ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"РОССИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Винер Марианна Евгеньевна

Патофизиологическое обоснование применения таргетных методов лечения моногенных заболеваний сетчатки

14.03.03 – Патологическая физиология

14.01.07 – Глазные болезни

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научные консультанты:
доктор медицинских наук, профессор Салмаси Жеан Мустафаевич
доктор медицинских наук Балашова Лариса Маратовна

Москва, 2020 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ. 6

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: Современные подходы к классификации, диагностике и лечению моногенных заболеваний сетчатки 13

1.1. Нормальная физиология и патофизиология сетчатки 13

1.1.1. Нормальная физиология зрительного цикла 16

1.1.2. Наружный сегмент фоторецептора в норме и при патологии 22

1.1.3. Ресничный транспорт в фоторецепторах в норме и при патологии 23

1.1.4. Каскад зрительного сигнала в норме и при патологии 26

1.1.5. Межфоторецепторное пространство в норме и при патологии 31

1.2. Осложнения моногенных заболеваний сетчатки и коморбидность 35

1.2.1. Аномалии рефракции. 35

1.2.2. Кистоидный макулярный отек 35

1.2.3. Катаракта. 36

1.2.4. Аномалии стекловидного тела. 36

1.2.5. Сосудистые нарушения. 37

1.2.6. Друзы диска зрительного нерва 38

1.2.7. Пигментные и другие аномалии и коморбидность. 38

1.3. Диагностика моногенных заболеваний сетчатки 40

1.3.1. Методы клинического офтальмологического исследования. 41

1.3.2. Молекулярно-генетические и лабораторные исследования. 45

1.3.3. Дифференциальная диагностика моногенных заболеваний сетчатки. 47

1.4. Методы лечения моногенных заболеваний сетчатки. 51

1.4.1. Генно- и мутационно-специфические подходы 51

1.4.2. Мутационно независимые подходы 54

1.4.3. Лечение сопутствующих глазных заболеваний 56

1.4.4. Реабилитация 58

1.5. Направления исследований для патогенетического лечения моногенных заболеваний сетчатки. 58

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. 64

2.1.Характеристика исследуемой группы 64

2.1.1. Методы клинического офтальмологического исследования. 65

2.1.2. Молекулярно-генетические и лабораторные исследования. 70

2.1.3. Биоинформатический анализ 71

2.1.4. Методы субъективной оценки зрения пациентами. 72

2.1.5. Гистологические исследования 77
2.1.6. Дифференциальная диагностика 79
2.2. Методы лечения моногенных заболеваний сетчатки в исследуемой группе 82
2.2.1. Методика проведения стандартного лечения. 82
2.2.2. Методика проведения патогенетического лечения. 84
2.2.3. Методика лечения стволовыми клетками 88
2.2.4. Методика оценки побочных эффектов и осложнений терапии. 90
2.3. Методика подготовки индуцированных стволовых клеток. 91
2.4. Методы математической статистики и анализа полученных данных. 94
ГЛАВА 3. ДИАГНОСТИКА И РАЗДЕЛЕНИЕ НА ГРУППЫ. 96
3.1. Результаты молекулярно-генетической диагностики всех пациентов 96
3.1.1. Обнаруженные новые мутации. 96
3.1.2. Алгоритм расчета патогенности обнаруженных мутаций. 98
3.1.3. Алгоритм применения дополнительных методов диагностики. 99
3.2. Алгоритмы распределения пациентов по группам. 100
3.2.1.Алгоритм отбора в группу патогенетического лечения. 102
3.2.2. Алгоритм отбора в группу лечения стволовыми клетками 101
3.2.3. Группа стандартного лечения 102
3.2.4. Сравнительная характеристика групп 103
3.3. Распределение пациентов детского и взрослого возраста по группам. 104
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СТАНДАРТНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ. 105
4.1. Общая характеристика разнородной группы 105
4.2. Общая характеристика полученных результатов. 106
4.3. Сравнительные результаты лечения внутри группы. 111
4.3.1. Оценка функционального состояния сетчатки. 111
4.3.2. Оценка анатомической структуры сетчатки. 120
4.3.3. Субъективные результаты лечения по оценке пациентов (PRO). 121
ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ. 124
5.1. Результаты лечения пациентов с ювенильным ретиношизисом – *RS1*. 125
5.2. Результаты генотерапевтического лечения пациентов с
изолированными рецессивными формами пигментного ретинита. 128
5.2.1. Результаты лечения *RPGR*-ассоциированной ретинопатии 128
5.2.2. Результаты лечения *RPE65*-ассоциированной ретинопатии 130
5.2.3. Результаты лечения *CDHR1*-ассоциированной ретинопатии. 134

5.3. Результаты лечения олигонуклеотидами пациентов с изолированными рецессивными формами пигментного ретинита. 137
5.3.1. Результаты лечения *USH2A*-ассоциированной ретинопатии. 137
5.3.2. Результаты лечения *EYS*-ассоциированной ретинопатии 139
5.3.3. Результаты лечения *CRB1*-ассоциированной ретинопатии. 145
5.3.4. Результаты лечения *CEP290*-ассоциированной ретинопатии. 147
5.4. Результаты лечения пациентов с доминантными формами пигментного ретинита 149
5.4.1. Результаты лечения *NR2E3*-ассоциированной ретинопатии 149
5.4.2. Результаты лечения *RHO*-ассоциированной ретинопатии. 152
5.5. Результаты лечения пациентов с синдромными формами пигментного ретинита 155
5.5.1. Результаты лечения нейронального цероидного липофусциноза *CLN3*. 155
5.5.2. Результаты лечения *C19orf12*-ассоциированного накопления железа. 161
5.6. Результаты лечения пациентов с центральными дистрофиями сетчатки 164
5.6.1 Результаты лечения *CNGA3*-ассоциированной ретинопатии. 164
5.6.2. Результаты лечения *CNGB3*-ассоциированной ретинопатии 164
5.7. Сравнительные результаты лечения внутри группы пациентов, прошедших патогенетическое лечение. 170
5.7.1. Оценка функционального состояния сетчатки. 170
5.7.2. Оценка анатомической структуры сетчатки. 178
5.7.3. Субъективные результаты лечения по оценке пациентов. 181
5.8. Сравнительная характеристика остроты и полей зрения в группе детей и взрослых до и после лечения. 194
5.9. Общие данные сравнительной характеристики показателей в исследуемой группе 195
ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ. 197
6.1.Общая характеристика полученных результатов. 198
6.1.1. Оценка функционального состояния сетчатки. 198
6.1.2. Оценка анатомической структуры сетчатки. 200
6.1.3. Субъективные результаты лечения по оценке пациентов. 201
6.1.4. Системные эффекты лечения стволовыми клетками. 202
ГЛАВА 7. ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ И ОСЛОЖНЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ. 204
7.1. Применяемые шкалы и градации побочных эффектов. 204
7.2. Классификация осложнений. 204
7.3. Местные осложнения и побочные эффекты. 205
7.4. Системные осложнения и побочные эффекты 206
7.5. Коморбидность моногенных заболеваний сетчатки. 206

7.5. Методы управления рисками и осложнениями лечения. 207
ГЛАВА 8. ПРИМЕНЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (иППСК) ДЛЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ В БУДУЩЕМ. 210
8.1. Характеристика культивируемых иППСК. 210
8.1.1. иППСК пациента с мутацией в гене *NR2E3*. 210
8.1.2. иППСК пациента с мутацией в гене *RHO*. 212
8.1.3. Создание иППСК для транскрипции других генов. 213
8.2. Результаты внесения изменений в геном культивируемых иППСК. 214
8.2.1.Доставка до таргетной ткани и клеточного окружения. 214
8.2.2.Пространственная архитектура и сложность встраивания в анатомию сетчатки 215
8.3. За и против применения иППСК. 215
ГЛАВА 9. ИЗУЧЕНИЕ ПЛЕЙОТРОПНОГО ЭФФЕКТА ПРЕПАРАТОВ И ПРЕДСКАЗАНИЕ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ. 219
9.1. Анализ офф-таргет эффективности. 219
9.2. Анализ метаболических путей патогенетического действия препаратов. 219
9.3. Плейотропный эффект препаратов 223
9.3.1. в группе пациентов с изолированными рецессивными формами. 223
9.3.2. в группе пациентов с доминантными формами. 224
9.3.3. в группе пациентов с синдромными формами. 224
9.3.4. в группе пациентов с центральными дистрофиями сетчатки. 225
9.4. In silico поиск предполагаемых общих мишеней: генная терапия, биологическая терапия, терапия малыми молекулами. 225
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 231
ВЫВОДЫ. 233
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. 234
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. 235
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ. 269
ГЛОССАРИЙ. 271

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы: моногенные заболевания сетчатки представляют собой группу из порядка 300 разнородных по клиническим проявлениям изолированных или синдромальных заболеваний, которые объединены схожими механизмами развития – повреждением одного из звеньев фототрансдукции или целостности клеток фоторецепторов, а также вспомогательных клеток (пигментных, Мюллеровых). Частота встречаемости моногенных заболеваний сетчатки колеблется от 1:5000 (болезнь Штаргардта) до 1:100 000 (синдром Ашера, ахроматопсия), что при разнообразии форм дает в среднем 1:4000 человек.

На сегодняшний день в широкой клинической практике отсутствует патогенетически направленное эффективное лечение данной группы заболеваний, однако на разных стадиях клинических и доклинических исследований находятся перспективные методы лечения. На текущий момент одобрен один препарат, возмещающий функцию гена RPE65 при амаврозе Лебера. Своевременная диагностика моногенных заболеваний сетчатки затруднена редкостью этой группы заболеваний и высокой стоимостью необходимого лабораторного молекулярно-генетического анализа, однако в последние годы наблюдается положительная тенденция в сторону более раннего выявления заболеваний. Точных эпидемиологических данных встречаемости данной группы заболеваний в России нет. При отсутствии лечения **моногенные заболевания сетчатки** прогрессируют, приводят к полной слепоте и тяжёлой инвалидности. Имеющиеся методы лечения мало эффективны, не имеют четкой нацеленности на устранение причины, терапия нацелена в основном на сохранение оставшихся зрительных функций и замедление прогрессирования и включает в себя витаминотерапию (вит. А, Е, В, модифицированные формы витамина А (ALK-001), мультивитаминные комплексы и др.), применение биодобавок, антиоксидантов и пигментов (микроэлементы, лютеин/зеаксантин), применение солнцезащитных очков и светофильтров, лечение сопутствующих заболеваний (макулярного отека гормональными препаратами, катаракты хирургическим удалением и др.), а также сосудистые препараты (трентал, мексидол), ноотропные препараты и процедуры, повышающие кровоснабжение заднего отрезка глаза – реваскуляризирующая хирургия височных артерий и др. Появление новых таргетных методов лечения дает надежду на сохранение и в некоторых случаях на восстановление зрительных функций.

Типичные особенности, характерные для пигментного ретинита (ПР) в целом в связи с неоднородностью требует более пристального взгляда на клинические результаты, которые были зарегистрированы для генетических подтипов ПР. Во многих ранних исследованиях использовались не генотипированные когорты ПР и иногда они делились на пациентов в соответствии с их типом наследования заболевания. Совсем недавно описаны фенотипы для

конкретного причинного гена, хотя и с ограниченным числом пациентов и / или отсутствием клинических деталей. Поэтому получение четкой картины относительно фенотипов, связанных с генетическими подтипами ПР, является сложной задачей. В работе представлен исчерпывающий обзор конкретных клинических признаков, относящихся к различным подтипам, чтобы помочь врачу определить подтип и предсказать клиническое течение. Важно отметить, что даже в рамках конкретного подтипа могут происходить значительные фенотипические изменения из-за различных эффектов мутаций, генетических модификаторов и, в некоторых случаях, факторов окружающей среды.

Цель: Разработать методы патогенетического лечения моногенных заболеваний сетчатки на основе изучения этиологии и патогенеза этих заболеваний у российских пациентов.

Задачи:

1. Изучить спектр мутаций, характерный для российской популяции пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки, описать их отличия и особенности.
2. Проанализировать патогенетическую значимость выявленных мутаций в развитии моногенных заболеваний сетчатки в исследованной группе пациентов.
3. Обосновать применение таргетных препаратов для коррекции генных мутаций у больных моногенными заболеваниями сетчатки как патогенетически направленного лечения исследованной группы пациентов с известным механизмом развития заболевания.
4. Изучить клинический эффект таргетных методов лечения с описанием механизма воздействия используемых препаратов и молекул у пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки, в сравнении с контрольной группой.
5. Провести сравнительное изучение влияния стандартной терапии, пересадки стволовых клеток и таргетного лечения на зрительные функции обследуемых пациентов.
6. Выявить и обосновать различия в тактике лечения доминантных и рецессивных форм моногенных заболеваний сетчатки.
7. Разработать точные критерии современной клинической дифференциальной диагностики моногенных заболеваний сетчатки и внедрить их в практику для своевременной постановки диагноза и оптимальной тактики лечения.

Новизна, преимущества перед существующими аналогами

На клиническом материале впервые изучен клинический эффект таргетных методов лечения с описанием механизма воздействия используемых препаратов и молекул у пациентов с

моногенными заболеваниями сетчатки, в сравнении с контрольной группой традиционного лечения и лечения стволовыми клетками.

- Впервые собрана и обследована по единому протоколу репрезентативная выборка пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки.
- Впервые применены адаптированные методы статистической обработки результатов динамического наблюдения в этой группе пациентов при проведении лечения и при наблюдательной тактике.
- Впервые изучен спектр мутаций, характерный для российской популяции пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки, описаны отличия и особенности.
- Впервые проведен компьютерный анализ взаимодействия звеньев интерактома сетчатки, проведена аналитическая подготовительная работа для создания и внедрения методов лечения при мутациях в генах факторов транскрипции (*EYS, CRB1*), а не только имеющиеся подходы к лечению структурных белков (*RPE65, RPGR, NR2E3, CNGA3, CNGB3*).

Теоретическая значимость и практическая ценность работы

Впервые в России реализован системный подход в наблюдении и лечении пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки. Собран и обработан большой объем аналитической информации, который лег в основу развития этой области в России.

Впервые в России проведено патогенетически направленное лечение в группе пациентов с моногенными дистрофиями сетчатки с известным механизмом патогенеза.

Разработаны критерии дифференциальной диагностики для определения тактики лечения группы моногенных заболеваний сетчатки.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разные типы заболевания характеризуются разными типами наследования и требуют отличных методов лечения (применение антисенсных последовательностей и молекулярных ножниц (CRISPR) при доминантных формах и заместительную генную терапию при рецессивных формах).
2. В зависимости от причины заболевания (патология структурного или сигнального белков, транскрипционных факторов и проч.) требуются различные подходы к лечению на разных фазах заболевания.

3. В зависимости от механизма дефекта (snp или делеции или сдвиг рамки считывания или обрыв цепи белка вследствие мутации на стоп-кодон) применяются различные методы медицинского вмешательства.
4. Важно изучение метаболических путей и перекрестной эффективности препаратов для применения уже имеющихся препаратов в клинической практике при моногенных заболеваниях сетчатки и разработки новых препаратов.

Формы и этапы внедрения

Подготовлен и представлен в Департамент здравоохранения г. Москвы проект методических рекомендаций «Современная дифференциальная диагностика и лечение моногенных заболеваний сетчатки».

По материалам исследования изданы методические рекомендации, опубликованы статьи в общероссийских и региональных сборниках, результаты доложены на конференциях.

Представлен план и содержание образовательного курса «Дифференциальная диагностика и лечение моногенных заболеваний сетчатки» для медицинских вузов.

Результаты данного научного исследования внедрены в работу офтальмологических отделений государственных бюджетных и частных учреждений: ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» управления делами Президента РФ, Научно-клинический центр «Офтальмик», Центр генетики и репродуктивной медицины «Генетико», Международный научно-практический центр пролиферации тканей, ГБУЗ Городская клиническая больница №1 им. Н. И. Пирогова ДЗМ, клиника Сфера, Центр диагностики и хирургии заднего отдела глаза, клиника Атлас, Орловская глазная клиника, Офтальмологический центр «Визус» (г. Улан-Удэ), Иркутский филиал МНТК «Микрохирургия глаза» имени акад. С.Н. Фёдорова» МЗ РФ, Красноярская краевая офтальмологическая клиническая больница им. профессора П.Г. Макарова, Калужский филиал ФГАУ НМИЦ МНТК Микрохирургия глаза им. акад. С. Н. Фёдорова Минздрава России, Приморский центр микрохирургии глаза (г. Владивосток), Офтальмологический центр «Визус» (г. Псков), Республиканская клиническая офтальмологическая больница (г. Казань) и в учебный процесс кафедры патологической и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Ожидаемая медико-социальная и экономическая эффективность от внедрения предложений. Внедрение результатов исследования должно улучшить зрительные функции у больных с моногенными заболеваниями сетчатки после применения таргетного лечения, направленного на коррекцию патофизиологических механизмов развития заболевания.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на международной конференции ARVO (США, 2020), были доложены на семинаре по офтальмогенетике Nijmegen, дек 2019, на Федоровских чтениях 2018 (в программе доклад, тезисы), на конференции «Пожилой больной качество жизни» (2019, 2020), на съезде генетиков MGNGS. 2018, 2019 (Суздаль, Россия), на съезде британского общества генной и клеточной терапии (BSGCT 2018), CRISPR meeting CSHL 2018, на конференции по молекулярной офтальмологии (октябрь 2018, Москва), на Форуме «Пролиферативный синдром в биологии и медицине» (ноябрь 2020, Москва, Россия).

Публикации

По теме диссертации опубликованы **27 научных работ**, из них **13 в журналах ВАК**, **9 в зарубежных журналах**.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 277 страницах машинописного текста. Состоит из введения, 9 глав, содержащих обзор литературы, материалы и методы исследования, данные клинико-генетических исследований, клинико-функциональных исследований и результатов терапевтического и хирургического лечения больных, анализа побочных эффектов и осложнений терапии, обсуждении различных терапевтических тактик, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, глоссария, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 78 рисунками, 44 таблицами. Список литературы включает 370 источников, из них 26 отечественных и 344 зарубежных авторов.

Личный вклад автора

Выбор направления исследования принадлежит автору. Лично автором осуществлялся сбор материала, анализ и обобщение полученных результатов, велся мониторинг основных параметров, проводилась аналитическая и статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Функция автора в этой работе является определяющей и

заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования: от постановки задач, их научно-практической, теоретической и клинической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и докладах до их внедрения в практику. Текст диссертации написан и оформлен лично автором.

Благодарности

Автор с особой признательностью благодарит научных сотрудников Медико-генетического центра и лично Стрельникова В.В. за помощь в проведении генетических анализов и их обсуждение, поиск интронных мутаций и анализ их патогенности, Смирнихину С.А. за помощь в формировании и внедрении подходов к лечению, Зинченко Р.А. за возможность принять участие в эпидемиологических экспедициях по изучению отягощенности населения генетической патологией, руководителя ЦГРМ Генетико Исаева А.А. за содействие в проведении молекулярно-генетической диагностики, а также сотрудников лаборатории Померанцеву Е.А., Каймонова В.С., Миронову И.В., сотрудников ЛКБ Коновалова Ф.А., Амплееву М.А., Толмачеву Е.Р. за помощь в биоинформатическом анализе биообразцов, благодарит Хаценко И.Е., Зольникову И.В., Казимирову Е.Г., Горгишели К.В., Атарщикова Д.С., Бакунину Н.А за помощь в клиническом обследовании пациентов, Зиновкина Р.А., Шеремет Н.Л. за консультации по митохондриальной патологии, Sofia Calado за консультации по формированию клеточных линий iPSC, Демчинского А.М., Шибанову В.А., Котову И.В., Губину Л.А. за помощь в организации, поддержке и обновлении реестра пациентов и плодотворные обсуждения, объединение переводчиков жестового языка в лице Ионичевской Л.Г. и всех сопровождающих слепо-глухих пациентов, Еремина И.И., Пулина А.А. за помощь в хранении образцов пациентов по стандартам ISBER и условиям биобанкирования, Владимирова С.В. за помощь в обсчете статистических данных, Debmalya Barh за помощь в построении 3D структур нормальных и транкированных белков в Phyer2 и подготовку совместных публикаций, сотрудников лаборатории геномной инженерии МФТИ за плодотворное сотрудничество, сотрудников лаборатории Геномед и лично Канивец И.В. за помощь в генетической диагностике, за содействие в получении пациентами лечения Zein Wadih, Dnag Do (CLN3) Liz Caruana, Rob Collin (EYS, CEP290), Frans Cremers (ABCA4), Susanne Roosing, Marko Hawlina (USH2A) Hirji N. (CNGA3/B3), Stephen Tsang, Robinson Gregory (CRB1, RPGR), Imran Yusuf (CDHR1), T. Kmiec (C19orf12), Petia Stratieva (Retina International) сотрудников МЦ Атлас за содействие в выполнении клинической работы, сотрудников Фонда Сколково Л.Кравченко, В.Мелихову за правовые и бизнес консультации по внедрению методов лечения в России, Наделяеву И.И. за помощь в подготовке документов по

дизайну исследования для этического комитета, Киргизова К.И. за помощь в подготовке документов в МЗ РФ, членов своей семьи за моральную поддержку в написании работы.

Без всех вас данная работа не могла бы быть выполнена!

Финансирование

Работа была проведена частично за счет средств благотворительного фонда поддержки слепоглухих «Со-единение» (проект #201609-CRO), в рамках Президентского гранта #19-2-010585-2, за счет со-финансирования ЦГРМ «Генетико» в рамках договора #LAB201811, а также частично за счет собственных средств автора.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ:
Современные подходы к классификации, диагностике и лечению моногенных заболеваний сетчатки

1.1.Нормальная физиология и патофизиология сетчатки

Всего насчитывается порядка 70 четких фенотипических форм наследственных дистрофий сетчатки. Пигментный ретинит (ПР) является наиболее частой и разнородной формой моногенных заболеваний сетчатки и приводит к необратимому нарушению зрения и неизлечимой слепоте. От пигментного ретинита страдают более 1,5 миллиона пациентов во всем мире. ПР является наиболее распространенной наследственной дистрофией сетчатки, распространенность которой во всем мире составляет приблизительно 1:4000 (Pagon, 1988), хотя сообщения варьируют от 1:9000 (Na et al., 2017) до 1:750 (Nangia et al., 2012), в зависимости от географического положения. Термин «пигментный ретинит» впервые был введен Дондерсом в 1857 г. (Donders, 1857). ПР включает группу прогрессирующих наследственных дистрофий сетчатки, характеризующихся первичной дегенерацией фоторецепторов палочек с последующей потерей фоторецепторов колбочек. Первоначальным симптомом является снижение ночного видения, которое сопровождается постепенной концентрической потерей поля зрения. Функция в макуле обычно относительно хорошо сохраняется до более поздних стадий заболевания. На глазном дне обычно обнаруживают пигментацию в виде костных телец (спикул) преимущественно на периферии и / или средней периферии, истончение сосудов сетчатки и восковую бледность диска зрительного нерва. Электроретинограмма может помочь в диагностике и выявляет характерную потерю функции фоторецепторов, главным образом среди палочковых фоторецепторов, а не колбочек на ранних стадиях заболевания.

ПР клинически отличается от других наследственных дистрофий сетчатки, которые проявляются при рождении или в течение первых нескольких месяцев жизни (например, врожденный амавроз Лебера, или LCA), дистрофии, при которых дегенерация колбочек предшествует дегенерации палочек (например, колбочковая дистрофия), дистрофии желтого пятна (макулы) и расстройства, которые обычно не прогрессируют, такие как ахроматопсия и врожденная стационарная ночная слепота (CSNB). Кроме того, 20-30% пациентов с ПР имеют синдромальную форму заболевания, связанную с экстраокулярными аномалиями. Вместе все эти расстройства образуют континуум дистрофий сетчатки с частично совпадающими клиническими и / или генетическими данными (рис. 1).

ПР характеризуется прогрессирующей дегенерацией фоторецепторов и пигментного

эпителия сетчатки (РПЭ), что приводит к ночной слепоте, туннельному зрению и постепенному снижению центрального зрения. Тем не менее, клинические проявления при ПР варьируются в широких пределах из-за большого количества вовлеченных генов, каждый из которых может иметь несколько аллелей.

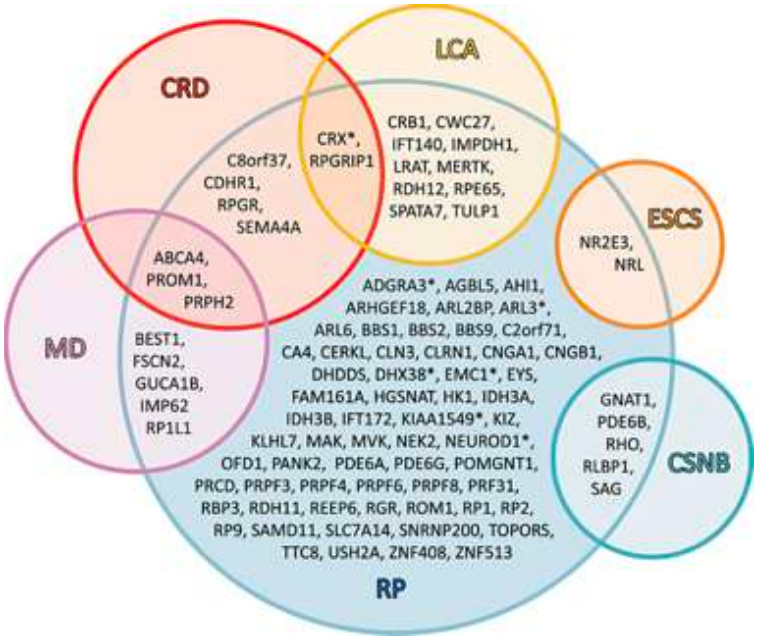


Рис.1. Пересечение фенотипов наследственных дистрофий сетчатки, схема создана на основе обзора Verbakel S.K. и соавт., 2018.

CSNB - congenital stationary night blindness - врожденная стационарная ночная слепота. **ESCS** - enhanced S-cone syndrome - синдром повышенного ответа колбочек. **MD** - macula dystrophy - макулярная дистрофия (ранняя форма). **LCA** - Leber congenital amaurosis - врожденный амавроз Лебера. **CRD** - cone-rod dystrophy - колбочко-палочковая дистрофия. **RP** - retinitis pigmentosa - пигментный ретинит. Латинскими аббревиатурами указаны названия генов, в пересекающихся окружностях указаны гены, мутации в которых могут приводить к проявлению пигментного ретинита (синий круг) или другой формы дистрофии сетчатки (окружности другого цвета).

Это совпадение может усложнить классификацию отдельных наследственных дистрофий сетчатки и является предметом обсуждения. Более того, в повседневной клинической практике доступно несколько терапевтических вариантов. Поэтому цель врача должна быть в том, чтобы предоставить пациенту наилучшую возможную информацию относительно ожидаемого клинического течения, типа наследования заболевания, вариантов лечения и их ожидаемой эффективности. В этом отношении разработка системы классификации, которая сочетает в себе клинический диагноз с лежащими в основе генетическими факторами, может предоставить ценную прогностическую информацию относительно скорости прогрессирования и долгосрочного результата.

Широкая гетерогенность среди пациентов с ПР лучше всего иллюстрируется большим количеством генетических дефектов, связанных с ПР. В 1990 году Dryja et al. сообщили о первом идентифицированном гене, вовлеченном в аутосомно-доминантный ПР: ген родопсина (RHO) (Dryja et al., 1990). С тех пор мутации в более чем 80 генах были описаны вовлеченными в несиндромальную (изолированную форму) ПР (Daiger et al., 2016), и каждый год новые гены добавляются в этот список. Каждый из этих генов соответствует геноспецифическому подтипу ПР с определенным возрастом начала, типом ухудшения зрения, проявлениями на сетчатке и / или скоростью прогрессирования. Более того, несколько факторов могут значительно различаться в каждом из этих геноспецифических подтипов, даже между разными членами семьи с одним и тем же диагнозом, что свидетельствует о наличии неопознанных генетических и / или факторов окружающей среды, которые могут влиять на фенотип ПР.

Информация относительно разнообразного клинического течения различных подтипов ПР описана различными авторами, включавшими ограниченную группу пациентов для анализа. В этой работе приведен исчерпывающий обзор клинических особенностей, связанных с различными генетическими подтипами несиндромального ПР. Смежным, но не менее сложным предметом изучения является функциональная роль многих белков, кодируемых их соответствующими генами ПР. Чтобы лучше оценить клинический эффект от мутаций в генах ПР, приводится обсуждение роли этих белков в структуре и функции сетчатки. Также продолжена дискуссия о современной терапевтической тактике и будущих перспективах лечения несиндромального (изолированного) ПР.

Начальные симптомы ПР включают ночную слепоту (никталопию) и трудности с темновой адаптацией. В некоторых случаях ПР также может приводить к потере среднего периферического поля зрения, хотя об этом редко сообщают как о раннем симптоме.

Центральная сетчатка остается относительно сохранной до последних стадий заболевания, хотя анатомические нарушения в центральной сетчатке могут появляться на ранних стадиях заболевания. Как правило, когда пациент достигает среднего возраста, дегенерация центральной области сетчатки приводит к снижению остроты зрения. Большинство пациентов с ПР сохраняют способность воспринимать свет благодаря остаточной макулярной функции и / или наличию сохранившегося периферического височного островка сетчатки (Hamel, 2006). Фотопсия является распространенным, но часто игнорируемым симптомом (Heckenlively et al., 1988), который может сильно беспокоить пациентов. Это явление может быть вызвано отсутствием афферентных нервных импульсов в ответ на дегенерацию фоторецепторов (Kolmel, 1993) или спонтанной самосигналирующей активностью в результате ремоделирования внутренней сетчатки (Marc et al., 2003). Фотопсия может возникнуть в начальной стадии ПР (Bittner et al., 2009), но особенно тревожно у пациентов с более поздними стадиями заболевания

(Bittner et al., 2011). При прогрессирующем ПР зрительные галлюцинации могут принимать живые формы, что соответствует диагнозу синдром Чарльза Бонне (O'Hare et al., 2015). Пациенты с ПР также могут испытывать фотофобию и дисхроматопсию (Hamel, 2006; Pinckers et al., 1993).

1.1.1. Нормальная физиология зрительного цикла

Фототрансдукция, процесс, посредством которого фотон света превращается в электрический сигнал, происходит в фоторецепторах. Зрительные пигменты в наружном сегменте фоторецептора поглощают свет, инициируя процесс. Затем следует серия биохимических изменений, и клетка гиперполяризуется, что вызывает электрический ток через сетчатку. Сигнал проходит к биполярным и горизонтальным клеткам, происходит обработка зрительного сигнала, это происходит в большей степени, когда сигнал передается амакриновым и ганглиозным клеткам. Как только ганглиозная клетка активируется, ее аксон передает сообщение в мозг.

Фотопигмент родопсин состоит из двух частей: мембранного белка, называемого опсином, и хромофора. Опсин образует длинную спираль, которая проходит по двухслойной мембране туда и обратно семь раз; хромофор - это молекула, которая на самом деле поглощает фотон и содержится в зацикленном белке. 11-цис-ретиналь - это хромофор, присутствующий во всех фоторецепторах; это производное витамина А. Белок опсин, состоящий из семи петель, определяет длину волны, поглощаемую фоторецептором. Фотопигмент в палочках расположен в мембранах диска, а его белок - родопсин. В колбочках фотопигмент расположен по всей сплошной плазматической мембране, глубокие впячивания которой образуют диски колбочек. Белок опсина в клетках L-колбочек чувствителен к красному цвету, а в М-колбочках чувствителен к зеленому. Структура этих двух фотопигментов отличается только несколькими аминокислотами, и гены для них расположены в тандемной матрице на Х-хромосоме. Чувствительные к синему S-колбочки (составляющие всего от 5 до 10% совокупности колбочек) структурно отличаются.

Фоторецептор находится в деполяризованном состоянии, когда он не стимулируется светом. Как обычно делают нейроны в деполяризованном состоянии, фоторецептор секретирует свой нейротрансмиттер. Во время деполяризации управляемые напряжением Ca^{2+} каналы открыты, и ионы кальция облегчают процесс, посредством которого пузырьки, содержащие глутамат, сливаются с клеточной мембраной, обеспечивая высвобождение нейротрансмиттера в синаптическую щель. Таким образом, в темноте синаптическая терминаль фоторецептора непрерывно высвобождает глутамат. Деполяризованное состояние возникает из-за ионной цепи внутри фоторецептора. Внешний сегмент фоторецептора проницаем для Na^{+}; цГМФ-

управляемые катионные каналы в мембране наружного сегмента остаются открытыми из-за высокой концентрации цитоплазматического цГМФ. Na^+ перемещается во внешний сегмент, через открытые каналы, и ионы легко переходят во внутренний сегмент через соединительный поясок (connective cilium), где Na^+ выдавливается с помощью Na^+ / K^+ -АТФазных насосов. Эта цепь (вызванная движением Na^+ во внешний сегмент и выход из внутреннего сегмента) называется темновым током. В этом состоянии фоторецептор деполяризован с мембранным потенциалом приблизительно -40 мВ. Подробнее на рис.2.

Фотоизомеризация включает превращение 11-цис-ретиналя в полностью транс-ретиналь. Это изменение вызывает спонтанные конформационные изменения в опсине, при этом активный промежуточный продукт, метародопсин II, формируется в течение примерно 1 мс. Метародопсин II затем активирует трансдуцин, гетеротримерный G-белок (GT, состоящий из α, β и γ-субъединиц), вызывая замену гуанозинтрифосфата (ГТФ) ГДФ на α-субъединицу ГТα; диссоциация ГТα · ГТФ от ГТβγ GTα ГТФ, в свою очередь, стимулирует цГМФ-фосфодиэстеразу (цГМФ-ФДЭ) для усиления гидролиза цГМФ (Островский М.А., Каламкаров Г.Р., 2002). Этот фермент состоит из двух каталитических субъединиц (ФДЭαβ в палочках или двух копий ФДЭαs в колбочках) и двух ингибирующих субъединиц (две копии ФДЭγs в палочках и в колбочках). ГТα ГТФ действует, связываясь с ингибирующей субъединицей и устраняя ее ингибирующее влияние на каталитическую субъединицу. Результирующее увеличение активности ФДЭ снижает цитоплазматический уровень цГМФ, и поэтому катионные каналы (CNG), которые функционируют в ответ на связывание циклических нуклеотидов, закрываются. Это закрытие катионных каналов вызывает гиперполяризацию мембраны в качестве светового отклика и уменьшает высвобождение глутамата из синаптической терминали клетки. Высокая амплификация фототрансдукции в палочках, которая позволяет этим клеткам сигнализировать одиночные поглощенные фотоны, частично объясняется тем фактом, что каждая молекула родопсина имеет длительное активное время жизни в состоянии метародопсина II до наступления инактивации, чтобы он мог последовательно активировать значительное количество молекул трансдуцина.

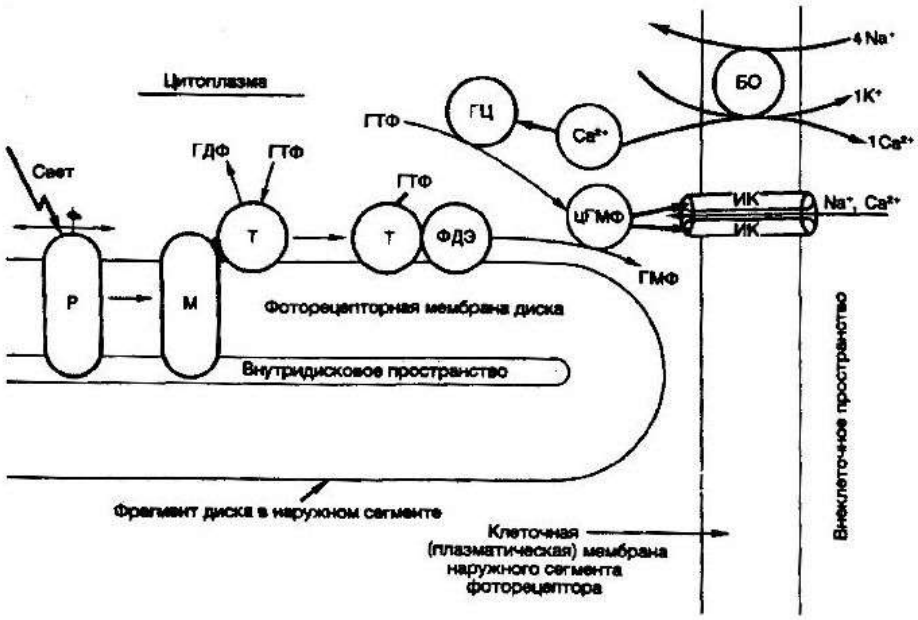


Рис.2. Нормальная физиология зрения. Цикл передачи зрительного сигнала (фототрансдукции). Рисунок взят из Островский М.А., Каламкаров Г.Р., 2002.

БО – белковый обменник. ИК – ионный канал. ГЦ – гунилтциклаза, ФДЭ – фосфодиэстераза, ГТФ – гуанозинтрифосфат, ГДФ – гуанозиндифосфат, цГМФ – циклический гуанозинтрифосфат. Т – трансдуцин. Р – родопсин. М – метародопсин II.

