

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Preventivní medicína

Studijní obor: Preventivní medicína



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

**MUDr. Bohdan Kousal**

Epidemiologie a preventivní opatření  
u dědičných dystrofií sítnice v České republice

*Epidemiology and preventive measures  
in inherited retinal dystrophies in the Czech Republic*

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Petra Lišková, M.D., Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

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

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

V Praze 25. 9. 2020

**Identifikační záznam:**

KOUSAL, Bohdan. *Epidemiologie a preventivní opatření u dědičných dystrofií sítnice v České republice. [Epidemiology and preventive measures in inherited retinal dystrophies in the Czech Republic]*. Praha, 2020. 69 stran, 9 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu. Školitel: Lišková, Petra.

## **Abstrakt**

**Úvod:** Dědičná onemocnění sítnice jsou jednou z nejčastějších příčin neléčitelné slepoty u dětí a mladších dospělých. V České republice nebyla tato onemocnění dosud předmětem systematického výzkumu. Cílem této práce bylo identifikovat, klinicky charakterizovat a molekulárně geneticky analyzovat pacienty s monogenně podmíněnými dědičnými chorobami sítnice a následně implementovat do klinické praxe preventivní a léčebná opatření.

**Materiál a metody:** U pacientů s různými geneticky podmíněnými chorobami sítnice a jejich rodinných příslušníků jsme provedli komplexní klinické vyšetření, genealogický rozbor a molekulárně genetickou analýzu. Detailní oční vyšetření zahrnovalo optickou koherenční tomografii se spektrální doménou a fotodokumentaci včetně autofluorescence fundu. DNA byla izolována ze vzorků venózní krve, popř. buněk bukalní sliznice. Příčinné varianty byly hledány pomocí Sangerova a masivně paralelního sekvenování a jejich patogenita prokazována v kontextu dříve publikovaných poznatků, pomocí bioinformatické analýzy a sledováním segregace u rodinných příslušníků.

**Výsledky:** Ve formě publikačních výstupů bylo charakterizováno 103 jedinců ze 76 českých rodin se známkami monogenně dědičných dystrofií sítnice. Konkrétně jsme popsali klinické a molekulárně genetické nálezy u pacientů s retinitis pigmentosa, Usherovým syndromem, Danonovou chorobou, Stargardtovou chorobou, závažnými dystrofiemi sítnice s časnou manifestací, dědičnou poruchou glykosylace typu Iq a achromatopsií. Nejvýznamnější byl popis očních nálezů u dosud největší publikované kohorty pacientů trpících Danonovou chorobou.

**Závěr:** Náš výzkum pomohl objasnit faktory podílející se na etiopatogenezi různých dystrofií sítnice a upozornil na nutnost jejich detailní korelace genotypu s fenotypem, což je důležité pro časnou diagnostiku, vypracování efektivního screeningového postupu, zlepšení klinického poradenství a péče, zavedení účinných preventivních opatření a výběr pacientů pro cílené terapie. Projekt zvýšil informovanost o geneticky podmíněných onemocněních sítnice jak mezi odborníky, tak i laickou veřejností.

**Klíčová slova:** dědičná onemocnění sítnice, oftalmologie, prevence, genová léčba

## **Abstract**

**Introduction:** Inherited retinal diseases (IRDs) are one of the most common causes of incurable blindness in children and young adults. In the Czech Republic, prior to the start of our work, these disorders had not been the subject of a systematic research. The aim of the study was to identify, clinically characterize and molecular genetically analyse Czech patients with monogenic IRDs and based on the knowledge gained subsequently implement preventive and therapeutic measures to clinical practice.

**Material and methods:** We have performed a comprehensive clinical examination, genealogical analysis and molecular genetic investigation in patients with IRDs and their family members. Detailed ocular examination included spectral domain optical coherence tomography, high-resolution fundus photography and autofluorescence imaging. DNA was isolated from venous blood samples or buccal cells. Causal variants were searched for using Sanger and massively parallel sequencing, and their pathogenicity was evaluated in the context of previously published data, bioinformatical analysis and segregation in available family members.

**Results:** In total, 103 individuals from 76 Czech families diagnosed with IRDs were characterized and their data published. Specifically, we have described clinical and molecular genetic findings in patients with retinitis pigmentosa, Usher syndrome, Danon disease, Stargardt disease, early-onset severe retinal dystrophies, congenital disorder of glycosylation type Iq, and achromatopsia. The most significant was characterization of ocular findings in the largest single-center cohort of patients suffering from Danon disease.

**Conclusions:** Our research helped to elucidate factors involved in the etiopathogenesis of various retinal dystrophies and highlighted the need for detailed genotype-phenotype correlations, which is important for early diagnosis, development of effective screening procedure, improvement of clinical counseling and care, implementation of preventive measures and selection of patients for targeted therapies. The project has raised awareness of IRDs among both professionals and the general public.

**Key words:** inherited retinal diseases, ophthalmology, preventive measures, gene therapy

## Poděkování

Chci na tomto místě poděkovat školitelce doc. MUDr. Petře Liškové, M.D., Ph.D. za její podporu, cenné rady, spolupráci a trpělivost při vedení mé disertační práce (*There are no problems, only solutions*), spolupracovníkům Ing. Ľubici Ďud'ákové, Ph.D. a Ing. Martinu Meliškovi za skvělou práci a proaktivní přístup (*The future belongs to people who see possibilities before they become obvious*), kolegům z Oční kliniky a Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze za spolupráci a podporu, stejně tak kolegům českým oftalmologům, se kterými jsme se v posledních letech potkávali, vzájemně se inspirovali, přijímali připomínky a komentáře a realizovali je k vzájemnému zdokonalování (*Pleasure in the job puts perfection in the work*) a nejvíce své rodině – ženě, dětem, rodičům, přátelům – za podporu, trpělivost, psychickou vzpruhu a smysl života. Vážím si každého dne, kdy s vámi mohu být (*Where there is love, there is life*).

Práce vznikla za institucionální podpory Univerzity Karlovy programy PROGRES Q25/LF1 a PROGRES Q26/LF1, Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK) projektem 400/54/227015, Specifického vysokoškolského výzkumu Univerzity Karlovy (SVV UK) projekty 260148/2015, 260256/2016, 260367/2017 a 260516, Agenturou pro zdravotnický výzkum České republiky (AZV ČR) projektem NU20-07-00182 a European Joint Programme on Rare Diseases Joint Transnational Call (EJP RD JTC 2019) projektem Solve-RET.

## OBSAH

<b>Abstrakt</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	9
<b>1. ÚVOD</b> .....	11
<b>2. SPEKTRUM DĚDIČNÝCH ONEMOCNĚNÍ SÍTNICE</b> .....	13
2.1 <i>Retinitis pigmentosa</i> .....	14
2.1.1 <i>Nesyndromová retinitis pigmentosa</i> .....	15
2.1.2 <i>Syndromová retinitis pigmentosa</i> .....	15
2.2 <i>Bestova choroba</i> .....	17
2.3 <i>Stargardtova choroba</i> .....	18
2.4 <i>Choroideremie</i> .....	19
2.5 <i>X-vázaná juvenilní retinoschíza</i> .....	20
2.6 <i>Závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací</i> .....	22
2.7 <i>Achromatopsie</i> .....	23
2.8 <i>Genetické testování onemocnění sítnice</i> .....	24
<b>3. HLAVNÍ CÍLE PRÁCE</b> .....	26
<b>4. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	27
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	33
5.1 <i>Nesyndromová retinitis pigmentosa</i> .....	35
5.2 <i>Usherův syndrom</i> .....	37
5.3 <i>Danonova choroba</i> .....	38
5.4 <i>Stargardtova choroba</i> .....	41
5.5 <i>Závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací</i> .....	43
5.6 <i>Achromatopsie</i> .....	45
<b>6. DISKUZE</b> .....	48
6.1 <i>Prohloubení poznatků o fenotypu a korelace s genotypem</i> .....	48
6.2 <i>Přínosy molekulárně genetického vyšetření onemocnění sítnice z preventivního hlediska</i> .....	51
6.2.1 <i>Časná diagnóza</i> .....	52
6.2.2 <i>Upřesnění přenosu onemocnění v rodině a jeho ovlivnění</i> .....	52
6.2.3 <i>Cílené terapie</i> .....	53
6.2.4 <i>Společenské uplatnění</i> .....	55

<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>57</b>
<b>PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE.....</b>	<b>66</b>
<b>OSTATNÍ PUBLIKACE V IMPAKTOVANÝCH A NEIMPAKTOVANÝCH RECENZOVANÝCH ČASOPISECH.....</b>	<b>67</b>
<b>KNIŽNÍ PUBLIKACE.....</b>	<b>68</b>
<b>Přílohy.....</b>	<b>70</b>

**Příloha 1. Klinické nálezy u členů české rodiny s retinitis pigmentosa podmíněnou mutací v ORF15 genu *RPGR***

**Příloha 2. Severe retinal degeneration in women with a c.2543del mutation in ORF15 of the *RPGR* gene**

**Příloha 3. SD-OCT imaging as a valuable tool to support molecular genetic diagnostics of Usher syndrome type 1**

**Příloha 4. Pigmentary retinopathy can indicate the presence of pathogenic *LAMP2* variants even in somatic mosaic carriers with no additional signs of Danon disease**

**Příloha 5. Molekulárně genetická příčina a klinické nálezy u dvou probandů se Stargardtovou chorobou**

**Příloha 6. Resolving the dark matter of *ABCA4* for 1054 Stargardt disease probands through integrated genomics and transcriptomics**

**Příloha 7. Phenotypic features of *CRB1*-associated early-onset severe retinal dystrophy and the different molecular approaches to identifying the disease causing variants**

**Příloha 8. Review of *SRD5A3* disease-causing sequence variants and ocular findings in steroid 5 $\alpha$ -reductase type 3 congenital disorder of glycosylation, and a detailed new case**

**Příloha 9. Molekulárně genetická příčina achromatopsie u dvou pacientů českého původu**



## Seznam použitých zkratk

<i>ABCA4</i>	ATP binding cassette subfamily A member 4
ACHM	Achromatopsia (achromatopsie)
<i>BEST1</i>	Bestrophin 1
CDG	Congenital disorder of glycosylation
<i>CEP290</i>	Centrosomal protein 290
CNG	Cyclic nucleotide-gated ion (iontové kanály aktivované cyklickými nukleotidy)
<i>CNGA3</i>	Cyclic nucleotide gated channel alpha 3
<i>CNGB3</i>	Cyclic nucleotide gated channel beta 3
<i>CRB1</i>	Crumbs 1, cell polarity complex component
CRD	Cone rod dystrophy (dystrofie čípků a tyčinek)
CSNB	Congenital stationary blindness (kongenitální stacionární noční slepota)
cyl	Cylindr
D	Dioptrie
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EMA	European Medicines Agency (Evropská agentura pro léčivé přípravky)
EOSRD	Early-onset severe retinal dystrophies (závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací)
ERG	Elektroretinografie
ERN-EYE	European Reference Network dedicated to Rare Eye Diseases (Evropská referenční síť pro vzácná onemocnění oka)
ETDRS	Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
gnomAD	Genome Aggregation Database
HSF	Human Splicing Finder
<i>CHM</i>	CHM Rab escort protein 1
<i>IFT140</i>	Intraflagellar transport 140
<i>IQCB1</i>	IQ motif containing B1

LCA	Leber congenital amaurosis (Leberova kongenitální amauroza)
LCHAD	Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza mastných kyselin s dlouhým řetězcem)
MD	Macular dystrophy (makulární dystrofie)
<i>MERTK</i>	MER proto-oncogene, tyrosine kinase
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
<i>MYO7A</i>	Myosin VIIA
NCLG	Národní centrum lékařské genomiky
NKZO	Nejlepší korigovaná zraková ostrost
OCT	Optical coherence tomography (optická koherenční tomografie)
OCT-A	OCT angiografie
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
<i>PDE6B</i>	Phosphodiesterase 6B
PolyPhen2	Polymorphism Phenotyping v2
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer
<i>RLBP1</i>	Retinaldehyde binding protein 1
RNA	Ribonukleová kyselina
RNFL	Retinal nerve fiber layer (vrstva nervových vláken sítnice)
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	Retinální pigmentový epitel
<i>RPE65</i>	Retinoid isomerohydrolase RPE65
<i>RS1</i>	Retinoschisin 1
SD-OCT	Spectral domain optical coherence tomography (optická koherenční tomografie se spektrální doménou)
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
<i>SRD5A3</i>	Steroid 5 $\alpha$ -reductase type 3
SRD5A3-CDG	Steroid 5 $\alpha$ -reductase type 3 congenital disorder of glycosylation (kongenitální porucha glykosylace zapříčiněná mutací v genu pro steroidní 5 $\alpha$ -reduktázu typu 3)
<i>USH2A</i>	Usherin
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

## 1. ÚVOD

Vzácná onemocnění jsou v rámci Evropské unie definována jako choroby postihující méně než 5 pacientů na 10 000 obyvatel. Počet známých očních chorob oka s genetickou komponentou v etiologii je nesrovnatelný s jinými orgány. Odhaduje se, že existuje přibližně 900 vzácných onemocnění oka, přičemž kolem 80 % z nich vzniká na genetickém podkladě (Richter T. et al, 2015). Jejich velká klinická a genetická rozmanitost znamená obrovskou zátěž pro pacienty, jejich rodiny a společnost.

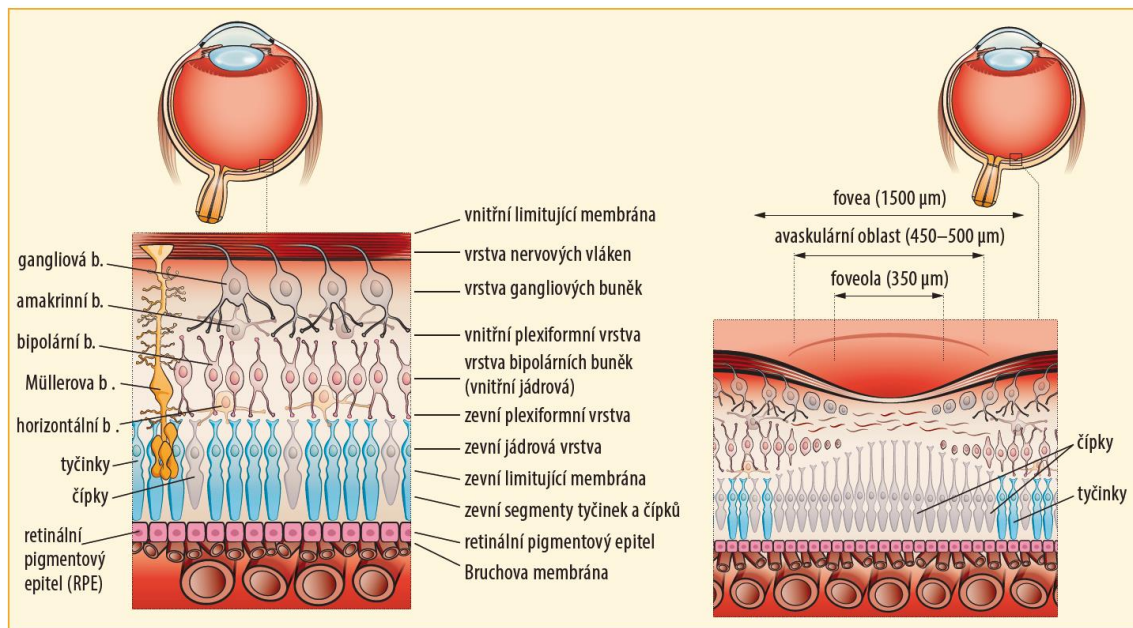
Genetické testování očních chorob se během posledních let velmi změnilo. Dříve bylo dostupné pouze na výzkumné bázi pro dosti omezené množství pacientů, zatímco v současné době je mnoha akreditovanými laboratořemi nabízena řada testů. Přesný počet pacientů se vzácnými genetickými chorobami oka, jejich diagnózy ani molekulárně genetické příčiny nejsou v České republice přesně známy, neboť tato onemocnění začala být předmětem systematického sledování až v nedávné době.

Možnosti terapie této skupiny chorob jsou v současné době v běžné klinické praxi většinou omezeny na léčbu vybraných doprovodných příznaků. Díky pokrokům na poli molekulární biologie ale započal v posledních dvou desetiletích i vývoj cílených terapií. Testované terapie jsou založené na znalosti genetické příčiny onemocnění a představují zcela nový přístup. V současné době nejdále pokročily klinické zkoušky testující terapie vzácných onemocnění sítnice, které patří mezi nejčastější příčiny slepoty u mladších jedinců (Ziccardi L. et al., 2019). První a v současné době jedinou farmakologickou léčbou povolenou pro jakékoliv geneticky podmíněné onemocnění sítnice je voretigen neparvovek určený k léčbě pacientů s potvrzenými bialelickými mutacemi v genu *RPE65* (retinoid isomerohydrolase RPE65) (Ciulla TA. et al., 2020).

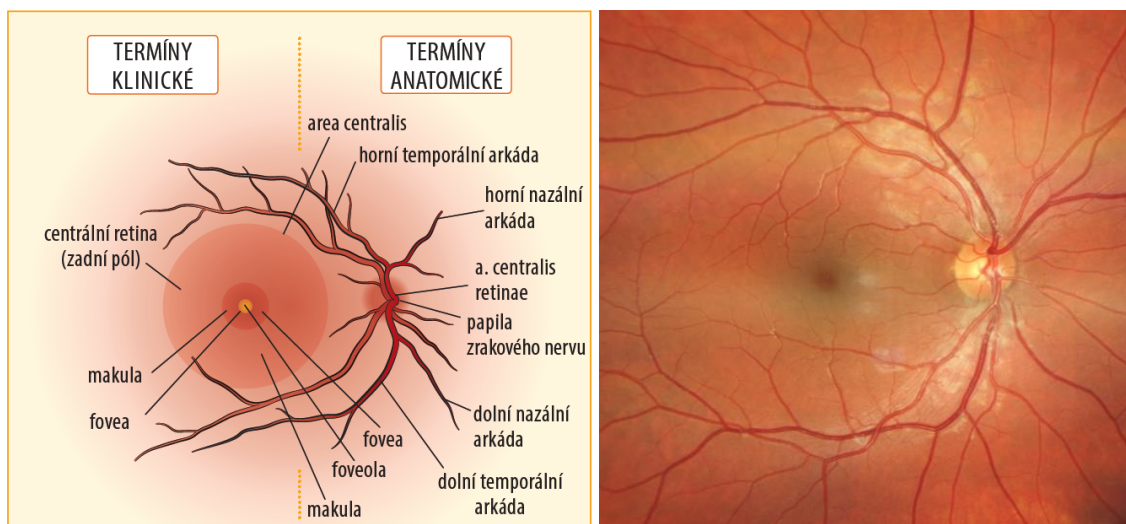
Oko je párový smyslový orgán sloužící k přijímání světelných podnětů a jejich transformaci na nervové impulsy, které jsou dále vedeny do mozku. Paprsky světla vstupují do oka a jsou lámány rohovkou, prostupují přední komorou oční a skrz zornici do čočky, kde jsou dále zaostřeny a po průchodu sklivcem dopadají na sítnici.

Sítnice je uložena uvnitř oční koule a je zodpovědná za vnímání světla. Na sítnici rozlišujeme vrstvu vnitřní lokalizovanou mezi vnitřní a zevní limitující membránou a vrstvu vnější zahrnující zevní části fotoreceptorů a vrstvy přiléhající k cévnatce. Histologicky lze v sítnici popsat deset vrstev (Obr. 1), zevně je pak uložena cévnatka. Fotoreceptory převádějí světelné signály na signály elektrochemické, které pak putují ke zpracování do mozku. Fotoreceptory dělíme na tyčinky a čípky. Tyčinky nevnímají

barvy, ale jsou velmi citlivé na světlo. Tři druhy čípků mají za úkol vnímat tři základní barvy a podílejí se na vzniku ostrého barevného obrazu. Uprostřed sítnice je umístěna makula, žlutá skvrna, která je místem nejostřejšího vidění (Obr. 1, 2). V centru jsou uloženy čípky, jejich hustota pak do periferie výrazně klesá. Naopak nejvyšší hustota tyčinek je 5–6 mm od centra sítnice a do periferie pak jejich hustota klesá jen pozvolna.



**Obr. 1.** Vlevo jednotlivé vrstvy sítnice a vpravo detailní struktura makuly (b. – buňka). Převzato z Heissigerová J. et al. (2018).



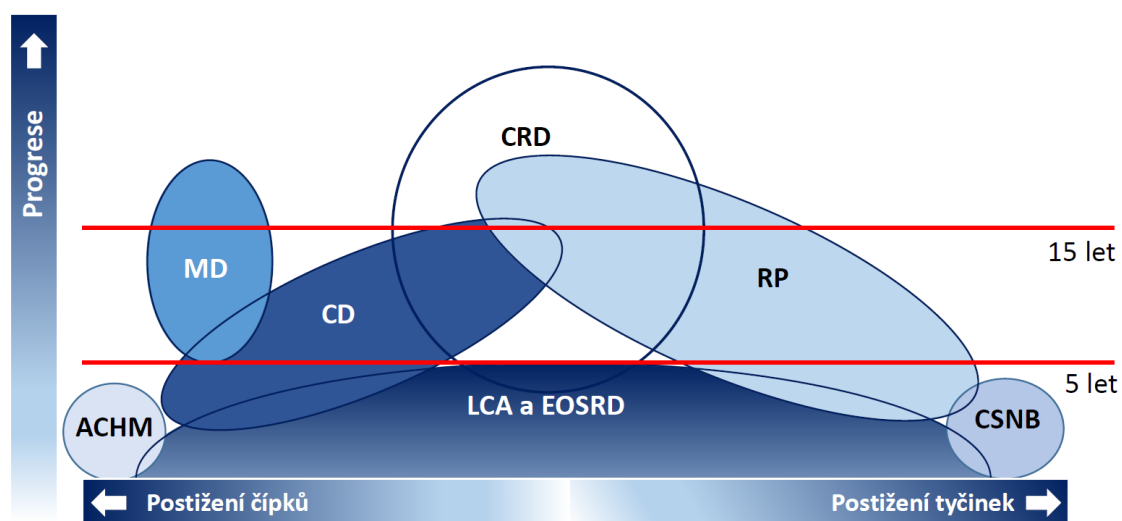
**Obr. 2.** Vlevo klinická a anatomická terminologie sítnice. Převzato z Heissigerová J. et al. (2018). Vpravo barevná fotografie normální sítnice pravého oka.

Retinální pigmentový epitel (RPE) má zásadní úlohu ve výživě a zpracování odpadních látek fotoreceptorů, fagocytóze jejich použitých a odloučených zevních částí, znovuvyužití zrakového pigmentu a zabraňuje zpětnému odrazu světla. Při degeneraci pigmentových buněk dochází sekundárně k narušení funkcí a snížení počtu životaschopných fotoreceptorů.

U dědičných onemocnění sítnice mohou být postiženy všechny z výše uvedených vrstev a podle počátečního místa vzniku poruchy se pak vyvíjí klinický a funkční nále. Změny se projeví zhoršením zrakových funkcí, které je výsledkem poruchy metabolismu vysoce citlivých fotoreceptorů sítnice a strukturálních změn zejména zadního pólu oka.

## 2. SPEKTRUM DĚDIČNÝCH ONEMOCNĚNÍ SÍTNICE

Spektrum chorob sítnice je nebývale široké, popsáno bylo více než 120 klinických jednotek, přičemž nejčastější je retinitis pigmentosa, nejzávažnější pak Leberova kongenitální amauróza (Obr. 3). V této práci předkládáme seznam nemocí sítnice, se kterými se v naší klinické praxi setkáváme nejčastěji, a jsou také předmětem našeho výzkumu. U zkoumaných jednotek uvádíme jejich číslo v databázi OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, <https://www.omim.org/>), která je průběžně aktualizovaným katalogem lidských genů a geneticky podmíněných onemocnění.

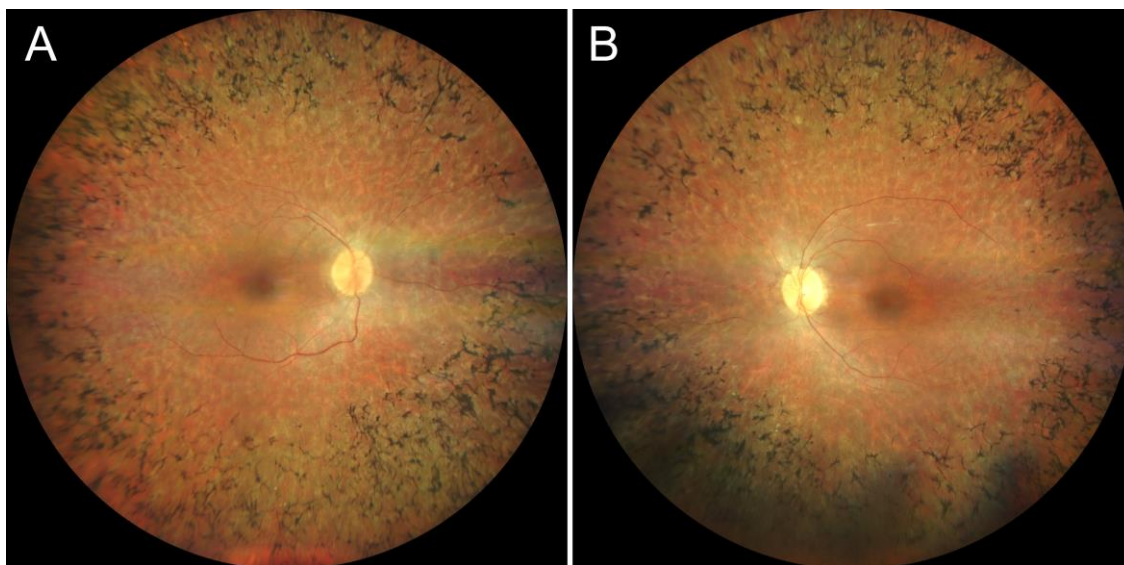


**Obr. 3.** Klinické jednotky dědičných onemocnění sítnice a souvislost nástupu příznaků a degenerace buněk (CRD – dystrofie čípků a tyčinek, CSNB – kongenitální stacionární noční slepota, ACHM – achromatopsie, LCA – Leberova kongenitální amauróza, EOSRD – závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací, MD – makulární dystrofie, RP – retinitis pigmentosa). Upraveno podle den Hollander AI. et al. (2010).

