

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Jana Djakow

Aspekty identifikace pacientů s primární ciliární dyskinezi

Aspects of identification of patients with primary ciliary dyskinesia

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc. MUDr. Ondřej Cinek, Ph.D.
Konzultant: Prof. MUDr. Petr Pohunek, CSc., MUDr. Jiří Uhlík, Ph.D.

Praha, 2015

Bibliografický záznam

DJAKOW, Jana. *Aspekty identifikace pacientů s primární ciliární dyskinezí. [Aspects of identification of patients with primary ciliary dyskinesia]*. Praha, 2015. 81 s, 9 příl.

Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Pediatrická klinika.

Vedoucí práce/školicel: Doc. MUDr. Ondřej Cinek, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 20. 07. 2015

Jana Djakow

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména svému manželovi a dalším rodinným příslušníkům za neustávající podporu při veškeré mé vědecké i klinické práci. Děkuji svým školitelům, Doc. MUDr. Ondřeji Cinkovi, Ph.D. a Prof. MUDr. Petru Pohunkovi, CSc., i dalším spolupracovníkům a spoluautorům za trpělivost a cenné připomínky k této práci i všem přiloženým původním článkům. V neposlední řadě děkuji prim. MUDr. Danielu Blažkovi za pracovní vstřícnost při psaní rukopisu této práce.

Obsah

OBSAH	6
1. ÚVOD A TEORETICKÁ VÝCHODISKA PRÁCE	8
1.1. STRUKTURA A FUNKCE ŘASINEK.....	9
1.1.1. Typy řasinek u člověka.....	9
1.1.2. Struktura a funkce řasinek v dýchacích cestách.....	10
1.2. HISTORICKÉ SOUVISLOSTI: OD KARTAGENEROVA SYNDROMU K MOLEKULÁRNÍ PODSTATĚ PCD	12
1.3. EPIDEMIOLOGIE	13
1.4. ETIOPATOGENEZE	14
1.4.1. Patofyziologie.....	14
1.4.2. Genetický základ onemocnění: prudce narůstající množina kauzálních genů	15
1.5. KLINICKÉ PŘÍZNAKY	23
1.5.1. Prenatální a perinatální období.....	23
1.5.2. Další příznaky vyskytující se u dětí	24
1.5.3. Příznaky u dospělých.....	26
1.5.4. Přidružená onemocnění.....	27
1.6. DIAGNOSTIKA.....	27
1.6.1. Vyšetření funkce řasinek.....	27
1.6.2. Vyšetření struktury řasinek.....	29
1.6.3. Vyšetření nazálního oxidu dusnatého (nNO).....	29
1.6.4. Ostatní pomocné diagnostické metody.....	30
1.6.5. Diferenciální diagnózy.....	32
1.7. PÉČE O PACIENTY S PCD A JEJICH PROGNÓZA.....	33
1.7.1. Pravidelné kontroly a vyšetřovací postupy.....	33
1.7.2. Cvičení a fyzioterapie.....	34
1.7.3. Farmakologická léčba.....	35
1.7.4. Očkování	36
1.7.5. Otorinolaryngologická péče.....	36
1.7.6. Prognóza.....	36
1.8. ZÁVĚR TEORETICKÉ ČÁSTI.....	37
2. VLASTNÍ PUBLIKACE A RUKOPISY S KOMENTÁŘI.	38
2.1. SOUBOR STUDIÍ ZABÝVAJÍCÍ SE GENETICKÝMI ZÁKLADY PCD	39
2.1.1. Omezení nutného repertoáru vyšetřovaných úseků pomocí prioritní sekvenace oblastí se	
zvýšeným výskytem mutací.....	39
2.1.2. Testování nových přístupů k diagnostice pomocí metod sekvenování nové generace.....	41
2.1.3. Hledání nového kauzálního genu specifického fenotypu primární ciliární dyskineze	48
2.2. STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE AUTOMATIZACÍ ZPRACOVÁNÍ OBRAZU Z VYSOKORYCHLOSTNÍ	
VIDEOMIKROSKOPIE	49
2.2.1. Úvod, cíle a hypotéza	49
2.2.2. Metodika.....	49
2.2.3. Výsledky	50
2.2.4. Diskuze	52

2.3.	STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE RŮSTEM PACIENTŮ S PCD	54
2.3.1.	Úvod, cíle a hypotéza	54
2.3.2.	Metodika	54
2.3.3.	Výsledky	54
2.3.4.	Diskuze	55
2.4.	STUDIE ZABÝVAJÍCÍ SE IDENTIFIKACÍ VYSOCE SUSPEKTNÍCH PACIENTŮ (KLINICKÝ INDEX RIZIKA PCD)	57
2.4.1.	Úvod, cíle a hypotéza	57
2.4.2.	Metodika	57
2.4.3.	Výsledky a diskuze	58
2.4.4.	Diskuze	60
2.5.	SOUBORNÉ A PŘEHLEDOVÉ ČLÁNKY V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH	61
3.	ZÁVĚR	62
4.	SOUHRN	64
5.	SUMMARY	65
6.	LITERATURA	66
7.	SEZNAM PŘÍLOH	80

1. Úvod a teoretická východiska práce

Primární ciliární dyskineze (PCD) je vzácné onemocnění podmíněné vrozenou poruchou funkce nebo struktury řasinek. V posledním desetiletí se objevila řada nových etiopatogenetických poznatků, stejně jako nová doporučení týkající diagnostiky i terapie tohoto onemocnění. Díky rozvoji různých diagnostických metod došlo v průběhu posledních 15 let k prudkému nárůstu počtu genů, o kterých je známo, že jejich poruchy mohou toto závažné onemocnění způsobit. Došlo také k zpřesnění diagnostiky tohoto onemocnění, která v současnosti vyžaduje k definitivnímu potvrzení diagnózy použití více různých diagnostických metod.

Řada zahraničních studií stejně jako poznatky z české klinické praxe naznačují, že primární ciliární dyskineze zůstává navzdory prudkému rozvoji znalostí o patogenezi a zlepšení diagnostiky onemocněním v populaci poddiagnostikovaným. Zejména pacienti s mírnějšími projevy a méně typickými fenotypy mohou být snadno řadu let i desetiletí vedeni pod jinými diagnózami (astma bronchiale, alergická onemocnění, nespecifikované defekty imunity apod.). Nejčastějšími projevy PCD jsou chronické či recidivující infekce horních a dolních cest dýchacích. Infekce dýchacích cest jsou nejčastější příčinou návštěv dětských pacientů u lékaře a diferenciální diagnóza opakovaných infekcí dýchacích cest je velmi široká, což komplikuje rozpoznání pacientů s PCD a stanovení správné diagnózy je často pozdní (průměr v naší populaci je 9,6 roku).

Přestože etiologické a patofyziologické znalosti i diagnostické postupy jsou čím dál tím dokonalejší, je zatím k dispozici pouze velmi omezené spektrum terapeutických postupů, které by měly solidní vědecké podklady. Postupy, které v současnosti používáme v rámci farmakologické i nefarmakologické terapie PCD, jsou odvozeny zejména od parciální podoby PCD s cystickou fibrózou. Přes podobnost některých klinických rysů je patofyziologická podstata obou onemocnění poměrně odlišná a řada zahraničních odborníků volá po široké mezinárodní spolupráci, která by vědecky opodstatnila či vyvrátila postupy používané v této populaci pacientů.

1.1. Struktura a funkce řasinek

Řasinky jsou buněčné specializace¹ s vysoce organizovanou strukturou. Jde o evolučně konzervované struktury, které si své uspořádání a částečně i funkci zachovávají u všech tvorů od jednobuněčných zelených řas (např. *Chlamydomonas reinhardtii*, která je jedním z jednoduchých modelových organismů pro studium cilií) až po obratlovce. Zatímco u jednobuněčných organismů jsou to součásti buněk, které umožňují pohyb, u složitějších organismů se postupně vyvinuly také v jakési buněčné senzory extracelulárního prostředí, odpovědné za příjem a třídění řady signálů. Významnou roli hrají také v řadě procesů embryonálního vývoje (Bisgrove B. W. and Yost H. J., 2006; Veland I. R. *et al.*, 2009).

1.1.1. Typy řasinek u člověka

Řasinky, které se vyskytují u člověka, lze rozdělit podle struktury a podle funkce. Podle struktury je dělíme na řasinky typu 9 + 2, které byly zmíněny v předchozím odstavci, a řasinky 9 + 0, u nichž se nevyvinul centrální pár mikrotubulů. Podle funkce lze řasinky dělit na pohyblivé a nepohyblivé. Zkombinujeme-li obě kritéria, získáme 4 typy lidských řasinek (Fliegau M. *et al.*, 2007):

- 1) Pohyblivé řasinky typu 9 + 2, které lemují dýchací cesty, ependym mozkových komor a centrálního míšního kanálu, u žen vejcovody a u mužů ductuli efferentes. Jejich pohyb, který má přesně definovaný vzorec s určitou frekvencí, usnadňuje pohyb částic podél epitelu. Tento pohyb je významnou součástí mukociliárních obranných mechanismů.
- 2) Nepohyblivé řasinky typu 9 + 2 se nacházejí na povrchu vláskových buněk ve vnitřním uchu a slouží jako receptory sluchového a rovnovážného ústrojí.
- 3) Nepohyblivé řasinky typu 9 + 0 se vyskytují téměř na všech buňkách obratlovců a mají funkci mechanoreceptorů, chemoreceptorů a otoreceptorů, pracují tedy jako „buněčné antény“ komunikující s extracelulárním prostředím. Nejčastěji je

¹ V zahraniční literatuře jsou řasinky běžné označovány jako organely, u nás je však pro cilie zakořeněn termín „buněčná specializace“. Toto rozlišování vychází z čistě morfologického hlediska, kdy za organelu je považována pouze součást buňky s vlastní membránou. Ačkoliv membrána na povrchu řasinky je součástí membrány buňky (a tudíž z morfologické definice nemá membránu vlastní), řada studií prokázala, že složení membrány řasinky se liší od zbytku buněčné membrány, obsahuje např. odlišné receptory a plní odlišné funkce. Naprostá většina procesů probíhajících v řasince je navíc přísně oddělená od zbytku buňky (např. vstup do intraciliárního transportu je omezen cytoskeletální i funkční bariérou, stejně jako přenos signálů zpracovávaných v řasince dále do buňky). Z funkčního hlediska je tedy označení organela zcela přiléhavé, ačkoliv není splněno striktně morfologické kritérium vlastní membrány.

nalezneme na výstelce žlučovodů, pankreatických vývodů, ledvinných kanálků, ale i například na povrchu chondrocytů. Axonema typu 9 + 0 také spojuje zevní a vnitřní segmenty tyčinek a čípků sítnice. Jejich klíčová role v přenosu signálu řady signalizačních kaskád byla objevena teprve nedávno (Fliegau M. *et al.*, 2007).

- 4) Nodální řasinky jsou pohyblivé, mají však strukturu 9 + 0 a podílejí se především na determinaci laterality u embrya v časném stadiu vývoje v období gastrulace (Chodhari R. *et al.*, 2004).

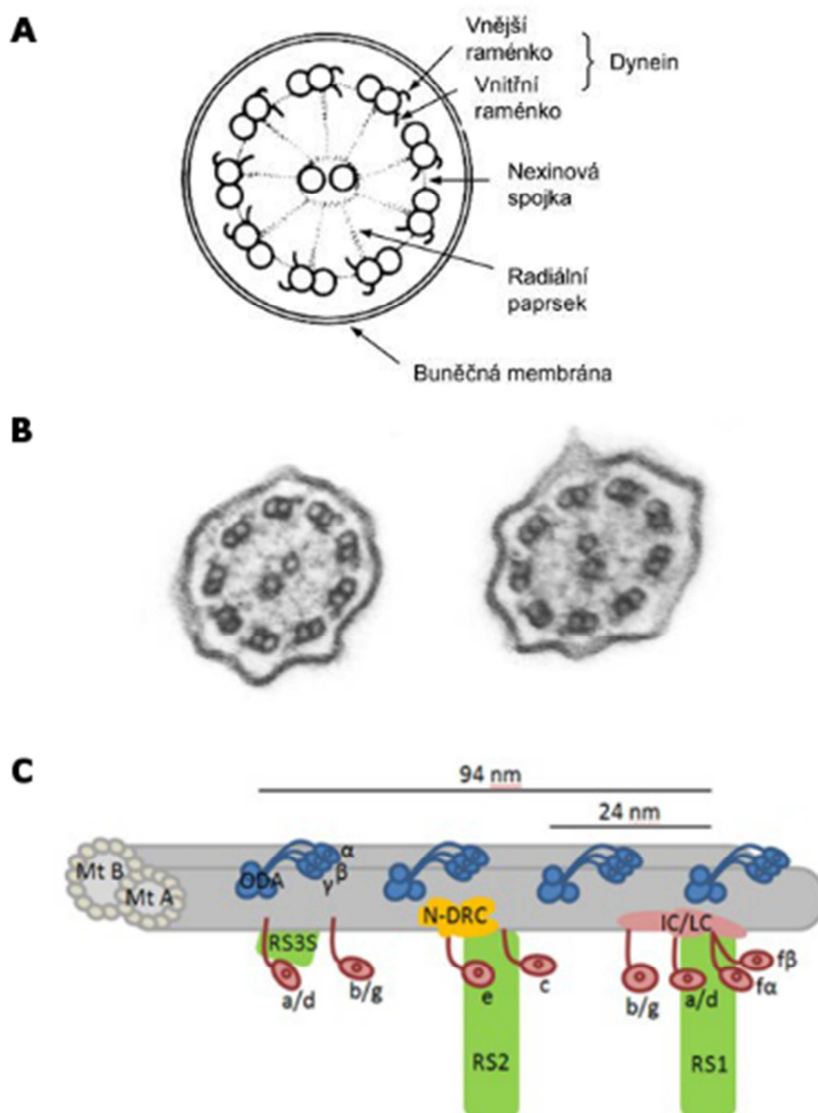
Objev poruch, které postihují nepohyblivé řasinky, pomohl vysvětlit řadu onemocnění se zdánlivě velmi odlišnými fenotypy. Příkladem jsou onemocnění jako polycystická onemocnění ledvin či jater, vrozená nefronoftíza, řada vzácných syndromů (Joubertův, Bardet-Biedlův, Alströmův, Meckel-Gruberův, orální faciální syndrom) nebo některé formy retinální degenerace. Tato onemocnění jsou v poslední době souhrnně označována jako ciliopatie (Badano J. L. *et al.*, 2006; Baker K. and Beales P. L., 2009). Primární ciliární dyskinezi lze mezi ciliopatie řadit rovněž, přestože v tomto případě postihuje porucha výhradně řasinky pohyblivé.

1.1.2. Struktura a funkce řasinek v dýchacích cestách

Na řasince se rozeznává část vyčníhající nad povrch buňky (volná část řasinky) a bazální tělísko, které slouží k zakotvení řasinky v buňce. Volná část řasinky je spojena s bazálním tělískem přechodnou částí. Vnitřní strukturu řasinky (OBRÁZEK 1) tvoří axonema, která se skládá z mikrotubulů – jednotlivých a uspořádaných do dubletů. Řasinky dýchacích cest mají evolučně konzervovanou strukturu 9 + 2, kde je pár centrálních mikrotubulů obklopen devíti periferními dublety mikrotubulů. Ty se skládají z mikrotubulů A (13 protofilament) a B (11 protofilament). Každý dublet je spojen s vedlejšími dvěma dublety nexinovými spojkami a je připojen k centrálnímu páru mikrotubulů radiálními paprsky. Centrální mikrotubuly se skládají každý ze 13 protofilament, které obsahují proteiny funkčně i biochemicky odlišné od proteinů ve vnějších dubletech. K mikrotubulu A každého periferního dubletu jsou připojena vnější a vnitřní dyneinová raménka (Satir P. and Christensen S. T., 2007; Satir P. and Christensen S. T., 2008; Tarchalski J., 1981).

OBRÁZEK 1: Schéma struktury řasinky (převzato z Přílohy 7)

Doplněno o schematickou adaptaci uspořádání mikrotubulů z (Kurkowiak M. *et al.*, 2015):



A) Schéma struktury řasinky v příčném průřezu. Devět periferních párů mikrotubulů obklopuje jeden centrální pár mikrotubulů. Mikrotubuly jsou navzájem spojeny radiálními paprsky, nexinovými spojkami (regulační komplex nexin-dynein) a dyneinovými raménky vnitřními (IDA) a vnějšími (ODA).

B) Příčný průřez normálními lidskými řasinkami bronchiálního epitelu s dobře viditelnými dyneinovými raménky (transmisní elektronová mikroskopie, původní zvětšení 40 000x).

C) Schéma periferního páru mikrotubulů u modelového organismu *Chlamydomonas*.

Všechny struktury s výjimkou ODA jsou distribuovány podél axonémy s periodicitou 94 nm, ODA se vyskytují častěji, každých 24 nm. *a/d*, *b/g*, *c* a *e*, jednohlavé isoformy IDA; *fa* a *fb*, dvouhlavá isoforma IDA; IC/LC, komplex IDA složený z intermediárního a lehkého řetězce; Mt A, mikrotubulus A; Mt B, mikrotubulus B; N-DRC, regulační komplex nexin-dynein; ODA, vnější dyneinová raménka s trojicí těžkých řetězců označovaných u *Chlamydomonas* α , β a γ ; RS1, radiální paprsek 1; RS2, radiální paprsek 2; RS3S, pahýl radiálního paprsku 3.

Zjednodušeně lze říci, že vnější dyneinová raménka jsou zodpovědná za frekvenci pohybu řasinky, vnitřní dyneinová raménka odpovídají za tvar ohybové křivky. Na svém konci dyneinová raménka nesou ATPázu. Pomocí hydrolýzy ATP se hlava dyneinového raménka posouvá podél sousedního mikrotubulu B. Centrální pár mikrotubulů komunikuje s radiálními paprsky a pomocí signálních molekul selektivně aktivuje dyneinová raménka postupně v různých částech axonemy (Chodhari R. *et al.*, 2004). Tím je způsobeno ohýbání řasinky. Samotný pohyb řasinky pak vypadá tak, že se řasinka rychle ohýbá vpřed jakýmsi úderem a pomalejším pohybem se vrací zpět. Zároveň svým koncem opisuje křivku mírně oválného tvaru. Mukociliární transport je účinný pouze tehdy, pohybují-li se řasinky koordinovaně s ostatními řasinkami na stejné buňce i na buňkách okolních a jsou-li orientovány stejným směrem. Frekvence pohybu řasinek je uváděna v rozmezí 10–20 Hz, hlen je posouván rychlostí asi 4 mm/min (Chilvers M. A. *et al.*, 2003b; Toledo M. F. and Adde F. V., 2000).

Chybění nebo zkrácení dyneinových ramének jsou nejčastější strukturální defekty způsobující primární ciliární dyskinezi (Plesec T. P. *et al.*, 2008; Shoemark A. *et al.*, 2012; Theegarten D. and Ebsen M., 2011). Je však známa celá řada dalších strukturálních abnormalit řasinek na úrovni transmisní elektronové mikroskopie (TEM), které mohou toto onemocnění způsobit. U některých pacientů s PCD nemusí být na úrovni TEM detekovatelná žádná ultrastrukturální abnormalita. Takovým případem jsou například pacienti s mutacemi v genu *DNAH11*, jejichž řasinky se pohybují s abnormálně vysokou frekvencí, avšak dyskinetickým způsobem, který nevede k účinné mukociliární clearance. Některé skupiny uvádějí, že procento pacientů s PCD, u nichž není detekovatelná porucha ultrastruktury řasinek, může dosahovat až 30 % (Knowles M. R. *et al.*, 2013a), ačkoliv v evropských i našich podmínkách je obvykle uváděna hodnota do 10 %. Tyto pacienty je možné odhalit pouze využitím kombinace dalších diagnostických metod, zejména vysokorychlostní videomikroskopie, ale stále více se uplatňuje i genetická diagnostika.

1.2. Historické souvislosti: Od Kartagenerova syndromu k molekulární podstatě PCD

V 60. letech minulého století Kartagener a Stucki popsali syndrom chronické sinusitidy, bronchiektázií a zrcadlového orgánového situ (*situs viscerum inversus*) (Kartagener M. and Stucki P., 1962). O více než desetiletí později dal Afzelius toto

onemocnění do souvislosti s funkcí řasinek (Afzelius B. A., 1976). V té době již bylo známo, že buňky prakticky celého dýchacího traktu mají na svém povrchu pohyblivé řasinky a že mukociliární clearance je jedním ze základních nespecifických obranných mechanismů dýchacích cest (Antunes M. B. and Cohen N. A., 2007). Afzelius zjistil, že většina pacientů s Kartagenerovým syndromem má nepohyblivé řasinky. Zároveň však objevil nepohyblivé řasinky také u pacientů s podobným spektrem příznaků, ale normální polohou orgánů. Toto onemocnění tedy nazval syndromem nepohyblivých řasinek (ICS z angl. *immotile cilia syndrome*). Nálezy z transmisní elektronové mikroskopie (TEM) již v té době doložily, že ICS může být způsoben několika různými poruchami řasinek na strukturální úrovni (Afzelius B. A., 2000). Začátkem tohoto tisíciletí byli díky rozvoji metodik přesnějšího hodnocení funkce řasinek rozpoznáni další pacienti s obdobným spektrem příznaků, jejichž řasinky se sice pohybují, ale vzorec pohybu jejich řasinek je chybný a nevede k účinnému očišťování dýchacích cest. Důsledky jsou stejné jako u pacientů, kteří mají řasinky zcela nepohyblivé. Pojmenování onemocnění se tedy znovu změnilo tak, aby obsáhlo i tuto skupinu pacientů. Současný termín primární ciliární dyskineze odráží skutečnost, že jde o vrozené geneticky podmíněné onemocnění (primární) způsobené chybnou pohyblivostí řasinek (ciliární dyskineze) (Sleigh M. A., 1981). Tímto označením je PCD také jasně odlišena od častější dyskineze sekundární (SCD), kdy chybnou pohyblivost řasinek způsobují zevní vlivy (nejčastěji infekce dýchacích cest, ale také vlivy vnějšího prostředí – např. kouření, alergeny) (Bertrand B. *et al.*, 2000; Mygind N. *et al.*, 1983).

1.3. Epidemiologie

Primární ciliární dyskineze (PCD) je vzácné geneticky podmíněné onemocnění řazené do skupiny ciliopatií, s předpokládaným výskytem 1:12 000-1:30 000 živě narozených dětí. Jde o geneticky heterogenní skupinu onemocnění s převážně autozomálně recesivní dědičností (Escudier E. *et al.*, 2009; Leigh M. W. *et al.*, 2009). V roce 2008 jsme na Pediatrické klinice FN Motol po oslovení řady pracovišť v celé České republice vytvořili databázi pediatrických pacientů s PCD, kde v roce 2008 bylo 28 do té doby diagnostikovaných pacientů, v době zpracovávání této práce je evidováno již 40 pacientů s PCD, několik z nich již mezitím dosáhlo dospělého věku. V současnosti spolupracujeme také na vytváření databáze celoevropské. I v případě, že počítáme s nejkonzervativnějším odhadem prevalence, očekávaný počet dětských pacientů s PCD v rámci ČR je minimálně 2–2,5x vyšší. Kromě nízkého celkového počtu

diagnostikovaných dětí je alarmující také vysoký průměrný věk při diagnóze ve srovnání s nejúspěšnějšími evropskými zeměmi (9,6 roku vs. 4 roky) (Coren M. E. *et al.*, 2002). Přitom závažné důsledky tohoto onemocnění (bronchiektázie, porucha plicních funkcí) se u řady pacientů objevují již v dětském nebo mladém dospělém věku (Date H. *et al.*, 2001; Maglione M. *et al.*, 2012a).

1.4. Etiopatogeneze

1.4.1. Patofyziologie

Mukociliární clearance je jedním z hlavních neimunologických mechanismů, který nás chrání před patogeny a částicemi, které vdechujeme. Mukociliární clearance zajišťují miliony řasinek na povrchu epitelu dýchacích cest a k její účinnosti je zapotřebí jejich koordinovaný pohyb zajišťující transport hlenu a v něm zachycených nečistot směrem k nazofaryngu. Při porušené struktuře nebo funkci řasinek není tento mechanismus účinný, stáza sekretu v dýchacích cestách je pak zodpovědná za hlavní klinické obtíže pacientů s PCD: opakované či chronické infekce dýchacích cest, které vedou k rozvoji bronchiektázií, chronické rhinosinuitidy a u řady pacientů také k rozvoji sekreторické otitidy a s ní spojeným poruchám sluchu.

Porucha pohyblivosti řasinek ve vejcovodech je příčinou subfertility (McComb P. *et al.*, 1986) a vyššího rizika ektopické gravidity u žen s PCD (Blyth M. and Wellesley D., 2008). U mužů s PCD je snižená plodnost dána jednak poruchou pohyblivosti řasinek v ductuli efferentes a jednak poruchou pohyblivosti spermií, jejichž bičík je strukturálně velice podobný řasince a podléhá shodným strukturálním poruchám (Chenoweth P. J., 2005; Pennarun G. *et al.*, 2002).

Úloha pohyblivých nodálních cílů je v průběhu embryonálního vývoje klíčová pro ustavení normální polohy orgánů. Tyto cíle jsou pohyblivé, chybí jim však centrální pár mikrotubulů, proto je tvar pohybu spíše cirkulární či oválný. Tímto pohybem nodálních cílů vzniká jednosměrný „nodal flow“, který je zcela zásadní pro vznik levo-pravé osy embrya. Pokud se nodální řasinky v této fázi vývoje nepohybují správně, levo-pravá tělesná osa je ustanovena náhodně a výsledkem může být *situs viscerum solitus* (normální orgánové uspořádání), částečný nebo úplný *situs viscerum inversus* (obrácená poloha některých nebo všech vnitřních orgánů), nebo vzácně *situs viscerum ambiguus* (různé formy heterotaxie – abnormálního uspořádání či umístění orgánů v dutině hrudní nebo břišní) (Leigh M. W. *et al.*, 2009; Sutherland M. J. and Ware S. M., 2009).

Jak již bylo uvedeno výše, v souvislosti s PCD byly identifikovány různé typy strukturálních defektů řasinek (Kupferberg S. B. *et al.*, 1998; Pizzi S. *et al.*, 2003; Roomans G. M. *et al.*, 2006), z nichž nejčastější je defekt vnějších nebo vnitřních dyneinových ramének (podle různých autorů 60–80 %). Z dalších strukturálních defektů se vyskytují numerické defekty, nejčastěji chybějící centrální pár mikrotubulů (9 + 0). U těchto defektů dochází k transpozici periferních dubletů tak, že výsledné uspořádání je často 8 + 1. Méně častými numerickými defekty jsou chybějící nebo nadbytečné periferní mikrotubuly nebo celé dublety. Nejméně obvyklé jsou defekty radiálních paprsků vedoucí k dezorganizaci axonemy o normálním počtu mikrotubulů. U pacientů s PCD pozorujeme často náhodnou orientaci řasinek, kterou lze sledovat po vyhodnocení vzájemné polohy centrálních párů. Složené cilie s mnohočetnými axonemami jsou považovány za sekundární jev způsobený tvorbou apikálních cytoplazmatických protruzí poškozenými řasinkovými buňkami (Al-Rawi M. M. *et al.*, 1998). Vzácnými poruchami jsou defekty bazálních tělísek a úplná aplazie řasinek.