Прекращение фототрансдукции включает фосфорилирование метародопсина II специфической киназой (пигментная киназа, член семейства связанных с G-белком рецепторной киназы или GRK) с последующим связыванием белка, называемого аррестином, для ограничения активности Мета II. В то же время ГТα ГТФ самодеактивируется своей внутренней активностью ГТФазы, которая гидролизует связанный ГТФ до ГДФ и, следовательно, возвращается в неактивное состояние ГТα ГДФ, чтобы снова быть готовым к активации после повторной ассоциации с GTβγ. ГТФазная активность ГТα · ГТФ усиливается ФДЭγ, ее субстратом, вместе с комплексом ГТФаза-активирующего белка (ГАБ), который состоит из RGS9 (регулятор G-белка, изоформа 9) и Gβ5, другого G-белка β -субъединица или G-белок β-субъединица-подобный белок (Островский М.А., Каламкаров Г.Р., 2002). Когда трансдуцин дезактивируется, то и ФДЭ восстанавливает ингибирующую активность ФДЭγ. Затем концентрация свободного цГМФ возвращается к темновому уровню из-за продолжающейся активности цГМФ-синтезирующего фермента гуанилатциклазы.

Итак, в темноте происходит устойчивый синтез и гидролиз цГМФ, и легкая вспышка просто временно нарушает равновесие в сторону гидролиза. Метародопсин II в конечном итоге распадается до изначально неактивного состояния. Затем пигмент распадается на опсин и освобождает весь транс-ретиналь, процесс, называемый «засветом». Опсин также теряет свой

связанный аррестин и дефосфорилируется общей киназой (протеинфосфатазой 2А). Что касается полностью транс-ретиналя, то он сводится к полностью транс-ретинолу. Весь транс-ретинол диффундирует, благодаря белку-носителю, из фоторецептора в клетки пигментного эпителия, где он превращается в полностью транс-ретиниловый эфир, а затем повторно изомеризуется (ферментом изомерогидролазой RPE65) в 11-цис-ретинол и окисляется до 11-цис-ретиналя, затем возвращается в фоторецептор и самопроизвольно комбинируется с опсином для повторного образования голопигмента. Недавно стало известно, что клетки Мюллера также обладают автономным механизмом регенерации хромофоров, по-видимому, специально для колбочек (Островский М.А., Каламкаров Г.Р., 2002). Этот дополнительный механизм регенерации может быть важен в ярком свете, когда пигмент колбочки должен конкурировать с родопсином за 11-цис-ретиналь, но может не победить, потому что недиссоциируемый родопсин будет вытеснять конкурентный диссоциирующий пигмент колбочки, выступая в качестве огромной воронки для цис-ретиналя.

Ca^{2+} играет критическую роль в активной адаптации палочек или колбочек к свету. Поскольку катионные каналы, которые функционируют в ответ на связывание циклических нуклеотидов, т.е. CNG-каналы, проницаемы для Ca^{2+}, в темноте наблюдается постоянный приток Ca^{2+}, который уравновешивается постоянным оттоком Ca^{2+} через $Na^{+}/Ca^{2+}/K^{+}$ обменник, антипереносчик, который использует направленный внутрь электрохимический градиент Na^{+} и направленный наружу K^{+} электрохимический градиент для вытеснения Ca^{2+} против его направленного внутрь градиента. Как и катионные каналы CNG, этот обменник присутствует на плазматической мембране наружного сегмента фоторецепторов. На свету закрытие каналов циклических связанных катионных каналов CNG останавливает приток Ca^{2+}, но отток Ca^{2+} через обменник продолжается, что приводит к уменьшению концентрации свободного Ca^{2+} во внешнем сегменте. Это снижение Ca^{2+} вызывает многократную отрицательную обратную связь, чтобы регулировать фототрансдукцию, противодействуя воздействию света, таким образом вызывая активную адаптацию клетки к свету (Островский М.А., Каламкаров Г.Р., 2002).

Один путь отрицательной обратной связи действует на гуанилатциклазу, чтобы усилить ее активность. Активность гуанилатциклазы облегчается активирующими гуанилатциклазу белками (GCAP), которые, в свою очередь, контролируются Ca^{2+} тем, что они действуют хорошо, когда не связывают Ca^{2+}, и плохо, когда они связывают Ca^{2+}. Таким образом, в темноте активность гуанилатциклазы является лишь умеренной, поскольку высокий внутриклеточный свободный Ca^{2+} контролирует GCAP, тогда как на свету активность гуанилатциклазы усиливается, чтобы противостоять свету, поскольку GCAP более активны из-за более низкого свободного Ca^{2+}.

Другой путь, по-видимому, воздействует на пигментную киназу, которая фосфорилирует Мета II, чтобы погасить активность последнего через белок, связывающий Ca^{2+}, называемый рековерин (кодируемый геном *RCVRN*). Считается, что рековерин в Ca^{2+}-связанной форме ингибирует пигментную киназу. Таким образом, на свету, когда уровень Ca^{2+} относительно низок и рековерин теряет свою связь с Ca^{2+}, киназа быстро гасит метародопсин II, чтобы уменьшить амплификацию (Островский М.А., Каламкаров Г.Р., 2002).

Третий путь действует на циклические связанные катионные каналы CNG через кальмодулин, который в форме, связанной с Ca^{2+}, снижает сродство канала к цГМФ. Таким образом, в темноте Ca^{2+}-кальмодулин связывается с циклическим связанным катионным каналом CNG и снижает вероятность его открытия. На свету кальмодулин теряет свой связанный Ca^{2+} и диссоциирует от канала, в результате чего канал CNG с большей вероятностью открывается снова из-за его более высокой аффинности к цГМФ, что противодействует свету. Кальмодулин, активирующие гуанилатциклазу белки (GCAP) и рековерин – все эти белки имеют связывающие домены типа спираль-петля-спираль (helix-loop-helix), Ca^{2+}. Из трех Ca^{2+}-опосредованных регуляторных путей гуанилатциклазный является наиболее важным для низких и средних уровней освещенности, выше которых начинает действовать тот, который через рековерин, становится все более важным с еще более высокими уровнями освещенности. Регуляторный путь через катионные каналы CNG, которые функционируют в ответ на связывание циклических нуклеотидов, слабый и имеет минимальное значение (Островский М.А., Каламкаров Г.Р., 2002).

Колбочки имеют гораздо более низкую чувствительность к свету, и они также адаптируются к свету намного эффективнее, чем палочки. Механизмы, лежащие в основе этих различий палочек и колбочек в контексте общего процесса фототрансдукции, все еще остаются областью активных исследований. Большинство белков, участвующих в фототрансдукции, имеют четкие изоформы в палочках и колбочках, поэтому некоторые количественные различия в процессах между палочками и колбочками не удивительны. Кроме того, для палочек, поскольку они работают при очень низких уровнях освещенности, снижение их чувствительности из-за значительного засвета пигмента светом, как правило, не важно в их рабочем диапазоне интенсивностей света. Колбочки, с другой стороны, работают при ярком свете.

Таким образом, значительное засвечивание пигмента является распространенным явлением и резко влияет на чувствительность колбочек к свету на ярком фоне. Засвет пигмента не только снижает вероятность поглощения света, но также существенно уменьшает сигнал, генерируемый поглощенным фотоном, поскольку сам по себе опсин (т.е. засвеченный пигмент) обладает слабой активирующей активностью в отношении трансдуцина и запускает описанные пути отрицательной обратной связи.

84 гена и 7 генов-кандидатов описаны при несиндромальном ПР. Каждый из этих генов

кодирует белок, который играет роль в жизненно важных процессах в сетчатке и / или РПЭ (например, каскад фототрансдукции и зрительный цикл) или образует базовую структуру клетки (например, соединительную ресничку (connective cilium).

Следовательно, мутация в гене в пределах определенного метаболического пути может привести к тому, что часть каскада или весь каскад будет полностью нарушен. В принципе, следует ожидать определенной степени клинического совпадения среди подтипов ПР, которые вызваны мутациями в генах, связанных с общим метаболическим путем. На практике, однако, генетические варианты, которые модифицируют активность пути, могут увеличить клиническую и / или генетическую гетерогенность заболеваний, которые включают общий метаболический путь. Поэтому идентификация путей, вовлеченных при несиндромальном ПР, важна для понимания патогенеза и патофизиологии протекающих в клетке процессов. В этой главе приводится обзор основных физиологических метаболических путей, которые нарушаются при пигментном ретините, и обсуждены местоположение и функция генов / белков, участвующих в проявлениях ПР (Рис.3). В частности, мы фокусируемся на каскаде фототрансдукции (с участием 10 генов ПР), зрительном цикле (7 генов ПР), цилиарной структуре и транспорте (35 генов ПР) и межфотрецепторном матриксе (ген 1 ПР).

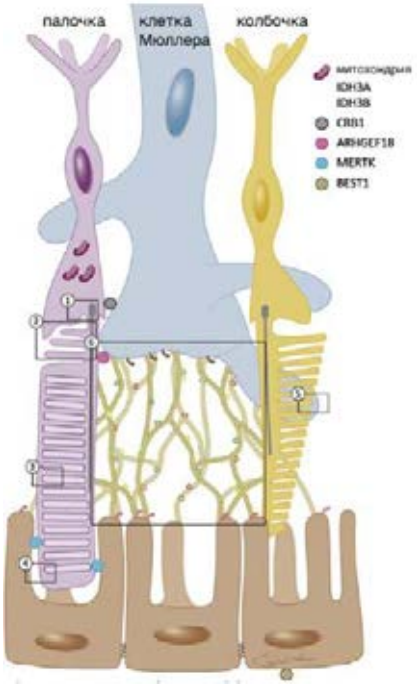


Рис.3. Схематическое отображение структуры и взаимодействия клеток сетчатки: фоторецепторы палочки, колбочки, на основе обзора Verbakel S.K. и соавт., 2018.

Коричневым указаны клетки пигментного эпителия сетчатки, синим Мюллеровы клетки, горчичным - структуры межфоторецепторного матрикса. Прямоугольные выделения с номером отражают области, которые более подробно отражены на следующих рисунках. BEST1, MERTK,

ARHGEF18, CRB1, IDH3A, IDH38.

1.1.2. Наружный сегмент фоторецептора в норме и при патологии

Ресничка фоторецепторной клетки состоит из соединительной реснички и наружного сегмента, который содержит узкоспециализированный отдел, состоящий из стопок внутриклеточных дисков (в клетках палочек) или пластин (в клетках колбочек) (Cohen, 1961; Sjostrand, 1953). Goldberg et al. недавно рассмотрел морфогенез и архитектуру внутриклеточных дисков (Goldberg et al., 2016). Некоторые подтипы несиндромального ПР связаны с белками, которые участвуют в развитии и / или ориентации дисков наружного сегмента фоторецепторов, и их гены обсуждаются ниже. Рис.4.

Диски наружного сегмента развиваются из соединительной реснички в виде инвагинаций в плазматической мембране, которые впоследствии интернализируются, образуя стопку внутриклеточных дисков (Ding et al., 2015). Микрофиламенты F-актина, расположенные в базальных аксонемных микротрубочках, необходимы для начала инвагинации нового диска (Goldberg et al., 2016). ПР-ассоциированный ген FSCN2 кодирует гомолог 2 сетчатки Fascin (*FSCN2*), который сшивает и связывает филаменты F-актина (Saishin et al., 2000; Tubb et al., 2000). Периферин-2 (*PRPH2*) играет роль в формировании обода диска наружного сегмента, а потеря PRPH2 приводит к отсутствию дисков наружного сегмента фоторецептора (Cohen, 1983; Goldberg et al., 2016).

Также было высказано предположение, что PRPH2 играет роль в стабильности или выпадении диска (Edrington et al., 2007; Goldberg et al., 2016). Недавно Salinas et al. сообщили, что ресничка фоторецептора может высвобождать большое количество эктосом (Salinas et al., 2017), аналогично процессу, недавно описанному для первичных ресничек, в котором рецепторы, связанные с G-белком, направляются во внеклеточную передачу сигналов через актин-опосредованный эктоцитоз (Nager et al., 2017). PRPH2 поддерживает этот процесс на соответствующем уровне, позволяя оставшимся эктосомам трансформироваться в диски наружных сегментов (Salinas et al., 2017). Образование PRPH2 регулируется белком мембранного белка-1 (ROM1) наружного сегмента палочки, тем самым регулируя процесс интернализации диска (Loewen and Molday, 2000). Инициирование образования диска наружного сегмента фоторецептора требует связанного с мембраной белка PROM-1 (ген *PROM1*), который локализуется на краю зарождающегося диска (Goldberg et al., 2016). PROM1 также, по-видимому, связывает диски внешнего сегмента, тем самым помогая стабилизировать стек (Fetter and Corless,

1987).

Связанный с кадгерином член семейства белков 21 (также известный как протокадгерин-21 и кодируемый геном *CDHR1*) также участвует в формировании края мембраны диска и, как полагают, функционирует совместно с PROM1, так как он также находится на зарождающемся краю диска (Yang et al. al., 2008). Фоторецептор-специфический цитоплазматический белок RP1 связан с цилиарной аксонемой и необходим для морфогенеза диска наружного сегмента фоторецептора (Liu et al., 2004). Таким образом, RP1 играет роль в ориентации диска наружного сегмента и предположительно служит связующим звеном между дисками наружного сегмента и аксонемой (Liu et al., 2003). Наконец, RP1 имеет синергетическое взаимодействие с RP1L1, белком, который имеет сходную схему локализации и также необходим для морфогенеза наружного сегмента фоторецепторов (Yamashita et al., 2009).

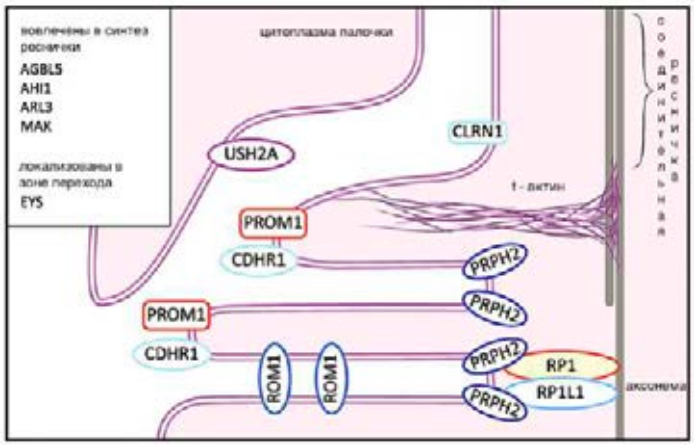


Рис.4. Схематичное отображение молекулярного окружения реснички. Более детальное изображение прямоугольной области с номером 2 (на рисунке 3), на основе обзора Verbakel S.K. и соавт., 2018.

1.1.3. Ресничный транспорт в фоторецепторах в норме и при патологии

Реснички представляют собой тонкие продольные ворсинки на основе микротрубочек, которые простираются от поверхности большинства клеток млекопитающих и различаются по форме и размеру в зависимости от типа клетки (Satir and Christensen, 2008). Реснички можно разделить на две основные категории: подвижные реснички и неподвижные (первичные) реснички. Подвижные реснички используются в определенных органах и процессах, которые требуют движения цилиарной жидкости; примеры включают установление лево-правой асимметрии внутренних органов у развивающегося эмбриона, очищение дыхательных путей от слизи и подвижность сперматозоидов.

Неподвижные реснички присутствуют в подавляющем большинстве неподвижных эукариотических клеток и служат сенсорными «антеннами» в большинстве сенсорных органов (Berbari et al., 2009; Singla and Reiter, 2006). Учитывая почти повсеместное присутствие ресничек по всему телу, мутации в генах, кодирующих ресничные белки, могут привести к так называемым цилиопатиям, которые часто включают синдромный фенотип с множественными пораженными органами и клеточными процессами (Hildebrandt et al., 2011; Reiter and Leroux, 2017).

Фоторецепторные клетки содержат высокоспециализированный наружный сегмент, состоящий из соединительной реснички и связанного базального тельца, а также апикального наружного сегмента, узкоспециализированной структуры, в которой происходит фототрансдукция (Roepman and Wolfrum, 2007). Поскольку во внешнем сегменте фоторецепторов отсутствует механизм биосинтеза, все его компоненты синтезируются и частично предварительно собираются во внутреннем сегменте клетки, а затем транспортируются во внешний сегмент через соединительную ресничку, процесс, облегчаемый внутрифлагеллярным транспортом (IFT). IFT также используется для сборки и поддержания ресничек (Bhogaraju et al., 2013a; Hao et al., 2011; Kozminski et al., 1993; Kubo et al., 2016; Ye et al., 2013).

К настоящему времени мутации в более чем 30 генах, кодирующих цилиарные белки, были связаны с несиндромальными заболеваниями сетчатки (Daiger et al., 2017; Estrada-Cuzcano et al., 2012b). Функции этих белков в соединительной ресничке были идентифицированы, и большинство этих белков вовлечены либо в функцию / регуляцию IFT, либо в цилиарную структуру.

IFT представляет собой двунаправленную транспортную систему, в которой используются двигательные молекулы на основе микротрубочек для транспортировки молекул как от основания ресничек к кончику (т.е. **антероградного** транспорта, который стимулируется кинезиновыми моторными белками), так и от кончика к основанию (т. е. **ретроградного** транспорта, который управляется моторными белками динеина) (Rosenbaum and Witman, 2002; Scholey, 2003; Wren et al., 2013). Эта транспортная система способна перемещать тысячи молекул в секунду в каждой фоторецепторной клетке, включая антероградный транспорт RHO и светозависимый транспорт аррестина и трансдуцина (Besharse et al., 1977; Sokolov et al., 2002; Strissel et al. al., 2006; Young, 1968).

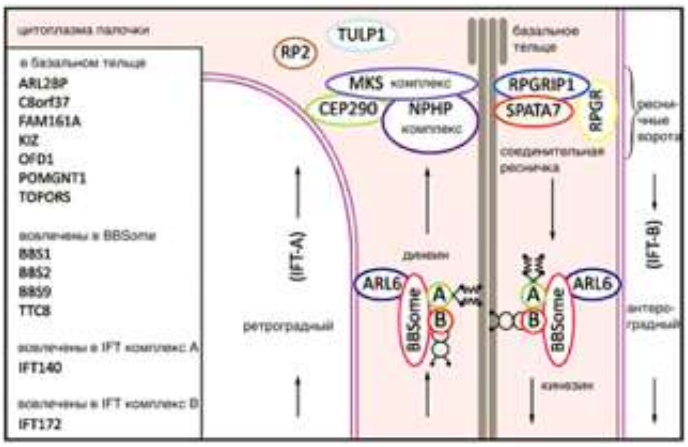


Рис.5. Схематичное отображение цилиарного транспорта. Более детальное изображение прямоугольной области с номером 1 (на рисунке 3), на основе обзора Verbakel S.K. и соавт., 2018.

Многие гены, связанные с несиндромальным ПР, кодируют белки, которые участвуют в различных аспектах цилиарного транспорта. Например, *ARL3* и *RP2* опосредуют локализацию двигательных единиц на кончике реснички (Schwarz et al., 2017). Кроме того, IFT опосредуется так называемыми IFT-белками (например, *IFT140* и *IFT172*), которые образуют два комплекса (комплекс A и комплекс B), которые связывают и транспортируют везикулы (Bhogaraju et al., 2013b; Taschner et al. 2012). Более того, комплекс BBSome (в котором BBS обозначает синдром Барде-Бидля) служит адаптером между «грузом» и комплексом IFT (Mourao et al., 2016; Nachury et al., 2007). Комплекс BBSome состоит из восьми белковых субъединиц (BBS1, -2, -4, -5, -7, -8 (TTC8), -9 и -18) (Mourao et al., 2016). Мутации в субъединицах BBSome обычно вызывают синдром Барде-Бидля (Mockel et al., 2011); однако четыре из генов, которые кодируют субъединицы BBSome (BBS1, BBS2, BBS9 и TTC8), а также ген, который кодирует ARL6 (белок, который рекрутирует комплекс BBSome на мембрану), связаны с несиндромальным ПР (Abu-Safieh et al., 2012; Estrada-Cuzcano et al., 2012a; Goyal et al., 2015; Jin et al., 2010; Mourao et al., 2014; Murphy et al., 2015; Pretorius et al. , 2011; Riazuddin и др., 2010; Shevach и др., 2015). Рис.5.

Транспорт молекул на «ресничковом двигателе» IFT регулируется «ресничковыми воротами», специализированной структурой, расположенной у основания первичной реснички; эта структура формирует общий барьер против диффузии частиц и, следовательно, регулирует транспорт в и из структурно изолированного внешнего сегмента (Christensen et al., 2007; Emmer et al., 2010; Goncalves and Pelletier, 2017; Leroux, 2007; Nachury et al. ., 2010; Розенбаум и Витман, 2002). Функция ворот опосредуется переходными волокнами и переходной зоной. Переходные волокна (также известные как дистальные отростки) прикрепляют ресничку к плазматической мембране, а переходная зона представляет собой модульную структуру, содержащую Y-образные линкеры, которые, как полагают, действуют как «молекулярное сито», чтобы ограничить и выбрать вход и выход цилиарных везикул.

Фоторецептор связывающая ресничка структурно и функционально аналогична прототипу переходной зоны. Тем не менее, удлиненная форма этой реснички, вероятно, необходима для достижения высокого уровня переноса при транспортировке биосинтетического материала, так как приблизительно 10% внешнего сегмента обновляется каждый день за счет потери и замены материалов на апикальном конце клетки (Young, 1967). Кроме того, комплекс с ресничными порами, который гомологичен комплексу с ядерными порами, функционирует в качестве активных молекул ворот в основании реснички (Takao and Verhey, 2016). Два взаимодействующих белковых модуля, а именно модули, связанные с синдромом Меккеля / Жубера (MKS / JBTS) и нефронофтиз (NPHP), собирают переходную зону и контролируют ее стробирующую функцию (Chih et al., 2011; Garcia-Gonzalo et al., 2011 Sang et al., 2011).

Эти модули состоят из нескольких белков, ассоциированных с цилиопатией, и взаимодействуют с соседними компонентами переходной зоны (например, комплексом BBSome) и комплексом, который содержит белок, кодируемый геном *RPGR*, который составляет 70-90% случаев Х-сцепленного ПР и 10-20% всех случаев ПР (Goncalves and Pelletier, 2017; Megaw et al., 2015). Белок RPGR прикрепляется к соединительной ресничке взаимодействующим с RPGR белком 1 (RPGRIP1), для локализации которого необходим другой белок соединительной реснички, белок 7, связанный со сперматогенезом (SPATA7). Дефекты в комплексе RPGR-RPGRIP1-SPATA7 приводят к нарушению локализации определенных опсинов; следовательно этот комплекс играет роль в транспорте специфических опсинов (Eblimit et al., 2015).

Подробный обзор взаимодействий между RPGR и другими белками в области соединительной реснички, такими как центросомальный белок 290 (*CEP290*), фосфодиэстераза 6D (*PDE6D*), нефроцистин 1 (*NPHP1*), нефроцистин 4 (NPHP4) и Whirlin (*WHRN*), описан Megaw и коллегами (Megaw et al., 2015).

1.1.4. Каскад зрительного сигнала в норме и при патологии

Фототрансдукция (передача зрительного сигнала) представляет собой каскад последовательных химических реакций, запускаемых возбуждением молекулы белка опсина фотоном, в результате чего электрический сигнал, который передается через зрительный нерв в зрительную зону коры головного мозга, приводит к восприятию изображения. Этот каскад в значительной степени похож между палочками и колбочками, с небольшими различиями из-за их различных функций в сумеречном и ярком свете.

В палочковых фоторецепторах находится белок родопсин (кодируемый геном *RHO*), который состоит из апопротеина опсина и хромофора 11-цис-ретиналя. После захвата фотона 11-цис-ретиналь превращается в полностью транс-ретинальный изомер, который меняет структуру родопсина на структуру фотоактивного метародопсина II (Wald, 1968). Метародопсин II активирует трансдуцин, который является G белком (кодируемым геном *GNAT1*), который затем активирует фосфодиэстеразу циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), которая состоит из четырех субъединиц, кодируемых генами *PDE6A* (две субъединицы), *PDE6B* (1 субъединица) и *PDE6G* (1 субъединица), которая гидролизует цГМФ с образованием 5'-ГМФ (Stryer, 1986). Этот процесс снижает концентрацию цГМФ в цитоплазме фоторецептора, которая закрывает катионные каналы с цГМФ, которые состоят из четырех белковых субъединиц, кодируемых генами *CNGA1* и *CNGB1* (по 2 субъединицы) в плазматической мембране. Это, в свою очередь, гиперполяризует плазматическую мембрану из-за большого снижения внутриклеточной концентрации кальция; эта гиперполяризация плазматической мембраны приводит к уменьшению выделения глутамата в синапсе фоторецептора.

Таким образом, изменение структуры любого из белков, участвующих в описываемом процессе, вследствие мутации (миссенс или стоп кодон или другая мутация, значительно затрагивающая строение или функцию активных сайтов белка) влияет на функцию клетки в целом и на возможность проводить процесс распознавания зрительного сигнала.

После фототрансдукции система возвращается в исходное состояние пре-фотоактивации с помощью следующих шагов: 1) фосфорилирование метародопсина II с помощью родопсинкиназы и последующее связывание аррестина (кодируемого геном *SAG*), который дезактивирует трансдуцин (Gurevich et al., 2008, Пальчевский, 1994); 2) диссоциация полностью транс-ретиналя от зрительного пигмента и превращение в 11-цис-ретиналь через зрительный ретиноидный цикл (см. ниже); 3) инактивация трансдуцина с помощью GTPазу-ускоряющих белков (в частности, RGS9), тем самым инактивируя фосфодиэстеразу (Krispel et al., 2006; Pugh, 2006); и 4) возвращение внутриклеточного цГМФ до нормальных уровней гуанилатциклазой (кодируемой геном *GUCY2D*), которая активируется белком, активирующим гуанилатциклазу (кодируемым генами *GUCA1A GUCA1B* и *GUCA1C*) (Haeseleer et al., 1999; Koch и Stryer, 1988). После того, как полностью транс-ретиналь отщепляется от опсина, 11-цис-ретиналь связывается с опсином с образованием родопсина, который затем отсоединяется от аррестина. Затем родопсин дефосфорилируется протеинфосфатазой 2A. Таким образом, в темноте родопсин находится преимущественно в нефосфорилированном состоянии. Рис.6.

Большинство молекул в каскаде фототрансдукции палочек имеют гомолог, который выполняет аналогичную функцию в клетках колбочек. Есть два принципиальных различия между палочками и колбочками в отношении фототрансдукции.

Во-первых, колбочковые клетки экспрессируют три разных опсина, каждый из которых специфичен, хотя и менее чувствителен, к определенной длине волны.

Во-вторых, опсины в клетках колбочек имеют более быструю кинетику, чем опсины палочек, и являются почти ненасыщенными. Хотя функциональные последствия этого различия в кинетике не совсем ясны, большинство исследований показывают, что более быстрая кинетика в колбочках приводит к более короткой фазе восстановления. Это может быть связано с более быстрым фосфорилированием активированных пигментов колбочек, более высокой скоростью диссоциации полностью транс-ретинального и / или с более быстрой кинетикой инактивации трансдуцина (Tachibanaki et al., 2005; Tachibanaki et al., 2001). Гидролиз трансдуцин-связанного ГТФ является реакцией, ограничивающей скорость в клетках палочек; однако, по сравнению с палочками, колбочки содержат в десять раз более высокие концентрации белкового комплекса, ускоряющего ГТФазу.

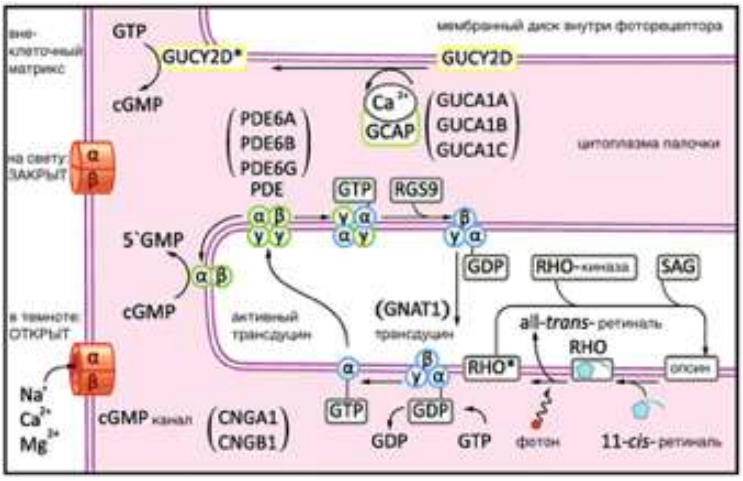


Рис.6. Каскад фототрансдукции, схематическое изображение. Более подробное отображение прямоугольной области, очерченной с номером (3) на рис.3. Подробности в тексте, на основе обзора Verbakel S.K. и соавт., 2018.

Производное витамина А 11-цис-ретиналь является важным компонентом в каскаде фототрансдукции. Поступающий в организм витамин А (полностью транс-ретинол) всасывается из крови, поступает в РПЭ и превращается в 11-цис-ретиналь. Зрительный цикл представляет собой сложный процесс, который фокусируется на регенерации 11-цис-ретиналя из полностью транс-ретиналя, образующегося в каскаде фототрансдукции и происходит одновременно с фототрансдукцией.

После фотоактивации весь транс-ретиналь высвобождается из активированного зрительного пигмента в просвет дисков наружного сегмента, где он вступает в реакцию с фосфатидилэтаноламином с образованием N-ретинилиденфосфатидилэтаноламина (Liu et al., 2000). Благодаря флиппазной активности белка ABC (АТФ-связывающей кассеты) транспортера

ABCR (кодируемого геном *ABCA4*) весь транс-ретиналь высвобождается в цитоплазму фоторецептора, где он восстанавливается до полностью транс-ретинола ферментом полностью транс-ретинальная дегидрогеназа (кодируется генами *RDH8*, *RDH12* и *RDH14*) (Haeseleer et al., 1998; Rattner et al., 2000).

Весь транс-ретинол затем транспортируется в субретинальное пространство, где он связывается с межфторецепторным ретиноид-связывающим белком (IRBP, кодируемый геном *RBP3*) и транспортируется в РПЭ (Gonzalez-Fernandez, 2002). В цитоплазме клетки РПЭ весь транс-ретинол связывается с клеточным ретинол-связывающим белком (кодируемым геном *CRBP1*) и повторно изомеризуется с помощью каскада, включающего лецитин-ретинолацилтрансферазу (*LRAT*). *RPE65* (также известный как ретиноид изомерогидролаза), ретинальный рецептор, связанный с белком G (RGR) и 11-цис-ретинолдегидрогеназа (кодируемая генами *RDH5* и *RDH11*) (Deigner et al., 1989; Moiseyev et al., 2005; Saari and Bredberg, 1989; Saari et al., 2001; Trehan et al., 1990). Полученный 11-цис-ретиналь затем транспортируется в межфотрецепторный матрикс клеточным ретинальдегид-связывающим белком (CRALBP, кодируемый геном *RLBP1*) и затем транспортируется обратно в цитоплазму фоторецептора посредством IRBP. Вернувшись в фоторецептор, 11-цис-ретиналь связывается с опсином с образованием новой молекулы родопсина. Этот путь, известный как канонический зрительный цикл (рис. 7), катализирует ре-изомеризацию сетчатки в клетках палочек.

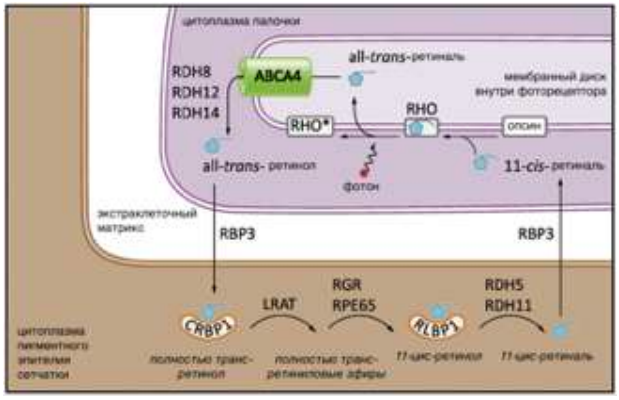


Рис.7 Канонический зрительный цикл в палочках, более детальное изображение прямоугольной области с номером 4 (на рисунке 3), на основе обзора Verbakel S.K. и соавт., 2018.

Недавние исследования показали, что в дополнение к вышеупомянутому зрительному циклу у колбочек также есть второй, неканонический зрительный цикл, который действует в наружных сегментах колбочек и клетках Мюллера (рис. 8); этот цикл регенерирует 11-цис-ретиналь с 20-кратной скоростью (Mata et al., 2002; Tang et al., 2013), хотя все белки в этом цикле еще не идентифицированы.

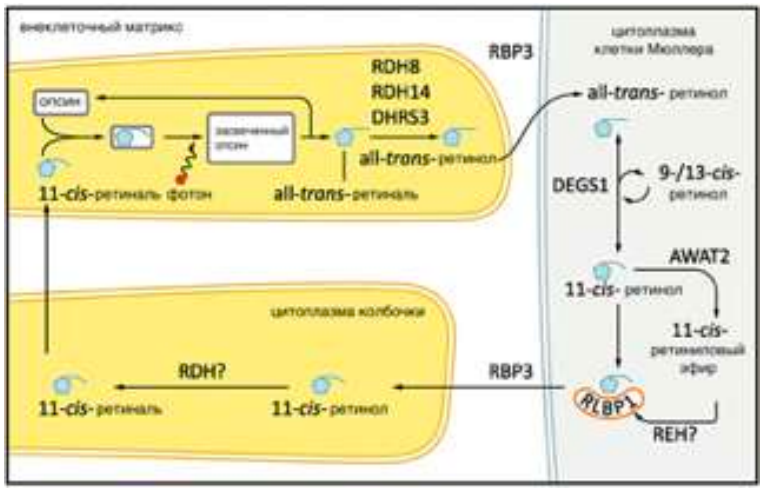


Рис.8. Неканонический зрительный цикл в колбочках, более детальное изображение прямоугольной области с номером 5 (на рисунке 3), на основе обзора Verbakel S.K. и соавт., 2018.

Этот цикл запускается, когда колбочко-специфический опсин фотообесцвечивается и высвобождает весь транс-ретиналь в цитоплазму клетки, где он затем восстанавливается до полностью транс-ретинола ретинолдегидрогеназой (кодируемой генами *RDH8* и *RDH14*) и колбочко-специфический фермент retSDR1 (кодируемый геном *DHRS3*) (Sahu and Maeda, 2016). Весь транс-ретинол затем связывается с IRBP и транспортируется в клетки Мюллера, где дигидроцерамид-десатураза-1 (DES1, кодируемая геном *DEGS1*) катализирует прямую изомеризацию всего транс-ретинола с образованием 11-цис-ретинола, а также как 9-цис-ретинол и 13-цис-ретинол (Kaylor et al., 2013; Tang et al., 2013). Поскольку реакция изомеризации, катализируемая DES1, является обратимой (Kaylor et al., 2013), вновь образованный 11-цис-ретинол подвержен повторной изомеризации.

Клетка использует два механизма, чтобы уменьшить эту восприимчивость к повторной изомеризации. Во-первых, 11-цис-ретинол может быть этерифицирован многофункциональной О-ацилтрансферазой (MFAT, кодируемой геном *AWAT2*) с образованием 11-цис-ретинилового эфира, и, во-вторых, вновь образованный 11-цис-ретинол может быть захвачен CRALBP (Kaylor et al., 2014). В настоящее время неопределенная гидролаза сложного эфира 11-цис-ретинола (обозначена как REH со знаком вопроса) гидролизует сложный эфир 11-цис-ретинила с образованием 11-цис-ретинола; это происходит только тогда, когда доступен CRALBP для связывания 11-цис-ретинола и предотвращения повторной изомеризации с помощью DES1 (Stecher et al., 1999). При связывании с CRALBP 11-цис-ретинол высвобождается в межфоторецепторный матрикс, где он связывает IRBP и захватывается наружным сегментом колбочки (Saari et al., 2009). Там неизвестный RDH (обозначенный рисунке 7 «RDH?») окисляет 11-цис-ретинол с образованием 11-цис-ретиналя, который затем связывается с опсином, образуя новую молекулу пигмента. Эта конечная реакция окисления может происходить в наружных сегментах колбочек, но не в наружных сегментах палочек (Tang et al., 2013), таким образом,

неканонический зрительный цикл специфичен для клеток колбочек.

1.1.5. Межфоторецепторное пространство в норме и при патологии

Межфоторецепторное пространство или матрикс, (также употребляется термин интерфоторецепторный матрикс) заполняет субретинальное пространство, которое простирается от наружной пограничной мембраны, заполнено межфоторецепторным матриксом. Внутренний и внешний сегменты фоторецепторных клеток также встроены в это пространство (Hollyfield, 1999). В течение многих лет считалось, что межфоторецепторный матрикс просто обеспечивает поддержку ткани сетчатки без каких-либо других важных функций.