## 2.1 Retinitis pigmentosa

Pod pojmem retinitis pigmentosa (OMIM #268000) je zahrnována celá řada různorodých onemocnění sítnice, jejichž společným znakem je primární postižení tyčinek. V pozdějších fázích může dojít také k odumírání čípků zadního pólu, což v konečném důsledku vede k úplné slepotě. Retinitis pigmentosa se vyskytuje buď jako samostatné onemocnění, nebo jako součást řady syndromů, tj. kromě očního postižení jsou přítomny i jiné příznaky, např. hluchota.

Onemocnění se typicky projevuje nejprve šeroslepostí, poté úbytkem zorného pole, jehož centrum, a tím i zraková ostrost, může zůstat dlouho zachované. Retinitis pigmentosa vykazuje při klinickém vyšetření velkou variabilitu, a to i mezi příslušníky jedné rodiny. Za typický znak je při vyšetření očního pozadí považován nález shluků pigmentu tvarem připomínající kostní buňky (Obr. 4). Dále bývá přítomno zúžení tepen na sítnici, vosková atrofie terče zrakového nervu, zákaly čočky a nedetekovatelné nebo snížené amplitudy při elektroretinografickém (ERG) vyšetření.



**Obr. 4.** Retinitis pigmentosa. Širokoúhlá barevná fotografie očního pozadí pravého (A) a levého (B) oka 30leté pacientky s pokročilým stadiem dokumentující typické shluky pigmentu ve tvaru kostních buněk v periférii sítnice, zúžené cévy a bledší terč zrakového nervu.

Onemocnění se přenáší všemi známými typy dědičnosti, tj. recesivně, dominantně, s vazbou na pohlavní chromozom a existují i digenické a syndromové formy s mitochondriální dědičností.

### 2.1.1 Nesyndromová retinitis pigmentosa

Nesyndromová retinitis pigmentosa, tj. vykazující pouze nález na oku, postihuje přibližně 1 ze 4 000 obyvatel (Hamel C., 2006), v praxi to tedy znamená, že jenom v České republice trpí tímto onemocněním asi 2 700 lidí. Nesyndromový výskyt zahrnuje 65 % všech případů retinitis pigmentosa (Daiger SP. et al., 2007).

Dosud bylo identifikováno minimálně 102 genů pro nesyndromovou retinitis pigmentosa (<https://sph.uth.edu/retnet/>) kódující jak struktuální a funkční proteiny ve fotoreceptorech a RPE, tak i různé transkripční faktory uplatňující se při vývoji sítnice (Ferrari S. et al., 2011). Samostatnou skupinou jsou pak vybrané splicingové faktory. Přestože se účastní sestřihu ribonukleové kyseliny (RNA) v každé buňce, jejich mutace vedou ke vzniku pouze onemocnění sítnice (Korir PK. et al., 2014; Xiao X. et al., 2017).

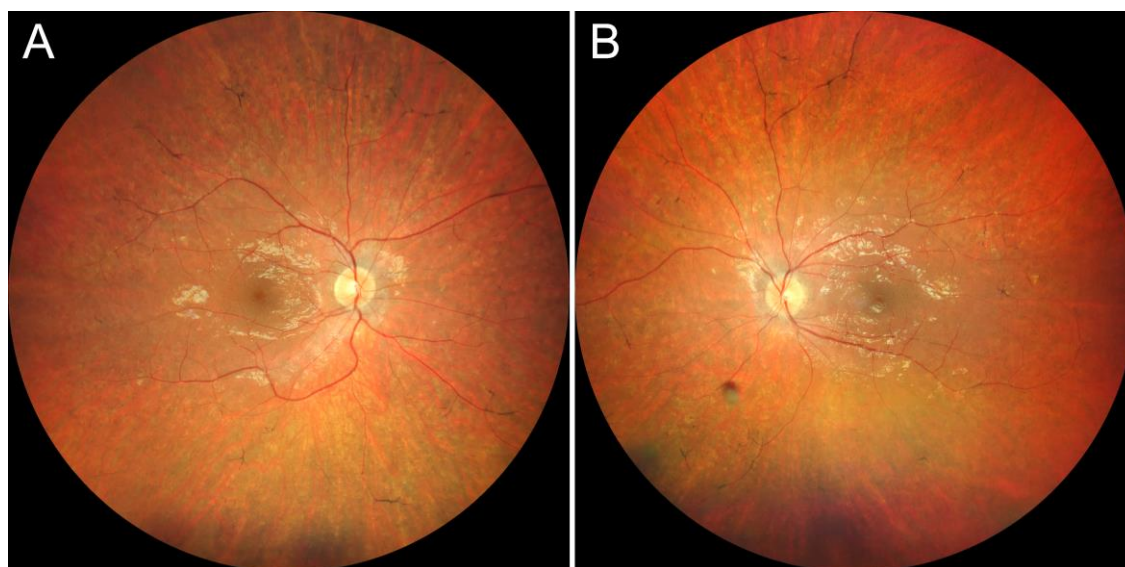
### 2.1.2 Syndromová retinitis pigmentosa

U syndromové retinitis pigmentosa je degenerace sítnice spojená s dalšími symptomy způsobenými onemocněními jiných systémů. Nejčastějšími formami jsou Usherův syndrom charakterizovaný přidruženou hluchotou (Keats BJ., Savas S., 2004) a dědičné poruchy metabolismu, např. Kearnsův-Sayreův syndrom (OMIM #530000) s progresivní zevní oftalmoplegií, pigmentovou degenerací sítnice a některým z dalších příznaků (Khambatta S. et al., 2014), deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCHAD, long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, OMIM #609016) provázený v batolecím věku letargií, odmítáním stravy, hypoglykemií, hypotonií a hepatopatií (Schrijver-Wieling I. et al., 1997), Bardetův-Biedlův syndrom (OMIM #209900), který kromě postižení sítnice zahrnuje polydaktylii, obezitu, nefropatii, hypogonadismus a variabilně i mentální retardaci (Katsanis N., 2004) či Danonova choroba (OMIM #300257) manifestující se kardiomyopatií, myopatií kosterního svalu, mentální retardací a variabilním očním nálezem (Prall FR. et al., 2006).

Usherův syndrom je nejčastější příčinou vrozené hluchoslepoty s prevalencí 1 postižený na 25 000 obyvatel (Kimberling WJ. et al., 2010). Onemocnění se projevuje jako kongenitální či v dětství vzniklá hluchota následovaná většinou ve 2. a 3. dekádě života progresivní degenerací sítnice typu retinitis pigmentosa (Obr. 5). Dle stupně hluchoty a vertiga klinicky rozlišujeme tři formy tohoto syndromu (Tabulka 1). Nejzávažnější je kongenitální typ I, u něhož jsou znaky degenerace sítnice přítomny již v 1. dekádě života (Mathur P., Yang J., 2015; Bonnet C. et al., 2016; Testa F. et al., 2017),



variabilně se přidává i postižení vestibulární funkce ucha. Nejčastější je mírnější typ II bez poruchy rovnováhy. Typ III se liší od typu II rychlostí progresu a možností pozdějšího rozvoje vestibulárních příznaků. Jeho odhadované zastoupení je ale velmi nízké (Tabulka 1) (Bonnet C. et al., 2016).



**Obr. 5.** Usherův syndrom. Širokouhlá barevná fotografie sítnice pravého (A) a levého (B) oka 18leté pacientky s Usherovým syndromem typu II, s prořídnutím a ojedinělými shluky pigmentu ve tvaru kostních buněk v periferii a pigmentací podél cév.

**Tabulka 1.** Příznaky jednotlivých typů Usherova syndromu

	Typ I (~40 %)	Typ II (~60 %)	Typ III (<3 %)
Sluch	Vrozená těžká hluchota	Vrozená střední až těžká nedoslýchavost	Po narození normální, progresivní porucha v dětství nebo časně dospělosti
Zrak	Šeroslepost před 10. rokem věku	Šeroslepost od pozdního dětství až dospívání	Různá závažnost, šeroslepost obvykle od dospívání
Vestibulární funkce	Problémy s rovnováhou od narození	Normální	Normální nebo subnormální, možnost pozdějšího rozvoje obtíží

Usherův syndrom je geneticky heterogenní onemocnění s autozomálně recesivním typem dědičnosti způsobené mutacemi minimálně v 11 genech (Millán JM. et al., 2011). Produkty těchto genů tvoří vzájemně se ovlivňující síť (Kremer H. et al., 2006). Nejčastěji jsou detekovány patogenní varianty v genu *USH2A* (usherin) (McGee TL. et al., 2010; Bonnet C. et al., 2016). Jeho produkt protein usherin je součástí bazálních



membrán a má vliv na homeostázu fotoreceptorů sítnice a vývoj vláskových buněk vnitřního ucha.

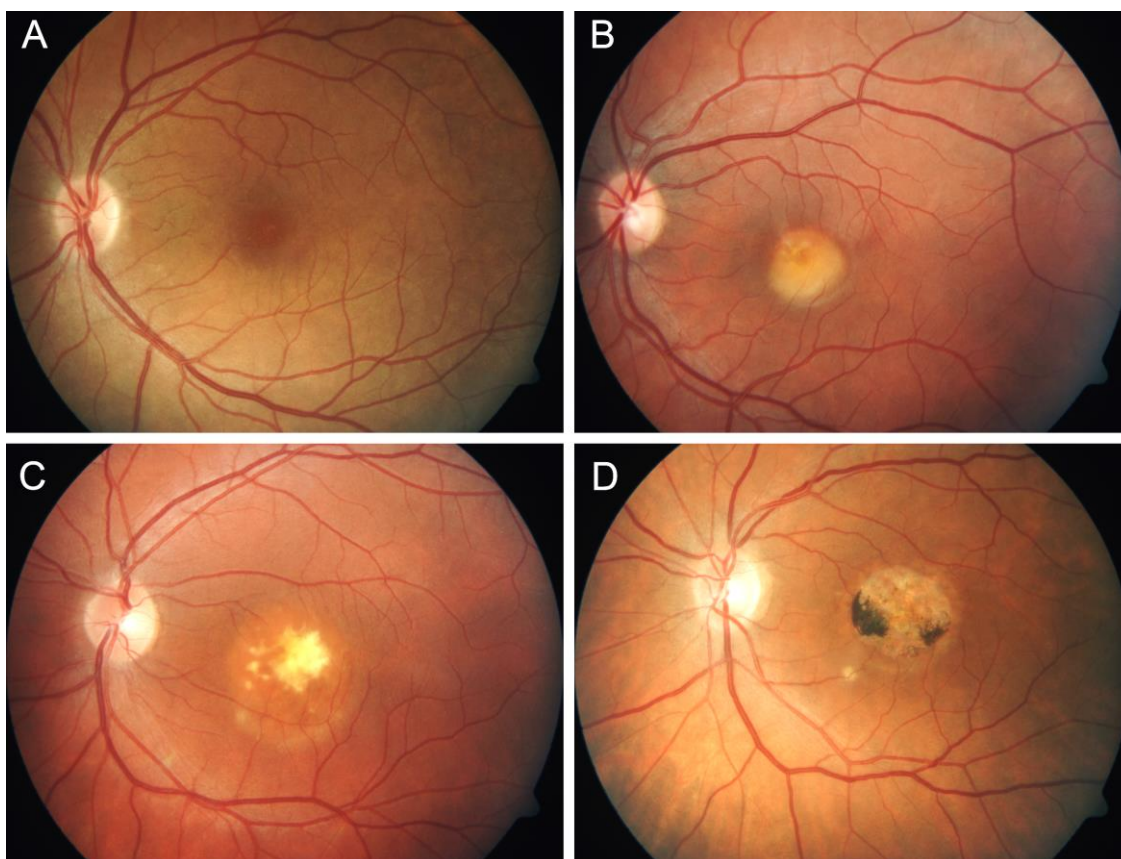
Jako další příklad syndromové retinitis pigmentosa může sloužit oční nález u Danonovy choroby (Majer F. et al., 2020). Jde o vzácné X-vázané onemocnění způsobené mutacemi v genu *LAMP2* (lysosomal associated membrane protein 2). Mezi typické klinické symptomy patří hypertrofická kardiomyopatie s časnou progresí do pokročilého srdečního selhání, myopatie kosterního svalu a mentální retardace. Součástí je i variabilní oční nález, zejména charakteru pigmentové retinopatie spojené s generalizovanou ztrátou funkcí čípků a tyčinek (Schorderet DF. et al., 2007). Občas mohou být pozorovány jemné opacity čočky (Prall FR. et al., 2006).

## 2.2 Bestova choroba

Bestova choroba (OMIM #153700) je oboustranná makulární dystrofie s prevalencí 1 postižený na 10 000 obyvatel (Mohler CW., Fine SL., 1981).

Zpočátku je vzhled makuly normální, v další fázi, zatím bez funkčních projevů, jsou přítomny jemné změny RPE (Obr. 6A). Bestova choroba se typicky projevuje mezi 10. až 30. rokem věku vznikem oranžovožlutého ložiska s ukládáním toxických prekurzorů a derivátů lipofuscinu v makule, které svým vzhledem připomíná vaječný žloutek (viteliformní léze) (Obr. 6B). V dalším vývoji se může ložisko částečně vstřebávat (Obr. 6C). V poslední fázi onemocnění, která je provázená často výraznějším poklesem zrakové ostrosti, může dojít ke vzniku jizvy (Obr. 6D) nebo neovaskularizace pod nebo kolem jizvy. Ne všichni pacienti procházejí všemi fázemi onemocnění a často mají rozdílný průběh na každém oku (Marmorstein AD. et al., 2009; Mohler CW., Fine SL., 1981; Querques G. et al., 2009). Obtíže ve smyslu zkresleného a rozostřeného vidění a snížení centrální zrakové ostrosti mohou vznikat již v dětství, ale i o několik desetiletí později. V dlouhodobějším časovém horizontu dochází u většiny pacientů k poklesu centrální zrakové ostrosti při zachovaném periferním vidění (Mohler CW., Fine SL., 1981).

Onemocnění se přenáší autozomálně dominantně a je podmíněno přítomností mutací v genu *BEST1* (bestrophin 1) kódujícím protein bestrofin, o kterém je známo, že je lokalizovaný v bazolaterální membráně buněk RPE, kde tvoří chloridové kanály. Tyto se aktivují změnami intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$ .



**Obr. 6.** Bestova choroba. Barevné fotografie očního pozadí levého oka čtyř pacientů dokumentující vývojové fáze onemocnění v oblasti makuly. Jemné změny retinálního pigmentového epitelu (A), viteliformní léze (B), nepravidelné žlutavé shluky lipofuscinu (C), pigmentovaná jizva (D).

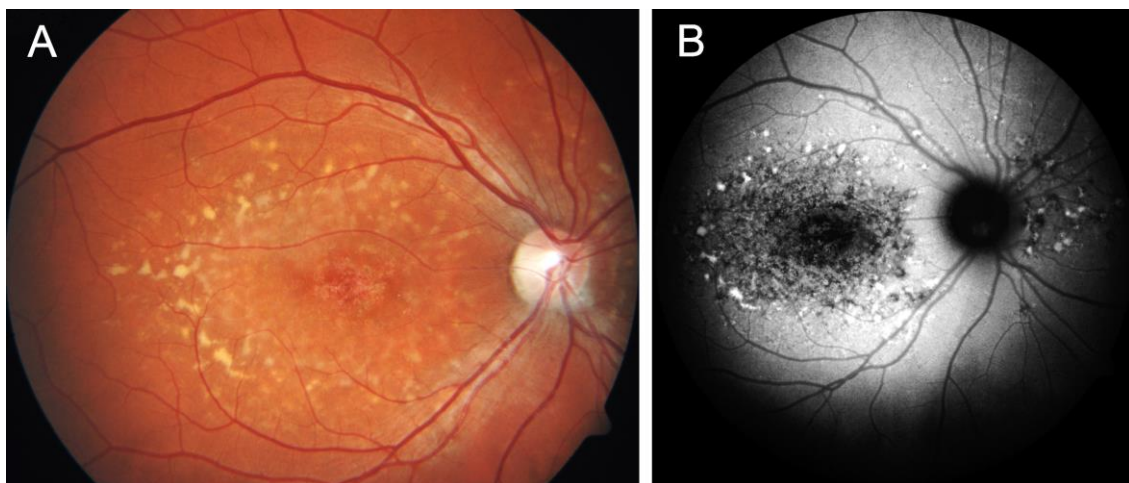
### 2.3 Stargardtova choroba

Stargardtova choroba (OMIM #248200) zahrnuje široké spektrum degenerací s postižením makuly včetně čípko-tyčinkové dystrofie. Charakteristickým klinickým nálezem je přítomnost žlutých skvrn lipofuscinových depozit v makule spolu s jejím ztenčením a změnou architektiky. Postiženy jsou nejprve RPE a fotoreceptory, v pozdějších stádiích může dojít až k celkovému rozpadu všech vrstev sítnice. Prevalence je přibližně 1 případ na 10 000 obyvatel (Burke TR. et al., 2012).

Stargardtova choroba se projevuje oboustranným snížením centrální zrakové ostrosti, které typicky vzniká již v dětství nebo v časně dospělosti, známky onemocnění se ale mohou dostavit i později (Zernant J. et al., 2011). Zpočátku může mít makula normální vzhled, následně začne připomínat tepaný kov a postupně vzniká jizva se žlutými skvrnami při okrajích (Obr. 7A) nebo i po celém očním pozadí (Rivera A. et al., 2000; Lois N. et al., 2001). V rámci klinického obrazu čípko-tyčinkové dystrofie je průběh

a rozsah postižení sítnice natolik rychlý a závažný, že ke vzniku žlutavých depozit nedojde. Za nejspolehlivější metodu, jak rozpoznat Stargardtovu chorobu, a zvláště velikost patologických změn, je dnes považována autofluorescence fundu (Obr. 7B) (Tanna P. et al., 2017).

Onemocnění se dědí autozomálně recesivně a je podmíněné mutacemi v genu *ABCA4* (ATP binding cassette subfamily A member 4), který kóduje transportní protein odstraňující použité části fotoreceptorů v tyčinkách a čípcích směrem do RPE. Narušení funkce proteinu ABCA4 způsobí jejich nahromadění v sítnici ve formě toxických sloučenin a vede k následnému odumírání fotoreceptorů (Weng J. et al., 1999). Klinickým obrazem spojovaným s mutacemi v genu *ABCA4* je i klasická retinitis pigmentosa (tj. s primárním postižením tyčinek). Vzácně mohou klinický obraz Stargardtovy choroby vyvolat mutace v genech *ELOVL4* (ELOVL fatty acid elongase 4) (Vasireddy V. et al., 2010) a *PROM1* (prominin 1) (Yang Z. et al., 2008).



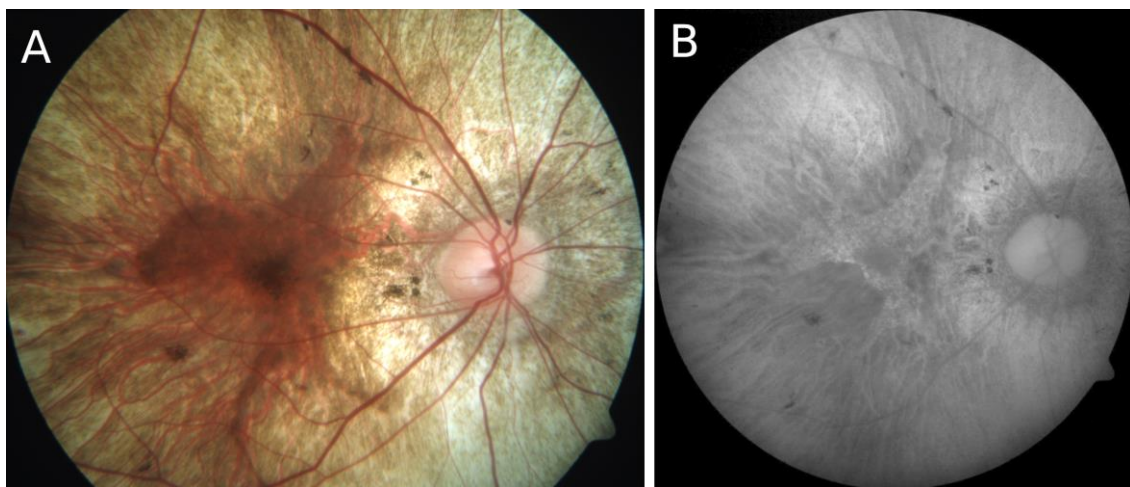
**Obr. 7.** Stargardtova choroba. Barevná fotografie fundu 18leté pacientky dokumentující žlutavá ložiska a atrofii retinálního pigmentového epitelu v makule pravého oka (A), autofluorescence fundu stejného oka s nepravidelně zrnitou distribucí, v místech hromadění lipofuscinových depozit je autofluorescence zvýšená, v oblastech atrofie autofluorescence chybí (B).

#### 2.4 Choroideremie

Choroideremie (OMIM #303100) je onemocnění sítnice s dědičností vázanou na chromozom X, které postihuje přibližně 1 z 50 000 obyvatel (Aleman TS. et al., 2017).

Pacienti trpí degenerací choriokapilaris, RPE a fotoreceptorů (Obr. 8) s výrazným snížením zrakové ostrosti, postupně až úplnou slepotou, která vzniká typicky v 5. až 7. dekádě života (Mitsios A. et al., 2018).

Chorobu způsobují mutace v genu *CHM* (CHM Rab escort protein 1), jehož produkt reguluje transport vezikul v procesech endocytózy a exocytózy (Strunnikova NV. et al., 2009). Pacienti s choroideremií mají snížené nebo nulové množství tohoto enzymu, což vede k poruchám transportu opsinu (proteinové složky zřetivého pigmentu) do zevních segmentů fotoreceptorů, k poruchám migrace melanozomů v buňkách RPE a ke snížené fagocytóze zevních segmentů fotoreceptorů buňkami RPE. I přes intenzivní výzkum není dosud jasné, která část sítnice je u choroideremie primárně postižená (Dimopoulos IS. et al., 2015).



**Obr. 8.** Choroideremie. Barevná fotografie fundu pravého oka 26letého pacienta s rozsáhlou chorioretinální atrofii s viditelnými cévami cévnatky a zbytkem sítnice na zadním pólu (A), generalizované snížení autofluorescence fundu stejného oka (B).

### 2.5 X-vázaná juvenilní retinoschíza

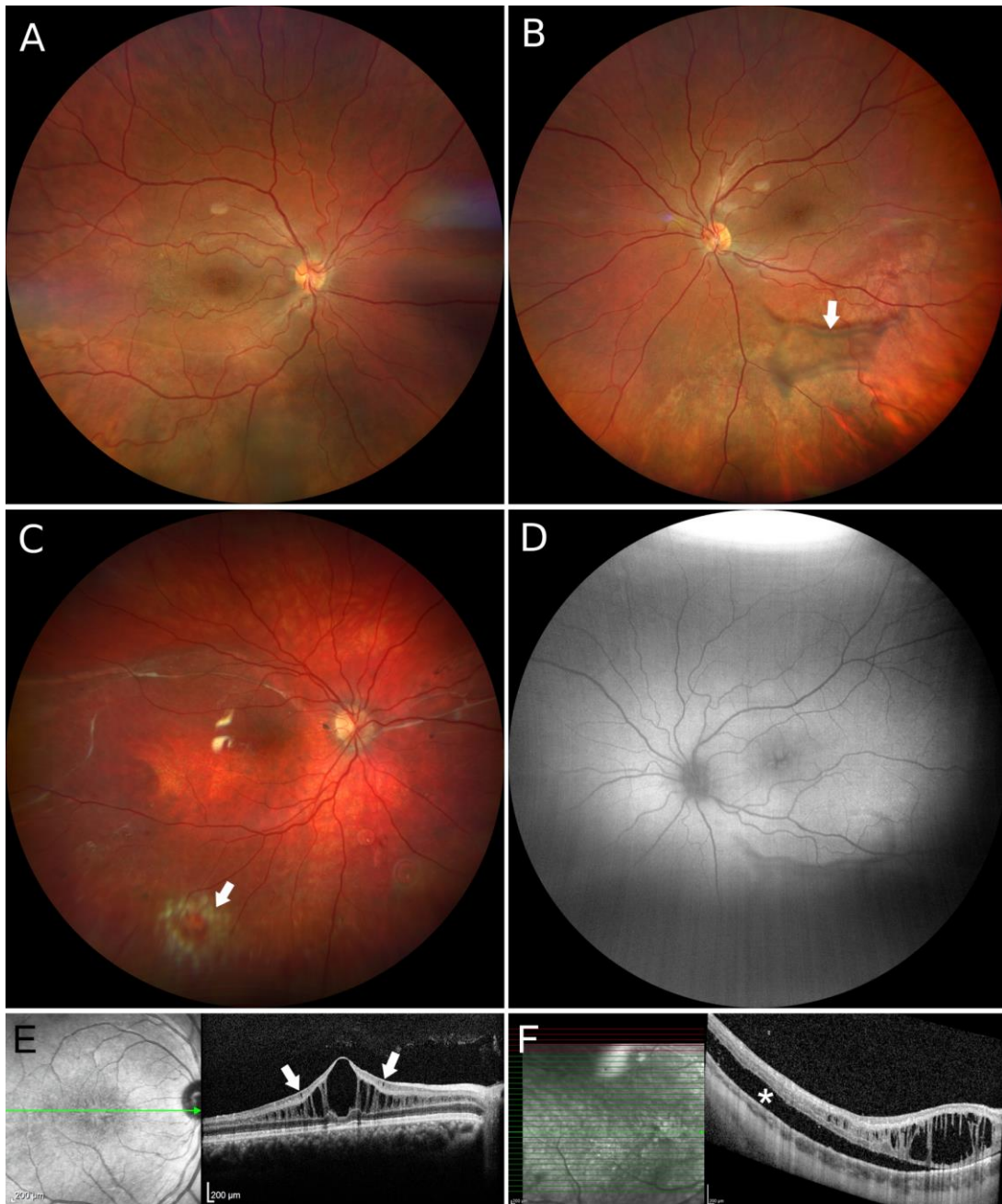
X-vázaná retinoschíza (OMIM #312700) je vzácná vitreoretinální dystrofie, která se nejčastěji manifestuje v první dekádě života. Její prevalence je udávána 1 postižený na 5–25 000 obyvatel (Yi J. et al., 2012).