Morillas *et al.* (Morillas H. N. *et al.*, 2007) uvádějí, že asi 15 % v současnosti diagnostikovaných pacientů nemá strukturální defekt, který by bylo možné odhalit pomocí elektronové mikroskopie, novější práce pak uvádějí číslo až 30 % (Knowles M. R. *et al.*, 2013a). U těchto nemocných je diagnóza obvykle stanovena na základě klinického obrazu a podrobných funkčních studií cilí s tím, že je vždy nutno pečlivě odlišit případné změny sekundární, užitečné může být u těchto pacientů i vyšetření genetické.

1.4.2. Genetický základ onemocnění: prudce narůstající množina kauzálních genů

Řasinky jsou vysoce komplexní evolučně konzervované struktury, sestávající ze stovek proteinů, další proteinové produkty jsou zapojeny do sestavování jednotlivých ciliárních součástí ještě v cytoplasmě. Z těchto skutečností plyne extrémní genetická heterogenita PCD. Ještě v přehledovém článku z roku 2009 (Příloha 7) jsme uváděli, že PCD může být způsobena mutacemi v některém z 8 známých genů, mutace v těchto genech byly zodpovědné za přibližně třetinu všech případů PCD. V přehledovém článku z roku 2014 již uvádíme 26 známých genů, které mohou toto onemocnění způsobit (Příloha 9). K dnešnímu dni již je známo 30 genů a další kandidátní geny jsou průběžně testovány, ani toto číslo tedy jistě není konečné. Geneticky objasnit příčinu PCD se v současnosti daří u přibližně dvou třetin všech pacientů (Kurkowiak M. *et al.*, 2014).

Primární ciliární dyskinezi nelze tedy z hlediska etiopatogeneze považovat za jedno onemocnění, ale spíše za skupinu geneticky rozdílných onemocnění s fenotypicky obdobnými, nikoliv však shodnými projevy, jak bude uvedeno dále. Klinický obraz je nápadně podobný, daný především nefungující mukociliární clearance, i když určitá specifika klinického obrazu jednotlivých kauzálních genů existují (např. některé genové defekty nejsou nikdy spojeny s obrazem *situs viscerum inversus*).

První geny spojené s PCD byly objeveny na základě studií genové vazby (linkage analysis), mapování homozygoty, následným studiem kandidátních genů a jejich proteinových produktů u rodin s PCD. Výběr kandidátních genů vyplýval zejména ze studia modelových organismů (nejčastěji jednobuněčné řasy *Chlamydomonas reinhardtii*). Vytvořené mutanty tohoto organismu potvrdily v začátcích genetických výzkumů význam řady proteinů pro pohyb flagel a cilií (Duquesnoy P. *et al.*, 2009; Pennarun G. *et al.*, 1999). Výzkum a potvrzování nových genů byly v počátcích prováděny téměř výhradně pomocí klasického Sangerova sekvenování. Prudký rozvoj metodik sekvenování nové generace (NGS z angl. next generation sequencing) umožnil revoluci v objevování dalších genů spojených s primární ciliární dyskinezi.

Z hlediska funkce a umístění proteinových produktů genů spojených s PCD lze kauzální geny rozdělit do několika skupin (Kurkowiak M. *et al.*, 2014):

- a) geny kódující proteinové součásti vnějších dyneinových ramének (ODA),
- b) geny, jejichž produkty se podílejí na sestavování dyneinových ramének,
- c) geny kódující proteinové součásti radiálních paprsků a centrálního páru řasinek,
- d) geny kódující proteinové součásti regulačního komplexu nexin-dynein (N-DRC),
- e) geny, jejichž mutace způsobují patologický pohyb řasinek bez ultrastrukturálního defektu,
- f) geny, jejichž mutace způsobují vzácné syndromologické typy PCD, a ostatní geny.

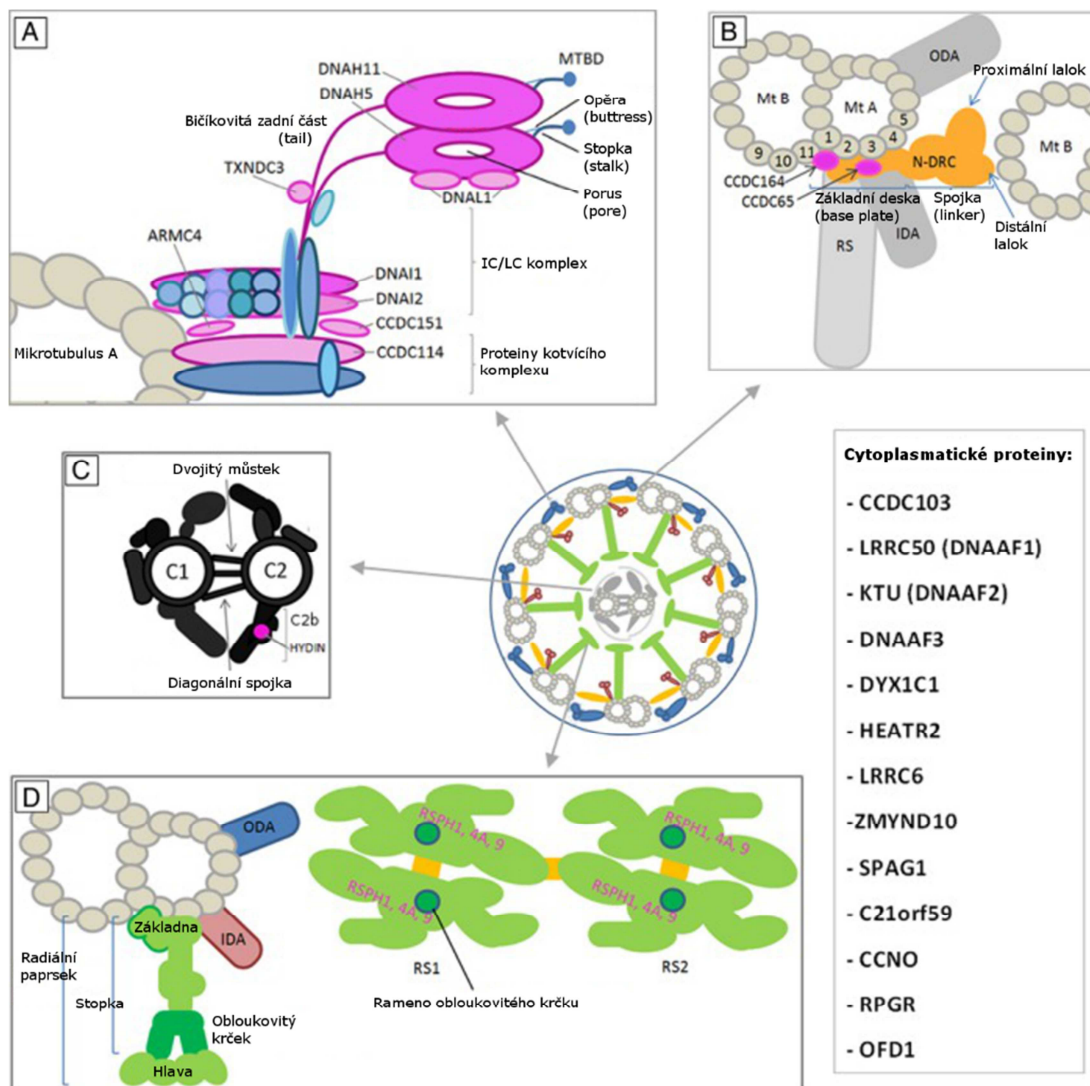
Fenotypicky se tyto skupiny se liší na úrovni ultrastrukturální i funkční a na rozdíl je třeba pamatovat při diagnostice PCD, kdy je důležité korelovat správně nalezené fenotypické znaky s předpokládaným genotypem (Chilvers M. A. *et al.*, 2003a; Noone P. G. *et al.*, 2004; Raidt J. *et al.*, 2014). Přehled genů, jejichž mutace mohou způsobit PCD, společně s jejich genotypickými korelacemi uvádí souhrnně TABULKA 1. Umístění a funkci jednotlivých proteinových produktů těchto genů pak shrnuje OBRÁZEK 2.

TABULKA 1: Přehled genů, jejichž mutace způsobují primární ciliární dyskinezi

Gen	Chromozomální lokus	Lokalizace/funkce proteinu	Ultrastrukturální poruchy	Typická funkční porucha	Literatura
<i>DNAI1</i>	9p13	ODA	ODA	Nepohyblivé cilie	(Noone P. G. et al., 2002; Zariwala M. A. et al., 2006; Zietkiewicz E. et al.), (Faily M. et al., 2008)
<i>DNAH5</i>	5p	ODA	ODA	Nepohyblivé cilie	(Faily M. et al., 2009; Hornef N. et al., 2006; Olbrich H. et al., 2002)
<i>DNAI2</i>	17q25	ODA	ODA	Nepohyblivé cilie	(Loges N. T. et al., 2008)
<i>TXNDC3 (NME8)</i>	7p14-p13	ODA	ODA	Nepohyblivé cilie	(Duriez B. et al., 2007)
<i>DNALI1</i>	14q24.3	ODA	ODA	Porušená pohyblivost	(Mazor M. et al., 2011)
<i>CCDC114</i>	19q13.33	Komplex ukotvující ODA	ODA	Nepohyblivé cilie	(Knowles M. R. et al., 2013b; Onoufriadis A. et al., 2013)
<i>ARMC4</i>	10p12.1	Komplex ukotvující ODA	ODA	Nepohyblivé cilie	(Hjeij R. et al., 2013; Onoufriadis A. et al., 2014a)
<i>CCDC151</i>	19q13.2	Směrování a ukotvování ODA	ODA	Nepohyblivé cilie	(Hjeij R. et al., 2014)
<i>CCDC103</i>	17q21.31	Cytoplasma, sestavování ODA	ODA	Nepohyblivé cilie	(Panizzi J. R. et al., 2012)
<i>KTU (DNAAF2)</i>	14q21.3	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA	Nepohyblivé cilie	(Omran H. et al., 2008)
<i>LRRC50 (DNAAF1)</i>	16q24.1	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA	Nepohyblivé cilie	(Duchesnoy P. et al., 2009; Loges N. T. et al., 2009)
<i>DNAAF3 (PF22)</i>	19q13	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA	Nepohyblivé cilie	(Mitchison H. M. et al., 2012)
<i>DYX1C1 (DNAAF4)</i>	15q21.3	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA	Nepohyblivé cilie	(Tarkar A. et al., 2013)
<i>HEATR2</i>	7p22.3	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA	Nepohyblivé cilie	(Horani A. et al., 2012)
<i>LRRC6</i>	8q24.22	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA	Nepohyblivé cilie	(Horani A. et al., 2013; Kott E. et al., 2012; Zariwala M. A. et al., 2013)
<i>ZMYND10</i>	3p21.31	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA	Nepohyblivé cilie	(Moore D. J. et al., 2013; Zariwala M. A. et al., 2013)
<i>SPAG1</i>	8q22.2	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA	Nepohyblivé cilie	(Knowles M. R. et al., 2013c)
<i>C21orf59</i>	21q22.1	Cytoplasma, sestavování DA	ODA+IDA		(Austin-Tse C. et al., 2013)

<i>CCDC39</i>	3q26.33	N-DRC	Dezorganizace MT a defekt IDA	Hyperkinetické, rigidní cilie	(Becker-Heck A. et al., 2011; Blanchon S. et al., 2012; Merveille A. C. et al., 2011)
<i>CCDC40</i>	17q25.3	N-DRC	Dezorganizace MT a defekt IDA	Hyperkinetické, rigidní cilie	(Becker-Heck A. et al., 2011; Blanchon S. et al., 2012; Merveille A. C. et al., 2011)
<i>CCDC164</i>	2p23.3	N-DRC	Defekt N-DRC; není viditelný	Malá amplituda pohybu	(Wirschell M. et al., 2013)
<i>CCDC65</i>	12q13.12	N-DRC	Defekt N-DRC	Porušená pohyblivost	(Austin-Tse C. et al., 2013)
<i>RSPH4A</i>	6q22	RS	Dezorganizace MT (defekt CP-RS)v některých ciliích	Cirkulární vzorec pohybu nebo rigidní řasinky	(Castleman V. H. et al., 2009; Zietkiewicz E. et al., 2012)
<i>RSPH9</i>	6q21	RS	Dezorganizace MT v některých ciliích (defekt CP-RS)	Cirkulární vzorec pohybu	(Castleman V. H. et al., 2009; Zietkiewicz E. et al., 2012)
<i>RSPH1</i>	21q22.3	RS	Dezorganizace MT (defekt CP-RS)	Odlišné vzorce pohybu	(Knowles M. R. et al., 2014; Kott E. et al., 2013; Onoufriadis A. et al., 2014b)
<i>HYDIN</i>	16q22	CP	Defekt výběžku CP; příležitostně MT defekty	Malá amplituda pohybu, dyskoordinace	(Olbrich H. et al., 2012)
<i>DNAH11</i>	7p21	ODA	Normální ultrastruktura	Hyperkinetický pohyb, malá amplituda	(Lucas J. S. et al., 2012; Pifferi M. et al., 2010)
<i>RPGR</i>	Xp21.1	Cytoplasma	Syndromologická PCD s retinitis pigmentosa		(Bukowy-Bieryllo Z. et al., 2013; Moore A. et al., 2006)
<i>OFD1</i>	Xq22	Cytoplasma	Syndromologická PCD s orofaciálním digitálním syndromem		(Budny B. et al., 2006)
<i>CCNO</i>	5q11.2	Apikální cytoplasma	Redukce počtu pohyblivých řasinek		(Wallmeier J. et al., 2014)

CP, centrální pár; DA, dyneinová raménka; IDA, vnitřní dyneinová raménka; MT, mikrotubuly; N-DRC, regulační komplex nexin-dynein; ODA, vnější dyneinová raménka; RS, radiální paprsky.

OBRÁZEK 2: Pravděpodobná lokalizace produktů genů identifikovaných u pacientů s PCD. Adaptováno podle (Kurkowiak M. *et al.*, 2015)

Proteiny, jejichž poruchy jsou spojeny s PCD jsou ve schématech značeny svými jmény a purpurovou barvou. Cytoplasmatické proteiny spojené s fenotypem PCD jsou uvedeny v boxu vpravo.

A: ODA se skládají z těžkých řetězců β a γ (ty sestávají z bičíkovité zadní části, motorické podjednotky, což je struktura podobná AAA-kruhu s centrálním pórem, a ze stopky (stalk), která obsahuje MTBD a šroubovicový výběžek nazývaný vzpěra (strut) nebo opěra (buttress), která zesiluje bázi stopky), dále ze lehkých a intermediárních řetězců (LC, IC) a proteinů kotvicího komplexu (DC).

B: N-DRC se skládá ze základní desky (basal plate) a spojky, která dále obsahuje proximální a distální laloky

C: Schéma centrálního páru, kde jsou viditelné mikrotubuly C1 a C2 se svými výběžky (včetně výběžku C2b). Mikrotubuly jsou vzájemně spojeny dvojitým můstkem (bipartite bridge) a diagonální spojkou (diagonal linker).

D: Struktura radiálního paprsku je zobrazena vlevo na příčném průřezu a vpravo z pohledu. RSPH1, RSPH4A a RSPH9 jsou součástí hlavy RS.

CP, centrální pár; DC, kotvicí komplex (docking complex); IC, intermediární řetězec; IDA, vnitřní dyneinové raménko; LC, lehký řetězec; Mt A a B, mikrotubulus A a B; MTBD, doména vázající mikrotubulus (microtubule binding domain); N-DRC, regulační komplex nexin-dynein (nexin-dynein regulatory complex); ODA, vnější dyneinové raménko; RS, radiální paprsek; β a γ , těžké dyneinové řetězce β a γ .

1.4.2.1. Geny kódující proteinové součásti vnějších dyneinových ramének (ODA)

Mutace v těchto genech mají za následek typické ultrastrukturální poruchy axonémy – zkrácení nebo úplné chybění vnějších dyneinových ramének. Funkčním důsledkem je pak úplná nebo téměř úplná nepohyblivost řasinek. Nejčastěji mutovaným genem u pacientů s PCD je gen *DNAH5* kódující protein, který tvoří součást těžkého řetězce ODA. Mutace v genu *DNAH5* jsou odpovědné za přibližně 15–24 % všech případů PCD (Faily M. *et al.*, 2009; Hornef N. *et al.*, 2006; Olbrich H. *et al.*, 2002). Dalším často mutovaným genem je gen *DNAI1* (kódující intermediární řetězec ODA), který způsobuje přibližně 10 % případů PCD (Noone P. G. *et al.*, 2002; Zariwala M. A. *et al.*, 2006; Zietkiewicz E. *et al.*), ačkoliv byla popsána také prevalence nižší (Faily M. *et al.*, 2008). Tento gen byl také prvním popsaným genem v souvislosti s PCD.

Další geny v této skupině se uplatňují jako kauzální mnohem méně často, jejich mutace byly dosud popsány pouze u jedné či několika málo rodin: *DNAI2* kóduje intermediární dyneinový řetězec 2 (Loges N. T. *et al.*, 2008), *TXNDC3* (*NME8*) je lidský ortolog *ICI* součásti ODA mořského ježka (Duriez B. *et al.*, 2007) a *DNALI1* kóduje lehký řetězec ODA, který se specificky váže na *DNAH5* (Mazor M. *et al.*, 2011).

1.4.2.2. Geny podílející se na sestavování dyneinových ramének

Komplexy dyneinových ramének, které jsou složeny z více podjednotek, jsou vytvářeny a sestavovány v cytoplasmě, transportovány směrem k řasince a ukotveny k axonemálním mikrotubulům pomocí komplexu ukotvujícího ODA. Nedávno byla objevena celá řada genů, jejichž proteinové produkty se podílejí na těchto procesech a jejichž mutace byly nalezeny u pacientů s poruchami ODA nebo kombinovanými defekty ODA+IDA.

Velmi vzácně byly ve skupině pacientů s ODA defekty popsány mutace v genech *CCDC114* (protein je součástí komplexu ukotvujícího ODA) (Knowles M. R. *et al.*, 2013b; Onoufriadis A. *et al.*, 2013) a *CCDC151* (produkt se podílí na sestavování komplexu ukotvujícího ODA) (Hjeij R. *et al.*, 2014), častější je zřejmě porucha genu *ARMC4*, který se rovněž podílí na směřování a ukotvování ODA k mikrotubulům (Hjeij R. *et al.*, 2013; Onoufriadis A. *et al.*, 2014a). Na sestavování ODA se zřejmě podílí také produkt genu *CCDC103*, který byl nalezen u jedné rodiny s částečným deficitem ODA (Panizzi J. R. *et al.*, 2012).

Do této skupiny patří i rozrůstající se skupina cytoplasmatických proteinů, které se podílejí na sestavování nebo transportu součástí ODA i IDA. Jako první byl popsán faktor *KTU* (*DNAAF2*), který byl podrobně studován také u mutant rybek medaka (Omran H. *et al.*, 2008). Další geny, které jsou zapojeny do stejného procesu a jejichž mutace tedy rovněž způsobují PCD se strukturálním defektem ODA i IDA, jsou vzácně u PCD pozorované *LRRC50* (*DNAAF1*) (Duquesnoy P. *et al.*, 2009; Loges N. T. *et al.*, 2009), *DNAAF3* (Mitchison H. M. *et al.*, 2012), *HEATR2* (Horani A. *et al.*, 2012) a *C21orf59* (Austin-Tse C. *et al.*, 2013) a častěji pozorované geny *DYX1C1* (protein interaguje s *KTU*) (Tarkar A. *et al.*, 2013), *LRRC6* (Horani A. *et al.*, 2013; Kott E. *et al.*, 2012; Zariwala M. A. *et al.*, 2013), *ZMYND10* (interaguje s *LRRC6*) (Moore D. J. *et al.*, 2013; Zariwala M. A. *et al.*, 2013) a *SPAG1* (Knowles M. R. *et al.*, 2013c).

1.4.2.3. Geny kódující proteinové součásti radiálních paprsků a centrálního páru řasinek

Mutace v těchto genech vedou k abnormalitám uspořádání mikrotubulů, nejčastějším ultrastrukturálním obrazem je chybění centrálních párů s následným uspořádáním 9+0 nebo 8+1 (periferní pár je dislokován do centra axonémy) (Chilvers M. A. *et al.*, 2003a; Noone P. G. *et al.*, 2004). Tyto defekty mají za následek změnu vzorce pohybu řasinek (Castleman V. H. *et al.*, 2009; Raidt J. *et al.*, 2014). U pacientů s mutacemi v těchto genech není pozorován abnormální orgánový situs, protože funkce nodálních cilií, která centrální pár nevyžaduje, zůstává zachována.

V této skupině byly jako první pomocí analýzy genové vazby a mapování homozygoty identifikovány u beduínských pacientů s PCD mutace v genech *RSPH9* a *RSPH4A* (Castleman V. H. *et al.*, 2009). Zatímco mutace v genu *RSPH9* se v kohortě evropských pacientů nevyskytovaly, mutace v genu *RSPH4A* byly u pacientů s abnormálním uspořádáním mikrotubulů nalezeny (Zietkiewicz E. *et al.*, 2012). Nejčastěji mutovaným genem v této skupině je ale zřejmě *RSPH1* (Knowles M. R. *et al.*, 2014; Kott E. *et al.*, 2013; Onoufriadis A. *et al.*, 2014b). Detekce těchto poruch radiálních paprsků může být pomocí klasické TEM poměrně obtížná, byla tedy vyvinuta experimentální technika 3D kryo-elektronové tomografie, která pomohla tyto defekty lépe vizualizovat (Lin J. *et al.*, 2014). Výhodné může být i použití imunofluorescenčního značení těchto proteinů (Frommer A. *et al.*, 2015). Vzácně mutovaným genem je *HYDIN* detekovaný zatím v pěti rodinách (Olbrich H. *et al.*, 2012), jehož mutace způsobuje obtížně detekovatelnou absenci výběžku C2b

centrálního páru mikrotubulů, abnormality na TEM se vyskytují pouze na malém procentu cílů, řasinky jsou pohyblivé, ale pohyb vykazuje sníženou amplitudu a diskoordinaci. Vzhledem k těmto nálezům je diagnostika tohoto fenotypu obtížná a pacienti mohou být snadno přehlédnuti. I genetická diagnostika je v tomto případě složitá, vzhledem k tomu, že *HYDIN* má evolučně vytvořený duplicitní gen *HYDIN2* s téměř identickou sekvencí.

1.4.2.4. Geny kódující proteinové součásti regulačního komplexu nexin-dynein (N-DRC)

Studiem mutantních organismů *Chlamydomonas* byla objevena složitost struktury regulačního komplexu nexin-dynein (N-DRC) (Dymek E. E. *et al.*, 2011). Tento komplex se společně s vnitřními raménky podílí na vytváření typického vzorce pohybu a stabilizuje vnitřní organizaci struktur axonémy.

V této skupině byly nejprve objeveny geny *CCDC39* a *CCDC40* (Becker-Heck A. *et al.*, 2011; Blanchon S. *et al.*, 2012; Merveille A. C. *et al.*, 2011), jejichž mutace vedou k poruše N-DRC a IDA. Na strukturální úrovni jsou u těchto pacientů patrné dezorganizace mikrotubulů s defekty IDA, funkčně jsou cilie rigidní, hyperkinetické.

Vzácněji pak byly nalezeny také mutace v dalších genech kódujících součásti N-DRC: *CCDC164* (Wirschell M. *et al.*, 2013), což je ortholog DRC1 podjednotky N-DRC *Chlamydomonas*, jehož mutace nepůsobí dezorganizaci mikrotubulů a porucha pohyblivosti je méně patrná než v případě *CCDC39*; a gen *CCDC65* (Austin-Tse C. *et al.*, 2013), jehož proteinový produkt je lidským orthologem podjednotky FAP250 N-DRC *Chlamydomonas* a jehož mutace způsobují poruchu pohyblivosti s rigidními ciliiemi a strukturální poruchu IDA s dezorganizací mikrotubulů v některých ciliiích.

1.4.2.5. Geny, jejichž mutace způsobují poruchu pohyblivosti řasinek bez strukturálního defektu

U některých pacientů s klasickými klinickými příznaky PCD nelze detekovat žádný ultrastrukturální defekt na úrovni TEM. Je však možné pozorovat abnormality pohybu řasinek. V této skupině byl dosud identifikován pouze jeden gen *DNAH11*, jehož proteinový produkt je součástí vnějších dyneinových ramének. Pacienti s mutacemi v tomto genu mají buď rigidní, nebo zcela nepohyblivé řasinky (Lucas J. S. *et al.*, 2012; Pifferi M. *et al.*, 2010). Mutace v genu *DNAH11* vysvětlují asi pětinu případů pacientů s PCD bez strukturálního defektu (Knowles M. R. *et al.*, 2012).

1.4.2.6. Geny, jejichž mutace způsobují vzácné syndromologické typy PCD, a ostatní geny

Dosud byly identifikovány 2 geny, jejichž mutace způsobují vzácné syndromologické varianty PCD, kde se porucha pohyblivých cilií překrývá s fenotypem jiné ciliopatie. Mutace v genu *RPGR* byla popsána u varianty PCD s retinitis pigmentosa (Bukowy-Bieryllo Z. *et al.*, 2013; Moore A. *et al.*, 2006), mutace v genu *OFD1* u pacienta, který měl známky PCD a orofaciálního digitálního syndromu spojeného s mentální retardací a makrocefalií (Budny B. *et al.*, 2006). U obou těchto genů je dědičnost vázaná na chromozom X, na rozdíl od autozomálně recesivní dědičnosti klasické PCD.

Zatím posledním genem, jehož mutace způsobují fenotyp podobný PCD, je u 16 pacientů popsán gen *CCNO* kódující cyklin O. Mutace tohoto genu způsobují poruchy vzniku a umístění mateřské centrioly řasinek. Důsledkem je nedostatečný počet cilií na apikální straně buňky s důsledky obdobnými jako u jiných typů PCD (Wallmeier J. *et al.*, 2014).

Předpokládá se, že s rozvojem genetické diagnostiky a s dalšími rozpoznávanými genetickými defekty řasinek se bude zvyšovat počet pacientů s PCD, u nichž se nepodaří prokázat jasný strukturální defekt, a přesto mají funkci řasinek trvale porušenou. Bush *et al.* (Bush A. *et al.*, 2007) zase uvádějí předpoklad, že bude přibývat diagnosticky hraničních případů PCD a že bude možné asociovat jednotlivé genetické mutace s různě vyjádřenými fenotypy, podobně jako je tomu v současnosti u cystické fibrózy CF.

1.5. Klinické příznaky

Klinické příznaky u dětí i dospělých souvisí převážně s nefungující mukociliární clearance. Dále jsou rozděleny podle věkového období, kdy je možné tyto příznaky u pacientů detekovat.

1.5.1. Prenatální a perinatální období

Již ultrazvukové vyšetření před narozením dítěte může upozornit na abnormální polohu orgánů. Všechny děti se zjištěným abnormálním orgánovým sitem (*situs viscerum inversus, ambiguus* – heterotaxie) by měly podstoupit funkční vyšetření řasinek bez ohledu na výskyt dalších příznaků (Barbato A. *et al.*, 2009). V této souvislosti je třeba zmínit, že některé formy heterotaxie zahrnují také abnormality

utváření srdeční kličky, které se projevují jako vrozené srdeční vady. Na PCD je třeba myslet u všech pacientů s vrozenou srdeční vadou, u kterých se vyskytují chronické infekce horních a dolních cest dýchacích, zejména u těch, kde může vrozená srdeční vada představovat určitou formu heterotaxie (Brueckner M., 2007; Brueckner M., 2012; Kennedy M. P. *et al.*, 2007). Zároveň je však třeba zdůraznit fakt, že abnormální orgánový situs se vyskytuje u méně než 50 % dětí s PCD (Sutherland M. J. and Ware S. M., 2009) a u některých diagnosticky obtížných forem se poruchy orgánového situ nevyskytují nikdy z důvodů již uvedených v textu výše.