Однако теперь известно, что межфоторецепторный матрикс играет важную роль во многих ключевых процессах, включая: 1) метаболизм сетчатки и ретиноидов; 2) адгезии сетчатки к РПЭ (Hageman et al., 1995; Lazarus и Hageman, 1992; Marmor et al., 1994; Yao et al., 1994); 3) межклеточной коммуникации с точки зрения выделения наружного сегмента и фагоцитоза с помощью РПЭ; 4) в матричном метаболизме; 5) в выравнивании и пространственной ориентации фоторецепторов; 6) синтезе ростовых факторов (Hageman and Johnson, 1991) и 7) регуляции транспорта кислорода и питательных веществ к фоторецепторным клеткам (Ishikawa et al., 2015; Rhodes and Simons, 2007). Кроме того, этот межклеточный матрикс может также играть ключевую роль в образовании клинической картины прогрессирующей дегенерации сетчатки (Al-Ubaidi et al., 2013).

Межфоторецепторный матрикс состоит из белков и углеводов, которые секретируются фоторецепторами и клетками РПЭ (Kanan et al., 2009). Основными компонентами этого матрикса являются протеогликаны, гиалуроновая кислота, волокна коллагена, эластина и другие белки, такие как фибронектин, фибриллин, ламинины и фибулины. Полимеры гиалуроновой кислоты образуют очень большие (100–10000 кДа) полисахариды, которые соединяются, образуя трехмерную ячеистую сеть (Hollyfield, 1999). Эта сеть связана с клетками Мюллера через CD44 и с РПЭ через белки, содержащие участки связывания типа RHAMM (рецептор подвижности, опосредуемой гиалуроновой кислотой).

Кроме того, другие компоненты внеклеточного матрикса, такие как SPACR, SPACRCAN, фактор, полученный из пигментного эпителия (PEDF), и IRBP, также содержат RHAMM-связывающие мотивы и также связаны с сетью гиалуроновой кислоты (Hollyfield, 1999; Inatani and Tanihara, 2002).

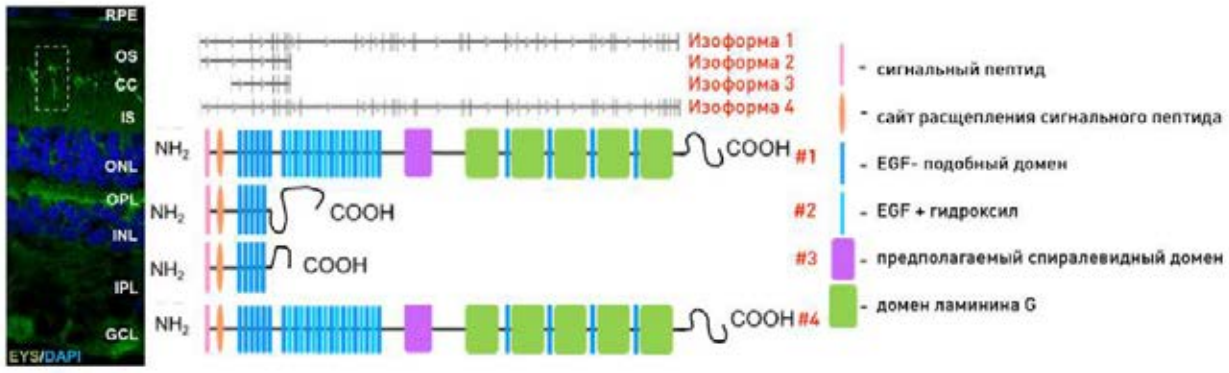
Три гена (*IMPG2, RBP3* и *EYS*), связанные с несиндромальным ПР, кодируют белки,

которые связываются с сетью гиалуроновой кислоты (Abd El-Aziz et al., 2008; Bandah-Rozenfeld et al., 2010a; Collin et al., 2008; den Hollander et al., 2009; Littink et al., 2010; Valverde et al., 1998; van Huet et al., 2014).

SPACRCAN (кодируется геном *IMPG2*) представляет собой протеогликан, который связывает как гиалуроновую кислоту, так и сульфат хондроитина и играет несколько функциональных ролей, включая организацию межфоторецепторного матрикса и регулирование роста и поддержания наружного сегмента фоторецептора (Acharya et al., 2000; Foletta и др., 2001). См. Рис. 10.

IRBP (кодируемый геном *RBP3*) является основным растворимым белком в межфоторецепторном матриксе и, как обсуждалось выше, играет роль в зрительном цикле (см. Раздел 4.2). У человека ген *EYS* кодирует человеческий ортолог белка закрытых глаз Drosophila и является одним из самых больших генов, экспрессируемых в сетчатке (помимо гена *USH2A*). Полученный белок содержит несколько сайтов для присоединения гликозаминогликанов боковых цепей; у дрозофилы этот белок является внеклеточным белком (Husain et al., 2006; Zelhof et al., 2006). Высокая степень гомологии между ортологами человека и дрозофилы предполагает, что человеческий белок также функционирует во внеклеточном матриксе.

У людей, однако, этот белок, который имеет четыре изоформы (Alfano et al., 2016), может локализоваться в субклеточных отсеках в цитоплазме и в аксонеме соединительной реснички. Более того, удаление экспрессии *EYS* у рыбок данио вызывает неправильную локализацию белков наружного сегмента фоторецепторов, что указывает на функциональную роль также в цилиарном транспорте (Lu et al., 2017). Кроме того, посттрансляционные модификации этого белка могут позволить ему нацеливаться на определенные места (Alfano et al., 2016) и проявлять большую аффинность.



А Б

Рис. 9. А. Локализация белка EYS в фоторецепторах – наиболее яркая (зеленая) флуоресценция белка EYS (указана пунктирным прямоугольником) отмечается в области соединительной реснички (CC – connective cilium) между внутренним (IS – inner segment) и наружным сегментом (OS outer segment) фоторецепторов, RPE – retinal pigment epithelium, ONL

– outer nuclear layer, OPL – outer plexiform layer, INL – inner nuclear layer, IPL – inner plexiform layer, GCL – ganglion cell layer. DAPI – синий краситель для ядер клеток. Рисунок составлен на основе**. Б.** Изоформы белка EYS. Рисунок приведен с изменениями из работ Alfano G и соавт., 2016.

Мутации в EYS составляют ~ 5-35% случаев аутосомно-рецессивного пигментного ретинита в Европе и Азии, но также были описаны у некоторых пациентов с аутосомно-рецессивной дистрофией колбочек (CRD). Существует по меньшей мере четыре изоформы белка EYS, каждая из которых экспрессируется в сетчатке человека. (*Рис.9*) Ген гомолога «закрытых глаз» (EYS от *англ. eyes shut*; OMIM: 612424), расположен на хромосоме 6p12, весит около 2 Мб и состоит из 44 экзонов, которые вместе кодируют белок, который, является самым большим специфичным для глаза геном, идентифицированным до настоящего времени. Белок, кодируемый геном EYS, представляет собой белок из 3165 аминокислот, который содержит 5 G-подобных доменов ламинина и 27 доменов, подобных эпидермальному фактору роста (EGF) (Рис 9).

Белок RP1 содержит мотивы, связывающие гиалуроновую кислоту, и может взаимодействовать с каркасом гиалуроновой кислоты, если он связывается с плазматической мембраной фоторецептора (Hollyfield, 1999).

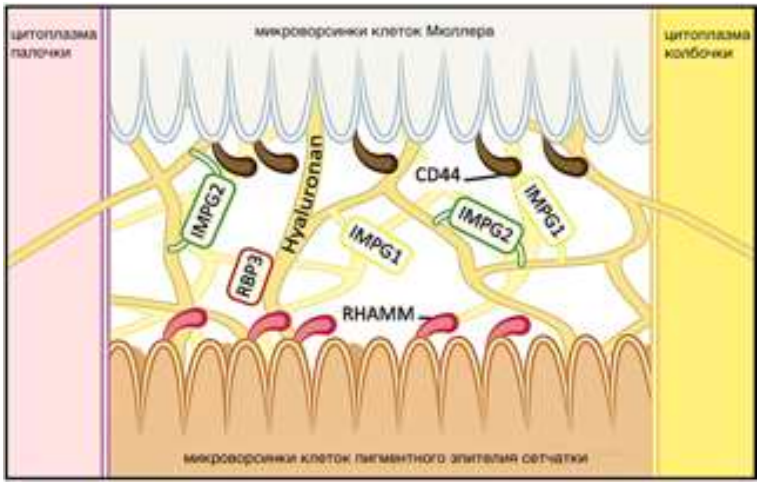


Рис.10. Схематичное отображение интерфоторецепторного матрикса. Более детальное изображение прямоугольной области с номером 6 (на рисунке 3), на основе обзора Verbakel S.K. и соавт., 2018.

Ген RS1 кодирует белок ретиношизин, который экспрессируется в фоторецепторах сетчатки и биполярных клетках, выделяется в межфоторецепторное пространство и играет роль в организации архитектуры и функции сетчатки. Мутации в гене RS1 вызывают Х-сцепленный

ювенильный ретиношизис (XLRS), который является одной из форм моногенных заболеваний сетчатки.

Х-сцепленный ювенильный ретиношизис может редко проявляться в младенчестве, в таком случае наблюдается врожденный нистагм, но чаще заболевание манифестирует в детстве с легкой потерей центрального зрения. Дальнозоркость встречается часто. Острота центрального зрения может снизиться до 0,2, но у пациентов наблюдается значительная вариабельность. Острота зрения может оставаться относительно стабильной до зрелого возраста, но, как было показано, с возрастом она снижается. Прогноз может быть хорошим до тех пор, пока не произойдет отслойка сетчатки и кровоизлияние в стекловидное тело. Заболевание обычно поражает оба глаза симметрично, если только осложнения заболевания (кровоизлияние в стекловидное тело или отслоение сетчатки) резко не ухудшают зрение на один глаз. Фундоскопия обычно выявляет фовеальный шизис, который представляет собой характерный узор фовеальных кист в макуле в виде «спиц-колеса». На более поздних стадиях заболевания макулярные находки могут прогрессировать до атрофии. Периферические аномалии сетчатки включают двухсторонние шизисные полости (обычно нижневисочные), «вуали стекловидного тела», закрытие сосудов, внутренний блеск сетчатки и пигментную ретинопатию, наблюдаются примерно в 50% случаев.

Оптическая когерентная томография (ОКТ) является наиболее полезным методом тестирования для диагностики и выявляет кистоидные изменения во внутренней сетчатке, которые со временем могут увеличиваться и уменьшаться. Слой нервных волокон сетчатки у некоторых пациентов может быть тоньше, чем в норме. У пожилых пациентов может не наблюдаться ретиношизис на ОКТ, но у них может быть уменьшена толщина центральной зоны сетчатки. Ганцфельд ЭРГ может выявить отрицательную ЭРГ, при которой отношение b-волны к а-волнам меньше 1 для скотопической b-волны, или может показать длительную латентность фликера колбочек, в то время как мультифокальная ЭРГ (mfERG) иллюстрирует области дисфункции колбочек Однако несколько исследований показали, что ЭРГ может быть нормальной, особенно на ранней стадии заболевания.. Периметрия обычно показывает потерю центрального поля зрения. Около 5% случаев XLRS осложняются кровоизлиянием в стекловидное тело и отслоением сетчатки, и о них сообщается уже на первом году жизни. Также сообщалось о макулярных отверстиях.

1.2.Осложнения моногенных заболеваний сетчатки и коморбидность

Часто моногенные заболевания сетчатки сочетаются с другими глазными заболеваниями, которые являются следствием нарушения тех же физиологических метаболических путей, происходящих в органе зрения, либо являются независимыми сопутствующими заболеваниями, в некоторых случаях провести исследование взаимосвязей затруднительно.

1.2.1. Аномалии рефракции. Как близорукость, так и дальнозоркость - особенно высокая степень близорукости (отношение шансов 10,1) и высокая степень дальнозоркости (отношение шансов 9,7) - более распространены у пациентов с ПР по сравнению с общей популяцией (Hendriks et al., 2017). Дальнозоркость типична для пациентов с ПР с мутациями в гене CRB1 (Talib et al., 2017), LRAT (den Hollander et al., 2007) или NR2E3 (Bandah et al., 2009). Интересно, что гиперметропия часто связана с амаврозом Лебера, особенно среди пациентов с мутацией в гене GUCY2D, RPGRIP1, CRX или CEP290 (Hanein et al., 2006). Близорукость связана с синдромом Ашера и следующими пятью генетическими подтипами ПР: RP1, RBP3 и ZNF408 при аутосомно-рецессивном ПР, а также RPGR и RP2 при Х-сцепленном ПР (Arno et al., 2015; Avila-Fernandez et al., 2015; Chassine et al., 2015; Habibi et al., 2017; Hendriks et al., 2017; Krantz et al., 2010).

1.2.2. Кистоидный макулярный отек. Помимо аномалий рефракции, окулодигитального симптома и зачастую поискового нистагма, у пациентов с ПР также могут наблюдаться макулярные осложнения, которые включают наиболее распространенное и рефрактерное к лечению – кистоидный макулярный отек (КМО или CME в англоязычной литературе), макулярное отверстие и образование эпиретинальной мембраны. Сообщалось, что кистоидный макулярный отек встречается приблизительно у 30% пациентов с ПР (Strong et al., 2017). Хотя этиология остается неизвестной, Strong et al. недавно было предложено несколько механизмов, которые могут способствовать формированию кистоидного макулярного отека, в том числе:

1) разрушение барьера между кровью и сетчаткой,
2) нарушение функции механизма перекачивания РПЭ,
3) отек и дисфункция клеток Мюллера,
4) антитела к клеткам сетчатки и
5) тракции стекловидного тела (Strong et al., 2017).

Кистоидный макулярный отек является распространенным явлением среди пациентов с ПР и

распространен во всех возрастных группах (Hajali et al., 2008). Сообщаемая распространенность среди пациентов с аутосомно-доминантной формой ПР относительно высока (Sandberg et al., 2008a; Testa et al., 2014), хотя это открытие не было широко подтверждено другими группами (Hajali et al., 2008; Liew et al., 2015; Makiyama et al., 2014). Относительно высокая распространенность КМО среди пациентов с ПР предполагает, что он не может быть специфичным для подтипа. Есть данные о комбинации КМО и клеток в стекловидном теле у детей с вариантами в гене CRB1 или RP1, а также у молодых людей с мутациями в гене PRPF31 или USH2A (Hettinga et al., 2016; Murro et al. , 2017). Эта комбинация клинических результатов может привести к неправильному диагнозу промежуточного увеита (!), особенно у детей с ПР, у которых аномалии сетчатки едва различимы или вообще отсутствуют (Verhagen et al., 2016; Yoshida et al., 2013). Терапевтические тактики для лечения КМО у пациентов с ПР обсуждаются в разделе 7.3.

До 36% пациентов с ПР имеют **эпиретинальную мембрану (**Chebil et al., 2016; Fujiwara et al., 2016; Hagiwara et al., 2011; Testa et al., 2014; Triolo et al., 2013), которая может быть результатом идиопатической ретинальной пролиферации глиальных клеток (Szamier, 1981) или, как недавно было предположено, может происходить вторично по отношению к воспалительному процессу (Fujiwara et al., 2016). Понятие воспалительного компонента при ПР не является новым, о чем свидетельствует слово «ретинит» в названии, и обычно считается вторичным по отношению к гибели фоторецепторных клеток.

Однако недавние данные свидетельствуют о том, что воспалительные факторы способствуют дегенерации сетчатки благодаря их цитотоксическому действию на клетки, такие как фоторецепторы (Peng et al., 2014; Zhao et al., 2015).

1.2.3. Задняя субкапсулярная катаракта может значительно влиять на зрение и встречается примерно у 45% пациентов с ПР (Auffarth et al., 1997; Heckenlively, 1982; Pruett, 1983); визуально значимая катаракта может быть удалена даже при выраженной макулярной патологии. Основной механизм развития задней субкапсулярной катаракты в настоящее время неизвестен, хотя недавно была предложена возможная связь с воспалением (Fujiwara et al., 2017).

1.2.4. Аномалии стекловидного тела, которые возникают при ПР, - это наличие кист стекловидного тела, которые, как сообщалось, встречаются у 6% пациентов с ПР (Yoshida et al., 2015b). Кроме того, друзы диска зрительного нерва и / или друзы в толщине зрительного нерва были зарегистрированы у 9% из 262 пациентов с ПР (Grover et al., 1997), и в более поздних исследованиях удалось связать эти друзы со специфическими подтипами ПР (см. раздел 4.9). Также ПР является одним из наиболее распространенных заболеваний у пациентов с вторичными

вазопролиферативными опухолями сетчатки (Shields et al., 2013).

1.2.5. Сосудистые нарушения. Экссудативная ретинопатия, для которой характерны телеангиэктазия сетчатки, отложения липидов и экссудативная отслойка сетчатки, отмечается у 7-15% пациентов с ПР, ассоциированным с геном CRB1 (Aleman et al., 2011; Henderson et al., 2011 ; Mathijssen et al., 2017; Talib et al., 2017) и у одного пациента с мутацией в экзоне ORF15 в гене RPGR (Demirci et al., 2006). В отличие от болезни Коатса, которая обычно бывает односторонней, фенотип Коатса у пациентов с ПР часто бывает двусторонним (Khan et al., 1988). Однако не все члены семьи с ПР имеют фенотип болезни Коатса, что свидетельствует о наличии негенетических факторов (den Hollander et al., 2001). Также у некоторых пациентов сообщается о хориоидальной неоваскуляризации с клинической картиной ПР при мутациях в генах CRB1, IMPG2 или REEP6 (van den Born et al., 1994, van Huet et al., 2014).

Этиология, лежащая в основе истончения сосудов сетчатки при ПР, остается не до конца неясной. Первоначально этот клинический признак был объяснен снижением метаболической потребности после дегенерации ганглиозных клеток вследствие потери фоторецепторных клеток. Альтернативная гипотеза связывает потерю потребляющих кислород фоторецепторов с гипероксическим состоянием оставшейся внутренней сетчатки, что приводит к сужению сосудов и снижению кровотока в сосудах сетчатки (Grunwald et al., 1996; Padnick-Silver et al., 2006; Penn et al., 2000; Yu and Cringle, 2005). Кроме того, Li et al. обнаружили, что утолщение внеклеточного матрикса между сосудами сетчатки и мигрирующими клетками РПЭ вызывает сужение сосудов (Li et al., 1995). Наконец, Стоун и соавт. предположили, что потеря синаптического входа, вторичного по отношению к гибели фоторецепторных клеток – и, как следствие, снижение трофических факторов - вызывает снижение метаболизма внутренних слоев сетчатки, что может вызвать ремоделирование сосудов и последующее истончение сосудов (Stone et al., 1992).

С другой стороны, Cellini et al. обнаружили, что глазной кровоток был уменьшен больше, чем можно было бы ожидать из-за атрофии сетчатки, что поднимает вопрос о том, являются ли сосудистые изменения у пациентов с ПР просто вторичными по отношению к нейро-ретинальному ремоделированию, или же они играют более важную роль в развитии ПР (Cellini и др., 2010). Кроме того, была предложена роль вазоконстрикторного эндотелина-1, хотя у пациентов с ПР сообщалось как об увеличении, так и снижении уровней эндотелина-1 в плазме, что указывает на необходимость дальнейшего исследования (Cellini et al., 2010; Ohguro et al. al., 2010; Sorrentino et al., 2015; Strobbe et al., 2015). Учитывая, что большинство генов, связанных с развитием ПР, играют роль либо в комплексе фоторецептор-РПЭ, либо в межфоторецепторном пространстве (матриксе), вероятна вторичная причина этих сосудистых изменений.

1.2.6. Друзы диска зрительного нерва – обычное явление у пациентов с ПР, особенно у пациентов с мутациями в гене CRB1, у которых их распространенность приближается к 1 из 3 пациентов (Mathijssen et al., 2017; Talib et al., 2017). Специфический рефлекс глазного дна представляет собой желто-золотой блеск, сходный с феноменом Мидзуо-Накамуры, наблюдаемым при болезни Огуши, хотя этот блеск обычно не исчезает после адаптации к темноте. Этот рефлекс лучше всего визуализировать с использованием отражения без красного или ближнего инфракрасного излучения (Acton et al., 2013). Первоначально эта находка считалась патогномоничной для женщин-носителей *RPGR*-ассоциированного ПР, однако, это также сообщалось у женщин-носителей Х-сцепленного RP2 (Flaxel et al., 1999). Помимо хорошо известного гипераутофлуоресцентного кольца, в некоторых генетических подтипах сообщалось о других характеристиках аутофлуоресценции. Например, мутации в гене RPE65 или LRAT, которые оба участвуют в зрительном цикле, могут привести к снижению или даже отсутствию сигнала при визуализации на аутофлуоресценции сетчатки (Dev Borman et al., 2012; Lorenz и др., 2004). Наличие двух-трех гипераутофлуоресцентных колец было связано с мутациями в гене NR2E3 (Coppieters et al., 2007; Escher et al., 2012).

1.2.7. Пигментные и другие аномалии. *Периферическая пигментация сетчатки.* В дополнение к типичной пигментации в виде костных телец (спикул), которая возникает на средней периферии сетчатки и имеет явное сродство к периваскулярной области, также были описаны и другие формы и локализации пигментации. Круглые скопления пигмента часто встречаются у пациентов с мутациями в генах ARHGEF18 (Arno et al., 2017), GNAT1 (Carrigan et al., 2016), NR2E3 (Bandah et al., 2009) или NRL (Bessant et al., 2003). При ПР, ассоциированном с геном BEST1, эта пигментация обычно расположена на самой внешней периферии сетчатки (Davidson et al., 2009). *Параартериолярное отсутствие пигментации* является признаком ПР у пациентов с мутациями в генах CRB1 (Talib et al., 2017; van den Born et al., 1994), PRPF31 или RDH12 (Mackay et al., 2011). *Отсутствие гиперпигментации сетчатки*. Отсутствие или нехватка типичной гиперпигментации, связанной с ПР, известной как беспигментная форма пигментного ретинита, была описана в нескольких подтипах ПР, хотя это может быть связано с тем, что пигментация иногда отсутствует на ранних стадиях ПР (Pearlman et al., 1976). Отсутствие пигментации у пациентов с ПР старше 20 лет было зарегистрировано у пациентов с мутациями в RLBP1 (Bocquet et al., 2013; Hipp et al., 2015), RP1 (Ma et al., 2013), RPGRIP1 (Booij et al., 2005; Huang et al., 2017a) и USH2A (Chen et al., 2014). Важно отметить, что только пациент с RP1-ассоциированным ПР был старше 30 лет. Причина такого отсутствия гиперпигментации сетчатки неясна, хотя у некоторых пациентов с ПР причиной может быть миопическая дегенерация (Bandah-Rozenfeld et al., 2010b). Тем не менее, отсутствие пигментации не должно

использоваться для исключения диагноза ПР, особенно у молодых пациентов, хотя следует учитывать и другие нарушения. Минимальные пигментные изменения также были связаны с мутациями в генах BBS; однако, за исключением TTC8 (BBS8), это касается только синдромных случаев ПР (Deveault et al., 2011; Priya et al., 2016). *Пигментные аномалии в макуле*. В некоторых подтипах ПР центральные изменения РПЭ и макулярная атрофия происходят относительно рано (то есть раньше, чем можно было бы ожидать на основании степени сужения полей зрения). Эти подтипы связаны с более быстрым снижением остроты зрения (Flynn et al., 2001) и их трудно отличить от колбочковой дистрофии. Гены, связанные с ранней макулярной атрофией, являются причинами палочко-колбочковой дистрофии сетчатки. У пациентов с подтипом DHX38 (Ajmal et al., 2014) или IDH3A (Pierrache et al., 2017) макулярная атрофия часто называется макулярной псевдоколобомой. В отличие от потери пигментации вследствие атрофии РПЭ, отложения пигмента в макуле были описаны в подтипах ПР с ранним началом из-за мутаций в гене ABCA4 или RDH12 (Cremers et al., 1998; Schuster et al., 2007). В этих подтипах отложения пигмента простираются от периферии / средней периферии до макулярной области; в других подтипах макула обычно остается свободной от скопления пигмента.

Степень гиперпигментации может быть разной среди пациентов и не обязательно отражает тяжесть заболевания. Пигментация по типу костных телец состоит из клеток РПЭ, которые отделяются от мембраны Бруха после дегенерации фоторецепторов и мигрируют в интраретинальные периваскулярные участки, где они образуют отложения меланинового пигмента (Li et al., 1995). Эти костные тельца часто возникают на средней периферии, где концентрация фоторецепторов палочек самая высокая (Berson, 1993). Что именно вызывает миграцию РПЭ, неизвестно, учитывая высокий уровень взаимозависимости между хориокапиллярами, РПЭ и фоторецепторами. Однако миграция РПЭ может быть вызвана уменьшением расстояния между внутренними сосудами сетчатки и РПЭ из-за дегенерации фоторецепторов (Jaissle et al., 2010).

Прогрессирующая потеря полей зрения является характерным признаком ПР, часто она симметрична с двух сторон (Massof et al., 1979) и обычно начинается с изолированных скотом в средних периферических областях, которые постепенно сливаются, образуя частичную или полную кольцевую скотому. По мере прогрессирования заболевания эта кольцевая скотома распространяется как наружу (темпорально), так и медленнее внутрь (назально). Кроме кольцевых скотом были описаны и другие паттерны прогрессирования потери полей зрения, в том числе концентрическая потеря поля зрения без предшествующей кольцевой скотомы и потеря поля зрения от верхней части сетчатки к нижней части по дуговидной схеме (Grover et al., 1998). *Кинетическая периметрия* (см. раздел 2.1.1. Методы клинического обследования) лучше всего подходит для оценки потери периферического поля зрения; годовая скорость снижения для

V4e периметра Гольдмана колеблется в пределах 2-12% и варьируется среди геноспецифических подтипов (Berson et al., 2002; Hafler et al., 2016; Holopigian et al., 1996; Sandberg et al. ., 2007; Sandberg et al., 2008b; Talib et al., 2017). Прогрессирование потери центрального поля зрения обычно определяют с помощью статической периметрии. Относительно новым методом оценки центрального поля зрения является *микропериметрия*, которая использует точное отслеживание глаз на протяжении всего исследования и обеспечивает прямую корреляцию между структурой и функцией, предоставляя аннотированное изображение заднего полюса глаза.

1.3. Диагностика моногенных заболеваний сетчатки

Три клинических признака - наличие пигментации сетчатки на периферии по типу костных телец, истончение сосудов сетчатки и восковая бледность диска зрительного нерва – являются отличительными признаками ПР. На ранних стадиях ПР глазное дно может казаться нормальным, так как отложения пигмента в форме костных телец либо отсутствуют, либо редки, истончение сосудов минимально, а диск зрительного нерва нормальный на вид. До типичных нарушений ПР у некоторых пациентов могут присутствовать неспецифические нарушения, такие как нерегулярные рефлексы с внутренней пограничной мембраны (ILM), расширение фовеального рефлекса и дискретные локальные белесые поражения на уровне РПЭ. Не у всех пациентов с ПР развиваются типичные костные тельца; у некоторых развивается пылевидная пигментация, в то время как у других развивается монетообразная гиперпигментация.

Оценка возраста начала и скорости прогрессирования пигментного ретинита. В «классическом» представлении ПР трудности с темновой адаптацией начинаются в подростковом возрасте, а потеря зрения в средней периферической области становится очевидной в молодом возрасте. Тем не менее, возраст начала у пациентов с ПР варьируется в широких пределах; таким образом, у некоторых пациентов развивается симптоматическая потеря зрения в раннем детстве, в то время как другие могут оставаться относительно бессимптомными до середины взрослого возраста. Точный возраст начала часто трудно определить, так как многие пациенты, особенно дети, способны компенсировать периферическую потерю зрения. Кроме того, трудности с темновой адаптацией могут оставаться незамеченными пациентом из-за нашей искусственно освещенной ночной среды. В целом, подтипы ПР, проявляющиеся в раннем возрасте, имеют тенденцию прогрессировать быстрее. Кроме того, тяжесть заболевания коррелирует с менделевским наследованием заболевания. В целом, пациенты с Х-сцепленным ПР (5-15% пациентов с ПР) имеют более тяжелое течение заболевания по сравнению с

пациентами с аутосомно-рецессивным ПР (50-60% пациентов с ПР), тогда как пациенты с аутосомно-доминантной формой ПР (30-40% пациентов с РП) (Bunker et al., 1984; Novak-Lauŝ et al., 2002) имеют лучший долгосрочный прогноз в отношении сохранения центрального зрения (Grover et al., 1996; Hamel, 2006).

Семейный анамнез. Тщательный семейный анамнез очень важен для любого пациента с подозрением на ПР, и мы рекомендуем составить родословную для каждого пробанда. Родословная полезна несколькими способами, она помогает оценить тип наследования, что может также иметь диагностические последствия. Например, если предполагается Х-сцепленное наследование, ген RPGR может быть секвенирован до полного секвенирования экзома. Родословная может также проиллюстрировать, какие члены семьи подвержены риску развития ПР, и / или указать субъектов, у которых следует подозревать неполную пенетрантность заболевания, например, когда участвуют мутации в PRPF31 и HK1.

Установление возраста начала заболевания. В большинстве случаев ПР проявляется в подростковом возрасте, однако возраст начала для ПР варьирует в широких пределах. Ранние формы ПР и амавроза Лебера имеют много общих причинных генов, эти общие гены - за исключением генов CWC27, IMPDH1 и CRX - все они связаны с началом ПР в возрасте до пяти лет. ПР, связанный с HGSNAT, может проявляться как на ранних, так и на более поздних этапах жизни, начиная от 10 лет до пятого десятилетия. Этот широкий диапазон обусловлен, вероятно, большим генетическим модифицирующим эффектом. В дополнение к HGSNAT, два других гена пигментного ретинита - CRX и RBP3 - также связаны с поздним началом ПР. У пациентов, у которых симптомы развиваются в более позднем возрасте, всегда следует учитывать возможный диагноз псевдоретинита (см. Табл. 5).

1.3.1. Методы клинического офтальмологического исследования

Оптическая когерентная томография (ОКТ). Самым ранним гистопатологическим изменением при ПР является укорочение наружных сегментов фоторецепторов (Milam et al., 1998). Это видно на снимках оптической когерентной томографии (SD-ОКТ) в виде дезорганизации внешних слоев сетчатки, сначала в зоне сосудистых аркад, затем в зоне эллипсоида и, наконец, в наружной пограничной мембране (Liu et al. , 2016). По мере развития ПР истончение наружных сегментов сопровождается уменьшением толщины внешнего ядерного слоя, в котором находятся ядра фоторецепторных клеток. Поздние стадии ПР характеризуются

полной потерей как внешнего сегмента, так и внешнего ядерного слоя фоторецепторов (Hood et al., 2011). Внутренние слои сетчатки, включая внутренний ядерный слой и слой ганглиозных клеток, в отличие от наружных, остаются относительно хорошо сохраненными. Фактически уменьшение толщины наружных сегментов фоторецепторов может даже сопровождаться утолщением внутренних слоев сетчатки; хотя основная причина этого утолщения не совсем ясна, это может быть связано с образованием отека в слое нервных волокон сетчатки и / или нейрональнo-глиальным ремоделированием сетчатки в ответ на истончение наружной сетчатки (Aleman et al., 2007). У пациентов с прогрессирующим заболеванием и атрофией наружных слоев сетчатки снимки SD-ОКТ могут визуализировать наружные сегменты фоторецепторов (Goldberg et al., 2013). Гиперрефлексивные очаги являются обычным явлением во внутреннем ядерном слое, внешнем ядерном слое и / или в субретинальном пространстве. Эти гиперрефлексивные очаги могут представлять собой мигрирующие клетки РПЭ и они коррелируют с состоянием слоя РПЭ, состоянием эллипсоидной зоны и, в некоторых случаях, с видимой гиперпигментацией глазного дна. Интересно, что отсутствие гиперрефлексивных очагов во внешнем ядерном слое было связано с более высокой остротой зрения (Kuroda et al., 2014). Несколько исследований также выявили корреляцию между остротой зрения у пациентов с ПР и состоянием линии зоны эллипсоида (Aizawa et al., 2009; Tamaki and Matsuo, 2011; Witkin et al., 2006). Кроме того, ширина линии зоны эллипсоида связана с уменьшением чувствительности поля зрения. Другое исследование обнаружило линейную корреляцию между уменьшением поля зрения и истончением наружных сегментов (Liu et al., 2016).

Проведение ОКТ также может быть полезно для диагностики других макулярных аномалий, присутствующих у половины пациентов с ПР (Makiyama et al., 2014). Например, кистоидный макулярный отек (КМО) является наиболее распространенной находкой, сопровождаемой образованием эпиретинальной мембраны, синдромом витреомакулярной тракции и макулярным отверстием (Liu et al., 2016). У пациентов с ПР с КМО кистоидные пространства обнаруживаются главным образом во внутреннем ядерном слое, но они также могут встречаться во внешнем ядерном слое, внешнем плексиформном слое и / или слое ганглиозных клеток (Makiyama et al., 2014).

Оценка цветового зрения – первоначально цветовое зрение может быть нормальным; однако дисхроматопсия - дефекты зрения сине-желтого спектра (чаще), когда пациенты в основном испытывают трудности в различении оттенков синего от зеленого и желто-зеленого от фиолетового, - может возникнуть на поздних стадиях заболевания. Эти так называемые приобретенные дефекты цветового зрения III типа (синий) встречаются чаще, чем дефекты цветового зрения I типа (красно-зеленый) (Pinckers et al., 1993). Дисфункция синих колбочек объясняется дефицитом этих коротковолновых колбочек в фовеа (Kolb, 1995). Из-за этого

неравномерного распределения потеря перицентральной функции сетчатки может привести к тританопии (сине-желтый дальтонизм). Потеря остроты зрения вместе с соответствующей дегенерацией центральных фоторецепторов увеличивает вероятность развития дефекта цвета I типа (Massof и др., 1979). С другой стороны, потеря остроты зрения из-за кистоидного макулярного отека, по-видимому, мало влияет на цветовое зрение (Pinckers et al., 1993).

Темновая адаптометрия. Нарушение порога темновой адаптации является отличительной чертой ПР. Порог световосприятия палочек часто повышается из-за снижения и длительного восстановления их чувствительности (Alexander and Fishman, 1984). Исследования темновой адаптации при ПР выявили увеличение порогов колбочек и палочек, задержку в достижении порога или полную потерю функции палочковых фоторецепторов (Mantyjarvi and Tuppurainen, 1994).

Фоторегистрация глазного дна. В одном снимке обычная фотография глазного дна охватывает поле зрения 30-50 градусов. Периферическая сетчатка обычно видна довольно плохо, даже при 7-полевой фотографии глазного дна. Обычная цветная фотография глазного дна может быть затруднена вследствие непрозрачности оптических сред и недостаточного расширения зрачка. Внимательное объяснение инструкций пациенту имеет большое значение. Лучшая альтернатива - ультраширокое изображение, которое использует конфокальную сканирующую лазерную офтальмоскопию (cSLO) с зеленым и красным лазерным светом. Сверхширокоугольная визуализация показывает до 200 градусов сетчатки за один снимок (Shoughy et al., 2015; Witmer and Kiss, 2013). Эта техника, однако, также имеет свои недостатки: цветопередача является неестественной, периферическое изображение искажается из-за двумерного изображения, и структуры, расположенные перед сетчаткой (например, ресницы или помутнения в стекловидном теле), могут вызывать артефакты (Witmer and Kiss, 2013). Многоцветная визуализация - это метод, который использует отражательную способность трех лазеров с определенной длиной волны, чтобы предоставить информацию о различных слоях сетчатки (Sergott, 2014). Возможное многоцветное изображение состоит из отражающих изображений от отдельных лазеров, и цветопередача также неестественна. У пациентов с ПР многоцветная визуализация лучше при определении границ неповрежденной макулярной области по сравнению с обычной фотографией глазного дна (Liu et al., 2017).

Зрительные вызванные потенциалы также могут быть снижены у пациентов с ПР (Wachtmeister, 1998). Ежегодная скорость снижения полной ЭРГ среди пациентов с ПР колеблется от 9 до 11% (Berson et al., 1993). Снижение функции колбочек происходит медленнее (Berson et al., 1985; Nagy et al., 2008). В гетерогенной группе пациентов, включая все три типа наследования ПР (аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный и Х-сцепленный) и синдромальные подтипы, ежегодная скорость снижения функции колбочек была оценена в 4-7%

(Falsini et al., 2012). По мере прогрессирования заболевания ганцфельд-ЭРГ может становиться нерегистрируемой, несмотря на остаточное поле зрения. При этих обстоятельствах мультифокальная ЭРГ (мфЭРГ) может все еще регистрировать ответы и, следовательно, может быть использована для отслеживания прогрессирования заболевания (Messias et al., 2013; Nagy et al., 2008). Удлинение латентности ответа на стимул при мфЭРГ может использоваться для прогнозирования потери поля зрения в сетчатке, которая выглядит здоровой (Hood, 2000).

