

# Přínos moderní genetiky pro pediatrickou praxi

MUDr. Andrea Hladíková, Ph.D., RNDr. Alfons Balcar, Mgr. Dita Černá

Oddělení lékařské genetiky FN Ostrava

Ke standardním postupům při molekulárně genetických analýzách biologického materiálu se postupně i v pediatrické genetické praxi zavádí metoda sekvenování nové generace (NGS) a mikroarray techniky. Ve srovnání s klasickou „cílenou“ genetickou indikací zaměřenou na konkrétní část DNA tyto metody přinášejí možnost detekce celého lidského genomu s vysokým rozlišením, čím se rozšiřuje potenciál objevení genetické příčiny různých klinických diagnóz. Analýza chromozomů pomocí techniky mikroarray (CMA) představuje moderní diagnostickou metodu, která umožňuje odhalit genomické abnormality týkající se široké škály poruch psychomotorického a mentálního vývoje, mnohočetných kongenitálních malformací a problémů s učením a chováním u dětí. CMA zahrnuje metodu CGH array (komparativní genomická hybridizace) a SNP (single nucleotide polymorphism) array. Obě metody umožňují detekci genomických variant CNV (copy number variants, variabilita počtu kopií určitých sekvencí), jakými jsou mikrolece či mikroduplikace. Frekvence záchytu CNV je nejvyšší (20–25 %) ve skupině dětí se středně těžkým až těžkým stupněm mentální retardace v kombinaci s kongenitálními anomáliemi nebo dysmorfickými črtami. Navíc se změna CNVs nachází i u 5–10 % případů autistických dětí, opět častěji v kombinaci s nápadným fenotypem.

V diagnostickém procesu u dětí s mentální retardací a poruchami řeči, vývoje, učení a chování se tyto moderní genetické technologie postupně stávají metodou první volby, jelikož můžou přinést cenné diagnostické informace u takto postižených dětí a jejich rodin.

**Klíčová slova:** sekvenování nové generace (NGS), SNP a CGH mikroarray, pediatrie, mentální retardace, opoždění psychomotorického vývoje, vrozené vývojové vady, autismus.

## The utility of modern diagnostic genetic methods in clinical pediatrics

Next generation sequencing (NGS) and microarray analysis are being used with increasing frequency in pediatric genetic research. Compared with traditional „targeted“ genetic analyses that focus on a limited portion of the human genome, these methods produce significantly larger quantities of data, increasing the potential for wide-ranging and clinically meaningful applications. Chromosomal microarray analysis (CMA) has emerged as a new useful diagnostic method to identify genomic abnormalities associated with a wide range of developmental delay including mental retardation, congenital malformations, cognitive and language impairment as well as multiple congenital abnormalities. CMA includes array comparative genomic hybridization (CGH) and single nucleotide polymorphism (SNP) arrays. Both methods are powerful for detection of genomic copy number variants (CNV) such as microdeletions or microduplications. Genomic abnormalities occur with the highest frequency (20–25 %) in children with moderate to severe mental retardation combined with congenital malformations or dysmorphic features. However, disease-causing CNVs are found in 5–10 % children with autistic spectrum disorders and atypical phenotypes.

Nowadays CMA should replace classical karyotype examination as the first-tier test for genetic evaluation of children with developmental and behavioral delay. Potent new genetic technologies may discern important diagnostic information in this group of children and their families.

**Key words:** next generation sequencing (NGS), SNP and CGH microarray, pediatrics, developmental delay, intellectual disability, multiple congenital anomalies, autism.

Pediatr. praxi 2015; 16(2): 98–102

## Úvod

Trizomie chromozomu 21, příčina Downova syndromu, nejfrekventovanějšího onemocnění spojeného s mentální retardací, byla odhalena Lejeunem v roce 1959. V následujících desetiletích se cytogenetické a následně molekulárně cytogenetické diagnostické metody postupně vyvíjely, zpřesňovaly a rozšiřovaly možnosti identifikace genetických a epigenetických příčin fenotypových abnormalit (1).

## Současné možnosti moderní genetiky

Až do konce 80. let 20. století bylo jedinou možností záchytu chromozomových aberací

u dětí stanovení jejich karyotypu **klasickým cytogenetickým vyšetřením** (analýza metafázních chromozomů ve světelném mikroskopu). Při klasické cytogenetické analýze lze rozlišit 400–550 pruhů v haploidní sadě chromozomů a změny v rozsahu 5–10 Mb (5 až 10 miliónů párů bazí) (2). Ani metoda G-pruhování s vysokým rozlišením, umožňující detekovat změny v rozsahu 3–5 Mb, v mnohých případech nedostačuje; přestavby menšího rozsahu nelze klasickými cytogenetickými metodami rozpoznat.