U velké části dětí s PCD, ale zdaleka ne u všech, je možné anamnesticky zjistit abnormální perinatální průběh (Coren M. E. *et al.*, 2002; Knowles M. R. *et al.*, 2013a). Jde zejména o syndrom respirační tísně (RDS) (Ferkol T. and Leigh M., 2006), a to přestože jsou děti s PCD v naprosté většině případů narozené v termínu s normální porodní hmotností a délkou. V našem souboru jsme abnormální časné novorozenecké období identifikovali u 45 % dětí (RDS, pneumonie, aspirace, transienční tachypnoe). Také Ferkol a Leigh (Ferkol T. and Leigh M., 2006) uvádějí, že PCD tvoří část etiologicky neobjasněných případů respirační tísně novorozenců narozených v termínu a že by měla v tomto případě tato diagnóza vždy zvažována již neonatologu.

Také sourozenci všech pacientů s již diagnostikovanou PCD by měli být vyšetřeni již v časném novorozeneckém věku bez ohledu na přítomnost symptomů (Barbato A. *et al.*, 2009).

Pravděpodobně nejčastějším příznakem vůbec, který je ve shodě s jinými soubory udáván i v našem souboru prakticky u všech pacientů, je trvalá rýma, typicky začínající již v novorozeneckém období a v různé intenzitě se projevující v průběhu celého života (Bush A. *et al.*, 2007). Často se k rýmě přidává i chronický vlhký kašel, který napomáhá odstraňování hlenu z dýchacích cest při nefungující mukociliární clearance.

1.5.2. Další příznaky vyskytující se u dětí

Opakované nebo chronické infekce horních a dolních dýchacích cest jsou nejčastějšími obtížemi pacientů s PCD, u většiny z nich přitom začínají poměrně časně, obvykle ještě v kojeneckém či raném batolecím období. U jednotlivých pacientů se může lišit tíže i četnost infekcí, stejně jako míra postižení horních a dolních dýchacích cest.

Opakované otitidy (akutní více než 3x) nebo ještě častěji chronická sekretorická otitida (el-Sayed Y. *et al.*, 1997) se vyskytovaly v našem souboru u 95 % všech dětí. V případě chronické sekretorické otitidy může na možnost PCD upozornit neúspěšné zavádění ventilačních trubiček (zejména jejich vícenásobné spontánní vypadnutí), nebo přetrvávající sekrece ze středouší po jejich zavedení (Coren M. E. *et al.*, 2002; el-Sayed Y. *et al.*, 1997; Mygind N. and Pedersen M., 1983). Současně se vyskytující převodní porucha sluchu je popisována u více než poloviny PCD pacientů (Majithia A. *et al.*, 2005).

Z ostatních infekcí se často objevují opakované bronchitidy (s obstrukcí či ještě častěji bez ní), pneumonie a sinusitidy. Prakticky u všech dětí s PCD jsou postiženy jak horní, tak i dolní cesty dýchací, i když míra zastoupení se může dosti lišit. Noone *et al.* (Noone P. G. *et al.*, 2004) uvádějí, že kombinace příznaků postižení horních a dolních dýchacích cest je podmínkou, bez níž nelze diagnózu PCD stanovit. Pokud se (zejména u dětí nad 4 roky věku) vyskytují izolované příznaky pouze z horních nebo pouze z dolních cest dýchacích, svědčí to spíše proti diagnóze PCD. Opakované či chronické infekce dolních cest dýchacích dříve či později vedou k rozvoji bronchiektazií. „Idiopatické bronchiektázie“ jsou sice zřídka problémy dětského věku, ale část těchto pacientů jistě tvoří nedidiagnostikovaní pacienti s PCD (Shoemark A. *et al.*, 2007). Bronchiektázie byly popsány již u dětí s PCD od 3 let věku a jsou téměř univerzálním nálezem u dospělých pacientů s PCD (Noone P. G. *et al.*, 2004). Při spirometrickém vyšetření může být prokazatelná obstrukční porucha ventilace, která se zhoršuje s věkem (Sagel S. D. *et al.*, 2011).

U pacientů s PCD prakticky vždy rodiče popisují přetrvávající rýmu a zahlenění, někdy také kašel, a to i v obdobích mimo infekce. Pokud se kašel vyskytuje, pak mívá téměř konstantně vlhkou složku. Děti jsou často odmítány v předškolních zařízeních, protože rýma a vlhký kašel jsou automaticky přisuzovány infekčním onemocněním. Tyto děti bývají opakovaně neúspěšně odesílány na alergologická, imunologická a gastroenterologická vyšetření, často i léčeny mnoha skupinami různých léčiv, rodiče však většinou ani na kombinované léčbě nepozorují výraznější zlepšení příznaků. Zahraniční publikace (Coren M. E. *et al.*, 2002) i naše zkušenosti naznačují, že někteří pacienti mohou být dlouhodobě vedeni například pod diagnózami obtížně léčitelné astma, astma nereagující na léčbu, blíže nespecifikovaná porucha imunity či sino-bronchiální syndrom nejasné etiologie.

Vzhledem k chronické sekretorické otitidě a rhinosinuitidě jsou děti často odesílány také do ambulancí ORL lékařů, kteří často opomíjejí příznak současně se vyskytujícího vlhkého kašle a diagnóza se opožďuje (Sommer J. U. *et al.*, 2011).

Souhrnně lze konstatovat, že PCD by měla být zvažována v diferenciální diagnostice časně u všech dětí s abnormalitami orgánového *situ*, u novorozenců narozených v termínu, u kterých se rozvine jinak nevysvětlený syndrom respirační tísně, a u dětí s anamnézou perzistujícího zahlenění od časného věku, který je spojen s perzistující rhinosinuitidou. Je důležité, aby ORL specialisté zvažovali diagnózu PCD u pacientů s chronickou sekretorickou otitidou a dlouhodobým chronickým zahleněním a aby kardiologové byli obeznámeni s možnou asociací PCD s vadami spojenými s heterotaxií (Knowles M. R. *et al.*, 2013a).

1.5.3. Příznaky u dospělých

U dospělých se vyskytuje podobné spektrum příznaků, které jsou popisovány u dětí, ačkoliv poruchy sluchu jsou méně časté. Plicní funkce se s věkem postupně zhoršují a téměř všichni dospělí pacienti s PCD mají bronchiektazie. Noone *et al.* (Noone P. G. *et al.*, 2004) popisují, že až 25 % dospělých pacientů s PCD ve Spojených státech amerických mají příznaky respiračního selhání. Řada z těchto pacientů vyžaduje transplantaci plic (Date H. *et al.*, 2001).

U mužů je díky omezené pohyblivosti spermií (asthenozoospermie) významně snížená fertilita (Munro N. C. *et al.*, 1994). Úspěšné oplodnění pomocí intracytoplasmatické injekce spermie (ICSI) je však možné (McLachlan R. I. *et al.*, 2012; Stalf T. *et al.*, 1995). Zajímavostí je, že mutace v některých dyneinových genech byly nalezeny také u mužů s nesyndromologickou asthenozoospermii bez jakýchkoliv respiračních obtíží (Zuccarello D. *et al.*, 2008).

Subfertilita či infertilita je popisována také u žen (Halbert S. A. *et al.*, 1997; McComb P. *et al.*, 1986), přestože pohyb řasinek není jediným faktorem, který se podílí na transportu oplozeného vajíčka vejcovodem (Kolle S. *et al.*, 2009). Má se za to, že porucha ciliární aktivity řasinek vejcovodu je zodpovědná také za vyšší výskyt mimoděložních těhotenství u patientek s PCD (Blyth M. and Wellesley D., 2008).

1.5.4. Přidružená onemocnění

PCD se může pojít také s dalšími přidruženými chorobami. Někteří pacienti s PCD mohou mít bronchiální hyperreaktivitu, která je často chybně interpretována jako asthma bronchiale. U pacientů s PCD se pravděpodobně také vyskytují častěji spánkové poruchy dýchání (Santamaria F. *et al.*, 2014). Ve vzácnějších případech se pak mohou současně s PCD vyskytovat také vrozené srdeční vady (Brueckner M., 2007), polycystické onemocnění ledvin či jater (Gunay-Aygun M., 2009), hydrocefalus, retinální degenerace včetně retinitis pigmentosa (Krawczynski M. R. and Witt M., 2004), hluchota (Krawczynski M. R. *et al.*, 2004), biliární atrezie, závažné onemocnění jícnu (atrezie, závažný reflux). Většina těchto přidružených onemocnění patří samostatně či jako součást nejrůznějších syndromů také mezi ciliopatie.

1.6. Diagnostika

Jak přibývají znalosti o funkci řasinek ve zdraví i nemoci, vyvstala také potřeba přesnější diagnostiky PCD. Vzhledem k množství různých fenotypů, je diagnostika tohoto onemocnění poměrně složitá a měla by být vyhrazena specializovaným pracovištím (O'Callaghan C. *et al.*, 2007). Někteří pacienti mohou vykazovat pouze velmi nenápadné poruchy pohyblivosti a další skupina pacientů nemá žádný ultrastrukturální defekt na transmisní elektronové mikroskopii. V naprosté většině případů bývá při diagnostice nutné korelovat klinický obraz s výsledky zjištěnými vyšetřením funkce a struktury řasinek (Bush A. *et al.*, 2007).

1.6.1. Vyšetření funkce řasinek

Kromě typických klinických příznaků je k diagnóze vyžadován vždy průkaz poruchy funkce řasinkového epitelu (Chilvers M. A. *et al.*, 2003b; O'Callaghan C. *et al.*, 2007; Stannard W. A. *et al.*). Vyšetření motility řasinek se provádí pomocí tzv. digitální vysokorychlostní videomikroskopie (HSVM z angl. high-speed video microscopy) (Ishijima S., 1995; Stannard W. A. *et al.*), která je v současnosti považována za zlatý standard pro hodnocení vzorce pohyblivosti řasinek (Chilvers M. A. *et al.*, 2003b). Dříve používané diagnostické metody jsou již dnes považovány za obsoletní, zejména pro svou nízkou senzitivitu (světelná mikroskopie bez záznamu) nebo specifitu (sacharinový test) (Barbato A. *et al.*, 2009). Vzorek k vyšetření HSVM se odebírá pomocí tzv. nazálního brushing, při kterém se cytologickým či bronchoskopickým kartáčkem do speciálního roztoku odebere malý vzorek nosní (příp. při bronchoskopii

bronchiální) sliznice. Nazální odběr je rychlý, pacienta nezatěžující a proveditelný i u nejmenších dětí. Epiteliální lemy se pozorují obvykle při zvětšení 400-1000x a pohyb řasinek se nahrává rychlostí 250-500 snímků za vteřinu. Ideální je pozorovat následně zpomalený záznam pohybu řasinek na několika neporušených lemech. Při pozorování porušených lemů nebo samostatných buněk významně stoupá procento řasinek se zachyceným dyskinetickým pohybem (Thomas B. *et al.*, 2009). Zároveň se počítá průměrná frekvence pohybu řasinek. Vzorec pohybu některých fenotypů PCD může být obtížné rozeznat od normálně se pohybujících řasinek, bývá s výhodou pozorovat alespoň některé lemy také pohledem zeshora (overhead projection). Jak již bylo uvedeno v části o genetických příčinách PCD, ukazuje se, že jednotlivé genetické a strukturální defekty jsou asociovány s typickou poruchou pohyblivosti řasinek (Armengot M. *et al.*, 2010; Chilvers M. A. *et al.*, 2003a). Vzhledem k narůstajícímu množství objevovaných pacientů s fenotypy, které mají velmi diskrétní nebo žádné ultrastrukturální poruchy, se kvalitní diagnostika pomocí HSVM stává nepostradatelnou. V průběhu posledních let se toto vyšetření podařilo zavést i na našem pracovišti, které je zatím jediným centrem doporučovaným pro diagnostiku PCD Českou společností dětské pneumologie České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně.

Největším úskalím samotného vyšetření funkce řasinek je často odlišení případů sekundární ciliární dyskineze (SCD) (Armengot M. *et al.*, 2010; Bertrand B. *et al.*, 2000; Pifferi M. *et al.*, 2008a; Wilson R., 1988). Je nezbytné, aby hodnotící osoba byla proškolená a obeznámena jak se všemi možnými alteracemi pohyblivosti řasinek různých fenotypů PCD, tak i s abnormalitami vyskytujícími se v případě SCD. Sekundární ciliární dyskineze může nezdědkově zasahovat většinu či všechny pozorované epiteliální lemy (Pedersen M., 1990) a její odlišení od PCD je pak komplikované. Nejčastěji se SCD vyskytuje v návaznosti na akutní infekce dýchacích cest a může trvat i několik týdnů, než dojde k její úpravě. Pokud je tedy pacient po akutní infekci dýchacích cest, je dobré odběr vzorku odložit alespoň o 4 týdny (Bertrand B. *et al.*, 2000; Pifferi M. *et al.*, 2008b).

Opakovaným vyšetřením se obvykle daří většinu případů PCD a SCD odlišit. Definitivně lze tyto dvě jednotky odlišit vyšetřením funkce řasinek po ciliogenezi *in vitro* (Jorissen M. *et al.*, 2000; Olbrich H. *et al.*, 2006). Je využíváno několik různých experimentálních technik buněčných kultur umožňujících růst respiračního epitelu s

ciliemi (Hirst R. A. *et al.*, 2010; Pifferi M. *et al.*, 2009). Toto vyšetření je časově, organizačně i personálně náročné, úspěšnost ciliogeneze *in vitro* dosahuje v nejlepších laboratořích asi 60–70 %. Toto vyšetření je vyhrazeno pro vysoce specializované případy.

1.6.2. Vyšetření struktury řasinek

U většiny, zdaleka však ne u všech (Schwabe G. C. *et al.*, 2008), pacientů s PCD je pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) možné prokázat defekty ve struktuře řasinek (Plesec T. P. *et al.*, 2008; Roomans G. M. *et al.*, 2006; Tarchalski J., 1981). Jednotlivé typy strukturálních poruch u primární ciliární dyskineze i jejich korelace s genetickou příčinou byly již zmíněny výše. Toto vyšetření zůstává nadále jedním z pilířů diagnostiky. Provádí se u pacientů, kde anamnéza i výsledky HSVM svědčí pro PCD. Na rozdíl od dřívější doby již jej však nelze považovat za zlatý standard diagnostiky PCD, protože významné procento pacientů bez strukturálního defektu nedokáže odhalit. Také hodnocení TEM je náročné a vyžaduje patologickou či histologickou laboratoř se zkušenostmi se zpracováváním vzorku i hodnocením nálezů a přináší s sebou řadu úskalí – i zde může být odlišení sekundárních změn obtížné (Jorissen M. and Willems T., 2004; O'Callaghan C. *et al.*, 2011).

1.6.3. Vyšetření nazálního oxidu dusnatého (nNO)

Měření nazálního NO je běžně využíváno jako screeningové vyšetření, má-li lékař podezření na PCD (Corbelli R. *et al.*, 2004; Karadag B. *et al.*, 1999; Walker W. T. *et al.*, 2012). Ačkoliv naprostá většina pacientů s PCD má nízké hladiny nazálního NO, PCD nelze potvrdit, co je ale důležitější, ani vyloučit pouze na základě výsledků tohoto vyšetření (Corbelli R. *et al.*, 2004; Moreno Galdo A. *et al.*; Piacentini G. L. *et al.*, 2008) a interpretace výsledků musí vždy brát v potaz klinický obraz a event. výsledky dalších vyšetření. Malé procento pacientů s PCD má normální hladiny nazálního NO, falešná pozitivita vyšetření je naopak popisována u diagnóz jako cystická fibróza a nosní polypóza (Corbelli R. *et al.*, 2004).

Příčina nízkých hladin nazálního NO u pacientů s PCD zatím není zcela objasněná (Walker W. T. *et al.*, 2012). Existují různé techniky měření nazálního NO, vyžadující různou míru spolupráce pacienta. I při použití nejjednodušší metody měření je toto vyšetření proveditelné až u pacientů asi od 4–5 let věku (Marthin J. K. and Nielsen K.

G., 2011; Santamaria F. *et al.*, 2008). Také toto vyšetření je v posledních letech dostupné i na našem pracovišti.

1.6.4. Ostatní pomocné diagnostické metody

1.6.4.1. Buněčné kultury řasinkového epitelu

Již výše bylo zmíněno využití ciliogeneze *in vitro*. Toto vyšetření může být užitečné zejména u pacientů s rozšířenou sekundární ciliární dyskinezi (Armengot M. *et al.*, 2010) a dále při diagnostice některých vzácnějších fenotypů PCD (Boon M. *et al.*, 2014; Hirst R. A. *et al.*, 2010; Pifferi M. *et al.*, 2009). Vyšetření využívá toho, že po ciliogenezi *in vitro* buňky nevykazují takové množství SCD jako původní vzorek (Jorissen M. *et al.*, 2000) a u pacientů s PCD se často dokonce abnormalita ve vzorci pohybu ještě zdůrazní (Hirst R. A. *et al.*, 2014).

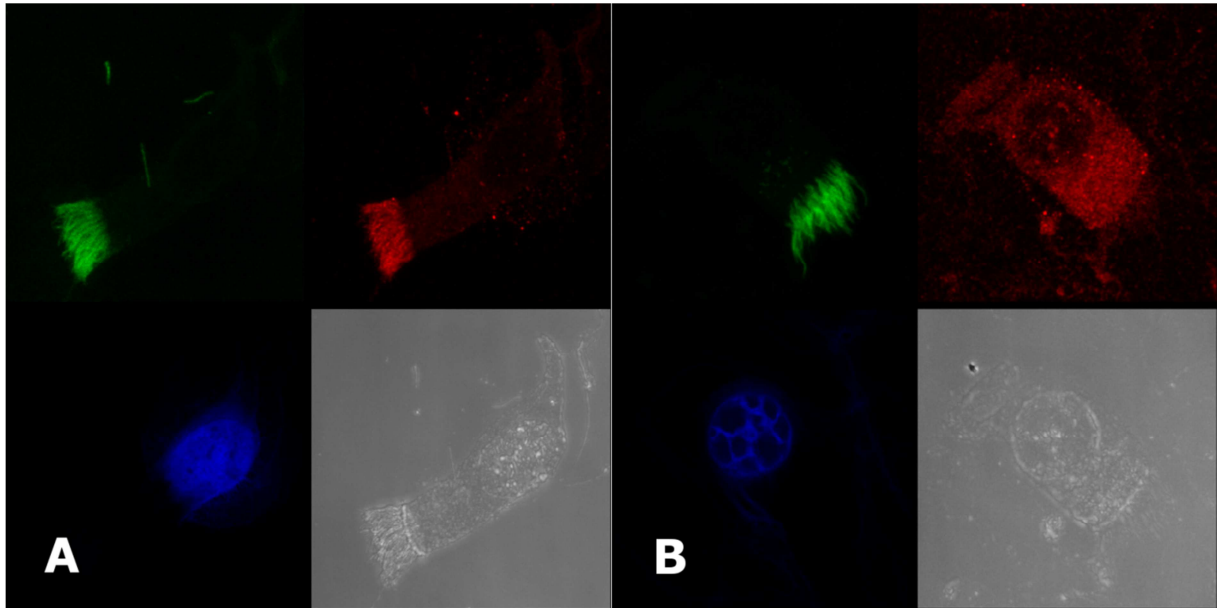
1.6.4.2. Imunofluorescence

Diagnostika pomocí imunofluorescence využívá skutečnosti, že specifické strukturální proteiny řasinek jsou u některých pacientů s PCD dislokovány (Fliegauf M. *et al.*, 2005). Označení takových proteinů fluorescenčními protilátkami a pozorování jejich lokalizace lze pak použít pro výzkumné i diagnostické účely (Omran H. and Loges N. T., 2009). Imunofluorescenční barvení dokumentuje OBRÁZEK 3.

1.6.4.3. Genetické vyšetření

V současnosti se předpokládá, že kauzální gen může být odhalen asi u 65 % pacientů s PCD (Knowles M. R. *et al.*, 2013a). Genetické potvrzení PCD ovšem může být komplikované a časově i finančně náročné, a to zejména pro extrémní genetickou heterogenitu tohoto onemocnění, ale také proto, že řada z kauzálních genů, včetně nejčastěji mutovaného *DNAH5*, je výjimečně dlouhých. Například *DNAH5* sestává ze 79 exonů plus alternativního exonu 1 a patří mezi jedny z nejdelších lidských genů. Racionálním a ekonomickým (cost-effective) využitím různých genetických metod se zabývá několik našich prací. Stále častěji jsou pro výzkumné, ale i diagnostické účely využívány metody sekvenování nové generace (whole genome/exome sequencing, custom amplicon sequencing). Tento trend jsme sledovali také při naší práci.

OBRÁZEK 3: Imunofluorescenční barvení respiračních buněk.



V každém panelu je buňka pozorovaná standardní světelnou mikroskopií v pravém dolním rohu, další tři obrázky v každém panelu zobrazují tutéž buňku při pozorování v kanálu pro jednotlivé imunofluorescenční barvičky. Imunozačnění bylo následující: Zelená, protilátka proti acetylovanému tubulinu (marker řasinek); modrá, DAPI (marker buněčných jader); červená, protilátka proti proteinu DNAH5.

A: U zdravého dobrovolníka je protein DNAH5 jasně detekovatelný v řasinkách (srovnej červený a zelený barevný kanál).

B: U pacienta s PCD způsobenou mutacemi v genu DNAH5 je protein lokalizován pouze v cytoplasmě buňky a nedostává se do řasinek (srovnej červený a zelený barevný kanál).

1.6.5. Diferenciální diagnózy

Opakované respirační infekce jsou jedna z nejčastějších obtíží, se kterými se dětský lékař setkává. Obecně se uvádí, že u dětí do 6 let věku, zejména navštěvují-li kolektivní zařízení, může být za normu považováno až 5 běžných respiračních infekcí ročně. K tomuto číslu je ovšem třeba přistupovat individuálně, hodnotit vždy tíži obtíží u daného pacienta, jeho rodinnou a osobní anamnézu a zaměřit se na příznaky, které mohou signalizovat, že opakované infekce jsou příznakem jiného základního onemocnění. Primární ciliární dyskineze jistě patří do diferenciální diagnózy opakovaných či chronických respiračních infekcí, vzhledem k její relativní vzácnosti je však třeba vždy nejprve vyšetřit a případně vyloučit jiné častější příčiny podobných klinických obtíží.

Jedno z nejčastějších onemocnění dětského věku, které se může projevovat opakovanými respiračními infekcemi, jsou hypertrofické adenoidní vegetace. Podobně se mohou projevovat také závažné (zejména humorální) imunodeficity, cystická fibróza, astma a alergická rhinosinusitida, ale také onemocnění z gastroezofageálního refluxu (GERD) s extraezofageálními příznaky. U každého dítěte by měly být tyto diferenciální diagnózy zváženy a vyšetřeny (Coren M. E. *et al.*, 2002). Na onemocnění PCD je nicméně i nadále třeba myslet, zejména v těchto případech:

- Ani po odstranění adenoidních vegetací nedošlo ke zlepšení obtíží.
- Obtíže vypadají významněji než zjištěné abnormality při imunologickém vyšetření, event. jsou protilátky normální nebo zvýšené (pacienti s PCD mohou mít různý imunologický profil od mírných hypogamaglobulinémií či známek mírné dysregulace buněčné imunity, přes normální hladiny protilátek až po významné hypergamaglobulinémie IgA, IgM či IgG, které svědčí pro chronicky probíhající zánět).
- U pacientů, kde byl extraezofageální GERD správně diagnostikován (24h impedanční pHmetrie), obtíže neustupují ani po zavedení léčby (někteří pacienti s PCD mohou mít současně GERD, který je dlouho považován za základní diagnózu).
- Pacient má stanovenou diagnózou astmatu, která ale i při dobré spolupráci pacienta a rodiny nereaguje adekvátně na zavedenou terapii.
- Alergologické vyšetření je negativní.
- Spirometricky jsou známky fixované obstrukce v dolních cestách dýchacích.

1.7. Péče o pacienty s PCD a jejich prognóza

Ačkoliv se objevují první vědecké publikace o postupech, které by umožnily obnovení ciliárních funkcí (genová terapie a terapie s využitím malých molekul) (Boudes P. F., 2014; McIntyre J. C. *et al.*, 2012; McIntyre J. C. *et al.*, 2013; Ostrowski L. E. *et al.*, 2014), primární ciliární dyskinezi v současné době není možné vyléčit. Je možné pouze pravidelnou a soustavnou terapií co možná nejúčinněji bránit vzniku komplikací, zejména pak závažného postižení plic (Lucas J. S. *et al.*, 2013). Sledování pacientů s PCD by mělo být vždy vyhrazeno terciárním pracovištím se zkušenostmi s péčí o tyto pacienty. O'Callaghan *et al.* (O'Callaghan C. *et al.*, 2007) předpokládají, že ustavení center povede ke zlepšení krátkodobé i dlouhodobé morbidit u pacientů s PCD, ačkoliv dosavadní velmi krátkodobé zkušenosti zatím tento trend nepotvrzují (Maglione M. *et al.*, 2014). Některé práce ale jasně naznačují, že časná diagnóza znamená menší výskyt komplikací v dospělosti (Yiallourous P. K. *et al.*, 2015).

Péče o děti s PCD dosud nemá standardizovanou podobu a napříč Evropou je možné pozorovat významné rozdíly (Strippoli M. P. *et al.*, 2012). Pracovní skupina pro PCD Evropské respirační společnosti sice vydala doporučení pro diagnostiku a management PCD (Barbato A. *et al.*, 2009), ale zároveň dodává, že důkazy pro tato doporučení jsou málo kvalitní.

Péče o děti s PCD je částečně extrapolována ze zkušeností s péčí o děti s cystickou fibrózou (CF). Protože se však patofyziologie obou onemocnění v mnohém liší, nelze se s takto zjednodušujícím přístupem spokojit a je zapotřebí dále pomocí metod medicíny založené na důkazech ověřovat, které z využívaných postupů skutečně zlepšují dlouhodobou prognózu pacientů s PCD. K provedení takových klinických studií je vzhledem k vzácnosti onemocnění zapotřebí mezinárodní spolupráce. Terapeutické postupy se v současnosti soustředí především na zlepšení clearance dýchacích cest kombinacemi fyzioterapie a cvičení, event. s využitím inhalační terapie, a na agresivní léčbu všech respiračních infekcí (Barbato A. *et al.*, 2009).

1.7.1. Pravidelné kontroly a vyšetřovací postupy

Při pravidelných kontrolách je nutné sledovat oxygenaci, monitorovat plicní funkce, osídlení dýchacích cest patogeny, celkový růst a prospívání dítěte. Každá kontrola by měla být doplněna také komplexním vyšetřením sluchu a ORL vyšetřením (Barbato A. *et al.*, 2009).

Četná zobrazení pomocí klasických snímků hrudníku nemají potřebnou citlivost k detekci bronchiektazií, k zobrazení se tedy doporučuje spíše CT vyšetření s vysokým rozlišením s delšími časovými odstupy (Fauroux B. *et al.*, 2009; Maglione M. *et al.*, 2012b).

Mikrobiologická vyšetření sputa mají být prováděna v pravidelných časových intervalech, nejdéle jednou za 3 měsíce, lépe 1x měsíčně. Znalost osídlení dýchacích cest je zásadní pro rozhodování o terapii v případě, že dojde k akutní infekci, stav pacienta nebo jeho plicní funkce se zhorší. Nejčastěji se vyskytující patogeny v dýchacích cestách jsou *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* a *Staphylococcus aureus*. Méně často jsou detekovány *Pseudomonas aeruginosa* a netuberkulózní mykobakteria (Maglione M. *et al.*, 2014; Noone P. G. *et al.*, 2004). Tam, kde není možné vyšetřovat běžné ani indukované sputum, bývá někdy nutné vyšetřovat vzorky bronchoalveolární laváže získané při bronchoskopickém vyšetření.