Аутофлуоресценция глазного дна (FAF) может выявить неопределяемое нарушение метаболизма РПЭ. При коротковолновой sw-FAF с использованием синего или зеленого света сигнал исходит главным образом от молекул липофусцина, присутствующих в РПЭ (Delori et al., 1995). Напротив, ближняя инфракрасная nir-FAF отображает сигнал аутофлуоресценции, который исходит от РПЭ и - в меньшей степени - хориоидального меланина или родственных флуорофоров (Keilhauer and Delori, 2006). FAF все чаще используется для оценки и мониторинга прогрессирования ПР, однако отсутствуют достаточные данные относительно повышенной восприимчивости к световой токсичности сетчатки с дистрофией сетчатки, характеризующейся накоплением фотосенсибилизаторов, таких как липофусцин (Hunter et al., 2012; Teussink et al., 2017). Аномальное фовеальное кольцо или дуга повышенной аутофлуоресценции, не видимые при офтальмоскопии, присутствуют у 50-60% пациентов с ПР (Lois and Forrester, 2015). Это кольцо может быть визуализировано с использованием sw-FAF и nir-FAF. Диаметр кольца колеблется от 3 до 20 градусов и обычно имеет относительно высокий уровень симметрии между правым и левым глазом (Sujirakul et al., 2015). Это гипераутофлуоресцентное кольцо представляет собой переходную зону между аномальной и нормальной функцией сетчатки, таким образом, функция относительно нормальна внутри кольца и отсутствует за пределами кольца.

Уровень аутофлуоресценции непосредственно за пределами кольца сохраняется, несмотря на серьезные нарушения функции сетчатки. Кроме того, дегенерация фоторецепторных клеток вне кольца отражается в потере зоны эллипсоида и внешней пограничной мембраны, а также в истончении или отсутствии внешнего ядерного слоя при сканировании SD-ОКТ (Lima et al., 2009). Само аутофлуоресцентное кольцо соответствует области дисгенеза внешнего сегмента и продукции липофусцина с прогрессирующим истончением сетчатки, обычно сопровождающимся потерей эллипсоидальной зоны на внутреннем краю кольца или вблизи него (Greenstein et al., 2012; Lenassi и др., 2012; Lima и др., 2009; Murakami и др., 2008). Со временем диаметр гипераутофлуоресцентного кольца становится меньше; хотя скорость этого уменьшения варьирует, относительно большие кольца имеют тенденцию уменьшаться в размере быстрее, чем маленькие кольца. Внутренний край кольца обычно соответствует прогрессированию дисфункции колбочек; потеря функции палочек более распространена и включает

парафовеальную область внутри кольца (Robson et al., 2012). В далеко зашедшей фазе кольцо может рассеяться, и это явление коррелирует с потерей остроты зрения (Robson et al., 2012; Robson et al., 2011; Wakabayashi et al., 2010). Микропериметрия у пациентов с ПР показывает, что зрительная чувствительность относительно сохраняется внутри кольца, снижается в самой зоне кольца и уменьшается или не регистрируется в области за пределами кольца (Duncker et al., 2013).

Помимо гиперфлуоресцентного кольца могут наблюдаться другие аутофлуоресцентные паттерны. Почти у всех взрослых пациентов с ПР при широкоугольной визуализации FAF наблюдается пятнистая и / или пониженная аутофлуоресценция на средней периферии, что, по-видимому, связано с потерей периферического зрения (Oishi et al., 2013). Кроме того, патологический паттерн повышенной аутофлуоресценции может наблюдаться в макуле и связан с нарушением центрального зрения (Robson et al., 2011; von Ruckmann et al., 1999; Wakabayashi et al., 2010).

Флюоресцеиновая ангиография (ФАГ) В наши дни флуоресцентная ангиография обычно не используется при ПР. На ангиограмме можно легко наблюдать хориоретинальную атрофию, сначала на периферии и / или средней периферии, а затем в центре заднего полюса глаза. Хотя обычно заполнение сосудов сетчатки не задерживается, сами сосуды истончены и может присутствовать некоторое просачивание флуоресцеина (ликедж). Наличие и степень кистоидного макулярного отека также легко измерить с помощью флюоресцентной ангиографии. Хориоидальная неоваскуляризация хотя и редко встречается при ПР, может быть визуализирована как на ФАГ, так и на ОКТ (Kashani et al., 2017; Sayadi et al., 2017).

Диск зрительного нерва обычно приобретает восковую бледность по мере прогрессирования заболевания; эта особенность, вероятно, вызвана образованием глиальных клеток как на поверхности, так и внутри диска зрительного нерва, что приводит к увеличению светоотражения (Hwang et al., 2012; Szamier, 1981).

1.3.2. Молекулярно-генетические и лабораторные исследования

Генетические исследования. Междисциплинарный подход, сочетающий офтальмологическое и генетическое консультирование, может оптимизировать как диагностический процесс, так и долгосрочное лечение ПР (Branham and Yashar, 2013). В последние годы в этой области произошли значительные успехи в методах, используемых для идентификации генов. Например, некоторые центры перешли от использования целевых тестов секвенирования отдельных генов или групп генов (NGS панели) для диагностики и теперь

выполняют полноэкзомное секвенирование с использованием специальных программ и алгоритмов, фильтрующих анализ по генам, связанным со зрением (Haer-Wigman et al., 2017). При полноэкзомном секвенировании секвенируются все кодирующие области (то есть экзоны) в пределах всего генома человека (порядка 22000 генов). Добавление генного фильтра, содержащего все известные гены наследственных дистрофий сетчатки, может ограничить риск случайных находок в генах, которые не обязательно связаны с заболеванием.

Преимущество полноэкзомного секвенирования состоит в том, что если причинный ген не идентифицирован ни в одном из известных генов ПР, поиск можно легко расширить, включив в него другие гены, тем самым потенциально идентифицируя новые гены, связанные с ПР. С другой стороны, полноэкзомное секвенирование обычно не является тестом выбора для очевидных случаев Х-связанных форм ПР (RPGR ассоциированного).

Хотя мутации в гене *RPGR* составляют 70-75% всех пациентов с Х-связанной формой ПР, этот ген имеет нерегулярное покрытие, если проводить его анализ с помощью секвенирования экзома (Huang et al., 2015). Это связано с многочисленными повторяющимися участками пуриновых оснований (регион ORF15 - open reading frame). Поэтому этот регион лучше анализировать с помощью прямого секвенирования. В настоящее время секвенирование экзома обеспечивает молекулярную диагностику у 60-80% пациентов с ПР (Abu-Safieh et al., 2013; Haer-Wigman et al., 2017); у остальных пациентов, вероятно, имеется вариант, который не может быть обнаружен с использованием полноэкзомного секвенирования, который может включать структурные перестройки, мутации в некодирующих и / или богатых GC областях и мутации в генах, которые еще не были описаны при дистрофиях сетчатки (Carss et al. al., 2017; Nishiguchi et al., 2013).

Введение секвенирования всего генома в рутинную диагностику, вероятно, еще больше увеличит нашу способность подтверждать молекулярные диагнозы, хотя определение функциональной роли многих из этих предполагаемых причинных вариантов останется проблемой еще несколько лет.

Генетическое тестирование часто вызывает широкий круг вопросов, и пациенты обычно направляются на генетическое консультирование, где могут быть рассмотрены вопросы, касающиеся надежности результатов теста и последствий для пациента и его / ее родственников. Проведение пресимптоматического и / или прогностического тестирования в слишком раннем возрасте может увеличить вероятность неблагоприятного воздействия на качество жизни; поэтому, идеальный возраст для прохождения генетического тестирования в настоящее время обсуждается (Godino et al., 2016). Чтобы обеспечить свою будущую автономию, дети редко проходят предсимптомное тестирование; тем не менее, наличие новых вариантов лечения,

которые в идеале применяются на самой ранней стадии заболевания, может потребовать тестирования в более молодом возрасте.

Генотипирование обычно улучшает результат офтальмологического консультирования; однако количество хорошо описанных фенотипов для данного генетического подтипа обычно ограничено, и фенотипы могут сильно различаться в пределах подтипа и даже между членами семьи, которые имеют идентичные мутации. Тем не менее, информация, обсуждаемая в главе 4, может предоставить клиницисту обзор клинических аспектов, связанных с различными генетическими подтипами. Например, острота центрального зрения часто быстро ухудшается у пациентов с ПР с мутацией в гене *CERKL*, тогда как острота зрения обычно сохраняется гораздо дольше у пациентов с ПР с мутацией в гене *TOPORS*.

Следовательно, понимание основного генетического профиля и других модификаторов, которые могут влиять на фенотип, поможет обеспечить более надежный клинический прогноз. В ожидании такого углубленного генетического анализа тщательные последующие обследования, которые включают анализ поля зрения, SD-OKT и FAF, будут служить для мониторинга клинического прогрессирования дистрофии сетчатки, а также для прогнозирования снижения зрительной функции. Кроме того, другие патологии глаз, такие как катаракта и КМО (кистоидный макулярный отек), также могут быть идентифицированы на ранней стадии и соответствующим образом лечиться. Биоинформатический анализ, методы субъективной оценки зрения пациентами, гистологические исследования будут подробнее освещены в главе 2 – объекты и методы исследования.

1.3.3. Дифференциальная диагностика моногенных заболеваний сетчатки

ПР с ранним началом имеет клиническое и генетическое совпадение с врожденным амаврозом Лебера (LCA) и оба расстройства представляют собой группу дистрофий сетчатки, разделенных на нечеткие критерии, основанные на возрасте начала. Чаще всего пациенты, у которых признаки заболевания присутствуют при рождении или в течение первых месяцев жизни, классифицируются как имеющие амавроз (Kumaran et al., 2017). Нижний возрастной предел для диагностики ПР был установлен некоторыми после младенчества (определяемый по-разному - 4 - 8 мес.), что привело к появлению серой области, где оба диагноза перекрываются (Kumaran et al., 2017). При амаврозе чрезвычайно ранняя потеря зрительных функций приводит к ряду симптомов, которые включают нистагм, вялый или почти отсутствующий зрачковый рефлекс, светобоязнь и окуло-пальцевой симптом (надавливание пальцами на глаза). Острота

зрения редко бывает лучше, чем 0,05, а глазное дно может выглядеть от нормального до обширной атрофической ПР-подобной пигментной ретинопатии. Скотопическая и фотопическая ЭРГ, как правило, не регистрируемая или угасающая. ПР с ранним началом может иметь многие из этих симптомов, и это совпадение с LCA четко отражается в количестве генов, связанных с обоими расстройствами (см. рис. 1).

Колбочковая дистрофия является еще одной формой наследственной дистрофии сетчатки, которая имеет клиническое и генетическое пересечение с ПР. Результаты ЭРГ не всегда дают окончательный ответ о том, какие фоторецепторы в первую очередь поражены, особенно на поздних стадиях заболевания. Однако ранние симптомы дистрофии колбочек, которые включают раннюю потерю остроты зрения, интенсивную светобоязнь, переменную ахроматопсию и начальное отсутствие ночной слепоты, могут помочь практикующему врачу провести различие между колбочковой дистрофией и ПР (Hamel, 2007).

Определенные дистрофии сетчатки имеют признаки палочко-колбочковой дистрофии, однако некоторые их симптомы высокоспецифичны. Примерами являются хориоидеремия (пятнистая хориоретинальная атрофия, с просвечивающими сосудами хориоидеи и нормальные сосуды сетчатки), атрофия гирате (хорошо разграниченная круговая хориоретинальная атрофия с повышенным уровнем орнитина в крови) и поздняя дегенерация сетчатки (перимакулярные друзоподобные поражения) (Borooah et al., 2009; Mauthner, 1872). Белоточечный ретинит (Retinitis punctata albescens) также имеет очень специфический фенотип; тем не менее, эта сущность считалась подтипом ПР на протяжении долгих лет.

Врожденная стационарная ночная слепота (CSNB) является примером стационарного расстройства, характеризующегося преимущественно палочковой дисфункцией. За исключением двух подтипов CSNB у пациентов с CSNB обычно нормальное глазное дно. Однако CSNB имеет значительное совпадение с ПР в отношении вовлеченных генов; таким образом, мутации в генах PDE6B, RDH5, RHO, RLBP1 и SAG могут приводить либо к ПР, либо к CSNB (Zeitz et al., 2015).

Синдромальный (синдромный) пигментный ретинит. Мутации в генах, вовлеченных в функцию ресничек клеток, часто - но не всегда - приводят к синдромальной форме ПР. Возможно, наиболее распространенной цилиопатией является **синдром Ашера**, который характеризуется разной степенью нейросенсорной тугоухости (Boughman et al., 1983).

Другая хорошо известная синдромальная форма ПР - **синдром Барде-Бидля**. В дополнение к ретинопатии, у пациентов с этим синдромом также могут быть ожирение, постаксиальная полидактилия, гипогонадизм, почечная дисфункция и / или когнитивные нарушения (Mockel et al., 2011). Тип и степень этих внеглазных проявлений могут значительно различаться и зависеть по большей части от конкретного вовлеченного гена и конкретной

мутации в этом гене.

Синдромный ПР также связан с системными метаболическими и митохондриальными нарушениями. Экстраокулярные признаки при синдромном ПР могут быть чрезвычайно тонкими (например, нарушение обоняния) и легко игнорироваться врачом-офтальмологом (например, в случае сердечно-сосудистых и / или почечных заболеваний); с другой стороны, некоторые признаки могут быть хирургически исправлены в раннем возрасте (например, полидактилия). Таким образом, сбор тщательного анамнеза, который включает в себя эти различные экстраокулярные аномалии чрезвычайно важен для установки диагноза.

Тем не менее, генетический анализ может выявить мутации в гене, который связан с синдромальными формами ПР, когда первоначальная клиническая оценка не обнаружила внеглазные аномалии. В таких случаях важно сделать повторный физикальный диагностический осмотр пациента на наличие системных проявлений. Например, у всех пациентов с ПР, ассоциированным с TRNT1, обнаруживается умеренный эритроцитарный микроцитоз, который обнаруживается только после анализа параметров анализа крови (DeLuca et al., 2016). Однако важно помнить, что не все внеглазные нарушения указывают на синдромное заболевание: эти нарушения должны соответствовать обнаруженной во время генетического анализа мутации в вовлеченном гене.

Ряд генов, связанных с несиндромальным ПР (например, BBS1, CLRN1 и USH2A), также могут вызывать синдромный ПР (Табл. 5). Правильная диагностика пациента с синдромным ПР может иметь последствия для сохранения зрения или даже для спасения жизни, особенно у пациентов с нарушением обмена веществ, таким как **болезнь Рефсума** или нейрональным цероидным липофусцинозом, или **синдром Кернса-Сайре** (митохондриальное нарушение, которое часто включает сердечную дисфункцию).

Пигментный псевдоретинит. Некоторые состояния могут имитировать клинические особенности ПР (фенокопии) и классифицируются как пигментный псевдоретинит (Табл. 5). Важно отличать эти заболевания от ПР, так как некоторые формы пигментного псевдоретинита поддаются лечению и не имеют основного генетического компонента. Тщательный анамнез, включая прием лекарственных препаратов, отсутствие межглазной симметрии и отсутствие прогрессирования заболевания, может указывать на диагноз, отличный от ПР. Действительно, многие пациенты, у которых был диагностирован «односторонний ПР», попадают в эту категорию, хотя мутация зародышевой линии в гене RP1 была отмечена у пациента со строго односторонним ПР (Mukhopadhyay et al., 2011).

Локализованные формы ПР. *Секторальный ПР***.** Хотя ПР считается генерализованной дистрофией фоторецепторов, у некоторых пациентов аномалии сетчатки ограничены определенной областью сетчатки. В 1937 году Bietti был первым, кто описал форму ПР, при

которой пигментные изменения были ограничены нижне-назальным квадрантом обоих глаз (Bietti, 1937). Этот так называемый секторальный ПР представляет собой атипичную форму ПР, характеризующуюся симметричными областями региональных пигментных изменений, обычно ограниченными нижними квадрантами сетчатки (Van Woerkom and Ferrucci, 2005). Дефекты поля зрения часто соответствуют границам этих пигментных изменений сетчатки, хотя аномалии, видимые при флюоресцентной ангиографии и ЭРГ, могут выходить за пределы пораженных областей, наблюдаемых при офтальмоскопии (Abraham, 1975; Abraham et al., 1976). Секторальный ПР обычно прогрессирует медленно, но может развиться в панретинальный фенотип ПР (Hellner и Rickers, 1973; Ramon et al., 2014). Секторальный ПР был описан главным образом у пациентов с аутосомно-доминантной формой ПР, вызванной патогенными мутациями в гене RHO (Heckenlively et al., 1991; Ramon et al., 2014; Sullivan et al., 1993). Другие авторы сообщали о секторальном ПР в случаях, ассоциированных с мутациями в гене GUCA1B (аутосомно-доминантной) (Sato et al., 2005) и гене RPGR (Х-сцепленной) формами ПР (Charng et al., 2016; Heckenlively, 1988). Тем не менее, остается неясным, почему атрофические пигментные аномалии изначально ограничены определенной областью, несмотря на тот факт, что лежащие в основе молекулярные дефекты наиболее вероятно выражены во всей сетчатке. В качестве возможного объяснения у пациентов с ПР с мутациями в гене RHO были предложены локализованные различия в воздействии света на сетчатку (Ramon et al., 2014). *Перицентральная пигментная ретинопатия (ППР).* Некоторые гены были связаны с пигментными изменениями и кольцевой хориоретинальной атрофией, которая распространяется от височного края диска зрительного нерва вдоль или рядом с сосудистыми аркадами и имеет тенденцию к распространению до далекой периферии (Chakarova et al., 2007; Comander et al. , 2017; Matsui et al., 2015; Sullivan et al., 2014). Клинические данные, сообщаемые при этой перицентральной пигментной ретинопатии (ППР), варьируют среди пациентов, включая медленное прогрессирование и стационарные формы заболевания (de Crecchio et al., 2006; Matsui et al., 2015; Sandberg et al., 2005). ППР можно рассматривать как часть спектра ПР, особенно у пациентов с прогрессирующим заболеванием, историей ночной слепоты, кольцевой скотомой и снижением функции палочек по данным ЭРГ. Эта клиническая картина соответствует сообщениям о том, что члены семьи пациентов с ППР могут иметь более типичный фенотип ПР (Matsui et al., 2015). ППР может напоминать пигментированную паравенозную ретинохориоидальную атрофию (PPRCA) и поствоспалительную пигментацию сетчатки.

Белоточечное глазное дно (Retinitis punctata albescens). Некоторые пациенты с ПР могут иметь белые точечные отложения, которые распределены диффузно по всей сетчатке и часто уменьшаются до появления атрофии. Хотя это клиническое явление было описано как отдельная форма дистрофии сетчатки, называемая retinitis punctata albescens, его также можно

считать описательным подтипом несиндромального ПР. Retinitis punctata albescens может быть вызван мутациями в генах *LRAT* (Littink et al., 2012), PRPH2 (Kajiwara et al., 1993), *RHO* (Souied et al., 1996) или *RLBP1* (Morimura et al., 1999).

Мутации в гене *RLBP1* были также описаны при дистрофии сетчатки по типу Ботния (Burstedt et al., 1999) и палочко-колбочковой дистрофии Ньюфаундленд (Eichers et al., 2002), двумя специфическими подтипами ПР, характеризующимися одинаковыми белыми точечными отложениями, присутствующими при ретините punctata albescens (Burstedt et al., 2001). Эти белые отложения объясняются накоплением всех транс-ретиниловых эфиров в РПЭ (Saari et al., 2001). Однако, учитывая, что пациенты с ретинитом punctata albescens с мутациями LRAT практически не продуцируют сложные эфиры ретинила, точный состав этих отложений остается неясным (Dessalces et al., 2013).

1.4. Методы лечения моногенных заболеваний сетчатки

1.4.1. Генно- и мутационно-специфические подходы

Значительные успехи в наших знаниях относительно генетических причин ПР сопровождаются значительным прогрессом в разработке новых стратегий лечения этого заболевания (Scholl et al., 2016). Эти стратегии можно подразделить на две основные категории: 1) подходы, которые специфичны для генов или даже специфичны для мутаций (особенно это актуально для часто встречающихся мутаций), и 2) подходы, которые оказывают терапевтическое воздействие независимо от основного генетического дефекта.

Большинство генов, мутированных при ПР, кодируют белки, которые экспрессируются либо в фоторецепторных клетках, либо в РПЭ. Следовательно, чтобы лечение было эффективным, подходы гено-специфического и / или мутационно-специфического лечения **требуют присутствия клеток, на которые будут нацелены,** то есть эти подходы наиболее успешны **на ранних стадиях заболевания**, до дегенерации клеток.

При подходах, основанных на **генной терапии**, в клетки-мишени вводится конструкт, управляющий экспрессией копии кДНК дикого типа, соответствующей мутированному гену, с целью восстановления экспрессии дикого типа в этих клетках. В случае ПР и сопутствующих заболеваний вирусные векторы, такие как аденоассоциированные вирусы (AAV), часто используются для доставки генетического конструкта к клеткам-мишеням в сетчатке; вирус обычно вводится с помощью интравитреального или субретинального введения.

В 2008 году были опубликованы первые исследования для проверки безопасности и

эффективности применения терапии с повышением экспрессии гена *RPE65* у пациентов с LCA или ПР с ранним началом из-за биаллельных мутаций гена *RPE65* (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008). Обнадеживающие результаты, полученные в результате этих исследований, обеспечили огромный импульс в этой области и привели к клиническим испытаниям I / II фазы, предназначенным для проверки подходов, основанных на генной терапии, для лечения ряда других генетических подтипов заболеваний сетчатки, включая хориделемию (ген *CHM*) (MacLaren et al., 2014), *MERTK*-ассоциированный ПР (Ghazi et al., 2016) и - совсем недавно - *CNGA3*-ассоциированная ахроматопсия, *PDE6A*-ассоциированный ПР, *RPGR*-ассоциированный Х-сцепленный ПР, *RS1* - Х-сцепленный ювенильный ретиношизис и *ABCA4*-ассоциированную болезнь Штаргардта (см. www.clinicaltrials.gov).

Недавнее исследование 3 фазы на пациентах с *RPE65*-опосредованной наследственной дистрофией сетчатки, которых лечили субретинальной инъекцией воретигена непарвовека, подтвердило безопасность и эффективность лечения; у пациентов наблюдались улучшения светочувствительности, расширение полей зрения и улучшались навигационные способности в условиях слабого освещения (Russell et al., 2017).

Это привело к первой в США утвержденной FDA генной терапии при заболеваниях сетчатки в 2017 г. Тем не менее, несмотря на эти первоначальные достижения, необходимо преодолеть важные проблемы, прежде чем можно будет широко применять генную терапию в офтальмологии. Например, неясно, может ли однократное введение терапевтического вектора обеспечить долгосрочные, длительные клинические преимущества.

Размер генов, которые можно транспортировать при наиболее частых дистрофиях сетчатки и используемые для этого вирусные векторы также относительно ограничен и поэтому не подходит для доставки больших кДНК, соответствующих нескольким генам, которые мутируют у многих пациентов с ПР (например, гены *EYS, CRB1* и *USH2A*). В этих случаях разрабатывается применение дуплексного или даже триплексного подхода генной терапии, когда терапевтическая кДНК вводится на аденовирусном носителе частями и собирается в единую кДНК уже непосредственно в клетке, однако на каждом из таких этапов сборки отмечается снижение терапевтического эффекта на 15 - 20%.

Кроме подходов генной терапии при разрезании таргетного гена на куски применяются также терапевтические стратегии **mini gene или экзон-скиппинг** (то есть пропуск экзона). Этот подход подразумевает следующее терапевтическое предположение, оправданное на лабораторных и in vivo экспериментах: при наличии у пациента мутации, которая приводит к преждевременной терминами синтеза белка подход, который позволит сделать пропуск в транскрипции белка и приведет к синтезу дефектной, но полноразмерной копии белка, должна дать ощутимый терапевтический эффект, что и наблюдается, особенно в случаях генной терапии

такого изолированного и иммунопривилегированного органа как глаз. Терапевтический подход методом экзон-скиппинга показал свою эффективность на животных моделях *EYS, CRB1* и *USH2A* ассоциированного ПР.

Другие появляющиеся терапевтические стратегии включают **антисмысловые олигонуклеотиды** (AON), которые представляют собой небольшие универсальные молекулы РНК, которые могут модифицировать сплайсинг пре-мРНК путем специфического связывания с областью-мишенью в пре-мРНК, тем самым подавляя события патологического сплайсинга при мутациях в клетках пациента, вызванные некоторыми мутациями (Collin и Garanto, 2017) и редактирование генома, например, с использованием **системы CRISPR / Cas9**. Этот последний метод вводит высокоточный двухцепочечный разрыв в геномной ДНК в месте мутации и может использоваться для восстановления первичного генетического дефекта непосредственно в геноме пациента (Yanik et al., 2017).

Другим классом высоко универсальных терапевтических соединений, которые могут действовать гено-специфичным и / или мутационно-специфическим образом, являются **низкомолекулярные соединения**. При ранней дегенерации сетчатки у пациентов с мутацией в гене *LRAT* или *RPE65* нарушается зрительный цикл, в котором весь транс-ретиналь превращается обратно в 11-цис-ретиналь посредством нескольких ферментативных реакций. Пероральное лечение 9-цис-ретиноидом, аналогом 11-цис-ретиналя, было хорошо переносимым и умеренно эффективным в ранних фазах клинических испытаний у пациентов с мутацией в вышеупомянутых генах. Более того, эффективность лечения коррелировала с остаточной целостностью сетчатки (Scholl et al., 2015). Важно отметить, что алиментарное лечение метаболическими препаратами может предотвратить или уменьшить прогрессирование заболевания при следующих трех синдромальных формах ПР: взрослая болезнь Рефсума, синдром Бассена-Корнцвейга и дефицит белка-переносчика α-токоферола (также известный как семейный дефицит витамина Е).

Кроме прямой проблемы оценки эффективности проводимой генной и низкомолекулярной терапии, необходимо 1) контролировать уровни экспрессии терапевтических агентов, 2) учитывать и снижать доминантно-негативные механизмы, которые нивелируют эффективность лечения заболевания, 3) учитывать относительно небольшое количество пациентов для каждого из генетических подтипов и в связи с этим сложности с набором в группы для исследований безопасности и эффективности, а также 4) финансовые затраты на высоко индивидуализированные формы лечения.

1.4.2. Мутационно независимые подходы

В последние годы некоторые изменения в рационе питания и пищевые добавки (например, витамин А) были рекомендованы для лечения ПР (Brito-Garcia et al., 2017). Тем не менее, Кокрановский систематический обзор, проведенный Rayapudi et al. (Rayapudi et al., 2013) не нашли четких доказательств того, что витамин А и / или докозагексаеновая кислота из рыбьего жира оказывают благотворное влияние на пациентов с ПР в целом. Кроме витамина А рекомендуют применение **комплекса витаминов** группы В и С, а также Е и комплекс микроэлементов курсами по два раза в год. Кроме этого, применяются **ростовые и нейротрофические факторы**, выделяемые организмом или синтезированные искуственно. В их число входят BDNF – нейротрофический фактор мозга, CNTF – цилиарный нейротрофический фактор, bFGF – основной фактор роста фибробластов и другие. (ссылки).

При отсутствии возможности проводить другие виды терапии, **магнитотерапия** занимает свое место в лечении дистроофияечких процессов в сетчатке.

Применени **комплекса короткоразмерных пептидов** из лизата спинномозговой жидкости крупного рогатого скота (Ретиналамин, Герофарм) является спорным с точки зрения терапевтического эффекта (Сидоренко Е.И. и соавт., 2016), однако данная практика весьма широко распространена в России. Основной терапевтический эффект объясняется стимулирующим действием набора лизированных клеточкных стенок и структур в совокупности с активирующими и ростовыми факторами, присутствующими в препарате. Приблизительно 15% пациентов отмечают наличие аллергических и побочных эффектов данного препарата, околоо 30% отмечают «прояснение», «улучшение» зрения и приблизительно половина пациентов (55%) не замечает изменений до и после применения препарата.

Заместительная клеточная терапия представляет собой введение клеток-предшественников сетчатки глаза (RPC - retina progenitor cells) или стволовых клеток, не происходящих из глаза, таких как эмбриональные стволовые клетки (ESC) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), в стекловидное тело или субретинальное пространство. Каждый из этих типов клеток имеет определенные преимущества и недостатки (Tang et al., 2017). Например, RPC относительно легко обрабатывать и реципиенту не требуется иммуносупрессивная терапия; однако получение достаточного количества донорских клеток проблематично.

Напротив, **стволовые клетки** требуют более тщательного, кропотливого и трудозатратного производственного процесса. Ключевое различие между ESCs и iPSCs

заключается в том, что iPSCs могут быть получены от пациента, что позволяет проводить аутологичную трансплантацию РПЭ или фоторецепторных клеток, полученных из iPSC, что позволяет избежать иммуносупрессивного лечения; более того, лежащий в основе генетический дефект может быть даже исправлен до трансплантации с использованием редактирования генома (Li et al., 2016).

Однако такое высоко индивидуализированное лечение связано с чрезвычайно высокими затратами. Следовательно, варианты использования iPSCs, совместимых с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA), из банка данных получают все большее внимание (Chakradhar, 2016; de Rham and Villard, 2014). В настоящее время используются различные подходы к трансплантации, включая трансплантацию клеток РПЭ, полученных из стволовых клеток и / или фоторецепторных клеток (Seiler and Aramant, 2012). Фаза I / II испытаний с использованием RPC в настоящее время проводится на пациентах с ПР для оценки безопасности in vivo, долгосрочной выживаемости и функции трансплантата (см. www.clinicaltrials.gov). Хотя клинические применения все еще находятся в зачаточном состоянии, терапевтические подходы на основе стволовых клеток / клеток-предшественников представляют собой многообещающее будущее для пациентов с прогрессирующим ПР.

Другим новым подходом является использование **электронных имплантатов сетчатки** для пациентов с далекозашедшей и терминальной стадией ПР с остротой зрения на уровне «движение руки у лица», proectio luxus in/certae. Два имплантата сетчатки в настоящее время доступны на рынке. *Эпиретинальный* имплант Argus II (производства Second Sight Medical Products Inc. в Силмаре, Калифорния) получил европейскую сертификацию CE и одобрение FDA США. Наиболее свежие новости констатируют приостановку производства региональных имплантов типа Argus II. *Субретинальный* имплант Alpha AMS (производства Retina Implant AG в Ройтлингене, Германия) получил CE сертификация (Mills et al., 2017). Оба эти имплантата функционируют, стимулируя внутренние слои сетчатки и, следовательно, требуют неповрежденной внутренней архитектуры сетчатки, что крайне редко наблюдается у пациентов с далекозашедшей и терминальной стадией ПР.

Эпиретинальный имплант соединен с миниатюрной камерой, установленной на очках, затем имплант непосредственно стимулирует остаточные ганглиозные клетки сетчатки. Напротив, субретинальный имплант состоит из светочувствительной матрицы микро-фотодиодов, которая стимулирует слой биполярных клеток. Импланты сетчатки могут восстанавливать основные зрительные функции, улучшать результаты тестов, связанных со зрением, и повышать суточную подвижность пациентов с ПР (da Cruz et al., 2016; Stingl et al., 2017; Zrenner et al., 2011). Например, недавно было сообщено об улучшении остроты зрения от восприятия света без проекции до 20/546 у пациента, который получил имплантат Alpha AMS

(Stingl et al., 2017). Несмотря на эти многообещающие результаты, реабилитация зрения пациентов с этими протезами является сложной, и все еще необходимо преодолеть несколько проблем, включая неблагоприятные эффекты, долговечность устройства и низкую разрешающую способность матрицы (Cheng et al., 2017; Zrenner, 2013).

Еще одним относительно новым подходом, который может обеспечить терапевтические преимущества у пациентов, которые потеряли слой фоторецепторов и / или клетки РПЭ, является **оптогенетика**, которая использует генную терапию для экспрессии активированных светом ионных каналов в остаточных нейронах сетчатки, тем самым восстанавливая фоточувствительность (Busskamp et al., 2012). Несмотря на многообещающие результаты как на клеточных моделях, так и на моделях на животных, истинный потенциал этого подхода необходимо полностью проверить в клинических условиях. При всех достоинствах идеи метод оптогенетики вызывает опасение относительно долгосрочного терапевтического эффекта в связи с активизацией вторичной иммуногенности на синтез незнакомого для клеток сетчатки хромофорного белка, что может привести к аутоиммунным реакциям.

Также было показано, что некоторые **нейропротективные факторы** замедляют потерю фоторецепторов на многочисленных моделях животных, включая нейротрофический фактор мозга (BDNF) (Okoye et al., 2003), основной фактор роста фибробластов (bFGF) (Faktorovich et al., 1990), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) (Liang et al., 2001), нейротрофический фактор, происходящий из глиальных клеток (GDNF) (Dalkara et al., 2011), нейрональный фактор роста (NGF) (Lenzi et al., 2005) и полученный из палочек фактор жизнеспособности колбочек (rdCVF) (Byrne et al., 2015). Однако в настоящее время нет доказательств того, что эти соединения полезны при лечении ПР (Birch et al., 2016).

Транскорнеальная электростимуляция (TES) – терапевтический подход для заболеваний сетчатки и атрофии зрительного нерва, также оказывает свое влияние через высвобождение нейротрофических факторов после электростимуляции роговицы. Доказательство принципа TES было установлено на животных моделях (Morimoto et al., 2007), и лечение безопасно у пациентов (Schatz et al., 2017; Schatz et al., 2011; Wagner et al., 2017), хотя для обеспечения эффективности лечения в течение длительного времени необходимы более масштабные исследования.

1.4.3. Лечение сопутствующих глазных заболеваний

Улучшение зрения после операции по удалению катаракты у пациентов с ПР во многом зависит от остаточной макулярной функции. Вероятность восстановления зрения наиболее высока у пациентов с ПР, у которых есть неповрежденная или только слегка нарушенная

фовеальная эллипсоидная зона (Nakamura et al., 2015; Yoshida et al., 2015a). В некоторых сообщениях указывается, что у пациентов с ПР может быть повышенный риск развития осложнений во время и после операции по удалению катаракты. Эти осложнения могут включать слабость цинновых связок (в 19% случаев) (Dikopf et al., 2013), помутнение задней капсулы (44-95% случаев) (Bayyoud et al., 2013; De Rojas et al., 2017; Yoshida et al., 2015a) и затруднение капсулорексиса передней капсулы (10-38% случаев) (Hayashi et al., 1998; Jackson et al., 2001; Yoshida et al., 2015a).

Хотя научные доказательства отсутствуют, некоторые хирурги сообщают о более тяжелом послеоперационном воспалении у пациентов с ПР. В целом, предоперационное лечение стероидами может быть полезным у пациентов с ПР для предотвращения этого воспаления, а также КМО. В настоящее время нет признаков того, что операция ускоряет прогрессирование ПР (De Rojas et al., 2017). С другой стороны, субъективное улучшение зрения после операции по удалению катаракты у пациентов с ПР часто бывает значительным. Следовательно, экстракция катаракты должна быть рассмотрена при визуально значимых катарактах, даже при наличии выраженного ПР.До настоящего времени не было проведено ни одного крупного рандомизированного контролируемого клинического исследования для оценки эффекта лечения КМО у пациентов с ПР. Средство выбора при КМО на фоне ПР - ингибиторы карбоангидразы (Strong et al., 2017). Метаанализ, проведенный Huang et al. показал среднее уменьшение толщины центральной зоны сетчатки на 46% (Huang et al., 2017b). Однако часто нет никакой корреляции между анатомическим и функциональным улучшением (Huang et al., 2017b). Предписанные дозы перорального ацетазоламида варьируют между 125-500 мг в день, и местные ингибиторы карбоангидразы, такие как 1-2% дорзоламид или бринзоламид, обычно вводят три раза в день. Поскольку оптимальная терапевтическая доза для пациента до сих пор неизвестна, рекомендуется использовать метод проб и ошибок для выявления оптимального режима дозирования. Рецидив КМО может произойти после прекращения лечения ингибитором карбоангидразы (Huang et al., 2017b), и эффективность может снижаться при длительном лечении (Huckfeldt и Comander, 2017).

Повторное лечение ингибиторами карбоангидразы после периода прекращения применения может снова иметь благоприятный эффект (Thobani and Fishman, 2011). Рефрактерный КМО можно лечить с помощью интравитреальных стероидов (Huckfeldt and Comander, 2017). Эффективность использования интравитреального анти-VEGF (сосудистого эндотелиального фактора роста) у пациентов с ПР остается неясной, поскольку исследования положительного эффекта противоречат друг другу; более того, уровень VEGF заметно ниже в водянистой влаге у пациентов с ПР (Strong et al., 2017), чем у здоровых людей. Важно отметить, что высота КМО (кистоидного макулярного отека) и его рецидивирование может меняться со

временем, особенно у детей, даже без вмешательства, это следует учитывать во время лечения (Huckfeldt and Comander, 2017).