U pacientů mužského pohlaví vede k rozštěpu vnitřních vrstev sítnice obvykle v makulární oblasti (Obr. 9), což je provázeno poklesem zřetivé ostrosti (Prenner JL. et al., 2006). Jedna až dvě třetiny pacientů mají také retinoschízu periferní (Hinds AM. et al., 2018). X-vázaná retinoschíza může být komplikována odchlípením sítnice (až u pětiny pacientů) (Obr. 9F) a krvácením do sklivce (až u třetiny pacientů) (Prenner JL. et al., 2006).

Choroba je způsobena mutacemi v genu *RS1* (retinoschisin 1). Produkt genu je exprimován ve fotoreceptorech a bipolárních buňkách sítnice. Jeho funkce není úplně



objasněna, ale předpokládá se, že se podílí na adhezi uvedených buněk (Plössl K. et al., 2018).

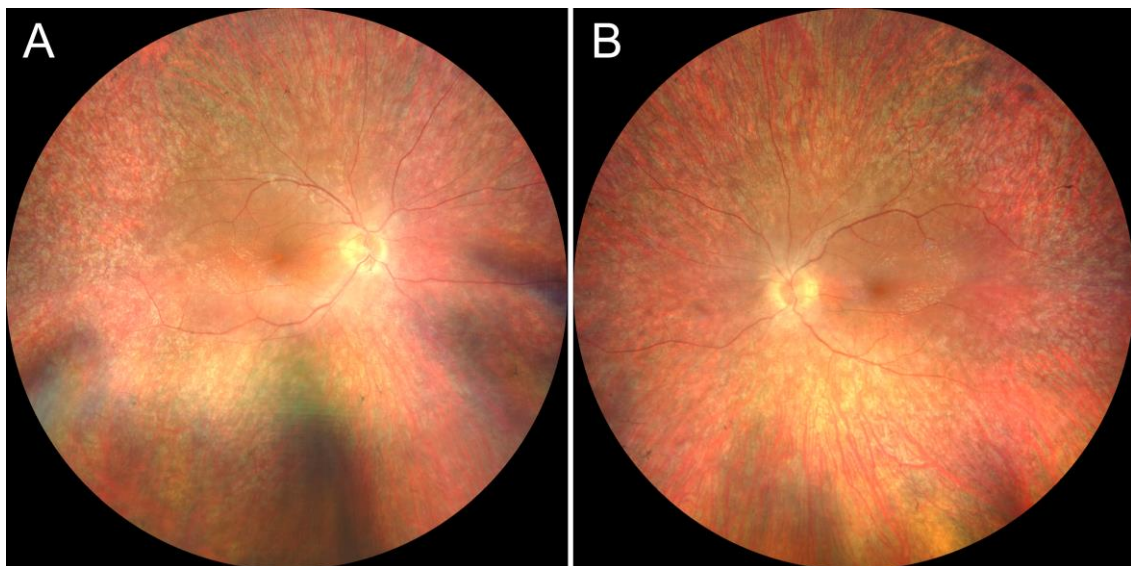


**Obr. 9.** X-vázaná juvenilní retinoschíza. Širokouhlé barevné fotografie fundu 35letého pacienta s rozštěpem sítnice v oblasti makuly pravého (A) a levého (B) oka, kde je přítomna i preretinální membranózní opacita (označena šipkou). Nález po operaci odchlípení sítnice u 15letého pacienta (C), v centru odlesky silikonového oleje, světlé demarkační linie, dole trhlina sítnice ošetřená laserovou baráží (označena šipkou). Autofluorescence fundu levého oka 35letého pacienta s typickým radiálním uspořádáním změn v makule (D). SD-OCT makuly pravého oka 16letého pacienta s rozštěpem vnitřní jaderné vrstvy sítnice a několika drobnými cystami ve vrstvě gangliových buněk (označeny šipkami) (E), SD-OCT makuly pravého oka 15letého pacienta s komplikujícím odchlípením sítnice (označeno hvězdičkou) (F).

## 2.6 Závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací

Závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací v dětství se vyskytují u 1 postiženého na 80 000 obyvatel (den Hollander AI. et al., 2008). Pokud je onemocnění diagnostikováno na základě klinických známek do 6 měsíců života, označuje se jako Leberova kongenitální amauróza (OMIM #204000). V praxi se ale tento název často používá i při pozdějším začátku choroby (Weleber RG. et al., 2011).

Mezi hlavní projevy patří časně vzniklé těžké postižení zraku, nystagmus, strabismus, absence fixace, světloplachost, chybění fotoreakce zornic, bloudivé pohyby očí, stlačování očí prsty. Nález na očním pozadí může být velmi variabilní, od zpočátku normálního vzhledu sítnice, přes pigmentovou retinopatii (Obr. 10), bílá depozita v úrovni RPE, atrofii makuly, zúžení cév, po pseudoedém, bledou či drúzovou papilu zrakového nervu (Kumaran N. et al., 2017).



**Obr. 10.** Závažná dystrofie sítnice s časnou manifestací. Širokouhlá barevná fotografie fundu pravého (A) a levého (B) oka 22letého pacienta, sítnice se zrnitým prořidnutím retinálního pigmentového epitelu, v makule celofánové lesky, v periferii řídce shluky pigmentu a úzké cévy.

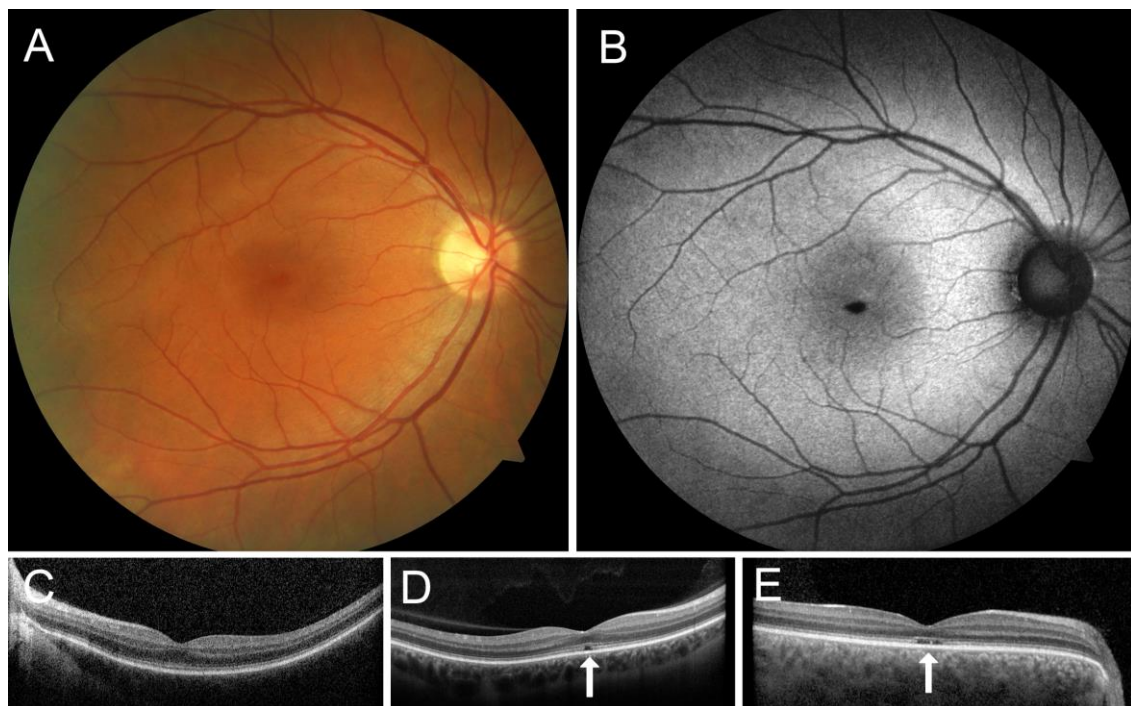
Dosud bylo zjištěno nejméně 25 genů, jejichž mutace způsobují závažné dystrofie sítnice u dětí. Většina z těchto genů je exprimována ve fotoreceptorech nebo RPE, kde kódují funkční proteiny (Kumaran N. et al., 2017). Některé podtypy závažných dystrofií sítnice s časnou manifestací, např. s mutacemi v genech *IQCB1* (IQ motif containing B1), *IFT140* (intraflagellar transport 140) a *CEP290* (centrosomal protein 290), jsou součástí oční symptomatologie Seniorova-Løkenova syndromu (OMIM #266900) nebo

Joubertova syndromu (OMIM #213300) (Kumaran N. et al., 2017). Také u dědičných poruch glykosylace byl popsán výskyt závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací (Thompson DA. et al., 2013; Taylor RL. et al., 2017). Pokud tedy není jasně určena molekulárně genetická příčina, musí být u dětí s časně vzniklou dystrofií sítnice vždy na syndromové postižení pomýšeno.

## 2.7 Achromatopsie

Achromatopsie (OMIM #262300) je charakterizována poruchou funkce čípků a vyskytuje se s prevalencí 1 postižený na 30–50 000 obyvatel (Thiadens AA. et al., 2010).

Choroba je provázena úplnou barvoslepostí nebo vzácně zbytky barvocitu, světloplachostí, malým centrálním výpadem zorného pole, nystagmem a excentrickou fixací. Postižení mají první projevy onemocnění již od velmi raného věku. Oční pozadí se obvykle biomikroskopicky jeví jako normální či téměř normální (Obr. 11A), vzácně



**Obr. 11.** Achromatopsie. Barevná fotografie fundu pravého oka 36leté pacientky s téměř normální nálezem (A), ostře ohraničená oblast hypoautofluorescence fovey stejné pacientky (B). SD-OCT makuly levého oka 30letého pacienta se zachovanou neuroretinou (C), variabilní rozsah disrupce zóny elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů (označeno šipkami) pravého oka 40letého pacienta (D) a pravého oka 22leté pacientky (E).

s lézemi RPE makuly. Na optické koherenční tomografii se spektrální doménou (SD-OCT) jsou přítomny variabilní strukturální změny zóny elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů (Obr. 11C–E) a integrity zevní vrstvy sítnice (Sundaram V. et al., 2014).

Z pěti dosud popsaných genů odpovědných za vznik onemocnění, jsou mutace v genu *CNGB3* (cyclic nucleotide gated channel beta 3) u pacientů převážně evropského původu příčinou přibližně u poloviny jedinců (Mayer AK. et al., 2017). *CNGB3* kóduje tvorbu podjednotky iontových kanálů aktivovaných cyklickými nukleotidy (CNG, cyclic nucleotide-gated ion channel) v cytoplazmatické membráně čípků, kde se účastní procesu fototransdukce. Na rozdíl od čípků se tyto kanály nevyskytují na tyčinkách, skotopické vidění proto zůstává zachováno (Meighan PC. et al., 2015).

## 2.8 Genetické testování onemocnění sítnice

V řadě vyspělých států, jako např. ve Velké Británii, USA či Německu, představuje genetické testování očních chorob běžnou součást vyšetřovacího procesu. Vzhledem k tomu, že mnoho z těchto testů je poměrně nákladných a dopady výsledků je třeba s postiženými jedinci a jejich rodinami citlivě a důkladně prodiskutovat, jsou pacienti většinou odesíláni do specializovaných očních genetických center, kde pracuje oftalmolog s odbornými znalostmi na poli genetiky nebo úzce spolupracující oftalmolog a genetik.

Genetické testování onemocnění sítnice prodělalo v průběhu posledního desetiletí značný vývoj od cíleného screeningu vybraných genů Sangerovým sekvenováním, přes použití genotypovacího mikročipu (Jaakson K. et al., 2003; Henderson RH. et al., 2007; van Huet RA. et al., 2015) až po masivní paralelní sekvenování, které již představuje v současné době standard. Vyšetřovány jsou buď vybrané sady genů, např. panel genů účastnících se vzniku sítnicových onemocnění, nebo kódující úseky všech genů, tzv. exomové sekvenování (Stone EM. et al., 2012; Lee K., Couser NL., 2016). U pacientů s negativním výsledkem lze zvážit testování variability počtu kopií segmentu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (Zampaglione E. et al., 2020). Na výzkumné úrovni se dále provádí genomové sekvenování, které je v některých zemích zaváděno i do běžné oftalmologické praxe (Black GC. et al., 2020).

Genetické testování s sebou však nese i specifická úskalí, onemocnění sítnice nevyjímaje. Přestože se rizika mohou jevit ve srovnání s jinými invazivními metodami



jako velmi malá, výsledky vyšetření mohou například ovlivnit rozhodnutí mít děti, vyvolat pocity úzkosti nebo viny či narušit vztahy s ostatními členy rodiny. Z těchto důvodů je nutné, aby jedincům, kteří genetické testování podstoupí, bylo poskytnuto odborné poradenství (Marteau TM., Croyle RT., 1998).

### 3. HLAVNÍ CÍLE PRÁCE

Hlavním předmětem postgraduálního studia a disertační práce bylo:

- identifikovat a klinicky charakterizovat české pacienty se závažnými monogenně dědičnými onemocněními sítnice,
- zkoumat molekulárně genetickou příčinu jejich onemocnění,
- vytvořit a kontinuálně aktualizovat seznam pacientů a všech jejich relevantních dat,
- propojit poznatky o fenotypu se znalostmi o příčině na molekulárně genetické úrovni,
- zlepšit klinické a genetické poradenství pacientům a jejich rodinám,
- implementovat preventivní a léčebná opatření do klinické praxe,
- vytvořit vlastní internetovou doménu s edukačním obsahem,
- zvýšit informovanost o geneticky podmíněných degenerativních onemocněních sítnice mezi odborníky i laickou veřejností.

#### 4. MATERIÁL A METODIKA

Výzkum byl proveden v souladu s Helsinskou deklarací Světové lékařské asociace o etických zásadách pro lékařský výzkum zahrnující lidské bytosti. Pacienti podepsali písemný informovaný souhlas a byl jim předán stejnopis a „Písemná informace pro účastníka studie“. Oba dokumenty byly předem projednány a schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice (VFN) v Praze. Pokud byl výzkum prováděn ve spolupráci se zahraničním pracovištěm, vždy současně splňoval podmínky dané lokální etickou komisí.

Vhodní pacienti s geneticky podmíněnými onemocněními sítnice byli zpočátku vyhledáváni v záznamech Oční kliniky 1. LF UK a VFN v Praze za období 2004–2014. Po vytvoření jejich seznamu byli kontaktováni s žádostí o vyplnění komplexního dotazníku zaměřeného na rodinnou, osobní a oční anamnézu, subjektivní klinické projevy, geografický původ, včetně dat o původu rodičů a prarodičů, a po souhlasu byli pozváni k podrobnému vyšetření.

Poté byly vypracovány webové stránky, první svého druhu v českém jazyce, informující pacienty a odbornou zdravotnickou veřejnost o dědičných onemocněních oka, možnostech jejich léčby a preventivních opatřeních.

Dále byly rozeslány dotazy obvodním oftalmologům s cílem zjistit výskyt vzácných onemocnění sítnice v České republice, s informacemi o nově zřízených webových stránkách a se žádostí o předání informací pacientům. V rámci dalšího vzdělávání odborné i laické veřejnosti probíhaly edukativní pohovory a přednášky včetně akcí Institutu postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, seminářů Oční kliniky 1. LF UK a VFN v Praze nebo prezentace na Gymnáziu pro zrakově postižené a Střední odborné škole pro zrakově postižené, Praha 5.

Průběžně byla sbírána data z předcházejících očních a celkových vyšetření i z dosud provedených vyšetření genetických. Byla tedy použita kvantitativní výzkumná strategie sběru dat formou analýzy, dotazníkového šetření, rozhovoru i standardizovaného pozorování.

##### *Klinické vyšetření a genealogický rozbor*

U pacientů a rodinných příslušníků jsme provedli komplexní oftalmologické vyšetření. Nejlepší korigovaná zraková ostrost (NKZO) byla zjišťována pomocí nejběžnějších

Snellenových nebo Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) optotypů (Precision Vision, Woodstock, USA) vyjádřená v decimálních nebo logaritmických hodnotách. Vidění do blízka bylo testováno pomocí dvou typů Jägerových tabulek s rozsahem od nejmenšího k největšímu textu 0,4–1,1 a 1–12. Kontrastní citlivost byla zjišťována na Pelli-Robsonových tabulkách (HS Clement Clarke International, Harlow, Velká Británie) a barvocit Lanthonyho desaturovaným panel D-15 testem (Good-Lite, Elgin, USA), Ishiharovými (Kanehara Trading, Tokio, Japonsko) a Hardy-Rand-Rittler (HRR) pseudoizochromatickými tabulkami (Richmond Products, Albuquerque, USA).

Zorné pole bylo hodnoceno pomocí statické automatické perimetrie (M-700, Medmont International, Nunawading, Austrálie a Peristat 433, G. Rodenstock Instruments GmbH, Ottobrunn-Riemerling, Německo). Axiální délka oka byla měřena přístrojem IOLMaster 500 (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Německo) a nitrooční tlak metodou bezkontaktní nebo aplanační tonometrie. Přední segment oka byl pozorován pomocí štěrbinové lampy, nález na fundu při biomikroskopickém vyšetření v mydriáze byl fotograficky zdokumentován (FF 450 plus IR, Clarus 700 a Visucam 200, Carl Zeiss Meditec AG). Vyšetření autofluorescence fundu využívající fluorescenční schopnosti lipofuscinu ke znázornění jeho distribuce a akumulace a k odlišení poškozeného RPE a receptorů sítnice jsme prováděli BluePeak modrým laserem (Spectralis, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Německo) nebo pomocí modrého či zeleného filtru funduskamery (Clarus 700, Carl Zeiss Meditec AG).

Další používanou metodou byla SD-OCT pomocí přístrojů Spectralis (Heidelberg Engineering GmbH), Spectral OCT/SLO (OTI Ophthalmic Technologies Inc., Toronto, Kanada) nebo RTVue (Optovue, Inc., Fremont, USA) zobrazující jednotlivé vrstvy sítnice a cévnatky zejména v oblasti makuly a vrstvu nervových vláken sítnice (RNFL, retinal nerve fiber layer) v kruhu o průměru 3,5–3,6 mm okolo terče zrakového nervu s možností automatického či manuálního měření parametrů uvedených tkání. OCT angiografie (OCT-A) (Spectralis OCT2, Heidelberg Engineering GmbH) umožnila *in vivo* neinvazivní vizualizaci cévních struktur v libovolně zvolené hloubce sítnice či cévnatky bez použití kontrastní látky. Přístroj snímá sekvenci objemových skenů s vysokou hustotou a v místech, kde jsou přítomny cévy, se z důvodu krevního průtoku informace na každém opakovaném skenu liší. S vysokým rozlišením je pak možno softwarově rekonstruovat cévní síť včetně nejjemnějších kapilár.







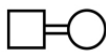


V případě potřeby bylo doplněno na spolupracujícím pracovišti (prof. Hana Langrová, LF UK v Hradci Králové) elektrofyziologické hodnocení funkce sítnice klasickou

zábleskovou a multifokální ERG (RETI-port/scan 21, Roland Consult GmbH, Brandenburg, Německo) podle standardů vypracovaných Mezinárodní společností pro klinickou elektrofyziologii zraku (McCulloch DL. et al., 2015).

Rozsah cíleného klinického vyšetření závisel na aktuálním zdravotním stavu postižených jedinců a příslušníků jejich rodin. Konkrétní metodika je uvedena v jednotlivých publikacích.

Grafické zpracování rodokmenu bylo provedeno pomocí softwaru HaploPainter (<http://haplopainter.sourceforge.net/>) (Thiele H., Nürnberg P., 2005), použity byly standardní symboly (Tabulka 2). Mendelovský typ přenosu byl odhadován na základě rodinné i osobní anamnézy a podrobného klinického vyšetření. U sporadického výskytu onemocnění byl zvažován i vznik dominantně děděné mutace *de novo*.

**Tabulka 2.** Základní symboly používané v genealogických schématech.

Symbol	Význam
	Nepostižený muž, žena a neznámé pohlaví
	Muž a žena nesoucí daný znak (onemocnění)
	Muž a žena přenašeči
	Muž a žena probandi
	Muž a žena zemřelí
	Nepokrevní vztah
	Pokrevní vztah
	Dizygotní dvojčata
	Monozygotní dvojčata

### *Molekulárně genetická analýza*

Pacientům a jejich rodinným příslušníkům byly odebírány vzorky biologického materiálu, nejčastěji 3–6 ml venózní krve do EDTA zkumavek na izolaci genomové DNA z leukocytů pomocí kitů Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, Hilden, Německo), Nucleon BACC3 (GE Healthcare, Chicago, USA) či systému FlexSTAR (AutoGen, Holliston, USA) podle instrukcí výrobce, popřípadě vzorek slin na izolaci DNA z buněk bukalní sliznice pomocí kitu Oragene OG-300 (DNA Genotek, Ottawa, Kanada).

K identifikaci mutací jsme použili různé postupy na základě předpokládaného vztahu mezi fenotypem a genotypem (Obr. 12). Po amplifikaci DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) byly vzorky dále analyzovány, zpočátku v Laboratoři biologie a patologie oka, později po restrukturalizaci pracoviště a změně názvu v Laboratoři pro studium vzácných nemocí 1. LF UK nebo ve spolupráci se zahraničními pracovišti (skupina Johna Neidhardta, Institute of Medical Molecular Genetics, University of Zurich, Švýcarsko; skupina prof. Alison J. Hardcastle, Institute of Ophthalmology, University College London, Velká Británie; skupina prof. Franse Cremers, Department of Human Genetics, Radboud University Nijmegen Medical Center, Nizozemsko a další).

U onemocnění podmíněných jedním genem, při respektování nejlepšího poměru ceny a výkonu metody, probíhal screening často konvenčním Sangerovým sekvenováním (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA), stejná metoda byla použita k ověření přítomnosti zvažované patogenní varianty detekované jinou metodou a pro cílený screening u příbuzných prvního stupně. U onemocnění způsobených mutacemi v mnoha genech nebo v genech extrémně dlouhých jsme využívali sekvenování nové generace (také známé jako masivní paralelní sekvenování mnoha fragmentů DNA), tedy panel genů nebo exomové sekvenování, které jsme pro ekonomickou výhodnost odesílali do velkých servisních laboratoří, které generovaly tzv. „raw data“. Na našem pracovišti pak probíhalo jejich zpracování v podobě anotace DNA variant a komplexní bioinformatické vyhodnocení jejich vlivu, popřípadě i funkční průkazy jejich patogenity, vždy ve vztahu ke klinickému nálezu. Bioinformatika jako multidisciplinární obor kombinující biologii a informační technologie se pro obrovskou produkci výstupních dat s následnou potřebou jejich třídění a analýzy stala nezbytnou součástí molekulárně genetického vyšetření.

