statistika metodami uvedenými níže volenými s ohledem na počet porovnávaných kategorií a počet pozorování. Vzhledem k tomu, že proměnné jsou kategoriální, byla k ozřejmění, zda v souboru existuje asociace mezi jednotlivými dvojicemi sledovaných proměnných, použita kontingenční analýza. Pro každou dvojici proměnných byla sestavena kontingenční tabulka a spočteny kontingenční koeficienty. Statistická významnost asociace pak byla testována (pokud to

počet pozorování umožňoval) Fischerovým testem. Dále byla provedena shluková (clusterová) analýza celého souboru.

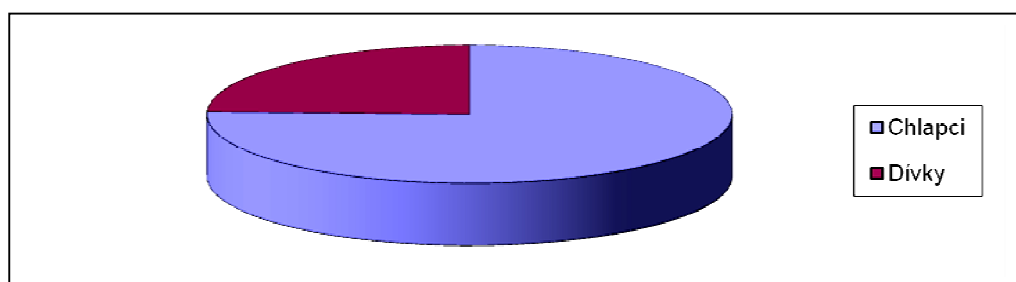
Porovnání skupiny pacientů s kauzálním nebo pravděpodobně kauzálním nálezem na SNP array se skupinou pacientů bez nálezu bylo provedeno pomocí logistické regresní analýzy. Logistický regresní model je speciálním případem zobecněného lineárního modelu, který lze (mimo jiné) využít i k predikci pravděpodobností či poměrů šancí nastání nějakých jevů v závislosti na sledovaných znacích. V této práci byla snaha sestavit logistický model pro predikci poměru šancí indikace skupiny A (pacienti s nálezem) a B (pacienti bez nálezu) popsanych v kapitole 4.2.7 na základě vhodně zvolené podmnožiny ostatních sledovaných proměnných (viz seznam v kapitole 3.1)

4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza klinických parametrů celého souboru pacientů

4.1.1 Pohlaví pacientů

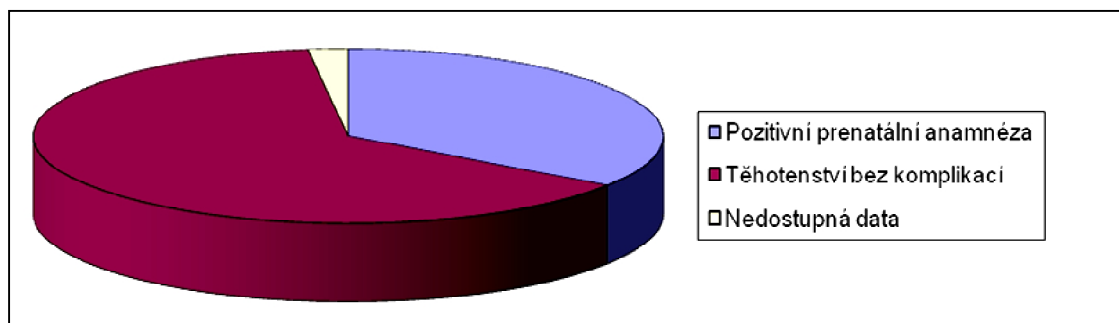
Ze souboru 98 pacientů bylo 74 (75,5 %) chlapců a 24 (24,5 %) dívek, jak je znázorněno na Obrázku 5.



Obrázek 5. Zastoupení chlapců a dívek v souboru pacientů

4.1.2 Průběh gravidity a perinatální anamnéza

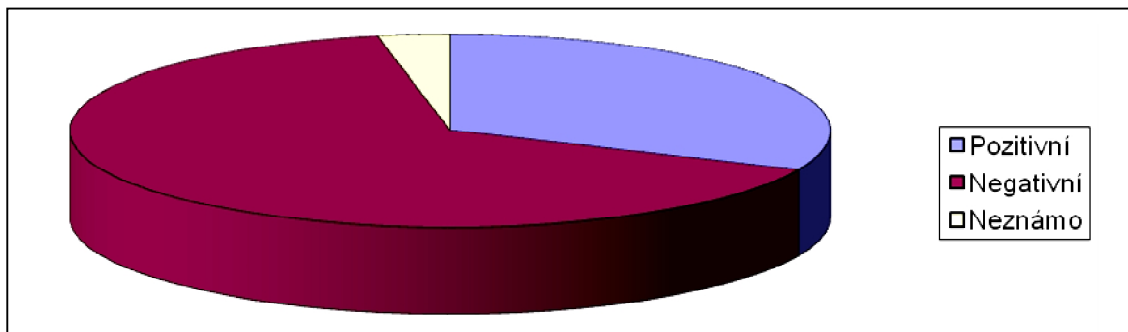
U 34 pacientů (34,7 %) byla pozitivní perinatální anamnéza (tj. nefyziologický průběh gravidity). Jednalo se zejména o gestační diabetes mellitus, virové infekty s hyperpyrexii, hypertenzi a preeklampsi s nutností léčby, případně abortus imminens. V 62 případech (63,2 %) probíhala gravidita bez vážnějších komplikací. U 2 pacientů (2,0 %) nebyla data o průběhu gravidity k dispozici, protože se jednalo o adoptované děti. Procentuální zastoupení pacientů s rizikovým perinatálním obdobím je znázorněno na Obrázku 6.



Obrázek 6. Průběh gravidity

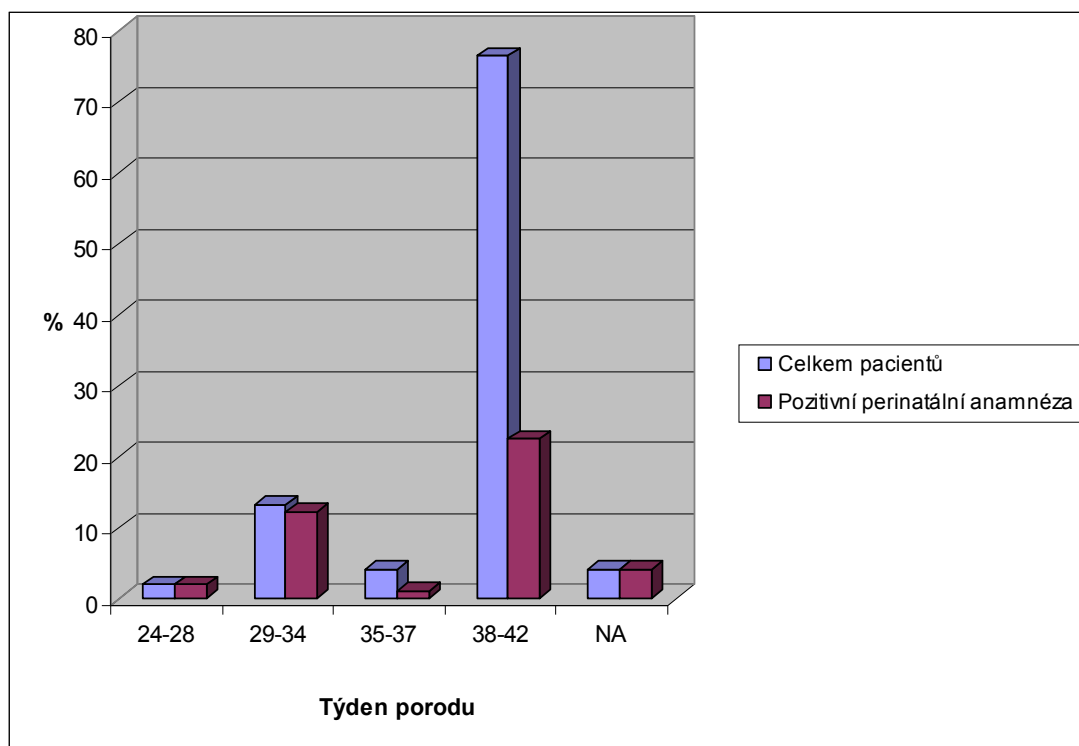
Dalším sledovaným parametrem byla perinatální anamnéza. Většina pacientů (64, tj. 65,3 %) byla donošená, resp. hraničně donošená (porod mezi 36 - 40 týdnem)

a měla nekomplikovanou poporodní adaptaci. Pozitivní perinatální anamnéza byla zjištěna v 31 případech (31,6 %). U tří pacientů (3,1 %) nebyla tato data dostupná. Data jsou shrnuta v Obrázku 7 a dále diskutována v kapitole 4.2.1.



Obrázek 7. Perinatální anamnéza

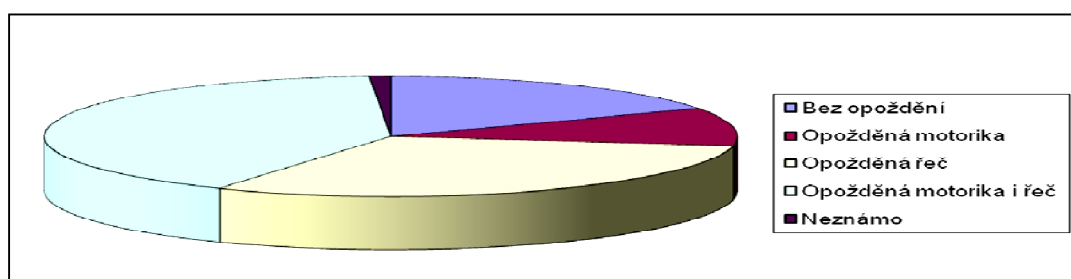
U dvou pacientů (2,0 %) s pozitivní perinatální anamnézou se jednalo o těžkou prematuritu (porod ve 25. resp. 28. týdnu gravidity), u 11 pacientů (11,2 %) se jednalo o středně těžkou nezralost (porod mezi 29. – 34. týdnem). Dalších 17 pacientů (17,4 %) s pozitivní perinatální anamnézou bylo donošených resp. pouze lehce nezralých, měli však ztíženou poporodní adaptaci a byla u nich nutná intenzivní péče. Týden porodu a poměr pacientů s pozitivní perinatální anamnézou je znázorněn na Obrázku 8.



Obrázek 8. Vztah pozitivní perinatální anamnézy s týdnem porodu

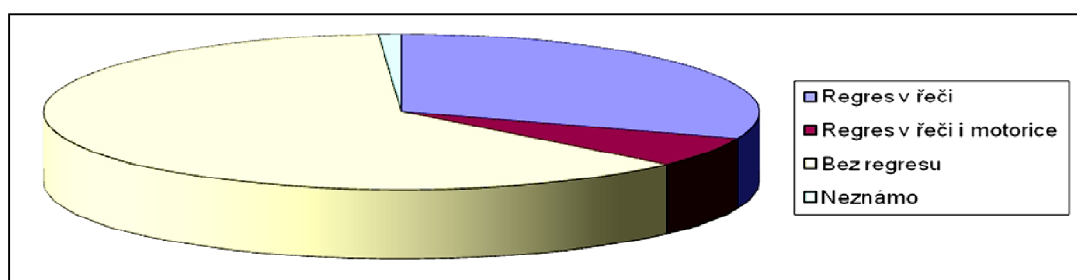
4.1.3 Psychomotorický vývoj a regres ve vývoji

Sledován byl také psychomotorický vývoj pacientů. Fyziologický vývoj motoriky i řeči byl zaznamenán u 17 pacientů (17,4 %). Opoždění motoriky a zároveň normální vývoj řeči byl zjištěn u 10 pacientů (10,2 %), u 3 z nich později došlo k regresu ve vývoji řeči. Normální motorický vývoj ale opožděný vývoj řeči mělo 30 pacientů (30,6 %). Opoždění motorických dovedností i vývoje řeči bylo zjištěno u 40 pacientů (40,8 %). U jednoho pacienta (1,0 %) nebyly údaje o časném vývoji známy (adoptované dítě). Rozdělení pacientů podle psychomotorického vývoje ukazuje Obrázek 9.