Хотя эпиретинальные мембраны преобладают среди пациентов с ПР, в некоторых сообщениях рассматривается эффект отслоения мембран у пациентов с ПР. Ikeda et al. недавно сообщали о морфологическом улучшении после пилинга эпиретинальной мембраны в 9 из 11 глаз, хотя только три из этих глаз, два из которых подвергались сопутствующей операции по удалению катаракты, имели долгосрочное улучшение остроты зрения (Ikeda et al., 2015). Этот относительно ограниченный показатель успеха, наряду с потенциальной токсичностью, связанной с прямым внутриглазным освещением, позволяет предположить, что пилинг эпиретинальной мембраны следует использовать с крайней осторожностью у пациентов с РП.

1.4.4. Реабилитация

Пигментный ретинит может серьезно повлиять на физическую и эмоциональную жизнь пациентов и их семей. Поэтому предоставление адекватной поддержки пациентам и их родственникам является важным компонентом в лечении ПР, как в текущем варианте, так и в будущих терапевтических вариантах лечения. В последние годы зрительная реабилитация пациентов с ПР с низкой остротой зрения превратилась в междисциплинарный подход, который фокусируется на функциональных возможностях и потребностях пациента (Herse, 2005), обеспечивая тем самым высокую ценность для пациентов с ПР. Центры реабилитации зрения обеспечивают поддержку и обучение, в том числе обучение ориентации и мобильности в сочетании со вспомогательными средствами для слабовидящих, такими как фонарики, очки ночного видения и / или обратные телескопы, для оптимизации использования остаточных зрительных функций. При запущенном заболевании независимость пациента и функциональное качество жизни могут быть улучшены с помощью программного обеспечения преобразования текста в речь, которое позволяет пациенту интерпретировать текст, а собака-поводырь может дополнительно повысить мобильность и независимость пациента. Тем не менее, социальное влияние постепенного ухудшения поля зрения не следует недооценивать.

1.5. Направления исследований для патогенетического лечения моногенных заболеваний сетчатки

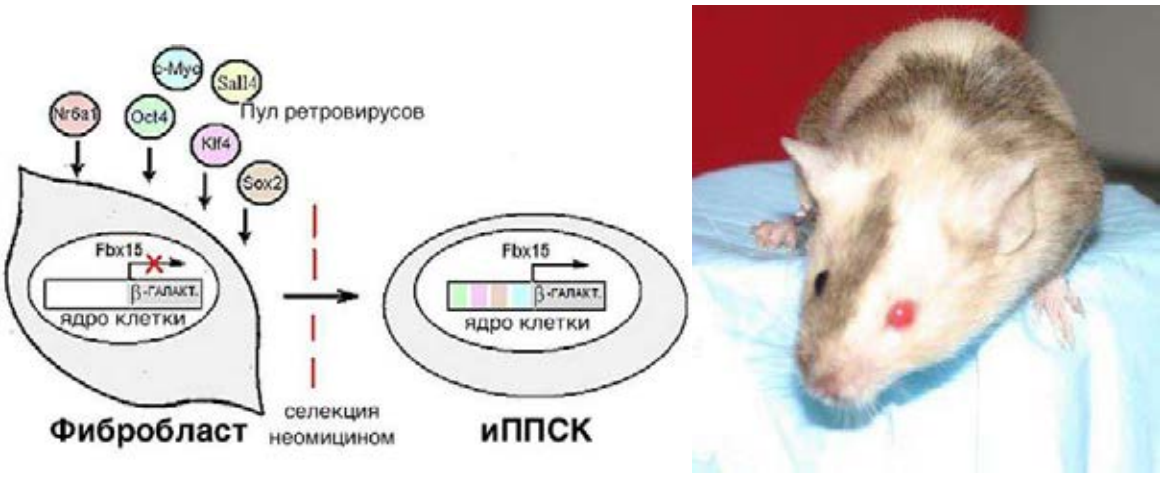
Среди разнообразных подходов, нацеленных на устранение причин необратимой слепоты, наиболее перспективным является получение собственных здоровых клеток сетчатки из

организма пациента. Это стало возможным благодаря индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (иППСК). Впервые иППСК были получены в виде перевиваемой тератокарциномы, индуцированной трансплантатом, взятым из мышиных эмбрионов [Stevens LC, 1970]. Было доказано, что тератокарциномы образуются из соматических клеток [Mintz B., 1978]. Тот факт, что из клеток тератокарциномы можно получить нормальную мышь доказывал их плюрипотентность [Illmensee K., 1976]. Оказалось, что клетки тератокарциномы, выделяя в культуральную среду различные факторы, способны поддерживать культуру плюрипотентных стволовых клеток эмбриона в недифференцированном состоянии. Таким образом, ещё в 1980-е годы стало ясно, что трансплантация плюрипотентных или эмбриональных стволовых клеток во взрослый организм млекопитающих обычно приводит к образованию тератомы, которая затем может превратиться в злокачественную опухоль — тератокарциному [Martin G.R., 1980]. Если, однако, поместить клетки тератокарциномы в ранний зародыш млекопитающего (на стадии бластоцисты), то они включаются в состав клеточной массы бластоцисты и из такого химерного (то есть состоящего из клеток от разных организмов) эмбриона нередко развивается нормальное химерное животное. Уже тогда, используя ретровирусные векторы, удалось ввести инородные гены в мышиные химеры, полученные с помощью клеток тератокарциномы [Stewart L.C.б 1985].

Японские исследователи Такахаси и Яманака разработали систему отбора факторов плюрипотентности, использующую фибробласты, содержащие кассету устойчивости к антибиотику неомицину с промотором гена Fbx15, который активен в раннем эмбрионе, но не экспрессируется в фибробластах [Tokuzawa Y., 2003] Для индукции перепрограммирования, авторы заражали тестирующие фибробласты ретровирусными векторами, каждый из которых нес уникальную кольцевую ДНК, кодирующую ген молекулы кандидата в факторы перепрограммирования. Если ядерное перепрограммирование произошло, то эти фибробласты должны синтезировать β-галактозидазу и стать устойчивыми к высоким концентрациям неомицина.

В августе 2006 года японские исследователи сумели превратить клетки мышиной кожи (фибробласты) в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки — иППСК (induced pluripotent stem cells — iPSC), используя для модификации клетки всего четыре репрограммирующих фактора: **Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc**, доставленных в ядро ретровирусами (рис. 11А). Этим они доказали, что гиперэкспрессия небольшого количества факторов иногда может подтолкнуть клетки к переходу в новое стабильное состояние, связанное с изменением активности тысяч генов. По своим свойствам иППСК оказались очень похожи на эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) [Choi J., 2015]. Позднее, с развитием технологии перепрограммирования, лучшим доказательством идентичности иППСК и ЭСК стала возможность получения взрослой мыши полностью из некоторых линий иППСК. Замена одного

из факторов Яманаки, а именно c-Myc на H1foo, значительно повысила количество и качество получаемых клонов иППСК — они стали более однородными по свойствам, из них чаще стали получаться мыши-химеры. Мыши-химеры по фенотипическим проявлениям отличаются от обычных мышей тем, что в связи с различным набором активных генов в разных клетках окраска животного может быть различна на разных участках тела. К примеру, у одного животного один глаз может быть карим, а второй альбинотичен без пигмента (рис. 11Б).



А Б

Рис. 11. А. Превращение клетки мышиной кожи (фибробластов) в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки — иППСК, с использованием для модификации клетки всего четыре репрограммирующих фактора: Oct4, Klf4, Sox2 и c-Myc, доставленных в ядро ретровирусами. Схема составлена на основе материалов Tokuzawa Y. и соавт., 2003 с изменениями. Б. Химерная мышь (Copyright NIH – national institute of health, USA).

Важным преимуществом иППСК перед ЭСК является то, что они могут быть получены из клеток взрослого организма, а не из эмбриона. Поэтому стало возможным получать иППСК от взрослых и даже пожилых пациентов [Milhavet O., 2014]. Перепрограммирование соматических клеток в иППСК приводит к их омоложению о чём свидетельствуют данные исследования теломеров — концевых участков хромосом, состоящих из коротких следующих друг за другом повторов эволюционно консервативной последовательности ДНК. Выяснилось, что перепрограммирование приводит к удлинению теломеров и их нормальному укорочению по мере дифференцировки иППСК обратно в фибробласты. Таким образом, при индуцированной плюрипотенции восстанавливается эмбриональная длина теломеров, а значит, увеличивается потенциальное число делений клетки [West M.D., 2010], ограниченное так называемым лимитом Хайфлика (Hayflick limit). Более того омолаживаются и митохондрии клетки при этом восстанавливается характерный для молодых клеток уровень дыхания.

Из-за диссонанса в стадии развития омоложенных клеток и окружающих их старых клеток реципиента, инъекция пациенту его же собственных иППСК, обычно приводит к иммунной

реакции, что может быть использовано в медицинских целях [Dhodapkar M.V., 2011]. Одной из причин иммуногенности аутологичных иППСК и ЭСК считается группа из 9 генов: Hormad1, Zg16, Cyp3a11, Lce1f, Spt1, Lce3a,Chi3L4, Olr1, Retn, синтез которых повышен. Некоторые клетки, дифференцированные из иППСК и ЭСК, продолжают синтезировать эмбриональные изоформы белков и неадекватно интерпретируют сигналы окружающих их клеток реципиента.

Недавно методом отбора удалось найти небольшие молекулы (цитотоксические селективные ингибиторы плюрипотентных стволовых клеток человека), которые предотвращают образование тератомы у мышей после трансплантации им плюрипотентных стволовых клеток человека. Самое мощное и селективное из этих соединений — PluriSIn #1 (ПлюриСИн, или 2-фенилгидразид изоникотиновой кислоты), вызывало ингибирование стеароил-КоА десатуразы (ключевого фермента в биосинтезе олеиновой кислоты), что в конечном итоге приводило к апоптозу плюрипотентных стволовых клеток. С помощью этой молекулы удается выборочно удалить из культуры недифференцированные клетки [Ben-David U., 2013].

Ещё одной молекулой избирательно удаляющей недифференцированные клетки является STF-31, являющийся ингибитором GLUT1. Эффективной стратегией избирательного устранения плюрипотентных клеток, которые способны дать начало тератоме является ингибирование характерных для этих клеток антиапоптотических факторов, таких как сурвивин или Bcl10. Обработкой малыми молекулами, которые могут ингибировать эти антиапоптотические факторы, можно добиться селективного удаления подобных клеток вызвав их апоптоз, этого достаточно, чтобы предотвратить образование тератомы после трансплантации клеток полученных из иППСК. Тем не менее, маловероятно, что какая либо, пусть даже самая изощренная, предварительная очистка, способна обезопасить подсадку иППСК, так как при избирательном удалении плюрипотентных клеток, они вновь довольно быстро возникают путём превращения дифференцированных клеток обратно в стволовые (к обратному переходу может в частности подтолкнуть гипоксия). Ещё один способ предотвратить образование тератомы — это вызвать в пересаживаемой клетке иППСК гиперэкспрессию гена *CREG*.

Использование иППСК для клеточной терапии пока ограничено [Cunningham J.J., 2012]. Тем не менее, они могут быть использованы для целого ряда иных целей — включая моделирование болезней, скрининг (селективный отбор) лекарств, проверку токсичности различных препаратов. Важными факторами для получения высококачественных иППСК являются определённые небольшие молекулы, способствующие сохранению геномной целостности, образующихся при перепрограммировании иППСК, путём ингибирования двухцепочечных разрывов ДНК и активации гена Zscan4, содействующего процессам репарации ДНК [Park H.S., 2015]. Перепрограммирование вызывает репликативный стресс, который можно снизить повысив уровень чекпоинт киназы 1 (CHK1), благодаря чему повышается качество и

эффективность образования иППСК. Кроме того добавление во время перепрограммирования нуклеозидов позволяет снизить повреждения ДНК и число геномных перестроек в получаемых иППСК.

Определение уникального набора транскрипционных факторов, которые необходимы для перепрограммирования клеток, представляет собой длительный и дорогостоящий процесс. Международная группа исследователей разработала алгоритм, называемый Mogrify, который помогает предсказать оптимальный набор клеточных факторов, необходимых для преобразования одного типа клеток человека в другой [Rackham OJ., 2016]. Появился также алгоритм, который предсказывает не только транскрипционные факторы необходимые для перепрограммирования, но также и идеальный выбор времени для применения этих факторов. Разработаны критерии качества и стратегия производства иППСК для клинических испытаний.

Чтобы обезопасить применение иППСК в клинике, было предложено одновременно с перепрограммированием клеток пациента в иППСК, вводить в эти клетки индуцируемый малой молекулой ген каспазы-9 (IC9) для запуска каскадов апоптоза для самоубийства клеток образованных из этих иППСК. Такой «предохранитель» позволит избавляться от омоложенных клеток после того как они выполнили свою терапевтическую функцию или в случае образования опухоли из этих клеток [Ando M., 2015]. Важную роль на поздних этапах перепрограммирования играют и ферментативные модификации гистонов. Показано, что необходимым условием эффективного перепрограммирования является подавление переносчика гистонов CAF-1 и белкового комплекса ремоделирования нуклеосом и деацетилирования (nucleosome remodeling and deacetylation — NuRD), который исполняет роль эпигенетического регулятора, который ограничивает экспрессию ключевых генов плюрипотентности. Поэтому подавление NuRD (например, с помощью бутирата, вальпроевой кислоты, субероиланилидгидроксамовой кислоты или трихостатина А) может стать мощным средством для повышения эффективности и точности перепрограммирования. Действительно, подавив NuRD, удалось впервые осуществить детерминированное и синхронизированное перепрограммирование клеток кожи мыши и человека в иППСК в течение всего семи дней и с невиданной ранее эффективностью — около 100 % [Rais Y., 2013]

Описаны методы получения из иППСК клеток хрусталика и сетчатки [Buchholz D.E., 2009] и способы их использования для клеточной терапии [Mark A., 2013], которая в несколько раз на длительный срок улучшала зрение у подопытных животных. В последние годы получены пигментные, ганглиозные, биполярные и фоторецепторные сетчатки глаза, а также клетки хрусталика из иППСК. Начаты клинические испытания, призванные продемонстрировать безопасность использования иППСК для клеточной терапии людей с дистрофиями сетчатки и катарактой.

Итак, резюмируя современное состояние проблемы моногенных заболеваний сетчатки, приводящих к необратимому снижению зрения и инвалидизации в России и в мире, важно отметить, что в зависимости от вида заболевания необходима релевантная диагностика и по результатам диагностики применение различных схем лечения. Наиболее распространенными видами моногенных заболеваний сетчатки, поддающимися в ближайшем будущем лечению, направленному на устранение причины снижения зрения, являются патологии, приводящие к изменению нормальной физиологии зрительного цикла, а именно: патологии наружного сегмента фоторецепторов, ресничного транспорта, каскада зрительного сигнала, межклеточного взаимодействия и особенностям межфоторецепторного пространства.

Диагностика моногенных заболеваний сетчатки – важный комплекс стандартизированных объективных и субъективных клинических и лабораторных методов оценки, который позволяет проводить дифференциальнаю диагностику и подбирать наиболее эффективные методы лечения, которые могут быть генно- и мутационно-специфическими, а также мутационно-независимыми. Очень важно иметь стройную отработанную систему такой диагностики, что позволяет сделать представленная научная работа, что подтверждает актуальность данной темы с учетом распространенности этой группы заболеваний.

Также важно лечение сопутствующих глазных заболеваний и реабилитация по зрению этой группы пациентов. Нужно иметь в виду, что при генетически обусловленной патологии довольно часто встречаются осложнения основного заболевания сетчатки, коморбидность и синдромность клинических проявлений, поэтому важными являются направления дальнейших исследований с целью патогенетического лечения моногенных заболеваний сетчатки.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1.Характеристика исследуемой группы

Из **3514 пациентов**, направленных на клиническое и генетическое обследование с 2012 до 2019 г. в НКЦ «Офтальмик» с моногенной глазной патологией или с подозрением на таковую, в том числе пигментным ретинитом, ахроматопсией, врожденной стационарной ночной слепотой, синдромом Ашера, болезнью Штаргардта, Х-сцепленным ретиношизисом, амаврозом Лебера, колбочковой дистрофией, макулодистрофией, в группу для отбора и дальнейшего анализа вошли 852 пациента с изолированным и синдромным пигментным ретинитом и колбочковой дистрофией, которые были разделены на **3 группы**: 1) группа таргетного патогенетически ориентированного лечения (48 пациентов (62 глаза) 2) группа лечения стволовыми клетками (142 пациента, 284 глаза) и 3) группа стандартного лечения (662 пациента, 1284 глаза), включавшего применение ретиналамина, витаминных, сосудистых препаратов и магнито- и электрофореза.

При наличии травм в анамнезе, последствий ретинопатии после окклюзии сосудов сетчатки, паранеопластических процессов (таких пациентов было 13 человек (1,5%) пациенты исключались из анализа. Также исключались пациенты с инфекционными хориоретинитами, природа которых была подтверждена лабораторными анализами и чьи патологические процессы в сетчатке вероятнее всего связаны с приемом ретинотоксичных препаратов (таких пациентов в общей сложности было 51 человек (5,9%). Этим пациентам было показано динамическое наблюдение совместно офтальмологом и врачом-инфекционистом, а также назначение лечения, нацеленного на элиминирование инфекции.

Также в результате клинического обследования по направлению от врача-офтальмолога с диагнозом «пигментный ретинит» было выявлено 62 случая (7,2%) синдромного пигментного ретинита, подтвержденного клиническими данными, среди них разные виды цилиопатий: синдром Ашера (44 пациента), синдром Барде-Билля (11 пациентов), синдром Коэна (1 пациент), синдром Жубера (3 пациента). В результате генетического анализа синдромное заболевание было подтверждено у 79 пациентов (9,2%), в числе которых 4 случая с нечеткой клинической картиной были финально классифицированы как митохондриальные заболевания Кейнса-Сайре (2 пациента, пациенты девочки-близнецы) и NARP синдром (2 пациента), в 10 случаях подтвердились генетически обусловленные нарушения обмена веществ (7 случаев мукополисахаридоза и 3 случая нейронального цероидного липофусциноза), а также 4 случая

синдрома Альстрёма и 2 случая синдрома Сениора-Локена. Все эти 79 пациентов были направлены под наблюдение и лечение к соответствующим специалистам, в том числе к врачам-генетикам и смежным специалистам для симптоматического лечения сопутствующих заболеваний и были исключены из группы изучения и последующего анализа.

Возраст пациентов варьировал от 3 мес. до 76 лет, из них 408 мужчин, 444 женщины. (табл. 14). Этнический состав группы пациентов представлен в табл. 14. Срок наблюдения за пациентами составил от 6 мес. до 7 лет.

Применялось лабораторно-диагностическое оборудование для проведения общеклинических, биохимических анализов, персональный компьютер, высокопроизводительные серверы для обработки геномных данных, моделирования 3D структуры белков и статистических расчетов.

2.1.1. Методы клинического офтальмологического исследования

Проводился общеклинический осмотр терапевтом, консультация генетика, сбор семейного анамнеза, анамнеза заболевания, возраста начала и скорости прогрессирования, физикальное обследование, измерение роста, веса, ИМТ, типа телосложения. Сбор и фиксация семейного анамнеза проводились сертифицированным специалистом после прохождения обучения на основе образовательного курса http://www.genome.gov/Pages/Education/Modules/YourFamilyHealthHistory.pdf с помощью программных продуктов Microsoft Power Point, Corel Draw или Invitae family history tool.

Каждому пациенту были проведены следующие процедуры: визометрия, рефрактометрия, биомикроскопия, оптическая когерентная томография, периметрия, микропериметрия, пневмотонометрия, офтальмоскопия (с фотофиксацией, в случае если возраст пациента был менее 12 мес. применяли Retcam под общим наркозом), электроретинография, измерение зрительных вызванных потенциалов, темновая адаптометрия, аутофлуоресценция, флуоресцентная ангиография, проверка цветовосприятия по таблицам Рабкина и тесту Фарнсуорта/Хью).

1. **Визометрия** – метод определения остроты зрения. Визометрия проводилась с помощью проектора знаков Potec PACP-6100 (Корея) с цифровыми оптотипами по стандартной методике с расстояния 5 метров.
2. **Биомикроскопия** – объективный бесконтактный метод исследования структур глаза, в основе которого лежит феномен световой контрастности. Исследование проводилось с помощью

щелевой лампы Zeiss, Meditec AG 07740 (Германия) и фотокамеры Nikon Coolpix P5000.

3. **Рефрактометрия** - метод определения преломляющей силы глаза, проводилась с помощью рефрактометров Huvitz HRK-7000A (Корея) или Topcon RM-8900 (Япония).
4. **Пневмотонометрия** (проводилась на приборе Reichert 7 (США) – метод определения внутриглазного давления, в основе которого лежит измерение степени деформации роговицы при давлении на неё извне струей воздуха.
5. **Офтальмоскопия** применялась для визуальной оценки состояния диска зрительного нерва, сетчатки и хориоидеи. Проводилась методом обратной офтальмоскопии с помощью щелевой лампы и высокодиоптрийной линзы 60D/90D после медикаментозного расширения зрачка раствором мидриацила 1,0 %. Сначала осматривался диск зрительного нерва, далее - макулярная область, а затем - периферические отделы сетчатки. При проведении исследования особое значение уделялось осмотру периферической части сетчатки на проверку наличия/отсутствия очагов дегенерации по типу «костных телец».
6. **Оптическая когерентная томография**: бесконтактная неинвазивная технология для прижизненного исследования морфологии переднего и заднего отрезка глазного яблока. Медикаментозное расширение зрачка позволяло получить более качественное изображение структур заднего отрезка глаза. Пациент фиксировал взгляд на мигающем объекте в линзе фундус-камеры. Камеру приближали к глазу пациента до тех пор, пока изображение сетчатки не отобразится на мониторе. После этого фиксировали камеру нажатием кнопки фиксатора и регулировали чёткость изображения. Если острота зрения низкая и пациент не видел мигающий объект, то использовали внешнюю подсветку, а пациент, не моргая, смотрел прямо перед собой. Расстояние между исследуемым глазом и линзой камеры 9 мм. Исследование проводилось в режиме perform scans (выполнение сканирования) на аппарате Zeiss Cirrus HD-OCT 5000 (Германия) или Optovue, США (рис.12). Далее выравнивали и очищали выполненные сканы от помех. После обработки данных измеряли исследуемые ткани и анализ их оптической плотности. Полученные количественные измерения сравнивали со стандартными нормальными значениями или значениями, полученными во время предыдущих обследований и сохранёнными в памяти компьютера.

А Б

Рис.12. Проведение оптической когерентной томографии на аппарате Zeiss Cirrus HD-OCT 5000 (А) Проведение периметрии на периметре Humphrey (Carl Zeiss Meditec) (Б). Фото автора.

7. **Периметрия,** применялась *квантитативная* периметрия (трехвариабельная периметрия с изменением трех параметров: размера объекта, освещенности объекта и освещенности общего фона) *кинетическая* (периметрия при постоянном механическом перемещении объекта вдоль меридиана, который видит глаз исследуемого от крайней периферии и до центра)– определение световой чувствительности в различных участках поля зрения с помощью неподвижных объектов переменной яркости, проводилась с помощью компьютерного периметра Humphrey (Carl Zeiss Meditec), по пороговой программе 30-2 на всех этапах наблюдения. Длительность каждого светового стимула в периметре Humphrey составляет 0,2 с. Это связано с тем, что распознавание стимулов длительностью более 0,1 с для периферии и более 0,4 с для центральных отделов сетчатки не зависит от времени предъявления, а определяется только их яркостью. Однако скрытое время произвольных движений глаз составляло около 0,25 с, и при более длительных стимулах пациент успевает перевести взор от центра к объекту на периферии и фиксировать его макулярной зоной. С учетом периметрических стандартов в периметре Humphrey яркость фона составляет 31,5 асб (10 кд/м^2). Использование такого умеренно яркого фона, близкого к мезопическим условиям зрения, уравнивает вклад палочек и колбочек в светочувствительность и исключает необходимость предварительной световой и темновой адаптации зрительной системы пациента.
8. **Микропериметрия** – комбинированное использование компьютерной периметрии и исследования сетчатки, которые проводились при помощи фундус-камеры. Микропериметрия соотносит видимые изменения на глазном дне (анатомию) и дефекты поля зрения (функцию). Данное исследование составило карту светочувствительности сетчатки и дало возможность провести количественное оценочное исследование зрительной функции пациента на момент

начала лечения, например, в области макулярного отека, а также в процессе лечения выявляло динамику изменения светочувствительности сетчатки. Микропериметрия выполнялась с помощью прибора Maia фирмы Centervue.

9. **Электроретинография** (ЭРГ) и **зрительные вызванные потенциалы** (ЗВП) выполнялись с помощью электрофизиологического комплекса Tomey EP-1000 PRO (Германия). Электроретинография проводилась с помощью электродов, не влияющих на оптические свойства глаза. Световой стимул аналогичен стимулу, используемому для регистрации зрительных вызванных потенциалов, и представляет собой подобие шахматной доски, на которой попеременно менялись освещённые и тёмные поля. Главный электрод устанавливали в свод нижнего века. Референтные электроды – в области наружного угла глазной щели. На лоб пациента устанавливали электрод с функцией заземления. Фотопический ответ смешанной ЭРГ регистрировался при использовании белого стандартного стимула интенсивностью 1,5— 3,0 кd x c/m^2 с интервалом 0,5 с в фотопических условиях на светлом фоне 17—34кd c/m^2 Зрительные вызванные потенциалы (ЗВП) отражают функцию зрительных путей от сетчатки до зрительной коры (17-е поле). В качестве стимуляции использовали реверсивный шахматный паттерн, а также стандартную вспышку. Полнофункциональное электрофизиологическое тестирование проводили в соответствии с рекомендациями ISCEV (http://www.iscev.org/standards) для количественной оценки тяжести заболевания, а также для мониторинга прогрессирования заболевания.
10. **КЧСМ –** критическая частота слияния мельканий (flicker test) – минимальная частота световых вспышек, которая вызывает ощущение непрерывного равномерного свечения Тест проводили на аппарате Свето-тест и начинали с малой частоты мельканий, при которой обследуемый видит только серию раздельных световых вспышек. При увеличении частоты мельканий у пациента появлялось ощущение мерцания, в первый момент грубое, а затем тонкое, наконец, наступало видение равномерного непрерывного свечения. КЧСМ в норме у здоровых людей от 40 до 46 Гц и снижаестя с возрастом, у здорового человека 70 лет средние показатели КЧСМ в пределах 38—40 Гц. Данный тест является диагностическим для выявления патологий, протекающих в сетчатке и зрительном пути, к примеру при болезни Штаргардта или атрофии зрительного нерва КЧСМ может достигать 18 – 25 Гц.
11. **Оценка цветового зрения –** проводилась с применением таблиц Рабкина и 32-х точечного теста Hue. Пациент располагается в 30 см от монитора при необходимости с рефракционной коррекцией для близи, и его просят расположить с помощью компьютерной мыши оттенки по убыванию градиента цвета всех трех спектров длин волн. По результатам выполнения задания, которое в среднем занимает 2 – 5 минут, выдается результат по 255-балльной шкале, в которой 0 – нормальное трихроматическое зрение, 255 – полная ахроматопсия. (рис.13).

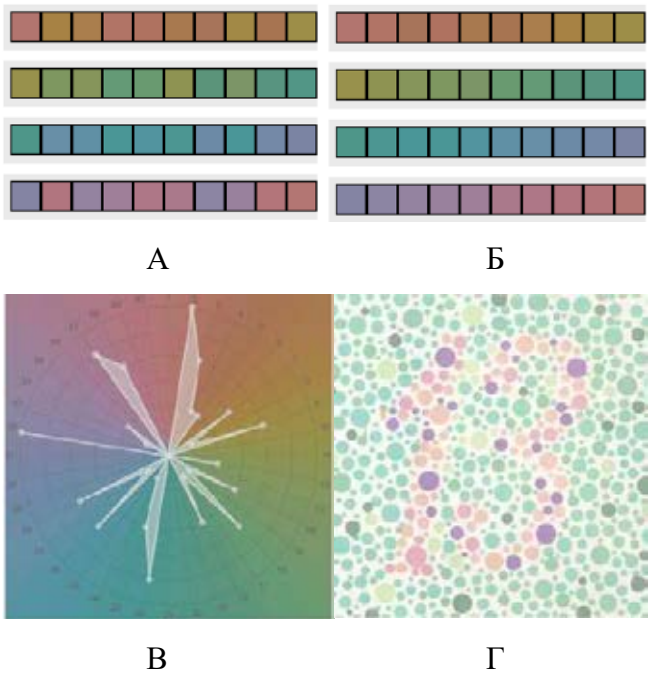


Рис.13. Внешний вид интерфейса для проведения оценки цветовосприятия методом Хью (Hue). А – интерфейс до выполнения теста, Б – интерфейс после выполнения теста (в случае нормальной трихромазии), В – результат в количественной оценке. Указан результат теста, где степень цветоаномалии составляет 72 балла с пиками в красной (протанопия) и зеленой (дейтеранопия) зоне. Г – пример таблицы Рабкина. Рисунки А, Б, В получены автором путем снимка экрана в результате проведения исследования пациентом https://www.xrite.com/hue-test. Рис. Г. – скан страницы таблиц Рабкина.

В случае протанопии, дейтеранопии или тританопии пики затруднения распознавания цветов смещены соответственно в красной, зеленой и синей части спектра.

12. **Темновая адаптометрия -** исследование темновой адаптации с помощью адаптометрами, которая основана на количественном учете восприятия интенсивности светового раздражения. Применялся отечественный адаптомер Е. М. Белостоцкого.
13. **Фоторегистрация глазного дна -** 7-полевая фотография проводилась с помощью ретинальной камеры Topcon (Япония). При непрозрачности оптических сред и/или недостаточного расширения зрачка проводили максимальную адаптацию и инструктаж пациента для получения наиболее четких снимков. Далее проводился отбор и чистка снимков от артефактов с помощью специальных алгоритмов.
14. **Флюоресцеиновая ангиография** (ФАГ) при необходимости и для дифференциальной диагностики проводилась с помощью ретинальной камеры Topcon (Япония). До проведения процедуры проводилась кожная аллергопроба с флуоресцеином для исключения риска генерализованной аллергической реакции. При отрицательной аллергопробе вводился 1 мл флуоресцеина внутривенно с проведением серии последовательных снимков в последующие

20 минут, когда краситель распространялся по артериям, затем артериолам, затем капиллярам, затем венулам и в последнюю очередь венам сетчатки, выявляя зоны избыточного накопления красителя и выявление зон ликиджа (нарушения целостности сосудистой стенки).

15. **Аутофлуоресцентная** визуализация глазного дна проводилась с помощью ретинальной камеры Topcon (Япония). Возбуждение аутофлюоресценции в приборе происходило с помощью маломощного сине-зеленого аргонового лазера с длиной волны 488 нм. Барьерным фильтром выделялось свечение флюрохромов с длиной волны более 500 нм. Дополнительно использовался интерференционный фильтр, подавляющий зеленую составляющую спектра возбуждающего лазера 514 нм и еще один интерференционный фильтр, подавляющий отражения от глазного дна возбуждающего излучения 488 нм. Узкополосные интерференционные фильтры позволяли ослабить мешающие сигналы и получить изображение собственных флюорофоров глазного дна. Изображения глазного дна при различных заболеваниях отличаются как от обычных черно-белых изображений, так и от флюоресцентных ангиограмм.

2.1.2. Молекулярно-генетические исследования.

Полноэкзомное секвенирование (WES) и NGS (next generation sequencing) панели, а также секвенирование отдельных генов проводилось путем забора 5 мл. периферической венозной крови, выделения ДНК. Для подготовки библиотек применялись реагенты Nextera Rapid Capture Exome v1.2 (Illumina) и набор зондов SureSelect Human All Exon V7 (Agilent). Сиквенс проводился на приборе Illumina Novaseq 6000 со средним покрытием 100X (рис.14). Большие хромосомные аномалии исключались с помощью хромосомного микроматричного анализа (ХМА; Affymetrix CytoScan HD array), протяженные делеции подтверждались/исключались методом MLPA (multiplex. ligation-dependent probe amplification) – мультиплексной амплификацией лигазно-связанных проб. Секвенирование по Сэнгеру проводили, чтобы подтвердить обнаруженные мутации. Также проводили анализ сегрегации для доступных членов семьи, следуя протоколу Malaichamy.

А Б В

Рис.14. (А) Секвенатор ДНК Novaseq 6000. (Б) Пробирки, выдерживающие низкие температуры при заморозке (-70°С) (В) Размещение образцов ДНК в криобанке.

Лабораторные исследования включали**:** ОАК (общий анализ крови), ОАМ (общий анализ мочи), биохимический анализ крови, анализ на метаболиты, в том числе орнитин, микроэлементы, исключение наследственных болезней обмена (НБО).

2.1.3. Биоинформатический анализ

Аннотация обнаруженных вариантов в геноме, отличающихся от нормы, выполнялась с использованием стандартных и проприетарных алгоритмов (табл.1). GATK и пользовательские базы данных применялись для обнаружения как однонуклеотидных вариантов (SNV), малых вставок/делеций, так и вариаций числа копийности (CNV). Эволюционную стабильность аминокислотных остатков определяли с помощью инструмента webPRANK, CDD / SPARCLE и MOTIF Search (https: //www.genome.jp/tools/ motif), а 3D-структура белка, функциональный анализ и влияние мутаций на заболевание проводились на Phyre2 (Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., et al. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. Nat. Protoc. 2015; 10 (6): 845–58. doi: 10.1038/nprot.2015.053) и с помощью Swiss model (https://swissmodel.expasy.org) а также PyMol (https://www.pymol.org/view). Поиск гомологичных последовательностей (blast/fastA) с имеющимися последовательностями в PDB (http://www.rcsb.org/pdb). Построение сетей белок-белкового взаимодействия и функциональный анализ проводили с помощью базы данных String (https://string-db.org). Анализ активности различных доменов белков (в случае NR2E3) проводили с помощью интегрированной системы **ISMARA** - Integrated System for Motif Activity Response Analysis, разработанной в Швейцарском центре молекулярной биологии (https://ismara.unibas.ch). Каждый из этих инструментов имел свои преимущества и ограничения в конкретном случае построения модели.

Табл. 1. Основные алгоритмы, применявшиеся для оценки потенциальной патогенности новых обнаруженных мутаций.

Алгоритм предсказания патогенности мутаций	Описание алгоритма	Нахождение алгоритма в сети
SIFT – Sorting Intolerant from Tolerant	алгоритм, который предсказывает, влияет ли аминокислотная замена на функцию белка на основе гомологии последовательности и физических свойств аминокислот. SIFT может применяться для встречающихся в природе несинонимичных полиморфизмов и лабораторных миссенс мутаций.	https://sift.bii.a-star.edu.sg
Polyphen_2HDIV и Polyphen_2HVAR	представляет собой алгоритмический инструмент, который предсказывает возможное влияние аминокислотного замещения на структуру и функцию человеческого белка с использованием простых физических и сравнительных данных. Два набора данных были использованы для обучения и тестирования моделей прогнозирования PolyPhen-2. Первый, HumDiv, была составлена из всех повреждающих аллелей с известными эффектами на молекулярную функцию, вызывающую менделевские заболевания человека, присутствующими в базе данных UniProtKB, вместе с различиями между нормальными человеческими белками и их близкородственными гомологами млекопитающих. Второй, HumVar, состоял из всех мутаций, вызывающих заболевание человека, из UniProtKB, вместе с обычными человеческими полиморфизмами, частота которых (MAF) была больше > 1% без аннотированного участия в заболевании, которые рассматривались как не повреждающие.	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Mutation Taster	веб-приложение для оценки вариантов последовательности ДНК на предмет их потенциала вызыванm заболевание. Программное обеспечение выполняет ряд тестов in silico, чтобы оценить влияние варианта на генный продукт / белок	http://www.mutationtaster.org
PROVEAN	Protein Variation Effect Analyzer - это программный инструмент, который предсказывает, влияет ли аминокислотная замена или делеция/вставка на биологическую функцию белка. PROVEAN полезен для фильтрации вариантов последовательности, чтобы идентифицировать несинонимичные или неопределенные варианты, которые, по прогнозам, являются функционально важными.	http://provean.jcvi.org/index.php
LRT	Likelihood Ratio Test - отличить патогенные мутации от огромного количества нефункциональных вариантов, которые встречаются в одном геноме, - значительная проблема. Используя сравнительный набор данных геномов 32 видов позвоночных, LRT тест отношения правдоподобия может точно идентифицировать подмножество патогенных мутаций, которые нарушают высококонсервативные аминокислоты в кодирующих белок последовательностях, которые, вероятно, будут безусловно вредными. LRT также способен идентифицировать известные аллели болезней человека. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2752137/pdf/1553.pdf	http://www.genetics.wustl.edu/jflab/lrt_query.html

2.1.4. Методы субъективной оценки зрения пациентами

FLORA тест. Тест FLORA со шкалой от 0 до 35 баллов содержит 35 вопросов о ежедневной активности. Если пациент может выполнять все перечисленные активности самостоятельно, то результат теста = 35 баллов, если с какими-то процедурами пациент не справляется, то пациент указывает, с какими именно и это снижает количество баллов в зависимости от того, какие трудности испытывает пациент в повседневной жизни.