V následujícím období byla velkým přínosem cytogenetické diagnostiky **metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH)**, která umožnila diagnostikovat a potvrdit specifické mikroleční syndromy jako syndrom

velo-kardio-faciální – DiGeorgeův (delece oblasti 22q11.2; vzácně též v oblasti 10q13–q14), Williams-Beurenův (delece 7q11.23), Prader-Williho (paternální delece oblasti 15q11–q13), Angelmanův (maternální delece stejné oblasti jako u syndromu Prader-Williho, tj. 15q11–q13), deleční syndrom 1p36 a mnoho dalších, které do té doby bylo možné diagnostikovat jen aspekty a dlouholetou klinickou zkušeností vyšetřujícího lékaře (3). FISH se rutinně provádí vyšetřením chromozomů v metafázi a umožňuje spolehlivě a cíleně detekovat delece menšího rozsahu (až na úroveň několika tisíc párů bazí). Duplikace menšího rozsahu lze detekovat takzvanou interfázni FISH. Od r. 1996 bylo možno provádět vyšetření subtelomerických oblastí všech chro-

mozomů metodou FISH, které pomohlo objasnit dalších 10 % do té doby nevysvětlitelných příčin vzniku mentální retardace u dětí (3, 4). Výše zmíněné postupy se využívají cíleně k diagnostice konkrétních chromozomových změn.

**Komparativní genomová hybridizace,** jedna z modifikací metody FISH, je k dispozici od roku 1992 a umožňuje stejně jako klasická cytogenetická diagnostika celogenomový screening nebalancovaných chromozomových změn typu delecí a duplikací, má ovšem řádově stejnou úroveň rozlišení.

Schopnost odhalit genetické odchylky, které jsou příčinou psychomotorické retardace (PMR) a dalších poruch vývoje u dětí, se výrazně zlepšila zejména během posledních 7 let zavedením vyšetření chromozomů metodou mikroarray analýzy (1, 3, 5, 6, 7). Pokroky v klinické a laboratorní genetice přinesla možnost „prohlédnout“ najednou celý lidský genom s vysokým rozlišením, což umožnilo do té doby technicky nemožnou celogenomovou detekci velmi malých dysbalancí chromozomového materiálu (mikroduplikace, mikrolece) v rámci jediného laboratorního vyšetření.

**Sekvenování** DNA patří již ke standardním postupům při molekulárně genetických analýzách biologického materiálu. V medicíně nachází široké uplatnění, zejména v oblasti diagnostiky dědičných chorob a nádorových onemocnění, přičemž rozvoj DNA diagnostiky byl významně podpořen zveřejněním sekvence lidského genomu v roce 2001. Rychle následovaly sekvenční analýzy dalších jedinců z různých etnik, které přinesly podstatné informace o interpersonálních rozdílech ve struktuře genomů (byly např. charakterizovány nukleotidové polymorfismy, delecce a amplifikace úseků DNA). V posledních několika letech dochází k rychlému technologickému rozvoji nových sekvenčních technologií, který umožnil vznik sekvenátorů nové generace (tzv. **next generation sequencing**). Nové technologie založené na principu masivního paralelního sekvenování umožňují zásadní navýšení kapacity sekvenátorů a výrazné snížení ceny (8). Tento významný technologický pokrok umožnil rozvoj **celogenomového sekvenování** včetně analýz individuálních lidských genomů a nastartoval rozvoj personální genomiky. První významné aplikovatelné výsledky již přineslo sekvenování genomů nádorových buněk, např. akutní myeloidní leukemie. Naopak, velkým problémem výstupu z NGS, je klinická interpretace obrovského množství získaných údajů a ačkoli v současné době ještě nejsme schopni interpretovat význam všech detekovaných variant

genomu, znamená **možnost sekvenování individuálních lidských genomů zásadní zlom v DNA diagnostice i celé medicíně**. Molekulární genetici se tak ocitají v multioborovém systému, který vyžaduje dovednosti z oblasti bioinformatiky, počítačového inženýrství, analýzy softwarových aplikací a systému internetových databází.