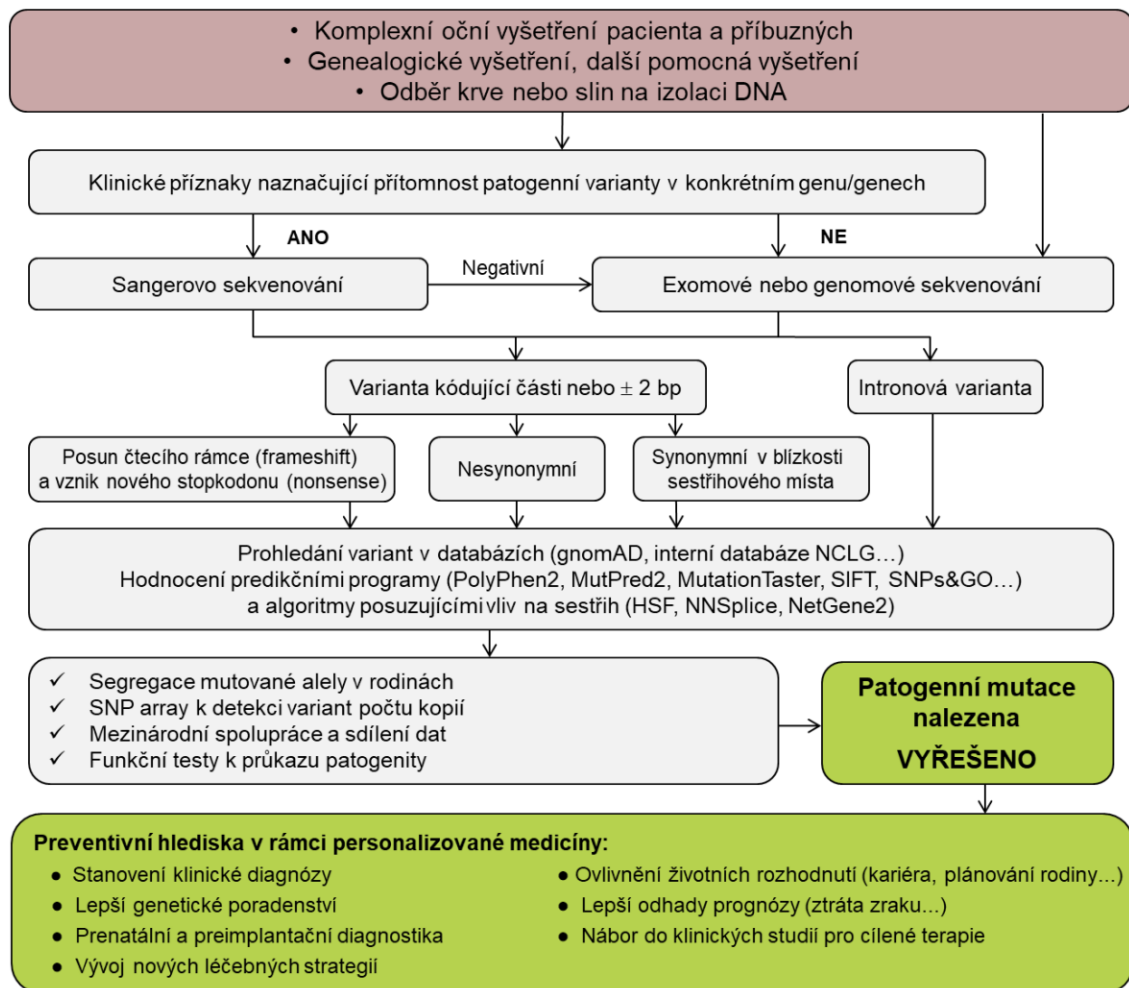
Konkrétně při bioinformatickém zpracování jsme po mapování všech získaných sekvencí o délce 100 párů bází na referenční genom GRCh37 (hg19) za použití

např. NovoalignCS (Novocraft, Selangor, Malaysia, <http://www.novocraft.com/>) nebo Burrows-Wheeler Aligner (BWA, <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) a úpravě sadou nástrojů SAMtools (<http://www.htslib.org/>) vizualizovali získaná data programem Integrative Genomics Viewer (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>). Následovaly kroky k nalezení všech variant mapované DNA, určení typu mutace, ve které oblasti se nachází a pravděpodobnosti, že nejde o chybu. Poté jsme prováděli hodnocení detekovaných variant na základě prohledání a srovnání jejich frekvencí ve veřejně dostupných referenčních databázích, např. Genome Aggregation Database (gnomAD, <http://gnomad.broadinstitute.org/>), Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) a s českou populačně specifickou databází genomických variant (NCLG, Národní centrum lékařské genomiky, <https://ncmg.cz/>).

Sekvenční varianty s nízkou populační frekvencí ( $< 0,005$ ) byly dále analyzovány pomocí různých softwarových nástrojů, např. MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>), MutPred2 (<http://mutpred.mutdb.org/>), SNPs&GO (<https://snps.biofold.org/snps-and-go/>), Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN, <http://provean.jcvi.org/>) či Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT, <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>). Tyto predikční programy se používají k předpovědi efektu „missense“ mutací, kdy po zadání referenční sekvence a aminokyselinové záměny vyhodnotí patogenitu varianty. Každý pracuje s jiným algoritmem a s určitou mírou spolehlivosti. Vliv na sestřih byl posuzován algoritmy Human Splicing Finder (HSF, <https://www.genomnis.com/access-hsf/>), NNSplice ([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) a NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>). Následně jsme sledovali segregaci varianty a s ní spojeného onemocnění ve vyšetřované rodině.

Nomenklatura popisu variant vycházela z doporučení Společnosti pro variace v lidském genomu (Human Genome Variation Society, <http://www.hgvs.org/>), s uvedením referenční sekvence nebo pozice varianty v konkrétní verzi lidského genomu (den Dunnen JT. et al., 2016).

Postup shrnující kroky vedoucí k nalezení patogenní mutace u pacientů s podezřením na monogenně podmíněné onemocnění sítnice je uveden na Obr. 12.



**Obr. 12.** Algoritmus různých postupů použitých u pacientů s podezřením na monogenně podmíněné onemocnění sítnice.



## 5. VÝSLEDKY

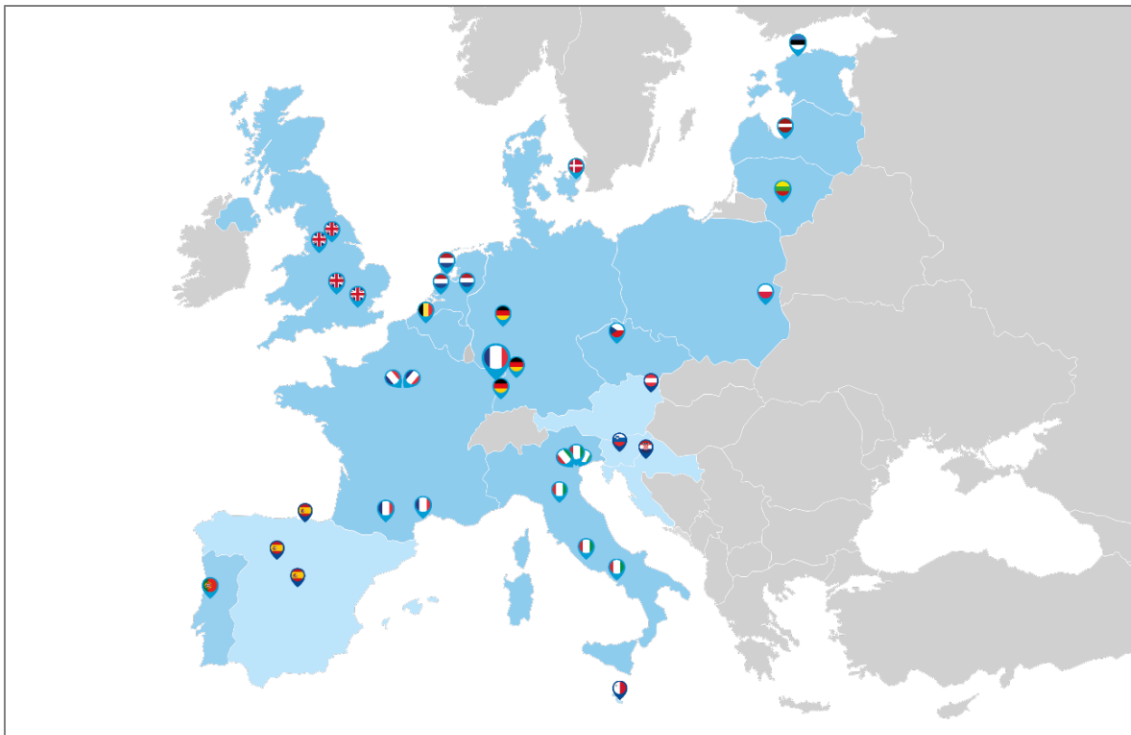
V rámci postgraduálního studia jsme vyhledali, vyšetřili a izolovali DNA od více než 800 pacientů a jejich rodinných příslušníků. Ve formě publikačních výstupů jsme provedli klinickou charakterizaci a identifikaci molekulárně genetické příčiny u 103 jedinců ze 76 rodin s různými dědičnými dystrofiemi sítnice. U dalších 31 pacientů z 23 rodin s určenou molekulárně genetickou příčinou je publikace v přípravě, nicméně uvedena byla v rámci konferenčních abstraktů v příloze časopisu *Acta Ophthalmologica* (Kousal B. et al., 2017).

Při prosazování oční genetiky jako samostatného podoboru v oftalmologii jsme v roce 2014 založili a průběžně rozšiřovali činnost Centra klinické oční genetiky 1. LF UK a VFN v Praze, které dispenzarizuje pacienty s monogenně dědičnými onemocněními oka a při hledání molekulárně genetické příčiny jejich onemocnění úzce spolupracuje s Laboratoří pro studium vzácných nemocí 1. LF UK (skupina doc. Petry Liškové). Od roku 2018 také centrum spolupracuje se společností Laboratoře AGEL, která jako první v ČR zavedla diagnostický panel genů podílejících se na vzniku monogenně podmíněných onemocnění oka (<https://www.agellab.cz/>).

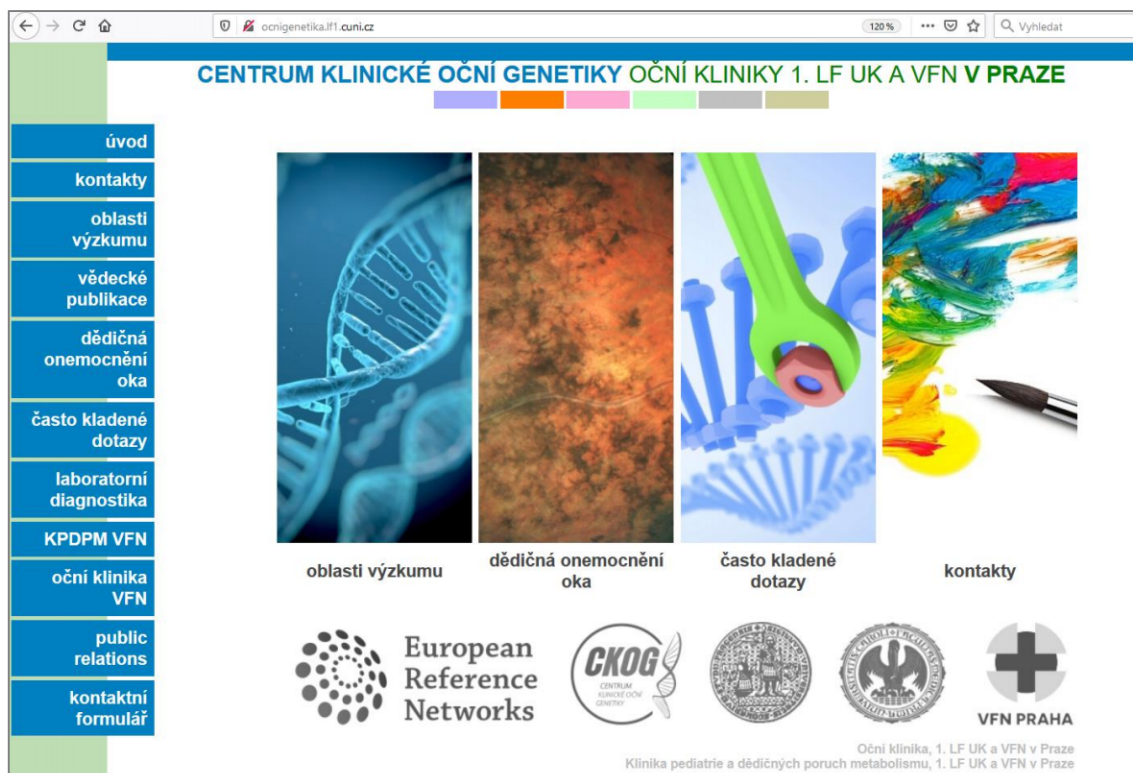
Účastníme se práce v Evropské referenční síti pro vzácná onemocnění oka (ERN-EYE, <https://www.ern-eye.eu/>), která v současné době sdružuje 29 poskytovatelů zdravotnické péče ze 13 evropských zemí (Obr. 13). Z České republiky se do ERN-EYE zapojila především díky činnosti námi založeného Centra klinické oční genetiky pouze Oční klinika 1. LF UK a VFN v Praze. Zapojení předcházelo poskytnutí rozsáhlé dokumentace, posuzovala se odborná úroveň, přístrojové a personální zajištění, úroveň spolupráce s patientskými organizacemi a další kritéria. Hlavním záměrem je podpora vysoce kvalitní, komplexní a nákladově efektivní zdravotní péče pro pacienty se vzácnými chorobami prostřednictvím úzké spolupráce specializovaných zdravotnických zařízení v rámci celé Evropské unie. Od projektu ERN-EYE je očekáván vývoj nových modelů péče a nástrojů elektronického zdravotnictví. Navýšení počtů pacientů zapojených do velkých klinických studií pak podpoří výzkum a přispěje k vývoji nových léků. Lepší využití finančních zdrojů bude mít pozitivní vliv na udržitelnost péče národních zdravotnických systémů.

Provozujeme a průběžně aktualizujeme vlastní internetovou doménu <https://ocnigenetika.lf1.cuni.cz/> s edukačním obsahem o dědičných onemocněních oka včetně výčtu možností preimplantační diagnostiky, o kontroverzní preventivní

suplementaci vysokými dávkami vitamínu A a s nastíněním budoucích terapií. Webové stránky jsme také sami graficky navrhli, naprogramovali a realizovali (Obr. 14).



Obr. 13. Mapa poskytovatelů zdravotnické péče zařazených do Evropské referenční sítě pro vzácná onemocnění oka (ERN-EYE).



Obr. 14. Edukační internetová doména <https://ocnigenetika.lf1.cuni.cz/>.

### 5.1 Nesyndromová retinitis pigmentosa

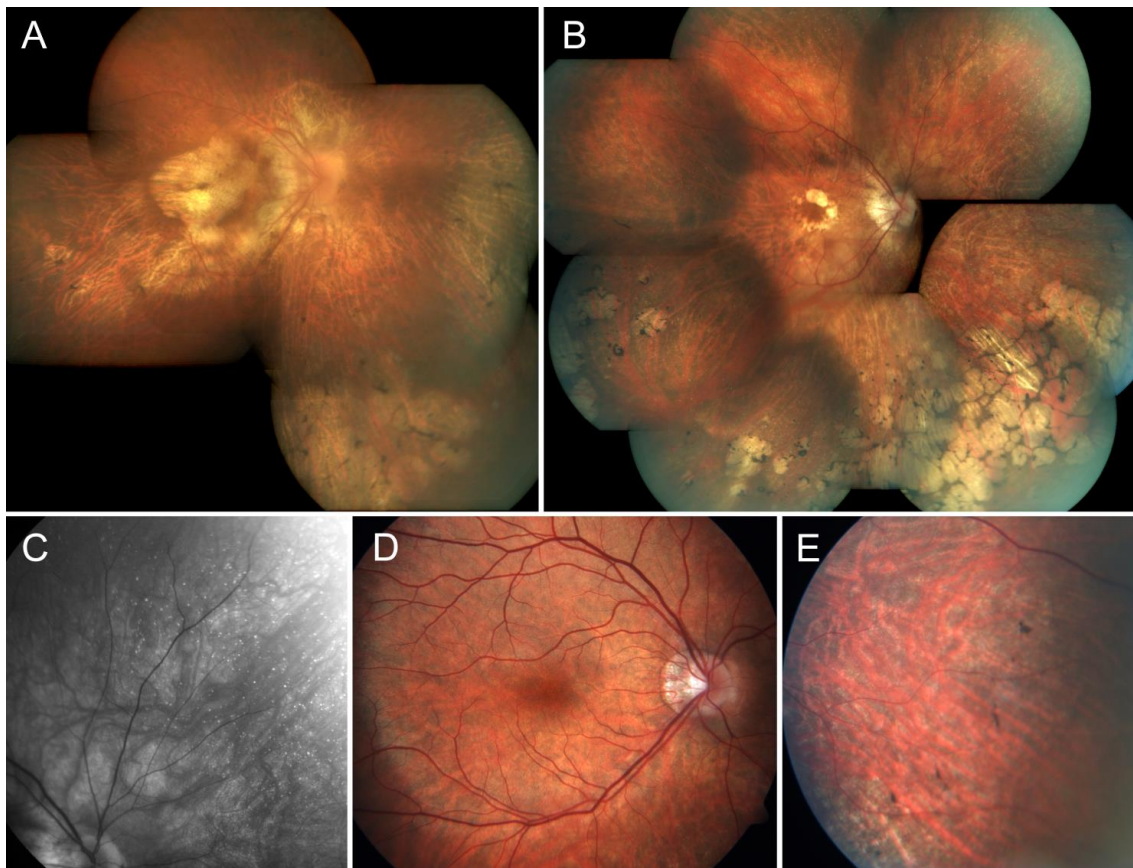
#### **Příloha 1. Klinické nálezy u členů české rodiny s retinitis pigmentosa podmíněnou mutací v ORF15 genu *RPGR***

#### **Příloha 2. Severe retinal degeneration in women with a c.2543del mutation in ORF15 of the *RPGR* gene**

V literatuře se nám podařilo u pacientů českého původu zdokumentovat molekulárně genetickou příčinu onemocnění u dvou rodin s X-vázanou formou retinitis pigmentosa.

V jedné velké rodině jsme identifikovali patogenní mutaci c.2426\_2427del; p.(Glu809Glyfs\*25) v exonu ORF15 genu *RPGR* (referenční sekvence NM\_001034853.1). Analyzovali jsme klinické záznamy za období 13 let a podrobně jsme vyšetřili dva postižené bratrance ve věku 22 let, tři přenašečky a jednu ženu, u které nebyla mutace zjištěna. U prvního z vyšetřených mužů byla NKZO 0,63 oboustranně s korekcí na pravém oku  $-3,75$  D =  $-2,00$  cyl ax  $15^\circ$  a na levém oku  $-3,5$  D =  $-2,00$  cyl ax  $165^\circ$ . Kontrastní citlivost a barvocit byly v normě, šeroslepost popíral. Vyšetření fundu odhalilo ve střední periférii přítomnost typických shluků pigmentu ve tvaru kostních buněk. Zorné pole bylo oboustranně excentricky zúženo se zachováním přibližně centrální třetiny. ERG vyšetření prokázalo snížení aktivity tyčinek na 10 % normálních hodnot, funkce čípků dosahovala 20 % normálních hodnot. Druhý muž popsal těžkou šeroslepost, kterou pozoroval od 15 let věku. Jeho NKZO byla vpravo 0,3 s korekcí  $-7,0$  D =  $-1,25$  cyl ax  $10^\circ$  a vlevo 0,5 s korekcí  $-6,0$  D =  $-1,0$  cyl ax  $180^\circ$ . Zaznamenána byla oboustranně snížená kontrastní citlivost a porucha barvocitu spolu se zúžením zorného pole až k  $5^\circ$ . Aktivita světločivých buněk byla při klasickém ERG vyšetření již vyhaslá, na multifokální ERG byla však detekovatelná čípková aktivita v centrální oblasti sítnice do  $7^\circ$  excentricity. Vyšetření fundu prokázalo typické známky pokročilé retinitis pigmentosa. Žádná z přenašeček netrpěla subjektivně šeroslepostí, dvě z nich měly sníženou NKZO na 0,5 a méně alespoň na jednom oku. Ani u jedné nebyly zjištěny shluky pigmentu ve tvaru kostních buněk nebo charakteristický vzhled fundu označovaný jako tapetoidní (kovový) reflex. U všech očí přenašeček byl přítomen astigmatismus větší než 1,5 cyl (Příloha 1).

Dále jsme popsali fenotyp (Obr. 15) a provedli molekulárně genetickou analýzu u 18 členů (9 žen a 9 mužů) pětigenerační rodiny s retinitis pigmentosa. Typické známky



**Obr. 15.** Spektrum nálezů na očním pozadí u dvou žen a jednoho muže s retinitis pigmentosa na podkladě mutace c.2543del v exonu ORF15 genu *RPGR*. Složená barevná fotografie fundu pravého oka 54leté ženy (A) a pravého oka 50leté ženy (B) s chorioretinální degenerací v makule a periferii. Zvýraznění bílých teček v horním nasálním kvadrantu sítnice pravého oka 50leté ženy na snímku v bezčerveném světle (C). Barevná fotografie fundu 19letého muže s relativně zachovanou makulou (D) a shluky pigmentu ve střední periferii (E).

onemocnění vykazovalo 5 mužů a 4 ženy, všichni měli myopii a astigmatismus. Čtyři ženy dle údajů ostatních členů rodiny osleply v průběhu šesté nebo sedmé dekády života, přičemž u jedné z nich byl tento stav potvrzen oftalmologickým vyšetřením. U všech 5 mužů byly přítomny při vyšetření očního pozadí shluky pigmentu, myopie a astigmatismus, tyto známky byly zjištěny také u jedné ženy, která měla v šesté dekádě života pouze zbytky zorného pole na obou očích. Tři další ženy trpěly střední až těžkou myopií a myopickým astigmatismem bez přítomnosti charakteristických pigmentových depozit. Vzhledem k závažnému postižení žen i mužů v po sobě jdoucích generacích byl zprvu považován za nejpravděpodobnější autozomálně dominantní typ přenosu. Nicméně tato hypotéza byla nakonec na základě studia literatury přehodnocena a provedeno bylo přímé sekvenování exonu ORF15 genu *RPGR* (referenční sekvence

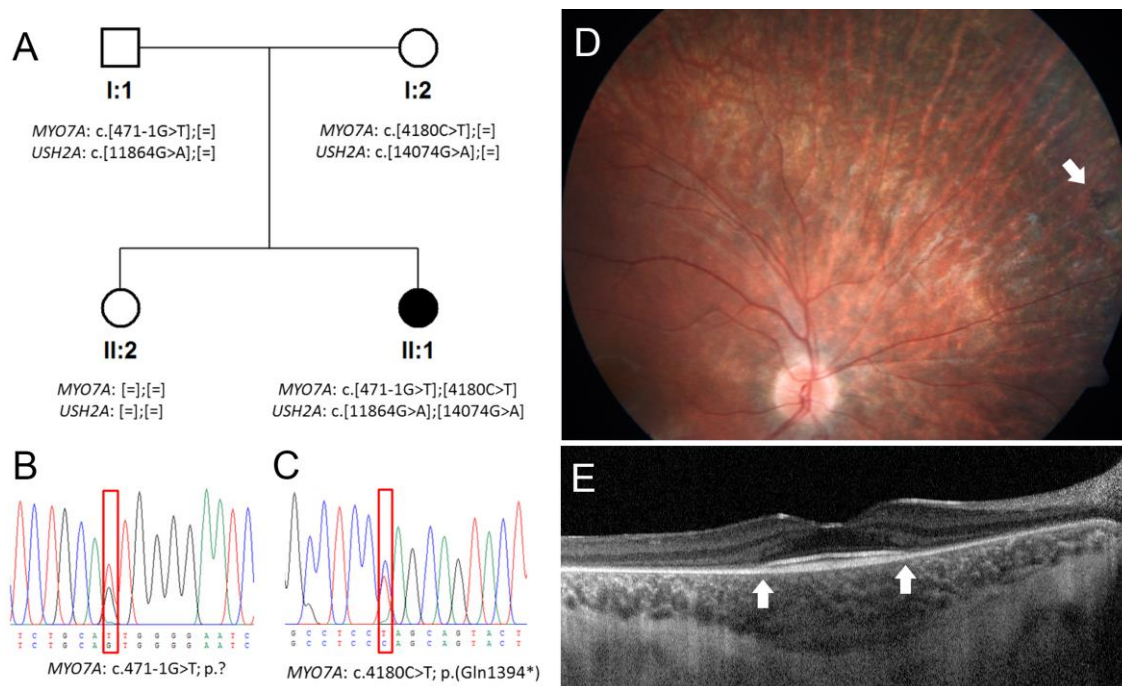
NM\_001034853.1), kterým byla detekována patogenní varianta c.2543del; p.(Glu848Glyfs\*241). Tato změna byla identifikována i u jedné ženy s refrakční vadou bez typických známek retinitis pigmentosa a dále u 34leté asymptomatické ženy s nekorigovanou zrakovou ostrostí 1,0 a normálním nálezem při očním vyšetření. Potvrdili jsme, že na rozdíl od typického mírného klinického nálezu může mutace c.2543del vést u přenašeček k úplné slepotě (Příloha 2).

## 5.2 Usherův syndrom

### **Příloha 3. SD-OCT imaging as a valuable tool to support molecular genetic diagnostics of Usher syndrome type 1**

V rámci detailní klinické charakterizace a hledání molekulárně genetické příčiny Usherova syndromu jsme identifikovali 5 pacientů s Usherovým syndromem typu I (Kousal B. et al., 2017). Na případu 4, 75leté probandky jsme poukázali, že SD-OCT je zvláště u dětí, které ještě nemohou podstoupit vyšetření zorného pole, užitečným nástrojem k posuzování vlivu zjištěných mutací na fenotypové projevy a může nejenom potvrdit diagnózu, ale sloužit i k monitoraci progresu onemocnění. U této pacientky s kongenitální hluchotou a poruchou rovnováhy jsme konkrétně našli v pozici trans varianty ve dvou různých genech odpovědných za vznik Usherova syndromu: c.471-1G>T; p.(?) a c.4180C>T; p.(Gln1394\*) v genu pro *MYO7A* (myosin VIIA, referenční sekvence NM\_000260.3) spojovaný s výskytem Usherova syndromu typu I a c.11864G>A; p.(Trp3955\*) a c.14074G>A; p.(Gly4692Arg) v *USH2A* (referenční sekvence NM\_206933.2) spojovaný s výskytem Usherova syndromu typu II (Obr. 16A–C). Zatímco tři byly vyhodnoceny jako patogenní, u varianty c.14074G>A v *USH2A* byly údaje v literatuře a databázích kontroverzní. I přes téměř normální nález na očním pozadí (Obr. 16D), bez typických shluků pigmentu, jsme pomocí SD-OCT zjistili jasně prokazatelný úbytek fotoreceptorů v oblasti makuly (Obr. 16E), což spolu s poruchou rovnováhy a těžkou kongenitální hluchotou, vyžadující kochleární implantáty, potvrdilo diagnózu Usherova syndromu typu I.