1. Можете ли вы определить источники освещения в окружении Вас?
2. Достаточно ли Вам дневного освещения из окна, чтобы ориентироваться дома?
3. Определяете ли Вы, когда включена/выключена домашняя лампа?
4. Можете ли Вы перемещаться по дому и ориентироваться в нем самостоятельно?
5. Можете ли Вы распознать человека?
6. Замечаете ли Вы проходящих мимо Вас людей?
7. Используете ли Вы искусственное освещение для ориентирования?
8. Замечаете ли Вы препятствия во время ходьбы?
9. Замечаете ли приближение людей, идущих Вам навстречу?
10. Определяете ли Вы направления идущих людей?
11. Можете ли Вы следовать за другим человеком?
12. Можете ли оценить размер препятствия перед Вами?
13. Можете оценивать расстояние до предметов, которые видите?
14. Можете ли определить место за обеденным столом?
15. Можете ли Вы идентифицировать предметы на различных дистанциях?
16. Распознаете ли Вы дверные проемы?
17. Видите ли Вы бордюры или ограждения на тротуаре?
18. Сталкиваетесь ли Вы с людьми, которые идут Вам навстречу?
19. Различаете ли Вы информационные знаки и указатели на улице?
20. Определяете ли Вы верхнюю и нижнюю ступени лестницы?
21. Можете ли Вы самостоятельно подниматься по лестнице?
22. Можете ли Вы распознать конкретного человека в общественном месте?
23. Можете ли Вы самостоятельно пересекать улицы по пешеходным переходам?
24. Можете ли визуально определить необходимую Вам одежду?
25. Различаете ли Вы день от ночи?
26. Можете ли Вы увидеть низко висящие ветки деревьев или высокие полки и т.д.?
27. Можете ли Вы определить еду на тарелке?
28. Можете ли Вы визуально найти в ванной необходимые Вам средства гигиены?
29. Можете ли Вы визуально найти на кухне необходимую посуду?
30. Можете ли Вы самостоятельно помыть посуду после еды?
31. Часто ли подвергаетесь ушибам, падениям, ожогам, травмам?
32. Комфортнее ли Вам в солнечное время для определения ориентации?
33. Можете ли самостоятельно нарезать продукты для готовки?
34. Можете ли самостоятельно разогревать еду?
35. Можете ли обнаружить необходимые Вам вещи в незнакомой обстановке?

При результатах теста FLORA менее 25 человек нуждается в ежедневной помощи посторонних людей.

VFQ-25 (visual functional questionnaire) – международно признанный стандартный опросник для определения качества зрения. Состоит из 25 вопросов и генерирует подшкалы, нацеленные на оценку зрения:. Баллы за каждый раздел суммируются.

- общий рейтинг зрения (1 балл),
- трудности с действиями для зрения вблизи (3 балла),
- трудности с действиями для зрения вдаль (3 балла),
- ограничения в социальных действиях из-за зрения (2 балла),
- ролевые ограничения выполнения работ из-за зрения (2 балла),
- зависимость от других из-за зрения (3 балла),
- симптомы психического здоровья из-за зрения (4 балла),
- трудности с вождением (3 балла),
- ограничения периферического (1 балл) и цветового зрения (1 балл)
- глазная боль (2 балла)

ИТОГО: 25 баллов.

Подробное описание методики проведения находится на странице National Eye Institute США https://www.nei.nih.gov/sites/default/files/2019-06/manual_cm2000.pdf

Непосредственно опросник: https://www.nei.nih.gov/sites/default/files/2019-06/vfq_ia.pdf

Интерпретация результатов опросника представлена в табл. 2.

Табл. 2. Интерпретация результатов опросника VFQ-25.

Номер вопроса	Шкала	Статус	Доп. №вопроса	Шкала
1	общее здоровье	S	1	социальная фиксация/ зрительный контакт
2	общее здоровье	A	A1	социальная фиксация/ зрительный контакт
3	общее зрение	S	2	социальная фиксация/ зрительный контакт
4	ожидания от зрения			зрение вдаль
5	уровень благополучия/стресса	S	3	зрение вдаль
6	уровень благополучия/стресса			зрение вдаль
7	глазная боль	S	19	вождение авто
8	ожидания от зрения			вождение авто
9	ожидания от зрения			вождение авто
10	ожидания от зрения			вождение авто
11	уровень благополучия/стресса	S	25	вождение авто
12	глазная боль	S	4	вождение авто
13	уровень благополучия/стресса			вождение авто
14	общее зрение	A	A2	ограничения позиций
15	зрение вблизи	S	5	ограничения позиций

16	зрение вблизи	A	A3	уровень благополучия/ стресса
17	зрение вблизи	S	6	ограничения позиций
18	зрение вблизи			ограничения позиций
19	зрение вблизи	S	7	ограничения позиций
20	зрение вдаль	S	8	уровень благополучия/ стресса
21	зрение вдаль			зависимость
22	зрение вдаль	S	9	уровень благополучия/ стресса
23	периферическое зрение	S	10	уровень благополучия/ стресса
24	зрение вдаль	A	A6	зависимость
25	социальная фиксация/ зрительный контакт	S	11	зависимость
26	зрение вблизи	A	A4	зависимость
27	цветовое зрение	S	12	зависимость
28	зрение вблизи	A	A5	

При количестве баллов менее 15 человек испытывает крайние затруднения, связанные со зрением и нуждается в ежедневной помощи посторонних людей.

Методика оценки мобильности при разной шкале освещенности Multi-Luminance MobilityTesting – MLMT: после 40 минут темновой адаптации пациенты проходили тест – полосу препятствий при различном уровне освещенности, начиная от первого и заканчивая шестым (табл. 3) сначала с закрытым левым глазом, затем с открытым правым глазом, затем завершали третью конфигурацию с обоими открытыми глазами (рис.16). Этот процесс повторялся до тех пор, пока не были определены пороговые значения уровня освещенности для каждого патологического состояния, переходя от более низкого к заранее заданному уровню освещенности. Прохождение теста участниками оценивалось по точности и скорости (рис.15). Успешным считалось завершение курса на указанном уровне люкс, если было менее четырех ошибок и препятствия удавалось пройти в течение 3-х минут.

Табл. 3. Методика оценки мобильности при разной шкале освещенности Multi-Luminance MobilityTesting – MLMT

Уровень освещенности	**Количество люкс**	**Иллюстрация освещенности в повседневной жизни**
0	400	Ярко освещенный офис
1	250	Освещенность внутри лифта
2	125	Освещенность внутри машины ночью
3	50	Транспортная остановка ночью
4	10	Город через час после заката
5	4	На парковке ночью
6	1	Безлунная летняя ночь

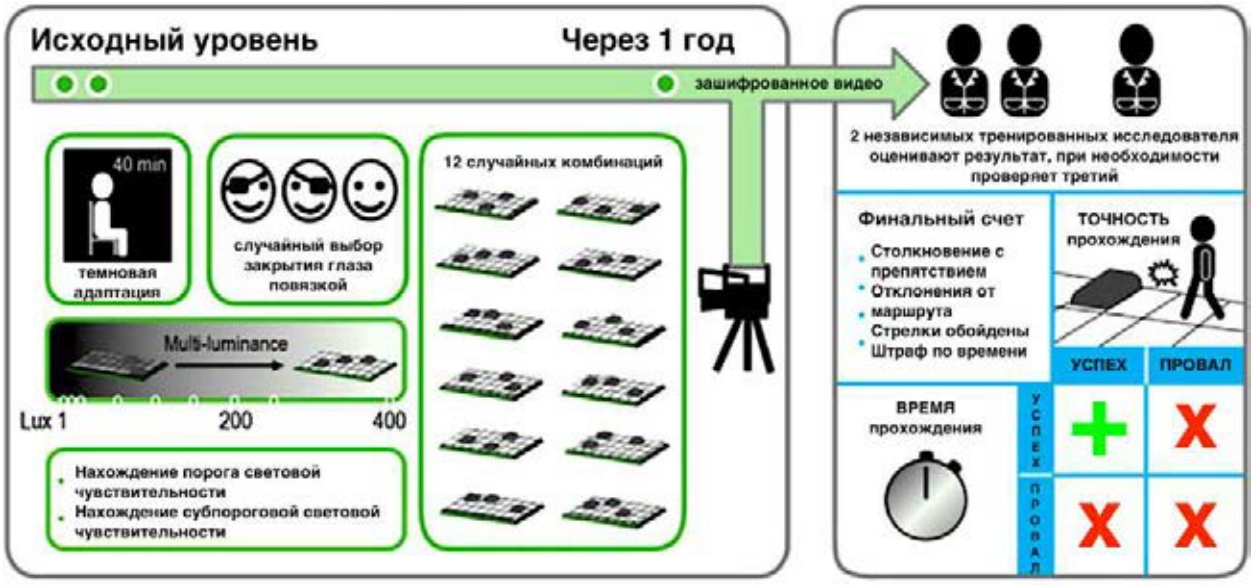


Рис. 15. Критерии оценки теста на подвижность с переменной яркостью (MLMT). После 40 минут адаптации к темноте пациенту одевали повязку на каждый глаз по очереди, а затем без повязки на глаза, нужно было пройти один из 12 случайных MLMT. Тестирование проводилось на уровне пороговой светочувствительности и предполагаемом более низком уровне светочувствительности. Видеозаписи прохождения пациентом теста оценивались удаленно де-идентифицированно двумя обученными независимыми исследователями, а третий при необходимости оценивал их результаты. Окончательная оценка была рассчитана на основе точности и времени, необходимого для прохождения полосы препятствий, с учетом всех штрафов по времени и точности прохождения. Для сдачи MLMT необходимо было получить проходной балл по обоим компонентам. Рисунок создан на основе работы Daniel C Chung и соавт., 2018 по разработке методологии оценки мобильности при крайне низких зрительных функциях.

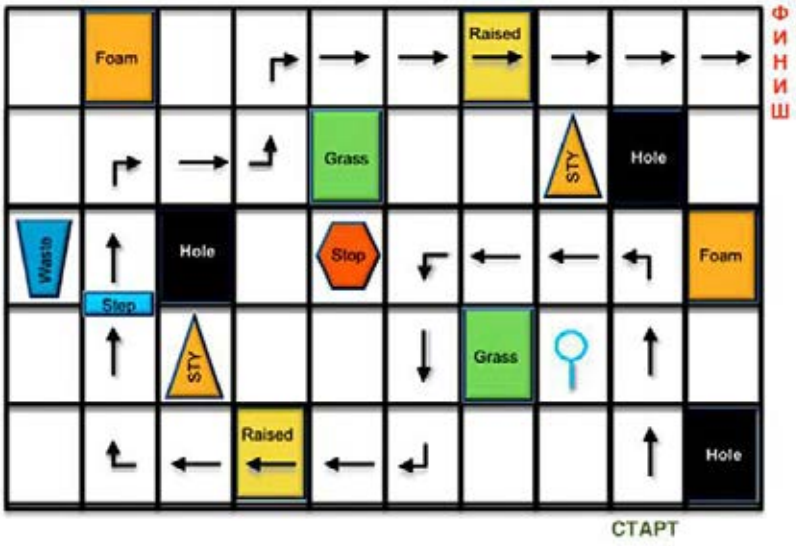


Рис.16. Макет тестового образца MLMT теста с разной яркостью. Препятствия включают две приподнятые ступени со стрелками (5 см в высоту), две плитки с травой (Grass), три черные плитки, представляющие дыры (Hole), два приподнятых пеноблока (высота 12 см^ Foam), два

конуса из пенополистирола (STY), один знак остановки (регулируемый от 100 до 180 см в высоту, STOP), одно препятствие для перешагивания (23 см в высоту, Raised), одно препятствие высотой по пояс (в виде синего дерева, 70 см в высоту, Waste) и одна корзина для мусора (30 см в высоту). Рисунок создан на основе меморандума Yao-Yao Zhu, 2017.

Табл. 4. Количество баллов шкалы, присваиваемых тесты MLMT в зависимости от степени освещенности.

	Освещение в Люкс							
	1	4	10	50	100 и 150	200 и 250	400	>400
Количество баллов	**6**	**5**	**4**	**3**	**2**	**1**	**0**	**-1**

Оценка изменения теста на подвижность по яркости, двусторонняя оценка, базовый

2.1.5. Гистологические исследования

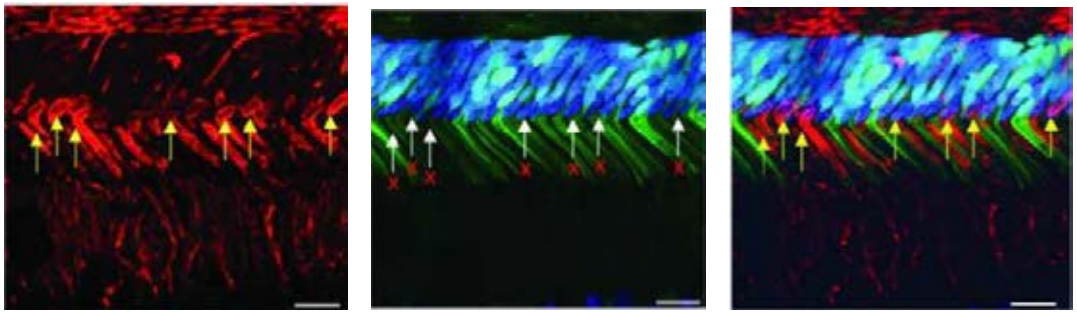
Для определения успеха трансфекции клеток сетчатки вирусным вектором, несущим ген *RPGR* (rAAV2tYF-GRK1-hRPGRco) проводились гистологические исследования, в которых изучалась экспрессия транслируемых белков в культивируемых клетках фоторецепторов и РПЭ человека, находящихся в жидкой среде со специальным набором питательных сред (Capricorn FBS-11A, RPMI-XA, GLN-B, Helicon) (Рис. 17А).

На рис. 17Б иллюстрирован срез клеток сетчатки, содержащий большое количество колбочек, которые для контрастирования были окрашены на S-антиген (антителами к аррестину колбочек, указаны красным цветом). На рис. 17В клетки фоторецепторов были контрастированы синим красителем DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) – который связывается с двухцепочечной ДНК и контрастирует ярче ядра клеток. GFP – green fluorescent protein – зеленый флуоресцентный белок, который флуоресцирует в зелёном диапазоне при освещении его светом определенного диапазона, был применен в сродстве к палочкам в качестве светящейся метки, куда был доставлен в количестве 100 мкл на промоторе IRBP (межфоторецепторный связывающий промотор) AAV2/5- IRBP-eGFP в титре $3x10^{11}$ вирусных геномов на мл. Его проникновение наблюдалось в палочках и отсутствовало в колбочках. Таким образом была достигнута возможность дифференцированно оценивать успех трансфекции вирусным вектором, несущим ген *RPGR* (rAAV2tYF-GRK1-hRPGRco) в палочки, но не колбочки, благодаря различию окрашивания. На рис. 17Г иллюстрировано наложение окрашенных срезов палочек и колбочек. Проводили количественную анатомическую оценку локализации трансфицированного генотерапевтического конструкта rAAV2tYF-GRK1-hRPGRco в клетках РПЭ и отдельно в

фоторецепторах на 8-й неделе после инъекции высокими титрами AAV2 с использованием промотора GRK1 (родопсин киназа 1).

Анализировались изображения микро срезов с подсветкой в спектре 820 нм (ближний инфракрасной), показывающие флуоресценцию клеток сетчатки, обработанной 100 мкл раствора, содержащего $2x10^{12}$ вирусных кодон-оптимизированных (co) геномов rAAV2tYF-GRK1-hRPGRco. В подмножестве срезов, чтобы очертить границу слоя РПЭ и фоторецепторов, использовались специальные алгоритмы и отраженная визуализация в проходящем свете.

А



Б В Г

Рис. 17. А. Использованные питательные культуральные среды (фото взято с сайта производителя Capricorn https://www.capricorn-scientific.com. Б. Желтыми стрелками показаны фоторецепторы-колбочки, окрашенные антителами против аррестина колбочек (красный). В. Белыми стрелкми указана экспрессия зеленого флуоресцентного белка GFP (green fluorescent protein), прицельно доставленного в фоторецепторы-палочки. Г. Совмещенные срезы окрашивания палочек и колбочек, доказывающие успех трансфекции палочек сетчатки вирусным вектором, несущим ген *RPGR* (rAAV2tYF-GRK1-hRPGRco) и отсутствие трансфекции в колбочки сетчатки. Длина шкалы на рис. Б, В, Г составляет 17 мкм. Фото результатов совместного иммуногистохимического анализа (Б, В, Г) использованы с разрешения Dr. Aguirre G.D.

2.1.6. Дифференциальная диагностика

Дифференциальная диагностика является важным этапом наблюдения и лечения пациентов. Она проводилась с помощью разработанного на основании литературных данных и собственного опыта алгоритма, детально приведенного в табл.5. Спектр наследственных дистрофий сетчатки является широким и включает в себя расстройства, которые в первую очередь влияют на макулу (например, болезнь Штаргардта и дистрофия Беста), и не прогрессирующие расстройства, такие как ахроматопсия и врожденная стационарная ночная слепота (CSNB) (Ivanova ME, Zolnikova IV, Gorgisheli KV et al., 2019). Для диагностики ПР в этом спектре применяют как относительно объективные критерии (симптомы, аномалии глазного дна, результаты ЭРГ), так и кажущиеся произвольными критерии (возраст пациента вначале заболевания, данные анамнеза). При классификации наследственных дистрофий сетчатки важно учитывать **весь ход течения заболевания**, так как некоторые фенотипы имеют тенденцию перекрываться на поздних стадиях (рис.1). Список нозологий, синдромов и состояний для дифференциальной диагностики при ПР приведен в табл. 5

Табл. 5. Частота встречаемости различных видов центральных и периферических генетически обусловленных дистрофий сетчатки и их дифференциальная диагностика.

*Кол-во**	*Заболевание*	*Клинические признаки*
152	**СИНДРОМНАЯ ФОРМА**	
86	***Цилиопатии***	
67	Ашера/Ушера синдром	ПР с частичной или полной сенсонейрональной тугоухостью, иногда вестибулярные аномалии
11	Барде-Билля синдром	ПР и ожирение, постаксиальная полидактилия, гипогонадизм, дисфункция почек, когнитивные нарушения
1	Коэна синдром	ПР и миопия, задержка умственного развития, гипотония, фасциальный дизморфизм, нейтропения, невысокий рост.
3	Жубера синдром	ПР/ LCA с дизморфичными лицевыми признаками, врожденная гипотония, переходящая в атаксию, задержка развития, нехарактерное быстрое/медленное дыхание. Окуломоторная апраксия и нистагм иногда присутствуют. Характерный признак на МРТ «признак коренного зуба».
2	Сениора-Локена синдром	ПР / LCA и нефронофтиз
1	Краниоэктодермальная дисплазия	ПР и краниосиностоз, эктодермальные аномалии
1	Майнцер-Сальдино синдром	ПР и торакальная гипоплазия, невысокий рост, брахадактилия, полидактилия, хроническая почечная недостаточность (иногда летальная), дыхательная недостаточность.
28	***Метаболические нарушения***	
5	Недостаточность белка-переносчика альфа-токоферола	ПР с атаксией (Фридриха), дизартрией, снижением проприоцепции и гипорефлексией.
3	Бассена-Корнцвейга синдром	атипичный ПР с началом в 1-2 десятилетии жизни. Широкий спектр аномалий, в том

	(абеталипопротеинемия)	числе прогрессирующая церебеллярная атаксия, желудочно-кишечные аномалии, акантоцитоз, отсутствие апо-В липопротеинов.
7	Мукополисахаридоз	6 типов группа заболеваний ПР, помутнение роговицы, глаукома, различные симптомы разной степени – от когнитивных нарушений, задержки развития, снижение слуха, гидроцефалия, лицевые аномалии, карликовость, гепатоспленомегалия.
3	Нейрональный цероидный липофусциноз (болезнь Баттена)	ПР с ранним снижением остроты зрения, на ФАГ диффузные очаги атрофии РПЭ с пунктирной гиперфлуоресценцией, прогрессирующая нейродегенерация, приступы эпилепсии, иногда ранняя смерть
4	Болезнь Рефсума	ПР и аносмия, миоз, ослабленный эффект мидриатиков, повышенный уровень фитановой кислоты, снижение слуха, атаксия, полинейропатия, ихтиоз, кардиопатия
2	Мевалоновая ацидурия	периодический фебрилитет, лимфаденопатия, артралгия, нарушения ЖКТ, сыпь на коже, повышенные уровни иммуноглобулина Д в крови. Часто психомоторная задержка, прогрессирующая мозжечковая атаксия.
2	HARP синдром	ПР с гипо пребета липопротеинемия, акантоцитоз, дегенерация pallidum на МРТ признаки «тигровый глаз». Спектр признаков сходен с пантотенат киназной нейродегенерацией.
2	PHARC синдром	ПР с полинейропатией, потерей слуха, мозжечковой атаксией и ранней катарактой.
38	***Митохондриальные заболевания***	
2	Кернса-Сайре синдром	ПР с прогрессирующей наружной офтальмоплегией, дефектами проводимости сердца, мозжечковой атаксией, повышенной концентрацией белка в спинномозговой жидкости. Начало до 20 лет
34	Нейропатия Лебера (LHON)	
2	NARP синдром	ПР и периферическая нейропатия, слабость мышц (начало с верхнего плечевого пояса), атаксия
2620	**ИЗОЛИРОВАННАЯ ФОРМА**	
980	Прогрессирующая палочко-колбочковая дистрофия	обычно пациенты теряют остроту зрения, дисхроматопсия, фотоаверзия, возможна никталопия. На ЭРГ признаки потери колбочковой функции, затем палочковой. Выделяют спорадическую, доминантную, рецессивную, Х-сцепленную формы
1121	Колбочковая дистрофия, в т.ч. диагноз «возрастная макулодегенерация»	прогрессирующая потеря остроты зрения. Дисхроматопсия, фотоаверзия, фотофобия, в макуле от нормальной до бычьего глаза макулопатии и атрофия РПЭ. Сниженная или нерегистрируемая фотопическая ЭРГ
12	Амавроз Лебера	раннее начало дистрофии с рождения или в первые месяцы жизни, нистагм, гиперметропия, амавротические зрачки, окулодигитальные симптомы, исчезающая фотопическая и скотопическая ЭРГ.
140	Макулодистрофия Б-нь Штаргардта, Сорсби	прогрессирующая потеря остроты зрения, в далеко зашедшей стадии иногда ассоциирована с ночной слепотой и потерей периферического зрения
2	Бьетти кристаллиновая дистрофия	бело-желтые кристаллиновые отложения на сетчатке и иногда в лимбе роговицы. Склероз хориоидальных сосудов. Часто заметная асимметрия проявлений в глазах.
357	Дистрофия сетчатки с поздним началом	перимакулярные бело-желтые очаги подобные друзам, гиперпигментация по средней периферии, постепенная потеря ночной адаптации на 5-6 десятилетии жизни. Сниженная острота зрения в далеко зашедшей стадии заболевания, атрофия РПЭ, неоваскуляризация, снижение ЭРГ (палочко-колбочковый паттерн). Нормальный калибр сосудов сетчатки
8	Не прогрессирующая врожденная стационарная ночная слепота	в большинстве случаев непрогрессирующая ночная слепота, ассоциированная с миопией, снижением остроты зрения, раннее начало заболевания, Наиболее часта негативная ЭРГ при темновой адаптации. Болезнь Огуши и белоточечное глазное дно – формы этого заболевания, полная и неполная.
14	***Хориоретинальная дистрофия***	
4	Хориоидеремия	Х-сцепленная, глыбки пигмента на уровне РПЭ, местами потеря слоя РПЭ, сосуды хориоидеи и склера просвечивают сквозь истонченную сетчатку. Сосуды сетчатки нормального калибра
4	Атрофия гирате (girate)	хорошо отграниченные, круглые зоны хориоретинальной атрофии, обычно начинающиеся с дальней периферии, раннее начало катаракты, миопия, кистозный макулярный отек, повышенные уровни орнитина в крови, атрофия мышечных волокон второго типа, истончение волос.
2	Серповидная перипапиллярная хориоретинальная дистрофия	аутосомно-доминантная, перипапиллярная хориоретинальная атрофия, с радиально расширяющейся в виде крыльев атрофией. Сосуды сетчатки нормального калибра

4	Прогрессирующая бифокальная хориоретинальная дистрофия	медленно прогрессирующая, большие атрофические очаги в макуле и с носовой стороны от диска зрительного нерва. Нистагм и миопия
32	***Витреоретинальная дистрофия***	
18	Х-сцепленный ювенильный ретиношизис	потеря остроты зрения в 1-2 декаде жизни, кистоидный макулярный отек, типично в виде спицы колеса, периферический шизис в 50% случаев. ЭРГ – селективное снижение в амплитуде в-волны.
9	Гольдмана-Фавре синдром	ЭРГ – патогномоничные признаки повышенной чувствительности S- колбочек. Вариабельный фенотип. Отличительный признак – монетообразные пятна пигментации РПЭ, и кистоидный шизис макулы. Ночная слепота с рождения и снижение остроты зрения
3	Вагнера синдром	оптически пустое стекловидное тело с аваскулярными тяжами и «занавесками», пресенильная катаракта, умеренная миопия, прогрессирующая хориоретинальная атрофия иногда с диффузными пигментными изменениями, снижение остроты зрения, ночная слепота, сужение полей зрения. Отслойка сетчатки в развернутой стадии заболевания.
2	Витреоретинопатия "снежные хлопья"	аутосомно-доминантная форма, сальные «капли» на эндотелии роговицы, катаракта, фибриллярная дегенерация стекловидного тела, отслойка сетчатки, периферическая дегенерация сетчатки, в том числе кристаллиновые отложения, похожие на снежинки, сужение сосудов сетчатки, хориоретинальная пигментация.
21	***Женщины-носительницы наследственных заболеваний сетчатки***	
6	Пигментный ретинит	очень вариабельный фенотип – от нормального до развернутого фенотипа пигментного ретинита. Возможен рефлекс с глазного дна в виде тапеса, «ковра» (специфический металлический оттенок)
3	Хориоидеремия	в большинстве случаев носители асимптоматичны, однако иногда отмечаются схожие с мужчинами очаги хориоретинопатии и изменения на ЭРГ.
12	Глазной альбинизм	носительницы GPR143 альбинизма – лоскутная гипопигментация РПЭ, трансиллюминация радужной оболочки
187	**ПСЕВДОРЕТИНИТ**	
8	Ятрогенные (побочное действие лекарств)	
3	Хлорпромазин	монетоподобные очаги потери РПЭ, ликедж хориокапилляров. Часто формирование заднекапсулярной катаракты
5	Хинолины/хлорохины	макулопатия по типу бычьего глаза, перицентральная ретинопатия. В случае отравления расширенные зрачки, затем миоз, отсроченные изменения на глазном дне
48	Хориоретинальные инфекции	
48	Сифилис, Болезнь Лайма, Краснуха, Цитомегаловирус	часто одностороннее или секторальное поражение
131	Последствия инфекционного заболевания	
109	Саркоидоз	малые гранулематозные очаги, узелки в трабекулярном аппарате, хлопья в стекловидном теле, узелковый сегментарный перифлебит, гранулемы в легких, лимфоузлах, коже, печени, селезенке, слюнных железах, сердце, костях и нервной системе
2	Мультифокальная плакоидная пигментная эпителиопатия	внезапная потеря остроты зрения, центральные скотомы, благоприятный прогноз восстановления зрительных функций
2	Хориоретинопатия "выстрел дробью"	постепенное снижение остроты зрения вследствие кистоидного макулярного отека, глэр эффект, дисхроматопсия, фотопсии, кремовые неправильные или вытянутые хориоидальные очаги, начинающиеся от зрительного нерва. Патогномонично HLA-A29+ и ретинальный васкулит.
3	Серпингинозная хориопатия	потеря остроты зрения, метаморфопсии, центральная скотома, рецидивирующие серо-желтые субретинальные инфильтраты, распространяющиеся в виде серпантина, в исходе атрофия. Билатеральное, но асимметричное течение.
3	Подострый нейроретинит	ранняя стадия: витреит, папиллит, сгруппированные желто-серо-белые очаги. Поздняя стадия – атрофия зрительного нерва, сужение артерий, усиленный рефлекс от внутренней пограничной мембраны (признак Орефис), субретинальный тоннель

		(признак Гарсия). Диффузная дегенерация РПЭ, афферентный зрачковый дефект.
12	Системная красная волчанка	характерные системные проявления – лихорадка, боль в суставах, сыпь., ватные очажки на сетчатке
488	**РАЗНОЕ**	
0	Недостаточность витамина А	ксерофтальмия и ночная слепота, желтые и белые очаги на периферии сетчатки. Симптомы проходят при лечении витамином А
12	Паранеопластические процессы	фотопсии, онкология в анамнезе, наиболее часто молочная железа, легочная карцинома, меланома
178	Травма	анамнез, односторонний процесс
2	Сидероз	анамнез, односторонний, внутренние слои сетчатки затронуты больше внешних
1	Пигментная паравенозная ретинохориоидальная атрофия	накопление пигмента исключительно вдоль сосудов, не прогрессирует (или очень медленно прогрессирует). Этиология неизвестна
12	Острая закупорка артерии сетчатки	острое начало, изначально обычно односторонний, скотомы, фотопсии, глазное дно часто нормальное, затем признаки нарушения РПЭ, ЭРГ – задержка 30 Гц колбочкового ответа на вспышку. ЭОГ – снижение.
283	Другое	

*В первом столбце указано количество пациентов в исследуемой группе с утвержденным диагнозом после проведения дифференциальной диагностики.

2.2. Методы лечения моногенных заболеваний сетчатки

2.2.1. Методика проведения стандартного поддерживающего лечения

При обнаружении точной причины развития заболевания необходимо направить все лечебные мероприятия на то, чтобы снизить влияние патологического фактора на развитие болезни. Причину развития заболевания можно выяснить лабораторным и клиническим путем. Когда точной причины выяснить не удается, то применяют набор общеизвестных препаратов, в числе которых:

- Тауфон или Вита-таурин или Рибофлавин-мононуклеотид или Сермион курсом 10 дней.
- Милдронат (в/м) или Мильгамма (в/м) 10 уколов или Комбилипен - комплекс витаминов группы В.
- Трентал (таблетки) курс по показаниям.
- Нобен (капсулы) - ноотропный препарат, повышает синтез АТФ или уколы АТФ 10 шт в/м два раза в год.
- Фезам (пирацетам, циннаризин) - ноотропное, сосудорасширяющее средство.
- Физиотерапия / Магнитофорез – курс по показаниям
- Витамины: Перфект айз или Нутроф-тотал или Лютеин форте или Вазонит.

- Кортексин - ноотропные, полипептидные средства.

Выбор комплекса препаратов, дозировки и кратность/частота их применения утверждаются непосредственно врачом, проводящим лечение и наблюдающим пациента регулярно (табл.6).

Не показано или применяется при дистрофиях сетчатки с осторожностью:

1. Семакс – ноотропное средство, пептид, аналог фрагмента гормона АКТГ
2. Ретиналамин, эффективность его не доказана

В медицинской практике западных стран принята наблюдательная тактика без назначения не доказавших свою эффективность препаратов.

Табл. 6. Характеристика применяемых препаратов и процедур для проведения стандартных схем лечения в группе 3.

Кол-во пац-тов	**Диагноз**	**Группа препаратов**	**Препарат**	**Кратность приема**	**Длительность лечения**	**Путь приема**
184	RP, MD. STGD, LCA, CRD	Олигопептиды	Ретиналамин (полипептиды сетчатки глаз скота)	1 р/сут	10 уколов	п/б
293	STGD, RP, CRD	Метаболиты	Милдронат	2 р/сут	30 таб.	п/о
			АТФ (аденозин трифосфат натрия)	1 р/сут	10 уколов	в/м
328	CSNB, RP, MD. STGD, LCA, CRD	Ноотропные препараты	Нобен (идебенон) Сермион	2 р/сут	30 таб.	п/о
			Фезам, пирацетам, циннаризин	1 р/сут	30 таб.	п/о
			Кортексин	1 р/сут	30 таб.	п/о
440	CSNB, ESCS, RP, MD. STGD, LCA, CRD	Витамины	Нутроф тотал, перфект айз	1 р/сут	90 таб.	п/о
			Вита-таурин, тауфон	1 р/сут	Курс 1 мес.	м/к
			Рибофлавин	1 р/сут	10 уколов	в/м
			Мильгамма,	1 р/сут	10 уколов	в/м
92	MD	Пигментные добавки	Лютеин/зеаксантин	1 р/сут	90 дн	п/о
			Вазонит	1 р/сут	90 дн	п/о
65	RP, STGD	Магнитоофрез		1 р/сут	10 процедур	м/к

CSNB - congenital stationary night blindness - врожденная стационарная ночная слепота. ESCS - enhanced S-cone syndrome - синдром повышенного ответа колбочек. MD - macula dystrophy - макулярная дистрофия (ранняя форма). LCA - Leber congenital amaurosis - врожденный амавроз Лебера. CRD - cone-rod dystrophy - колбочко-палочковая дистрофия. RP - retinitis pigmentosa - пигментный ретинит. STGD - болезнь Штаргардта

п/б – парабульбарно, п/о – перорально в/м – внутримышечно м/к – местно капельно

2.2.2. Методика проведения патогенетического лечения

Лекарственные препараты: применение генотерапевтических и низкомолекулярных лекарств в этом исследовании было одобрено в рамках проведения клинических исследований локальным этическим комитетом (г. Москва), уведомление о проводимом клиническом исследовании было направлено в Департамент государственного регулирования обращения лекарственных средств Министерства Здравоохранения РФ, а также зафиксировано в ЦИТИС (Центр информационных технологий и систем органов исполнительной власти) под номером #9170816000066. Расчеты медико-социальной и экономической эффективности от внедрения предложенных методов лечения были проведены совместно с представителями Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр экспертизы и контроля качества медицинской помощи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ “ЦЭККМП” Минздрава России).

Схемы введения лекарственных препаратов. Генная терапия изменяет экспрессию генов для лечения заболеваний, связанных с недостаточностью или некорректной функцией того или иного гена. Это может включать стратегии «починки» генов или введения новых генов в клетки. Процесс намеренного внедрения функционирующих генов в клетках называется трансфекцией и осуществляется с помощью вектора, обычно вирусного.

Новый ген может функционировать как неотъемлемая часть генома, что означает продолжение функционирования после деления клеток или он может функционировать физически отделенным от хромосомной ДНК трансфицированной клетки и обычно не передается при делении клетки. Одна из центральных задач генной терапии – доставка гена в нужное место и включение его, избегая иммунных реакций, которые могут сделать генную терапию неэффективной или нанести вред пациенту, и убедиться, что новый ген не нарушает функции других генов.

Генотерапевтические препараты в текущей клинической практике вводятся в основном субретинально (рис. 18В) однократно в течение жизни, что сопряжено с рядом интраоперационных и ранних постоперационных осложнений, о которых более подробно сказано в главе 7. Антисмысловые нуклеотидные последовательности вводятся в основном интравитреально и субретинально (рис. 18А,В) и требуют частоты введения 1 раз в несколько месяцев (в устоявшейся практике раз в 4-6 месяцев).

Наблюдается тенденция перехода в ближайшие годы в клинической практике к супрахориоидальному (рис. 18Б) введению лекарственных препаратов, нацеленных на лечение

моногенных заболеваний сетчатки, так как данный способ введения лишен некоторых серьезных побочных эффектов по сравнению с субретинальным и не требует частого введения, как в случае интравитреального введения. Также перспективным является разрабатываемый метод таргетной доставки к определенным клеткам сетчатки (РПЭ, фоторецепторов, ганглиозных клеток) при внутривенном введении препарата, который содержит наночастицы на липосомах, которые распознаются рецепторами только таргетных типов клеток, но данный подход пока еще не вышел на этап клинических исследований.

А Б В

Рис.18. Схема интравитреального (А), супрахориоидального (Б) и субретинального (В) введения препаратов в условиях стерильной операционной. Схема взята из материала Szilárd Kiss, MD https://www.retinalphysician.com/issues/2020

В связи с тем, что данный тип операций является затратной высокотехнологичной микроинвазивной процедурой, требующей введения лекарства в строго определенный слой сетчатки, операции проводились под контролем ОКТ (рис. 19).

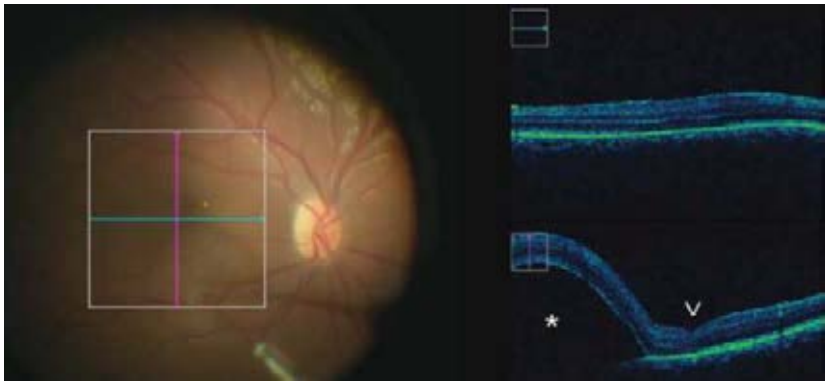


Рис.19. Субретинальный пузырь при введении лекарственного препарата rAAV8tYF-CB-hCNGA3 . Звездочкой указано субретинальное пространство, куда проводилась инъекция. Изображение использовано с разрешения витреоретинального хирурга Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt, проводившего инъекцию и обладающего правами на данное изображение.