**Analýza chromozomů pomocí techniky mikroarray** představuje moderní molekulární cytogenetickou technologii, která je schopna zjistit variabilitu počtu kopií určitých sekvencí (copy number variants) v celém genomu. Opakovanou resekvenací částí celého genomu se zjistilo, že se lidé v sekvenci DNA navzájem liší asi v 0,1 %, tedy že DNA je v lidské populaci polymorfní. Změny v sekvenci DNA se nazývají **genetické varianty**, z nichž nejčastější jsou **jednonukleotidové polymorfismy** (SNP). V mezinárodní spolupráci pokračuje od r. 2003 identifikace milionů SNP, které jsou shromažďovány ve veřejně přístupných databázích (např. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>). Možnost typizace mnoha set tisíc SNP v jednom vzorku pomocí nových technologií (DNA čipů) usnadňuje identifikaci alel a jejich vztah k řadě komplexních chorob (9). V současnosti jsou dostupné 2 platformy analýzy chromozomů metodou mikroarray: komparativní genomická hybridizace (array CGH) a analýza jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism – SNP array) (1, 10). Termín CMA je užíván obecně pro použití jakékoliv array technologie, mezi oběma metodami však existují jisté rozdíly (tabulka 1). Při **array CGH** se pracuje se vzorkem DNA vyšetřované osoby a se vzorkem kontrolní DNA. DNA pacienta je označena jednou fluorescenční barvou (červenou nebo zelenou) a kontrolní DNA druhou barvou. Označené vzorky jsou smíchány a navázány (tzv. hybridizovány) na fragmenty DNA přichycené na sklíčku (tzv. čip). Původně byly při této metodě využívány

umělé chromozomy bakterií („bacterial artificial chromosomes“, BAC), kdy fragmenty DNA byly o velikosti více než 10 kilobází (kb). Novější CGH arraye využívají krátké oligonukleotidy o velikosti 50–70 bp. Následně jsou skla čtena laserem. Oblasti genomu, v nichž je shodný počet kopií u nemocného dítěte i v kontrolní DNA, vydávají žlutou barvu, neboť je rovnoměrně vyvážená dávka červené a zelené barvy pro každý oligonukleotid nebo klon BAC. Pokud má nemocné dítě delecii (chybění) oblasti, je patrný posun barvy ve prospěch kontrolní DNA. V případě duplikace (zdvojení) oblasti dojde k převaze barvy, kterou je označena DNA dítěte. **SNP arraye** byly původně navrženy, aby bylo možno detekovat genotypy tisíců až stovek tisíců jednonukleotidových polymorfismů („single nucleotide polymorphism“, SNP) po celém genomu v rámci tzv. celogenomových asocičních studií, kdy jsou hledány po celém genomu genetické změny, které by mohly být příčinou různých onemocnění. Pro každý detekovaný SNP jsou navrženy dva oligonukleotidy, kdy každý odpovídá jedné alele (standardní nebo variantní). Genotyp je pak určen pomocí jednobázové extenční reakce (platforma Illumina) nebo odlišnou hybridizací (vazbou) k oligonukleotidu, kdy je rozlišena dokonalá komplementarita („perfect match“) od jednonukleotidové neshody („mismatch“; platforma Affymetrix). Ukázalo se, že SNP arraye jsou schopné detekovat také změny v počtu kopií („copy number variation“, CNV), ačkoli toto nebylo původním záměrem. Příklad nálezu delecce a duplikace chromozomové oblasti detekované pomocí metody SNP array platformy Illumina je na obrázku 1.

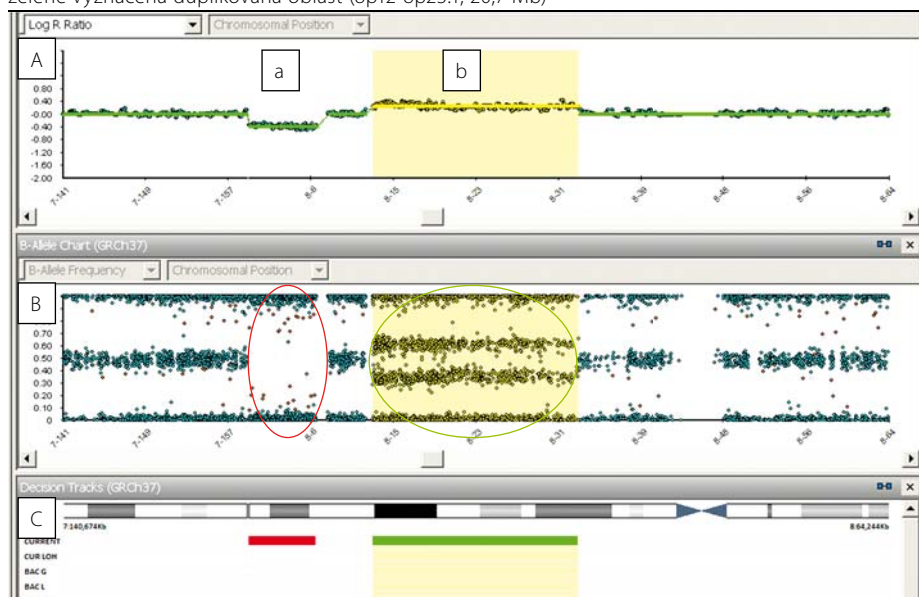
## Diskuze

Diagnostika příčin vzniku mentální retardace a jakékoliv odchylky v předpokládaném psychomotorickém vývoji dítěte je velmi