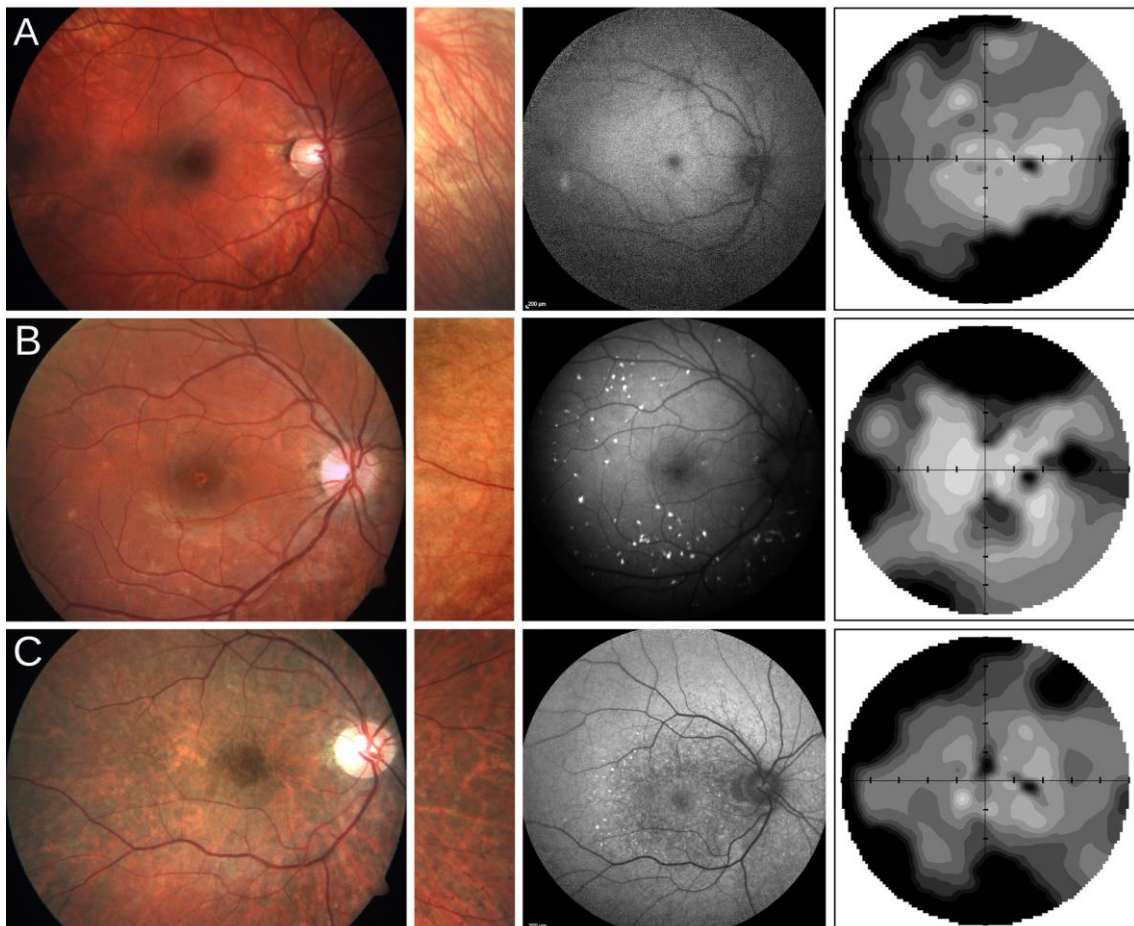
**Obr. 16.** Segregace vzácných variant identifikovaných v genech asociovaných s Usherovým syndromem ve studované rodině a oční nález u 4,75letého dítěte s Usherovým syndromem typu I. Rodokmen rodiny (A), sekvenční chromatogramy nových mutací spojených s Usherovým syndromem typu I c.471-1G>T (B) a c.4180C>T (C) v *MYO7A*. Barevná fotografie fundu pravého oka ukazuje jeden shluk pigmentu (označen šipkou) a zrnění retinálního pigmentového epitelu ve střední periférii sítnice (D). SD-OCT zobrazuje ztenčení sítnice a cévnatky, šipky vymezují oblast neporušených fotoreceptorů (E).

### 5.3 Danonova choroba

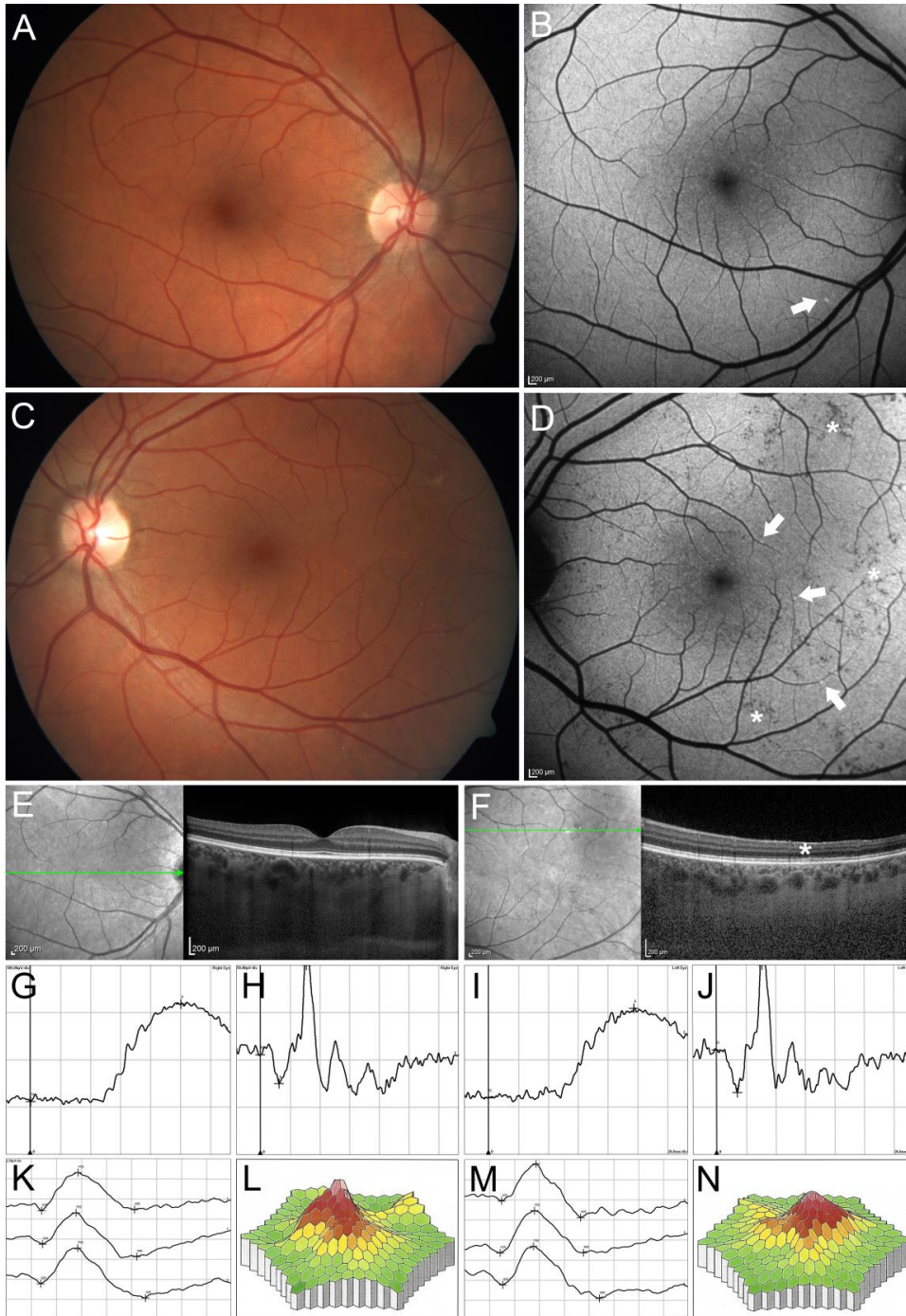
#### **Příloha 4. Pigmentary retinopathy can indicate the presence of pathogenic *LAMP2* variants even in somatic mosaic carriers with no additional signs of Danon disease**

Jako další příklad syndromové retinitis pigmentosa jsme popsali oční fenotyp Danonovy choroby u 10 pacientů (3 postižení muži, 7 postižených heterozygotních žen) ze 7 rodin s již dříve publikovanými mutacemi v genu *LAMP2* (Majer F. et al., 2012, 2014, 2018). Kromě toho jsme uvedli také nález u asymptomatické ženy se somatickým mozaicismem na podkladě *de novo* vzniklé mutace v genu *LAMP2*. U všech 10 pacientů s Danonovou nemocí byla přítomna abnormální distribuce pigmentu v sítnici s korespondujícími oblastmi hyper a hypoautofluorescence (Obr. 17). Pomocí SD-OCT jsme našli ložiskové přerušení linie RPE, chybění a změny ve vrstvě fotoreceptorů. Závažnost nálezu na sítnici se obecně zvyšovala s věkem. Patologický nález na sítnici

byl zjištěn u všech žen, avšak v porovnání s muži podobného věku bylo jejich postižení méně závažné. U asymptomatické ženy se somatickým mozaicismem byl biomikroskopický nálezn na fundu (Obr. 18A–C) i vyšetření SD-OCT (Obr. 18E, F) bilaterálně v normě, nicméně autofluorescence fundu levého oka vykazovala ložiskovou poruchu distribuce (Obr. 18D).



**Obr. 17.** Oční fenotyp a statická perimetrie u mužů s Danonovou chorobou. Barevná fotografie očního pozadí (levý sloupec), detail periferie sítnice (levý prostřední sloupec), autofluorescence fundu (pravý prostřední sloupec) a 50° zorného pole (pravý sloupec) pravého oka 17letého (A), 18letého (B) a 35letého (C) pacienta. V nálezech je pigmentová retinopatie přítomna zejména v periferii sítnice, autofluorescence fundu s oblastmi hyper a hypoautofluorescence koresponduje se změnami retinálního pigmentového epitelu a citlivost zorného pole je difuzně snižená.



**Obr. 18.** Oční nález u 45leté asymptomatické ženy se somatickým mozaickým patogenní varianty genu *LAMP2*. Normální nález na barevné fotografii očního pozadí pravého (A) a levého (C) oka. Autofluorescence fundu pravého (B) a levého (D) oka ukazuje jen jedno hyperautofluorescentní ložisko pravého oka (označeno šipkou), abnormální distribuci autofluorescence levého oka s četnými hypoautofluorescentními (označeny hvězdičkami) a několika hyperautofluorescentními (označeny šipkami) tečkovitými ložisky. SD-OCT pravého (E) a levého (F) oka s oblastí korespondující s hyperautofluorescentním ložiskem (označena hvězdičkou). Normální odpovědi při klasické ERG pravého (G – skotopické), (H – fotopické), (K – strukturované) a levého (I – skotopické), (J – fotopické), (M – strukturované) oka a snížení odpovědi pravého (L) a levého (N) oka při multifokální ERG.



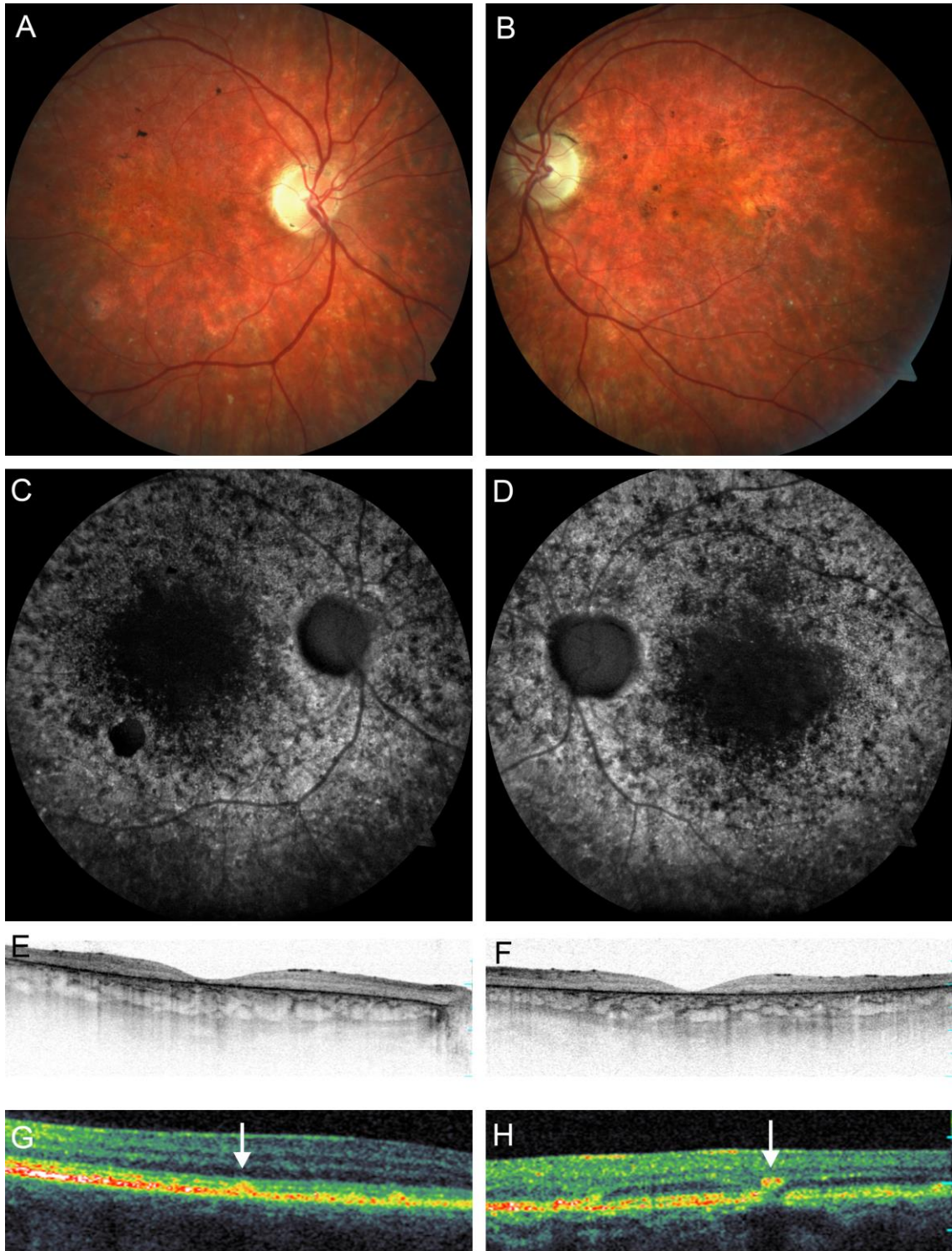
#### 5.4 Stargardtova choroba

### **Příloha 5. Molekulárně genetická příčina a klinické nálezy u dvou probandů se Stargardtovou chorobou**

### **Příloha 6. Resolving the dark matter of *ABCA4* for 1054 Stargardt disease probands through integrated genomics and transcriptomics**

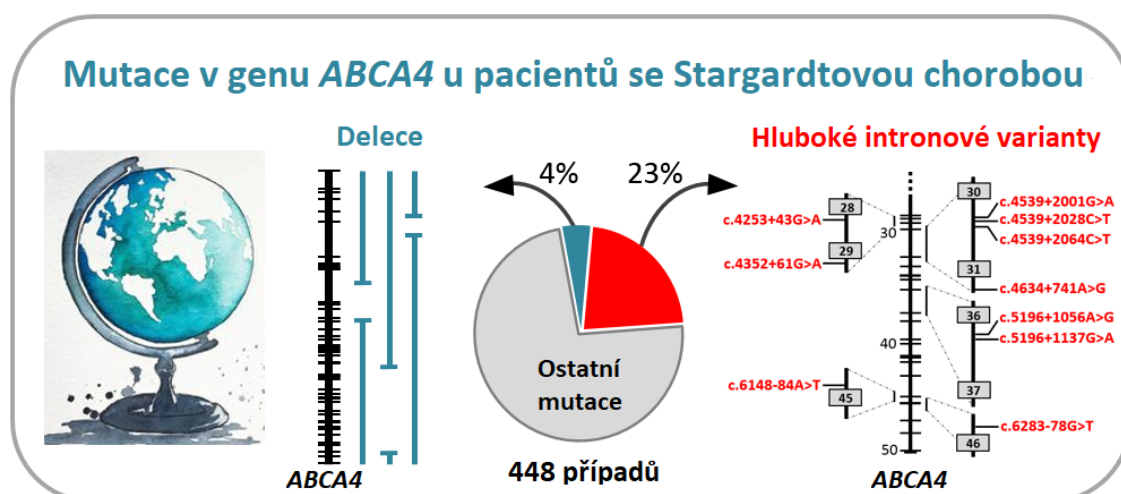
V roce 2014 jsme podali první popis Stargardtové choroby a její molekulárně genetické příčiny u pacientů českého původu. U prvního probanda, 39letého muže, byla NKZO obou očí 0,1, druhý proband, 26letý muž, měl zrakovou ostrost 0,05. Klinické vyšetření prokázalo typický nález atrofie makuly s přítomností žlutavých skvrn na očním pozadí (Obr. 19A, B). Autofluorescence fundu vykazovala poruchu distribuce. V oblastech atrofie RPE zcela chyběla, zatímco v jejich okolí jsme pozorovali nepravidelně zrnitou autofluorescenci. Naopak v místech hromadění lipofuscinových depozit byla autofluorescence zvýšena (Obr. 19C, D). Vyšetření SD-OCT odhalilo oboustranně chybění linie elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů, ztenčení neuroretiny a nepravidelnosti RPE (Obr. 19E–H). V souladu s autozomálně recesivním typem přenosu byla rodinná anamnéza pro Stargardtovu chorobu v obou případech negativní. Molekulárně genetickým vyšetřením bylo zjištěno, že první proband je nositelem mutace c.4234C>T; p.(Gln1412\*) v exonu 28 a c.5882G>A; p.(Gly1961Glu) v exonu 42 genu *ABCA4* (referenční sekvence NM\_000350.2). U druhého probanda byla detekována pouze jedna známá patogenní mutace c.1988G>A; p.(Trp663\*) v exonu 14.

V rozsáhlé mezinárodní studii, které jsme se účastnili spolu s vědci z dalších 20 zemí z celého světa, byly identifikovány doposud neodhalitelné příčinné mutace v genu *ABCA4* u 448 jedinců se Stargardtovou chorobou, z toho 56 probandů bylo vyšetřeno v rámci našeho Centra klinické oční genetiky a jejich DNA izolována v Laboratoři pro studium vzácných nemocí Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK a VFN v Praze. Použita byla nákladově efektivní metoda založená na sekvenování celého genu *ABCA4* sestávajícího ze 128 313 párů bází pomocí molekulárních inverzních sond. Poloautomatickým postupem proběhlo testování více než 1 000 probandů se Stargardtovou chorobou a podobnými makulopatiemi na přítomnost příčinných mutací. Nalezeno bylo kromě mutací v kódujících úsecích i 105 kauzálních mutací, které se nacházejí v intronech genu *ABCA4*, což vedlo k narušení sestřihu mRNA a vzniku



**Obr. 19.** Klinický nález 26letého probanda se Stargardtovou chorobou. Barevná fotografie fundu dokumentující atrofii neuroretiny a retinálního pigmentového epitelu v makule pravého (A) a levého (B) oka s malými žlutobílými ložisky v periférii. Chybění autofluorescence makuly pravého (C) a levého (D) oka s ložiskovým zvýšením autofluorescence fundu v místech hromadění lipofuscinu. SD-OCT makuly pravého (E) a levého (F) oka prokazující ztenčení neuroretiny, absenci linie elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů a atrofii retinálního pigmentového epitelu. Hyperreflektivní ložiska rozdělená na typ 1 (G) a typ 2 (H) podle hloubky uložení v sítnici (označena šipkami) a odpovídající žlutobílým skvrnám na SD-OCT levého oka.

nefunkčního proteinu ABCA4. Celkově byly tyto doposud neodhalitelné mutace nalezeny u 27 % ze 448 případů, což ukazuje na jejich vysoký podíl u Stargardtovy choroby (Obr. 20). Sangerovo ověřování přítomnosti patogenních mutací a jejich segregace v českých rodinách pak proběhlo opět v Laboratoři pro studium vzácných nemocí. Do souboru byl zavzat i proband 2 publikovaný v roce 2014, a byl tak dořešen nálezem druhé patogenní mutace c.3377T>C; p.(Leu1126Pro) v pozici trans. V rámci studie se zároveň podařilo vyvinout test s nízkými náklady na sekvenování.



**Obr. 20.** Identifikace doposud neodhalitelných příčinných mutací v genu *ABCA4* u 448 jedinců se Stargardtovou chorobou pomocí metod genomiky a transkriptomiky.

### 5.5 Závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací

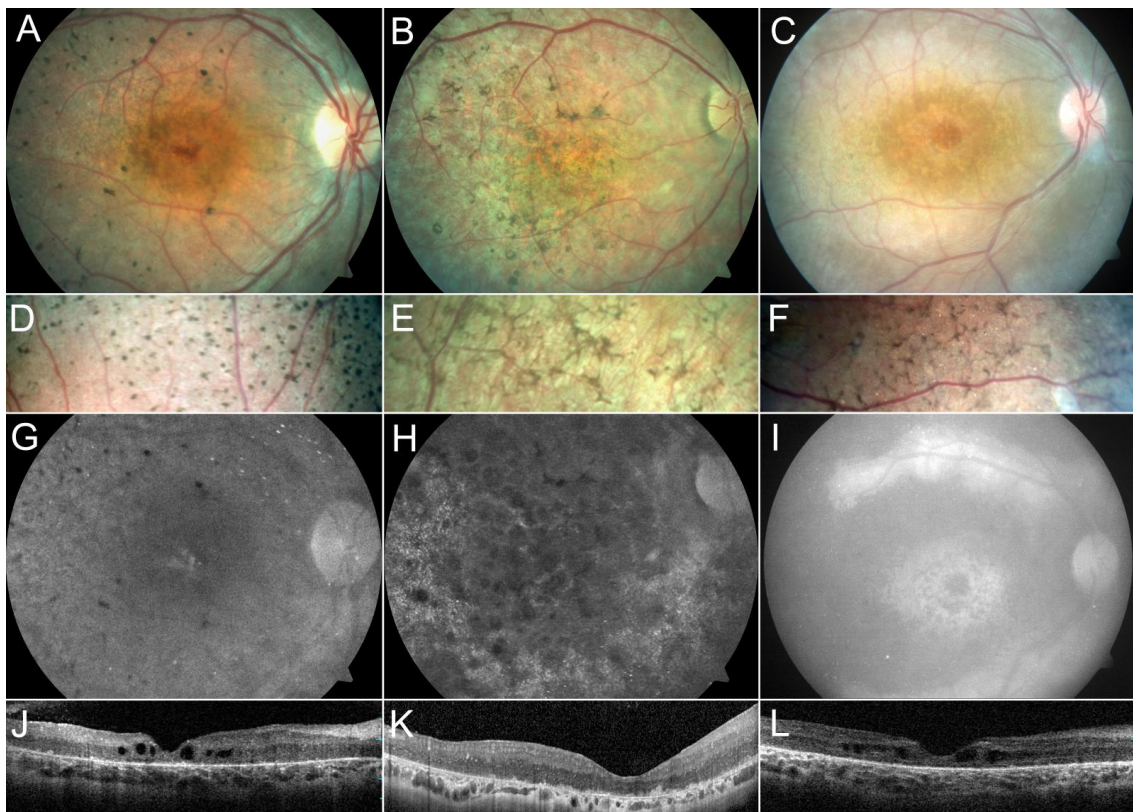
#### **Příloha 7. Phenotypic features of *CRB1*-associated early-onset severe retinal dystrophy and the different molecular approaches to identifying the disease-causing variants**

#### **Příloha 8. Review of *SRD5A3* disease-causing sequence variants and ocular findings in steroid 5 $\alpha$ -reductase type 3 congenital disorder of glycosylation, and a detailed new case**

Náš výzkum rozšířil spektrum patogenních mutací v genu *CRB1* (crumbs 1, cell polarity complex component) asociovaných se závažnými dystrofiemi sítnice s časnou manifestací a zdůraznil význam detailního klinického popisu pro interpretaci genetických dat. Průměrný věk dětských pacientů v době vyšetření byl 6,8 let (rozpětí 5,5–8,5 let).