Дозировка, кратность и спецификация применяемых генотерапевтических препаратов, для пациентов с подтвержденными генетическими мутациями в тех случаях, когда

зарегистрированные или находящиеся в фазе экспериментальной разработки препараты были доступны, представлены в табл 7**.**

Генотерапевтические препараты в текущей клинической практике вводятся в основном *субретинально* либо *интравитреально*. В случае метаболических нарушений, возникающих в результате мутаций в гене *CLN3* (болезнь Баттена, нейрональный цероидный липофусциноз), одним из манифестирующих признаков является пигментный ретинит, который без лечения прогрессирует. Болезнь Баттена – редкое, часто смертельное нейродегенеративное рецессивно наследуемое заболевание, начинающееся в детстве, наиболее частое заболевание из группы липофусцинозов нейронов. В ходе заболевания в клетках нервной системы скапливаются жировые вещества, что приводит к потере речи, нарушению зрения, задержке умственного развития, эпилепсии. Трансфекцию здоровой копии причинного гена при лечении болезни Баттена (*CLN3*) на вирусном носителе AAV9, тропном к нервной ткани, проводят однократно *интратекально* в количестве 2 мл 2×10^{12} вирусных геномов на мл в условиях стерильной нейрореанимации (табл.7).

В случае пигментного ретинита, ассоциированного с мутацией в гене *C19orf12* происходит избыточное накопление железа в головном мозге. Белок C19orf12 локализован в основном в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и в мембране митохондрий. Заболевание характеризуются первоначально изменениями походки, сопровождающимися прогрессирующим спастическим парезом, прогрессирующей дистонией (которая может быть ограничена руками и ногами или быть более общего характера), психоневрологическими нарушениями (например, эмоциональной лабильностью, депрессией, беспокойством, импульсивностью, галлюцинациями, невнимательностью и гиперактивностью), снижением когнитивных способностей. Дополнительные ранние признаки включают дисфагию, дизартрию, атрофию зрительного нерва, аксональную нейропатию, паркинсонизм и недержание кала/мочи. Обычно пациенты доживают до взрослого возраста, но не оставляют потомства. Конечная стадия заболевания характеризуется тяжелой деменцией, спастичностью, дистонией и паркинсонизмом. В последние пять лет для купирования признаков заболевания применяют хелатные препараты железа, в том числе деферипрон (не зарегистрирован в РФ), который принимают в капсулах ежедневно по 500 мг, для уменьшения накопления железа в нейронах головного мозга с целью снижения потенциального прогрессирования неврологической симптоматики. Регулярное применение хелатных препаратов железа назначают в течение 2 лет с оценкой клинического и функционального состояния, проведения МРТ в динамике.

Генное *редактирование* в случае **рецессивных** моногенных заболеваний сетчатки проводили на AAV2 носителе, тропном к клеткам сетчатки, однократно в дозировке от 4.0×10^{10} до 3.0×10^{12} вирусных геномов на дозу в объеме жидкости от 0,15 до 0,5 мл (Табл. 7).

Применение блокирующих мутировавший участок *антисмысловых нуклеотидных последовательностей* в случае **рецессивных** моногенных заболеваний сетчатки проводился в дозировках от 750 мг до 1200 мг действующего вещества на один глаз интравитреально кратностью 1 раз в полгода. При отсутствии осложнений второй глаз проводили инъекцию на 6-12 день.

Генное редактирование в случае **доминантных** заболеваний проводили с применением системы CRISPR/Cas9 в дозировках 1.0×10^{12} – 2.0×10^{12} вг/мл в объеме 0.5 мл (Табл. 7). Несмотря на значительный прогресс в понимании системы CRISPR/Cas9, сохраняются опасения по поводу ее нецелевых эффектов и как следствие побочных действий препарата.

Табл. 7. Характеристика применяемых препаратов для проведения патогенетического направленного лечения в группе 1.

К-во	Ген	Носитель	Метод лечения	Кратность	Доза, вг/гл	Протокол лечения	Метод доставки
5	*RS1*	AAV2	г/т rAAV2tYF-CB-hRS1	однокр.	0,5 мл с 4×10^{10} вг/глаз	NCT02416622	интравитреально
2	*RPGR*	AAV2	г/т rAAV2tYF-GRK1-hRPGRco	однокр.	0.15 мл с 3.0×10^{12} вг/мл	NCT03252847	субретинально
2	*RPE65*	AAV2	г/т rAAV2-CB-hRPE65	однокр.	0.45 мл с 1.33×10^{12} вг	NCT00749957	субретинально
3	*CLN3*	AAV9	г/т scAAV9.P546.CLN3	однокр.	2 мл 2×10^{12} вг/мл	NCT03770572	интратекально
2	*CDHR1*	AAV8	г/т rAAV8-CB-hCDHR1 +	однокр.	0.3 мл с 3.0×10^{12} вг/мл	–	субретинально
			Рисутеганиб	1р./мес. в теч. 3 мес.	1,0 мг	NCT03626636	интравитреально
2	*CNGA3*	AAV2	г/т AAV2-hArr3-nCNGA3	однокр	0.5 мл с 5.0×10^{11} вг/глаз	NCT03758404	субретинально
2	*CNGB3*	AAV2/8	г/т AAV2/8-hCARp.hCNGB3	однокр	0.5 мл с 5.0×10^{11} вг/глаз	NCT03001310	субретинально
3	*CEP290*	–	AON	1р./6 мес.	900 мг AON / гл	NCT03913130 NCT03872479	интравитреально
8	*EYS*	–	AON	1р./6 мес.	1200 мг AON / гл	NCT04127006	интравитреально
13	*USH2A*	–	AON	1р./6 мес.	750 мг AON / гл	NCT03780257	интравитреально
1	*CRB1*	–	AON	1р./6 мес.	1100 мг AON / гл	–	интравитреально (преретинально)
2	*NR2E3*	AAV2	г/т CRISPR	однокр	0.5 мл с 1.0×10^{12} вг/мл	–	субретинально
			Интерферон гамма-1b	4 раза в день в течение 2 недель	По 1 капле в глаз, суточная доза 112 мг	NCT02338973	глазные капли
2	*RHO*	AAV2	г/т CRISPR	однокр	0.4 мл с 2.0×10^{12} вг/мл	NCT04123626	субретинально
1	*C19orf12*	–	Fe (Деферипрон)	1 р/день. / 24 мес.	500 мг табл.	–	перорально

г/т – генная терапия, AON – антисмысловые олигонуклеотиды NCT – номер клинического исследования, вг/гл – кол-во вирусный геномов на 1 глаз.

На текущий момент применяется компромиссная сбалансированная по активности и специфичности система CRISPR/Cas9, которая идентифицирует расщепление ДНК вне целевого региона с помощью техники глубокого секвенирования всего генома. Цистидиновые редакторы (cytidine base editors CBEs) и адениновые редакторы (adenine base editors ABEs) соответственно вызывают редактирование РНК вне мишени во всем транскриптоме. Нецелевой эффект можно уменьшить с помощью выбора и оптимизации коротких направляющих РНК. Недавно разработанные белки анти-CRISPR могут также контролировать активность системы CRISPR, что может также снижать нецелевые эффекты воздействия. Необходима разработка более чувствительных методов для обнаружения нецелевого редактирования как на уровне генома, так и на уровне транскриптома.

Самыми распространенными мутациями гена *NR2E3* являются мутации

1. c.119-2A> C, которая попадает в канонический акцепторный сайт сплайсинга интрона 1. Чтобы продемонстрировать функциональный эффект этой мутации, временно трансфицировали культуральные нокаутные по *NR2E3* человеческие клетки экспрессионной плазмидой, содержащей копию гена *NR2E3*, несущего вариант c.119-2A> C с подтверждением патологического эффекта мутации.
2. c.219G> C; p. (Arg73Ser) в лиганд-связывающем домене белка NR2E3
3. c.932G> A; p. (Arg311Gln) в лиганд-связывающем домене белка NR2E3.

Методы лечения см. 2.3

В группе пациентов, прошедших лечение с применением системы CRISPR/Cas9, при мутациях в гене *RHO* были использованы следующие праймеры:

hRHO прямой: 5'-CTTTGCCAAGAGCGCCG-3 ';

hRHO обратный: 5'-AGCAGAGGCCTCATCGTCA-3 '.

Проводили ПЦР в реальном времени и определяли относительное количество мРНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора для обратной транскрипции, уровень экспрессии мРНК hRHO определяли и нормализовали с помощью гена фоторецептора PDE6G. Продукты ПЦР подтверждали с помощью электрофореза в агарозном геле.

2.2.3. Методика лечения стволовыми клетками

Применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) проводилось путем пункции жировой ткани (4 мл) подкожно-жировой клетчатки в области пупка пациента с последующей культивацией стволовых клеток (рис.20А). МСК выделялись на градиенте фикола (StemCell

Technologies), после чего высевались на флаконы и культивировались (рис.20Б) в течение 25-40 суток не более чем до 4-го пассажа. Первый пересев культуры МСК проводили через 10-12 суток. после эксплантации, далее культуру пересевали каждые 5—7 суток с исходной плотностью $1,3x10^3$ клеток/см^2. МСК культивировали с использованием AdvanceStem Media (Hyclone) с добавлением 20% StemCell Supplement (Hyclone) и раствора пенициллина/стрептомицина до конечной концентрации 100 мкг/мл (Hyclone). Замену питательной среды производили каждые 3 суток. После каждого пассажа, начиная с первого и заканчивая четвертым, для части культуры МСК каждого образца проводили хромосомный анализ, а также иммунофенотипирование методом проточной цитофлуориметрии с окрашиванием антителами к специфическим поверхностным маркерам.

Табл. 8. Характеристика применяемых стволовых клеток для проведения лечения в группе №2.

К-во пац-тов	**Диагноз**	**МСК**	**Дозировка**	**Кратность**	**Длительность курса**
142	CSNB, ESCS, RP, MD. STGD, LCA, CRD	CD34-, CD45-, CD44+, CD90+, CD105+ ММСК	$1,5\text{-}2x10^6$ клеток/на 1 кг тела	1р/6 мес.	2 – 7 лет

После каждого пассажа культуральную кондиционную среду проверяли на стерильность. Полученные в ходе культивации чистые популяции МСК имели фибробластоподобную морфологию, адипогенный, хондрогенный и остеогенный потенциалы дифференцировки. Иммуннофенотип клеток не изменялся в ходе культивирования и был описан для всех полученных культур как CD34-, CD45-, CD44+, CD90+, CD105+ (Табл. 8). Затем культура полученных мезенхимальных стволовых клеток вводилась субтеноново пациенту в количестве $1,5\text{-}2x10^6$ клеток/на 1 кг тела пациента 2 раза в год. Критерии включения для терапии МСК: возраст с 12 до 75 лет, отсутствие злокачественных новообразований в анамнезе, регистрируемая ЭРГ.

Рис. 20. (А) Пункция жировой ткани пациента иглой (источник фото https://profnv.ru/гистолог). (Б) Набор реактивов, используемых для культивирования клеток. Фото взято с сайта производителя реактивов Hyclone laboratories (GE company).

2.2.4. Методика оценки побочных эффектов и осложнений терапии

Методология оценки побочных эффектов частично была взята из учебника «Клиническая фармакология», учебник для вузов / Под ред. В.Г. Кукеса.- 4-е издание., перераб. и доп., - 2009. - 1056 с., а также на основе рекомендаций Н.В. Ворониной, А.А.Упницкого. Использовались три основных вида фиксации и анализа неблагоприятных побочных эффектов (НПЭ):

1. Активный мониторинг параметров в условиях дневного стационара и во время регулярных офтальмологических обследований
2. Метод, основанный на учете всех медицинских записей о больном
3. Когортное исследование

Применяли стандартную классификацию неблагоприятных побочных эффектов по четырем типам в зависимости от механизмов возникновения, тяжести течения и прогноза, а также частоты встречаемости.

Тип А – дозозависимые, частые, предсказуемые реакции, связанные с фармакологической активностью лекарственного препарата:

· токсичность, связанная с передозировкой;

· второстепенные НПЭ;

· вторичные НПЭ

Тип В – дозонезависимые, нечастые, непредсказуемые реакции:

· лекарственная непереносимость;

· идиосинкразия;

· реакции гиперчувствительности (иммунологические)

· псевдоаллергические реакции (неиммунологические)

Тип C – реакции, связанные с длительной терапией:

· лекарственная зависимость;

· толерантность;

· синдром отмены;

· кумулятивные эффекты;

· эффекты подавления выработки гормонов

Тип D – отсроченные реакции:

· канцерогенные эффекты;

· мутагенные эффекты;

· тератогенные эффекты.

2.3. Методика подготовки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Подготовка к применению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иППСК, iPSC) проводилась после забора клеток для формирования иППСК по протоколу NCT02162953 и Calado 2018 путем однократной биопсии кусочка кожи и забора 5 мл цельной венозной крови с использованием пробирок Vacutainer® CPTTM (BD Biosciences). Как уже было изложено в обзоре литературы (раздел 1.6), методика иППСК считается одной из наиболее перспективных и эффективных, а также пракически лишенных иммунного воспалительного ответа на лечение, так как состоит из клеток, полученных от самого пациента. Из кожи пациентов с подтвержденными мутациями в генах *RHO* (c.1040C>A p.Pro347Gln, 5 экзон) и *NR2E3* (c.481delA p.Thr161fs экзон 4 и c.227G>A p.Arg76Gln экзон 2) были выделены фибробласты, которые затем были перепрограммированы в индуцированные плюрипотентные клетки (иППСК). Клетки РПЭ были получены из иППСК. Клетки культивировали ($1{,}0 \times 10^6$ клеток) в среде для роста (EM; среда QBSF-60; 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 1% пенициллин/стрептомицин, 50 нг/мл SCF, 10 нг/мл IL-3, 2 Ед/мл EPO, 40 нг/мл IGF-1 и 1 мкМ дексаметазона) в течение 7 дней перед переносом с помощью набора для перепрограммирования CytoTune®-iPS 2.0 Sendai (Thermo Fisher Scientific). Клетки размером $0{,}25 \times 10^{-5}$ были перенесены с использованием MOI 5–5-3 (hKOS, hc-MYC, hKLF4 соответственно). После 24 ч. инкубации клетки собирали, центрифугировали и высевали в 24-луночный планшет, содержащий экстраклеточный матрикс. Два дня спустя $0{,}1 \times 10^6$ клеток переносили на шестилуночную плашку покрытую $0{,}25 \times 10^6$

облученными фетальными человеческими фибробластами (irHFF) в буферной среде QBSF-60 с добавлением 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 1% пенициллина/стрептомицина. Через семь дней после трансдукции культуральную среду заменяли средой iPS (KO DMEM, 20% KO сыворотки, 1% GlutaMAX; 1% MEM NEAA, 0,23 мМ β-меркаптоэтанол, 1% пенициллин/стрептомицин, 10 нг/мл bFGF). Отдельные колонии со стволоподобной морфологией выделяли вручную и амплифицировали через 21-27 дней после трансдукции. Клеточные культуры hiPS культивировали на 6-луночном планшете, покрытом $0,25 \times 10^6$ irHFF, выдерживали при 37° С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2, и рекультивировали каждую неделю. Проводили ПЦР в реальном времени для выявления вирусного клиренса и маркеров плюрипотентности.

Тотальную РНК выделяли из культивируемых клеток hiPS с помощью RNeasy Mini Kit (Qiagen) и обрабатывали ДНКазой 1 для удаления загрязнения геномной ДНК. 1 мкг суммарной РНК использовали в качестве матрицы для получения кДНК с использованием набора для обратной транскрипции QuantiTect (Qiagen). Вирусный клиренс и определение маркеров плюрипотентности анализировали с использованием специальных праймеров. Реакцию ПЦР в реальном времени проводили с использованием ДНК-полимеразы MyTaq (Bioline GmbH). Продукты ПЦР анализировали на 2% агарозных гелях.

Дифференцирование in vitro проводилось с помощью формирования эмбриоидного тела для создания трех зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и эктодермы). Клетки hiPS отделяли вручную от питающих клеток и культивировали в неприлипающих условиях в среде iPS без bFGF (KO DMEM, 20% KO сыворотка, 1% GlutaMAX; 1% MEM NEAA, 0,23 мМ β-меркаптоэтанол, 1% пенициллин/стрептомицин) в течение следующих 7 дней. Затем эмбриоидное тело высевали на стеклянные покровные стекла, обработанные 0,1% желатином в течение 2 ч. и культивировали в течение одной недели в среде DMEM / F12, 10% FBS, 1% GlutaMAX, 1% MEM NEAA, 1% пенициллин/стрептомицин. Покровные стекла фиксировали в 4% формальдегиде в течение 15 минут и анализировали методом иммунофлуоресценции.

Целостность генома клеток hiPS анализировали с помощью кариотипирования. Наличие микоплазмы регулярно проверяли люминесценцией с использованием набора для обнаружения микоплазмы MycoAlertTM PLUS (Lonza). Инъекция иППСК пациентам, донорам материала для культивации иППСК до текущего момента не проводилась.

Скрининг *NR2E3*-специфичных sgRNA, используемых в клетках пациентов, проводили с использованием липофектамина 2000 (Thermo Fisher Scientific), и расщепление оценивали с помощью анализа эндонуклеазы 1 T7 (T7E1) с использованием NR2E3-специфических праймеров при мутациях в гене *NR2E3* характеристика коротких направляющих РНК (sgRNA) и используемых праймеров приведена в табл. 9.

Табл. 9. Список коротких направляющих РНК (sgRNA) и используемых праймеров

Таргет	Название олигонуклеотида	Последовательность
CRISPR направитель	sg1 sg2 sg3 sg4 sg5	GACGGCGGAGGCTCATCTAC GGTCTCCGCACACGCGGCAC GCATCTACAGGTGAGTGCGG GGCTGCTGTCTCCGCACACG GATGGCATCTATGCCTGCAA
T7E1 эндонуклеаза	F2 R2	GCGTGGGTTCGTTCAAATG TCCAGCTTAGCACAGGTTTC
HDR – гомологичная направленная репарация	F1 R1	AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGG GTTATAAGGCTGGCCATGAAGTG
c.119-2/Arg73 последовательность	F2 R2	GCGTGGGTTCGTTCAAATG TCCAGCTTAGCACAGGTTTC
Arg311 последовательность	F3 R3	GAACCCAGTGTCTCAGATGATAG AGGATAGAGGCCTACACACA
NR2E3 ртПЦР	F4 R4	GCACAGAGAGACAGAGGTTCAT GTTCTGCACGGCGTCCT
18s рРНК	18s F 18s R	CGGCTACCACATCCAAGGAAG GCTGGAATTACCGCGGCTGCT
Последовательность	M13(-20) M13R	TGTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGACC

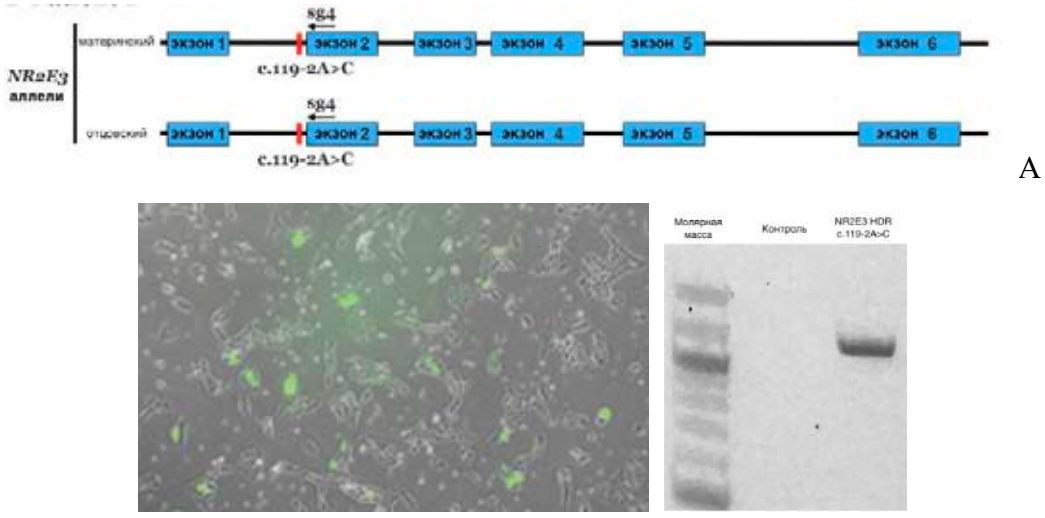
T7E1 эссе - HDR гомологичная направленная репарация

Конструкции sgRNA и CRISPR-Cas9 трансфицировали в клетки пациентов Контрольные иППСК трансфицировали 2 мкг плазмиды с использованием системы трансфекции неон (Neon Thermo Fisher Scientific, каталожный номер. MPK5000, с набором 100-мкл каталожного номера MPK10096). Рис. 21A-B.

Доставку sgRNA-Cas9 и HDR конструкта в *NR2E3*-специфические иППСК пациента проводили по специфическому механизму CRISPR-Cas9. Плазмиды sg4-spCas9 и HDR трансфицировали в молярном соотношении 1:2 в иППСК пациента с помощью липофектаминовой основы (Thermo Fisher Scientific; пациент 1) или электропорации неона (Thermo Fisher Scientific; пациент 2), далее выполняли отбор пуромицином (0,5 мкг/мл) и выжившие колонии подвергали скринингу с помощью ПЦР на включение терапевтических замен (HDR – гомологичная направленная репарация) и секвенировали для подтверждения коррекции. Кассету puroR-vTK удаляли трансфекцией липофектаминовой основой рекомбиназы Cre, и клетки обрабатывали 40–400 нМ ганцикловиром для отбора клеток с удалением vTK – гена тимидинкиназы вируса простого герпеса 1 типа. Наиболее вероятные нецелевые сайты (табл 10) были определены с использованием платформы Benchling (https://benchling.com/) и проанализированы с использованием эндонуклеазного анализа T7E1, как описано выше. Для анализа отбирали офф-таргеты с вероятностью более выше 30%.

Табл. 10. Список нецелевых последовательностей PAM, сайтов, офф-таргетной шкалы, положения на хромосомах нецелевых последовательностей и последовательностей праймеров

Офф-таргет	Последовательность	PAM	Шкала	№ хромосомы	Прямой (F) праймер	Обратный (R) праймер
Sg4	TGCTGCTGTCTCCGCACACG	CGG	100	Chr15		
1	TCCCGCTGTCTACGCACACG	GAG	1,52	Chr 19	TGGGATGCTCAGCCATTT	CCTCCTGGGTTAAAGTGATTCT
2	TGGTGCTGTGTCTGCACACG	GGG	1,09	Chr 12	CAGCTAGAGAGGTACAGGTAGAG	GATGAGGAAACTGAGGCATAGAG
3	TACTCCACTCTCCGCACACG	CGG	0,99	Chr 8	TGTCGCCATTCCCACTTC	TTAACACAGAGGGCCAAGAC
4	TGCTCCTGCCTCCGCACACC	AGG	0,98	Chr 17	GGTCAGGTTCTTGCCTTTCT	GACACTTCTGCCACCCTATTC
5	GGCAGCTGTGGCCGCACACG	TGG	0,85	Chr 19	AGATGCCGCAATGGTATGG	CAGAGGAGCCCAAGCTTTAAT
6	TGAGGCTGGATCCGCACACG	GAG	0,85	Chr 5	AGACATTTCCCTGGCCTTTC	ACACTGCGGAGGAAGAATTG
7	AAGTGTTGTCTCCGCACACG	GGG	0,84	Chr 2	CACAGGTCAGGGAAGTTTGT	ACCCTCAGCAAAGCAAGATAG
8	GGCTGCTTTAGCCGCACACG	GAG	0,82	Chr 13	CGGGAGCTTTGGGTTCTTTA	CGGAACTCCACCTTCCAAAT
9	TTCAGCTGTTTCAGCACACG	GAG	0,61	Chr 6	GAGCACTGATGGGAAGTACAA	CATCTACCACACTCAGACACAC
10	TTCTGCTGTCTCGGCACAAG	CAG	0,52	Chr 20	CAAGCGATTCTCCCACTTCA	CTGTAAAGCACCAAAGCACATAG
18	GGCAGCTGTCTCGGCACACA	AGG	0,38	Chr 1	GCAAAGGGAAGGAAGGGATTA	GTTTGTTACCCTGAAGTGGAGA
21	TGATGGAGCCTCCGCACACG	TGG	0,36	Chr 21	CTAGGAAGCAGGTGCAATACTC	TCAGTCCCTCCAAGACTCAA



А

Б В

Рис. 21. А. Иллюстрация репарируемых аллелей гена *NR2E3* у пациента P2 (**Б**. Экспрессия GFP метки в трансфицированных клетках. **В.** Контроль в гель-электрофорезе произошедшего редактирования в точке c.119-2A>C гена *NR2E3* (правая колонка) по сравнению с контролем (левая колонка). С изменениями Bohrer LR и соавт, 2019.

2.4. Методы математической статистики и анализа полученных данных

Статистическую обработку полученных результатов для возможности их сравнения проводили с использованием пакета программ SPSS Statistica 10.0 и MS EXCEL 2011.

Методы статистического анализа клинических данных: 1) определение закона распределения признака по критерию Шапиро-Уилка; 2) вычисление средних значений, СКО (среднеквадратичное отклонение) и дисперсии.

Методы сравнения групп по количественному признаку: 1) t-критерий Стьюдента для независимых групп; 2) сравнение двух групп по критериям Вилкоксона и Манна-Уитни с

повторными измерениями, где необходимо, и дальнейшим ретроспективным (post-hoc) анализом (LSD критерий Фишера); непараметрические данные были проанализированы с помощью одно- и двухфакторного анализа ANOVA. 3) сравнение трех групп и более по критерию Краскела-Уоллиса.

Методы определения взаимосвязи двух признаков: определение коэффициентов корреляции по Пирсону и Спирмену.

Методы построения линий тренда: осуществлялся подбор линии тренда, наиболее точно описывающей тенденции изучаемых параметров остроты и полей зрения, цветовосприятия, микропериметрии и ЭРГ у пациентов с моногенными дистрофиями сетчатки из 1, 2 и 3-й групп. Построение тепловых карт взаимосвязи признаков и расчета возможной перекрестной эффективности препаратов выполняли с помощью программных инструментов Heatmapper и Visual Paradigm Diagrams.

Достоверность полученных различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (сопоставление двух независимых групп данных по клиническим признакам в случае распределений, отличных от нормальных). Статистически достоверными принимались различия $p<0,05$.

Тепловые карты анализа метаболических путей и возможных офф-таргет активности препаратов в условиях сходных патогенетических механизмов развития заболевания были созданы с помощью программы, разработанной исследовательской группой Wishart в Университете Альберты и Канадским институтом исследований в области здравоохранения (CIHR) (http://www.heatmapper.ca). Построенные графики отображают некластеризованные цифровые данные взаимосвязей между генами в виде тепловой карты. Также выполнялась иерархическая кластеризация данных с получением дендрограммы. Форматы ввода данных: значения, разделенные запятыми (.csv), с разделителями табуляции (.txt, .dat, .tsv, .tab) или Microsoft Excel (.xls, .xlsx), количество расчетных параметров функций: 18.

Для анализа метаболических карт взаимодействия генов использовался программный инструмент Genemania (https://genemania.org, Gary Bader и Quaid Morris, Центр клеточных и биомолекулярных исследований Доннелли), который помогает предсказать функцию и взаимосвязь генов и наборов генов, используя очень большой набор данных функциональных ассоциаций. Данные ассоциации включают белковые и генетические взаимодействия, метаболические пути, коэкспрессию, совместную локализацию и сходство белковых доменов. Genemania используется, чтобы найти новые гены кандидаты и метаболические пути или найти новые гены с определенной функцией, запрос формируется набором введенных через запятую генов и выдается в виде графических карт.

ГЛАВА 3. ДИАГНОСТИКА И РАЗДЕЛЕНИЕ НА ГРУППЫ

3.1. Результаты молекулярно-генетической диагностики пациентов в исследуемых группах

3.1.1. Обнаруженные новые мутации

По результатам генетического обследования пациентов отобранной из 3514 человек исследуемой группы, состоящей из **852 человек**, молекулярно-генетический диагноз был подтвержден у **80,04% (682 человека**), среди них были выявлены **54 новые патогенные мутации**, ранее не описанные в мире, которые являются причинными в развитии моногенных заболеваний сетчатки у пациентов, проходивших диагностику (табл.11).

В столбце «Фенотип» табл. 11 в виде аббревиатур представлены уточненные на основании клинической дифференциальной диагностики (Табл. 5) фенотипические проявления заболевания: STGD – болезнь Штаргардта, ALSTR – синдром Альстрема, BEST – болезнь Беста, RP – пигментный ретинит (retinitis pigmentosa) порядковый номер после букв означает номер клинико-генетической группы RP по классификации базы данных OMIM с описанием конкретных характерных клинических проявлений, USH1 – синдром Ашера 1 типа, LCA10 – врожденный амавроз Лебера 10 типа (congenital Leber amaurosis), OPA – атрофия зрительного нерва (optic nerve atrophy), ANA – атрофия слухового нерва (auditory nerve atrophy), NCL7 – нейрональный цероидный липофусциноз 7 типа (болезнь Баттена) (neuronal ceroid lipofuscinosis), CRD20 – колбочко-палочковая дистрофия 20 типа (cone-rod dystrophy), Bothnia dystrophy – дистрофия Ботния, XLRP – X-сцепленный пигментный ретинит (X-linked RP), USH2 – синдром Ашера 2 типа. Каждый фенотип имеет присвоенный номер в базе OMIM (online Mendelian inheritance in man) менделевских генетических заболеваний (www.omim.org). Фенотипическое уточнение клинической картины отражает гетерогенность моногенных заболеваний сетчатки и повторно показывает важность клинической дифференциальной диагностики.

Табл. 11. Список **новых** впервые выявленных мутаций, ранее не описанных в мире, которые являются причинными в развитии моногенных заболеваний сетчатки в исследуемой группе (объяснения в тексте).

#	Положение hg19	Генотип	Ген	Положение в кДНК	Замена АК	Экзон	Транскрипт	Частота аллеля	Глубина прочтения	OMIM	Фенотип	Класс-я мутации	Кол-во аллелей
1	chr1:94577000T>C	T/C	*ABCA4*	c.296A>G	p.Asn99Ser	3	NM_000350.2	0ю000399%	146x	248200	STGD	VUS	1
2	chr2:73676384CAGAG>C	CAGAG>C	*ALMS1*	c.2733CAGAG>C	p.Glu913fs	8	NM_015120.4	n/a	>70x	203800	ALSTR	LPAT	1
3	chr2:73680886T>TA	T/TA	*ALMS1*	c.7240T>TA	p.Ser2414fs	8	NM_015120.4	n/a	>70x	203800	ALSTR	LPAT	1
4	Chr11:61723229A>T	A/T	*BEST1*	c.287A>T	p.CGln96Leu	4	NM_004183.3	n/a	73x	153700, 611809	BEST	LPAT	1
5	Chr11:61727008T>G	T/G	*BEST1*	c.906T>G	p.Asp302Glu	8	NM_004183.3	n/a	155x	153700, 611809	BEST	VUS	1
6	chr21:45757527CT>C	CT/C	*C21orf2*	c.96+4delA	-	int.2	NM_001271441.1	n/a	>70x	617547	RP	LPAT	1
7	chr2:29294550T>TG	T/TG	*C2orf71*	c.2580T>TG	p.Lys860fs	1	NM_001029883.2	n/a	>70x	613428	RP54	LPAT	**2**
8	chr10:73450277C>G	C/G	*CDH23*	c.2112C>G	p.Tyr704Ter	19	NM_022124.5	n/a	>70x	601067	USH1	LPAT	1
9	chr10:85970764C>T	C/T	*CDHR1*	c.1329C>T	p.Ala443Val	13	NM_033100.3	n/a	>70x	613660	RP	LPAT	1
10	chr10:85971471TG>T	G/T	*CDHR1*	c.1553+1delG	-	int.14	NM_033100.3	n/a	>70x	613660	RP65	LPAT	1
11	chr12:88487578C>G	C/G	*CEP290*	c.3278C>G	p.Arg1093Pro	28	NM_025114.3	n/a	>70x	611755	LCA10	LPAT	1
12	chr12:88472979G>A	G/A	*CEP290*	c.5254C>T	p.Arg1752Trp	39	NM_025114.3	0.00%	68x	611755	LCA10	VUS	**2**
13	chr1:197390461GA>G	GA/G	*CRB1*	c.1503GA>G	p.Thr502fs	6	NM_201253.2	n/a	>70x	613835	LCA	LPAT	1
14	chr1:197396935G>T	G/T	*CRB1*	c.2481G>T	p.Gly827Val	7	NM_201253.2	n/a	>70x	613835	RP	VUS	1
15	chr19:48342813GA>G	GA/G	*CRX*	c.492GA>G	p.Ser164fs	4	NM_000554.4	n/a	>70x	120970	LCA7	VUS	1
16	chr17:3558640G>A	G/A	*CTNS*	c.456G>A	p.Arg152Gln	7	NM_001031681.2	0.00%	>70x	219750	Цистиноз	VUS	1
17	chr16:72143335G>A	G/A	*DHX38*	c.3405G>A	p.Ala1135Thr	25	NM_014003.3	0.00%	>70x	618220	RP84	VUS	1
18	chr6:64516218A>C	A/C	*EYS*	c.7278A>C	p.Tyr2426Asp	37	NM_001142800.1	n/a	>70x	602772	RP25	VUS	1
19	chr6:66112499C>G	C/G	*EYS*	c.1057-1G>C	-	int.6	NM_001142800.1	n/a	>70x	602772	RP25	VUS	**2**
20	chr6:66112400A>T	A/T	*EYS*	c.1155T>A	p.Cys385Ter	7	NM_001142800.1	0.07%	148x	602772	RP25	LPAT	1
21	chr6:66204776TTCC>T	TTCC/T	*EYS*	c.528delTCC	p.Glu176del	4	NM_001142800.1	0.01%	>70x	602772	RP25	VUS	1
22	chr17:72860035C>T	C/T	*FDXR*	c.1286G>A	p.Arg429Gln	10	NM_001258012.2	0.00%	54x	617717	OPA ANA	VUS	1
23	chr17:72859350C>T	C/T	*FDXR*	c.1322G>A	p.Trp441Ter	11	NM_001258012.2	n/a	43x	617717	OPA ANA	LPAT	1
24	chr3:46026360G>A	G/A	*FYCO1*	g.15957G>A	p.Arg15Ter	2	NM_024513.3	0.00%	>70x	610019	Катаракта + RP	LPAT	1
25	chr16:1652381G>T	G/T	*IFT140*	c.360G>T	p.Ser120Tyr	4	NM_014714.3	n/a	>70x	617781	RP80	VUS	1
26	chr2:276765367>C	T/C	*IFT172*	c.3783T>C	p.Gln1261Arg	34	NM_015662.2	n/a	>70x	616394	RP71	VUS	1
27	chr17:39019475C>T	C/T	*KRT12*	c.1218C>T	p.Glu406Lys	6	NM_000223.3	n/a	>70x	122100	RP	VUS	1
28	chr2:112656376G>C	G/C	*MERTK*	c.61+3G>C	-	int.1	NM_006343.2	0.05%	>70x	613862	RP38	VUS	1
29	chr4:128863226T>G	T/G	*MFSD8*	c.528T>G	p.Gln176Pro	6	NM_152778.2	n/a	>70x	610951 и 616170	NCL7	VUS	1
30	chr11:76888690G>A	G/A	*MYO7A*	c.2282+1G>A	-	int.19	NM_000260.3	n/a	>70x	276900	USH1	VUS	1
31	chr15:72104211T>C	T/C	*NR2E3*	c.349+2T>C	-	инт. 3	NM_016346.3	n/a	53x	268100	RP	LPAT	1
32	chr15:72105956C>T	C/T	*NR2E3*	c.974C>T	p.Ala325Val	7	NM_016346.3	n/a	42x	268100	RP	VUS	1
33	chr12:89853489G>A	G/A	*POC1B*	g.71551G>A	p.Pro347Ser	10	NM_172240.2	0.00%	>70x	615973	CRD20	VUS	1
34	chr4:16010570A>G	A/G	*PROM1*	c.1301+2T>C		int.11	NM_006017.2	0.00%	>70x	612657 и 612095	CRD12 и RP41	LPAT	1
35	chr1:150310714C>G	C/G	*PRPF3*	c.1116C>G	p.Leu372Val	8	NM_004698.2	n/a	>70x	601414	RP18	VUS	1
36	chr10:48388321C>T	C/T	*RBP3*	c.2559C>T	p.Glu853Lys	1	NM_002900.2	0.00%	>70x	615233	RP66	VUS	1
37	chr15:89758328A>G	A/G	*RLBP1*	c.488A>G	p.Ile163Thr	6	NM_000326.4	0.01%	>70x	607475 и 136880	Bothnia	LPAT	1
38	chr8:55539915_	n/CAGAAAC	*RP1*	c.3474delCAGAAA	p.Ser1158fs	4	NM_006269.1	n/a	>70x	180100	RP1	LPAT	1
39	chr8:10468358G>A	G/A	*RP1L1*	c.3250C>T	p.Gln1084Ter	4	NM_178857.5	n/a	74x	613587	RP88	VUS	1
40	chrX:46713324TA>T	A/T	*RP2*	c.519TA>T	p.Asn173fs	2	NM_006915.2	n/a	>70x	312600	RP2	LPAT	1
41	chrX:38180280C>T	C/T	*RPGR*	c.310C>T	p.Glu104Lys	4	NM_001034853.1	n/a	>70x	304020	RD1	LPAT	1
42	chrX:38146219T>TC	T/TC	*RPGR*	c.2034T>TC	p.Glu678fs	15	NM_001034853.1	n/a	>70x	304020	CRD1	LPAT	2
43	chrX:38178192C>T	C/T	*RPGR*	c.360C>T	p.Gly120Glu	5	NM_001034853.1	n/a	>70x	300029	RP3	VUS	1
44	chrX:38146016CTCTG>C	CTCTG/C	*RPGR*	c.2232CTCTG>G	p.Asp744fs	15	NM_001034853.1	n/a	>70x	304020 и 300029	CRD1 и RP3	VUS	**2**
45	chrX:38147215G>C	G/C	*RPGR*	c.1653G>C	p.Ser551Ter	14	NM_001034853.1	n/a	>70x	304020	XLRP	VUS	1
46	chr2:234237165C>T	C/T	*SAG*	c.555C>T	p.Pro185Leu	8	NM_000541.4	n/a	>70x	613758	RP47	LPAT	1
47	chr2:96963398T>C	T/C	*SNRNP200*	c.1182T>C	p.Met394Val	10	NM_014014.4	0.00%	>70x	610359	RP33	VUS	1
48	chr11:12923649G>A	G/A	*TEAD1*	c.862G>A	p.Val288Ile	10	NM_021961.5	0.00%	>70x	108985	атрофия	VUS	1
49	chr9:140135822A>C	A/C	*TUBB4B*	c.10A>C	p.Ile4Leu	1	NM_006088.5	32%	>70x	617879	LCA и	VUS	1
50	chr1:215847860T>A	T/A	*USH2A*	c.13395T>A	p.Lys4465Ter	63	NM_206933.2	n/a	>70x	276901	USH2	LPAT	**2**
51	chr1:215963475A>C	A/C	*USH2A*	c.10110A>C	p.Cys3370Gly	51	NM_206933.2	n/a	>70x	613809	RP39	VUS	1
52	chr1:216348735G>T	G/T	*USH2A*	c.4488G>T	p.Pro1496Thr	21	NM_206933.2	n/a	>70x	613809	RP39	VUS	1
53	chr1:215844625G>A	G/A	*USH2A*	c.13822C>T	p.Arg4608Ter	64	NM_206933.2	0.00%	42x	276901	USH2	LPAT	1
54	chr11:46726691G>T	G/T	*ZNF408*	c.1419G>T	p.Gly473Cys	5	NM_001184751.1	n/a	>70x	616469	RP72	VUS	1

Название столбцов таблицы сформировано с учетом международных правил оформления обнаруженных отклонений от нормы в геноме тестируемого образца. Так, положение hg19 отражает точные координаты обнаруженной мутации при выравнивании на геном (сборка генома #hg19). Генотип – это описание конкретной нуклеотидной замены в данной координате. Ген – кодирование аббревиатурой, в рамках какого гена обнаружена новая мутация. Положение нуклеотида в кДНК – в кодирующей цепи ДНК. Замена АК – к замене какой аминокислоты приводит обнаруженная мутация. Экзон – порядковый номер активного считываемого участка гена, с которого происходит транскрипция. Транскрипт – единый номенклатурный номер получаемой РНК с указанного в 4-м столбце гена, данный столбец необходим для едино

однозначной идентификации полипептида, получаемого с белка при наличии нескольких синтезирующихся с гена изоформ белковых продуктов. Частота аллели – характеризует частоту встречаемости аллели, и является ли он зарегистрированным хотя бы в одной из мировых геномных баз данных – 1000 геномов, ESP6500 или ExAC, приводится расчетная частота встречаемости аллели в популяции. Если аллель ранее не был описан (что косвенно свидетельствует в пользу его редкости и как следствие патогенности), то это указано буквами n/a. Глубина прочтения – количество прочтений участка ДНК в образце конкретного пациента, у которого была обнаружена описываемая мутация.