Obrázek 9. Psychomotorický vývoj pacientů

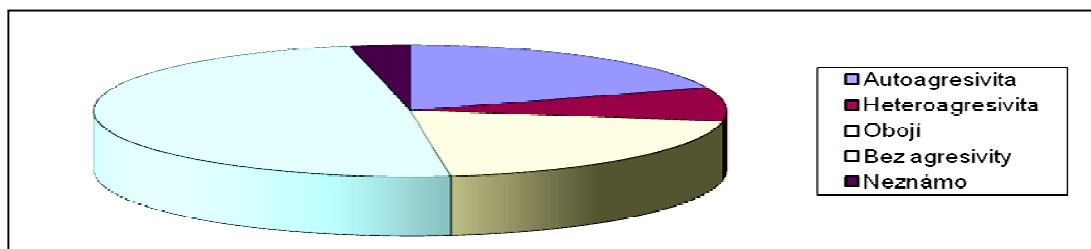
Regres ve vývoji řeči byl zaznamenán u 30 pacientů (30,6 %), u 20 z nich byl zároveň vývoj řeči od počátku opožděn a u zbývajících 10 byl časný vývoj řeči fyziologický. K regresu v řeči i v motorických dovednostech došlo u 6 pacientů (6,1 %), u 3 z nich byl od počátku opožděn jak vývoj motoriky, tak i vývoj řeči, u 2 z nich byl opožděn pouze vývoj řeči, u jednoho pacienta byl časný vývoj motoriky i řeči bez opoždění. Samostatný regres v motorických dovednostech nebyl popsán u žádného pacienta. Regres ve vývoji nebyl pozorován u 61 pacientů (62,2 %), přičemž 9 z nich vykazovalo zcela fyziologický vývoj, 7 bylo opožděno ve složce motorické, 17 mělo opožděnou řeč a 28 vykazovalo opoždění jak vývoje řeči, tak i motoriky. Přítomnost regresu je schematicky znázorněna na Obrázku 10.



Obrázek 10. Podíl pacientů s popsáním regresem ve vývoji

4.1.4 Agresivita

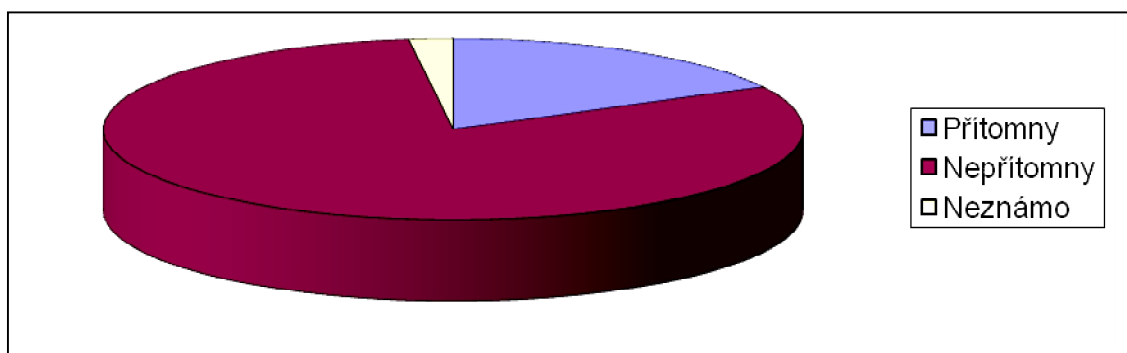
Dalším sledovaným parametrem bylo agresivní chování a sebepoškozování. Heteroagresivita byla zjištěna u 19 pacientů (19,4 %), autoagresivita u 8 pacientů (8,2 %), 20 pacientů (20,4 %) bylo agresivních vůči okolí a zároveň u nich bylo popsáno sebepoškozování. U 48 pacientů (49,0 %) nebylo agresivní chování pozorováno, u 3 (3,1 %) pacientů byla data nedostupná. Podíl pacientů s agresivním chováním je znázorněn na Obrázku 11.



Obrázek 11. Podíl pacientů s agresivním chováním

4.1.5 Poruchy spánku

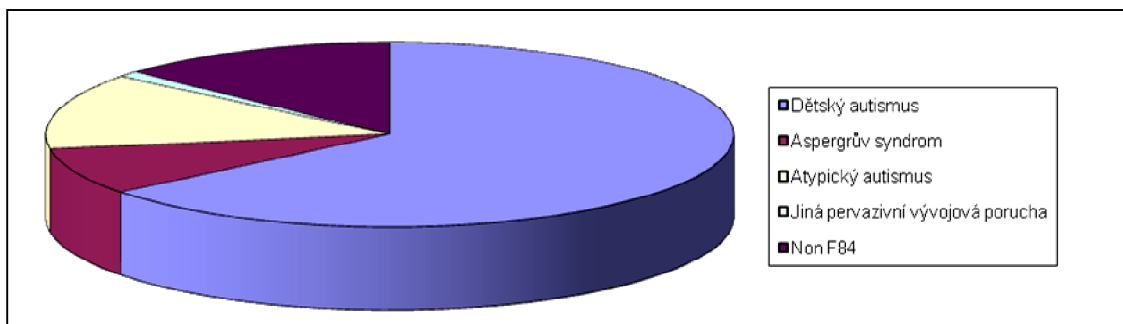
Poruchy spánku byly popsány u 17 pacientů (17,4 %), jednalo se zejména o převrácený spánkový režim, zásadní obtíže při usínání, případně o velmi malou potřebu spánku či o nápadně časté (obvykle více než 10 x) noční buzení. U 79 pacientů (80,6 %) rodiče neudávali žádné výrazné obtíže se spánkem, u 2 pacientů (2,0 %) nebyly údaje o spánkovém režimu k dispozici. Procentuální zastoupení ukazuje Obrázek 12.



Obrázek 12. Poruchy spánku u pacientů

4.1.6 Typ autismu

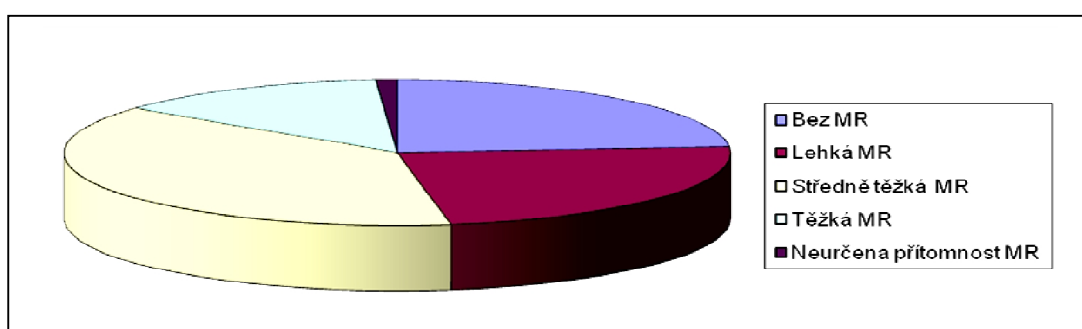
Dětský autismus byl diagnostikován u 63 pacientů (64,3 %), Aspergerův syndrom u 8 (8,1 %) a atypický autismus u 13 (13,3%). U jednoho pacienta (1,0 %) byla diagnóza uzavřena jako jiná pervazivní vývojová porucha a u 13 pacientů (13,3 %) byla diagnóza uzavřena jako non-F84. Procentuální zastoupení jednotlivých typů autismu v souboru je znázorněno na Obrázku 13.



Obrázek 13. Zastoupení jednotlivých typů autismu u pacientů

4.1.7 Úroveň mentální retardace

Komorbidní MR byla diagnostikována u 74 pacientů (75,5 %), 23 pacientů (23,5 %) mělo intelekt v mezích normy, u jednoho pacienta (1,0 %) nebyla přítomnost MR dosud určena. Tíže MR se pohybovala od horního pásma lehké MR až po MR těžkou. Zastoupení jednotlivých typů MR v souboru je zobrazeno na Obrázku 14.



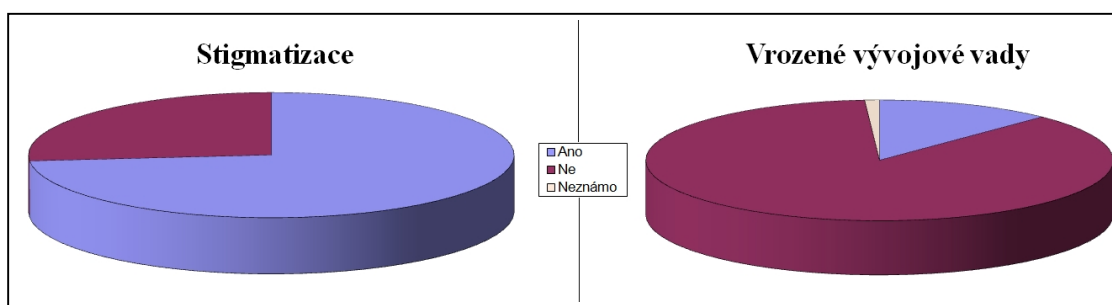
Obrázek 14. Mentální retardace u pacientů s poruchou autistického spektra

4.1.8 Přítomnost dysmorfických rysů a vrozených vývojových vad

Přítomnost dysmorfických rysů (faciální stigmatizace) byla popsána u 72 pacientů (73,5 %). Ve většině případů se jednalo o nespecifickou faciální stigmatizaci, která neupomínala na žádný z popsaných genetických syndromů. Fenotyp typický pro známý syndrom vykazoval pouze jeden pacient (1,0 %), u kterého však všechny dosavadní pokusy potvrdit tento syndrom selhaly (viz kap. 4.3.1).

Naprostá většina pacientů (85, tj. 86,7 %) neměla diagnostikovanou žádnou přidruženou vrozenou vývojovou vadu. Ty se vyskytovaly pouze u 12 pacientů (12,2 %). Jednalo se například o orofaciální rozštěp, cystickou degeneraci ledviny, hydronefrózu, transpozici velkých tepen, Fallotovu tetralogii, foramen ovale apertum, defekt septa síní, stenózu plicnice, atrézii zvukovodu, syndaktylie. U jednoho pacienta (1,0 %) nebyla přítomnost vrozených vad v době vyšetření ozřejmána.

Percentuální zastoupení přítomnosti dysmorfických rysů a přítomnosti vrozených vývojových vad ukazuje Obrázek 15.