Rovněž spirometrie má být prováděna pokud možno při každé kontrole, protože porucha plicních funkcí může vzniknout velmi časně a s rostoucím věkem se dále stupňuje.

1.7.2. Cvičení a fyzioterapie

Fyzioterapie v našich podmínkách tvoří nedílnou součást pravidelné léčebné péče. V součinnosti s inhalacemi umožňuje alespoň částečně nahradit nefungující clearance dýchacích cest. Od útlého věku se děti učí zásadám správného dýchání a správným hygienickým návykům pro udržení volné průchodnosti dýchacích cest. Respirační fyzioterapie využívá drenážní techniky s řízenou expektorací a kontrolou kašle, např. autogenní drenáž, PEP systémy dýchání, inhalační léčbu, aktivní cyklus dechových technik a respirační handling (Bush A. *et al.*, 2007). Rodiče pacientů musí přijmout skutečnost, že respirační fyzioterapie je celoživotním úkolem a v tomto smyslu pozitivně působit i na své děti s PCD. Gokdemir *et al.* uvádějí, že standardní respirační fyzioterapie je stejně účinná jako vysokofrekvenční oscilace plicní stěny, která může být některými pacienty lépe snášena (Gokdemir Y. *et al.*, 2014).

Velmi se doporučuje pravidelná přirozená fyzická aktivita dle preferencí dítěte a jeho věku. Zdá se, že pravidelné cvičení je pro děti s PCD lepším bronchodilatátorem než používání inhalačních betamimetik (Phillips G. E. *et al.*, 1998).

1.7.3. Farmakologická léčba

Včasná a dostatečně agresivní léčba respiračních infekcí pravděpodobně dokáže zmírnit postup onemocnění a alespoň částečně předejít rozvoji bronchiektazií. S perorální antibiotickou léčbou v dávkování na horní hranici dávkovacích rozmezí by se nemělo váhat, kdykoliv dojde k progresi respiračních příznaků nebo se začnou zhoršovat plicní funkce. Podávání antibiotik se musí řídit klinickým stavem pacienta a pokud možno i výsledky mikrobiologického vyšetření sputa, v antibiotické léčbě někdy pokračujeme i po dobu několika týdnů. Intravenózní antibiotika se používají k léčbě infekce *Pseudomonas aeruginosa* s cílem její eradikace, která bývá zřejmě díky vlastnostem sputa úspěšnější než u pacientů s cystickou fibrózou. Tam, kde je tento patogen zachycován opakovaně, se doporučuje také dlouhodobá nebulizační léčba protipseudomonádovými antibiotiky podobně jako u pacientů s CF (Barbato A. *et al.*, 2009).

V současnosti neexistují důkazy pro výhody dlouhodobého profylaktického používání antibiotik a takové použití je třeba vždy individuálně zvážit. U menšího procenta vybraných pacientů s opakovanou nutností podávání antibiotik pro akutní exacerbace infekcí vícekrát ročně v našem centru používáme profylaktické podávání azitromycinu. Jeho používání se zdá výhodné pro jeho antimikrobiální, protizánětlivé a obecně imunomodulační vlastnosti. Účinnost jeho použití však rovněž zatím není ve skupině pacientů s PCD doložena, stejně jako dalších protizánětlivých agens (inhalační kortikoidy).

Použití bronchodilatancií není obecně doporučováno, nemělo by se váhat s přerušением takové terapie, byla-li zahájena při chybně stanovené diagnóze. Podávání bronchodilatancií však může být prospěšné u některých pacientů s detekovanou bronchiální hyperreaktivitou. Tuto léčbu je tedy třeba vždy posoudit individuálně a brát ohled na výsledek spirometrického vyšetření a bronchomotorických testů.

Na používání mukolytických přípravků ani hypertonické soli nejsou jednoznačné názory, chybí studie, které by prokazovaly jejich účinnost u pacientů s PCD a jejich používání tedy není doporučováno na obecné úrovni pro všechny pacienty. U pacientů s výrazně vazkým sekretem v dýchacích cestách bývá uspokojivý efekt inhalačních mukolytik i perorálního podávání N-acetylcysteinu. Při velmi významném zahlnění v dolních dýchacích cestách lze vyzkoušet inhalace s mesnou. Použití rekombinantní

lidské DNázy se na rozdíl od pacientů s CF nezdá být u PCD prospěšné (Bush A. *et al.*, 2007).

1.7.4. Očkování

U pacientů s PCD se doporučuje běžné očkovací schéma doplněné o očkování proti pneumokokovým nákazám a každoroční očkování proti chřipce (Barbato A. *et al.*, 2009).

1.7.5. Otorinolaryngologická péče

Specifická je péče o děti s PCD také z hlediska otorinolaryngologa. Napříč všemi soubory pacientů se udává, že více než 80 % pacientů s PCD prodělalo chronickou, někdy závažnou sekretorickou otitidu. Sluchové potíže se často zlepšují v průběhu adolescence (Majithia A. *et al.*, 2005), ale u některých pacientů může porucha sluchu a jiné otologické potíže perzistovat i v dospělosti (Campbell R., 2012). Jak přistupovat k léčbě sekretorické otitidy u dětí s PCD je nadále diskutabilní (Campbell R. G. *et al.*, 2009). Používání ventilačních trubiček (gromet) k léčbě sekretorické otitidy sice zlepšuje sluch, ale může vést k dlouhotrvající komplikované otorhoeae (Bush A. *et al.*, 1998; Hadfield P. J. *et al.*, 1997). V mnoha evropských zemích se parciální ztráta sluchu spojená s chronickou sekretorickou otitidou řeší spíše používáním naslouchadel než zaváděním ventilačních trubiček, u nás je trend spíše opačný.

Dlouhodobá sekrece z nosu nebo naopak pocit ucpaného nosu jsou nálezy téměř univerzální u všech dětí s PCD. Rodiče tento fakt často popisují tak, že jejich dítě je prakticky stále nachlazené (Pedersen M. and Mygind N., 1982). Nosní polypy jsou popisovány asi u 15 % pacientů, jejich výskyt je ale vzácnější než v případě CF (Min Y. G. *et al.*, 1995). K léčbě nosních symptomů se používají slané nosní sprchy a anticholinergika, ale opět platí, že k jejich použití u pacientů s PCD chybějí důkazy. Zdá se, že někteří pacienti s chronickou rhinosinusitidou mohou profitovat z dlouhodobé terapie makrolidy a z endoskopické chirurgie v případě, že se jinak nedaří nemoc zvládnout (Campbell R., 2012).

1.7.6. Prognóza

Ve starším přehledu z roku 1998 Bush *et al.* udávají, že střední očekávaná délka života není zkrácena a že pacienti mají lepší prognózu, než pacienti s cystickou fibrózou, kteří mají podobné respirační příznaky (Bush A. *et al.*, 1998). Novější

popsaný soubor ukazuje, že progresse nemoci pacientů s PCD je obdobná jako u pankreaticky suficientní formy CF a je signifikantně pomalejší než u pankreaticky insuficientní formy CF (Cohen-Cyberknoh M. *et al.*, 2014). Zdá se, že pacienti, kteří jsou diagnostikováni časně a jejichž terapie je vedena v terciárním centru, mohou mít lepší prognózu (Lucas J. S. *et al.*, 2013). Noone *et al.* na velkém souboru severoamerických pacientů uvádějí, že ke zhoršování FEV1 dochází přibližně o 0,8 % za rok (oproti 3,4 % u CF) (Noone P. G. *et al.*, 2004). Asi 38 % dospělých pacientů s PCD ve věku nad 30 let však dospěje k respiračnímu selhání, které definují tak, že jde o pacienty s FEV1 \leq 40 %, pacienty na čekací listině pro transplantaci plic nebo po transplantaci plic, pacienty na trvalé kyslíkové terapii nebo pacienty se saturací hemoglobinu \leq 85 %) (Noone P. G. *et al.*, 2004).

1.8. Závěr teoretické části

Primární ciliární dyskineze je vzácné, u nás i jinde v Evropě poddiagnostikované onemocnění. Mutace způsobující PCD byly nalezeny již ve 30 různých genech a je pravděpodobné, že další budou ještě objeveny. I přes tuto širokou genetickou heterogenitu je klinický obraz u pacientů nápadně podobný. Věk při diagnóze je u nás, ale i v dalších státech Evropy vysoký a diagnostika by měla být zvažována co nejdříve u všech novorozenců narozených v termínu s jinak nevysvětleným syndromem respirační tísně, dále u všech pacientů s poruchami orgánového situ a především u dětí s opakovanými infekcemi horních a dolních cest dýchacích, včetně chronické sekretní otitidy, které trpí dlouhodobým zahleněním. Diagnostika PCD prošla v posledních letech rychlým rozvojem a měla by být soustředěna do specializovaných center, které mají k dispozici spektrum dostupných diagnostických nástrojů a jejich personál je vzdělán v této oblasti. Časně zahájená a správně vedená terapie velmi pravděpodobně může oddálit nástup vzniku nevratných plicních změn. Používané terapeutické postupy zatím bohužel z velké části nejsou založeny na vědeckých důkazech. Klinické studie účinnosti budou vyžadovat vytvoření mezinárodních registrů pacientů a širokou mezinárodní spolupráci. Do té doby by péče o pacienty měla být vedena pouze ve specializovaných centrech.

2. Vlastní publikace a rukopisy s komentáři.

Následující oddíl je tvořen komentáři k jednotlivým studiím, které byly v průběhu postgraduálního studia publikovány a jejichž soubor je základem dizertační práce. Pro každou samostatnou studii stručně shrnuji její cíl a hypotézu, ze které vycházela. Uvádím metodiku, hlavní výsledky a diskutuji jejich význam. Pro podrobnější informace odkazuji čtenáře přímo do textu originálních publikací.

Komentované publikace (Přílohy 1–9) se zabývají několika různými aspekty onemocnění primární ciliární dyskinezi:

- 1) **Soubor studií zabývajících se genetickými základy PCD** – tři studie zabývající se využitím genetického vyšetření v diagnostickém algoritmu PCD, zjednodušením a optimalizací nákladů na genetické vyšetření, využitím postupů sekvenování nové generace a další charakterizací genetických základů onemocnění PCD.
- 2) **Studie zabývající se automatizací zpracování a hodnocení záznamů z vysokorychlostní videomikroskopie** – studie vzniklá ve spolupráci se zahraničním pracovištěm v britském Leicesteru (diagnostické centrum pro PCD), jejímž výsledkem byl vývoj software ciliaFA k automatickému hodnocení frekvence pohyblivosti řasinek.
- 3) **Studie růstu pacientů s PCD** – studie hodnotící ohrožení dětských pacientů s PCD poruchou růstu.
- 4) **Studie zabývající se identifikací vysoce suspektních pacientů** – vývoj klinického indexu, který by dokázal v populaci dětí s opakovanými respiračními příznaky určit pacienty, u kterých existuje vysoké riziko, že jejich obtíže jsou způsobeny onemocněním PCD. Prospektivní větev studie nadále probíhá, v dizertaci popisují dosavadní výsledky.
- 5) **Souborné a přehledové články s tematikou primární ciliární dyskineze**

2.1. Soubor studií zabývajících se genetickými základy PCD

Doba provádění našich studií se překrývá s nejdynamičtějším rozvojem nejen v poznávání genetické etiologie PCD (více viz Úvod práce), ale i v technikách sekvenování nové generace (NGS), které mění tvář výzkumné humánní genetiky a zřejmě již brzy zasáhnou i rutinní genetickou diagnostiku. Tento dynamický rozvoj se odrazil i na naší práci. Ať bereme v potaz pouze geny již prokázané jako kauzální, nebo i ještě větší skupinu potenciálních kandidátních genů, je vzhledem k extrémní genetické heterogenitě i velikosti některých kauzálních genů, prakticky nemožné vyšetřovat všechny geny klasickým sekvenováním – bylo by to příliš pracné a neekonomické. Naše práce zabývající se genetickými základy PCD (Příloha 1 a 2) se tedy pokoušejí najít nejvýhodnější algoritmus (vzhledem k poznatkům dané doby), který by činil genetické vyšetření pacientů s PCD dostupným pro běžnou diagnostiku.

2.1.1. Omezení nutného repertoáru vyšetřovaných úseků pomocí prioritní sekvenace oblastí se zvýšeným výskytem mutací

Djakow J, Svobodová T, Uhlík J, Hrach K, Cinek O, Pohunek P. *Effectiveness of sequencing selected exons of DNAH5 and DNAI1 in diagnosis of primary ciliary dyskinesia*. *Pediatric Pulmonology*, 2012, 47(9): 864-875. **IF 2.31**. (Příloha 1)

2.1.1.1. Hypotézy a cíle práce

Cílem práce bylo vyšetřování několika vybraných exonů rozsáhlých genů *DNAH5* a *DNAI1* u pacientů s diagnostikovanou PCD, určení senzitivity a specificity takového vyšetřování a stanovení výskytu mutací v těchto genech v populaci českých pacientů. Předpokládali jsme, že vyšetřením vytipovaných vybraných exonů genů *DNAH5* a *DNAI1* bude možné odhalit většinu pacientů, kteří nesou v některém z těchto genů mutace.

2.1.1.2. Metodika

Zařazeni byli pacienti s PCD v té době diagnostikovaní na našem pracovišti, jejichž zákonní zástupci podepsali informovaný souhlas s genetickým vyšetřením a se zařazením do studie (n = 26 pacientů z 23 rodin). Na základě literárního studia mutací genů *DNAH5* a *DNAI1* (hlavních známých kauzálních genů) jsme vytypovali celkem 13 exonů (z celkem 100), ve kterých se vyskytovaly mutace nejčastěji (hot-spots).

Matematickým výpočtem jsme stanovili předpokládanou senzitivitu záchytu alespoň jedné mutace u našich pacientů s PCD (83,7 %) při sekvenci pouze vybraných exonů obou genů.

DNA pacientů byla izolována z krve nebo slin pacientů. Primery pro PCR amplifikaci byly převzaty z literatury nebo nově navrženy. Dále jsme provedli přímou sekvenaci exonů a přilehlých intronických úseků na sekvenátoru ABI3130x1.

Stanovili jsme prevalenci PCD způsobenou mutacemi v některém z genů *DNAH5* nebo *DNAI1*, senzitivitu, specificitu, pozitivní a negativní prediktivní hodnotu metody sekvenování pouze vybraných úseků.

2.1.1.3. Výsledky

Klinicky jsme definovali skupinu našich pacientů, určili prevalenci jednotlivých typických příznaků, jejich fenotypické nálezy na HSV1 a TEM.

Sekvenací vybraných oblastí obou genů jsme našli 6 mutovaných alel u 5 pacientů, jeden pacient byl složený heterozygot, u ostatních 4 pacientů byla druhá mutovaná alela nalezena sekvenací zbytku genu. Následnou sekvenací všech zbývajících exonů genů jsme objevili další 2 mutace u dalších 4 pacientů ze 3 rodin. Zjištěné mutace shrnuje TABULKA 3 (viz dále).

Dosažená senzitivita navržené metody byla 62,5 %, prediktivní hodnota pozitivního testu byla 100 %, negativního testu 83,3 %. Prevalence mutací v genech *DNAH5* a *DNAI1* v naší populaci byla 34,8 %.

2.1.1.4. Diskuze

Sekvenováním vybraných úseků jsme geneticky potvrdili PCD u jednoho jedince a u dalších 4 pacientů jsme detekovali jednu mutovanou alelu. Předpokládali jsme senzitivitu kolem 80 %, dosažená senzitivita byla ve skutečnosti mírně nižší, ale stále se nám podařilo zachytit většinu pacientů s mutacemi v genech *DNAH5* či *DNAI1*.

Největší výhodou použitého postupu je jeho nízká ekonomická náročnost a jednoduchost provedení. Při provedení přímého sekvenování všech exonů obou genů by bylo odhaleno pouze o 60 % více pacientů, zatímco náklady na toto vyšetření by stouply 6,6krát. Dále je v článku diskutován význam jednotlivých nových nalezených mutací a jejich vliv na zjištěný fenotyp pacientů. Prokazujeme také užitečnost genetického vyšetření u pacientů, kde některá diagnostická modalita nebyla k dispozici a navrhuje možnost stupňovaného genetického testování u pacientů s PCD.

2.1.2. Testování nových přístupů k diagnostice pomocí metod sekvenování nové generace

Djakow J, Kramná L, Dušátková L, Uhlík J, Pursiheimo J-P, Svobodova T, Pohunek P, Cinek O: *An Effective Combination of Sanger and Next Generation Sequencing in Diagnostics of Primary Ciliary Dyskinesia*. *Pediatric Pulmonology*, 2015. Přijato k publikaci. **IF 2.704** (Příloha 2)

2.1.2.1. Úvod, cíle a hypotézy

Vzhledem k postupně stále narůstající významné genetické heterogenitě onemocnění jsme se v dalším průběhu práce rozhodli využít rychle se rozvíjející postupy sekvenování nové generace (NGS) a pokusit se je zařadit do algoritmu genetického vyšetření našich pacientů. Cílem této práce bylo jednak dále zmapovat druh a výskyt mutací v naší populaci a stanovit ekonomicky nejvýhodnější algoritmus genetického vyšetřování pacientů s PCD. Předpokládali jsme, že využitím kombinovaných přístupů genetické diagnostiky budeme schopni stanovit genetickou příčinu onemocnění u více než poloviny našich pacientů a že metodika NGS bude pro vyhledávání mutací použitelná pro potřeby genetické diagnostiky PCD samotná nebo v kombinaci s klasickou Sangerovou metodou.

2.1.2.2. Metodika

Do studie byli zařazeni všichni pacienti s PCD, kteří byli v daném časovém období diagnostikováni na našem pracovišti a jejichž zákonní zástupci podepsali informovaný souhlas s genetickým vyšetřením a se zařazením do studie (n=28 dětí z 25 rodin). Jde o pacienty, u kterých se nepodařilo stanovit genetickou příčinu v předchozí studii, a o nově diagnostikované pacienty. Níže uvádíme tabulku shrnující základní údaje o pacientech z obou genetických studií (TABULKA 2).

K detekci tří mutací v genu *SPAG1*, které mají charakter ancestrálních prevalentních mutací jsme použili Sangerovo sekvenování. Dvě z těchto mutací jsou detekovatelné přímým sekvenováním, poslední je však rozsáhlá delece s našťestí konstantním breakpointem, který je možné amplifikovat a sekvenovat.

K testování ostatních genů jsme použili assay TruSeq Custom Amplicon kit a sekvenace proběhla na přístroji Illumina MiSeq. Principem metody je simultánní amplifikace několika set cílů pomocí primerů s adaptéry, prováděná díky tagování sekvencí na mnoha vzorcích najednou. Námi navržená assay měla 570 ampliconů

pokrývající exony a přilehlé intronické sekvence o délce 25 bází. Teoretické cílové pokrytí cílových genů bylo 92 %.

Po sekvenaci následuje filtrování a mapování čtení, definice variant a zjišťování jejich relevance pro možnou patogenicitu. Podezřelé mutace byly manuálně prohlédnuty v software IGV. Všechny zjištěné mutace byly pak resekvenovány pomocí klasické Sangerovy metody a byla stanovena jejich fáze.

2.1.2.3. Výsledky

Překvapivým zjištěním byla především vysoká prevalence mutací v genu *SPAG1*. PCD u osmi rodin (24 %) bylo objasnitelné defekty v tomto genu. Jednalo se o dvě prevalentní mutace.

Třetina případů PCD byla (očekávatelně) objasnitelná mutacemi v genu *DNAH5*. Další zjištěné etiologické geny byly *LRRC6*, *DNAI1* a *CCDC40*. Konkrétní přehled mutací uvádí TABULKA 3. Celkem se (rovněž v souladu s literaturou) podařilo geneticky objasnit 67 % případů PCD.

Dalším výsledkem je návrh efektivního a ekonomicky přijatelného postupu genetické diagnostiky PCD. Jako první krok navrhujeme použití Sangerova sekvenování na prevalentní ancestrální mutace genu *SPAG1*, následovaný podle počtu testovaných vzorků buď přímo některou variantou NGS, nebo ještě před tímto krokem vloženým přímým sekvenováním genu *DNAH5*.

2.1.2.4. Diskuze

Podařilo se nám stanovit genetickou diagnózu u dvou třetin českých pacientů s PCD, což je v souladu s recentními mezinárodními publikacemi (Kurkowiak M. *et al.*, 2015). Třetina případů PCD byla objasnitelná defektem v genu *DNAH5*, čtvrtina pak překvapivě ancestrálními mutacemi v genu *SPAG1*. Další geny detekované v naší populaci byly: *DNAI1*, *LRRC6* a *CCDC40*. V publikaci argumentujeme též patogenicitu zjištěných mutací.

Výpočtem dále prokazujeme, že ekonomicky výhodným krokem v diagnostice PCD je zařazení Sangerova sekvenování ancestrálních mutací genu *SPAG1*. Za určitých předpokladů a při klesajících nákladech na genetické vyšetřování by tento krok mohl nahradit i některé náročné diagnostické kroky (např. TEM). Další optimální postup závisí na počtu vyšetřovaných vzorků, což deklarujeme rozpočtem různých strategií na modelové populaci pacientů s PCD (OBRÁZEK 4 z rukopisu publikace – v angličtině).

TABULKA 2: Pacienti s PCD zařazení do genetických studií

ID pacienta	Pohlaví	Situs inversus	Parinatální anamnéza		Věk při diagnóze	Klinické příznaky /anamnéza v době diagnózy						Nález při diagnostice		Genetické nálezy		
			Narozen v termínu	Příznaky v perinatálním období		Rhinorhea	Každodenní vlhký kašel	Sinusitis	Otitis media	Opakované infekce DCD	Pneumonie	HSV	TEM	Testován v předchozí studii (1)	Testován v současné studii(2)	Nalezený kauzální gen
1458-1	M	A	n.a.	rhinorrhea	8	A	A	A	N	A	A	nepohyblivé	n.a.	D	-	<i>DNAH5</i>
1458-2	F	N	A	nedetekovány	9	A	A	A	A	A	A	atypický vzorec	ODA	D	-	<i>DNAH5</i>
1474-1	F	N	A	PNA	1	A	A	N	A	N	A	nepohyblivé	ODA+IDA	D	-	<i>DNAH5</i>
1474-2	M	N	A	nedetekovány	7	A	A	A	A	N	N	nepohyblivé	ODA+IDA	D	-	<i>DNAH5</i>
1504-1	F	N	A	nedetekovány	10	A	A	A	A	A	A	n.a.	ODA	D	-	<i>DNAH5</i>
1505-1	M	A	A	nedetekovány	4	A	A	A	A	A	N	nepohyblivé	ODA	D	-	<i>DNAH5</i>
1506-1	M	A	A	PNA, aspirace	14	A	A	A	A	A	A	nepohyblivé	ODA+IDA	D	-	<i>DNAH5</i>
1507-1	F	A	A	PNA	15	A	A	A	A	A	A	nízká frekvence	ODA	D	-	<i>DNAH5</i>
1508-1	M	A	A	nedetekovány	12	N	A	A	A	A	N	nepohyblivé	ODA	D	-	<i>DNAH5</i>
1509-1	F	A	A	rhinorrhea	11	A	A	A	A	A	A	nízká frekvence	ODA	D	-	<i>DNAI1</i>
1453-1	M	N	n.a.	RDS, PNA, rhinorrhea	12	A	A	A	n.a.	A	A	nepohyblivé	ODA+IDA	X	D	<i>SPAG-1</i>
1456-1	M	A	N	RDS, rhinorrhea	1	A	A	N	A	A	n.a.	nepohyblivé	ODA+IDA	X	D	<i>SPAG-1*</i>
1456-2	F	N	A	RDS, rhinorrhea	0	A	A	N	A	N	N	n.a.	ODA+IDA	X	D	<i>SPAG-1*</i>

1459-1	F	N	A	PNA, rhinorrhea	11	A	A	A	N	A	A	nepohyblivé	ODA	X	D	<i>SPAG-1</i>
1460-1	F	A	N	RDS	14	n.a.	n.a.	A	n.a.	n.a.	n.a.	nepohyblivé	ODA+IDA	X	D	<i>SPAG-1</i>
1464-1	F	A	A	nedetekovány	5	A	A	A	A	A	A	nepohyblivé	ODA+IDA	X	D	<i>SPAG-1</i>
1464-2	F	A	A	nedetekovány	5	A	N	A	n.a.	A	N	atypický vzorec	ODA+IDA	X	D	<i>SPAG-1</i>
1465-1	M	A	A	rhinorrhea	12	A	A	A	A	A	A	nepohyblivé	ODA+IDA	X	D	<i>SPAG-1</i>
1469-1	F	A	A	rhinorrhea	11	A	A	N	N	A	A	nepohyblivé	ODA+IDA	X	D	<i>SPAG-1</i>
1448-1	F	A	n.a.	aspirace	5	A	A	A	A	A	A	nízká frekvence	ODA	X	D	<i>DNAH5</i>
1457-1	F	A	A	rhinorrhea	8	A	A	A	A	A	A	nízká frekvence	ODA	X	D	<i>DNAH5</i>
1454-1	M	A	A	aspirace, rhinorrhea	1	A	A	N	A	A	A	nepohyblivé	ODA+IDA	X	D	<i>LRRC6</i>
1455-1	M	N	A	RDS, PNA	11	A	A	A	A	A	A	atypický vzorec	CP+IDA	X	X	ne
1451-1	M	N	A	nedetekovány	8	A	A	A	A	A	N	atypický vzorec	CP	X	X	ne
1461-1	F	N	A	nedetekovány	10	N	A	N	A	A	A	atypický vzorec	ODA	X	X	ne
1462-1	M	n.a.	n.a.	n.a.	15	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	atypický vzorec	CP+RS	X	X	ne
1449-1	M	N	A	nedetekovány	15	A	A	A	A	A	A	atypický vzorec	CP+IDA	X	X	ne
1466-1	F	N	A	PNA, rhinorrhea	14	A	A	A	N	A	A	atypický vzorec	CP	X	X	ne
1463-1	M	N	n.a.	n.a.	26	A	A	A	A	A	A	nepohyblivé	ODA+IDA	-	D	<i>SPAG-1</i>
1450-1	F	N	A	nedetekovány	11	A	A	N	N	A	n.a.	nepohyblivé	ODA	-	D	<i>DNAH5</i>
1450-2	M	N	A	nedetekovány	16	A	A	n.a.	A	A	N	nepohyblivé	ODA	-	D	<i>DNAH5</i>
1471-1	F	N	A	nedetekovány	15	N	N	N	N	A	N	nepohyblivé	ODA+IDA	-	D	<i>DNAH5</i>
1452-1	F	N	A	nedetekovány	4	A	A	N	N	N	A	nepohyblivé	CP+IDA	-	D	<i>CCDC 40</i>
1467-1	M	N	A	rhinorrhea	5	A	A	N	N	A	N	nízká frekvence	IDA	-	X	ne
1470-1	F	N	A	RDS	12	A	n.a.	A	A	A	A	nepohyblivé	normal	-	X	ne
1468-1	M	N	A	nedetekovány	16	A	A	A	A	A	A	atypický vzorec	CP	-	X	ne
1472-1	M	N	A	nedetekovány	1	A	N	N	A	A	N	nízká frekvence	CP+IDA	-	X	ne
1473-1	F	A	A	nedetekovány	3	N	N	N	N	N	N	atypický vzorec	n.a.	-	X	ne

(1) – Naše předchozí studie publikována v (Djakow J. *et al.*, 2012); (2) – Zde uváděná studie. Oba sloupce: D = kauzální gen nalezen a genetická diagnóza stanovena, X = kauzální gen nenalezen, "-" – pacient v dané studii nebyl testován. A, ano; CP, porucha centrálního páru mikrotubulů; IDA, porucha vnitřních dyneinových ramének; N, ne; ODA, porucha vnějších dyneinových ramének; PNA, pneumonie; n.a., informace není k dispozici; RDS, respiratory distress syndrome (syndrom dechové tísně); RS, porucha radiálních paprsků.