**Tabulka 1.** Srovnání obou metod mikroarray (CMA)

| Array CGH                                                                                                                                                                                                                                                             | SNP array                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Oligonukleotidy bez variantních sekvencí ~60bp                                                                                                                                                                                                                        | Dva 20-60-bp oligonukleotidy s rozdílnou sekvencí     |
| Hybridizovány dva vzorky DNA (pacient a kontrola) značené různými fluorochromy                                                                                                                                                                                        | Značena a hybridizována jen DNA pacienta              |
| Rozlišovací schopnost dána velikostí použitých oligonukleotidů                                                                                                                                                                                                        | Rozlišovací schopnost dána množstvím a distribucí SNP |
| Nelze detekovat UPD a konsanguinitu                                                                                                                                                                                                                                   | Detekce konsanguinity a většiny UPD                   |
| Detekce většiny známých klinicky významných CNVs, exon po exonu                                                                                                                                                                                                       | Detekce většiny známých klinicky významných CNVs      |
| Vysvětlivky: CMA – chromosomal microarray analysis; array CGH – array komparativní genomická hybridizace; SNP array – analýza jednonukleotidových polymorfismů; CNV – copy number variations (variabilita počtu kopií určitých sekvencí); UPD – uniparentální disomie |                                                       |

**Obrázek 1. Vyšetření SNP microarray – obraz delece a duplikace na chromozomu 8:** (A) pokles intenzity fluorescence/zvýšení intenzity fluorescence v oblastech a/b. (B) červeně vyznačena hemizygotní delece (loss) o rozsahu 6,8 Mb, chybí signály pro heterozygotní SNP genotypy AB (frekvence alely B rovna 0,50), relativní frekvence alely B rovna 0/1 – genotypy A\_/B\_, zeleně vyznačena hemizygotní duplikace (gain), frekvence alely B rovna 0/0,33/0,66/1 reprezentuje 4 možné genotypy AAA/AAB/ABB/BBB (C) částečný idiogram chromozomu 8, červeně vyznačena terminální delece (8p23.1-8pter, 6,8 Mb), zeleně vyznačena duplikovaná oblast (8p12-8p23.1, 20,7 Mb)



složitá; tito pacienti představují společnou problematiku pediatri, dětských neurologů, pedopsychiatrů, pedopsychologů, pracovníků pedagogicko-psychologických poraděn a v neposlední řadě klinických genetiků. V ambulanci lékařské genetiky se provádí genealogické šetření (vyšetření rodokmenů), klinické vyšetření dítěte a jeho rodičů (zhodnocení fenotypů). Stěžejní záležitostí je vyšetření karyotypu, vyloučení dědičných poruch metabolismu a v indikovaných případech, pokud se dítě jeví syndromologicky, pak cílená diagnostika na některý z častých genetických syndromů (např. Prader-Williho syndrom, syndrom fragilního X chromozomu, Angelmanův syndrom, Smith-Magenisův syndrom atd.). Ve většině případů však uvedená vyšetření nepřinesou očekávaný výsledek a neobjasní příčinu vzniku mentálního defektu. Nejmodernějšími genetickými metodikami, které v těchto případech usnadňují diagnózu, jsou právě možnosti vyšetření celogenomových mikroarrayů nebo sekvenování nové generace.

Metoda vyšetření celogenomových arrayů umožňuje odhalit patologické delece nebo duplikace, které jsou u postiženého dítěte **příčinou středně těžké až těžké mentální retardace, vrozených vývojových vad různých orgánových systémů a dysmorfie**. První práce zabývající se touto problematikou byly publikovány v letech 2002–2004 (11, 12), byly následovány mnoha dalšími (tabulka 2). Obecně

čím těžší je nález poškození kognitivních funkcí a čím více má dítě dalších mnohočetných vrozených vad, tím větší je pravděpodobnost patologického nálezu.