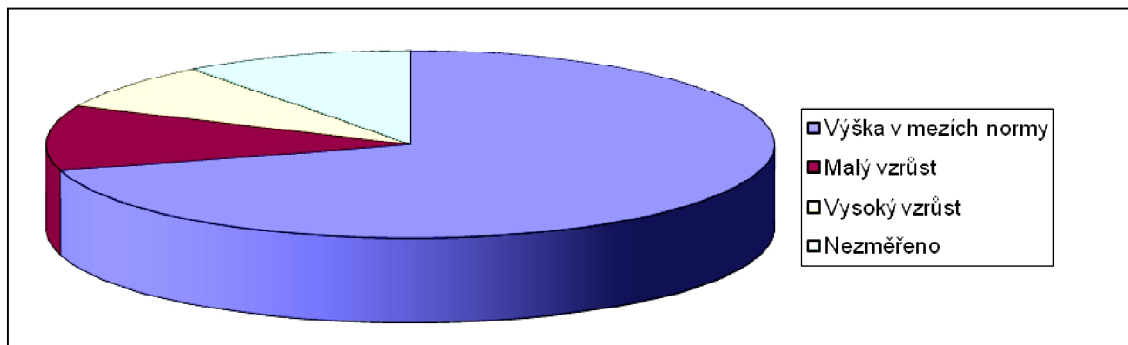


Obrázek 15. Stigmatizace a přítomnost vrozených vývojových vad

4.1.9 Poruchy růstu

4.1.9.1 Tělesná výška

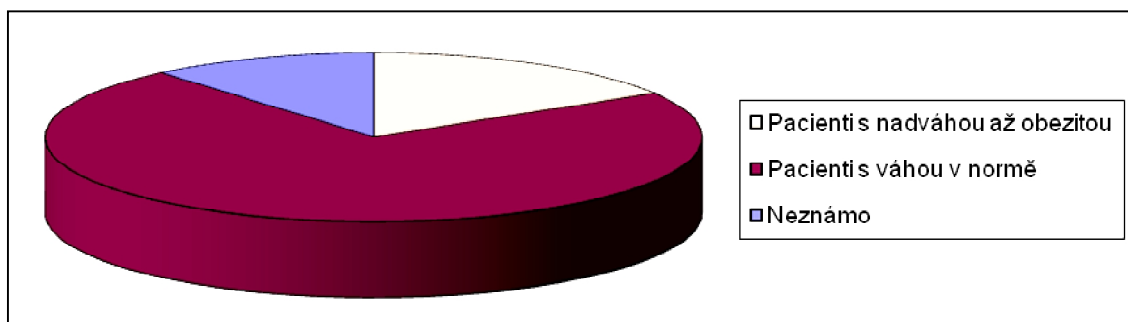
Údaje o tělesné výšce byly dostupné u 88 pacientů. Tělesná výška v mezích normy (5. – 95. percentil) byla zjištěna u 69 pacientů (78,4 %). Signifikantní porucha růstu (5. percentil a méně nebo 95. percentil a více) se vyskytovala u 19 pacientů (21,6 %). U 11 pacientů (12,5 %) byl zjištěn malý vzrůst, u 8 pacientů (9,1 %) vysoký vzrůst resp. makrosomie. Zastoupení pacientů s poruchou růstu znázorňuje Obrázek 16.



Obrázek 16. Tělesná výška pacientů s PAS

4.1.9.2 Tělesná hmotnost

Údaje o hmotnosti byly dostupné u 87 pacientů. Nadváha až obezita byla zjištěna u 16 z nich (18,4 %). U dalších 7 pacientů (8,0 %) byla hmotnost nad 95. percentilem, nicméně poměr hmotnosti k tělesné výšce byl odpovídající. Procentuální zastoupení váhy pacientů znázorňuje Obrázek 17.



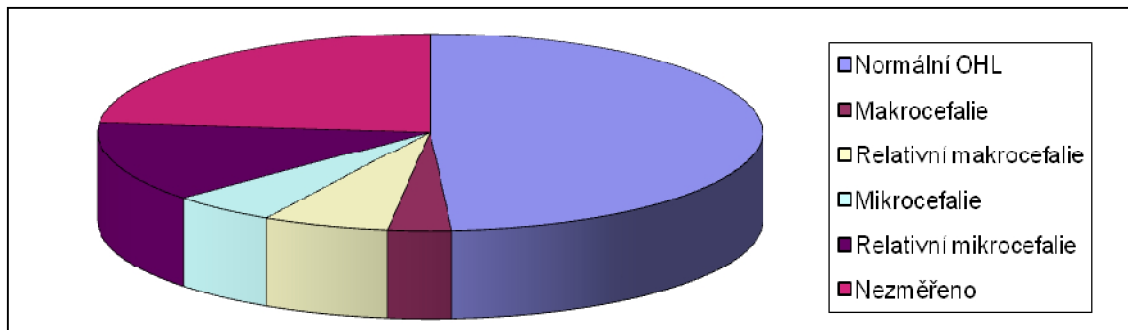
Obrázek 17. Tělesná hmotnost pacientů

4.1.9.3 Obvod hlavy

Obvod hlavy (OHL) byl změřen u 75 pacientů (76,5 %). U 43 (43,9 %) pacientů byl OHL v normě a zároveň v souladu s ostatními tělesnými proporcemi. U 5 pacientů (5,1 %) byla zjištěna izolovaná mikrocefalie (obvod hlavy pod 3. percentilem při normální tělesné výšce), u 3 pacientů (3,1 %) byla sice zjištěna mikrocefalie (u všech byl OHL pod 3. percentilem) ale zároveň malý vzrůst (rovněž pod 3. percentilem). Obvod hlavy u nich tedy odpovídal ostatním růstovým parametrům. U 13 pacientů (13,3 %) byla zjištěna mikrocefalie relativní (obvod hlavy byl sice v mezích normy, ale byl významně nižší než by odpovídalo ostatním růstovým parametrům)

Izolovaná makrocefalie byla zjištěna u 3 pacientů (3,1 %), další dva (2,0 %) pacienti měli obvod hlavy nad 97. percentilem, nicméně ostatní růstové parametry byly

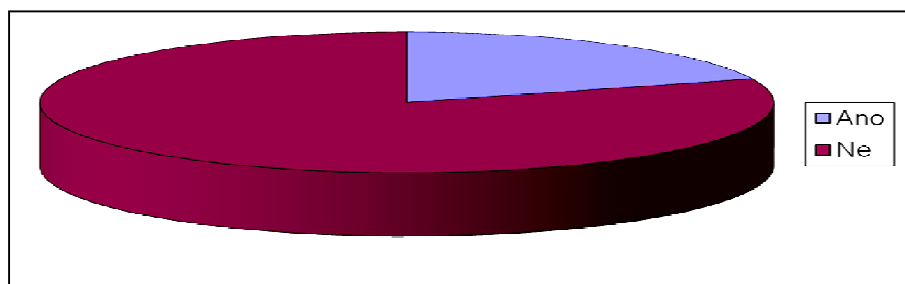
rovněž nad 97. percentilem. Relativní makrocefalie byla zjištěna u 6 pacientů (6,1 %). Procentuální zastoupení jednotlivých typů makrocefalie resp. mikrocefalie znázorňuje Obrázek 18.



Obrázek 18. Obvod hlavy

4.1.10 Epilepsie

Epilepsie byla diagnostikována u 19 pacientů (19,3 %). Ostatních 79 pacientů (80,6 %) epilepsií netrpělo (Obrázek 19). U části těchto pacientů byl popsán abnormální EEG záznam ovšem bez klinického korelátu, u řady pacientů však byl EEG záznam nehodnotitelný pro nespolečnou práci, a proto nebylo hodnocení EEG zařazeno do výsledků.

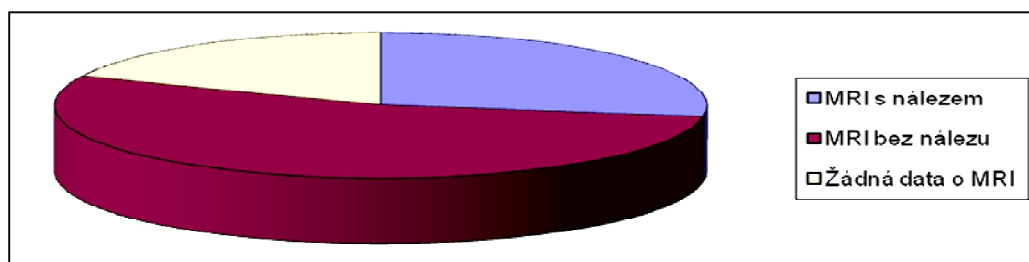


Obrázek 19. Výskyt epilepsie u pacientů

4.1.11 Výsledek MRI CNS

Výsledek magnetické rezonance mozku byl dostupný u 80 pacientů (81,6 %). U 18 pacientů (18,4 %) výsledek dostupný nebyl anebo MRI vyšetření nebylo nikdy provedeno. U 53 pacientů (66,3 %) byl výsledek MRI vyhodnocen jako fyziologický. Zcela fyziologický nálezný CNS na MRI nemělo 27 pacientů (27,5 %), v naprosté většině případů se však jednalo o změny nespecifické (opožděná myelinizace, nespecifické signálové změny v bílé hmotě, ložiska gliózy, mírná korová atrofie, přítomnost

subarachnoidálních cyst, Arnold Chiariho malformace typ 1, ageneze corpus callosum). Grafické znázornění výsledků MRI CNS ukazuje Obrázek 20.



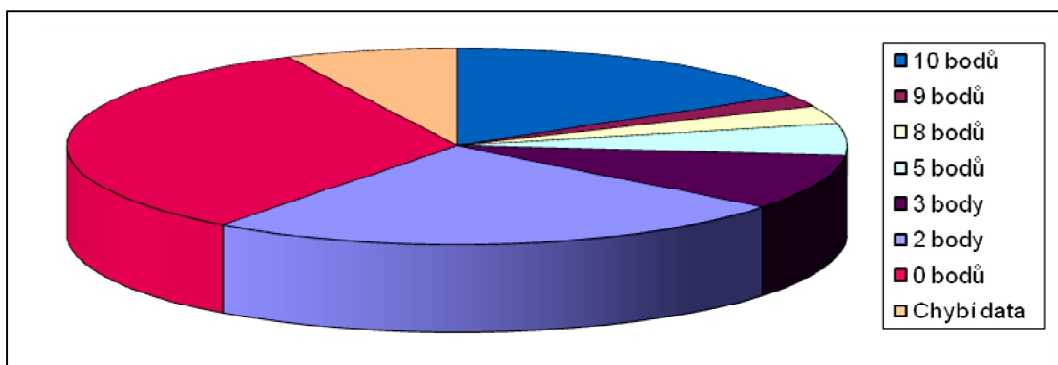
Obrázek 20. Výsledky vyšetření MRI CNS

4.1.12 Rodinná anamnéza

Dalším parametrem byla rodinná anamnéza. Pro snadnější hodnocení byly jednotlivým faktorům přiděleny body. Údaje týkající se rodinné anamnézy nebyly k dispozici u 7 pacientů (7,1 %). Ostatní pacienti spadali do jedné ze sedmi skupin závažnosti rodinné anamnézy ohodnocené 0-10 body: výskyt autismu u sourozence 10 bodů, nižší počet bodů pak různé kombinace autismu u vzdálenějšího příbuzného a přítomnosti širšího autistického fenotypu a jiných psychiatrických onemocnění v rodině. Pacienti, u kterých nebylo popsáno žádné psychiatrické onemocnění v rodině, mají 0 bodů (Tabulka 6). Zastoupení pacientů na základě bodového ohodnocení znázorňuje Obrázek 21.