TABULKA 3: Mutace nalezené u pacientů s PCD v genetické studii pacientů z r. 2015:

Gen	Nukleotidová změna	Předpokládaná změna na úrovni proteinu	Exon (zygozita)	Počet rodin/pacientů s uvedeným genotypem	Pacienti s uvedeným genotypem	Defekty zjištěné TEM	Reference
<i>SPAG1</i>	c.[2014C>T]; [61+201_POLR2K: c.140+1169_SPAG1del]	p.[Gln672Ter]; [0?]	16 (het), 1, 2 (het)	4 fam. / 5 subj.	1453-1, 1456-1 a -2, 1463-1, 1469- 1	ODA+IDA	obě (Knowles M. R. <i>et al.</i> , 2013c)
<i>SPAG1</i>	c.[2014C>T];[2014C>T]	p.[Gln672Ter]; [Gln672Ter]	16 (hom)	4 fam. / 5 subj.	1459-1, 1460-1, ^a 1464-1 a -2, 1465-1	ODA (1459-1)/ ODA+IDA	(Knowles M. R. <i>et al.</i> , 2013c)
<i>LRRC6</i>	c.[1024C>T];[1024C>T]	p.[Arg342Ter]; [Arg342Ter]	9 (hom)	1 fam. / 1 subj.	1454-1	ODA+IDA	nová
<i>CCDC40</i>	c.[248delC]; [1345C>T]	p.[Ala83Valfs*84]; [Arg449Ter]	3 (het), 9 (het)	1 fam. / 1 subj.	1452-1	IDA+CP	obě (Becker-Heck A. <i>et al.</i> , 2011)
<i>DNAH5</i>	c.[5563dupA;11583C>A]; [8498G>A]	p.[Ile1855Asnfs*6;Ser3861Arg] ^b ; [Arg2833His]	34, 68 (het), 51 (het)	1 fam. / 1 subj.	1448-1	ODA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012; Olbrich H. <i>et al.</i> , 2002; Zariwala M. A. <i>et al.</i> , 2013)
<i>DNAH5</i>	c.[717_729delCTACTTGACTCTA]; [13633T>C]	p.[Asp239Glufs*11]; [Trp4545Arg]	6 (het), 78 (het)	1 fam. / 2 subj.	1450-1 a -2	ODA	obě nové
<i>DNAH5</i>	c.[4660G>T]; [5177T>C]	p.[Glu1554Ter]; [Leu1726Pro]	29 (het), 32 (het)	1 fam. / 1 subj.	1457-1	ODA	obě nové
<i>DNAH5</i>	c.[8029C>T]; [c.8440_8447delGAACCAAA]	p.[Arg2677Ter]; [Glu2814Ter]	49 (het), 50 (het)	1 fam. / 1 subj.	1471-1	ODA+IDA	(Hornef N. <i>et al.</i> , 2006; Olbrich H. <i>et al.</i> , 2002)
<i>DNAH5</i>	c.[5130A>C]; [8998C>T]	p.[Lys1710Asn]; [Arg3000Ter]	32 (het), 54 (het)	1 fam. / 2 subj.	1458-1 a -2	ODA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012)
<i>DNAH5</i>	c.[5130A>C]; [12705G>T]	p.[Lys1710Asn]; [Lys4235Asn]	32 (het), 73 (het)	1 fam. / 2 subj.	1474-1 a -2	ODA+IDA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012)
<i>DNAH5</i>	c.[8845C>G]; [10815delT]	p.[Gln2949Glu]; [Pro3606Hisfs*23]	53 (het), 63 (het)	1 fam. / 1 subj.	1504-1	ODA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012; Hornef N. <i>et al.</i> , 2006)

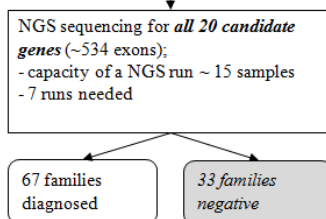
Gen	Nukleotidová změna	Předpokládaná změna na úrovni proteinu	Exon (zygozita)	Počet rodin/pacientů s uvedeným genotypem	Pacienti s uvedeným genotypem	Defekty zjištěné TEM	Reference
<i>DNAH5</i>	c.[8396G>C]; [10384C>T]	p.[Arg2799Pro]; [Gln3462Ter]	50 (het), 61 (het)	1 fam. / 1 subj.	1505-1	ODA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012; Zariwala M. A. <i>et al.</i> , 2013)
<i>DNAH5</i>	c.[7387C>T]; [10815delT]	c.[Gln2463Ter]; [Pro3606Hisfs*23]	44 (het), 63 (het)	1 fam. / 1 subj.	1506-1	ODA+IDA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012; Hornef N. <i>et al.</i> , 2006)
<i>DNAH5</i>	c.[4837C>T]; [5114+1G>C]	p.[Gln1613Ter]; [?]	30 (het), 31 (het)	1 fam. / 1 subj.	1507-1	ODA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012)
<i>DNAH5</i>	c.[8440_8447delGAACCAAA]; [10616G>A]	p.[Glu2814Ter]; [Arg3539His]	50 (het), 63 (het)	1 fam. / 1 subj.	1508-1	ODA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012; Olbrich H. <i>et al.</i> , 2002)
<i>DNAI1</i>	c.[48+2_3dupT]; [1334T>G]	p.[?]; [Met445Arg]	intron 1 (het), exon 14 (het)	1 fam. / 1 subj.	1509-1	ODA	(Djakow J. <i>et al.</i> , 2012; Zariwala M. A. <i>et al.</i> , 2006)

OBRÁZEK 4: Možné strategie genetického testování pacientů s PCD.

Testing strategy

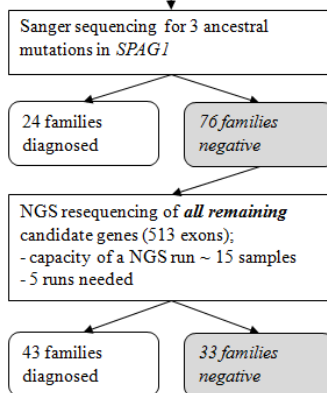
A. One-tier testing

100 hypothetical families with clinical PCD



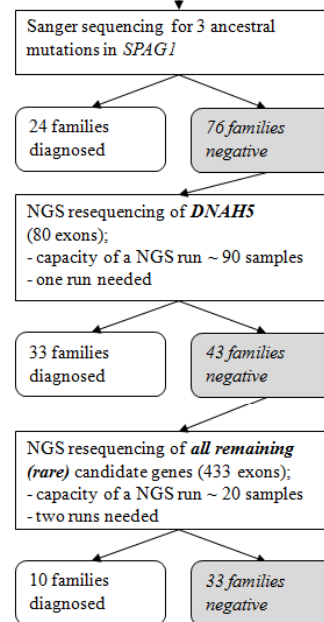
B. Two-tier testing

100 hypothetical families with clinical PCD



C. Three-tier testing

100 hypothetical families with clinical PCD



Costs (€)

	for 96 samples (above)	for 480 samples	for 96 samples (above)	for 480 samples	for 96 samples (above)	for 480 samples
Sanger sequencing test for 3 ancestral mutations	0	0	1 440	7 200	1 440	7 200
Synthesis of the NGS assay in the second tier	21 880	109 400	20 905	83 620	8 417	33 668
Synthesis of the NGS assay in the third tier	0	0	0	0	20 905	41 810
Costs for sequencing on the MiSeq instrument	9 100	41 600	6 500	31 200	3 900	19 500
Total cost for the given count of samples	30 980	151 000	28 845	122 020	34 662	102 178

Cost per sample

323 315

300 254

361 213

2.1.3. Hledání nového kauzálního genu specifického fenotypu primární ciliární dyskineze

Moore, D, Onoufriadis A, Shoemark A, Simpson MA, de Castro SC, zur Lage PI, Bartoloni L, Gallone G, Petridi S, Woollard WJ, Antony D, Schmidts M, Didonna T, Makrythanasis P, Bevillard J, Mongan NP, **Djakow J**, Pals G, Lucas JS, Marthin JK, Nielsen KG, Santoni F, Guiponni M, Hogg C, Antonarakis SE, Emes RD, Chung EMK, Greene NDE, Blouin J-L, Jarman AP, Mitchison H. *Mutations in ZMYND10, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms in human and fly, cause primary ciliary dyskinesia*. Am J Hum Gen, 2013. Vol. 93, Issue 2, pp. 346-356. **IF 11.202**. (Příloha 3)

Článek britských vědců popisuje objev nového vzácného kauzálního genu *ZMYND10*, jehož proteinový produkt hraje zásadní roli při sestavování dyneinových ramének v cytoplasmě. Pacienti s mutacemi v genu *ZMYND10* mají zcela nepohyblivé cilie a strukturální deficit ODA+IDA. K článku jsme přispěli stejně jako další menší národní skupiny zasláním několika vzorků našich pacientů, u kterých se genetický podklad PCD dosud nepodařil objasnit a jejichž fenotyp PCD byl natolik vzácný, že hledání nového kauzálního genu by bylo v našich podmínkách těžko proveditelné. Dále jsme se podíleli na psaní a kontrole rukopisu.

2.2. Studie zabývající se automatizací zpracování obrazu z vysokorychlostní videomikroskopie

Smith C, Djakow J (společné první autorství), Free RC, Djakow P, Fadaee-Shohada M, Patel A, Lonnen A, Williams G, Pohunek P, Hirst RA, Andrew PW, O`Callaghan C: *ciliaFA: A research tool for automated, high-throughput measurement of ciliary beat frequency using freely available software*. *Cilia*, 2012. 1(1):14. DOI:10.1186/2046-2530-1-14. (Příloha 4)

2.2.1. Úvod, cíle a hypotéza

Studie vznikala v průběhu stáže na zahraničním pracovišti (Center for primary ciliary dyskinesia, Leicester Royal Infirmary, United Kingdom). Cílem práce bylo vytvořit softwarovou metodu, která by dokázala automaticky hodnotit obrazové záznamy z vyšetření vysokorychlostní videomikroskopií (HSVM). Předpokládali jsme, že automatizovaný software bude při hodnocení frekvence pohyblivosti řasinek (ciliary beat frequency, CBF) stejně spolehlivý jako hodnocení člověkem.

2.2.2. Metodika

Použité vzorky pocházely z laboratorních buněčných kultur ciliárních buněk a také z reálných vzorků pacientů vyšetřovaných v diagnostickém centru. K měření frekvence pohybu řasinek (CBF z angl. ciliary beat frequency) byly vzorky inkubovány, pozorovány a nahrávány standardní metodikou, jak již bylo dříve popsáno. K inhibici pohybu řasinek některých vzorků byl použit pneumolyzin (*Streptococcus pneumoniae*), který zpomaluje, až zastavuje pohyb řasinek, aby mohla být zkoumána spolehlivost vyvinutého software také při nižších než normálních frekvencích pohybu.

Soustředili jsme se na dvě zásadní komponenty, které musel software splňovat:

- 1) zjištění a extrakce intenzity pixelů v ROI (region of interest) v průběhu času,
- 2) použití těchto údajů pro fast Fourier transformation (FFT).

K prvnímu účelu jsme použili volně dostupný software pro zpracování obrazu ImageJ, který mimo jiné zvládne stanovit průměrnou intenzitu pixelů v až 40 různých ROI na každém zachyceném snímku. Vytvořený plug-in nástroj ciliaFA v tomto programu následně exportuje dataset takto získaných až 1600 ROI do programu Microsoft Office Excel 2007, kde jsme vytvořili makro na bázi visual basic, které provede FFT. Další kombinace funkcí je následně použita ke stanovení dominantní frekvence v daném

jednotlivém ROI. Stanovením dalších podmínek jsme dále odstranili šum vlivem zachycených a detekovaných frekvencí z pozadí (pohyb celého vzorku, Brownův pohyb drobných částic v kapalině apod.) Výsledkový list v programu Excel umožňuje uživateli hodnotit frekvence zjištěné v jednotlivých ROI nebo obraz jako celek.

Korelace zjištěných CBF automatizovaným programem ciliaFA a standardním výpočtem nezávislou osobou byla provedena pomocí lineární regrese. Všechny videosekvence byly počítány dvakrát stejnou osobou a následně dalším nezávislým pozorovatelem ke stanovení variability u jednoho pozorovatele a mezi dvěma pozorovateli. K hodnocení shody mezi metodami jsme použili párový t-test a z průměrných rozdílů hodnot $\pm 95\%$ konfidenčních intervalů jsme stanovili Blandovy-Altmanovy limity shody.

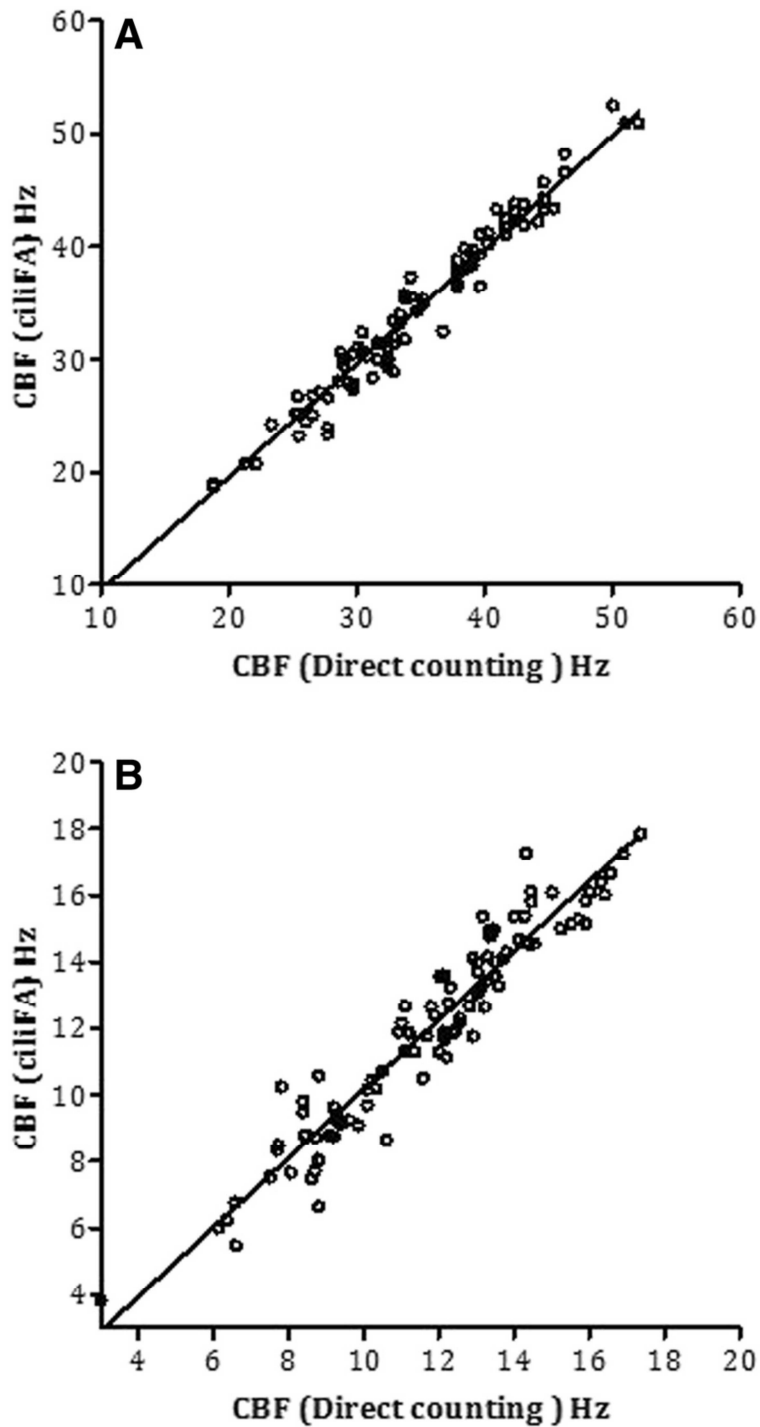
2.2.3. Výsledky

Nezjistili jsme statisticky významný rozdíl mezi stanovením CBF pomocí přímého pozorování a využitím automatizovaného software ($P = 0,64$), celkem bylo provedeno 200 různých měření.

Průměrný rozdíl mezi frekvencí stanovenou přímým pozorováním a pomocí automatického software byl $-0,05 \text{ Hz} \pm 1,25 \text{ Hz}$ a výsledky vykazovaly vysokou korelaci (OBRÁZEK 5).

Průměrná frekvence endymálních řasinek byla $36,3 \pm 6,4 \text{ Hz}$ při přímém počítání a $35,9 \pm 7,0 \text{ Hz}$ při stanovení pomocí software ciliaFA. V případě respiračních cilií byla průměrná hodnota při přímém počítání $11,97 \pm 3,0 \text{ Hz}$ a při využití software ciliaFA $11,72 \pm 2,8 \text{ Hz}$. Blandovy-Altmanovy limity ukazovaly shodu v rozmezí $-2,55$ až $3,25 \text{ Hz}$ v případě endymálních cilií a ještě užší shodu v případě respiračních cilií ($-1,99$ až $1,49 \text{ Hz}$). Opakovatelnost stanovení byla velmi dobrá. Průměrná variabilita mezi ciliaFA a přímým pozorovatelem byla obdobná jako variabilita stanovení CBF u jednoho pozorovatele a mezi dvěma pozorovateli ($1,17 \text{ Hz}$, resp. $1,08 \text{ Hz}$). ciliaFA software také správně predikoval oblasti, kde došlo ke snížení frekvence až úplnému zastavení cilií při použití pneumolyzinu (OBRÁZEK 6).

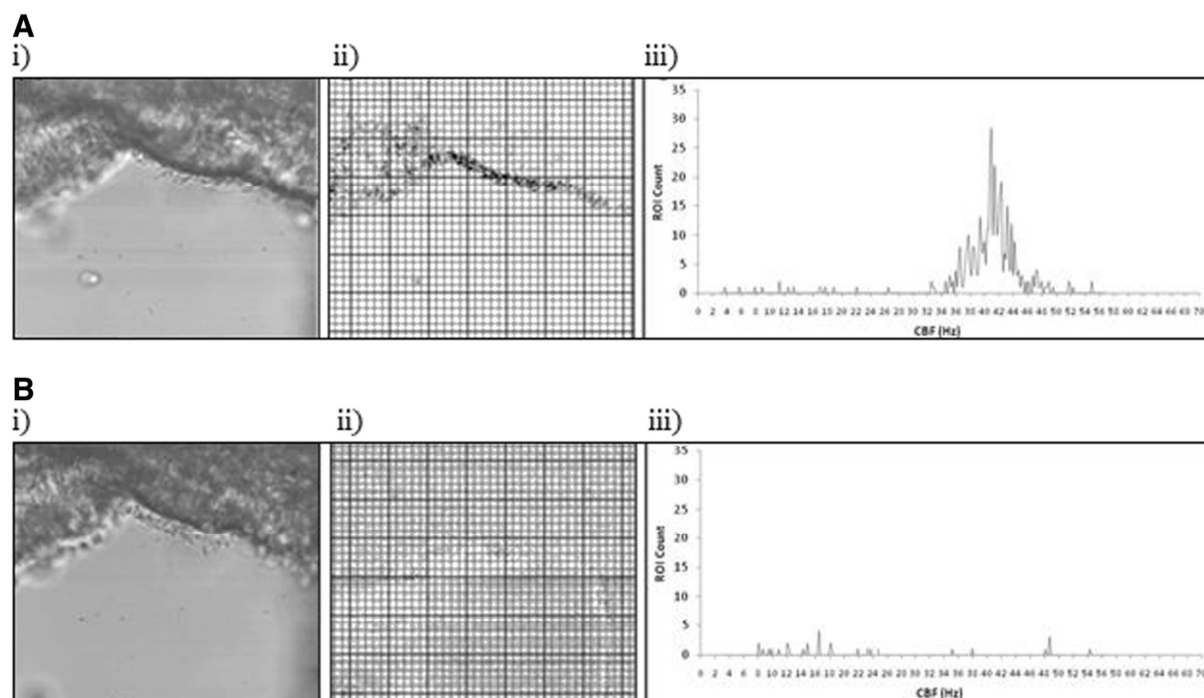
OBRÁZEK 5: Lineární regrese průměrných hodnot CBF stanovených metodou přímého počítání pozorovatelem při sledování zpomaleného záběru a pomocí systému ciliaFA.



A) na vzorcích ependymálních cilií při 37°C (n=100)

B) na vzorcích respiračních cilií při 37°C (n=100)

OBRÁZEK 6: Analýza dat z jednoho souboru AVI, který zachycuje ependymální cilia před přidáním bakteriálního toxinu pneumolyzinu (A) a 15 minut po jeho přidání (B).



Obrázky ukazují (i) oblast vyšetřované mozkové tkáně s lemem ependymálních cilií, (ii) oblasti ROI (regions of interest) použité pro analýzu (čím tmavší je dané pole (intenzita signálu), tím vyšší je frekvence pohybu řasinek v tomto poli) a (iii) histogram CBS všech ROI.

2.2.4. Diskuze

Vyvinuli jsme dostupný softwarový systém, který dokáže automaticky vyhodnocovat frekvenci pohyblivosti řasinek (CBF) ze souborů AVI získaných při vysokorychlostní videomikroskopii. Software je použitelný pro široké spektrum frekvencí (0 až 52 Hz). Dříve vyvinuté softwarové nástroje používaly k validizaci méně přesné nepřímé metody stanovení CBF (Dimova S. *et al.*, 2005). Studie prokazuje, že ciliaFA je spolehlivý software při stanovování CBF.

Výhodami je nepropojenost softwaru s nahrávacím zařízením, software pracuje až s hotovým AVI souborem. Tím je omezena chyba operátora ve formě selekčního ovlivnění (bias) při hodnocení jen vybraných ROI. Výhodou proti stávajícím dostupným systémům (Dimova S. *et al.*, 2005; Kennedy J. R. and Duckett K. E., 1981; Mantovani G. *et al.*, 2010) je vysoká kapacita umožňující zpracování velkého množství snímků

v krátkém čase. Další výhodou je možnost použití systému i na obrazové záznamy vícevrstevných snímků, kde může být pohyblivost řasinek pro přímého pozorovatele těžko hodnotitelná. Při použití na určité oblasti je navíc možné systém použít k hodnocení změn frekvence v průběhu času. Výhodou je, že systém využívá volně dostupný (ImageJ) nebo běžně používaný (Microsoft Office Excel 2007) software a byl dán jako příloha k článku volně k dispozici ostatním vědeckým pracovníkům.

Limitací softwaru je jeho vysoká závislost na kvalitě získaných záznamů (počet pixelů a počet zachycených snímků). V článku je dále diskutováno, jak omezit vliv zachycených frekvencí z pozadí.

2.3. Studie zabývající se růstem pacientů s PCD

Svobodová T, Djakow J, Zemková D, Cipra A, Pohunek P and Lebl J. *Impaired childhood growth in children with primary ciliary dyskinesia*. International Journal of Endocrinology, vol. 2013, Article ID 731423, 5 pages, 2013. doi:10.1155/2013/731423; **IF 2.518**. (Příloha 5)

2.3.1. Úvod, cíle a hypotéza

Další část naší práce zabývající se primární ciliární dyskinezi si vzala za cíl vyšetřit růst pacientů s PCD. Předpokládali jsme, že pacienti s PCD jsou vzhledem k chronicitě onemocnění ohroženi poruchou růstu, podobně jako je tomu například u pacientů s cystickou fibrózou.

2.3.2. Metodika

Do studie byli zařazeni všichni pacienti s PCD diagnostikovaní na našem pracovišti v souladu s diagnostickým doporučením (Barbato A. *et al.*, 2009) (n=29).

U všech pacientů jsme ze záznamů praktických dětských lékařů shromáždili všechny dostupné růstové údaje – tj. výšku a váhu při běžných preventivních prohlídkách (věk 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 a 17 let), z těchto údajů jsme stanovili také index tělesné hmotnosti (BMI). Celkem jsme měli k dispozici 178 měření (medián 6 měření na pacienta, rozmezí 1-9). Data jsme konvertovali do podoby standardních směrodatných odchylek (SDS) od průměrných údajů z posledních měření naší populace.

Pomocí jednovzorkového párového t-testu jsme srovnávali rozdíly průměrné výšky a BMI od očekávané hodnoty 0. Dále jsme stejné hodnocení provedli i pro podskupiny pacientů s ohledem na různé klinické charakteristiky, věk při diagnóze, známou genetickou příčinu apod.

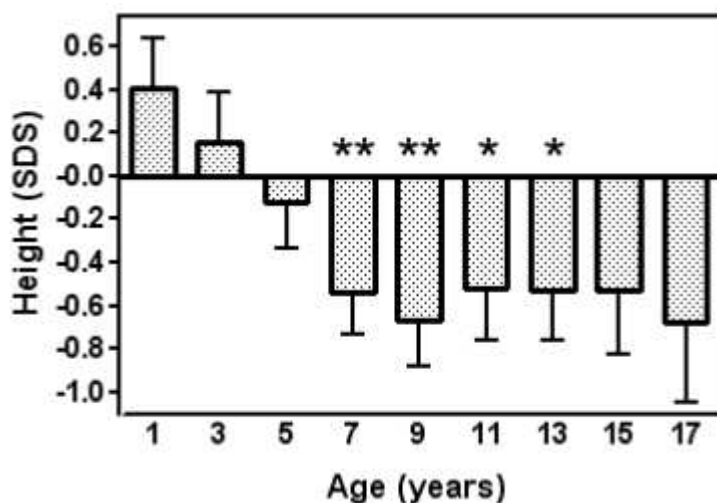
2.3.3. Výsledky

Pacienti s diagnózou PCD progresivně ztráceli výšku v průběhu dětství ve srovnání s jejich zdravými vrstevníky. Výška našich pacientů vyjádřená jako průměrná odchylka vzhledem k očekávané průměrné výšce (SDS) \pm standardní chyba měření (SEM) v průběhu dětství postupně klesala (OBRÁZEK 7), a to následovně: $+0,40 \pm 0,24$ při prvních narozeninách, $+0,16 \pm 0,23$ ve třech letech věku a $-0,13 \pm 0,21$ v 5 letech až k $-0,54 \pm 0,19$ (P = 0,01) v 7 letech, $-0,67 \pm 0,21$ (P = 0,005) v 9 letech, $-0,52 \pm 0,24$ (P = 0,04) v 11 letech a $-0,53 \pm 0,23$ (P = 0,03) ve 13 letech. Přibližně od 9 let se výška

stabilizovala a nedocházelo dále již k výraznému propadu proti běžné populaci. Jen u 12 pacientů jsme mohli hodnotit i výšku v 17 letech, která se vzhledem k nízkému počtu zařazených probandů nelišila, ačkoliv byl nadále patrný trend ke snížené výšce pacientů ($-0,67 \pm 0,38$). Při dalších analýzách jednotlivých podskupin pacientů jsme nenalezli mezi pacienty statisticky významné rozdíly.

BMI pacientů s PCD ve všech věkových skupinách se statisticky významně neodlišoval od běžné populace, což naznačuje, že na progresivní ztrátě výšky se nepodílí u pacientů s PCD nutriční deficit.

OBRÁZEK 7: Výška 29 pacientů s PCD (vyjádřená jako SD) od 1 roku do 17 let věku.