**Analýza karyotypu je schopna odhalit abnormality u 3–5 %** dětí se středně těžkou až těžkou PMR, vyjma Downova syndromu. **Kombinace vyšetření karyotypu, metody FISH zaměřené na konkrétní oblasti a vyšetření subtelomerických přestaveb** zvyšuje možnost zachytu **na 8–10 %** (4). Vyšetření **metodou arrayů** s nejvyšším stupněm rozlišení detekuje abnormality u **dalších 15–20 %** dětí s poruchami vývoje (3), hlavně pokud se vyskytují u dítěte v kombinaci **s dysmorfními rysy, vrozenými vadami a epilepsií**. Na základě výše uvedeného někteří zahraniční autoři navrhuji u dětí s poruchou vývoje a dysmorfii **indikovat v genetické diagnostice jako metodu první volby právě techniku mikroarrayů** (3, 5). I když se diagnostika neustále zlepšuje, u mnohých nálezů je problémem jejich interpretace; některé CNV je nutno interpretovat jako CNV neznámého významu, kdy nález nelze specifikovat jako jednoznačně patologický profil nebo variantu benigního charakteru (3). Obecně, ne však uniformně platí, že delece genetického materiálu mají závažnější důsledky ve fenotypu než duplikace (3). Odchytky CNVs zděděné od některého z nepostižených rodičů mohou být spojeny s inkompletní penetrancí nebo variabilní expresivitou, takže

stejný CNV profil má benigní dopad na klinický nález u rodiče, ale může být již příčinou nemoci dítěte (13). Příčinou této skutečnosti může být imprinting, tj. exprese genu závisí na tom, od jakého rodiče je zděděn. Frekvence zachytu abnormalit v genomu ve skupině dětí s odchylkami v mentálním vývoji závisí na indikačních kritériích vyšetřované skupiny; u dětí s lehčím klinickým nálezem, s méně závažným stupněm mentální retardace, bez fenotypového postižení nebo jen s potíženími s učením, autistickými rysy, izolovanou idiopatickou epilepsií nebo ADHD je stále signifikantní, ale zřetelně nižší než ve skupině dětí s těžkým fenotypovým obrazem (tabulka 2). Při vyšetření **dětí s autismem** závisí na zachytu odchylek v CNV zejména jejich další přidružené nálezy. Některé děti s autismem mají rovněž závažnou mentální retardaci a další dysmorfní rysy; v této skupině je pak zachyt kauzálních změn v CNV relativně vysoký, od 25 % do 30 % (3, 5). Z tohoto důvodu se v dalších pracích věnovaných této problematice již důsledně doporučuje rozlišovat autistický komplex jako příznak a diagnózu „čistého autismu“ bez dalších přidružených anomálií jako jsou dysmorfie nebo mikrocefalie (14). Zachyt de novo změn v profilech CNVs byl 6–7 % u chlapců v porovnání s 8–12 % u dívek, ale protože poměr pohlaví je 6,5 chlapců : 1 dívka, vzniká výrazně více de novo změn CNVs u autistických chlapců než u dívek (14, 15). Nálezy **de novo bodových mutací** nebo změn velmi malých úseků CNV jsou časté a mohou snadněji inaktivovat dosage-senzitivní geny, takže tyto změny pak nejsou detekovatelné ani moderními metodami, a takto lze vysvětlit, že u **velké většiny dětí s autismem nelze najít kauzální změnu** při vyšetření mikroarray. Pomocí array analýzy a sekvenování exomu se podařilo objasnit jen minimální množství kandidátních genů vysvětlujících genotypickou abnormalitu zodpovědnou za vznik autismu u dětí (15, 16, 17). Nejčastější změny CNVs detekované u autismu jsou **delece 16p11.2, maternální duplikace v oblasti regionu Prader-Willi/Angelman a duplikace v kritickém regionu Williams-Beurenova syndromu** (15). Přehled dosud publikovaných změn je uveden v tabulce 3. Další možnosti metodiky mikroarrayů spočívají **v možnostech diagnostiky psychiatrických poruch**. Prevalence schizofrenie u dospělých je 1,3 %, u dětí pod 13 let se jedná o raritní diagnózu (výskyt méně než 1 na 10 000 dětí) (18). Největší množství údajů o změnách v profilech CNVs pochází ze studií u dospělých psychiat-