Tabulka 6. Bodové ohodnocení podle rodinné anamnézy

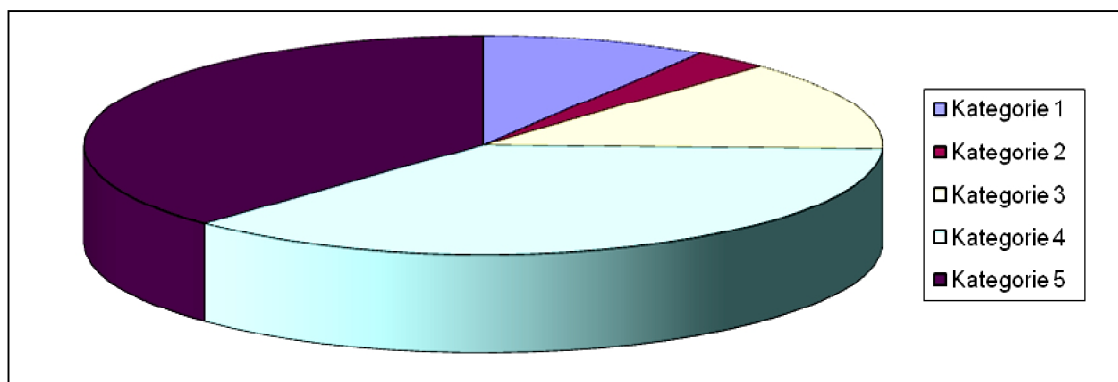
Počet bodů	Rodinná anamnéza	Počet pacientů
10	Postižený sourozenec	16
9	Autismus v rodině + psychiatrické onemocnění v rodině + širší autistický fenotyp v rodině	2
8	Autismus v rodině + psychiatrické onemocnění v rodině	3
5	Psychiatrické onemocnění v rodině + širší autistický fenotyp v rodině	5
3	Širší autistický fenotyp v rodině	9
2	Psychiatrické onemocnění v rodině	24
0	Zcela negativní rodinná anamnéza	32
-	Chybějící rodinná anamnéza	7



Obrázek 21. Rozdělení pacientů na základě bodového ohodnocení rodinné anamnézy

4.1.13 Kategorie nálezů na SNP array

Po vyšetření metodou SNP array byli pacienti rozděleni do 5 kategorií. V kategorii 1 byli pacienti, u kterých byla prokázána aberace, která má téměř jistě prokázanou spojitost s PAS (9 pacientů, tj. 9,2 %). Tři ilustrativní příklady takových nálezů jsou prezentovány v kapitole 4.3. V kategorii 2 byli pacienti, u kterých byly nalezeny aberace, které by velmi pravděpodobně mohly mít podíl na vzniku autismu (3, tj. 3,0 %). Do kategorie 3 byli zařazeni pacienti s nejasným nálezem, o jehož kauzalitě se nelze v současné době vyjádřit, ale jehož souvislost s PAS nebylo možno vyloučit (13, tj. 13,3 %). V kategorii 4 byli zařazeni pacienti, u kterých se s velkou pravděpodobností nejednalo o CNV s vlivem na rozvoj autistického fenotypu (36, tj. 36,7 %). Kategorie 5 zahrnovala jedince, u kterých bylo vyloučeno, že by nalezené aberace v genomu způsobovaly PAS, jelikož se ve všech případech jednalo pouze o běžně se vyskytující CNV ve zdravé populaci (37, tj. 37,8 %). Na Obrázku 22 je zobrazeno procentuální zastoupení jednotlivých kategorií v souboru.



Obrázek 22. Zastoupení pacientů s PAS v kategoriích podle nálezů na SNP array

4.2 Korelace vybraných klinických parametrů a porovnání pacientů dle výsledků SNP array

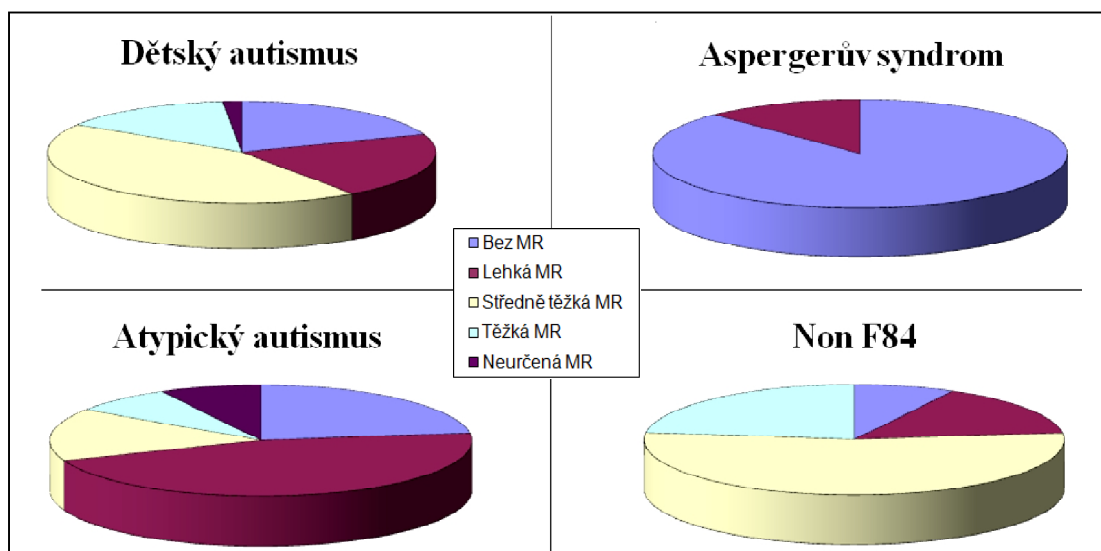
V této kapitole jsou popsány vztahy vybraných klinických parametrů, u kterých byla již v minulosti popsána závislost, a dále vzájemné porovnání klinických parametrů u jednotlivých kategorií pacientů podle výsledků SNP array.

4.2.1 Asociace jednotlivých parametrů v celém souboru

Kontingenční analýza, která byla provedena k ozřejmění, zda v souboru existuje asociace mezi jednotlivými dvojicemi sledovaných proměnných, nepoukázala na žádnou významnou asociaci mezi dvojicemi relevantními pro naše zkoumání (viz Příloha 2). Dále byla provedena shluková (clusterová) analýza celého souboru s cílem zjistit, zda v souboru neexistuje skupina pacientů s podobnou charakteristikou, která by po dalším podrobnějším zhodnocení mohla např. poukazovat na vyšší pravděpodobnost pozitivního výsledku SNP array. Žádná taková skupina pacientů však touto analýzou odhalena nebyla (viz Příloha 3, kompletní data dostupná na vyžádání).

4.2.2 Tíže MR u jednotlivých typů autismu

Z celkem 63 pacientů s dětským autismem jich 14 (22,2 %) trpělo lehkou MR, 27 (42,9 %) středně těžkou MR, 9 (14,3 %) těžkou MR, 12 (19 %) MR netrpělo vůbec a u jednoho (1,6 %) nebyla prozatím určena tíže MR. Z 8 pacientů, u nichž byl diagnostikován Aspergerův syndrom, trpěl 1 (12,5 %) lehkou MR a zbytek, tedy 7 pacientů (87,5 %), mělo intelekt v mezích normy. Ze 13 pacientů s atypickým autismem 3 netrpěli MR, u 6 (46,2 %) byla diagnostikována lehká MR, u 2 (15,4 %) středně těžká MR, u 1 (7,7 %) těžká MR a u 1 (7,7 %) pacienta nebyla stanovena tíže MR. Co se týče 13 pacientů, u kterých byla diagnóza uzavřena jako non F84, dva (15,4 %) měli lehkou MR, 7 (53,8 %) středně těžkou MR, 3 (23,1 %) těžkou MR a jeden (7,7 %) MR netrpěl. Tíži MR u jednotlivých typů autismu znázorňuje Obrázek 23.

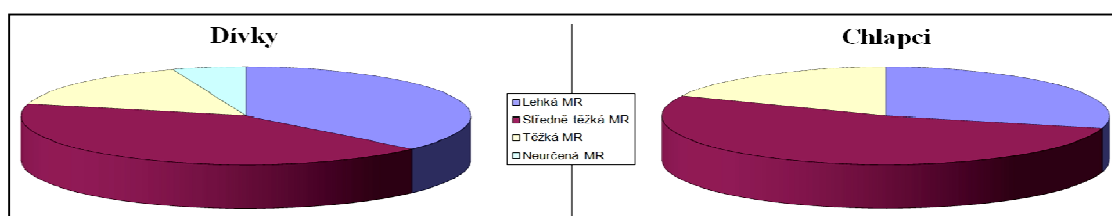


Obrázek 23. Tíže MR u jednotlivých typů autismu

K ozřejnění zda v našem souboru existuje významná korelace mezi typem autismu a tíží MR byl použit Fischerův test. Zjištěná byla hodnota $p = 0,2358$, což nesevídčí pro významnou asociaci tíže MR a typu autismu v našem souboru.

4.2.3 Vztah pohlaví a tíže mentální retardace

Z 19 dívek, u nichž byla přítomna MR, jich 7 (36,8 %) mělo lehkou MR, 8 (42,1 %) středně těžkou MR, 3 (15,8 %) těžkou MR a u jedné (5,3 %) nebyla tíže MR prozatím stanovena. Z 55 chlapců s diagnostikovanou MR se u 16 (29,1 %) vyskytovala lehká MR, u 29 (52,7 %) středně těžká MR a u 10 (18,2 %) těžká MR. Tíži MR v souvislosti s pohlavím znázorňuje Obrázek 24.

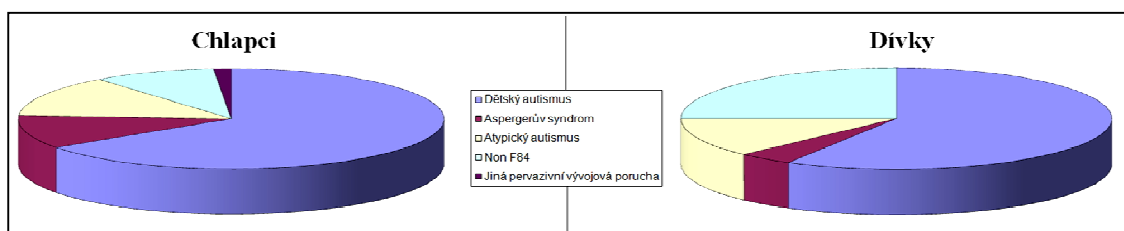


Obrázek 24. Porovnání procentuálního zastoupení tíže MR u chlapců a u dívek

K ozřejnění, zda v našem souboru existuje významná korelace mezi tíží MR a pohlavím, byl použit Fischerův test. Zjištěna byla hodnota $p = 0,793$. Ve vzorku se tedy nepodařilo prokázat významnou závislost mezi tíží MR a pohlavím.

4.2.4 *Vztah pohlaví a typu autismu*

Z 24 dívek byl u 14 (58,3 %) diagnostikován dětský autismus, u jedné (4,2 %) Aspergerův syndrom, u 3 (12,5 %) atypický autismus a u 6 (25,0 %) byla diagnóza uzavřena jako non F84. Co se týče 74 chlapců, 49 (66,2 %) mělo dětský autismus, 7 (9,5 %) Aspergerův syndrom, 10 (13,5 %) atypický autismus, jeden (1,4 %) jinou pervazivní vývojovou poruchu a u 7 (9,4 %) byla diagnóza uzavřena jako non F84. Procentuální zastoupení jednotlivých typů autismu u chlapců a dívek je na Obrázku 25.

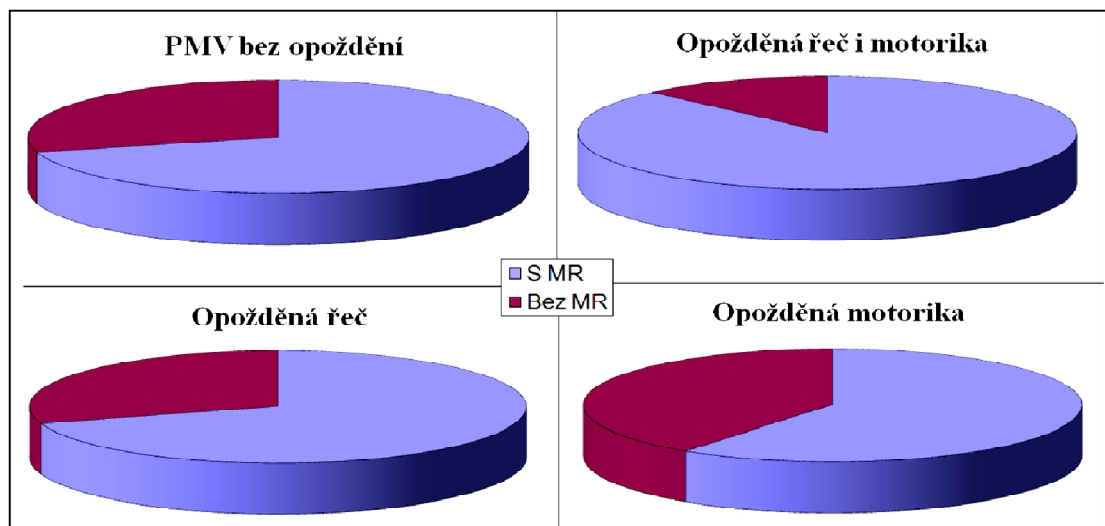


Obrázek 25. Porovnání typů autismu u chlapců a dívek

K ozřejmění, zda v našem souboru existuje významná korelace mezi typem autismu a pohlavím, byl použit Fischerův test. Zjištěna byla hodnota $p = 0,3936$. Ve vzorku se tedy nepodařilo prokázat významnou závislost mezi tíží MR a pohlavím.