Identifikovali jsme tři pacientky českého původu s mutacemi v genu *CRB1*. Znamky onemocnění byly u všech tří probandek poprvé popsány před 7 rokem věku. U dvou probandek byly ve věku 6 a 7 let zjištěny numulární shluky pigmentu v periférii sítnice (Obr. 21A, C, D, F) a pomocí SD-OCT cystoidní prázdné prostory v makulách obou očí (Obr. 21J, L). U třetí probandky byly ve věku 28 let dokumentovány shluky pigmentu tvaru kostních buněk (Obr. 21B, E), zvýšení tloušťky vrstvy nervových vláken a ztluštění sítnice okolo fovey (Obr. 21K). U všech tří jedinců byla detekována příčinná mutace



**Obr. 21.** Závažná dystrofie sítnice s časnou manifestací u tří probandek s mutací v genu *CRB1*. Barevná fotografie fundu pravého oka s numulárními shluky pigmentu u probandky 1 ve věku 6 let (A), numulárními pigmentacemi a shluky pigmentu tvaru kostních buněk u probandky 2 ve věku 28 let (B) a změnami retinálního pigmentového epitelu u probandky 3 ve věku 7 let (C). Detail pigmentových depozit v periférii sítnice u probandky 1 (D), 2 (E) a 3 (F). Snížení intenzity autofluorescence fundu u všech tří jedinců, s izolovanými hyperautofluorescentními tečkami ve střední periférii u probandky 1 (G), nepravidelnou skvrnitou autofluorescencí z důvodu změn retinálního pigmentového epitelu u probandky 2 (H) a relativně zachovaným retinálním pigmentovým epitelem podél cévních arkád a v makule u probandky 3 (I). SD-OCT dokumentovala intraretinální cystoidní prostory, ztluštění sítnice okolo fovey a ztrátu stratifikace sítnice u probandky 1 (J), disrupci zóny elipsoidů vnitřních segmentů fotoreceptorů, ztrátu zevní limitující membrány a stratifikace sítnice a atrofii retinálního pigmentového epitelu u probandky 2 (K) a intraretinální cystoidní prostory u probandky 3 (L).

c.2843G>A; p.(Cys948Tyr) v genu *CRB1* (referenční sekvence NM\_201253.2). U jedné probandky byla tato mutace v homozygotní konstituci. U dalších dvou probandek byly nalezeny ještě nové mutace c.2308G>A; p.(Gly770Ser) a c.3121A>G; p.(Met1041Val) v heterozygotním stavu. K detekci variant způsobujících onemocnění jsme použili tři různé přístupy zahrnující exomové sekvenování, genotypovací mikročip a metodu přímého sekvenování kandidátního genu (Příloha 7).

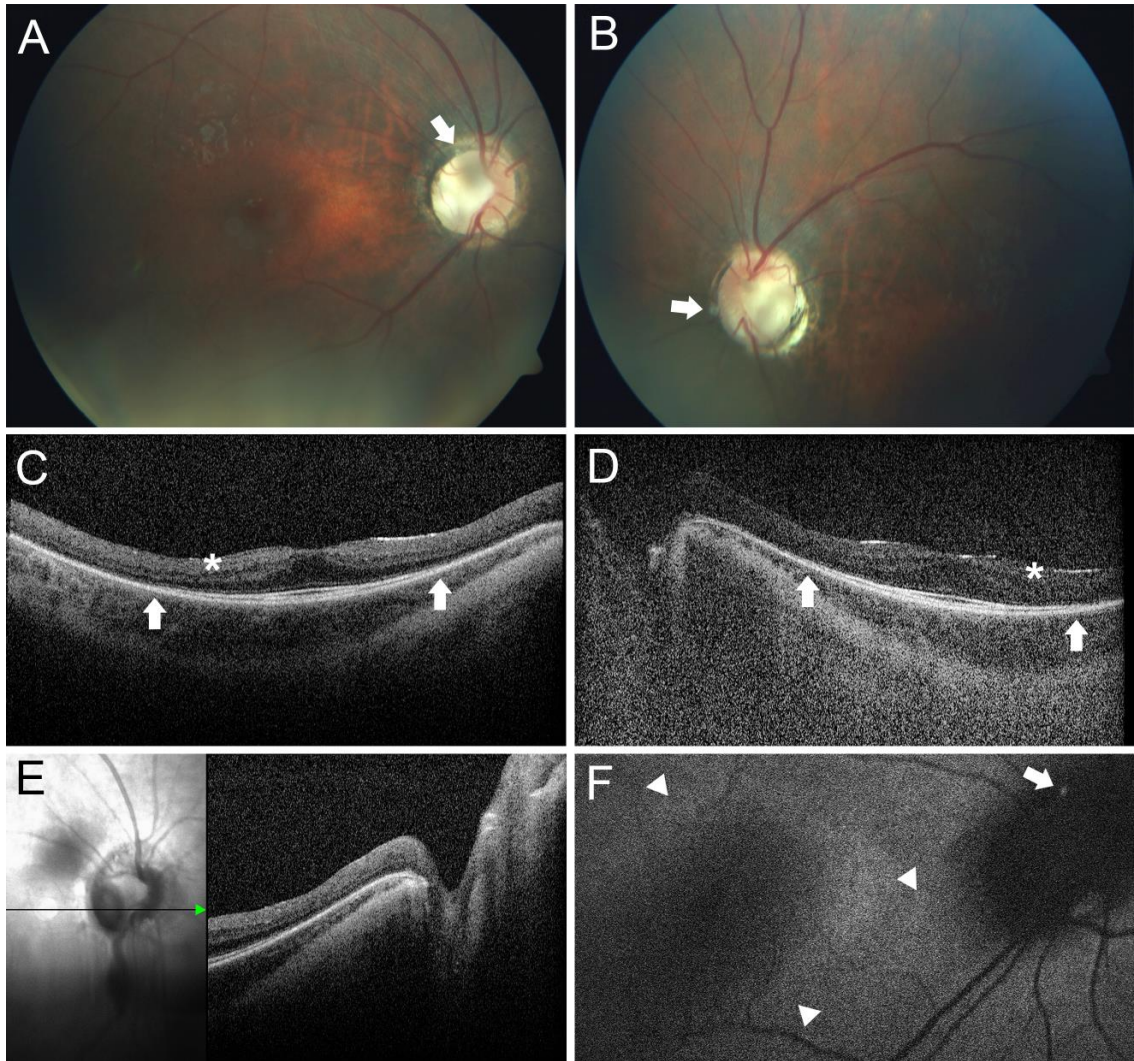
U 12leté dívky jsme poukázali na výskyt závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací u dědičné poruchy glykosylace (CDG, congenital disorder of glycosylation) typu Iq zapříčiněné novou homozygotní mutací c.436G>A; p.(Glu146Lys) v genu *SRD5A3* (steroid 5 $\alpha$ -reductase type 3, referenční sekvence NM\_024592.4) (*SRD5A3*-CDG, OMIM #612379). Souhrnem očních nálezů všech dosud popsanych pacientů v literatuře jsme konstatovali, že dystrofie sítnice je u tohoto onemocnění zřejmě konstantním znakem. U námi vyšetřené pacientky byl ve věku 13 měsíců diagnostikován kongenitální nystagmus a bilaterální neuropatie optiku. Vyšetření SD-OCT a autofluorescence fundu (Obr. 22C–F), provedené ve věku 12 let, dále ukázala jasné známky dystrofie sítnice, která nebyla až do našeho detailního očního vyšetřování rozpoznána. NKZO byla snížena na 0,15 na pravém oku a 0,16 na levém oku, na obou očích byl přítomen složený myopický astigmatismus. U probandky byly také bilaterálně nalezeny drúzy papil zrakových nervů (Obr. 22A, B, F), které nebyly u tohoto syndromu dříve pozorovány.

V rámci práce jsme dále provedli souhrn všech dosud publikovaných patogenních mutací. Celkem jich bylo zjištěno 15 ve 25 různých rodinách, včetně naší studie (Příloha 8).

### 5.6 Achromatopsie

#### **Příloha 9. Molekulárně genetická příčina achromatopsie u dvou pacientů českého původu**

Poprvé jsme u dvou pacientů českého původu s klinickou diagnózou či podezřením na achromatopsii provedli detekci kauzálních mutací. Bylo zjištěno, že proband 1 je nositelem složené heterozygotní mutace c.819\_826del; p.(Arg274Valfs\*13) a c.1006G>T; p.(Glu336\*) v genu *CNGB3* (referenční sekvence NM\_019098.4) a proband 2 je homozygotem pro mutaci c.1148del; p.(Thr383Ilefs\*13) opět v genu *CNGB3*, ve kterém se u pacientů evropského původu nejčastěji nacházejí mutace asociované se vznikem achromatopsie.

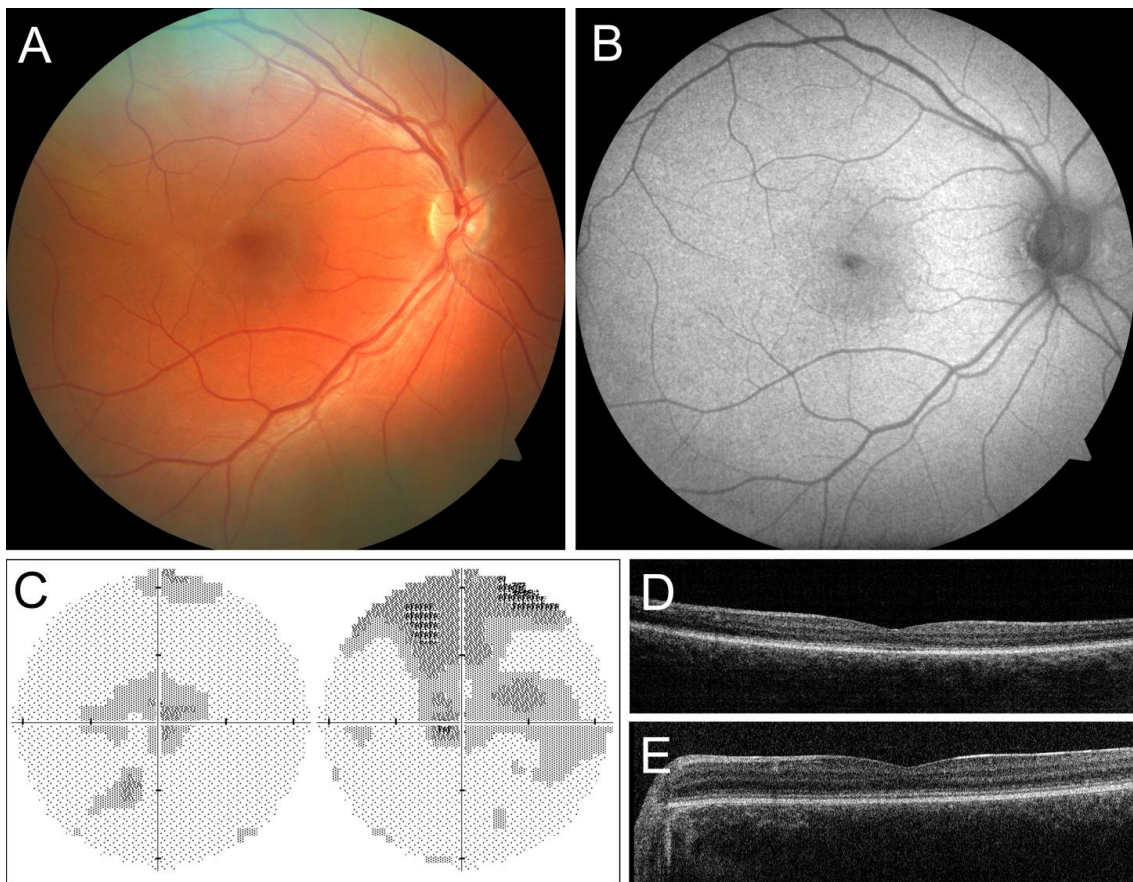


**Obr. 22.** Oční nálezy u 12leté pacientky s vrozenou poruchou glykosylace zapříčiněnou mutací v genu *SRD5A3*. Fotografie fundu pravého (A) a levého (B) oka zobrazují jemné zrnění retinálního pigmentového epitelu v periferii sítnice, bledou papilu zřakového nervu a malé povrchové drúzy na jeho okraji (označeny šipkou). SD-OCT makuly pravého (C) a levého (D) oka se ztrátou zevních vrstev sítnice periferně od makuly a relativním zachováním centra sítnice (vymezeno bílými šipkami). Hvězdičky označují ztrátu gangliových buněk sítnice. Horizontální sken SD-OCT papilou pravého oka (E) dokumentuje šikmý prostup cév a nervových vláken. Autofluorescence fundu pravého oka (F) zobrazuje hyperautofluorescentní kroužek kolem makuly (ohraničený trojúhelníky) a malou povrchovou drúzu na okraji papily zřakového nervu (označena šipkou). Kvalita zobrazení sítnice byla omezena obtížnou spoluprací a nystagmem.

NKZO byla u probanda 1 ve věku 19 let oboustranně 0,1 a u probanda 2 ve věku 8 let na pravém oku 0,05 a na levém oku 0,1. Klinicky se achromatsie projevila u obou postižených jedinců světloplachostí, nízkou zřakovou ostrostití, poruchou barvocitu a nystagmem. Biomikroskopický nález na sítnici byl u obou probandů normální



(Obr. 23A), avšak vyšetření pomocí SD-OCT (Obr. 23D, E) prokázalo mírné oboustranně symetrické strukturální změny ve fovee.



**Obr. 23.** Klinický nález dvou probandů s achromatopsií. Barevná fotografie fundu pravého oka (A), autofluorescence fundu pravého oka (B), statická perimetrie pravého a levého oka (C), SD-OCT levého oka 19letého jedince (D). SD-OCT levého oka 8letého jedince (E).

## 6. DISKUZE

Geneticky podmíněná onemocnění sítnice jsou vysoce heterogenní skupinou chorob, jejichž přesná diagnostika je i přes zdokonalující se zobrazovací techniky obtížná. Možnost stanovení diagnózy na úrovni genu a klinické testování nových cílených terapií u dědičných dystrofií sítnice umožnily vznik geneticky zaměřené klinické péče v oftalmologii. V České republice ani v dalších zemích střední a východní Evropy nebyla tato onemocnění dosud předmětem systematického výzkumu. Počet pacientů, spektrum jejich klinického postižení ani molekulárně genetické příčiny nebyly tedy známy. Neexistovala žádná doporučení pro odborné lékaře ani srozumitelné informace pro pacienty v českém jazyce.

Založením Centra klinické oční genetiky 1. LF UK a VFN v Praze byla v roce 2014 vyplněna v České republice odborně dosud nepokrytá oblast a vzácná geneticky podmíněná onemocnění oka začala být předmětem systematického sledování. Centrum splňuje velmi náročná kritéria péče, což bylo jedním z důvodů zařazení Oční kliniky 1. LF UK a VFN v Praze v roce 2016 do ERN-EYE. Postupně bylo u řady pacientů provedeno genetické testování, zpočátku pouze na výzkumné bázi, v roce 2017 byl sestaven panel známých genů způsobujících onemocnění oka a nastaveny podmínky úhrady zdravotními pojišťovnami. Tím se významně zvýšila výtěžnost genetického testování a Česká republika se v oblasti oční genetiky zařadila do skupiny vyspělých států, které považují diagnostiku na úrovni genů za součást standardního vyšetřovacího postupu. Zavedení molekulárně genetického testování do klinické oční praxe nejenže výrazně napomohlo upřesnění diagnózy u řady českých pacientů, ale také vedlo k lepšímu porozumění mechanismu nemoci.

### *6.1 Prohloubení poznatků o fenotypu a korelace s genotypem*

Naše studie dokumentovala intrafamiliární fenotypovou variabilitu u stejně starých pacientů s retinitis pigmentosa vzniklé na podkladě mutací v genu *RPGR*. Přítomnost střední nebo těžké myopie kombinované s astigmatismem u mužů s retinitis pigmentosa, stejně jako refrakční vady u příbuzných žen, mohou být asociovány s X vázanou dědičností (Kousal B. et al., 2013). Současně naše nálezy poukázaly na variabilitu projevu u přenašeček, které mohou být postiženy stejně závažně jako muži (Kousal B. et al., 2014).



Připomněli jsme, že správné vyhodnocení klinických známek často asociovaných s nesyndromovou retinitis pigmentosa vázanou na chromozom X a vyhodnocení rodokmenu při absenci přenosu z muže na muže napomáhá snížit procento záměny s autozomálně dominantním typem dědičnosti. Znalost typu přenosu může být pro určení molekulárně genetické příčiny retinitis pigmentosa zásadní, neboť ani metody sekvenování nové generace nejsou schopny detekovat mutace v ORF15 pro nízký stupeň variability jeho sekvence (Kousal B. et al., 2013, 2014).

U 4,75leté pacientky s podezřením na Usherův syndrom, nicméně zatím bez typických shluků pigmentu na sítnici, jsme poukázali na užitečnost vyšetření pomocí SD-OCT. Na rozdíl od vyšetření zorného pole, které je u malých dětí buď zcela neproveditelné nebo krajně nespolehlivé, poskytuje SD-OCT objektivní nález. Oční vyšetření tak značně napomohlo určit definitivní klinickou diagnózu a rozhodnout, které mutace lze u dané pacientky považovat za patogenní (Kremlíkova Pourova R. et al., 2018).

Provedli jsme popis očního nálezu u dosud největší publikované kohorty pacientů trpících Danonovou chorobou a zdůraznili užitečnost podrobného oftalmologického vyšetření a zobrazovacích metod při identifikaci přenašečů variant genu *LAMP2*, včetně jedinců se somatickým mozaicismem. Prokázali jsme, že pigmentová retinopatie spojená s Danonovou chorobou je snadno rozpoznatelná při zobrazení autofluorescence fundu u všech postižených jedinců, stejně tak byly detekovatelné změny pomocí SD-OCT s vysokým rozlišením i při normálním nálezu na očním pozadí. Nově jsme popsali fokálně zvýšené signály ve vnější jaderné vrstvě, která histologicky odpovídá jádrům fotoreceptorů, jejich podstata však nebyla dosud plně objasněna (Kousal B. et al., 2020). Předpokládá se, že na buněčné úrovni je postižení sítnice následkem akumulace zbytků zevních segmentů fotoreceptorů, nefunkčních mitochondrií a nedegradovatelného lipofuscinu v lysozomech buněk RPE (Thompson DA. et al., 2016). U asymptomatické přenašečky Danonovy choroby se somatickým mozaicismem jsme detekovali drobné abnormality sítnice při vyšetření autofluorescence sítnice a konstatovali, že tato metoda je jednoduchá a rychlá při vyhledávání potenciálních nositelů patogenních variant v genu *LAMP2* (Kousal B. et al., 2020).

Poprvé jsme u českých pacientů popsali mutace zodpovědné za vznik Stargardtové choroby. Zároveň jsme poskytli souhrn praktických poznatků plynoucích z mutační analýzy genu *ABCA4* pomocí ve své době dostupných metod a poukázali na některé problematické aspekty spojené se screeningem tohoto genu (Kousal B. et al., 2014). Nemožnost nalézt jednu nebo obě patogenní sekvenční varianty byla u této choroby za

použití dosud aplikovaných metod donedávna častým jevem (Khan M. et al., 2020). V současné době se při zjišťování mutací nejčastěji používá technologie sekvenování nové generace, provádí se screening panelu retinálních genů obsahujícího i gen *ABCA4* (Carrigan M. et al., 2016; Ścieżyńska A. et al., 2016). Revoluční přístup představuje použití molekulárních inverzních sond (Khan M. et al., 2019). Prostřednictvím rozsáhlé mezinárodní spolupráce jsme se podíleli na detekci dosud neodhalitelných mutací v genu *ABCA4* využívající tuto novou metodu. Proveden byl screening jak kódujících, tak i nekódujících částí tohoto genu. Detekována byla řada hlubokých intronových mutací, které narušují splicing genu *ABCA4* (Khan M. et al., 2020).

U českých pacientů se závažnou retinální dystrofií s časnou manifestací jsme identifikovali mutace v genu *CRB1*, jedna probandka měla homozygotní konstituci známé mutace c.2843G>A, ostatní dvě probandky byly složené heterozygotky s kombinací s dosud nepopsanými novými mutacemi (Kousal B. et al., 2016). Data z ostatních evropských populací ukazují, že mutace c.2843G>A je nejčastější variantou genu *CRB1* způsobující onemocnění sítnice (Bujakowska K. et al., 2012). K určení molekulární příčiny choroby se z hlediska rychlosti a nákladové efektivity ukázalo být nejpřínosnější exomové sekvenování. Ačkoliv u dystrofií sítnice neexistuje jednoznačná korelace genotypu a fenotypu, mohou některé klinické příznaky svědčit pro přítomnost mutace v genu *CRB1* (Jacobson SG. et al., 2003). Upozornili jsme zejména na změny uspořádání vrstev sítnice a zvětšení tloušťky RNFL, které nebylo pozorováno u jiných genů způsobujících závažnou dystrofii sítnice s časnou manifestací. Proto považujeme za nezbytné zařadit měření tloušťky RNFL mezi první kroky diagnostického postupu u všech pacientů se závažnou retinální dystrofií s časnou manifestací (Kousal B. et al., 2016).

Detailně jsme popsali oční nález u pacientky s SRD5A3-CDG na podkladě nové homozygotní mutace v genu *SRD5A3* a podali tak další důkaz, že dystrofii sítnice lze považovat za jeden ze znaků tohoto onemocnění (Kousal B. et al., 2019). Výskyt závažné dystrofie sítnice s časnou manifestací u pacientů s SRD5A3-CDG byl popsán teprve nedávno (Al-Sarraj Y. et al., 2014; Taylor RL. et al., 2017; Gupta N. et al., 2018; Khan AO., 2018), a to z několika důvodů. Nystagmus a snížená zraková ostrost byly připisovány bledé papile zřetelného nervu jako následku jeho hypoplazie či atrofie (Taylor RL. et al., 2017). SRD5A3-CDG je závažné metabolické onemocnění projevující se kromě očních symptomů svalovou hypotonií, opožděním vývoje, cerebelární ataxií (Cantagrel V. et al., 2010; Taylor RL. et al., 2017). Z důvodu obtížné spolupráce často

nebývá oční vyšetření komplexní (Kahrizi K. et al., 2009; Wheeler PG. et al., 2016), pacient obvykle není schopen absolvovat perimetrii nebo ERG a v časných stádiích nemusí být pigmentové změny sítnice zřetelné. Připomněli jsme, že v těchto případech přináší opět cenné informace neinvazivní vyšetření pomocí SD-OCT a autofluorescence fundu (Taylor RL. et al., 2017; Khan AO., 2018; Kousal B. et al., 2019). Současně jsme jako první u syndromu SRD5A3-CDG informovali o nálezů drúz zrakového nervu, který dosud nebyl pozorován (Kousal B. et al., 2019).

Detekce kauzálních mutací u achromatopsie byla u pacientů českého původu také provedena poprvé. Screeningem nejčastějších patogenních variant nalezených již dříve u pacientů z jiných evropských zemí jsme našli obě patogenní varianty pouze u dvou probandů z 11 vyšetřených (18 %), což oproti očekávaným 42 % (Mayer AK. et al., 2017) naznačuje, že u českých pacientů je spektrum a frekvence kauzálních mutací jiné. Toto zjištění však mohlo být zkruseno malým souborem pacientů. V raném dětství často nelze provést nezbytná objektivní a subjektivní vyšetření, proto stanovení diagnózy na úrovni genu je u achromatopsie velmi přínosné (Hlavatá L. et al., 2019).

## *6.2 Přínosy molekulárně genetického vyšetření onemocnění sítnice z preventivního hlediska*

Genetické testování má pro řadu pacientů s dědičným onemocněním sítnice pozitivní přínos. Při správném provedení a interpretaci napomáhá ke zpřesnění či potvrzení diagnózy, určení typu dědičnosti, k lepšímu odhadu prognózy vývoje onemocnění či stanovení léčebného plánu (Lišková P., Kousal B., 2015).

Získané poznatky jsou aktivně využívány v klinickém a genetickém poradenství v rámci primární a sekundární genetické prevence, vhodní pacienti mohou již nyní podstoupit např. preimplantační diagnostiku. V budoucnosti bude pravděpodobně možné indikovat řadu pacientů i k cíleným terapiím (např. genové) ještě předtím, než dojde k nevratnému poškození sítnice.

Vzhledem k tomu, že postižení sítnice může být jediným příznakem život ohrožujícího stavu, jakým je i Danonova choroba, je provedení molekulárně genetického vyšetření odůvodnitelné u většiny jedinců s pigmentovou retinopatií.

### 6.2.1 Časná diagnóza

Mezi velké přínosy identifikace patogenních mutací u pacientů s geneticky podmíněnými chorobami oka patří časně stanovení diagnózy, a tím i zkrácení často náročného diagnostického procesu spolu s redukcí nákladů, neboť umožňuje cílené naplánování vyšetřovacích procedur, vynechána jsou pak zbytečná vyšetření, která nepřinášejí v diagnostice nic nového (Kumaran N. et al., 2017).

Zvláště u závažných onemocnění sítnice u dětí mohou být oční projevy první známkou syndromového onemocnění, jehož průběh lze někdy ovlivnit pomocí preventivních opatření, jako např. u Joubertova syndromu, kdy je udržování rovnováhy mezi příjmem a výdejem tekutin a elektrolytů a ochranou před nefrotoxickými látkami důležité pro zabránění časné vzniklého renálního selhání (Bachmann-Gagescu R. et al., 2020). V případech, že progresi onemocnění není možno ovlivnit, např. u neuronálních ceroidních lipofuscinóz, lze alespoň pacienta ušetřit dalšího zbytečného zdlouhavého vyšetřovacího procesu a koncentrací péče do center, která mají s těmito vzácnými chorobami zkušenosti, podávat podpůrnou léčbu, včetně psychoterapie (Kohlschütter A. et al., 2019).