**Tabulka 2.** Frekvence záchytu při vyšetření CMA u dětí s poruchami vývoje

| Autoři, publikace            | Země                    | Počet pacientů | Hlavní diagnostický problém     | Frekvence záchytu |
|------------------------------|-------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------|
| Visser et al. 2003           | Holandsko a USA         | 20             | MR, DF                          | 10,0 %            |
| Shaw-Smith et al. 2004       | UK, Francie             | 50             | MR (středně těžká až těžká)     | 14 %              |
| De Vries et al. 2005         | Holandsko               | 100            | MR                              | 10 %              |
| Schoumans et al. 2005        | Švédsko                 | 41             | MR (středně těžká až těžká)     | 9,8 %             |
| Tyson et al. 2005            | Kanada                  | 22             | MR, DF                          | 13,7 %            |
| Krepischi-Santos et al. 2006 | Brazílie                | 95             | MR, DF, MCA                     | 16,8 %            |
| Ming et al. 2006             | USA                     | 10             | MCA                             | 20,0 %            |
| Miyake et al. 2006           | Japonsko                | 30             | MR, MCA                         | 16,7 %            |
| Rosenberg et al. 2006        | Holandsko, Brazílie, UK | 81             | MR (středně těžká až těžká), DF | 16,0 %            |
| Fan et al. 2007              | USA                     | 100            | MR, PMR                         | 15 %              |
| Hoyer et al. 2007            | Německo                 | 104            | MR                              | 9,6 %             |
| Lu et al. 2007               | USA                     | 2 513          | MR nebo PMR, DF, MCA, ASD       | 7 %               |
| Newman et al. 2007           | UK                      | 36             | PMR, potíže s učením, DF        | 13,8 %            |
| Shaffer et al. 2007          | USA                     | 8 789          | PMR nebo MR, MCA                | 6,9 %             |
| Shen et al. 2007             | USA                     | 211            | MR nebo PMR, MCA                | 7,6 %             |
| Thureson et al. 2007         | Švédsko                 | 48             | MR, DF, MCA                     | 6,3 %             |
| Wagenstaller et al. 2007     | Německo                 | 67             | MR (lehká až středně těžká)     | 16,4 %            |
| Aston et al. 2008            | USA                     | 1 075          | MR, PMR, DF, MCA                | 5,3 %             |
| Baldwin et al. 2008          | USA                     | 211            | MR, PMR, DF, MCA, ASD           | 15,6 %            |
| Pickering et al. 2008        | USA                     | 1 176          | MR nebo PMR                     | 7,8 %             |
| Shevell et al. 2008          | Kanada                  | 94             | MR, PMR                         | 6,4 %             |
| Xiang et al. 2008            | USA                     | 50             | MR, PMR                         | 18 %              |
| Nowakowska et al. 2008       | USA                     | 91             | MR, DF                          | 11,8 %            |
| Lu et al. 2008               | USA                     | 638            | MCA                             | 17,1 %            |
| Vorsanova et al. 2013        | Rusko                   | 100            | MR, ASD                         | 20,4 %            |
| Kornberg et al. 2013         | Austrálie               | 215            | MCA, PMR, epilepsie             | 14 %              |
| Madrigal et al. 2013         | Španělsko               | 100            | PMR, MR                         | 15 %              |

Vysvětlivky: CMA – chromosomal microarray analysis; ASD – porucha autistického spektra; PMR – psychomotorická retardace; DF – dysmorfny rysy; MR – mentální retardace; MCA – mnohočetné vrozené vady (multiple congenital anomalies)

rických pacientů. V případě změn v **oblasti chromozomu 16q11.2**, kde jsou delece relativně častým nálezem u dětí s autismem, reciproční duplikace predisponují k různým typům neuropsychiatrických fenotypů, zejména schizofrenie. Frekvence záchytů kauzálních změn kolísá od 1–3 %, častěji se nachází kauzální změna u pacientů se schizofrenií, kteří navíc trpí ještě idopatickou epilepsií (5). O úloze CNVs v etiologii bipolární poruchy u dětí probíhají intenzivní vědecké výzkumné práce. **Agresivní chování** bývá součástí mnoha mikrodelečních a mikroduplikačních syndromů, jako klinický symptom bývá u závažných delecí v **oblasti 15q13.3** (13, 19).

V porovnání s množstvím studií věnovaných problematice analýzy copy number array analýzy u dětí s autismem nebo mentální retardací existuje mnohem menší množství publikací ohledně **CNVs profilů u dětí s hyperaktivitou a poruchou pozornosti (ADHD)**.

**Tabulka 3.** Přehled nálezů chromozomových abnormalit nejčastěji asociovaných s autismem

| Delece  | Duplikace                          | Bodové mutace                                                           |
|---------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 15q13.3 | Prader-Willi/Angelman region       | 15q11-13 <b>SHANK3, PTEN</b>                                            |
| 16p11.2 | Region Williams-Beurenova syndromu | 7q11.23 <i>NRX1, MECP2/Rett</i>                                         |
| 22q13.3 | Region DiGeorgeova syndromu        | 22q11.2 <i>TNTAP2, FMR1/syndrom fragilního X chromozomu</i>             |
| Další   | XXX, XXY, XYY                      | <i>IL1RAPL1, TSC1 a TSC2/tuberózní skleróza</i><br><i>NLGN4 a další</i> |