4.2.5 *Vztah opoždění časného psychomotorického vývoje a MR*

Ze 17 pacientů s fyziologickým psychomotorickým vývojem byla u 12 (70,6 %) později diagnostikována MR různé tíže a pouze u 5 pacientů (29,4 %) byl zjištěn normální intelekt. Ze 40 pacientů, kteří byli opoždění v obou složkách vývoje, byl normální intelekt zaznamenán u 5 případů (12,5 %) a u 35 (87,5 %) byla později diagnostikována MR různé tíže. Z 30 pacientů, kteří měli opožděnou řeč, mělo 9 (30,0 %) normální inteligenci a MR byla diagnostikována u 21 z nich (70,0 %). Z 10 pacientů, kteří měli opožděný časný motorický vývoj, byla MR později diagnostikována u 6 (60,0 %) a 4 pacienti (40,0 %) měli normální inteligenci. Procentuální zastoupení pacientů znázorňuje Obrázek 26.

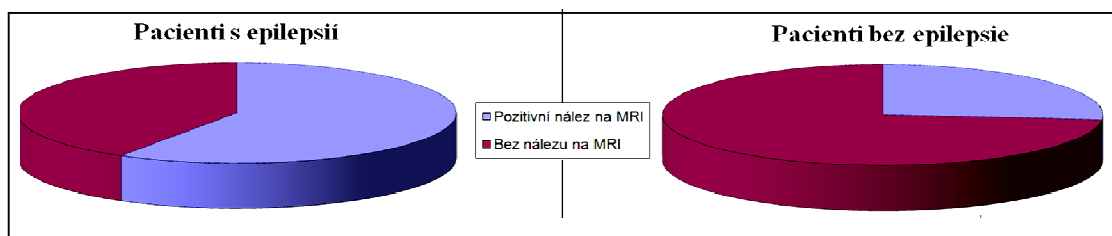


.Obrázek 26. Vztah průběhu psychomotorického vývoje a přítomnosti MR

K ozřejmění vztahu mezi MR a opožděním časného psychomotorického vývoje byl rovněž použit Fischerův test. Hodnota $p = 0,2347$ nesignifikantně nenasvědčuje pro závislost mezi časným psychomotorickým vývojem a přítomností MR.

4.2.6 Výskyt epilepsie a nález na MRI

Magnetická rezonance byla provedena u 80 pacientů (81,6 %). Z tohoto počtu mělo záchvatovité onemocnění a zároveň pozitivní nález na MRI 10 pacientů (12,5 %). Dále 7 pacientů (8,8%) trpělo epilepsií, ale nebyl u nich prokázán pozitivní nález na MRI. U 17 pacientů (21,3 %) byl pozitivní nález na MRI, ale nevyskytovalo se u nich záchvatovité onemocnění a 46 pacientů (57,5 %) nemělo pozitivní nález na MRI ani u nich nebyla popsána epilepsie (Obrázek 27).



Obrázek 27. Výskyt epilepsie a nález na MRI

K ozřejmění, zda existuje významná korelace mezi výskytem epilepsie a nálezem na MRI byl použit Fischerův test. Hodnota $p = 0,03755$ poukazuje na určitou asociaci mezi výsledkem MRI a výskytem epilepsie.

4.2.7 Asociace klinických parametrů s výsledky SNP array

Korelace klinických parametrů s nálezy na SNP array se zaměřila hlavně na rozdíly mezi skupinou A (pacienti z kategorie 1 a 2, celkem 12 pacientů), u které byla s velkou pravděpodobností objasněna genetická podstata autismu a skupinou B (pacienti z kategorie 4 a 5, celkem 73 pacientů), u kterých naopak genetická příčina autismu pomocí SNP array objasněna nebyla (Tabulka 7). U pacientů z kategorie 3 se jednalo o nejasné nebo dnes neinterpretovatelné nálezy, a proto byla tato kategorie z korelace vyřazena. Pro úplnost je v posledním sloupci uvedena i skupina C (pacienti z kategorie 3, celkem 13 pacientů).

Ke zjištění zda existuje významný rozdíl mezi skupinami A a B, resp. zda lze při nějaké kombinaci sledovaných parametrů očekávat vyšší pravděpodobnost pozitivního výsledku SNP array, byla použita logistická regresní analýza. Výsledky analýzy vedly k závěru, že žádná ze sledovaných proměnných nemá prokazatelný vliv na poměr šancí zařazení pacienta do skupiny A vůči skupině B. Výsledek analýzy je v Příloze 1. Ačkoliv zařazení některých proměnných do modelu pouze s konstantou vedlo k mírnému snížení Akaikeho kritéria (AIC), zařazení žádné z nich nevedlo ke statisticky významnému snížení deviance modelu ani na 10% hladině významnosti.

Tabulka 7. Porovnání klinických parametrů u pacientů s významnou aberací nalezenou pomocí metody SNP array s pacienty bez nálezu

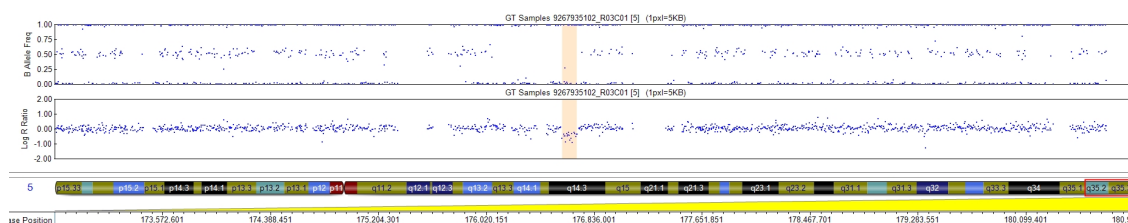
Parametr		Skupina A	Skupina B	Skupina C
Zastoupení dívek		33,3%	21,9%	30,8%
Pozitivní prenatální anamnéza		45,5%	31,9%	46,2%
Pozitivní perinatální anamnéza		63,6%	28,2%	30,8%
PMV	Opožděná pouze motorika	2500,0%	6,9%	15,4%
	Opožděná pouze řeč	16,7%	36,1%	15,4%
	Opožděná řeč i motorika	50,0%	41,7%	30,8%
Regres	Řeč	16,7%	34,7%	23,1%
	Řeč i motorika	0,0%	8,3%	0,0%
Agresivita	Heteroagresivita	27,3%	18,1%	25,0%
	Autoagresivita	9,1%	8,3%	8,3%
	Auto i heteroagresivita	0,0%	25,0%	16,7%
Poruchy spánku		0,0%	19,4%	25,0%
Typ autismu	Dětský autismus	66,7%	68,5%	38,5%
	Aspergerův syndrom	16,7%	2,7%	30,8%
	Atypický autismus	8,3%	15,1%	7,7%
	Non F84	8,3%	12,3%	23,1%
	Jiná pervazivní vývojová porucha	0,0%	1,4%	0,0%
MR	Celkem	83,3%	77,8%	61,5%
	Lehká MR	30,0%	32,1%	25,0%
	Středně těžká MR	40,0%	51,8%	50,0%
	Těžká MR	20,0%	16,1%	25,0%
	Neurčen typ MR	10,0%	0,0%	0,0%
Přítomnost dysmorfických rysů		83,3%	74,0%	69,2%
Vrozené vývojové vady		8,3%	15,3%	0,0%
Poruchy růstu	Malý vzrůst	0,3%	9,4%	15,4%
	Makrosomie	18,2%	10,9%	0,0%
	Nadváha	18,2%	17,7%	23,1%
	Absolutní mikrocefalie	12,5%	9,6%	16,7%
	Relativní mikrocefalie	25,0%	19,2%	8,3%
	Absolutní makrocefalie	12,5%	7,7%	0,0%
	Relativní makrocefalie	12,5%	5,8%	16,7%
Přítomnost epilepsie		41,7%	12,3%	38,5%
Pozitivní nález na MRI		45,5%	32,8%	25,0%
Rodinná anamnéza	Postižený sourozenec	0,0%	16,2%	41,7%
	Autismus v rodině	10,0%	7,1%	7,7%
	Psychiatrické onemocnění v rodině	30,0%	54,3%	15,4%
	Širší autistický fenotyp v rodině	10,0%	23,2%	23,1%

4.3 Kazuistiky vybraných pacientů s kauzální aberací

4.3.1 Pacient 1 (*aut012p*)

Chlapec byl doporučen ke genetickému vyšetření v 7 letech věku z důvodu opoždění psychomotorického vývoje a opoždění vývoje řeči. Klinickým vyšetřením byl diagnostikován dětský autismus a středně těžká MR. Chlapec navštěvuje speciální základní školu a je hodnocen slovně. V 5 letech prodělal pacient epileptický záchvat, od té doby je medikován a k dalšímu paroxysmu již nedošlo. V době vyšetření byl chlapec asthenického habitu, vysokého vzrůstu s makrocefalií. Fenotyp chlapce vykazoval dysmorfické rysy - hrubý, dlouhý obličej, antimongoloidní sklon očních štěrbin, prominující brada. Na základě antropometrického a endokrinologického vyšetření byla u pacienta zjištěna pubetas praecox centralis a urychlení sexuální maturace i kostního věku o 3 až 3,5 roku. Genealogická data jsou nedostatečná, matka pochází z dětského domova a údaje o otci zcela chybí. Vzhledem k fenotypu a růstovým parametrům bylo u chlapce od počátku pomýšleno na Sotosův syndrom, který je způsoben mutacemi genu *NSDI*.

U pacienta bylo provedeno vyšetření karyotypu, vyšetření syndromu fragilního X, molekulárně genetické vyšetření genu *NSDI* a CGH array (Cytochip BlueGnome, detekce mikroleceí či mikroduplikací větších než 1 Mb). Všechna provedená vyšetření byla negativní. Vzhledem k velmi suspektnímu fenotypu byl chlapec indikován k vyšetření metodou SNP array, které odhalilo 115 kb dlouhou delecí chromozomu 5 v oblasti 5q35.2-q35.3 (Obrázek 28). Jedná se o delecí postihující podstatnou část genu *NSDI* a vzhledem k fenotypu chlapce ji lze považovat za kauzální.

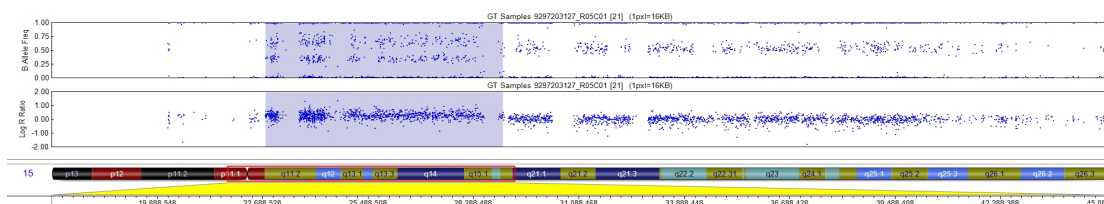


Obrázek 28. Výsledky SNP array, delecce na 5q chromozomu

4.3.2 Pacientka 2 (aut038p)

Pacientka je dítě z III. gravidity po IVF. Gravidita byla dvojčetná, bez komplikací. Porod byl proveden elektivní sekci v 39. týdnu gravidity, porodní hmotnost pacientky byla 3650 g, porodní délka 48 cm. Poporodní adaptace byla bez komplikací. Ve 3 měsících věku byla pacientka odeslána k neurologickému vyšetření pro hypotonii a equinovarovní postavení nožek. Z těchto důvodů byla doporučena rehabilitace, časný motorický vývoj byl v normě, celkový interní zdravotní stav pacientky rovněž nevybočoval z normy. Pacientka byla na Oddělení klinické genetiky poprvé vyšetřena ve věku 5 let z důvodu opoždění vývoje řeči. První jednoduchá slova pronesla až v roce a půl života a kolem 22. měsíce věku se u ní zastavil vývoj řeči úplně. Pohovorem s matkou bylo dále zjištěno, že po 2. roce života se u do té doby klidné pacientky začala rozvíjet hyperaktivita. Psychologickým vyšetřením u ní byl diagnostikován dětský autismus a MR, zatím bez bližší specifikace. Při klinickém vyšetření byla u pacientky popsána pouze nespecifická stigmatizace zahrnující podprůměrný vzrůst, výrazné oči a nos, plné tváře a níže posazené ušní boltce s mírnou dorsální rotací. U pacientky byla dále pozorována chůze po špičkách, syndaktylie 2. a 3. prstu na dolní končetině a skvrna café au lait na pravém boku. V rodině nebyl popsán žádný případ autismu či širšího autistického fenotypu, v širší rodině byl zaznamenán výskyt suicidia. Sestra - dizygotní dvojče je zdráva, její psychomotorický vývoj odpovídá věku, starší setra je rovněž zcela zdráva.