U dětských pacientů s Usherovým syndromem, kteří nemají ještě patrné známky onemocnění sítnice, je časná diagnostika na úrovni genu důvodem proč zavádět bilaterálně kochleární implantáty, neboť po ztrátě zraku jsou odkázáni na sluchové vjemy a nemohou znakovat (Jatana KR. et al., 2013)

### 6.2.2 Upřesnění přenosu onemocnění v rodině a jeho ovlivnění

Genetické testování vede k identifikaci členů rodiny rizikových pro vznik určitého onemocnění a může snížit opakovaný výskyt nemoci v rodinách (Kousal B. et al., 2014; Ďudřáková L. et al., 2016). Postižení jedinci mají možnost vyhledat prekoncepční poradenství, jehož cílem jako nástroje primární prevence je snížit riziko narození postiženého potomka ještě před plánovanou graviditou. Nezbytná je součinnost odborných lékařů v rámci mezioborové spolupráce. Pokud má onemocnění více rodinných příslušníků, je možno odhadnout riziko dalšího výskytu na základě Mendelových zákonů dědičnosti. Nicméně vzhledem k variabilitě nálezů, někdy

pozorované inkompletní penetranci nebo pseudodominanci může být odhad dědičnosti pouze podle genealogického rozboru nepřesný.

Genetické testování může být obzvláště důležité u jedinců, kteří nemají v širokém příbuzenstvu žádného dalšího stejně postiženého rodinného příslušníka. Je třeba totiž vyvrátit často tradovaný mýtus, že riziko přenosu na další generace je v tomto případě žádné či minimální. I když jde o tzv. sporadický výskyt, pacient může být nositelem *de novo* mutace pro autozomálně dominantní onemocnění a riziko přenosu nemoci na potomstvo je potom 50%.

Pokud se však podaří určit příčinu onemocnění na úrovni genu, lze riziko přenosu nemoci na další generace upřesnit. Je-li vysoké, tj. minimálně 25% u autozomálně recesivních onemocnění, a samotné onemocnění je z hlediska prognózy postižení zraku a časného vzniku obzvláště závažné, lze uvažovat i o podstoupení prenatální či dnes častěji preimplantační genetické diagnostiky, u které v případě pozitivního nálezu není pár vystaven rozhodnutí, zda již započaté těhotenství přerušit. Pomocí preimplantační diagnostiky lze totiž vybrat embrya bez genetické vlohy pro určité onemocnění, a tím eliminovat riziko přenosu choroby na další generace (Hlavatá L. et al., 2016). Je třeba si ale stále uvědomovat, že indikace k preimplantační diagnostice z důvodu geneticky podmíněného očního onemocnění vyžaduje vysoce individuální přístup respektující kulturní a náboženské cítění jedinců a rodin, kterých se může potenciálně týkat.

### 6.2.3 Cílené terapie

Kombinace klinických a laboratorních poznatků nám umožňuje vytipovat pacienty pro genové a jiné cílené terapie (Lišková P., Kousal B., 2015). Oko je totiž vzhledem ke snadné dostupnosti, malým rozměrům, imunologickému privilegiu, kompartmentalizaci a možnosti kontralaterální kontroly ideálním cílovým orgánem pro klinické hodnocení nových terapií (Důřáková L. et al., 2016; Straňák Z. et al., 2019).

Až na pacienty nesoucí bialelické mutace v genu *RPE65* způsobující přibližně 5 % závažných dystrofií sítnice u dětí (Kumaran N. et al., 2017), pro které byla již genová terapie schválena, a to v roce 2017 americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, Food and Drug Administration) a v roce 2018 Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA, European Medicines Agency) (Maguire AM., et al., 2019; Ciulla TA., et al., 2020), není účinná léčba pro dědičná onemocnění sítnice zatím k dispozici. Pacientům se doporučuje chránit oči pomocí slunečních brýlí před intenzivním modrým

světlem a ultrafialovým zářením, které může způsobovat zvýšené hromadění toxických sloučenin v sítnici anebo urychlit odumírání světločivých a jiných buněk sítnice. U pacientů se Stargardtovou chorobou navíc není vhodná zvýšená konzumace potravin bohatých na vitamín A či suplementace vitamínem A, protože mutace v genu *ABCA4* způsobuje chybění enzymu podílejícího se na odstraňování odpadních produktů metabolismu derivátů vitamínu A. Jeho dlouhodobé doplňování tak vede k akumulaci toxického dimeru bisretinoidu A2E v sítnici s následnou smrtí fotoreceptorů (Weng J. et al., 1999; Mihai DM. et al., 2014).

Nové léčebné metody jsou však intenzivně vyvíjeny. Podle mechanismu účinku lze zkoušené terapie dědičných onemocnění sítnice rozdělit do čtyř skupin: zabránění vzniku toxických dimerů vitamínu A (týká se pouze Stargardtovy choroby), genová terapie obnovující funkčnost genu, ochrana buněk sítnice před oxidativním poškozením a náhrada poškozeného RPE a fotoreceptorů pomocí kmenových buněk (Straňák Z. et al., 2019).

Nejblíže mají k zavedení do klinické praxe léčivé přípravky pro genovou terapii, které si kladou za cíl zastavení progresu onemocnění. Základní podmínkou pro zařazení do většiny těchto studií je potvrzení klinické diagnózy na molekulárně genetické úrovni, tedy znalost příčinných mutací (Kousal B. et al., 2016).

Genová terapie spočívá v přenosu plně funkční kopie genu s cílem nahradit sníženou či nulovou funkci proteinu, který je kódován mutovaným genem, a/nebo regenerovat či stabilizovat narušené retinální struktury (Ďudřáková L. et al., 2016). V některých případech, podle mechanismu účinku mutací, je cestou i zablokování přepisu škodlivé mediátorové RNA aplikací protisměrných oligonukleotidů (Cideciyan AV. et al., 2019).

V současné době probíhají v zahraničí klinické zkoušky genové terapie u pacientů s bialelickými mutacemi v genech *ABCA4*, *CNGA3* (cyclic nucleotide gated channel alpha 3), *CNGB3*, *PDE6B* (phosphodiesterase 6B), *RLBP1* (retinaldehyde binding protein 1), *MERTK* (MER proto-oncogene, tyrosine kinase) a *MYO7A* (Garafalo AV. et al., 2019; <http://www.clinicaltrials.gov/>). Antisense oligonukleotidy jsou testovány u pacientů s Leberovou kongenitální amaurozou na podkladě hluboké intronové mutace c.2991+1655A>G v genu *CEP290* (Cideciyan AV. et al., 2019). Předpokládá se, že pokroky na poli výzkumu povedou ke klinickým zkouškám i u řady jiných dědičných onemocnění sítnice, i proto je pro pacienty důležitá znalost molekulárně genetické příčiny jejich onemocnění (Beltran WA. et al., 2017).

Studie zaměřující se na regenerační přístupy, především výzkum kmenových buněk, jsou také nadějně, nicméně jejich začlenění do klinické praxe nelze v brzké době očekávat (Ben M'Barek K., Monville C., 2019).

#### *6.2.4 Společenské uplatnění*

U pacientů s dědičnými onemocněními sítnice napomáhá časná diagnóza a určení příčiny na úrovni genu lepšímu odhadu vývoje choroby, u Usherova syndromu pak i k jednoznačné indikaci zavedení kochleárních implantátů v raném dětství. Neméně důležitým faktorem je rovněž přizpůsobení prostředí dítěti s vypracováním specializovaných vzdělávacích plánů nebo integrace do běžných škol, což umožní těmto pacientům vhodné pracovní zařazení a společenské uplatnění.



## 7. ZÁVĚRY

Péče o pacienty s dědičnými onemocněními oka vyžaduje multidisciplinární přístup kombinující oční a genetickou diagnostiku, genetické poradenství a dlouhodobou péči o pacienty a jejich příbuzné s rizikem vzniku onemocnění. Týmová práce je důležitá nejen ke stanovení diagnózy, ale také z hlediska kvality péče a spokojenosti pacienta (Kousal B. et al., 2011). Náš výzkum pomohl objasnit faktory podílející se na etiopatogenezi dědičných onemocnění sítnice u českých pacientů, což je důležité pro časnou diagnostiku, vypracování efektivního screeningového postupu a zlepšení klinického poradenství a preventivní péče.

Projekt realizovaný v rámci postgraduálního studia vedl k monitoraci dědičných dystrofií sítnice v České republice, propojení poznatků o fenotypu se znalostmi o příčině na molekulárně genetické úrovni, zvýšení informovanosti o degenerativních onemocněních sítnice mezi odborníky i laickou veřejností, což v konečném důsledku umožňuje navrhnout vhodná preventivní opatření. Dosažen byl přímý socioekonomický přínos díky zlepšení klinického a genetického poradenství pacientům a jejich rodinám zahrnující potvrzení nebo stanovení diagnózy, zpřesnění odhadu vývoje onemocnění, potvrzení nebo stanovení typu dědičnosti či pomoc při plánování rodičovství.

Průkaz příčinných mutací umožňuje v rámci preventivních opatření nabídnout nositelům patogenních mutací zabránění přenosu onemocnění na další generaci pomocí preimplantační diagnostiky (Hlavatá L. et al., 2019). Znalost patogenních mutací jim dává naději na zapojení do klinických zkoušek testujících nové terapie (Hlavatá L. et al., 2016, 2019), v případě nositelů bialelických mutací v genu *RPE65* pak dokonce možnost podstoupit již oficiálně schválenou genovou terapii.

Závěrem lze konstatovat, že lékaři jsou stále více konfrontováni s výsledky genetického testování, oftalmology nevyjímaje. Oční specialisté by měli být schopni rozpoznat případy, u kterých by odeslání do specializované oční genetické ambulance mohlo mít přínos. K dosažení tohoto cíle je nezbytné kontinuální vzdělávání, které povede k porozumění užitečnosti molekulárně genetických testů a poradenství s přihlédnutím k potřebám každého jedince. Genetické testy by měly být v rámci vyšetřovacího procesu rutinně nabízeny zvláště u některých dědičných chorob, mezi které onemocnění sítnice patří. Současný výzkum nasvědčuje tomu, že v budoucnosti bude možno řadu dědičných onemocnění oka léčit a základním předpokladem pro tyto nové metody léčby je znalost jejich molekulárně genetické příčiny.

## LITERATURA

- Aleman TS, Han G, Serrano LW, Fuerst NM, Charlson ES, Pearson DJ, Chung DC, Traband A, Pan W, Ying GS, Bennett J, Maguire AM, Morgan JJ. Natural history of the central structural abnormalities in choroideremia: A prospective cross-sectional study. *Ophthalmology*. 2017; 124(3): 359–373.
- Al-Sarraj Y, Ben-Omran T, Tolefat M, Bejaoui Y, El-Shanti H, Kambouris M. A novel missense mutation in SRD5A3 causes congenital disorder of glycosylation type I (Cerebello-Ocular Syndrome). *J Inborn Errors Metab Screen*. 2014; 2, 3–7.
- Bachmann-Gagescu R, Dempsey JC, Bulgheroni S, Chen ML, D'Arrigo S, Glass IA, Heller T, Héon E, Hildebrandt F, Joshi N, Knutzen D, Kroes HY, Mack SH, Nuovo S, Parisi MA, Snow J, Summers AC, Symons JM, Zein WM, Boltshauser E, Sayer JA, Gunay-Aygun M, Valente EM, Doherty D. Healthcare recommendations for Joubert syndrome. *Am J Med Genet A*. 2020; 182(1): 229–249.
- Beltran WA, Cideciyan AV, Boye SE, Ye GJ, Iwabe S, Dufour VL, Marinho LF, Swider M, Kosyk MS, Sha J, Boye SL, Peterson JJ, Witherspoon CD, Alexander JJ, Ying GS, Shearman MS, Chulay JD, Hauswirth WW, Gamlin PD, Jacobson SG, Aguirre GD. Optimization of retinal gene therapy for X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR mutations. *Mol Ther*. 2017; 25(8): 1866–1880.
- Ben M'Barek K, Monville C. Cell Therapy for Retinal Dystrophies: From cell suspension formulation to complex retinal tissue bioengineering. *Stem Cells Int*. 2019; 2019: 4568979.
- Black GC, MacEwen C, Lotery AJ. The integration of genomics into clinical ophthalmic services in the UK. *Eye (Lond)*. 2020; 34(6): 993–996.
- Bonnet C, Riahi Z, Chantot-Bastaraud S, Smaghe L, Letexier M, Marcaillou C, Lefèvre GM, Hardelin JP, El-Amraoui A, Singh-Estivalet A, Mohand-Saïd S, Kohl S, Kurtenbach A, Sliesoraityte I, Zobor D, Gherbi S, Testa F, Simonelli F, Banfi S, Fakin A, Glavač D, Jarc-Vidmar M, Zupan A, Battelino S, Martorell Sampol L, Claveria MA, Catala Mora J, Dad S, Møller LB, Rodriguez Jorge J, Hawlina M, Auricchio A, Sahel JA, Marlin S, Zrenner E, Audo I, Petit C. An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *Eur J Hum Genet*. 2016; 24(12): 1730–1738.
- Bujakowska K, Audo I, Mohand-Saïd S, Lancelot ME, Antonio A, Germain A, Léveillard T, Letexier M, Saraiva JP, Lonjou C, Carpentier W, Sahel JA, Bhattacharya SS, Zeitz C. CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat*. 2012; 33(2): 306–315.
- Burke TR, Tsang SH, Zernant J, Smith RT, Allikmets R. Familial discordance in Stargardt disease. *Mol Vis*. 2012; 18: 227–233.
- Cantagrel V, Lefeber DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Bielas SL, Lehle L, Hombauer H, Adamowicz M, Swiezewska E, De Brouwer AP, Blümel P, Sykut-Cegielska J, Houliston S, Swistun D, Ali BR, Dobyns WB, Babovic-Vuksanovic D, van Bokhoven H, Wevers RA, Raetz CR, Freeze HH, Morava E, Al-Gazali L, Gleeson JG. SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell*. 2010; 142(2): 203–217.

- Carrigan M, Duignan E, Malone CP, Stephenson K, Saad T, McDermott C, Green A, Keegan D, Humphries P, Kenna PF, Farrar GJ. Panel-Based Population Next-Generation Sequencing for Inherited Retinal Degenerations. *Sci Rep*. 2016; 6: 33248.
- Cideciyan AV, Jacobson SG, Drack AV, Ho AC, Charng J, Garafalo AV, Roman AJ, Sumaroka A, Han IC, Hochstedler MD, Pfeifer WL, Sohn EH, Taiel M, Schwartz MR, Biasutto P, Wit W, Cheetham ME, Adamson P, Rodman DM, Platenburg G, Tome MD, Balikova I, Nerinckx F, Zaeytijd J, Van Cauwenbergh C, Leroy BP, Russell SR. Effect of an intravitreal antisense oligonucleotide on vision in Leber congenital amaurosis due to a photoreceptor cilium defect. *Nat Med*. 2019; 25(2): 225–228.
- Ciulla TA, Hussain RM, Berrocal AM, Nagiel A. Voretigene neparvovec-rzyl for treatment of RPE65-mediated inherited retinal diseases: a model for ocular gene therapy development. *Expert Opin Biol Ther*. 2020; 20(6): 565–578.
- Constable PA, Bach M, Frishman LJ, Jeffrey BG, Robson AG; International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV Standard for Clinical electro-oculography (2017 update). *Doc Ophthalmol*. 2017; 134(1): 1–9. Erratum in: *Doc Ophthalmol*. 2017; 134(2): 155.
- Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 2007; 125(2): 151–158.
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016; 37(6): 564–569.
- den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FP. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest*. 2010; 120(9): 3042–3053.
- den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res*. 2008; 27(4): 391–419.
- Dimopoulos IS, Chan S, MacLaren RE, MacDonald IM. Pathogenic mechanisms and the prospect of gene therapy for choroideremia. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2015; 3(7): 787–798.
- Đudřáková L, Kousal B, Kolářová H, Hlavatá L, Lišková P. Genová terapie dědičných onemocnění sítnice a zrakového nervu: současný stav poznání. *Cesk Slov Oftalmol*. 2016; 72(4): 128–136.
- Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics*. 2011; 12(4): 238–249.
- Garafalo AV, Cideciyan AV, Héon E, Sheplock R, Pearson A, WeiYang Yu C, Sumaroka A, Aguirre GD, Jacobson SG. Progress in treating inherited retinal diseases: Early subretinal gene therapy clinical trials and candidates for future initiatives. *Prog Retin Eye Res*. 2019; 77: 100827.
- Gupta N, Verma G, Kabra M, Bijarnia-Mahay S, Ganapathy A. Identification of a case of SRD5A3-congenital disorder of glycosylation (CDG1Q) by exome sequencing. *Indian J Med Res*. 2018; 147(4): 422–426.
- Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*. 2006; 1: 40.

- Heissigerová J. a kol.: Oftalmologie. Praha, Maxdorf, 2018, 380 s. ISBN: 978-80-7345-580-4.
- Henderson RH, Waseem N, Searle R, van der Spuy J, Russell-Eggitt I, Bhattacharya SS, Thompson DA, Holder GE, Cheetham ME, Webster AR, Moore AT. An assessment of the apex microarray technology in genotyping patients with Leber congenital amaurosis and early-onset severe retinal dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(12): 5684–5689.
- Hinds AM, Fahim A, Moore AT, Wong SC, Michaelides M. Bullous X linked retinoschisis: clinical features and prognosis. *Br J Ophthalmol.* 2018; 102(5): 622–624.
- Hlavatá L, Ďudáková L, Moravíková J, Zobanová A, Kousal B, Lišková P. Molekulárně genetická příčina achromatopsie u dvou pacientů českého původu. *Cesk a slov oftalmol.* 2019; 75(5): 272–276.
- Hlavatá L, Ďudáková L, Trková M, Soldátová I, Skalická P, Kousal B, Lišková P. Preimplantační genetická diagnostika a dědičná onemocnění oka. *Cesk Slov Oftalmol.* 2016; 72(5): 167–171.
- Jaakson K, Zernant J, Kõlm M, Hutchinson A, Tonisson N, Glavac D, Ravnik-Glavac M, Hawlina M, Meltzer MR, Caruso RC, Testa F, Mageri A, Hoyng CB, Gouras P, Simonelli F, Lewis RA, Lupski JR, Cremers FP, Allikmets R. Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene. *Hum Mutat.* 2003; 22(5): 395–403.
- Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Smilko EE, Milam AH, Sheffield VC, Stone EM. Crumbs homolog 1 (CRB1) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(9): 1073–1078.
- Jatana KR, Thomas D, Weber L, Mets MB, Silverman JB, Young NM. Usher syndrome: characteristics and outcomes of pediatric cochlear implant recipients. *Otol Neurotol.* 2013; 34(3): 484–489.
- Kahrizi K, Najmabadi H, Kariminejad R, Jamali P, Malekpour M, Garshasbi M, Ropers HH, Kuss AW, Tzschach A. An autosomal recessive syndrome of severe mental retardation, cataract, coloboma and kyphosis maps to the pericentromeric region of chromosome 4. *Eur J Hum Genet.* 2009; 17(1): 125–128.
- Katsanis N. The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet.* 2004; 13 Spec No 1: R65–71.
- Keats BJ, Savas S. Genetic heterogeneity in Usher syndrome. *Am J Med Genet A.* 2004; 130A(1): 13–16.
- Khambatta S, Nguyen DL, Beckman TJ, Wittich CM. Kearns-Sayre syndrome: a case series of 35 adults and children. *Int J Gen Med.* 2014; 7: 325–332.
- Khan AO. Early-onset retinal dystrophy and chronic dermatitis in a girl with an undiagnosed congenital disorder of glycosylation (SRD5A3-CDG). *Ophthalmic Genet.* 2018; 39(5): 628–630.
- Khan M, Cornelis SS, Khan MI, Elmelik D, Manders E, Bakker S, Derks R, Neveling K, van de Vorst M, Gilissen C, Meunier I, Defoort S, Puech B, Devos A, Schulz HL, Stöhr H, Grassmann F, Weber BHF, Dhaenens CM, Cremers FPM. Cost-effective molecular inversion probe-based ABCA4 sequencing reveals deep-intronic variants in Stargardt disease. *Hum Mutat.* 2019; 40(10): 1749–1759.

- Khan M, Cornelis SS, Pozo-Valero MD, Whelan L, Runhart EH, Mishra K, Bults F, AlSwaiti Y, AlTalbish A, De Baere E, Banfi S, Banin E, Bauwens M, Ben-Yosef T, Boon CJF, van den Born LI, Defoort S, Devos A, Dockery A, Dudakova L, Fakin A, Farrar GJ, Sallum JMF, Fujinami K, Gilissen C, Glavač D, Gorin MB, Greenberg J, Hayashi T, Hettinga YM, Hoischen A, Hoyng CB, Hufendiek K, Jägle H, Kamakari S, Karali M, Kellner U, Klaver CCW, Kousal B, Lamey TM, MacDonald IM, Matynia A, McLaren TL, Mena MD, Meunier I, Miller R, Newman H, Ntozini B, Oldak M, Pieterse M, Podhajcer OL, Puech B, Ramesar R, Rütther K, Salameh M, Salles MV, Sharon D, Simonelli F, Spital G, Steehouwer M, Szaflik JP, Thompson JA, Thuillier C, Tracewska AM, van Zweeden M, Vincent AL, Zanlonghi X, Liskova P, Stöhr H, Roach JN, Ayuso C, Roberts L, Weber BHF, Dhaenens CM, Cremers FPM. Resolving the dark matter of ABCA4 for 1054 Stargardt disease probands through integrated genomics and transcriptomics. *Genet Med.* 2020; 22(7): 1235–1246.
- Kimberling WJ, Hildebrand MS, Shearer AE, Jensen ML, Halder JA, Trzuppek K, Cohn ES, Weleber RG, Stone EM, Smith RJ. Frequency of Usher syndrome in two pediatric populations: Implications for genetic screening of deaf and hard of hearing children. *Genet Med.* 2010; 12(8): 512–516.
- Kohlschütter A, Schulz A, Bartsch U, Storch S. Current and emerging treatment strategies for neuronal ceroid lipofuscinoses. *CNS Drugs.* 2019; 33(4): 315–325.
- Korir PK, Roberts L, Ramesar R, Seoighe C. A mutation in a splicing factor that causes retinitis pigmentosa has a transcriptome-wide effect on mRNA splicing. *BMC Res Notes.* 2014; 7: 401.
- Kousal B, Dudakova L, Bujakowska K, Liskova P. Genetic causes of deaf-blindness in sixteen Czech families. *Acta Ophthalmol.* 2017; 95.
- Kousal B, Dudakova L, Gaillyova R, Hejtmankova M, Diblik P, Michaelides M, Liskova P. Phenotypic features of CRB1-associated early-onset severe retinal dystrophy and the different molecular approaches to identifying the disease-causing variants. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2016; 254(9): 1833–1839.
- Kousal B, Ďudřáková Ľ, Hlavatá L, Lišková P. Klinické zkoušky testující nové terapie pro Stargardtovu chorobu. *Cesk Slov Oftalmol.* 2016; 72(1): 293–297.
- Kousal B, Honzík T, Hansíková H, Ondrušková N, Čechová A, Tesařová M, Stránecký V, Meliška M, Michaelides M, Lišková P. Review of SRD5A3 disease-causing sequence variants and ocular findings in steroid 5 $\alpha$ -reductase type 3 congenital disorder of glycosylation, and a detailed new case. *Folia Biol (Praha).* 2019; 65(3): 134–141.
- Kousal B, Chakarova F, Black GC, Ramsden S, Langrová H, Lišková P. Minimální nález u pacienta s Bestovou chorobou podmíněnou mutací c.653G>A v genu BEST1. *Cesk Slov Oftalmol.* 2011; 67(5–6): 170–174.
- Kousal B, Majer F, Vlaskova H, Dvorakova L, Piherova L, Meliska M, Langrova H, Palecek T, Kubanek M, Krebsova A, Gurka J, Stara V, Michaelides M, Kalina T, Sikora J, Liskova P. Pigmentary retinopathy can indicate the presence of pathogenic LAMP2 variants even in somatic mosaic carriers with no additional signs of Danon disease. *Acta Ophthalmol.* 2020. doi: 10.1111/aos.14478.