Podobně jako u autismu se předpokládá role dědičnosti u 30 % až 80 % případů (20). Tato skupina dětí má však výrazně mírnější fenotyp v porovnání s dětskými pacienty trpícími mentální retardací nebo těžkým autismem, stejně tak méně často bývá asociace s přidruženými nálezy – jinými vrozenými vývojovými vadami, epilepsií nebo jinou dysmorfii. Nálezy patogenních profilů jednotlivých CNV jako kauzálního faktoru jsou nacházeny výjimečně, a když, tak se jedná vesměs o de novo mutace. Úloha indikace array analýzy u dětí

s ADHD musí být ještě zhodnocena na základě dalších výzkumů, **pravděpodobnost záchytu je ale daleko menší** než u jiných závažnějších poruch mentálního vývoje u dětí nebo u autismu. **Dědičnost pro potíže s učením** je rovněž klinicky evidentní (12), jak pro poruchy čtení, tak pro poruchy vývoje řeči, kauzální příčinu v CNVs profilech se však zatím nepodařilo objasnit. **Idiopatická epilepsie** velmi často doprovází poruchy psychomotorického vývoje, zejména u dětí se závažnějším fenotypem. Dědičnost idiopatických epilepsií



je komplexní, univerzální gen pro vrozenou dispozici k záchvatům nebyl dosud objeven. Delece v **oblasti 15q13.3** byly popsány u ~1 % případů dětí s idiopatickou epilepsií (19), rovněž tak v dalších oblastech **6q, 8p a 15q** byly zjištěny patologické profily CNVs. Je proto rozumné indikovat vyšetření CMA u pacientů s idiopatickou epilepsií, ať již je doprovázena poruchou vývoje či nikoli. **Vrozené srdeční vady** (VCC) jsou často asociovány s dalšími vývojovými anomáliemi, dysmorfními rysy a PMR. Kromě nálezu DiGeorgeova syndromu jen u málo dětí s vrozenou srdeční vadou má zjištěnou příčinu při konvenčním vyšetření karyotypu. V r. 2013 byl u 37 dětí z celkem 55 dětí s VCC nalezen patologický CNVs profil, všech 37 dětí mělo fenotypovou abnormalitu, 30 mělo navíc další vrozenou odchylku (MCA – multiple congenital anomalies), 23 dětí mělo dysmorfní rysy, 16 mělo navíc mentální retardaci, u 13 dětí byl záchyt abnormality při MRI vyšetření mozku, u 10 dětí byla psychomotorická retardace s hypotonií, 7 z dětí mělo navíc epilepsii. Array CGH přispívá k detekci submikroskopických chromozomových abnormalit a usnadňuje diagnostiku VCC u dětí včetně plánování rodičovství (21).

### Etické a sociální aspekty vyšetření mikroarray

Asi ¼ nejtěžších poruch psychomotorického vývoje u dětí (3), zejména v kombinaci s dalšími vrozenými vývojovými vadami, je v současnosti možné detekovat **prenatálním vyšetřením** pomocí array komparativní genomické hybridizace (22). Podle některých autorů by mělo být toto vyšetření dostupné všem těhotným ženám, problémem je etické (ne každá rodina akceptuje invazivní prenatální vyšetření) a finanční hledisko (5, 22), a dále skutečnost, že u mnoha nálezů prozatím nejsme schopni určit, zda jsou spojeny s fenotypovým projevem či nikoli. Další etický a právní problém diagnostiky mikroarray u dítěte s mentální retardací spočívá v možnosti **odhalení konsanguinity** (opakující se oblasti homozygoty SNP mikroarray v případě příbuzenského vztahu otec/dcera, matka/syn, bratr/sestra, strýc/netež, poloviční bratr/sestra, bratranec/sestřenice), což potvrzuje incestní vztah bez nutnosti vyšetření krevního vzorku rodičů a bez jejich informovaného souhlasu. Naproti tomu organizace sociálně právní ochrany dětí vidí právě v možnostech genetické diagnostiky pomocí mikroarray cestu, jak prokázat sexuální zneužívání v rodině (23).

### Závěr

Pediatr zaujímá v diagnostickém procesu objasnění příčiny vzniku nemoci u dětí klíčové postavení od znalostí rodinné anamnézy, perinatálního období dítěte až po zachycení prvních příznaků dysmorfických, vývojových a růstových poruch. V rámci diagnostického procesu má spolupráce dětského lékaře s genetickým pracovištěm zásadní význam v mezioborové péči o takto postižené dítě; dětský lékař je styčná osoba, u které se shromažďují všechny důležité výsledky od všech specialistů, zná vývoj a schopnosti dítěte i jeho rodiny nejpodrobněji ze všech zúčastněných konziliářů. Rodina dítěte s vývojovou anomálií a poruchami psychomotorického či mentálního vývoje má enormní zájem na zjištění příčin vzniku nemoci u svého dítěte, které jí může přinést usmíření, zamezit obviňování a dodat klid na rozvážení, jak nejlépe dítěti pomoci se s hendikepem vyrovnat a v neposlední řadě je třeba rodiče seznámit s genetickou prognózou pro jejich vlastní reprodukci i reprodukci příbuzných v riziku (24). Moderní genetika díky vyvíjejícím se technologiím přináší stále více nových možností při řešení tohoto nesnadného úkolu.