Cytogenetické vyšetření karyotypu neodhalilo žádnou abnormalitu. Byl vyloučen i syndrom fragilního X chromozomu. Vyšetřením na SNP array byla zjištěna duplikace v oblasti 15q11-q12 zahrnující kritický region PWS-AS (Obrázek 29). Duplikace se objevila u dívky *de novo*, nenese ji ani jeden z rodičů. Metodou MLPA (kit P343-C1) byl tento nálezní potvrzen. Nakonec byla u pacientky provedena metylsenzitivní MLPA, pomocí níž se zjistilo, že se duplikace nachází na maternální alele.

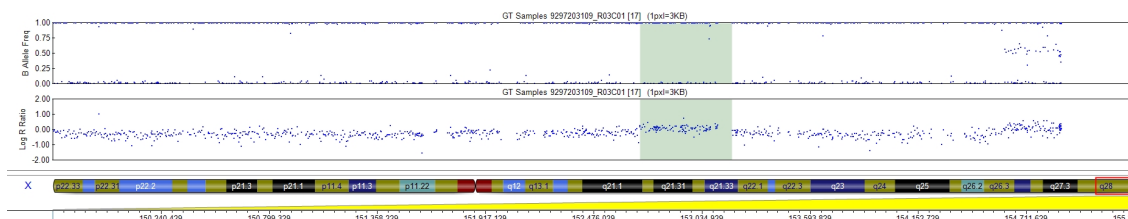


Obrázek 29. Výsledky SNP array, duplikace na 15q chromozomu

4.3.3 Pacient 3 (aut070p)

Pacient je dítě z I. gravidity, v 5 měsíci byla matka vyšetřena pro krvácení a suspektní abortus imminens, jinak probíhalo těhotenství bez komplikací. Porod byl spontánní ve 38. týdnu gravidity, porodní hmotnost 2990 g, poporodní adaptace byla bez komplikací. Pacient prodělal ve 2,5 měsících cytomegalovirovou infekci s myokarditidou, poté se začal jeho psychomotorický vývoj opožďovat. Motorický vývoj pacienta byl v mezích širší normy, vývoj řeči byl významně opožděn. Pacient dodnes nemluví, vydává pouze neartikulované zvuky. Z důvodu opoždění vývoje řeči byl pacient ve 3 letech vyšetřen psychiatrem v místě bydliště a bylo vyloveno podezření na PAS, které bylo následně potvrzeno. U pacienta byla dále diagnostikována středně těžká MR. Ve 4 letech chlapec prodělal jeden epileptický záchvat. Bylo provedeno EEG vyšetření, kde byly popsány epileptiformní grafoelementy a následně byla nasazena antiepileptická léčba. Záchvaty od té doby nebyly pozorovány. Na Oddělení klinické genetiky byl chlapec poprvé vyšetřen ve věku 8 let. U pacienta byly popsány dysmorfické rysy - široké čelo, hluboko posazené oči, epikanty, dlouhé výrazné filtrum, velké antvertované ušní boltce, náznak sandálové rýhy a přechodná čtyřprstá rýha v pravé dlani. Matka udávala nápadně vysokou nemocnost. Orgánové vady u pacienta zjištěny nebyly. Chlapec je celkově neklidný, v noci se několikrát budí. V rodinné anamnéze byl zaznamenán výskyt širšího autistického fenotypu.

Bylo indikováno vyšetření karyotypu, DNA analýza syndromu fragilního chromozomu X a vyšetření nejčastějších mikrolečnic/mikroduplikačních syndromů a subtelomerických přestaveb metodou MLPA. Žádná odchylka nebyla těmito metodami nalezena. Analýza metodou SNP array odhalila 500 kb dlouhou duplikaci na chromozomu Xq28 (Obrázek 30).



Obrázek 30. Výsledky SNP array, duplikace na Xq chromozomu

5 DISKUZE

5.1 Analýza klinických parametrů celého souboru

5.1.1 *Asociace jednotlivých parametrů v celém souboru*

Cílem statistického zhodnocení celého souboru pacientů bylo odhalení případných asociací mezi sledovanými parametry. V našem souboru nebyla žádná významná asociace nalezena. Vzhledem k tomu, že soubor čítal pouze 98 pacientů a sledovaných parametrů bylo 13 (plus podkategorie), nebyl pro jednotlivé asociace či kombinace dostatečný počet pozorování. Perspektivně by bylo možné zopakovat analýzu na rozsáhlejším souboru pacientů.

5.1.2 *Poměr pohlaví*

V našem souboru byli chlapci a dívky zastoupeni v poměru 3,5:1. V literatuře je běžně udáván poměr 3-5:1.[5] V tomto ohledu se tedy naše data shodují s publikovanými poznatky. Poměr blízký se spíše dolní hranici udávaného rozmezí lze vysvětlit tím, že výběr do souboru byl prováděn s přihlédnutím k De Vriesovým kritériím, což způsobilo vyšší zastoupení pacientů se stigmatizací a vrozenými vývojovými vadami a nižší zastoupení autistů bez těchto přidružených symptomů, u kterých je poměr pohlaví více vychýlen směrem k vyššímu zastoupení chlapců.

5.1.3 *Průběh gravidity a perinatální anamnéza*

Nefyziologický průběh gravidity byl uveden u 34,7 % pacientů, pozitivní perinatální anamnéza u 31,6 % pacientů. Významné procento (17,3 %) novorozenců s pozitivní perinatální anamnézou bylo donošených. Relativně vysoký podíl pacientů s pozitivní pre- a/nebo perinatální anamnézou v celém souboru může být dán jednak tím, že autismus není způsoben výhradně genetickými faktory a u části pacientů mohla komplikovaná poporodní adaptace či nefyziologický průběh těhotenství (zejména gestační diabetes, virové infekce) přispět k rozvoji PAS, a jednak tím, že matky pacientů s PAS mohou mít tendenci agravovat jinak běžné obtíže v pre- či perinatálním období ve snaze najít příčinu obtíží u svého dítěte (u většiny pacientů nebyl např. dostupný porodopis a data byla získávána výhradně pohovorem s matkou).

5.1.4 Psychomotorický vývoj a regres ve vývoji

Opoždění vývoje řeči je signální příznak, který často vede k vyslovení podezření na PAS. V literatuře je popisován až u 70 % pacientů s PAS [37]. V našem souboru byl opožděný vývoj řeči zaznamenán u 71,4 % případů (u 30,6 % se jednalo o izolovaný opožděný vývoj řeči, u 40,8 bylo přítomno i opoždění motorického vývoje). Tento výsledek je tedy v souladu s dosavadními poznatky.

Regres ve vývoji, zejména řeči, je v literatuře popisován u třetiny pacientů s PAS [12]. V našem souboru byl regres ve vývoji řeči zjištěn u 36 (36,7 %) pacientů. V tomto ohledu se tedy naše výsledky shodují s publikovanými daty. Regres v motorických dovednostech nebývá u pacientů s PAS tolik frekventní. V našem souboru bylo pouze 6 (6,1 %) pacientů s regresem v motorických dovednostech (všichni měli zároveň i regres ve vývoji řeči).

5.1.5 Autoagresivita/heteroagresivita

V souboru našich pacientů bylo izolované sebepoškozování popsáno u 8,0 % pacientů, heteroagresivita u 19,4 % a obojí u 20,4 %. Autoagresivita byla přítomna tedy u 28,4 %, zatímco v jiném souboru pacientů se vyskytovala u 50 % [38]. Shoda mezi těmito dvěma skupinami není dostatečná a bylo by třeba srovnání mezi více studiemi, které nejsou bohužel dohledatelné.

5.1.6 Poruchy spánku

Problémy se spánkem jsou v literatuře udávány u 44 – 83 % pacientů s PAS [39]. Naproti tomu, v našem souboru byla porucha spánku zjištěna pouze u 17 % pacientů. Poruchy spánku byly v našem souboru přičteny pouze pacientům, u nichž se jednalo o zjevný a závažný problém. Prevalence by ve skutečnosti mohla být mnohem vyšší. Velmi záleží na stanovení hranice mezi tím, co je považováno za běžné a co již ne. Tato specifikace není v odborné literatuře nikde uvedena a mohl by to být jeden z důvodů, proč je zde takový rozdíl.

5.1.7 Typ autismu

Nejčastěji byl v našem souboru popisován dětský autismus, stejně tomu je i v populaci autistů, kde tato podjednotka poruch autistického spektra též převažuje nad ostatními [8]. Aspergerův syndrom se v 90 % případů vyskytuje u chlapců a pouze v 10 % u dívek [14], rozdíl je v našem souboru pacientů tedy téměř stejně markantní (87,5 % pacientů jsou chlapci a 12,5 % dívky).

5.1.8 Tíže mentální retardace

Mentální retardace byla popsána u 67 % našich pacientů. Bývá udáváno, že se vyskytuje u 75 % pacientů s autismem [8] a data se v tomto případě tedy také velmi dobře shodují.

5.1.9 Poruchy růstu

Mezi autisty nebývají obecně popisovány abnormality ve výšce či váze, nejinak tomu bylo v našem souboru, kde byl mimo 5. - 95. percentil zanedbatelný počet pacientů. Jediným parametrem tělesných proporcí, u kterého je zřejmě asociace s autismem, je makrocefalie, která bývá popisována u 16,7 % pacientů s autismem a mikrocefalie, který bývá popisována u 15,1% [40]. V našem souboru byla absolutní makrocefalie popsána pouze u 1,2 % pacientů. Více pacientů v našem souboru (5,1 %) mělo naopak obvod hlavy menší, než by úměrně odpovídal velikosti jejich těla. Tato diskrepance může být způsobena tím, že u velkého počtu našich pacientů nebyla dostupná příslušná data.

5.1.10 Epilepsie

Výskyt epilepsie je v literatuře popisován u přibližně jedné třetiny autistů [15]. V našem souboru byla epilepsie diagnostikována u 19,3 % pacientů. Tento rozdíl může být dán tím, že epilepsie nepatřila mezi prioritní indikační kritéria k vyšetření metodou SNP array. Dále je možné, že řada pacientů sledovaných ve FNM, u kterých je epilepsie hlavním zdravotním problémem, ale kteří mají zároveň diagnostikovan PAS, nepodstoupila standardní vyšetřovací schéma pacientů s PAS, ale byli vyšetřeni dle jiného schématu, které zahrnuje i jiné metodiky a jiný typ array CGH analýzy. Věk řady

pacientů při prvním vyšetření se pohyboval v rozmezí 3 – 5 let (modus v celém souboru byl 4 roky), u některých pacientů se tedy epilepsie mohla manifestovat až v pozdějším věku a proto o ní chyběl záznam v dokumentaci.