- Kousal B, Skalická P, Diblík P, Kuthan P, Langrová H, Lišková P. Klinické nálezy u členů české rodiny s retinitis pigmentosa podmíněnou mutací v ORF15 genu RPGR. *Cesk Slov Oftalmol.* 2013; 69(1): 8–15.
- Kousal B, Skalicka P, Valesova L, Fletcher T, Hart-Holden N, O'Grady A, Chakarova CF, Michaelides M, Hardcastle AJ, Liskova P. Severe retinal degeneration in women with a c.2543del mutation in ORF15 of the RPGR gene. *Mol Vis.* 2014; 20: 1307–1317.
- Kousal B, Záhlava J, Vejvalková Š, Hejtmánková M, Lišková P. Molekulárně genetická příčina a klinické nálezy u dvou probandů se Stargardtovou chorobou. *Cesk Slov Oftalmol.* 2014; 70(6): 228–233.
- Kremer H, van Wijk E, Märker T, Wolfrum U, Roepman R. Usher syndrome: molecular links of pathogenesis, proteins and pathways. *Hum Mol Genet.* 2006; 15 Spec No 2: R262–270.
- Kremlikova Pourova R, Paderova J, Copikova J, Kousal B, Dudakova L, Liskova P. SD-OCT imaging as a valuable tool to support molecular genetic diagnostics of Usher syndrome type 1. *J AAPOS.* 2018; 22(4): 312–314.
- Kumaran N, Moore AT, Weleber RG, Michaelides M. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. *Br J Ophthalmol.* 2017; 101(9): 1147–1154.
- Lee K, Couser NL. Genetic Testing for Eye Diseases: A Comprehensive Guide and Review of Ocular Genetic Manifestations from Anterior Segment Malformation to Retinal Dystrophy. *Curr Genet Med Rep.* 2016; 4: 41–48.
- Lišková P, Kousal B. Dědičná onemocnění oka: genetické testování a poradenství. *In: Brdička R, Didden W. Genetika v klinické praxi III.* Praha, Galén, 2015, 190 s. ISBN 978-80-7492-226-8.
- Lois N, Holder GE, Bunce C, Fitzke FW, Bird AC. Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119(3): 359–369.
- Maguire AM, Russell S, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, Wittes J, Pappas J, Elci O, Marshall KA, McCague S, Reichert H, Davis M, Simonelli F, Leroy BP, Wright JF, High KA, Bennett J. Efficacy, Safety, and Durability of Voretigene Neparvovec-rzyl in RPE65 Mutation-Associated Inherited Retinal Dystrophy: Results of Phase 1 and 3 Trials. *Ophthalmology.* 2019; 126(9): 1273–1285.
- Majer F, Kousal B, Dusek P, Piherova L, Reboun M, Mihalova R, Gurka J, Krebsova A, Vlaskova H, Dvorakova L, Krihova J, Liskova P, Kmoch S, Kalina T, Kubanek M, Sikora J. Alu-mediated Xq24 deletion encompassing CUL4B, LAMP2, ATP1B4, TMEM255A, and ZBTB33 genes causes Danon disease in a female patient. *Am J Med Genet A.* 2020; 182(1): 219–223.
- Majer F, Pelak O, Kalina T, Vlaskova H, Dvorakova L, Honzik T, Palecek T, Kuchynka P, Masek M, Zeman J, Elleder M, Sikora J. Mosaic tissue distribution of the tandem duplication of LAMP2 exons

- 4 and 5 demonstrates the limits of Danon disease cellular and molecular diagnostics. *J Inher Metab Dis.* 2014; 37(1): 117–124.
- Majer F, Piherova L, Reboun M, Stara V, Pelak O, Norambuena P, Stranecky V, Krebsova A, Vlaskova H, Dvorakova L, Kmoch S, Kalina T, Kubanek M, Sikora J. LAMP2 exon-copy number variations in Danon disease heterozygote female probands: Infrequent or underdetected? *Am J Med Genet A.* 2018; 176(11): 2430–2434.
- Majer F, Vlaskova H, Krol L, Kalina T, Kubanek M, Stolnaya L, Dvorakova L, Elleder M, Sikora J. Danon disease: a focus on processing of the novel LAMP2 mutation and comments on the beneficial use of peripheral white blood cells in the diagnosis of LAMP2 deficiency. *Gene.* 2012; 498(2): 183–195.
- Marmorstein AD, Cross HE, Peachey NS. Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. *Prog Retin Eye Res.* 2009; 28(3): 206–226.
- Marteau TM, Croyle RT. The new genetics. Psychological responses to genetic testing. *BMJ.* 1998; 316(7132): 693–696.
- Mathur P, Yang J. Usher syndrome: Hearing loss, retinal degeneration and associated abnormalities. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852(3): 406–420.
- Mayer AK, Van Cauwenbergh C, Rother C, Baumann B, Reuter P, De Baere E, Wissinger B, Kohl S; ACHM Study Group. CNGB3 mutation spectrum including copy number variations in 552 achromatopsia patients. *Hum Mutat.* 2017; 38(11): 1579–1591.
- McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, Hamilton R, Holder GE, Tzekov R, Bach M. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc Ophthalmol.* 2015; 130(1): 1–12.
- McGee TL, Seyedahmadi BJ, Sweeney MO, Dryja TP, Berson EL. Novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in patients with Usher syndrome type II or non-syndromic retinitis pigmentosa. *J Med Genet.* 2010; 47(7): 499–506.
- Meighan PC, Peng C, Varnum MD. Inherited macular degeneration-associated mutations in CNGB3 increase the ligand sensitivity and spontaneous open probability of cone cyclic nucleotide-gated channels. *Front Physiol.* 2015; 6: 177.
- Mihai DM, Washington I. Vitamin A dimers trigger the protracted death of retinal pigment epithelium cells. *Cell Death Dis.* 2014; 5(7): e1348.
- Millán JM, Aller E, Jaijo T, Blanco-Kelly F, Gimenez-Pardo A, Ayuso C. An update on the genetics of Usher syndrome. *J Ophthalmol.* 2011; 2011: 417217.
- Mitsios A, Dubis AM, Moosajee M. Choroideremia: from genetic and clinical phenotyping to gene therapy and future treatments. *Ther Adv Ophthalmol.* 2018; 10: 2515841418817490.
- Mohler CW, Fine SL. Long-term evaluation of patients with Best's vitelliform dystrophy. *Ophthalmology.* 1981; 88(7): 688–692.



- Plössl K, Schmid V, Straub K, Schmid C, Ammon M, Merkl R, Weber BHF, Friedrich U. Pathomechanism of mutated and secreted retinoschisin in X-linked juvenile retinoschisis. *Exp Eye Res.* 2018; 177: 23–34.
- Prall FR, Drack A, Taylor M, Ku L, Olson JL, Gregory D, Mestroni L, Mandava N. Ophthalmic manifestations of Danon disease. *Ophthalmology.* 2006; 113(6): 1010–1013.
- Prenner JL, Capone A Jr, Ciaccia S, Takada Y, Sieving PA, Trese MT. Congenital X-linked retinoschisis classification system. *Retina.* 2006; 26(7 Suppl): S61–64.
- Querques G, Zerbib J, Santacroce R, Margaglione M, Delphin N, Rozet JM, Kaplan J, Martinelli D, Delle Noci N, Soubrane G, Souied EH. Functional and clinical data of Best vitelliform macular dystrophy patients with mutations in the BEST1 gene. *Mol Vis.* 2009; 15: 2960–2972.
- Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, Hughes DA; International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research Rare Disease Special Interest Group. Rare disease terminology and definitions-a systematic global review: Report of the ISPOR rare disease special interest group. *Value Health.* 2015; 18(6): 906–914.
- Rivera A, White K, Stöhr H, Steiner K, Hemmrich N, Grimm T, Jurklies B, Lorenz B, Scholl HP, Apfelstedt-Sylla E, Weber BH. A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet.* 2000; 67(4): 800–813.
- Ścieżyńska A, Oziębło D, Ambroziak AM, Korwin M, Szulborski K, Krawczyński M, Stawiński P, Szaflik J, Szaflik JP, Płoski R, Ołdak M. Next-generation sequencing of ABCA4: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe. *Exp Eye Res.* 2016; 145: 93–99.
- Schorderet DF, Cottet S, Loblirius JA, Borruat FX, Balmer A, Munier FL. Retinopathy in Danon disease. *Arch Ophthalmol.* 2007; 125(2): 231–236.
- Schrijver-Wieling I, van Rens GH, Wittebol-Post D, Smeitink JA, de Jager JP, de Klerk HB, van Lith GH. Retinal dystrophy in long chain 3-hydroxy-acyl-coA dehydrogenase deficiency. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81(4): 291–294.
- Stone EM, Aldave AJ, Drack AV, Maccumber MW, Sheffield VC, Traboulsi E, Weleber RG. Recommendations for genetic testing of inherited eye diseases: report of the American Academy of Ophthalmology task force on genetic testing. *Ophthalmology.* 2012; 119(11): 2408–2410.
- Straňák Z, Kousal B, Ardan T, Veith M. Inovativní postupy v léčbě sítnicových onemocnění. *Cesk a slov oftalmol.* 2019; 75(6): 287–295.
- Strunnikova NV, Barb J, Sergeev YV, Thiagarajasubramanian A, Silvin C, Munson PJ, Macdonald IM. Loss-of-function mutations in Rab escort protein 1 (REP-1) affect intracellular transport in fibroblasts and monocytes of choroideremia patients. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8402.

- Sundaram V, Wilde C, Aboshiha J, Cowing J, Han C, Langlo CS, Chana R, Davidson AE, Sergouniotis PI, Bainbridge JW, Ali RR, Dubra A, Rubin G, Webster AR, Moore AT, Nardini M, Carroll J, Michaelides M. Retinal structure and function in achromatopsia: implications for gene therapy. *Ophthalmology*. 2014; 121(1): 234–245.
- Tanna P, Strauss RW, Fujinami K, Michaelides M. Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *Br J Ophthalmol*. 2017; 101(1): 25–30.
- Taylor RL, Arno G, Poulter JA, Khan KN, Morarji J, Hull S, Pontikos N, Rueda Martin A, Smith KR, Ali M, Toomes C, McKibbin M, Clayton-Smith J, Grunewald S, Michaelides M, Moore AT, Hardcastle AJ, Inglehearn CF, Webster AR, Black GC; UK Inherited Retinal Disease Consortium and the 100,000 Genomes Project. Association of steroid 5 $\alpha$ -reductase type 3 congenital disorder of glycosylation with early-onset retinal dystrophy. *JAMA Ophthalmol*. 2017; 135(4): 339347.
- Testa F, Melillo P, Bonnet C, Marcelli V, de Benedictis A, Colucci R, Gallo B, Kurtenbach –A, Rossi S, Marciano E, Auricchio A, Petit C, Zrenner E, Simonelli F. Clinical presentation and disease course of Usher syndrome because of mutations in MYO7A or USH2A. *Retina*. 2017; 37(8): 1581–1590.
- Thiadens AA, Somervuo V, van den Born LI, Roosing S, van Schooneveld MJ, Kuijpers RW, van Moll-Ramirez N, Cremers FP, Hoyng CB, Klaver CC. Progressive loss of cones in achromatopsia: an imaging study using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51(11): 5952–5957.
- Thiele H, Nürnberg P. HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics*. 2005; 21(8):1730–1732.
- Thompson DA, Constable PA, Liasis A, Walters B, Esteban MT. The physiology of the retinal pigment epithelium in Danon disease. *Retina*. 2016; 36(3): 629–638.
- Thompson DA, Lyons RJ, Russell-Eggitt I, Liasis A, Jäggle H, Grunewald S. Retinal characteristics of the congenital disorder of glycosylation PMM2-CDG. *J Inherit Metab Dis*. 2013; 36(6): 1039–1047.
- van Huet RA, Pierrache LH, Meester-Smoor MA, Klaver CC, van den Born LI, Hoyng CB, de Wijs IJ, Collin RW, Hoefsloot LH, Klevering BJ. The efficacy of microarray screening for autosomal recessive retinitis pigmentosa in routine clinical practice. *Mol Vis*. 2015; 21: 461–476.
- Vasireddy V, Wong P, Ayyagari R. Genetics and molecular pathology of Stargardt-like macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2010; 29(3): 191–207.
- Weleber RG, Michaelides M, Trzuppek KM, Stover NB, Stone EM. The phenotype of Severe Early Childhood Onset Retinal Dystrophy (SECORD) from mutation of RPE65 and differentiation from Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52(1): 292–302.
- Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell*. 1999; 98(1): 13–23.

- Wheeler PG, Ng BG, Sanford L, Sutton VR, Bartholomew DW, Pastore MT, Bamshad MJ, Kircher M, Buckingham KJ, Nickerson DA, Shendure J, Freeze HH. SRD5A3-CDG: Expanding the phenotype of a congenital disorder of glycosylation with emphasis on adult onset features. *Am J Med Genet A*. 2016; 170(12): 3165–3171.
- Xiao X, Cao Y, Zhang Z, Xu Y, Zheng Y, Chen LJ, Pang CP, Chen H. Novel Mutations in PRPF31 Causing Retinitis Pigmentosa Identified Using Whole-Exome Sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017; 58(14): 6342–6350.
- Yang Z, Chen Y, Lillo C, Chien J, Yu Z, Michaelides M, Klein M, Howes KA, Li Y, Kaminoh Y, Chen H, Zhao C, Chen Y, Al-Sheikh YT, Karan G, Corbeil D, Escher P, Kamaya S, Li C, Johnson S, Frederick JM, Zhao Y, Wang C, Cameron DJ, Huttner WB, Schorderet DF, Munier FL, Moore AT, Birch DG, Baehr W, Hunt DM, Williams DS, Zhang K.: Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118(8): 2908–2916.
- Yi J, Li S, Jia X, Xiao X, Wang P, Guo X, Zhang Q. Novel RS1 mutations associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Int J Mol Med*. 2012; 29(4): 644–648.
- Zampaglione E, Kinde B, Place EM, Navarro-Gomez D, Maher M, Jamshidi F, Nassiri S, Mazzone JA, Finn C, Schlegel D, Comander J, Pierce EA, Bujakowska KM. Copy-number variation contributes 9% of pathogenicity in the inherited retinal degenerations. *Genet Med*. 2020; 22(6): 1079–1087.
- Zernant J, Schubert C, Im KM, Burke T, Brown CM, Fishman GA, Tsang SH, Gouras P, Dean M, Allikmets R. Analysis of the ABCA4 gene by next-generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52(11): 8479–8487.
- Ziccardi L, Cordeddu V, Gaddini L, Matteucci A, Parravano M, Malchiodi-Albedi F, Varano M. Gene Therapy in Retinal Dystrophies. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(22): E5722.

## PUBLIKACE VZTAHUJÍCÍ SE K TÉMATU DISERTAČNÍ PRÁCE

- Kousal B**, Skalicka P, Valesova L, Fletcher T, Hart-Holden N, O'Grady A, Chakarova CF, Michaelides M, Hardcastle AJ, Liskova P. Severe retinal degeneration in women with a c.2543del mutation in ORF15 of the *RPGR* gene. *Mol Vis*. 2014; 20: 1307–1317. **IF (2013) = 2.245**.
- Kousal B**, Dudakova L, Gaillyova R, Hejtmankova M, Diblik P, Michaelides M, Liskova P. Phenotypic features of *CRBI*-associated early-onset severe retinal dystrophy and the different molecular approaches to identifying the disease-causing variants. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016; 254(9): 1833–1839. **IF (2015) = 1.991**.
- Kremlikova Pourouva R, Paderova J, Copikova J, **Kousal B**, Dudakova L, Liskova P. SD-OCT imaging as a valuable tool to support molecular genetic diagnostics of Usher syndrome type 1. *J AAPOS*. 2018; 22(4): 312–314. **IF (2016) = 0.997**.
- Kousal B**, Honzík T, Hansíková H, Ondrušková N, Čechová A, Tesařová M, Stránecký V, Meliška M, Michaelides M, Lišková P. Review of *SRD5A3* disease-causing sequence variants and ocular findings in steroid 5 $\alpha$ -reductase type 3 congenital disorder of glycosylation, and a detailed new case. *Folia Biol (Praha)*. 2019; 65(3): 134–141. **IF (2019) = 1.073**.
- Majer F, **Kousal B**, Dusek P, Piherova L, Reboun M, Mihalova R, Gurka J, Krebsova A, Vlaskova H, Dvorakova L, Krihova J, Liskova P, Kmoch S, Kalina T, Kubanek M, Sikora J. *Alu*-mediated *Xq24* deletion encompassing *CUL4B*, *LAMP2*, *ATP1B4*, *TMEM255A*, and *ZBTB33* genes causes Danon disease in a female patient. *Am J Med Genet A*. 2020; 182: 219–223. **IF (2019) = 2.197**.
- Khan M, Cornelis SS, Pozo-Valero MD, Whelan L, Runhart EH, Mishra K, Bults F, AlSwaiti Y, AlTalbish A, De Baere E, Banfi S, Banin E, Bauwens M, Ben-Yosef T, Boon CJF, van den Born LI, Defoort S, Devos A, Dockery A, Dudakova L, Fakin A, Farrar GJ, Sallum JMF, Fujinami K, Gilissen C, Glavač D, Gorin MB, Greenberg J, Hayashi T, Hettinga YM, Hoischen A, Hoyng CB, Hufendiek K, Jäggle H, Kamakari S, Karali M, Kellner U, Klaver CCW, **Kousal B**, Lamey TM, MacDonald IM, Matynia A, McLaren TL, Mena MD, Meunier I, Miller R, Newman H, Ntozini B, Oldak M, Pieterse M, Podhajcer OL, Puech B, Ramesar R, Rütther K, Salameh M, Salles MV, Sharon D, Simonelli F, Spital G, Steehouwer M, Szaflik JP, Thompson JA, Thuillier C, Tracewska AM, van Zweeden M, Vincent AL, Zanlonghi X, Liskova P, Stöhr H, Roach JN, Ayuso C, Roberts L, Weber BHF, Dhaenens CM, Cremers FPM. Resolving the dark matter of *ABCA4* for 1054 Stargardt disease probands through integrated genomics and transcriptomics. *Genet Med*. 2020; 22(7): 1235–1246. **IF (2018) = 8.683**.
- Kousal B**, Majer F, Vlaskova H, Dvorakova L, Piherova L, Meliska M, Langrova H, Palecek T, Kubanek M, Krebsova A, Gurka J, Stara V, Michaelides M, Kalina T, Sikora J, Liskova P: Pigmentary retinopathy can indicate the presence of pathogenic *LAMP2* variants even in somatic mosaic carriers with no additional signs of Danon disease. *Acta Ophthalmol*. 2020. doi: 10.1111/aos.14478. **IF (2020) = 3.060**.

- Runhart EH, Khan M, Cornelis SS, Roosing S, Del Pozo-Valero M, Lamey T, Liskova P, Roberts L, Stöhr H, Klaver CCW, Hoyng CB, Cremers FPM, Dhaenens CM; for **the ABCA4 disease consortium study group**. Sex ratio in Stargardt disease for frequent and mild *ABCA4* alleles. *JAMA Ophthalmol*. 2020. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2020.2990. **IF (2019) = 6.198**.
- Kousal B**, Skalická P, Diblík P, Kuthan P, Langrová H, Lišková P. Klinické nálezy u členů české rodiny s retinitis pigmentosa podmíněnou mutací v ORF15 genu *RPGR*. *Cesk Slov Oftalmol*. 2013; 69(1): 8–15.
- Kousal B**, Záhlava J, Vejvalková Š, Hejtmánková M, Lišková P. Molekulárně genetická příčina a klinické nálezy u dvou probandů se Stargardtovou chorobou. *Cesk Slov Oftalmol*. 2014; 70(6): 228–233.
- Kousal B**, Ďudřáková L, Hlavatá L, Lišková P. Klinické zkoušky testující nové terapie pro Stargardtovu chorobu. *Cesk Slov Oftalmol*. 2016; 72(1): 293–297.
- Hlavatá L, Ďudřáková L, Trková M, Soldátová I, Skalická P, **Kousal B**, Lišková P. Preimplantační genetická diagnostika a dědičná onemocnění oka. *Cesk Slov Oftalmol*. 2016; 72(5): 167–171.
- Ďudřáková L, **Kousal B**, Kolářová H, Hlavatá L, Lišková P. Genová terapie dědičných onemocnění sítnice a zrakového nervu: současný stav poznání. *Cesk Slov Oftalmol*. 2016; 72(4): 128–136.
- Kousal B**, Ďudřáková L, Moravíková J, Lišková P. Vzácná oční onemocnění v oftalmologické praxi. *Oftalmologie pro praxi*. 2018; 7–11.
- Hlavatá L, Ďudřáková L, Moravíková J, Zobanová A, **Kousal B**, Lišková P. Molekulárně genetická příčina achromatopsie u dvou pacientů českého původu. *Cesk a slov oftalmol*. 2019; 75(5): 272–276.
- Straňák Z, **Kousal B**, Ardan T, Veith M. Inovativní postupy v léčbě sítnicových onemocnění. *Cesk a slov oftalmol*. 2019; 75(6): 287–295. **2. místo v hodnocení o nejlepší práci publikovanou v časopise Česká a slovenská oftalmologie v roce 2019.**

## **OSTATNÍ PUBLIKACE V IMPAKTOVANÝCH A NEIMPAKTOVANÝCH RECENZOVANÝCH ČASOPISECH**

- Kolářová H, Honzík T, Ďudřáková L, **Kousal B**, Kulhánek J, Diblík P, Tesařová M, Havránková P, Forgáč M, Zeman J, Lišková P. Leberova hereditární neuropatie optiku. *Cesk Slov Neurol N*. 2017; 80/113: 534–544. **IF (2017) = 0.368**.
- Kousal B**, Kolarova H, Meliska M, Bydzovsky J, Diblík P, Kulhanek J, Votruba M, Honzik T, Liskova P. Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy. *Acta Ophthalmol*. 2019; 97(1): e71–e76. **IF (2019) = 3.153**.
- Kelifová S, Honzík T, Tesařová M, **Kousal B**, Lišková P, Havránková P, Kolářová H. Dominantní (Kjerova) atrofie optiku asociovaná s mutacemi v *OPA1* genu. *Cesk Slov Neurol N*. 2020; 83(1): 33–42. **IF (2018) = 0.355**.

- Kousal B**, Dubská Z. Věkem podmíněná makulární degenerace – principy a léčba. Postgrad Med. 2010; 12(3): 257–264.
- Kousal B**, Chakarova F, Black GC, Ramsden S, Langrová H, Lišková P. Minimální nález u pacienta s Bestovou chorobou podmíněnou mutací c.653G>A v genu BEST1. Cesk Slov Oftalmol. 2011; 67(5–6): 170–174.
- Kousal B**, Dubská Z, Beňova A, Diblík P, Langrová H, Kalvodová B. Chlorochinová retinopatie: kazuistika a doporučení pro screening. Prakt Lek. 2013; 93(4): 181–185.
- Beňová A, Brichová M, Svozičková P, **Kousal B**, Jeníčková D, Heissigerová J, Říhová E. Cytomegalovirová retinitida u HIV negativních pacientů - retrospektivní studie. Cesk Slov Oftalmol. 2013; 69: 227–234.
- Kousal B**, Kalvodová B. Aflibercept v oftalmologii. Remedia. 2014; 24: 428–434.
- Cigánek P, Matoušková L, **Kousal B**. Dynamická vitreomakulární trakce. Cesk Slov Oftalmol. 2015; 71(1): 23–28.
- Beňová A, Kuthan P, **Kousal B**, Diblík P, Meliška M. Příběh jedné papily. Cesk a slov oftalmol. 2015; 71(2): 116–121.
- Kousal B**: Věkem podmíněná makulární degenerace – aktuální možnosti farmakoterapie v České republice. Remedia. 2016, 26: 162–167.
- Kousal B**: Věkem podmíněná makulární degenerace. ZN Plus 2018; 67: 18–21.

## KNIŽNÍ PUBLIKACE

- Němec P, Löfflerová V, **Kousal B**. Optická koherenční tomografie – Klinický atlas sítnicových patologií. 1. vyd. Praha, Mladá fronta, 2015, 304 s. ISBN 978-80-204-3810-2. **Cena předsednictva ČLS JEP za rok 2015 za nejlepší vědecké práce – knižní publikaci.**
- Svozičková, P, Heissigerová J, Diblík P, Becková J, Beňová A, Betková J, Brichová M, Dubská Z, Dvořák J, Fichtl M, Glezgová J, Huňa L, Janek M, Kaincová I, Kalvodová B, Klofáčová E, **Kousal B**, et al. Diferenciální diagnostika v oftalmologii v obrazech. 1. vyd. Praha, Mladá fronta, 2015, 222 s. ISBN 978-80-204-3393-0.
- Lišková P, **Kousal B**. Dědičná onemocnění oka: genetické testování a poradenství. In: Brdička R, Didden W. Genetika v klinické praxi III. Praha, Galén, 2015, 190 s. ISBN 978-80-7492-226-8.
- Němec P, **Kousal B**, Löfflerová V. Optická koherenční tomografie – Klinický atlas sítnicových patologií. 2. přepracované a doplněné vyd. Praha, Mladá fronta, 2017, 408 s. ISBN 978-80-204-4414-1.
- Heissigerová J, Brichová M, Diblík P, Dubská Z, Fichtl M, Glezgová J, Huňa L, Kalvodová B, Klímová A, **Kousal B**, Kuthan P, Lišková P, Michaličková M, Novák P, Rezková L, Růžičková E, Skalická P,

Sklenka P, Svozílková P. Oftalmologie: pro pregraduální i postgraduální přípravu. 1. vyd. Praha, Maxdorf, 2018, 380 s. ISBN 978-80-7345-580-4. **Cena předsednictva ČLS JEP za rok 2018 za nejlepší vědecké práce – knižní publikaci.**

Studnička J, Dusová J, Heissigerová J, **Kousal B**, Langrová H, Macháčková M, Matušková V, Stěpanov A, Vysloužilová D. Onemocnění sítnice a cévnatky v praxi. Praha, Mladá fronta, 2018, 423 s. ISBN 978-80-204-4945-0. **Ocenění v Soutěži vysoce kvalitních monografií na UK hodnocené v roce 2020.**

**Kousal B.** Léčiva s antiproliferačním účinkem. *In:* Suchopár J. a kol.: Compendium – Léčiva používaná v podmínkách ČR. Praha, Panax Co, 2018, 1139 s. ISBN 978-80-902806-7-0.

Lízrová Preiningerová J, Němec P, **Kousal B**, Diblík P. Optická koherenční tomografie v neurologii. Praha, Maxdorf, 2020, 156 s. ISBN 978-80-7345-661-0.