*Tato práce vznikla za veřejné finanční podpory dotačního programu „Podpora vědy a výzkumu v Moravskoslezském kraji 2013“, projekt č. 02486 2013 RRC.*

### Literatura

1. Schaaf CP, Wisniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2011; 12: 25–51.
2. General guidelines and quality assurance for cytogenetics. ECA newsletter 2012; 29: 7–25.
3. Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, et al. Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. Genetics in Medicine. 2003; 5: 28–34.
4. Seemanová E, Novotná D, Vlčková Z. Subtelomerní stavba příčinou mikrocefalie, faciální dysmorfie a mentální retardace. Čs Ped 2007; 62(1): 48–51.
5. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. American Journal of Human Genetics. 2010; 86: 749–764.
6. Lundvall M, Rajaei S, Erlandson A, et al. Aetiology of severe mental retardation and further genetic analysis by high-resolution microarray in population-based series of 6-to 17-year-old children. Acta Paediatr 2012; 101: 8591.
7. Beaudet AL. The Utility of Chromosomal Microarray Analysis in Developmental and Behavioral Pediatrics. Child Dev 2013; 84(1): 121–132.
8. Pospíšilová Š, Tichý B, Mayer J. Sekvenování lidského genomu – technologie nové generace anebo budeme rutinně sekvenovat lidské genomy? Čas Lék Čes 2009; 148: 296–302.
9. Brdička R. Genetika v klinické praxi. GHC Praha: Galén 2014: 126s.

10. Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. Human Molecular Genetics. 2010; 19: 1263–1275.
11. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH, Janssen I, Merckx G, van Cleef B, et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. American Journal of Human Genetics. 2002; 70: 1269–1276.
12. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. J Med Gen 2004; 41: 241–248.
13. Ben-Shachar S, Lanpher B, German JR, Potocki L, Sreenath Nagamani S, Franco LM, et al. Microdeletion 15q13.3: A locus with incomplete penetrance for autism, mental retardation, and psychiatric disorders. J Med Gen 2009; 46: 382–388.
14. Miles JH. Autism spectrum disorders – a genetics review. Genetics in Medicine. 2011; 13: 278–294.
15. Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, et al. Multiple recurrent de novo copy number variations (CNVs), including duplications of the 7q11.23 Williams-Beuren syndrome region, are strongly associated with autism. Neuron. 2011; 70: 863–885.
16. Hultman CM, Sandin S, Levine SZ, Lichtenstein P, Reichenberg A. Advancing paternal age and risk of autism: New evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. Molecular Psychiatry 2010; 121: 2010.
17. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. Brain Research. 2011; 1380: 42–77.
18. Remschmidt H, Theisen FM. Schizophrenia and related disorders in children and adolescents. Journal of Neural Transmission. Supplementa. 2005; 69: 121–141.
19. Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ, et al. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. Nature Genetics. 2009; 41: 160–162.
20. Boomsma DI, Saviouk V, Hottenga JJ, Distel MA, de Moor MH, Vink JM, et al. Genetic epidemiology of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD index) in adults. PLoS ONE. 2010; 5: e10621.
21. Symrou A, Tzetzis M, Fryssira H, et al. Array comparative genomic hybridization as a clinical diagnostic tool in syndromic and nonsyndromic congenital heart disease. Pediatr res 2013; 73(6): 772–776.
22. Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ, et al. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. Prenatal Diagnosis. 2009; 29: 29–39.
23. Tarini BA, Konczal LL, Goldenberg AJ, et al. The perils of SNP microarray testing: uncovering unexpected consanguinity. Pediatr Neurol 2013; 49 1): 50–53.
24. Seemanová E. Dysmorfické příznaky – klíč k diagnostice genetických poruch. Pediatr praxi 2008; 9(5): 305–308.

Článek doručen redakci: 26. 11. 2014

Článek přijat k publikaci: 29. 1. 2015

**MUDr. Andrea Hladíková, Ph.D.**  
Oddělení lékařské genetiky FN Ostrava  
17. listopadu 1 790, 708 52 Ostrava  
andrea.hladikova@fno.cz