2.3.4. Diskuze

U pacientů s PCD jsme zjistili významné opoždění růstu v průběhu dětství s postupným zlepšováním v průběhu adolescence.

Množství různých chronických stavů je spojováno s chronickým strádáním organismu, opožďováním růstu a výslednou získanou nízkou dospělou výškou. Nejčastějšími příčinami získané malé výšky celosvětově jsou malnutrice a chronické infekce, v rozvinutých zemích pak další neendokrinní příčiny nízké výšky, jako jsou zánětlivá střevní onemocnění, celiakie, chronické renální selhání a chronická plicní onemocnění.

Primární ciliární dyskineze je spojena s chronickým difúzním plicním procesem a postupným rozvojem bronchiektazií, které lze u řady pacientů detekovat již v časném věku (Magnin M. L. *et al.*, 2012). Tyto strukturální změny se často rozvíjejí daleko dříve, než lze detekovat první zhoršování spirometrických parametrů (Maglione M. *et al.*, 2012a). Podle našich klinických zkušeností se infekce vyskytují častěji u pacientů v předškolním a časném školním věku. Můžeme spekulovat, že růstové selhávání vyskytující se v tomto období tedy reflektuje četnost a závažnost probíhajících infekcí. Limitací naší studie je jistě poměrně nízký počet pacientů. Nemohli jsme tedy prokázat žádnou statisticky významnou vazbu např. mezi věkem při diagnóze a výslednou výškou. Můžeme ale předpokládat, že časná diagnóza a dobrá spolupráce rodiny při terapeutických opatřeních povedou k méně závažné progresi onemocnění, podobně jako to lze pozorovat u cystické fibrózy (Haeusler G. *et al.*, 1994).

2.4. Studie zabývající se identifikací vysoce suspektních pacientů (klinický index rizika PCD)

Djakow J, Svobodová T, Uhlík J, Pohunek P. *Primární ciliární dyskineze.* *Pediatric pro praxi*, 2013. 14(6): 368-371. (Příloha 6)

Djakow J, Rozehnalová E, Havlišová M, Svobodová T, Pohunek P. *Clinical index to evaluate the risk of primary ciliary dyskinesia in children.* *Eur Respir J*, 2012. 40:Suppl 56, 2844. (Kongresový abstrakt, není součástí příloh.)

2.4.1. Úvod, cíle a hypotéza

Jedním z cílů již v počátcích naší práce bylo zvýšit informovanost praktických lékařů pro děti a dorost, ale také ambulantních specialistů různých specializací o tomto vzácném, nicméně poddiagnostikovaném onemocnění. Díky prezentacím na několika různých konferencích a přehledovým článkům (Příloha 7 a 8) se nám záhy podařilo podstatněji zvýšit počet dětí odesílaných k diagnostice. Odesílané děti byly někdy z našeho pohledu významně suspektní, jindy měly pouze velmi omezený počet příznaků. Vystala tedy potřeba vytvořit jakési vodítko k vytipování nejsuspektnějších pacientů mezi dětmi s opakovanými či chronickými infekcemi dýchacích cest. Předpokládali jsme, že definováním určitého klinického indexu rizika PCD budeme schopni určit na základě klinických příznaků pacienty, u kterých je vysoká pravděpodobnost, že jejich obtíže jsou způsobeny právě onemocněním PCD.

2.4.2. Metodika

V případě klinického indexu tvořila soubor jednak skupina diagnostikovaných pacientů s PCD (n=31) a dále skupina pacientů vyšetřovaných na našem pracovišti pro podezření z PCD v letech 2009–2011 (n=352). Ze studie jsme následně vyloučili pacienty s věkem nad 18 let, dále pacienty, u kterých chyběla potřebná anamnestická data a pacienty, u nichž nebyla v době studie diagnostika PCD kompletní. Po vyloučení těchto pacientů byly skupiny následující:

- 223 referovaných suspektních pacientů (M:F = 0,98; průměrný věk 6,0 roku)
- 28 pacientů s PCD (M:F = 0,75; průměrný věk 8,9 roku)

Obě skupiny jsme randomizovali do 2 podskupin:

- analytická podskupina – skupina, na které byl připravován model klinického indexu (99+14 pacientů),

- validační (hold-out) skupina – skupina, na které jsme model ověřovali.

U analytické podskupiny jsme sledovali řadu různých klinických parametrů a hodnotili rozdíly v jejich výskytu u pacientů s diagnostikovanou PCD a u pacientů odesílaných jako suspektní, u nichž byla nicméně PCD diagnostickým hodnocením vyloučena. Pro jednotlivé sledované parametry jsme stanovili odds ratio (OR). Následně jsme pomocí regresní analýzy vytvořili různé modely použitím kombinací parametrů se statisticky významnými OR. K hodnocení kvality navrženého indexu jsme použili plochu pod křivkou ROC a vzhledem k nerovnoměrnému rozložení počtu pacientů ve skupinách jsme diskriminační validitu hodnotili pomocí Mann-Whitney U-testu.

2.4.3. Výsledky a diskuze

Vytvořený klinický index sestává ze sedmi otázek, odpověď ano na každou otázku je hodnocena 1 bodem (viz také Příloha 5):

- Mělo dítě po porodu významnější problémy s dýcháním (během pobytu v porodnici)?
- Mělo dítě rýmu nebo bylo významněji zahleněné v průběhu prvních 2 měsíců života?
- Prodělalo dítě pneumonii?
- Prodělalo dítě tři- nebo vícekrát bronchitidu (s obstrukcí nebo bez ní)?
- Bylo dítě léčeno pro chronickou sekretorickou otitidu nebo prodělalo více než třikrát akutní zánět středouší?
- Má dítě sekreci z nosu nebo nosní obstrukci po většinu dní v roce (bez významnějšího efektu medikace)?
- Bylo dítě více než třikrát léčeno antibiotiky pro akutní infekci horních cest dýchacích (rhinosinitidu)?

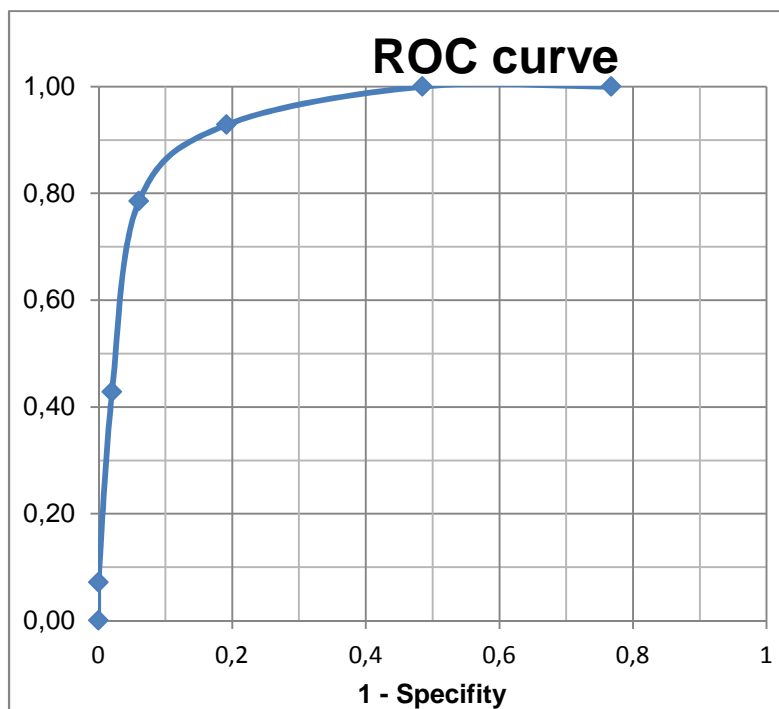
Pro analytickou skupinu byla vyhodnocená AUC 0,94, pro kontrolní validizační (hold-out) skupinu AUC 0,89 (GRAF 1 a 2). Diskriminační validita testu je vysoce signifikantní ($U = 555,5$; $Z = -7,08$; $p = 0,0001$).

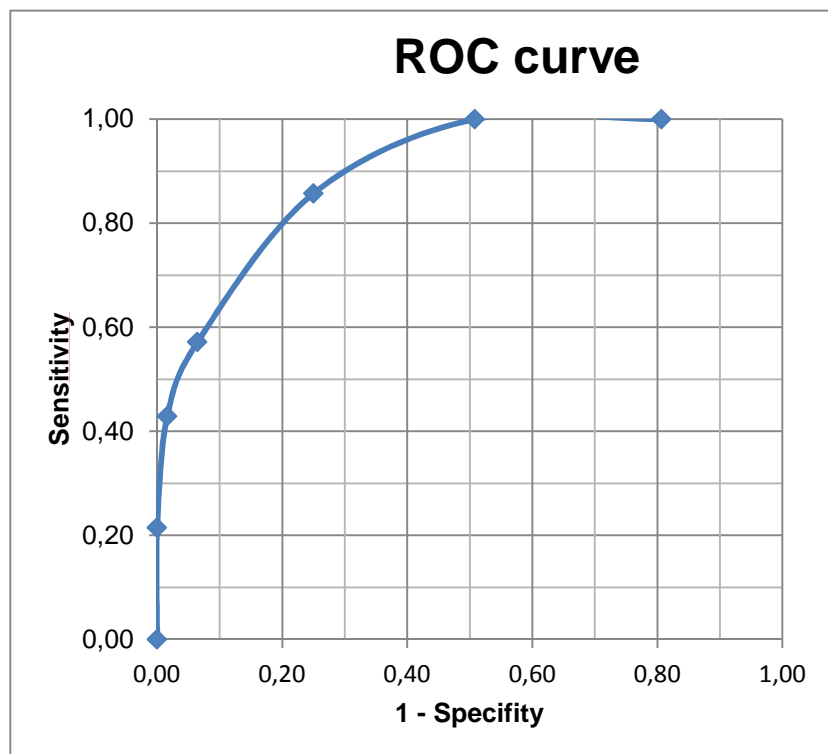
Pro hranici jsme navrhli cut-off hodnotu 2 body, kdy je test 100% senzitivní a přitom odfiltruje přibližně 50 % pacientů, kteří jsou posíláni referujícími lékaři k vyšetření řasinek, ale jejichž anamnéza přitom tomuto onemocnění neodpovídá. Většina pacientů s PCD (57,14 %) má přitom klinický index více než 4 body. Do stejné kategorie přitom spadá pouze 6 % pacientů, u kterých byla následně PCD vyloučena.

Dle výsledku hodnocení klinického indexu jsme navrhli také nejvhodnější postup pro ošetřujícího lékaře:

- 0–1 bod = velmi nízké riziko PCD, 2 body = nízké riziko PCD: PCD je u pacienta velmi málo pravděpodobná, lékař se má soustředit na hledání jiných příčin obtíží pacienta a klinický index rizika každoročně přehodnotit.
K vyšetření do diagnostického centra pacienta odeslat pouze, pokud suspekce na PCD přetrvává a ostatní příčiny byly vyloučeny.
- 3–4 body = středně vysoké až vysoké riziko PCD: U pacienta vyšetřit častější diferenciálně diagnostické příčiny podobných obtíží a odeslat k vyšetření, pokud již byly jiné příčiny vyloučeny, jsou nepravděpodobné, nebo neodpovídají tíži obtíží u pacienta
- 5 a více bodů = velmi vysoké riziko PCD: PCD je u pacienta velmi suspektní, pacienta vždy ihned odeslat k vyšetření do diagnostického centra.

GRAF 1: ROC křivka pro analytickou skupinu (AUC = 0,94)



GRAF 2: ROC křivka pro kontrolní validační skupinu (AUC = 0,89)

2.4.4. Diskuze

Vytvořili jsme klinický index rizika PCD, který mohou využít praktičtí dětskí lékaři i další specialisté, ke kterým jsou odesílány děti s problematikou opakovaných respiračních infekcí.

Dosud byla publikována pouze jedna studie zabývající se identifikací klinických faktorů, které by předpovídaly riziko PCD (Noll E. M. *et al.*, 2011). Tato studie byla soustředěna na pacienty s chronickým kašlem a zahrnovala dětské i dospělé pacienty. Vzhledem k tomu, že cílem všech evropských skupin je snižovat věk při diagnóze PCD, soustředili jsme při vývoji našeho klinického indexu spíše na velmi časně příznaky PCD, takže některé použité rizikové faktory rozvíjející se později, které uvádí tato německá studie, jsme do dotazníku nezahrnovali (např. přítomnost bronchiektázií).

Limitací naší studie je její částečně retrospektivní charakter. Tuto limitaci jsme se snažili kompenzovat randomizací do dvou samostatných skupin, přičemž jedna byla použita pro analýzu a druhá k validizaci navrženého indexu. V současné době pokračujeme ve studii zařazením zaslepené prospektivní větve. Dosud jsme limitováni nízkým počtem nově diagnostikovaných pacientů s PCD, abychom mohli provést

validní statistickou analýzu získaných výsledků. Současně probíhá ve spolupráci s Klinikou nosní, ušní a krční 2. LF UK také validizace klinického indexu na pacientech indikovaných k odstranění hypertrofické adenoidní vegetace či k zavedení gromet při sekreторické otitidě, kteří mohou mít částečně podobné spektrum příznaků.

Další limitací naší studie je nevyváženost věkového rozložení skupiny pacientů s PCD (průměrný věk 8,9 roku) a skupiny referovaných pacientů bez PCD (průměrný věk 6,0 roku). Tento rozdíl jsme vyhodnotili jako statisticky významný ($p=0,005$). Lze polemizovat, že nižší index u pacientů bez PCD je dán pouze tím, že se větší množství příznaků ještě nestačilo rozvinout. Abychom diskutovali tuto otázku, vyřadili jsme z obou podskupin všechny pacienty pod 3 roky věku a provedli novou analýzu. Věkový rozdíl již po vyřazení těchto pacientů nebyl signifikantní a přitom diskriminační validita testu zůstala zachována, dosažená AUC byla dokonce o něco vyšší než u původní skupiny (0,90). Lze tedy konstatovat, že rozdíly jsou skutečně dány spíše odlišností klinických projevů než rozdílem ve věkovém rozložení pacientů obou podskupin. Studii jsme v její primární podobě představili formou přednášky na kongresu Evropské respirační společnosti a informace jsme zahrnuli také do nejnovějšího souborného článku o PCD (Příloha 6).

2.5. Souborné a přehledové články v recenzovaných časopisech

Djakow J, Svobodová T, Uhlík J, Kabelka Z, Smolíková L, Cinek O, Pohunek P. *Primární ciliární dyskineze. Část 1. – Patogeneze a klinický obraz.* Alergie, 2009 (1). 54-59. (Příloha 7)

Djakow J, Svobodová T, Uhlík J, Kabelka Z, Smolíková L, Cinek O, Pohunek P: *Primární ciliární dyskineze. Část 2. – Diagnostika a terapie.* Alergie, 2009 (2). 38-44. (Příloha 8)

Djakow J, O'Callaghan C. *Primary ciliary dyskinesia.* Breathe (Educational Journal of European Respiratory Society), 2014. 10(2):122-133. doi: 10.1183/20734735.007413. (Příloha 9)

3. Závěr

V průběhu práce na několika projektech souvisejících s onemocněním primární ciliární dyskineze se podařilo naplnit celou řadu cílů, které jsme si na počátku práce stanovili. Vzniklo první diagnostické centrum pro primární ciliární dyskinezi, které má k dispozici vybavení přístrojové i personální k tomu, aby provádělo komplexní diagnostiku PCD. Podařilo se nám soustavnou publikační a přednáškovou činností zvýšit informovanost české lékařské veřejnosti o problematice tohoto onemocnění a výrazně stoupl počet pacientů referovaných k vyšetření. V průběhu těchto několika let se nám zatím nepodařilo výrazněji snížit věk při diagnóze tohoto onemocnění, což je dáno zejména tím, že i nadále jsou odesíláni k vyšetření i starší pacienti, u kterých bylo klinicky podezření již dříve vysloveno, ale jejich diagnostika nebyla kompletní. Vytvořili jsme databázi všech pediatrických pacientů s PCD, kde jsou průběžně ukládána všechna klinická i diagnostická data. Vytvořili jsme i databázi pacientů, kteří jsou odesíláni k diagnostice PCD jako suspektní.

Nejrozsáhlejší část naší práce se týkala možností genetické diagnostiky u pacientů s PCD. V době, kdy jsme s prací začali, bylo známo pouhých osm genů, jejichž mutace mohou PCD způsobit. V průběhu naší práce pak došlo k prudkému rozvoji metodiky sekvenování nové generace a s ním ruku v ruce také k rychlému nárůstu známých kauzálních genů, v době zpracovávání práce je jich známo již 30.

Celou naší práci zabývající se možnostmi komplikované genetické diagnostiky PCD se táhla jako červená nit snaha o její zjednodušení za ekonomicky přijatelných podmínek. V úvodní práci jsme prokázali, že sekvenování pouze vybraných úseků dvou hlavních kauzálních genů, *DNAH5* a *DNAI1*, může odhalit většinu pacientů s mutacemi v těchto genech. V následující práci jsme použili kombinaci Sangerova sekvenování a metody NGS. Tímto postupem jsme byli schopni stanovit genetickou diagnózu u 67 % pacientů s PCD, což je číslo odpovídající nejnovějším mezinárodním publikacím. Důležitým výstupem byla jednak genetická charakterizace naší populace pacientů, ale také návrh efektivního a ekonomicky přijatelného postupu genetického testování pacientů s kompletní diagnózou, případně i vysoce suspektních pacientů. Co se týká nalezených kauzálních genů v naší populaci, jak jsme předpokládali asi třetina případů PCD je způsobena mutacemi v genu *DNAH5*. Naopak velmi překvapivým nálezem bylo vysoké zastoupení ancestrálních mutací v genu *SPAG1* u asi čtvrtiny pacientů. Mutace

v dalších genech je možné označit již za mnohem vzácnější (v naší populaci jsme detekovali ještě mutace v genech *CCDC40*, *DNAH1* a *LRRC6*).

Ve spolupráci se zahraničním pracovištěm jsme vytvořili volně dostupný softwarový nástroj, který dokáže automaticky hodnotit frekvenci pohyblivosti řasinek (CBF). Je využitelný jako pomoc při běžné diagnostice i k výzkumným účelům. Vstupně využívá soubory AVI ze záznamu vysokorychlostní kamery, ke zpracování pak volně dostupný ImageJ a Microsoft Office Excel 2007. Software ciliaFA umožňuje spolehlivou vysokokapacitní (high throughput) automatickou analýzu CBF pro široké spektrum frekvencí (3 – 52 Hz) a odstraňuje selekční ovlivnění operátora.

U již diagnostikovaných pacientů s PCD jsme ověřovali hypotézu, že jejich růst je oproti zdravé populaci opožděn. Analyzovaná data ukázala, že u pacientů s PCD dochází v průběhu dětství k růstovému opoždění s postupným mírným zlepšením v průběhu adolescence. Ačkoliv jsme vzhledem k malému množství pacientů ve studii nemohli prokázat vliv časně zahájené léčby, domníváme se, že zahájení efektivní terapie brzy v dětství, zejména při dobré spolupráci, může vést ke zmírnění chronického strádání organismu spojeného s diagnózou PCD a zlepšit celkovou prognózu pacientů.

Vytvořené databáze pacientů s PCD a pacientů suspektních jsme využili k vytvoření klinického indexu rizika PCD. Tento index obsahující 7 zjišťovacích otázek je jednoduše použitelný například ošetřujícími dětskými lékaři a určuje riziko, že obtíže pacienta s opakovanými respiračními infekcemi jsou způsobeny právě primární ciliární dyskinezi. Vzhledem k tomu, že do našich databází neustále přibývají noví pacienti, plánujeme zhodnotit diskriminační validitu indexu také prospektivně. Při použití cut-off hodnoty 2 body je test 100% senzitivní a přitom odfiltruje téměř 50 % pacientů, kteří byli k vyšetření odesláni zbytečně. Pokud je u pacienta stanoven klinický index více než 4 body, je naopak diagnóza PCD velmi pravděpodobná. Prospektivní část této studie nadále probíhá, dosavadní výsledky hodnotící diskriminační validitu indexu jsou velmi slibné.

4. Souhrn

Primární ciliární dyskineze (PCD) je vzácné, avšak poddiagnostikované onemocnění. Jeho příčinou je genetická porucha struktury nebo funkce pohyblivých řasinek. Výsledná nefunkční mukociliární clearance způsobuje opakované záněty horních i dolních dýchacích cest, u některých pacientů může být také příčinou poruch plodnosti či abnormální polohy orgánů. Diagnostika tohoto onemocnění je mimořádně složitá. Vyžaduje kombinaci několika různých diagnostických postupů a dostatek zkušeností i specifické personální a technické vybavení. I přes významné pokroky v poznání etiopatogeneze PCD a prudký rozvoj diagnostiky zůstávají možnosti terapie omezené a účinnost jednotlivých léčebných postupů dosud není podložena většími klinickými studii.

Dizertační práce je tvořena komentovaným souborem vydaných publikací. Zabývám se v ní několika různými aspekty identifikace pacientů s PCD. Nejrozsáhleji jsme se věnovali genetickým základům PCD. V začátcích práce jsme se zabývali možnostmi diagnostiky pomocí sekvenování vybraných úseků v té době známých nejčastěji mutovaných genů *DNAH5* a *DNAI1* a prokázali jsme, že touto metodou je možné odhalit většinu pacientů s mutacemi v těchto genech. Nejrecentnější část práce se týkala využití postupů sekvenování nové generace (NGS) v kombinaci s klasickým Sangerovým sekvenováním. Podařilo se nám geneticky charakterizovat populaci českých pacientů s PCD. Navrženou metodikou jsme byli schopni stanovit genetickou diagnózu u dvou třetin všech českých pacientů, což odpovídá recentním světovým pracím. Přibližně třetina případů PCD byla očekávatelně způsobena mutacemi v genu *DNAH5*. Překvapivým nálezem bylo vysoké zastoupení ancestrálních mutací v genu *SPAG1* u čtvrtiny našich pacientů. Dále jsme již jen v jednotlivých rodinách detekovali mutace také v genech *DNAI1*, *LRRC6* a *CCDC40*. Neméně důležitým výstupem naší práce je návrh efektivního a ekonomicky přijatelného postupu genetické diagnostiky u pacientů s PCD.

Ve spolupráci se zahraničním pracovištěm jsme navrhli softwarovou metodu zpracování obrazu, která automaticky stanoví frekvenci pohyblivosti řasinek se stejnou přesností jako živý operátor. V další provedené studii jsme prokázali, že pacienti s PCD jsou ohroženi poruchou růstu v dětství. Poslední část práce popisuje vývoj snadno použitelného validovaného klinického indexu, který dokáže ve skupině pacientů

s opakovanými respiračními problémy odlišit pacienty, u nichž je vysoká pravděpodobnost, že jejich obtíže jsou způsobeny právě onemocněním PCD.

5. Summary

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare but underdiagnosed genetic disease. This innate disorder of motile cilia causes a non-functional mucociliary clearance which is the main reason for a clinical picture of recurrent or chronic upper and lower respiratory tract infections. Fertility disorders or abnormal organ situs can also be found in some patients. The diagnosis of PCD is extremely complicated and complex. A combination of several diagnostic procedures as well as skilled personnel and special technical equipment are usually needed for the PCD diagnostics. Although significant progress has been made in understanding the PCD etiopathogenesis and the advanced diagnostics has become available, therapeutic possibilities are rather limited and the treatment efficiency still remains to be confirmed by the evidence base medicine.

The dissertation thesis assembles several publications in which different aspects of primary ciliary dyskinesia were addressed. The most extensive part of our research addressed rapidly evolving possibilities of PCD genetic diagnostics. We studied possibility of priority sequencing of several segments of the genes *DNAH5* and *DNAI1* which were known to be the most frequently mutated genes in the PCD patients at the time of the study. We proved this method being able to identify most of the patients carrying mutations in these genes. The most recent part of our work focused on the next generation sequencing methods in combination with the classic Sanger sequencing. Using this method, we were able to establish the genetic diagnosis in the two thirds of the Czech patients achieving the same diagnostic rate as the best scientific groups worldwide. About a third of the Czech PCD cases were predictably caused by the mutations in the *DNAH5* gene. Surprisingly, another quarter of the PCD patients carried ancestral mutations in the *SPAG1* gene. Other genes found to be mutated only in individual families were *DNAI1*, *LRRC6* and *CCDC40*. We also suggested a cost-effective genetic diagnostic pipeline.

Secondly, in collaboration with British researchers, we designed an image processing software method capable of automatic ciliary beat frequency assessment with a high accuracy. In another study, we proved that the PCD patients are at risk of the growth failure at childhood. In the last study, we developed easy-to-use validated

clinical index that is able to distinguish the patients with high risk of PCD among the group of paediatric patients with recurrent respiratory problems.

6. Literatura

1. Afzelius, B. A. "A human syndrome caused by immotile cilia." *Science*, 1976. **193**(4250): 317-319.
2. Afzelius, B. A. "Ciliary structure in health and disease." *Acta Otorhinolaryngol Belg*, 2000. **54**(3): 287-291.
3. Al-Rawi, M. M., Edelstein, D. R. and Erlandson, R. A. "Changes in nasal epithelium in patients with severe chronic sinusitis: a clinicopathologic and electron microscopic study." *Laryngoscope*, 1998. **108**(12): 1816-1823.
4. Antunes, M. B. and Cohen, N. A. "Mucociliary clearance--a critical upper airway host defense mechanism and methods of assessment." *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007. **7**(1): 5-10.
5. Armengot, M., Milara, J., Mata, M., Carda, C. and Cortijo, J. "Cilia motility and structure in primary and secondary ciliary dyskinesia." *Am J Rhinol Allergy*, 2010. **24**(3): 175-180.
6. Austin-Tse, C., Halbritter, J., Zariwala, M. A., Gilberti, R. M., Gee, H. Y., Hellman, N., Pathak, N., Liu, Y., Panizzi, J. R., Patel-King, R. S., Tritschler, D., Bower, R., O'Toole, E., Porath, J. D., Hurd, T. W., Chaki, M., Diaz, K. A., Kohl, S., Lovric, S., Hwang, D. Y., Braun, D. A., Schueler, M., Airik, R., Otto, E. A., Leigh, M. W., Noone, P. G., Carson, J. L., Davis, S. D., Pittman, J. E., Ferkol, T. W., Atkinson, J. J., Olivier, K. N., Sagel, S. D., Dell, S. D., Rosenfeld, M., Milla, C. E., Loges, N. T., Omran, H., Porter, M. E., King, S. M., Knowles, M. R., Drummond, I. A. and Hildebrandt, F. "Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies *C21orf59* and *CCDC65* Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia." *Am J Hum Genet*, 2013. **93**(4): 672-686.
7. Badano, J. L., Mitsuma, N., Beales, P. L. and Katsanis, N. "The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders." *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006. **7**: 125-148.
8. Baker, K. and Beales, P. L. "Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies." *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2009. **151C**(4): 281-295.
9. Barbato, A., Frischer, T., Kuehni, C. E., Snijders, D., Azevedo, I., Baktai, G., Bartoloni, L., Eber, E., Escribano, A., Haarman, E., Hesselmar, B., Hogg, C., Jorissen, M., Lucas, J., Nielsen, K. G., O'Callaghan, C., Omran, H., Pohunek, P., Strippoli, M. P. and Bush, A. "Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children." *Eur Respir J*, 2009. **34**(6): 1264-1276.
10. Becker-Heck, A., Zohn, I. E., Okabe, N., Pollock, A., Lenhart, K. B., Sullivan-Brown, J., McSheene, J., Loges, N. T., Olbrich, H., Haeffner, K., Fliegauf, M., Horvath, J., Reinhardt, R., Nielsen, K. G., Marthin, J. K., Baktai, G., Anderson, K. V., Geisler, R., Niswander, L., Omran, H. and Burdine, R. D. "The coiled-coil domain containing protein *CCDC40* is essential for motile cilia function and left-right axis formation." *Nat Genet*, 2011. **43**(1): 79-84.
11. Bertrand, B., Collet, S., Eloy, P. and Rombaux, P. "Secondary ciliary dyskinesia in upper respiratory tract." *Acta Otorhinolaryngol Belg*, 2000. **54**(3): 309-316.
12. Bisgrove, B. W. and Yost, H. J. "The roles of cilia in developmental disorders and disease." *Development*, 2006. **133**(21): 4131-4143.