5.1.11 Výsledek MRI CNS

Pozitivní nález na MRI byl zjištěn u 27,5 % našich pacientů. Jednalo se však převážně o změny nespecifické. V literatuře často udávaná ageneze corpus callosum [9] byla zjištěna pouze u jednoho našeho pacienta. Je otázkou do jaké míry se tyto nespecifické nálezy na MRI podílejí na vzniku PAS, a nebo zda jsou pouze projevem, který souvisí s doposud neobjasněnými, možná i genetickými příčinami PAS. Rovněž zde chybí porovnání se zdravými kontrolami, a není tedy jasné, zda se stejné změny nevyskytují i v populaci bez PAS.

5.1.12 Rodinná anamnéza

Tento parametr je důležitý z hlediska podílu genetických faktorů na rozvoji autismu. V našem souboru bylo 10 rodin s více než jedním postiženým dítětem, u dalších 4 rodin bylo u sourozence vysloveno podezření na PAS, které nebylo doposud verifikováno s ohledem na nízký věk sourozence. Postižení sourozence se tedy v našem souboru vyskytovalo v 10,2 % případů a u dalších 4,1 % rodin není postižení sourozence vyloučeno. V literatuře se udává, že pouze 2 - 3 % rodin mají více než jedno postižené dítě [2]. Tento rozdíl lze jednoduše vysvětlit cíleným výběrem pacientů na mikročipovou analýzu, kdy je větší pravděpodobnost odhalení kauzální aberace v rodinách, kde je více podobně postižených sourozenců.

5.1.13 Kategorie nálezu na SNP array

V literatuře je udáváno, že asi 10 % pacientů s PAS má na array nález aberace, která je asociována s PAS [6]. V našem souboru byla kauzální či vysoce pravděpodobně kauzální aberace nalezena u 12,2 %, což je tedy v souladu s běžně publikovanými daty.

5.2 Korelace vybraných klinických parametrů v souboru a porovnání pacientů dle výsledků SNP array

5.3 Asociace jednotlivých parametrů v celém souboru

Cílem statistického zhodnocení celého souboru pacientů bylo odhalení případných asociací mezi sledovanými parametry. V našem souboru nebyla zjištěna žádná asociace mezi dvojicemi relevantními pro naše zkoumání.

Vzhledem k tomu, že soubor čítal pouze 98 pacientů a sledovaných proměnných bylo 13 (některé další z nich byly rozloženy, ne u všech pacientů se podařilo hodnotu jednotlivých proměnných zjistit), nebyl pro některé kombinace kategorií dostatečný počet pozorování. Perspektivně by bylo možné zopakovat analýzu na rozsáhlejším souboru pacientů.

5.3.1 Tíže MR u jednotlivých typů autismu

Největší procento pacientů s těžkou MR mělo diagnózu non F84. Mohl by to být i jeden u důvodů, proč právě tito pacienti nebyli zařazeni do některého ze subtypů autismu, jelikož pacienti s těžkou MR obtížně spolupracují při vyšetření. U atypického autismu, kdy bývá u pacientů často diagnostikovaná těžká MR [13], se v našem souboru vyskytovala téměř u poloviny pouze lehká MR. Atypický autismus byl však popsán pouze u 13 pacientů a tudíž se může jednat o chybu malých čísel. Přestože by Aspergerův syndrom by neměl být diagnostikován u pacientů s IQ nižším než 70, měli jsme v našem souboru výjimku, kdy byl u jednoho pacienta diagnostikován Aspergerův syndrom a současně komorbidní lehká MR. Jednalo se nejspíše o výjimku.

5.3.2 Vztah pohlaví a tíže mentální retardace

Udává se, že dívky postižené autismem mají v průměru těžší MR než chlapci. Zhodnocení v našem souboru nepoukázalo na významný rozdíl a vliv pohlaví na tíži MR nebyl v našem souboru potvrzen. Vzhledem k tomu, že dívek bylo v celém souboru pouze 24 a jednotlivá pozorování nebyla dostatečně četná, může se jednat o chybu malých čísel.

5.3.3 *Vztah pohlaví a typu autismu*

Chlapci bývají častěji postiženi Aspergerovým syndromem, jak tomu je i v našem souboru pacientů. Dívky mívají častěji diagnostikovaný atypický autismus. V tomto případě se tedy naše data s publikovanými neshodují. Důvodem může opět být nedostatečná velikost souboru.

5.3.4 *Výskyt opoždění časného psychomotorického vývoje a přítomnosti MR*

Při porovnání výskytu MR u pacientů s opožděným psychomotorickým vývojem a bez opoždění nebyly příliš velké rozdíly. Největší procento pacientů bez MR mělo opožděný pouze motorický vývoj. Vzhledem k tomu, že izolovaný opožděný motorický vývoj byl popsán pouze u 10 pacientů, nelze ani toto považovat za významné zjištění.

5.3.5 *Výskyt epilepsie ve vztahu k nálezů na MRI*

Nálezy na MRI CNS v našem souboru zahrnovaly převážně nespecifické změny. Závislost mezi pozitivním výsledkem MRI a výskytem epilepsie byla zkoumána pro případné odhalení asociace i mezi těmito nespecifickými změnami a epilepsií. Výsledek statistické analýzy na určitou, byť nijak silnou asociaci poukazuje. V úvahu však nebyly brány další ovlivňující faktory jako pozitivní perinatální anamnéza, která může riziko vzniku epilepsie zvyšovat. Relevantní data se v literatuře nepodařilo dohledat. Zde by opět bylo perspektivně vhodné zopakovat analýzu na rozsáhlejší souboru pacientů, kde by mohly být statisticky zhodnoceny i další potenciálně ovlivňující faktory. Na našem souboru nedostatečný počet pozorování jednotlivých kombinací více parametrů takto precizní analýzu nedovoluje.

5.3.6 *Asociace klinických parametrů s výsledky SNP array*

Při porovnání klinických parametrů skupiny pacientů s pravděpodobně objasněnou genetickou podstatou autismu (skupina A) se skupinou pacientů s neobjasněnou genetickou podstatou autismu (skupina B) bylo cílem zjistit, zda neexistují nějaká kritéria, která by mohla zvyšovat pravděpodobnost, že pacient bude mít kauzální nález na SNP array. Přestože byli do souboru zařazeni všichni pacienti s PAS, kteří byli vyšetřeni metodou SNP array, nebyl soubor příliš rozsáhlý. Dále je

nutno vzít v úvahu nepoměr v počtu pacientů v jednotlivých skupinách. Skupina B (s neobjasněnou podstatou) čítala 73 pacientů, zatímco ve skupině A bylo pouze 12 pacientů (skupina B tedy čítala přibližně 6x více pacientů než skupina A). Tento nepoměr tak způsobuje, že některé kategorie byly pozorovány jen velmi zřídka a prosté procentuální (empirické) porovnání jednotlivých parametrů mezi skupinou A a B je velice nerobustní. Některé rozdíly se mohou jevit jako významné, protože jeden pacient může způsobit rozdíl několika desítek procent (například vysoký podíl pacientů s pozitivní perinatální anamnézou ve skupině A zaujme, ve skutečnosti se však jednalo pouze o 3 děti). Jedná se tedy s vysokou pravděpodobností o chybu malých čísel. Podrobnější statistická analýza nezjistila mezi oběma skupinami žádný významný rozdíl. Perspektivně by bylo vhodné zopakovat stejný postup na větším souboru pacientů. Dále je třeba vzít do úvahy, že u pacientů ve skupině A byly nalezeny různé aberace v genomu, a jejich klinické příznaky se tedy mohou výrazně lišit.

5.4 Porovnání klinických parametrů vybraných pacientů s publikovanými údaji

5.4.1 *Pacient 1 (aut012p) - Sotosův syndrom*

Sotosův syndrom, který byl klinicky diagnostikován u tohoto pacienta a nakonec potvrzen pomocí SNP array je charakterizován gigantismem v dětském období a problémy s učením nebo opožděným vývojem [26]. Tyto defekty byly u našeho chlapce popsány. Faciální stigmatizace u tohoto syndromu zahrnuje rysy jako dlouhý úzký obličej, vysoko posazenou vlasovou hranici, makrocefalii, hypertelorismus a prominující bradu. U našeho pacienta je zřejmá makrocefalie, hrubý dlouhý obličej, velké dysplastické odstávající ušní boltce a protuberantní brada, což zcela koreluje s typickým profilem. Již od počátku bylo u pacienta kvůli jeho stigmatizaci podezření právě na Sotosův syndrom, které ale dlouho zůstávalo nepotvrzeno díky negativnímu výsledku sekvenace genu *NSDI* i negativnímu výsledku vyšetření aCGH na čipu s nižším rozlišením. Pacient má též problémy s viděním a vyskytl se u něj epileptický záchvat, což bývají další příznaky tohoto syndromu. Další frekvenčně zastoupené behaviorální odchylky jako ADHD, fobie, záchvaty vzteku a vznětlivost u pacienta popsány nebyly. Pacient splňuje kritéria pro autismus, u kterého se Sotosův syndrom vyskytuje u cca 0,5 % postižených [31].

5.4.2 *Pacientka 2 (aut038p) -maternální duplikace 15q11-q12*

Pacienti s duplikací 15q mají ve většině případů (71%) specifický nález na EEG [21]. EEG vyšetření u naší pacientky bylo sice provedeno, ale nebylo vyhodnoceno pro nedostatečnou diferenciaci a organizaci záznamu. Co se týče fenotypu, bývá u pacientů s tímto syndromem popisováno dlouhé filtrum, krátký nos s bulózní špičkou a plné tváře [21]. U naší pacientky byl popsán výraznější nos, plné tváře a níže posazené ušní boltce. Pacientka na základě genů spadajících do duplikovaného úseku patří do třídy I. Rozdíly ve fenotypu u jednotlivých tříd však popsány nebyly.

5.4.3 Pacient 3 (aut070p) - duplikace genu *MECP2*

V roce 2013 bylo popsáno pouze 11 chlapců s autistickým fenotypem, u nichž byla nalezena duplikace genu *MECP2* [6]. Běžné rysy vyskytující se u pacientů s touto aberací zahrnují neonatální hypotonii, opakující se respirační infekce, těžkou MR, omezené až žádné řečové schopnosti, křečové stavy a problémy s motilitou v gastrointestinálním traktu [41]. Náš pacient dodnes nemluví, vyskytovaly se u něj časté infekce horních cest dýchacích, spadá do pásma těžké MR a bylo u něj popsáno záchvatovité onemocnění, čili příznaky korelují s popisovanými symptomy u duplikace genu *MECP2*. Co se týče faciálního fenotypu, jsou u pacientů popisovány hluboko posazené oči, široký nos, prominující brada a velké uši. Všechny tyto dysmorfické rysy byly u našeho pacienta přítomny.

6 ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na podrobnou analýzu souboru pacientů s PAS vyšetřených metodou SNP array. Cílem bylo zjistit, zda se náš soubor v některých parametrech neliší od dosud publikovaných dat, zda neexistují nějaké asociace mezi dvojicemi jednotlivých parametrů a zda existuje výrazný rozdíl mezi pacienty s kauzálním nálezem na SNP array v porovnání s pacienty bez nálezu.

Rozbor jednotlivých sledovaných parametrů ukázal, že většina zjištěných dat se shoduje s daty publikovanými v literatuře. V některých případech však byly zjištěny rozdíly oproti dosud publikovaným datům. Například významně zvýšená prevalence epilepsie u pacientů s autismem se u našeho souboru pacientů zcela nepotvrdila. Oproti incidenci v celé populaci byla sice výrazně vyšší, nedosahovala však hodnot, jaké bývají udávány u pacientů s PAS. U některých parametrů nebylo možno data porovnat, neboť se nepodařilo dohledat studie, které by se podrobným rozбором těchto parametrů zabývaly.

V další části jsem se věnovala rozboru některých pacientů s kauzálními nálezy a porovnání jejich fenotypu s ostatními publikovanými případy. Fenotypy vybraných pacientů s kauzální aberací odpovídaly téměř úplně fenotypům pacientů se stejnou aberací.