13. Blanchon, S., Legendre, M., Copin, B., Duquesnoy, P., Montantin, G., Kott, E., Dastot, F., Jeanson, L., Cachanado, M., Rousseau, A., Papon, J. F., Beydon, N., Brouard, J., Crestani, B., Deschildre, A., Desir, J., Dollfus, H., Leheup, B., Tamalet, A., Thumerelle, C., Vojtek, A. M., Escalier, D., Coste, A., de Blic, J., Clement, A., Escudier, E. and Amselem, S. "*Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary ciliary dyskinesia.*" *J Med Genet*, 2012. **49**(6): 410-416.
14. Blyth, M. and Wellesley, D. "*Ectopic pregnancy in primary ciliary dyskinesia.*" *J Obstet Gynaecol*, 2008. **28**(3): 358.
15. Boon, M., Smits, A., Cuppens, H., Jaspers, M., Proesmans, M., Dupont, L. J., Vermeulen, F. L., Van Daele, S., Malfroot, A., Godding, V., Jorissen, M. and De Boeck, K. "*Primary ciliary dyskinesia: critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure.*" *Orphanet J Rare Dis*, 2014. **9**: 11.
16. Boudes, P. F. "*Gene therapy as a new treatment option for inherited monogenic diseases.*" *Eur J Intern Med*, 2014. **25**(1): 31-36.
17. Brueckner, M. "*Heterotaxia, congenital heart disease, and primary ciliary dyskinesia.*" *Circulation*, 2007. **115**(22): 2793-2795.
18. Brueckner, M. "*Impact of genetic diagnosis on clinical management of patients with congenital heart disease: cilia point the way.*" *Circulation*, 2012. **125**(18): 2178-2180.
19. Budny, B., Chen, W., Omran, H., Fliegauf, M., Tzschach, A., Wisniewska, M., Jensen, L. R., Raynaud, M., Shoichet, S. A., Badura, M., Lenzner, S., Latos-Bielenska, A. and Ropers, H. H. "*A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome.*" *Hum Genet*, 2006. **120**(2): 171-178.
20. Bukowy-Bieryllo, Z., Zietkiewicz, E., Loges, N. T., Wittmer, M., Geremek, M., Olbrich, H., Fliegauf, M., Voelkel, K., Rutkiewicz, E., Rutland, J., Morgan, L., Pogorzelski, A., Martin, J., Haan, E., Berger, W., Omran, H. and Witt, M. "*RPGR mutations might cause reduced orientation of respiratory cilia.*" *Pediatr Pulmonol*, 2013. **48**(4): 352-363.
21. Bush, A., Cole, P., Hariri, M., Mackay, I., Phillips, G., O'Callaghan, C., Wilson, R. and Warner, J. O. "*Primary ciliary dyskinesia: diagnosis and standards of care.*" *Eur Respir J*, 1998. **12**(4): 982-988.
22. Bush, A., Chodhari, R., Collins, N., Copeland, F., Hall, P., Harcourt, J., Hariri, M., Hogg, C., Lucas, J., Mitchison, H. M., O'Callaghan, C. and Phillips, G. "*Primary ciliary dyskinesia: current state of the art.*" *Arch Dis Child*, 2007. **92**(12): 1136-1140.
23. Campbell, R. "*Managing upper respiratory tract complications of primary ciliary dyskinesia in children.*" *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2012. **12**(1): 32-38.
24. Campbell, R. G., Birman, C. S. and Morgan, L. "*Management of otitis media with effusion in children with primary ciliary dyskinesia: a literature review.*" *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2009. **73**(12): 1630-1638.
25. Castleman, V. H., Romio, L., Chodhari, R., Hirst, R. A., de Castro, S. C., Parker, K. A., Ybot-Gonzalez, P., Emes, R. D., Wilson, S. W., Wallis, C., Johnson, C. A., Herrera, R. J., Rutman, A., Dixon, M., Shoemark, A., Bush, A., Hogg, C., Gardiner, R. M., Reish, O., Greene, N. D., O'Callaghan, C., Purton, S., Chung, E. M. and Mitchison, H. M. "*Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities.*" *Am J Hum Genet*, 2009. **84**(2): 197-209.

26. Cohen-Cymbarknoh, M., Simanovsky, N., Hiller, N., Gileles Hillel, A., Shoseyov, D. and Kerem, E. "*Differences in disease expression between primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis with and without pancreatic insufficiency.*" *Chest*, 2014. **145**(4): 738-744.
27. Corbelli, R., Bringolf-Isler, B., Amacher, A., Sasse, B., Spycher, M. and Hammer, J. "*Nasal nitric oxide measurements to screen children for primary ciliary dyskinesia.*" *Chest*, 2004. **126**(4): 1054-1059.
28. Coren, M. E., Meeks, M., Morrison, I., Buchdahl, R. M. and Bush, A. "*Primary ciliary dyskinesia: age at diagnosis and symptom history.*" *Acta Paediatr*, 2002. **91**(6): 667-669.
29. Date, H., Yamashita, M., Nagahiro, I., Aoe, M., Andou, A. and Shimizu, N. "*Living-donor lobar lung transplantation for primary ciliary dyskinesia.*" *Ann Thorac Surg*, 2001. **71**(6): 2008-2009.
30. Dimova, S., Maes, F., Brewster, M. E., Jorissen, M., Noppe, M. and Augustijns, P. "*High-speed digital imaging method for ciliary beat frequency measurement.*" *J Pharm Pharmacol*, 2005. **57**(4): 521-526.
31. Djakow, J., Svobodova, T., Hrach, K., Uhlik, J., Cinek, O. and Pohunek, P. "*Effectiveness of sequencing selected exons of DNAH5 and DNAIL1 in diagnosis of primary ciliary dyskinesia.*" *Pediatr Pulmonol*, 2012. **47**(9): 864-875.
32. Duquesnoy, P., Escudier, E., Vincensini, L., Freshour, J., Bridoux, A. M., Coste, A., Deschildre, A., de Blic, J., Legendre, M., Montantin, G., Tenreiro, H., Vojtek, A. M., Loussert, C., Clement, A., Escalier, D., Bastin, P., Mitchell, D. R. and Amselem, S. "*Loss-of-function mutations in the human ortholog of Chlamydomonas reinhardtii ODA7 disrupt dynein arm assembly and cause primary ciliary dyskinesia.*" *Am J Hum Genet*, 2009. **85**(6): 890-896.
33. Duriez, B., Duquesnoy, P., Escudier, E., Bridoux, A. M., Escalier, D., Rayet, I., Marcos, E., Vojtek, A. M., Bercher, J. F. and Amselem, S. "*A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia.*" *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(9): 3336-3341.
34. Dymek, E. E., Heuser, T., Nicastro, D. and Smith, E. F. "*The CSC is required for complete radial spoke assembly and wild-type ciliary motility.*" *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(14): 2520-2531.
35. el-Sayed, Y., al-Sarhani, A. and al-Essa, A. R. "*Otological manifestations of primary ciliary dyskinesia.*" *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1997. **22**(3): 266-270.
36. Escudier, E., Duquesnoy, P., Papon, J. F. and Amselem, S. "*Ciliary defects and genetics of primary ciliary dyskinesia.*" *Paediatr Respir Rev*, 2009. **10**(2): 51-54.
37. Faily, M., Bartoloni, L., Letourneau, A., Munoz, A., Falconnet, E., Rossier, C., de Santi, M. M., Santamaria, F., Sacco, O., DeLozier-Blanchet, C. D., Lazor, R. and Blouin, J. L. "*Mutations in DNAH5 account for only 15% of a non-preselected cohort of patients with primary ciliary dyskinesia.*" *J Med Genet*, 2009. **46**(4): 281-286.
38. Faily, M., Saitta, A., Munoz, A., Falconnet, E., Rossier, C., Santamaria, F., de Santi, M. M., Lazor, R., DeLozier-Blanchet, C. D., Bartoloni, L. and Blouin, J. L. "*DNAIL1 mutations explain only 2% of primary ciliary dyskinesia.*" *Respiration*, 2008. **76**(2): 198-204.
39. Fauroux, B., Tamalet, A. and Clement, A. "*Management of primary ciliary dyskinesia: the lower airways.*" *Paediatr Respir Rev*, 2009. **10**(2): 55-57.
40. Ferkol, T. and Leigh, M. "*Primary ciliary dyskinesia and newborn respiratory distress.*" *Semin Perinatol*, 2006. **30**(6): 335-340.

41. Fliegauf, M., Benzing, T. and Omran, H. "*When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies.*" *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(11): 880-893.
42. Fliegauf, M., Olbrich, H., Horvath, J., Wildhaber, J. H., Zariwala, M. A., Kennedy, M., Knowles, M. R. and Omran, H. "*Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia.*" *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(12): 1343-1349.
43. Frommer, A., Hjeij, R., Loges, N. T., Edelbusch, C., Jahnke, C., Raidt, J., Werner, C., Wallmeier, J., Grosse-Onnebrink, J., Olbrich, H., Cindric, S., Jaspers, M., Boon, M., Memari, Y., Durbin, R., Kolb-Kokocinski, A., Sauer, S., Marthin, J. K., Nielsen, K. G., Amirav, I., Elias, N., Eitan, K., Shoseyov, D., Haeffner, K. and Omran, H. "*Immunofluorescence Analysis and Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia with Radial Spoke Defects.*" *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015.
44. Gokdemir, Y., Karadag-Saygi, E., Erdem, E., Bayindir, O., Ersu, R., Karadag, B., Sekban, N., Akyuz, G. and Karakoc, F. "*Comparison of conventional pulmonary rehabilitation and high-frequency chest wall oscillation in primary ciliary dyskinesia.*" *Pediatr Pulmonol*, 2014. **49**(6): 611-616.
45. Gunay-Aygun, M. "*Liver and kidney disease in ciliopathies.*" *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2009. **151C**(4): 296-306.
46. Hadfield, P. J., Rowe-Jones, J. M., Bush, A. and Mackay, I. S. "*Treatment of otitis media with effusion in children with primary ciliary dyskinesia.*" *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1997. **22**(4): 302-306.
47. Haeusler, G., Frisch, H., Waldhor, T. and Gotz, M. "*Perspectives of longitudinal growth in cystic fibrosis from birth to adult age.*" *Eur J Pediatr*, 1994. **153**(3): 158-163.
48. Halbert, S. A., Patton, D. L., Zarutskie, P. W. and Soules, M. R. "*Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome.*" *Hum Reprod*, 1997. **12**(1): 55-58.
49. Hirst, R. A., Jackson, C. L., Coles, J. L., Williams, G., Rutman, A., Goggin, P. M., Adam, E. C., Page, A., Evans, H. J., Lackie, P. M., O'Callaghan, C. and Lucas, J. S. "*Culture of primary ciliary dyskinesia epithelial cells at air-liquid interface can alter ciliary phenotype but remains a robust and informative diagnostic aid.*" *PLoS One*, 2014. **9**(2): e89675.
50. Hirst, R. A., Rutman, A., Williams, G. and O'Callaghan, C. "*Ciliated air-liquid cultures as an aid to diagnostic testing of primary ciliary dyskinesia.*" *Chest*, 2010. **138**(6): 1441-1447.
51. Hjeij, R., Lindstrand, A., Francis, R., Zariwala, M. A., Liu, X., Li, Y., Damerla, R., Dougherty, G. W., Abouhamed, M., Olbrich, H., Loges, N. T., Pennekamp, P., Davis, E. E., Carvalho, C. M., Pehlivan, D., Werner, C., Raidt, J., Kohler, G., Haffner, K., Reyes-Mugica, M., Lupski, J. R., Leigh, M. W., Rosenfeld, M., Morgan, L. C., Knowles, M. R., Lo, C. W., Katsanis, N. and Omran, H. "*ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry.*" *Am J Hum Genet*, 2013. **93**(2): 357-367.
52. Hjeij, R., Onoufriadis, A., Watson, C. M., Slagle, C. E., Klena, N. T., Dougherty, G. W., Kurkowiak, M., Loges, N. T., Diggle, C. P., Morante, N. F., Gabriel, G. C., Lemke, K. L., Li, Y., Pennekamp, P., Menchen, T., Konert, F., Marthin, J. K., Mans, D. A., Letteboer, S. J., Werner, C., Burgoyne, T., Westermann, C., Rutman, A., Carr, I. M., O'Callaghan, C., Moya, E., Chung, E. M., Sheridan, E., Nielsen, K. G., Roepman, R., Bartscherer, K., Burdine, R. D., Lo, C. W., Omran, H. and Mitchison, H. M. "*CCDC151 mutations cause primary ciliary dyskinesia*

- by disruption of the outer dynein arm docking complex formation.*" Am J Hum Genet, 2014. **95**(3): 257-274.
53. Horani, A., Druley, T. E., Zariwala, M. A., Patel, A. C., Levinson, B. T., Van Arendonk, L. G., Thornton, K. C., Giacalone, J. C., Albee, A. J., Wilson, K. S., Turner, E. H., Nickerson, D. A., Shendure, J., Bayly, P. V., Leigh, M. W., Knowles, M. R., Brody, S. L., Dutcher, S. K. and Ferkol, T. W. "*Whole-exome capture and sequencing identifies HEATR2 mutation as a cause of primary ciliary dyskinesia.*" Am J Hum Genet, 2012. **91**(4): 685-693.
54. Horani, A., Ferkol, T. W., Shoseyov, D., Wasserman, M. G., Oren, Y. S., Kerem, B., Amirav, I., Cohen-Cymbberknoh, M., Dutcher, S. K., Brody, S. L., Elpeleg, O. and Kerem, E. "*LRRC6 mutation causes primary ciliary dyskinesia with dynein arm defects.*" PLoS One, 2013. **8**(3): e59436.
55. Hornef, N., Olbrich, H., Horvath, J., Zariwala, M. A., Fliegau, M., Loges, N. T., Wildhaber, J., Noone, P. G., Kennedy, M., Antonarakis, S. E., Blouin, J. L., Bartoloni, L., Nusslein, T., Ahrens, P., Griese, M., Kuhl, H., Sudbrak, R., Knowles, M. R., Reinhardt, R. and Omran, H. "*DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects.*" Am J Respir Crit Care Med, 2006. **174**(2): 120-126.
56. Chenoweth, P. J. "*Genetic sperm defects.*" Theriogenology, 2005. **64**(3): 457-468.
57. Chilvers, M. A., Rutman, A. and O'Callaghan, C. "*Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia.*" J Allergy Clin Immunol, 2003a. **112**(3): 518-524.
58. Chilvers, M. A., Rutman, A. and O'Callaghan, C. "*Functional analysis of cilia and ciliated epithelial ultrastructure in healthy children and young adults.*" Thorax, 2003b. **58**(4): 333-338.
59. Chodhari, R., Mitchison, H. M. and Meeks, M. "*Cilia, primary ciliary dyskinesia and molecular genetics.*" Paediatr Respir Rev, 2004. **5**(1): 69-76.
60. Ishijima, S. "*High-speed video microscopy of flagella and cilia.*" Methods Cell Biol, 1995. **47**: 239-243.
61. Jorissen, M. and Willems, T. "*The secondary nature of ciliary (dis)orientation in secondary and primary ciliary dyskinesia.*" Acta Otolaryngol, 2004. **124**(4): 527-531.
62. Jorissen, M., Willems, T., Van der Schueren, B. and Verbeken, E. "*Secondary ciliary dyskinesia is absent after ciliogenesis in culture.*" Acta Otorhinolaryngol Belg, 2000. **54**(3): 333-342.
63. Karadag, B., James, A. J., Gultekin, E., Wilson, N. M. and Bush, A. "*Nasal and lower airway level of nitric oxide in children with primary ciliary dyskinesia.*" Eur Respir J, 1999. **13**(6): 1402-1405.
64. Kartagener, M. and Stucki, P. "*Bronchiectasis with situs inversus.*" Arch Pediatr, 1962. **79**: 193-207.
65. Kennedy, J. R. and Duckett, K. E. "*The study of ciliary frequencies with an optical spectrum analysis system.*" Exp Cell Res, 1981. **135**(1): 147-156.
66. Kennedy, M. P., Omran, H., Leigh, M. W., Dell, S., Morgan, L., Molina, P. L., Robinson, B. V., Minnix, S. L., Olbrich, H., Severin, T., Ahrens, P., Lange, L., Morillas, H. N., Noone, P. G., Zariwala, M. A. and Knowles, M. R. "*Congenital heart disease and other heterotaxic defects in a large cohort of patients with primary ciliary dyskinesia.*" Circulation, 2007. **115**(22): 2814-2821.
67. Knowles, M. R., Daniels, L. A., Davis, S. D., Zariwala, M. A. and Leigh, M. W. "*Primary Ciliary Dyskinesia: Recent Advances in Diagnostics, Genetics, and Characterization of Clinical Disease.*" Am J Respir Crit Care Med, 2013a.

68. Knowles, M. R., Leigh, M. W., Carson, J. L., Davis, S. D., Dell, S. D., Ferkol, T. W., Olivier, K. N., Sagel, S. D., Rosenfeld, M., Burns, K. A., Minnix, S. L., Armstrong, M. C., Lori, A., Hazucha, M. J., Loges, N. T., Olbrich, H., Becker-Heck, A., Schmidts, M., Werner, C., Omran, H. and Zariwala, M. A. "*Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure.*" *Thorax*, 2012. **67**(5): 433-441.
69. Knowles, M. R., Leigh, M. W., Ostrowski, L. E., Huang, L., Carson, J. L., Hazucha, M. J., Yin, W., Berg, J. S., Davis, S. D., Dell, S. D., Ferkol, T. W., Rosenfeld, M., Sagel, S. D., Milla, C. E., Olivier, K. N., Turner, E. H., Lewis, A. P., Bamshad, M. J., Nickerson, D. A., Shendure, J. and Zariwala, M. A. "*Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia.*" *Am J Hum Genet*, 2013b. **92**(1): 99-106.
70. Knowles, M. R., Ostrowski, L. E., Leigh, M. W., Sears, P. R., Davis, S. D., Wolf, W. E., Hazucha, M. J., Carson, J. L., Olivier, K. N., Sagel, S. D., Rosenfeld, M., Ferkol, T. W., Dell, S. D., Milla, C. E., Randell, S. H., Yin, W., Sannuti, A., Metjian, H. M., Noone, P. G., Noone, P. J., Olson, C. A., Patrone, M. V., Dang, H., Lee, H. S., Hurd, T. W., Gee, H. Y., Otto, E. A., Halbritter, J., Kohl, S., Kircher, M., Krischer, J., Bamshad, M. J., Nickerson, D. A., Hildebrandt, F., Shendure, J. and Zariwala, M. A. "*Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype.*" *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **189**(6): 707-717.
71. Knowles, M. R., Ostrowski, L. E., Loges, N. T., Hurd, T., Leigh, M. W., Huang, L., Wolf, W. E., Carson, J. L., Hazucha, M. J., Yin, W., Davis, S. D., Dell, S. D., Ferkol, T. W., Sagel, S. D., Olivier, K. N., Jahnke, C., Olbrich, H., Werner, C., Raidt, J., Wallmeier, J., Pennekamp, P., Dougherty, G. W., Hjeij, R., Gee, H. Y., Otto, E. A., Halbritter, J., Chaki, M., Diaz, K. A., Braun, D. A., Porath, J. D., Schueler, M., Baktai, G., Griese, M., Turner, E. H., Lewis, A. P., Bamshad, M. J., Nickerson, D. A., Hildebrandt, F., Shendure, J., Omran, H. and Zariwala, M. A. "*Mutations in SPAG1 cause primary ciliary dyskinesia associated with defective outer and inner dynein arms.*" *Am J Hum Genet*, 2013c. **93**(4): 711-720.
72. Kollé, S., Dubielzig, S., Reese, S., Wehrend, A., König, P. and Kummer, W. "*Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow.*" *Biol Reprod*, 2009. **81**(2): 267-274.
73. Kott, E., Duquesnoy, P., Copin, B., Legendre, M., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., Jeanson, L., Tamalet, A., Papon, J. F., Siffroi, J. P., Rives, N., Mitchell, V., de Blic, J., Coste, A., Clement, A., Escalier, D., Toure, A., Escudier, E. and Amselem, S. "*Loss-of-function mutations in LRRC6, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms, cause primary ciliary dyskinesia.*" *Am J Hum Genet*, 2012. **91**(5): 958-964.
74. Kott, E., Legendre, M., Copin, B., Papon, J. F., Dastot-Le Moal, F., Montantin, G., Duquesnoy, P., Piterboth, W., Amram, D., Bassinet, L., Beucher, J., Beydon, N., Deneuille, E., Houdouin, V., Journal, H., Just, J., Nathan, N., Tamalet, A., Collot, N., Jeanson, L., Le Gouez, M., Vallette, B., Vojtek, A. M., Epaud, R., Coste, A., Clement, A., Housset, B., Louis, B., Escudier, E. and Amselem, S. "*Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects.*" *Am J Hum Genet*, 2013. **93**(3): 561-570.

75. Krawczynski, M. R., Dmenska, H. and Witt, M. "Apparent X-linked primary ciliary dyskinesia associated with retinitis pigmentosa and a hearing loss." *J Appl Genet*, 2004. **45**(1): 107-110.
76. Krawczynski, M. R. and Witt, M. "PCD and RP: X-linked inheritance of both disorders?" *Pediatr Pulmonol*, 2004. **38**(1): 88-89.
77. Kupferberg, S. B., Bent, J. P. and Porubsky, E. S. "The evaluation of ciliary function: electron versus light microscopy." *Am J Rhinol*, 1998. **12**(3): 199-201.
78. Kurkowiak, M., Zietkiewicz, E. and Witt, M. "Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics." *J Med Genet*, 2014.
79. Kurkowiak, M., Zietkiewicz, E. and Witt, M. "Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics." *J Med Genet*, 2015. **52**(1): 1-9.
80. Leigh, M. W., Pittman, J. E., Carson, J. L., Ferkol, T. W., Dell, S. D., Davis, S. D., Knowles, M. R. and Zariwala, M. A. "Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome." *Genet Med*, 2009. **11**(7): 473-487.
81. Lin, J., Yin, W., Smith, M. C., Song, K., Leigh, M. W., Zariwala, M. A., Knowles, M. R., Ostrowski, L. E. and Nicastrò, D. "Cryo-electron tomography reveals ciliary defects underlying human RSPH1 primary ciliary dyskinesia." *Nat Commun*, 2014. **5**: 5727.
82. Loges, N. T., Olbrich, H., Becker-Heck, A., Haffner, K., Heer, A., Reinhard, C., Schmidts, M., Kispert, A., Zariwala, M. A., Leigh, M. W., Knowles, M. R., Zentgraf, H., Seithe, H., Nurnberg, G., Nurnberg, P., Reinhardt, R. and Omran, H. "Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects." *Am J Hum Genet*, 2009. **85**(6): 883-889.
83. Loges, N. T., Olbrich, H., Fenske, L., Mussaffi, H., Horvath, J., Fliegauf, M., Kuhl, H., Baktai, G., Peterffy, E., Chodhari, R., Chung, E. M., Rutman, A., O'Callaghan, C., Blau, H., Tiszlavicz, L., Voelkel, K., Witt, M., Zietkiewicz, E., Neesen, J., Reinhardt, R., Mitchison, H. M. and Omran, H. "DNAI2 mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm." *Am J Hum Genet*, 2008. **83**(5): 547-558.
84. Lucas, J. S., Adam, E. C., Goggin, P. M., Jackson, C. L., Powles-Glover, N., Patel, S. H., Humphreys, J., Fray, M. D., Falconnet, E., Blouin, J. L., Cheeseman, M. T., Bartoloni, L., Norris, D. P. and Lackie, P. M. "Static respiratory cilia associated with mutations in Dnahc11/DNAH11: a mouse model of PCD." *Hum Mutat*, 2012. **33**(3): 495-503.
85. Lucas, J. S., Chetcuti, P., Copeland, F., Hogg, C., Kenny, T., Moya, E., O'Callaghan, C. and Walker, W. T. "Overcoming challenges in the management of primary ciliary dyskinesia: The UK model." *Paediatr Respir Rev*, 2013.
86. Maglione, M., Bush, A., Montella, S., Mollica, C., Manna, A., Esposito, A. and Santamaria, F. "Progression of lung disease in primary ciliary dyskinesia: is spirometry less accurate than CT?" *Pediatr Pulmonol*, 2012a. **47**(5): 498-504.
87. Maglione, M., Bush, A., Nielsen, K. G., Hogg, C., Montella, S., Marthin, J. K., Di Giorgio, A. and Santamaria, F. "Multicenter analysis of body mass index, lung function, and sputum microbiology in primary ciliary dyskinesia." *Pediatr Pulmonol*, 2014. **49**(12): 1243-1250.
88. Maglione, M., Montella, S. and Santamaria, F. "Chest CTs in primary ciliary dyskinesia: not too few, but not too many!" *Pediatr Pulmonol*, 2012b. **47**(8): 733-735.
89. Magnin, M. L., Cros, P., Beydon, N., Mahloul, M., Tamalet, A., Escudier, E., Clement, A., Le Pointe, H. D. and Blanchon, S. "Longitudinal lung function and

- structural changes in children with primary ciliary dyskinesia.*" *Pediatr Pulmonol*, 2012. **47**(8): 816-825.
90. Majithia, A., Fong, J., Hariri, M. and Harcourt, J. "*Hearing outcomes in children with primary ciliary dyskinesia--a longitudinal study.*" *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2005. **69**(8): 1061-1064.
91. Mantovani, G., Pifferi, M. and Vozzi, G. "*Automated software for analysis of ciliary beat frequency and metachronal wave orientation in primary ciliary dyskinesia.*" *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2010. **267**(6): 897-902.
92. Marthin, J. K. and Nielsen, K. G. "*Choice of nasal nitric oxide technique as first-line test for primary ciliary dyskinesia.*" *Eur Respir J*, 2011. **37**(3): 559-565.
93. Mazor, M., Alkrinawi, S., Chalifa-Caspi, V., Manor, E., Sheffield, V. C., Aviram, M. and Parvari, R. "*Primary ciliary dyskinesia caused by homozygous mutation in DNALI1, encoding dynein light chain 1.*" *Am J Hum Genet*, 2011. **88**(5): 599-607.
94. McComb, P., Langley, L., Villalon, M. and Verdugo, P. "*The oviductal cilia and Kartagener's syndrome.*" *Fertil Steril*, 1986. **46**(3): 412-416.
95. McIntyre, J. C., Davis, E. E., Joiner, A., Williams, C. L., Tsai, I. C., Jenkins, P. M., McEwen, D. P., Zhang, L., Escobado, J., Thomas, S., Szymanska, K., Johnson, C. A., Beales, P. L., Green, E. D., Mullikin, J. C., Sabo, A., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., Attie-Bitach, T., Yoder, B. K., Reed, R. R., Katsanis, N. and Martens, J. R. "*Gene therapy rescues cilia defects and restores olfactory function in a mammalian ciliopathy model.*" *Nat Med*, 2012. **18**(9): 1423-1428.
96. McIntyre, J. C., Williams, C. L. and Martens, J. R. "*Smelling the roses and seeing the light: gene therapy for ciliopathies.*" *Trends Biotechnol*, 2013. **31**(6): 355-363.
97. McLachlan, R. I., Ishikawa, T., Osianlis, T., Robinson, P., Merriner, D. J., Healy, D., de Kretser, D. and O'Bryan, M. K. "*Normal live birth after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in variant primary ciliary dyskinesia with completely immotile sperm and structurally abnormal sperm tails.*" *Fertil Steril*, 2012. **97**(2): 313-318.
98. Merveille, A. C., Davis, E. E., Becker-Heck, A., Legendre, M., Amirav, I., Bataille, G., Belmont, J., Beydon, N., Billen, F., Clement, A., Clercx, C., Coste, A., Crosbie, R., de Blic, J., Deleuze, S., Duquesnoy, P., Escalier, D., Escudier, E., Fliegauf, M., Horvath, J., Hill, K., Jorissen, M., Just, J., Kispert, A., Lathrop, M., Loges, N. T., Marthin, J. K., Momozawa, Y., Montantin, G., Nielsen, K. G., Olbrich, H., Papon, J. F., Rayet, I., Roger, G., Schmidts, M., Tenreiro, H., Towbin, J. A., Zelenika, D., Zentgraf, H., Georges, M., Lequarre, A. S., Katsanis, N., Omran, H. and Amselem, S. "*CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs.*" *Nat Genet*, 2011. **43**(1): 72-78.
99. Min, Y. G., Shin, J. S., Choi, S. H., Chi, J. G. and Yoon, C. J. "*Primary ciliary dyskinesia: ultrastructural defects and clinical features.*" *Rhinology*, 1995. **33**(4): 189-193.
100. Mitchison, H. M., Schmidts, M., Loges, N. T., Freshour, J., Dritsoula, A., Hirst, R. A., O'Callaghan, C., Blau, H., Al Dabbagh, M., Olbrich, H., Beales, P. L., Yagi, T., Mussaffi, H., Chung, E. M., Omran, H. and Mitchell, D. R. "*Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia.*" *Nat Genet*, 2012. **44**(4): 381-389, S381-382.
101. Moore, A., Escudier, E., Roger, G., Tamalet, A., Pelosse, B., Marlin, S., Clement, A., Geremek, M., Delaisi, B., Bridoux, A. M., Coste, A., Witt, M., Duriez, B.

- and Amselem, S. "*RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa.*" *J Med Genet*, 2006. **43**(4): 326-333.
102. Moore, D. J., Onoufriadis, A., Shoemark, A., Simpson, M. A., zur Lage, P. I., de Castro, S. C., Bartoloni, L., Gallone, G., Petridi, S., Woollard, W. J., Antony, D., Schmidts, M., Didonna, T., Makrythanasis, P., Bevillard, J., Mongan, N. P., Djakow, J., Pals, G., Lucas, J. S., Marthin, J. K., Nielsen, K. G., Santoni, F., Guipponi, M., Hogg, C., Antonarakis, S. E., Emes, R. D., Chung, E. M., Greene, N. D., Blouin, J. L., Jarman, A. P. and Mitchison, H. M. "*Mutations in ZMYND10, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms in humans and flies, cause primary ciliary dyskinesia.*" *Am J Hum Genet*, 2013. **93**(2): 346-356.
103. Moreno Galdo, A., Vizmanos Lamotte, G., Reverte Bover, C., Gartner, S., Cobos Barroso, N., Rovira Amigo, S., Linan Cortes, S., Lloreta Trull, J. and Busquets Monge, R. "*[Value of nasal nitric oxide in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia].*" *An Pediatr (Barc)*, **73**(2): 88-93.
104. Morillas, H. N., Zariwala, M. and Knowles, M. R. "*Genetic causes of bronchiectasis: primary ciliary dyskinesia.*" *Respiration*, 2007. **74**(3): 252-263.
105. Munro, N. C., Currie, D. C., Lindsay, K. S., Ryder, T. A., Rutman, A., Dewar, A., Greenstone, M. A., Hendry, W. F. and Cole, P. J. "*Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection.*" *Thorax*, 1994. **49**(7): 684-687.
106. Mygind, N. and Pedersen, M. "*Nose-, sinus- and ear-symptoms in 27 patients with primary ciliary dyskinesia.*" *Eur J Respir Dis Suppl*, 1983. **127**: 96-101.
107. Mygind, N., Pedersen, M. and Nielsen, M. H. "*Primary and secondary ciliary dyskinesia.*" *Acta Otolaryngol*, 1983. **95**(5-6): 688-694.
108. Noll, E. M., Rieger, C. H., Hamelmann, E. and Nusslein, T. G. "*Questionnaire to preselect patients with a high probability of primary ciliary dyskinesia.*" *Klin Padiatr*, 2011. **223**(1): 22-26.
109. Noone, P. G., Leigh, M. W., Sannuti, A., Minnix, S. L., Carson, J. L., Hazucha, M., Zariwala, M. A. and Knowles, M. R. "*Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features.*" *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **169**(4): 459-467.
110. Noone, P. G., Zariwala, M., Sannuti, A., Minnix, S., Leigh, M. W., Carson, J. and Knowles, M. R. "*Mutations in DNAI1 (IC78) cause primary ciliary dyskinesia.*" *Chest*, 2002. **121**(3 Suppl): 97S.
111. O'Callaghan, C., Chilvers, M., Hogg, C., Bush, A. and Lucas, J. "*Diagnosing primary ciliary dyskinesia.*" *Thorax*, 2007. **62**(8): 656-657.
112. O'Callaghan, C., Rutman, A., Williams, G. M. and Hirst, R. A. "*Inner dynein arm defects causing primary ciliary dyskinesia: repeat testing required.*" *Eur Respir J*, 2011. **38**(3): 603-607.
113. Olbrich, H., Haffner, K., Kispert, A., Volkel, A., Volz, A., Sasmaz, G., Reinhardt, R., Hennig, S., Lehrach, H., Konietzko, N., Zariwala, M., Noone, P. G., Knowles, M., Mitchison, H. M., Meeks, M., Chung, E. M., Hildebrandt, F., Sudbrak, R. and Omran, H. "*Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry.*" *Nat Genet*, 2002. **30**(2): 143-144.
114. Olbrich, H., Horvath, J., Fekete, A., Loges, N. T., Storm van's Gravesande, K., Blum, A., Hormann, K. and Omran, H. "*Axonemal localization of the dynein component DNAH5 is not altered in secondary ciliary dyskinesia.*" *Pediatr Res*, 2006. **59**(3): 418-422.

115. Olbrich, H., Schmidts, M., Werner, C., Onoufriadis, A., Loges, N. T., Raidt, J., Banki, N. F., Shoemark, A., Burgoyne, T., Al Turki, S., Hurles, M. E., Kohler, G., Schroeder, J., Nurnberg, G., Nurnberg, P., Chung, E. M., Reinhardt, R., Marthin, J. K., Nielsen, K. G., Mitchison, H. M. and Omran, H. "*Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry.*" *Am J Hum Genet*, 2012. **91**(4): 672-684.
116. Omran, H., Kobayashi, D., Olbrich, H., Tsukahara, T., Loges, N. T., Hagiwara, H., Zhang, Q., Leblond, G., O'Toole, E., Hara, C., Mizuno, H., Kawano, H., Fliegau, M., Yagi, T., Koshida, S., Miyawaki, A., Zentgraf, H., Seithe, H., Reinhardt, R., Watanabe, Y., Kamiya, R., Mitchell, D. R. and Takeda, H. "*Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins.*" *Nature*, 2008. **456**(7222): 611-616.
117. Omran, H. and Loges, N. T. "*Immunofluorescence staining of ciliated respiratory epithelial cells.*" *Methods Cell Biol*, 2009. **91**: 123-133.
118. Onoufriadis, A., Paff, T., Antony, D., Shoemark, A., Micha, D., Kuyt, B., Schmidts, M., Petridi, S., Dankert-Roelse, J. E., Haarman, E. G., Daniels, J. M., Emes, R. D., Wilson, R., Hogg, C., Scambler, P. J., Chung, E. M., Pals, G. and Mitchison, H. M. "*Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene CCDC114 cause primary ciliary dyskinesia.*" *Am J Hum Genet*, 2013. **92**(1): 88-98.
119. Onoufriadis, A., Shoemark, A., Munye, M. M., James, C. T., Schmidts, M., Patel, M., Rosser, E. M., Bacchelli, C., Beales, P. L., Scambler, P. J., Hart, S. L., Danke-Roelse, J. E., Sloper, J. J., Hull, S., Hogg, C., Emes, R. D., Pals, G., Moore, A. T., Chung, E. M. and Mitchison, H. M. "*Combined exome and whole-genome sequencing identifies mutations in ARMC4 as a cause of primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm.*" *J Med Genet*, 2014a. **51**(1): 61-67.
120. Onoufriadis, A., Shoemark, A., Schmidts, M., Patel, M., Jimenez, G., Liu, H., Thomas, B., Dixon, M., Hirst, R. A., Rutman, A., Burgoyne, T., Williams, C., Scully, J., Bolard, F., Lafitte, J. J., Beales, P. L., Hogg, C., Yang, P., Chung, E. M., Emes, R. D., O'Callaghan, C., Bouvagnet, P. and Mitchison, H. M. "*Targeted NGS gene panel identifies mutations in RSPH1 causing primary ciliary dyskinesia and a common mechanism for ciliary central pair agenesis due to radial spoke defects.*" *Hum Mol Genet*, 2014b. **23**(13): 3362-3374.
121. Ostrowski, L. E., Yin, W., Patel, M., Sechelski, J., Rogers, T., Burns, K., Grubb, B. R. and Olsen, J. C. "*Restoring ciliary function to differentiated primary ciliary dyskinesia cells with a lentiviral vector.*" *Gene Ther*, 2014. **21**(3): 253-261.
122. Panizzi, J. R., Becker-Heck, A., Castleman, V. H., Al-Mutairi, D. A., Liu, Y., Loges, N. T., Pathak, N., Austin-Tse, C., Sheridan, E., Schmidts, M., Olbrich, H., Werner, C., Haffner, K., Hellman, N., Chodhari, R., Gupta, A., Kramer-Zucker, A., Olale, F., Burdine, R. D., Schier, A. F., O'Callaghan, C., Chung, E. M., Reinhardt, R., Mitchison, H. M., King, S. M., Omran, H. and Drummond, I. A. "*CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms.*" *Nat Genet*, 2012. **44**(6): 714-719.
123. Pedersen, M. "*Ciliary activity and pollution.*" *Lung*, 1990. **168 Suppl**: 368-376.
124. Pedersen, M. and Mygind, N. "*Rhinitis, sinusitis and otitis media in Kartagener's syndrome (primary ciliary dyskinesia).*" *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 1982. **7**(6): 373-380.
125. Pennarun, G., Bridoux, A. M., Escudier, E., Dastot-Le Moal, F., Cacheux, V., Amselem, S. and Duriez, B. "*Isolation and expression of the human hPF20 gene*

- orthologous to Chlamydomonas PF20: evaluation as a candidate for axonemal defects of respiratory cilia and sperm flagella.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(3): 362-370.
126. Pennarun, G., Escudier, E., Chapelin, C., Bridoux, A. M., Cacheux, V., Roger, G., Clement, A., Goossens, M., Amselem, S. and Duriez, B. "Loss-of-function mutations in a human gene related to *Chlamydomonas reinhardtii* dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia." Am J Hum Genet, 1999. **65**(6): 1508-1519.
127. Phillips, G. E., Thomas, S., Heather, S. and Bush, A. "Airway response of children with primary ciliary dyskinesia to exercise and beta2-agonist challenge." Eur Respir J, 1998. **11**(6): 1389-1391.
128. Piacentini, G. L., Bodini, A., Peroni, D., Rigotti, E., Pigozzi, R., Pradal, U. and Boner, A. L. "Nasal nitric oxide for early diagnosis of primary ciliary dyskinesia: practical issues in children." Respir Med, 2008. **102**(4): 541-547.
129. Pifferi, M., Caramella, D., Ragazzo, V., Cangiotti, A. M., Macchia, P. and Boner, A. L. "Bronchiectasis in children with recurrent pneumonia: an immunopathological damage associated with secondary ciliary dysmotility." Int J Immunopathol Pharmacol, 2008a. **21**(1): 215-219.
130. Pifferi, M., Maggi, F., Di Cristofano, C., Cangiotti, A. M., Nelli, L. C., Bevilacqua, G., Macchia, P., Bendinelli, M. and Boner, A. L. "Torquetenovirus infection and ciliary dysmotility in children with recurrent pneumonia." Pediatr Infect Dis J, 2008b. **27**(5): 413-418.
131. Pifferi, M., Michelucci, A., Conidi, M. E., Cangiotti, A. M., Simi, P., Macchia, P. and Boner, A. L. "New DNAH11 mutations in primary ciliary dyskinesia with normal axonemal ultrastructure." Eur Respir J, 2010. **35**(6): 1413-1416.
132. Pifferi, M., Montemurro, F., Cangiotti, A. M., Ragazzo, V., Di Cicco, M., Vinci, B., Vozzi, G., Macchia, P. and Boner, A. L. "Simplified cell culture method for the diagnosis of atypical primary ciliary dyskinesia." Thorax, 2009. **64**(12): 1077-1081.
133. Pizzi, S., Cazzato, S., Bernardi, F., Mantovani, W. and Cenacchi, G. "Clinico-pathological evaluation of ciliary dyskinesia: diagnostic role of electron microscopy." Ultrastruct Pathol, 2003. **27**(4): 243-252.
134. Plesec, T. P., Ruiz, A., McMahon, J. T. and Prayson, R. A. "Ultrastructural abnormalities of respiratory cilia: a 25-year experience." Arch Pathol Lab Med, 2008. **132**(11): 1786-1791.
135. Raidt, J., Wallmeier, J., Hjejij, R., Onnebrink, J. G., Pennekamp, P., Loges, N. T., Olbrich, H., Haffner, K., Dougherty, G. W., Omran, H. and Werner, C. "Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia." Eur Respir J, 2014. **44**(6): 1579-1588.
136. Roomans, G. M., Ivanovs, A., Shebani, E. B. and Johannesson, M. "Transmission electron microscopy in the diagnosis of primary ciliary dyskinesia." Ups J Med Sci, 2006. **111**(1): 155-168.
137. Sagel, S. D., Davis, S. D., Campisi, P. and Dell, S. D. "Update of respiratory tract disease in children with primary ciliary dyskinesia." Proc Am Thorac Soc, 2011. **8**(5): 438-443.
138. Santamaria, F., De Stefano, S., Montella, S., Barbarano, F., Iacotucci, P., Ciccarelli, R., Sofia, M. and Maniscalco, M. "Nasal nitric oxide assessment in primary ciliary dyskinesia using aspiration, exhalation, and humming." Med Sci Monit, 2008. **14**(2): CR80-85.

139. Santamaria, F., Esposito, M., Montella, S., Cantone, E., Mollica, C., De Stefano, S., Mirra, V. and Carotenuto, M. "*Sleep disordered breathing and airway disease in primary ciliary dyskinesia.*" *Respirology*, 2014. **19**(4): 570-575.
140. Satir, P. and Christensen, S. T. "*Overview of structure and function of mammalian cilia.*" *Annu Rev Physiol*, 2007. **69**: 377-400.
141. Satir, P. and Christensen, S. T. "*Structure and function of mammalian cilia.*" *Histochem Cell Biol*, 2008. **129**(6): 687-693.
142. Shoemark, A., Dixon, M., Corrin, B. and Dewar, A. "*Twenty-year review of quantitative transmission electron microscopy for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia.*" *J Clin Pathol*, 2012. **65**(3): 267-271.
143. Shoemark, A., Ozerovitch, L. and Wilson, R. "*Aetiology in adult patients with bronchiectasis.*" *Respir Med*, 2007. **101**(6): 1163-1170.
144. Schwabe, G. C., Hoffmann, K., Loges, N. T., Birker, D., Rossier, C., de Santi, M. M., Olbrich, H., Fliegauf, M., Faily, M., Liebers, U., Collura, M., Gaedicke, G., Mundlos, S., Wahn, U., Blouin, J. L., Niggemann, B., Omran, H., Antonarakis, S. E. and Bartoloni, L. "*Primary ciliary dyskinesia associated with normal axoneme ultrastructure is caused by DNAH11 mutations.*" *Hum Mutat*, 2008. **29**(2): 289-298.
145. Sleight, M. A. "*Primary ciliary dyskinesia.*" *Lancet*, 1981. **2**(8244): 476.
146. Sommer, J. U., Schafer, K., Omran, H., Olbrich, H., Wallmeier, J., Blum, A., Hormann, K. and Stuck, B. A. "*ENT manifestations in patients with primary ciliary dyskinesia: prevalence and significance of otorhinolaryngologic comorbidities.*" *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011. **268**(3): 383-388.
147. Stalf, T., Sanchez, R., Kohn, F. M., Schalles, U., Kleinstein, J., Hinz, V., Tielsch, J., Khanaga, O., Turley, H., Gips, H. and et al. "*Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa from a patient with tail stump syndrome.*" *Hum Reprod*, 1995. **10**(8): 2112-2114.
148. Stannard, W. A., Chilvers, M. A., Rutman, A. R., Williams, C. D. and O'Callaghan, C. "*Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia.*" *Am J Respir Crit Care Med*, **181**(4): 307-314.
149. Strippoli, M. P., Frischer, T., Barbato, A., Snijders, D., Maurer, E., Lucas, J. S., Eber, E., Karadag, B., Pohunek, P., Zivkovic, Z., Escribano, A., O'Callaghan, C., Bush, A. and Kuehni, C. E. "*Management of primary ciliary dyskinesia in European children: recommendations and clinical practice.*" *Eur Respir J*, 2012. **39**(6): 1482-1491.
150. Sutherland, M. J. and Ware, S. M. "*Disorders of left-right asymmetry: heterotaxy and situs inversus.*" *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2009. **151C**(4): 307-317.
151. Tarchalski, J. "*[Structure and function of the cilia epithelium of the respiratory tract].*" *Pneumonol Pol*, 1981. **49**(5): 383-390.
152. Tarkar, A., Loges, N. T., Slagle, C. E., Francis, R., Dougherty, G. W., Tamayo, J. V., Shook, B., Cantino, M., Schwartz, D., Jahnke, C., Olbrich, H., Werner, C., Raidt, J., Pennekamp, P., Abouhamed, M., Hjeij, R., Kohler, G., Griese, M., Li, Y., Lemke, K., Klena, N., Liu, X., Gabriel, G., Tobita, K., Jaspers, M., Morgan, L. C., Shapiro, A. J., Letteboer, S. J., Mans, D. A., Carson, J. L., Leigh, M. W., Wolf, W. E., Chen, S., Lucas, J. S., Onoufriadis, A., Plagnol, V., Schmidts, M., Boldt, K., Roepman, R., Zariwala, M. A., Lo, C. W., Mitchison, H. M., Knowles, M. R., Burdine, R. D., Loturco, J. J. and Omran, H. "*DYX1C1 is required for axonemal dynein assembly and ciliary motility.*" *Nat Genet*, 2013. **45**(9): 995-1003.

153. Theegarten, D. and Ebsen, M. "*Ultrastructural pathology of primary ciliary dyskinesia: report about 125 cases in Germany.*" *Diagn Pathol*, 2011. **6**: 115.
154. Thomas, B., Rutman, A. and O'Callaghan, C. "*Disrupted ciliated epithelium shows slower ciliary beat frequency and increased dyskinesia.*" *Eur Respir J*, 2009. **34**(2): 401-404.
155. Toledo, M. F. and Adde, F. V. "*[Primary ciliary dyskinesia in children].*" *J Pediatr (Rio J)*, 2000. **76**(1): 9-16.
156. Veland, I. R., Awan, A., Pedersen, L. B., Yoder, B. K. and Christensen, S. T. "*Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease.*" *Nephron Physiol*, 2009. **111**(3): p39-53.
157. Walker, W. T., Jackson, C. L., Lackie, P. M., Hogg, C. and Lucas, J. S. "*Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia.*" *Eur Respir J*, 2012. **40**(4): 1024-1032.
158. Wallmeier, J., Al-Mutairi, D. A., Chen, C. T., Loges, N. T., Pennekamp, P., Menchen, T., Ma, L., Shamseldin, H. E., Olbrich, H., Dougherty, G. W., Werner, C., Alsabab, B. H., Kohler, G., Jaspers, M., Boon, M., Griese, M., Schmitt-Grohe, S., Zimmermann, T., Koerner-Rettberg, C., Horak, E., Kintner, C., Alkuraya, F. S. and Omran, H. "*Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia.*" *Nat Genet*, 2014. **46**(6): 646-651.
159. Wilson, R. "*Secondary ciliary dysfunction.*" *Clin Sci (Lond)*, 1988. **75**(2): 113-120.
160. Wirschell, M., Olbrich, H., Werner, C., Tritschler, D., Bower, R., Sale, W. S., Loges, N. T., Pennekamp, P., Lindberg, S., Stenram, U., Carlen, B., Horak, E., Kohler, G., Nurnberg, P., Nurnberg, G., Porter, M. E. and Omran, H. "*The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans.*" *Nat Genet*, 2013. **45**(3): 262-268.
161. Yiallourous, P. K., Kouis, P., Middleton, N., Nearchou, M., Adamidi, T., Georgiou, A., Eleftheriou, A., Ioannou, P., Hadjisavvas, A. and Kyriacou, K. "*Clinical features of primary ciliary dyskinesia in Cyprus with emphasis on lobectomized patients.*" *Respir Med*, 2015. **109**(3): 347-356.
162. Zariwala, M. A., Gee, H. Y., Kurkowiak, M., Al-Mutairi, D. A., Leigh, M. W., Hurd, T. W., Hjeij, R., Dell, S. D., Chaki, M., Dougherty, G. W., Adan, M., Spear, P. C., Esteve-Rudd, J., Loges, N. T., Rosenfeld, M., Diaz, K. A., Olbrich, H., Wolf, W. E., Sheridan, E., Batten, T. F., Halbritter, J., Porath, J. D., Kohl, S., Lovric, S., Hwang, D. Y., Pittman, J. E., Burns, K. A., Ferkol, T. W., Sagel, S. D., Olivier, K. N., Morgan, L. C., Werner, C., Raidt, J., Pennekamp, P., Sun, Z., Zhou, W., Airik, R., Natarajan, S., Allen, S. J., Amirav, I., Wieczorek, D., Landwehr, K., Nielsen, K., Schwerk, N., Sertic, J., Kohler, G., Washburn, J., Levy, S., Fan, S., Koerner-Rettberg, C., Amselem, S., Williams, D. S., Mitchell, B. J., Drummond, I. A., Otto, E. A., Omran, H., Knowles, M. R. and Hildebrandt, F. "*ZMYND10 is mutated in primary ciliary dyskinesia and interacts with LRRC6.*" *Am J Hum Genet*, 2013. **93**(2): 336-345.
163. Zariwala, M. A., Leigh, M. W., Ceppa, F., Kennedy, M. P., Noone, P. G., Carson, J. L., Hazucha, M. J., Lori, A., Horvath, J., Olbrich, H., Loges, N. T., Bridoux, A. M., Pennarun, G., Duriez, B., Escudier, E., Mitchison, H. M., Chodhari, R., Chung, E. M., Morgan, L. C., de Jongh, R. U., Rutland, J., Pradal, U., Omran, H., Amselem, S. and Knowles, M. R. "*Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: evidence of founder effect in a common mutation.*" *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(8): 858-866.
164. Zietkiewicz, E., Bukowy-Bieryllo, Z., Voelkel, K., Klimek, B., Dmenska, H., Pogorzelski, A., Sulikowska-Rowinska, A., Rutkiewicz, E. and Witt, M.

- "Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in East-European cohort of primary ciliary dyskinesia patients." *PLoS One*, 2012. **7**(3): e33667.
165. Zietkiewicz, E., Nitka, B., Voelkel, K., Skrzypczak, U., Bukowy, Z., Rutkiewicz, E., Huminska, K., Przystalowska, H., Pogorzelski, A. and Witt, M. "Population specificity of the *DNAI1* gene mutation spectrum in primary ciliary dyskinesia (PCD)." *Respir Res*, **11**: 174.
166. Zuccarello, D., Ferlin, A., Cazzadore, C., Pepe, A., Garolla, A., Moretti, A., Cordeschi, G., Francavilla, S. and Foresta, C. "Mutations in dynein genes in patients affected by isolated non-syndromic asthenozoospermia." *Hum Reprod*, 2008. **23**(8): 1957-1962.

7. Seznam příloh

Příloha 1:

Djakow J, Svobodová T, Uhlík J, Hrach K, Cinek O, Pohunek P. *Effectiveness of sequencing selected exons of DNAH5 and DNA11 in diagnosis of primary ciliary dyskinesia*. Pediatric Pulmonology, 2012, 47(9): 864-875. **IF 2.31**

Příloha 2:

Djakow J, Kramná L, Dušátková L, Uhlík J, Pursiheimo J-P, Svobodova T, Pohunek P, Cinek O: *An Effective Combination of Sanger and Next Generation Sequencing in Diagnostics of Primary Ciliary Dyskinesia*. Pediatric Pulmonology, 2015. Přijato k publikaci. **IF 2.704**

Příloha 3:

Moore, D, Onoufriadis A, Shoemark A, Simpson MA, de Castro SC, zur Lage PI, Bartoloni L, Gallone G, Petridi S, Woollard WJ, Antony D, Schmidts M, Didonna T, Makrythanasis P, Bevilard J, Mongan NP, **Djakow J**, Pals G, Lucas JS, Marthin JK, Nielsen KG, Santoni F, Guiponni M, Hogg C, Antonarakis SE, Emes RD, Chung EMK, Greene NDE, Blouin J-L, Jarman AP, Mitchison H. *Mutations in ZMYND10, a gene essential for proper axonemal assembly of inner and outer dynein arms in human and fly, cause primary ciliary dyskinesia*. Am J Hum Gen, 2013. Vol. 93, Issue 2, pp. 346-356. **IF 11.202**.

Příloha 4:

Smith C, **Djakow J** (společné první autorství), Free RC, Djakow P, Fadaee-Shohada M, Patel A, Lonnen A, Williams G, Pohunek P, Hirst RA, Andrew PW, O'Callaghan C: *ciliaFA: A research tool for automated, high-throughput measurement of ciliary beat frequency using freely available software*. Cilia, 2012. 1(1):14. DOI:10.1186/2046-2530-1-14.

Příloha 5:

Svobodová T, **Djakow J**, Zemková D, Cipra A, Pohunek P and Lebl J. *Impaired childhood growth in children with primary ciliary dyskinesia*. International Journal of

Endocrinology, vol. 2013, Article ID 731423, 5 pages, 2013. doi:10.1155/2013/731423;
IF 2.518

Příloha 6:

Djakow J, Svobodová T, Uhlík J, Pohunek P. *Primární ciliární dyskineze*. *Pediatric pro praxi*, 2013. 14(6): 368-371.

Příloha 7:

Djakow J, Svobodová T, Uhlík J, Kabelka Z, Smolíková L, Cinek O, Pohunek P. *Primární ciliární dyskineze. Část 1. – Patogeneze a klinický obraz*. *Alergie*, 2009 (1). 54-59.

Příloha 8:

Djakow J, Svobodová T, Uhlík J, Kabelka Z, Smolíková L, Cinek O, Pohunek P: *Primární ciliární dyskineze. Část 2. – Diagnostika a terapie*. *Alergie*, 2009 (2). 38-44.

Příloha 9:

Djakow J, O'Callaghan C. *Primary ciliary dyskinesia*. *Breathe* (Educational Journal of European Respiratory Society), 2014. 10(2):122-133. doi: 10.1183/20734735.007413