Analýzou SNP array byla kauzální nebo pravděpodobně kauzální aberace detekována u 12 pacientů. Tyto výsledky potvrzují, že DNA mikročipy jsou účinným nástrojem pro objasňování genetických příčin autismu. Vyšší diagnostickou výtěžnost lze přičíst i cílenému výběru pacientů podle De Vriesových kritérií, kdy byli vybráni jedinci, u kterých byla vyšší pravděpodobnost nálezu patologie.

Dalším cílem bylo zjistit, zda neexistují nějaké klinické projevy (i mimo De Vriesova kritéria) či jejich kombinace, které by zvyšovaly pravděpodobnost kauzálního nálezu na SNP array. Toto se na našem souboru pacientů prokázat nepodařilo. Tato práce však může sloužit jako výchozí bod pro další analýzy na rozsáhlejších souborech pacientů.

Při korelaci jednotlivých parametrů byly určité rozdíly mezi výsledky u pacientů v našem souboru a daty uváděnými v literatuře. Jednalo se zejména o porovnání tíže MR u dívek a chlapců a dále výskytu jednotlivých podtypů autismu u chlapců a dívek. Při porovnávání skupin pacientů s nalezenou kauzální aberací s pacienty bez nálezu nebyla zjištěna pomocí logistické regresní analýzy žádná spojitost s klinickými parametry.

Fenotypy vybraných pacientů s kauzální aberací odpovídaly téměř úplně fenotypům pacientů se stejnou aberací.

REFERENČNÍ SEZNAM

1. BREMER, Anna et al. Copy number variation characteristics in subpopulations of patients with autism spectrum disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* [online]. 2011, roč. 156, č. 2 [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.31142>
2. FOLSTEIN, Susan E., ROSEN-SHEIDLEY, Beth. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2001, roč. 2, č. 12, [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35103559>
3. RUTTER, Michael; GREENFELD, David; LOCKYER, Linda. A Five to Fifteen Year Follow-up Study of Infantile Psychosis II. Social and Behavioural Outcome. *The British Journal of Psychiatry* [online]. 1967, č. 113 [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://bjp.rcpsych.org/content/113/504/1183.short>
4. Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ.* 2014 Mar 28;63 Suppl 2:1-21.
5. The National Autistic Society. [online]. [cit. 2014-04-24]. Dostupné z: <http://www.autism.org.uk/about-autism/autism-and-asperger-syndrome-an-introduction/gender-and-autism/autism-why-do-more-boys-than-girls-develop-it.aspx>
6. SCHAEFER, G. Bradley et al. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genetics in Medicine* [online]. 2013, roč. 15, č. 5, [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/gim.2013.32>

7. CHATTERJEE, Archana; MOFFATT, Kody. Vaccines and Autism – An Unlikely Connection. *Autism - A Neurodevelopmental Journey from Genes to Behaviour* [online]. InTech, 2011-08-17, vol. 13, issue 4, s. 278-294 [cit. 2014-04-22]. DOI: 10.5772/17434. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/autism-a-neurodevelopmental-journey-from-genes-to-behaviour/vaccines-and-autism-an-unlikely-connection>

8. ATTWOOD, Tony. *Dětský autismus: přehled současných poznatků*. Vyd. 1. Editor Michal Hrdlička, Vladimír Komárek. Překlad Dagmar Brejlová. Praha: Portál, 2005, 206 s. Speciální pedagogika (Portál). ISBN 80-717-8813-9.

9. LAU, Yolanda C. et al. Autism Traits in Individuals with Agenesis of the Corpus Callosum: A Danish Nationwide Register-Based Cohort Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. 2013, roč. 43, č. 5, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10803-012-1653-2>

10. LANDRIGAN, Philip J et al. What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Current Opinion in Pediatrics* [online]. 2010, roč. 22, č. 2, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>

11. OŠLEJŠKOVÁ, Hana. Poruchy autistického spektra: poruchy vyvíjejícího se mozku. *Pediatric pro praxi* [online]. 2008, roč. 9, č. 2 [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/ped/2008/02/03.pdf>

12. RAPIN, Edited by D. Riva and I. *Autistic spectrum disorders*. Montrouge: J. Libbey Eurotext. ISBN 27-420-0590-0

13. KREJČÍŘOVÁ, Dana; VÁGNEROVÁ, Marie. *Psychodiagnostika dětí a dospívajících*. Vyd. 2. Praha: Portál, 2009, 791 s. ISBN 978-807-3675-660.

14. ATTWOOD, Tony. *Aspergerův syndrom: porucha sociálních vztahů a komunikace*. Vyd. 1. Praha: Portál, 2005, 203 s. Speciální pedagogika (Portál). ISBN 80-717-8979-8

15. TUCHMAN, Roberto; ALESSANDRI, Michael; CUCCARO, Michael. Autism spectrum disorders and epilepsy: Moving towards a comprehensive approach to treatment. *Brain and Development* [online]. 2010, roč. 32, č. 9, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760410001269>
16. MOURIDSEN, Svend Erik; RICH, Bente; ISAGER, Torben. Epilepsy in Individuals with a History of Asperger's Syndrome: A Danish Nationwide Register-Based Cohort Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. 2013, 43, 6, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10803-012-1675-9>
17. MANNION, Arlene et al. Epilepsy in autism spectrum disorder. *Research in Autism Spectrum Disorders* [online]. 2014, roč. 8, č. 4, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1750946713002511>
18. AMIET, Claire, et al. Epilepsy in Autism is Associated with Intellectual Disability and Gender: Evidence from a Meta-Analysis. *Biological Psychiatry* [online]. 2008, roč. 64, č. 7, [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322308005611>
19. BOLTON, P. F., I. CARCANI-RATHWELL, J. HUTTON, S. GOODE, P. HOWLIN a M. RUTTER. Epilepsy in autism: features and correlates. *The British Journal of Psychiatry* [online]. 2011-03-29, roč. 198, č. 4, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://bjp.rcpsych.org/cgi/doi/10.1192/bjp.bp.109.076877>
20. KREJČÍŘOVÁ, Dana. *Autismus VII. Diagnostika poruch autistického spektra.* [Metodická příručka IPPP.] Praha, 2003.
21. URRACA, Nora et al. The Interstitial Duplication 15q11.2-q13 Syndrome Includes Autism, Mild Facial Anomalies and a Characteristic EEG Signature. *Autism Research* [online]. 2013, roč. 6, č. 4, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/aur.1284>

22. MILES, Judith H. Autism spectrum disorders—A genetics review. *Genetics in Medicine* [online]. 2011, roč. 13, č. 4, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba>
23. KENT, Lindsey et al. Comorbidity of autistic spectrum disorders in children with Down syndrome. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 1999, 41.3: 153-158. Dostupný z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8749.1999.tb00574.x/full>
24. REDON, Richard et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* [online]. 2006, roč. 444, č. 7118, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature05329>
25. URRACA, Nora et al. The Interstitial Duplication 15q11.2-q13 Syndrome Includes Autism, Mild Facial Anomalies and a Characteristic EEG Signature. *Autism Research* [online]. 2013, roč. 6, č. 4, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/aur.1284>
26. KUMAR, R. A. et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Human Molecular Genetics* [online]. 2007, roč. 17, č. 4, [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: <http://www.hmg.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/hmg/ddm376>
27. *Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM)*. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
28. PANDEY, U.B.; PHADKE S.R.; MITTAL, B.. Molecular diagnosis and genetic counseling for fragile X mental retardation. *Neurology India* [online]. 2004, roč. 52, č. 1 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.neurologyindia.com/article.asp?issn=0028-3886;year=2004;volume=52;issue=1;spage=36;epage=42;aulast=Pandey>

29. MARTIN, Brandon S. a Molly M. HUNTSMAN. Pathological Plasticity in Fragile X Syndrome. *Neural Plasticity* [online]. 2012, [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/np/2012/275630/>
30. CLIFFORD, Sally et al. Autism Spectrum Phenotype in Males and Females with Fragile X Full Mutation and Premutation. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. 2007, roč. 37, č. 4, [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10803-006-0205-z>
31. ZAFEIRIOU, Dimitrios I.; VERVERI, Athena; VARGIAMI, Euthymia. Childhood autism and associated comorbidities. *Brain and Development* [online]. 2007, roč. 29, č. 5, [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0387760406002099>
32. KLENEROVÁ, Věra; HYNIE, Sixtus. Neurobiologie autismu. *Psychiatrie* [online]. 2008, roč. 12 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.apla-jm.cz/wpimages/other/art127/oxytocin%20autismus.pdf>
33. JAMAIN, Stéphane et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics* [online]. roč. 34, č. 1, [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng1136>
34. QIN, Jian et al. Association study of SHANK3 gene polymorphisms with autism in Chinese Han population. *BMC Medical Genetics* [online]. 2009, roč. 10, č. 1, [cit. 2014-04-22]. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/10/61>
35. GONG, Xiaohong et al. Association between the FOXP2 gene and autistic disorder in Chinese population. *American Journal of Medical Genetics* [online]. 2004, 127B, č. 1, [cit. 2014-04-25] Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.b.20162>
36. DE VRIES, Bert, et al. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *The American Journal of Human Genetics* [online], 2005, roč. 77, č. 4. [cit. 2014-04-25]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1275609/?report=reader>

37. WODKA, E. L., P. MATHY a L. KALB. Predictors of Phrase and Fluent Speech in Children With Autism and Severe Language Delay. *PEDIATRICS*[online]. 2013, roč. 131, č. 4, [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2012-2221>
38. RICHARDS, C. et al. Self-injurious behaviour in individuals with autism spectrum disorder and intellectual disability. *Journal of Intellectual Disability Research* [online]. 2012, roč. 56, č. 5, [cit. 2014-04-25]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2788.2012.01537.x>
39. GAIL WILLIAMS, P.; SEARS, Lonnie L.; ALLARD, AnnaMary. Sleep problems in children with autism. *Journal of Sleep Research* [online]. 2004, roč. 13, č. 3 [cit. 2014-04-25]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2869.2004.00405.x/full>
40. FOMBONNE, Eric, et al. Microcephaly and macrocephaly in autism. *Journal of autism and developmental disorders* [online]., 1999, roč. 29, č. 2, [cit. 2014-04-25]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1023036509476>
41. PETERS, Sarika U et al. The Behavioral Phenotype in MECP 2 Duplication Syndrome: A Comparison With Idiopathic Autism. *Autism Research* [online]. 2013, roč. 6, č. 1, [cit. 2014-04-25]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/aur.1262>

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Výsledky logistické regrese (tabulka).....	71
Příloha č. 2: Výsledky kontingenční analýzy (tabulka).....	72
Příloha č.3: Výsledky clusterovy analýzy (obrázek).....	73

PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Výsledky logistické regrese

	Df	Deviance	AIC
<none>		37.907	71.206
sex	1	34.795	70.094
prenatální.období	1	37.906	73.205
perinatální.anamnéza	1	37.226	72.525
opožděná.motorika	1	37.062	72.361
opožděná.rec	2	37.169	74.468
regres	2	34.974	72.273
motorika.rec	5	36.027	79.326
MR	1	37.610	72.909
tíže.MR	4	30.831	72.130
typ.autismu	4	35.334	76.633
epilepsie	1	35.347	70.645
poruchy.spánku	1	35.341	70.639
agresivita	2	35.678	72.977
autoagresivita	1	32.800	68.098
VVV	1	35.624	70.922
MRI.CNS	2	36.433	73.731
stigmatizace	1	37.352	72.651
postizeny	2	35.341	72.639
autismus.v.širší.rodině	1	37.512	72.811
psychiatrické.onemocnění.v.širší.rodině	1	34.503	69.802
sirsi.autisticky.fenotyp.v.sirsi.rodině	1	37.490	72.788
mały.vzrust	1	34.607	69.906
makrosomie	1	37.702	73.001
nadváha	1	35.341	70.639
mikrocefalie	2	36.808	74.107
makrocefalie	2	36.114	73.413
De.Vries.skóre	1	35.492	70.791
typ.autismu1	4	35.334	76.633

Příloha č. 3: Výsledky clusterovy analýzy