3.1.2. Алгоритм расчета патогенности обнаруженных мутаций

Степень патогенности, которую присваивали мутации, рассчитывалась на основе нескольких параметров, алгоритмы обсчета которых представлены в разделе материалы и методы в табл.1, а результаты обсчета представлены в табл.12.

Классификация мутации – присвоение степени (score) патогенности мутации по нарастанию: 1) доброкачественный (benign) 2) вариант с неизвестным значением (variant of unknown significance (**VUS**) 3) вероятно патогенная (likely pathogenic (**LPAT**) 4) патогенная (pathogenic (PAT). Кол-во аллелей – количество пациентов, несущих данный аллель в исследуемой группе пациентов (общее количество N = 3514 пациентов). Следует отметить, что при использовании SIFT алгоритма чем меньше значение, тем выше предсказанная патогенность варианта, как и алгоритм PROVEAN – чем меньше значение параметра, тем вероятнее мутация является патогенной, в то время как при использовании алгоритмов Polyphen_2HDIV, Polyphen_2HVAR и Mutation Taster чем ближе значение к 1.000, тем вероятнее вариант является патогенным. В столбце LRT – D – высокая предсказанная патогенность мутации, U – неопределенная патогенность.

Табл. 12. Список новых обнаруженных мутаций в исследуемой группе пациентов и расчет шкалы их патогенности.

#	Положение hg19	Генотип	Ген	SIFT	Polyphen_2HDIV	Polyphen_2HVAR	Mutation Taster	PROVEAN	LRT	Score
1	chr10:85970764C>T	C/T	*CDHR1*	0.018	1.000	0.990	1.000	(-3.030)	D	**LPAT**
2	chr12:88487578C>G	C/G	*CEP290*	0.000	1.000	1.000	1.000	(-4610)	D	**LPAT**
3	chr1:197396935G>T	G/T	*CRB1*	0.002	1.000	1.000	1.000	(-7.090)	na	**VUS**
4	chr17:3558640G>A	G/A	*CTNS*	0.000	0.999	0.937	1.000	(-3.900)	D	**VUS**
5	chr16:72143335G>A	G/A	*DHX38*	0.003	0.999	0.941	1.000	(-3.280)	D	**VUS**

6	chr6:64516218A>C	A/C	*EYS*	0.019	1.000	0.988	na	na	na	**VUS**
7	chr16:1652381G>T	G/T	*IFT140*	0.001	1.000	0.994	1.000	(-4.200)	D	**VUS**
8	chr2:27676536T>C	T/C	*IFT172*	0.286	0.042	0.020	na	(-1.730)	na	**VUS**
9	chr17:39019475C>T	C/T	*KRT12*	0.026	1.000	0.994	1.000	(-3.210)	D	**VUS**
10	chr4:128863226T>G	T/G	*MFSD8*	0.004	0.997	0.971	1.000	(-5.300)	D	**VUS**
11	chr12:89853489G>A	G/A	*POC1B*	na	1.000	0.996	1.000	na	D	**VUS**
12	chr1:150310714C>G	C/G	*PRPF3*	0.012	0.263	0.337	1.000	(-2.280)	D	**VUS**
13	chr15:89758328A>G	A/G	*RLBP1*	0.287	0.999	0.998	1.000	(-0.580)	D	**LPAT**
14	chrX:38180280C>T	C/T	*RPGR*	0.133	0.374	0.186	0.966	(-2.170)	U	**LPAT**
15	chrX:38178192C>T	C/T	*RPGR*	0.000	1.000	1.000	1.000	(-7.320)	U	**VUS**
16	chr2:234237165C>T	C/T	*SAG*	0.000	1.000	0.999	1.000	(-9.230)	D	**LPAT**
17	chr2:96963398T>C	T/C	*SNRNP200*	0.287	0.000	0.000	1.000	(-0.380)	D	**VUS**
18	chr9:140135822A>C	A/C	*TUBB4B*	na	0.730	0.156	1.000	(-0.390)	D	**VUS**
19	chr1:215963475A>C	A/C	*USH2A*	0.008	0.289	0.048	1.000	(-8.320)	D	**VUS**
20	chr1:216348735G>T	G/T	*USH2A*	0.000	1.000	1.000	1.000	(-4.880)	U	**VUS**
21	chr11:46726691G>T	G/T	*ZNF408*	0.002	0.772	0.157	0.992	(-3.780)	D	**VUS**

Мутация считалась вероятно патогенной (LPAT) при положительном результате анализа минимум в трех различных алгоритмических инструментах (табл. 1). Мутация классифицировалась как неизвестного клинического значения (VUS), если она расценивалась как значимо изменяющая структуру белка минимум в двух предсказательных алгоритмах.

3.1.3. Алгоритм применения дополнительных методов диагностики

В случаях, когда исследования на основе NGS (полноэкзомное WES и полногеномное WGS секвенирование) не дают возможности установить окончательный диагноз, к примеру, при предполагаемом рецессивном типе наследования заболевания удается найти только одну мутацию в причинном гене, необходимо применять дополнительные генетические лабораторные анализы для уточнения наличия или отсутствия патологических изменений во второй копии хромосомы в этом же локусе.

- MLPA лигазный анализ – для поиска крупных хромосомных аберраций
- CGH сравнительная геномная гибридизация – для поиска более мелких хромосомных аберраций
- Секвенировние по Сэнгеру – для анализа сегрегации и дифференцировки цис- и транс-положения обнаруженных мутаций

- Кариотипирование – для поиска количественных хромосомных аномалий (в исследуемой группе пациентов практически не применялось ввиду редкости таких изменений при таких диагнозах).

3.2. Алгоритмы распределения пациентов по группам

3.2.1. Алгоритм отбора в группу патогенетического лечения

На основе проведенных общих и специальных клинических, лабораторных и молекулярно-генетических исследований проводилась дифференциальная диагностика заболевания пациентов, что являлось важным этапом выбора метода лечения, прогноза течения и тактики дальнейшего регулярного наблюдения пациентов. Она проводилась с помощью разработанного на основании литературных данных и собственного опыта алгоритма, детально приведенного в Табл. 5.

Спектр наследственных заболеваний сетчатки является широким и включает в себя расстройства, которые в первую очередь влияют на макулу (болезнь Штаргардта, дистрофия Беста, макулодистрофия, колбочковые дистрофии), и не прогрессирующие расстройства, такие как ахроматопсия и врожденная стационарная ночная слепота. Для диагностики периферических палочковых дистрофий сетчатки в этом спектре применяют как объективные критерии (симптомы, аномалии глазного дна, результаты ЭРГ), так и субъективные критерии (возраст пациента вначале заболевания, данные анамнеза).

При классификации наследственных дистрофий сетчатки важно учитывать весь ход течения заболевания, так как некоторые фенотипы имеют тенденцию перекрываться на поздних стадиях. Список нозологий, синдромов и состояний для дифференциальной диагностики при ПР приведен в Табл. 5.

Для группы пациентов, по результатам клинического и генетического обследования которых были выявлены причинные мутации в генах *RPE65, RPGR, RS1, CLN3, CDHR1, CEP290, EYS, USH2A, CRB1, CNGA3, CNGB3, NR2E3, RHO, C19orf12* в доступности имеется зарегистрированное и экспериментальное патогенетическое лечение, нацеленное на устранение причины заболевания. **48 пациентов (62 глаза)** с этими заболеваниями были выделены в **первую группу**. (Табл.13)

Табл. 13. Отбор пациентов в группу патогенетического лечения.

К-во	Ген	Метод лечения	Носитель	NCT	Метод доставки
РЕЦЕССИВНЫЕ – ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ					
5	*RS1*	Генная терапия rAAV2tYF-CB-hRS1	AAV8	NCT02416622	интравитреально
2	*RPGR*	Генная терапия	AAV2	NCT03252847	субретинально
2	*RPE65*	Генная терапия	AAV2	NCT00749957	субретинально
2	*CDHR1*	Генная терапия + рисутеганиб	AAV8	n/a	субретинально интравитреально
3	*CLN3*	Генная терапия	AAV9	NCT03770572	интратекально
2	*CNGA3*	Генная терапия	AAV8	NCT03758404	субретинально
2	*CNGB3*	Генная терапия	AAV8	NCT03001310	субретинально
РЕЦЕССИВНЫЕ – МАЛЫЕ МОЛЕКУЛЫ					
3	*CEP290*	AON		NCT03913130	интравитреально
8	*EYS*	AON		NCT04127006	интравитреально
13	*USH2A*	AON		NCT03780257	интравитреально
1	*CRB1*	AON		n/a	супрахориоидально
ДОМИНАНТНЫЕ					
2	*NR2E3*	CRISPR + Интерферон гамма 1b		n/a	субретинально местно капельно
2	*RHO*	CRISPR		NCT04123626	субретинально
МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ					
1	*C19orf12*	Fe		n/a	внутрь
48	Всего пациентов				

AAV – аденоассоциированный вирус, номер отражает тип используемого серотипа вируса, AON – антисмысловые нуклеотидные последовательности, CRISPR - clustered regularly interspaced short palindromic repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, является методом лечения. Fe – железо.

Более подробная информация о половозрастном и этническом составе группы 1 представлена в Табл. 14.

3.2.2. Алгоритм отбора в группу лечения стволовыми клетками

Во **вторую группу** были выделены **142 пациента (284 глаза)** вне зависимости от того, подтвержден ли был у них диагноз молекулярно-генетическим методом или нет за исключением пациентов, у которых были обнаружены причинные мутации в генах *RPE65, RPGR, RS1, CLN3, CDHR1, CEP290, EYS, USH2A, CRB1, CNGA3, CNGB3, NR2E3, RHO, C19orf12* (см. раздел 5.1). Если диагноз был подтвержден, причинные мутации обнаружены, проводился поиск наличия

патогенетического лечения и при его отсутствии назначалось лечение стволовыми клетками, если не было следующих противопоказаний. к лечению стволовыми клетками:

- Возраст младше 18 лет
- Васкулиты в фазе обострения: капилляриты, флебиты, артерииты: возможно проведение трансплантации после достижения ремиссии, не ранее трех месяцев;
- Острые тромбозы: возможно проведение трансплантации не ранее 3-6 месяцев;
- Свежие кровоизлияния в среды глаза: возможно лечение спустя 3 месяца;
- Выраженная гипертензия малого круга кровообращения, связанная с васкулитом, тромбозами, крупноочаговой пневмонией, сопровождаемая развитием острого или подострого легочного сердца;
- Острый инфаркт миокарда;
- Нестабильная стенокардия;
- Тромбоэмболия легочной артерии;
- Повышение артериального давления при эритремии;
- Острое воспаление оболочек сердца (миокардит, перикардит, эндокардит).
- Острое нарушение мозгового кровообращения по геморрагическому или ишемическому типу, включая субарахноидальное кровоизлияние острый период до 4-6 мес.
- Острые вирусные энцефалиты, менингиты.
- Рассеянный склероз в стадии обострения.
- Спинальная травма терапия возможна после 2-3 месяцев после травмы
- Воспалительные заболевания нервной системы в острой стадии.
- Эпилепсия, судорожный синдром любой этиологии.

В группу лечения стволовыми клетками вошли 59 мужчин и 83 женщины в возрасте от 18 до 52 лет. Представлена подробная информация о половозрастном и этническом составе группы 2 (Табл.14).

3.2.3. Группа стандартного лечения

В **третью группу** – группу стандартного лечения, с котороцй проводилось сравнение, вошли **662 пациента (1284 глаза)**, которым в качестве лечения применялись общепринятые стандартные схемы лечения, подробно представленные в табл.15: применение ретиналамина, витаминных, сосудистых препаратов, магнито- и электрофореза (см. главу 2.2.1. Методика проведения стандартного лечения). В группу вошли 323 мужчины и 339 женщин в возрасте от 12

до 55 лет. Представлена подробная информация о половозрастном и этническом составе группы (Табл. 14).

В сроки, предусмотренные протоколом способа лечения каждой конкретной формы моногенной дистрофии сетчатки, проводилась оценка анатомического, физиологического и функционального состояния сетчатки и органа зрения в целом.

3.2.4. Сравнительная характеристика исследуемых групп

Сравнительная характеристика исследуемых групп представлена в табл.14.

Табл. 14. Половозрастной и этнический состав исследуемых групп пациентов

	Группа 1		**Группа 2**		**Группа 3**	
Количество пациентов	48		142		662	
Муж/Жен	26	22	59	83	323	339
Возраст (M±σ), лет	26±14		36±18		33±19	
Этнический состав (%):						
Русские	35		34		29	
Татары	20		12		13	
Украинцы	25		12		18	
Евреи	2		3		3	
Армяне	0		6		7	
Белорусы	0		4		4	
Буряты	6		2		4	
Узбеки	2		2		3	
Башкиры	2		2		3	
Таджики	0		4		3	
Чуваши	0		4		3	
Якуты	0		1		2	
Другие	8		14		8	

Как мы видим, группы имели схожий этнический состав. Средний возраст был сопоставим в группе 2 (36±18 лет) и 3 (33±19), тогда как в группе 1 средний возраст составлял 26±14 лет, что отражает критерии отбора для применения патогенетически ориентированного лечения. Процент мужчин и женщин в исследуемых группах был сопоставим. Данные количества участников в группах приводят к необходимости вводить поправочные коэффициенты во время сравнения, в связи с тем, что группа таргетного лечения была кратно меньше группы стандартного лечения в связи с полученными результатами молекулярно-генетического анализа и особенностями протокола отбора.

3.3. Распределение пациентов детского и взрослого возраста по группам

Известно, что моногенные заболевания сетчатки при известной их причине значительно более эффективно лечить в раннем возрасте, чем во взрослом. В данной работе распределение взрослые / дети (пациенты до 18 лет включительно) по группам имеет следующие параметры:

1 группа. В эту группу вошли пациенты в возрасте от 6 лет до 53 лет, из них 16 детей до 18 лет включительно и 32 взрослых от 19 до 53 лет. Сравнение зрительных параметров и их сравнение в разных возрастных категориях является логически оправданным, однако с учетом разнообразия клинической и генетической картины, различия в возрасте манифестации, а также в связи с малым размером групп есть ограничения в сравнении исходного состояния зрительных функций и результатов лечения.

2 группа. В эту группу вошли пациенты старше 18 лет и моложе 52 лет, в связи с осторожностью применения стволовых клеток у пациентов несовершеннолетнего возраста.

3 группа. В третью группу вошли пациенты в возрасте от 12 до 55 лет, из них 245 детей до 18 лет включительно и 417 взрослых от 19 до 55 лет.

Отдельно охарактеризовать детей и сравнить их результаты с результатами разнородной группы взрослых в данном исследовании статистически не представляется возможным, однако можно строить некоторые прогностические кривые, дающие основания полагать, что патогенетическое лечение, примененное в группе детей (16 детей) в долгосрочной перспективе даст эффективность кратно большую, чем результаты стандартного лечения.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СТАНДАРТНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ

4.1. Общая характеристика группы

В группу стандартного лечения вошли 662 пациента (1284 глаза), из них 323 мужчины и 339 женщин, от 12 до 55 лет, средний возраст в группе составил 33±19 лет. По этническому составу основное количество составляли русские 192 человека (29%), украинцы 119 человек (18%), татары 86 человек (13%), армяне 46 человек (7%), всего 17 национальностей Лечение включало применение различных комбинаций препаратов, указанных в табл.15.

Молекулярно-генетический диагноз был подтвержден и причина заболевания была найдена у 80,04% (682 человека) из всех групп пациентов. Из них в группу стандартного лечения попали 124 человека, у которых диагноз не был подтвержден. Остальные 46 человек, у которых не было подтверждения молекулярно-генетического диагноза, применяли лечение стволовыми клетками.

В группе стандартного лечения распределение пациентов с направительными клиническими диагнозами было следующим: пигментная абиотрофия сетчатки (тапеторетинальная абиотрофия) (249 пациентов), атрофия зрительного нерва (79 пациентов), палочко-колбочковая дистрофия сетчатки (42 пациента), смешанная дистрофия сетчатки (181 пациент), ПВХРД (периферическая витреохориоретинальная дистрофия) (49 пациентов), амблиопия средней/высокой степени (42 пациента), дистрофия сетчатки по типу Кунта-Юниуса (4 пациента), ахроматопсия (2 пациента), хориоидеремия (3 пациента), ангиоидные полосы сетчатки (3 пациента), серпингинозная хориопатия (1 пациент), белоточечное глазное дно (fundus albipunctatus) (7 пациентов).

По результатам клинического и генетического обследования из общего количества 152 пациентов с подтвержденной синдромной формой дегенерации сетчатки после распределения пациентов по группам и направления под наблюдение профильным специалистам в группе стандартного лечения было 58 пациентов с синдромальной формой заболевания. 28 пациентов с синдромом Ашера, 9 пациентов с синдром Барде-Бидля, 2 пациента с синдромом Коэна, 5 – с синдромом Стиклера, 3 – с синдромом Марфана, 5 – с синдромом Жубера, 3 – с синдромом Сениора-Локена, 3 пациента с FEVR – семейной экссудативной витреоретинопатией.

Пациенты, попавшие в группу стандартного лечения, были направлены из 42 субъектов РФ и из пяти стран СНГ. 522 пациента были из европейской части России, 128 пациентов прибыли из регионов, восточнее Урала, 12 человек прибыли из стран СНГ. У каждого пациента был собран семейный анамнез. У 128 пациентов (19,3%) имелась доминантная форма наследования заболеваний сетчатки, у 418 пациентов (63,1%) – рецессивная форма, у 116 пациентов (17,6%) – спорадическая форма (или информации о родственниках было недостаточно, чтобы исключить рецессивный тип наследования).

Во внимание принималось исходное общесоматическое состояние и состояние сетчатки, а также применявшееся ранее лечение. Для статистического сравнения результатов лечения в третьей и первой/второй группах применялись статистические коэффициенты соотношения ввиду кратного различия в количестве пациентов в группах.

Подробная характеристика, сроки и методы введения терапии представлены в табл. 15.

4.2. Общая характеристика полученных результатов

Результаты стандартного и расширенного офтальмологического обследования заносились в электронную карту пациента до и после каждого курса лечения. К анализируемым параметрам относили результаты визометрии, биомикроскопии, рефрактометрии, пневмотонометрии, офтальмоскопии с фоторегистрацией глазного дна обоих глаз при отсутствии затрудняющих факторов (помутнения оптических сред глаза), КЧСМ, теста Хью по результатам оценки цветового зрения, результатов ЭРГ и темновой адаптометрии.

Особое внимание уделялось оценке точных количественных методов обследования: оптическая когерентная томография макулярной зоны и зоны диска зрительного нерва, периметрия, микропериметрия, электроретинография, аутофлуоресценция сетчатки, по показаниям флюоресцентная ангиография (34 пациента).

Отдельно анализировались субъективные показатели, полученные на основе оценки пациентами исходного состояния и состояния зрения после курсов лечения: FLORA, VFQ, MLMT – тест (был применим у 16 пациентов).

Анализ коморбидности проводили по каждой из нозологий. Наиболее часто встречающимися сопутствующими заболеваниями были аномалии рефракции и нарушение прозрачности оптических сред глаза (в том числе катаракта). В группе пациентов, получавших стандартное лечение, аномалии рефракции распределялись следующим образом: Миопия слабой степени – 181 пациент (362 глаза), средней степени – 72 пациента (144 глаза), высокой степени –

31 пациент (54 глаза), миопический астигматизм (сфероэквивалент на глазу с меньшей аномалией рефракции >1,5 дптр) – 112 пациентов (218 глаз). Эмметропия – 127 пациентов (246 глаза), гиперметропия слабой степени 78 пациентов (156 глаз), гиперметропия средней/высокой степени 40 пациентов (68 глаз), гиперметропический астигматизм (сфероэквивалент на глазу с меньшей аномалией рефракции >1,5 дптр.) 21 человек (36 глаз).

Катаракта начальной степени была диагностирована у 113 пациентов (206 глаз), в том числе заднекапсулярная катаракта у 42 пациентов (79 глаз), незрелая катаракта у 32 пациентов (60 глаз), артифакия после катаракты у 78 пациентов (112 глаз), афакия – 4 пациента (8 глаз).

Анализ осложнений проведенной терапии помимо характеристики самих осложнений проводился по шкалам Клавьен-Диндо от 1 до 4 степени, а также по времени возникновения осложнения – ранние, отсроченные, поздние осложнения. Подробный анализ осложнений во всех трех исследуемых группах приводится в главе 7.

Визометрия вместе с оценкой контрастной чувствительности, а также рефрактометрия проводились во время каждого визита пациента: до лечения, непосредственно после курса лечения, через 1 мес., 2 мес., 6 мес. после лечения, перед повторным курсом лечения, а также на 7 мес. после первичного наблюдения, через 12 мес., 18 мес., и 24 мес. Визометрия и измерение контрастной чувствительности были обязательными в указанные сроки. Для пациентов, находящихся на курсах лечения и наблюдения дольше указанных сроков, визометрия проводилась при каждом последующем приеме, который проводился каждые 4 – 6 мес. Длительность наблюдения пациентов составила до 7 лет (84 мес.) – для 58 пациентов (116 глаз). Общий анализ изменения остроты зрения в исследуемых группах до и после лечения приведен в главе 7.

Биомикроскопия проводилась также при каждом визите пациента для оценки общего состояния органа зрения, наличия/отсутствия воспалительных процессов, прозрачности оптических сред глаза, а также для оценки степени пигментации радужной оболочки и угла передней камеры глаза (при необходимости, с использованием трехзеркальной линзы Гольдмана – гониоскопии) для оценки возможного вклада нарушения распределения пигмента в наблюдаемую клиническую картину, а также для исключения псевдоэксфолиативного синдрома.

Пневмотонометрия также проводилась при каждом плановом визите пациента, для исключения рисков развития и прогрессирования недиагностированной глаукомы как сопутствующего или самостоятельного патологического процесса, а также как возможного осложнения лечения. Признаки офтальмогипертензии наблюдались у 32 пациентов (58 глаз), когда цифры внутриглазного давления превышали уровень 24 мм. рт. ст. Максимальное зафиксированное внутриглазное давление – 32 мм рт.ст. В этом случае назначалась консультация

глаукоматолога с подбором капельного режима, отслеживающегося в динамике. Гипотонии глазных яблок в исследуемой группе зафиксировано не было в течение всего срока наблюдения.

Офтальмоскопия с фоторегистрацией глазного дна обоих глаз при отсутствии затрудняющих факторов (помутнения оптических сред глаза) также являлась обязательной процедурой в течение всего срока наблюдения. Фоторегистрация глазного дна проводилась билатерально не реже, чем 1 раз в год.

Результаты измерения КЧСМ (критической частоты слияния мелькания) для каждого пациента заносили в специальную таблицу, где в последующем проводили количественный анализ изменений, обсуждение которого приводится в главе 7 наряду с данными, полученными в результате лечения в других группах пациентов.

Количественное измерение цветовосприятия (32-х оттеночный тест Хью) проводили для каждого пациента до лечения, через 6 мес., 12 мес., 18 мес. и 24 мес. после лечения. Для пациентов с периферическими и синдромальными формами дистрофий сетчатки результаты теста Хью в подавляющем большинстве были нормальными (шкала от 0 до 4 баллов) – 402 пациента (804 глаза), как перед лечением, так и после лечения вплоть до далеко зашедшей формы заболевания, когда остается 1 – 5 градусов центрального поля зрения. Это обусловливается довольно высокой сохранностью колбочковых фоторецепторов центральной зоны сетчатки даже при продвинутой стадии заболевания. Для 260 пациентов (480 глаз) с признаками центральной дистрофии сетчатки различной степени результаты оценки цветового зрения сильно варьировали от незначительной дисхроматопсии (прото- или дейтераномалии) до полной ахроматопсии в зависимости от формы, стадии и патогенеза наблюдаемого процесса. Наиболее выраженные нарушения цветовосприятия наблюдались при генетически подтвержденных ахроматопсии, болезни Штаргардта.

По результатам теста Хью было выявлено, что у 260 пациентов (480 глаз) с признаками центральной дистрофии сетчатки в среднем ухудшение цветовосприятия было на уровне 18±7 баллов (M±σ). Градуировка степени цветоаномалии с указанием спектра, наиболее подверженного изменениям, – красного/зеленого/синего проводилась следующим образом: (I) количество баллов от 2 до 6 – нарушение цветовосприятия слабой степени, (II) от 7 до 18 баллов – средней степени, (III) от 19 до 35 баллов – выраженное нарушение цветовосприятия, (IV) >35 баллов – ахроматопсия. В первой группе (I) по результатам обследования до лечения оказались 46 пациентов, во (II) – 152 пациента, в (III) – 52 пациента, в (IV) – 10 пациентов. По результатам изучения цветовосприятия через 6, 12, 18 и 24 месяца после курсов терапии не было обнаружено статистически значимого изменения цветовосприятия: только два пациента по результатам обследования через 24 мес. после начала лечения из II группы переместились в III группу, что

означает, что их цветовосприятие билатерально ухудшилось с 14/12 баллов до 21/20 баллов соответственно.

Обратная картина наблюдалась при темновой адаптометрии – для пациентов с периферическими и синдромальными формами дистрофий сетчатки в подавляющем большинстве наблюдалось выраженное снижение адаптации к темноте, когда время темновой адаптации значительно увеличивалось. Для 260 пациентов (480 глаз) с различными вариантами центральной дистрофии сетчатки, как перед лечением, так и после лечения вплоть до далеко зашедшей формы заболевания, когда максимально корригируемая острота зрения на лучше видящем глазу была менее 0,1, общие показатели темновой адаптометрии не выходили за пределы начальных изменений, пограничных с нормальными.

Особенности проведения темновой адаптометрии в группе стандартного лечения заключались в том, чтобы получить сравниваемые результаты при краткосрочной адаптометрии. После засвета пациентам давался стимул, который динамически изменялся в зависимости от реакции пациента. Обследование длилось в среднем не менее 30 минут, что достаточно утомительно, и в 8% случаев пациенты засыпали во время процедуры. Для тестирования различных областей сетчатки использовался ахроматический стимул 11 угловых градусов и разные параметры, включая фиксацию (по умолчанию 20°), засвет (7000 кд/м^2 - значение по умолчанию), фазы стимуляции и интенсивности. Стимулом являлись красный и зеленый свет во время адаптации к темноте, что давало возможность определить различную чувствительность между колбочками и палочками. Оценивались различные функции адаптированного к темноте глаза, в том числе скотопическая чувствительность, быстрая адаптация к темноте и абсолютный порог при подаче стимула.

Из-за большой продолжительности и большой нагрузки на пациента полное исследование темновой адаптометрии затруднено для клинического использования, поэтому у 581 из 662 пациентов применяли протокол краткосрочной адаптации к темноте. Использовалась для засвета фотовспышка с высокой скоростью (длительность 0,8 мс, интенсивность 1,8 × 10 скотопических кд / м^2 с), что эквивалентно уровню засвета 76% для палочек. Измерения чувствительности начинались сразу после засвета. Весь тест занимал всего 6,5 минут, тогда как диагностическая чувствительность и специфичность аналогичны протоколам с более длительным временем адаптации. Также проводился замер сдвига Пуркинье как индикатора, при котором чувствительность глаза изменяется от красной области видимого спектра к синему при переходе от фотопического зрения к скотопическому.

По результатам темновой адаптометрии 260 пациентов (480 глаз) с центральными видами дистрофии сетчатки и 402 пациентов (804 глаза) с периферическими и смешанными дистрофиями сетчатки измерялись логарифм порога чувствительности палочек (log-threshold-

rod) и колбочек (log-threshold-cone), экспоненциальная константа изменения чувствительности (exponential-constant) палочек и колбочек и процент изменения чувствительности в минуту (% change/min). В скобках указаны нормальные значения, p – критерий Стьюдента, степень статистической значимости отличий полученных параметров от нормальных параметров, соответствующих данной возрастной категории.

Итак, среднее значение исследуемых параметров у 402 пациентов (804 глаза) с периферическими и смешанными дистрофиями сетчатки составило: log-threshold-cone = 4.79±0.14 (3.69±0.12) p<0,001, log-threshold-rod = 2.19±0.18 (1.52±0.12) p<0,05, exponential-constant cone = 1.26±0.17 (1.56±0.14) p=0,02, exponential-constant rod = 0.11±0.02 (0.17±0.01) p=0,04, % change/min cone = 67±5 (76±3) p=0,1, % change/min rod = 10±2 (15±1) p=0,03. Как мы видим, порог чувствительности палочек и колбочек статистически значимо увеличен, что доказывает функциональную несостоятельность палочек и вторичные изменения колбочек при периферических дистрофиях сетчатки, скорость адаптации палочек и колбочек к темноте снижалась, что мы видим из понижения экспоненциальной константы изменения чувствительности палочек и колбочек со статистической значимостью p=0,02 и p=0,04 соответственно. Процент изменения чувствительности в минуту для колбочек снижался, но оставался в пределах нормы, тогда как для палочек наблюдалось значимое замедление чувствительности (p=0,03).

Перечисленные показатели темновой адаптометрии у 260 пациентов (480 глаз) с центральными видами дистрофии сетчатки не выходили за пределы начальных изменений, пограничных с нормальными (указаны в скобках).

Все эти полученные данные позволяют количественно определить сдвиги чувствительности фоторецепторов для дополнительной оценки тяжести протекания заболевания, а также для составления уточненных прогнозов сохранности зрительных функций и скорости прогрессирования, при замерах в динамике.

Особое внимание уделялось оценке точных количественных методов обследования: оптическая когерентная томография макулярной зоны и зоны диска зрительного нерва, периметрия, микропериметрия, электроретинография, аутофлуоресценция сетчатки, по показаниям флюоресцентная ангиография (была проведена у 34 пациентов), а также количественная оценка результатов фоторегистрации глазного дна в динамике.

Отдельно анализировались параметрические субъективные показатели, полученные на основе оценки пациентами исходного состояния и состояния зрения после курсов лечения: FLORA, VFQ, MLMT – тест (был применим у 16 пациентов). Подробная сравнительная характеристика результатов этих анализов приведена в разделе 4.3.3.

4.3. Сравнительные результаты лечения внутри группы

4.3.1. Оценка функционального состояния сетчатки

По результатам проведенных курсов терапии через 24 мес. была проведена проверка показателей **темновой адаптометрии** 224 пациентов (448 глаз) с центральными видами дистрофии сетчатки и 370 пациентов (740 глаза) с периферическими и смешанными дистрофиями сетчатки. Результаты составили следующую картину: log-threshold-cone = 4.82±0.14 (3.69±0.12) p<0,001, log-threshold-rod = 2.21±0.18 (1.52±0.12) p=0,04, exponential-constant cone = 1.17±0.17 (1.56±0.14) p=0,01, exponential-constant rod = 0.10±0.02 (0.17±0.01) p=0,05, % change/min cone = 66±5 (76±3) p=0,1, % change/min rod = 8±2 (15±1) p=0,01. Как мы наблюдаем, в результате стандартной терапии увеличивается порог чувствительности как палочек, так и колбочек, в среднем на 0,02 и на 0,03 соответственно. Экспоненциальная константа изменения чувствительности более выраженно изменялась в колбочковых фоторецепторах, в среднем на 0.09, тогда как показатели палочковых фоторецепторов оставались практически без изменений (0,01). Показатели процента изменения чувствительности в минуту остались практически без изменений: 1% у колбочковых и 2% у палочковых фоторецепторов. Это отражает то, что молекулярная скорость темновой фазы процесса фототрансдукции практически интактна при генетически обусловленных заболеваниях сетчатки.

Периметрия, а также микропериметрия проводились во время каждого визита пациента: до лечения, непосредственно после курса лечения, через 1 мес., 6 мес. после лечения, перед повторным курсом лечения (6 мес.), а также через 12 мес., 18 мес., и 24 мес. Если период наблюдения за пациентом составлял более 2-х лет, то периметрию и микропериметрию делали каждые 6 месяцев. Ночная слепота и прогрессирующая потеря поля зрения в течение нескольких десятилетий являются отличительными чертами ПР. Поскольку острота зрения сохраняется на ранней и средней стадиях, обследование полей зрения является наиболее эффективным способом оценки прогрессирования заболевания. Потеря полей зрения начинается на средней периферии (неоднородная потеря) и прогрессирует центрально и периферически, создавая кольцевую скотому; на поздних стадиях болезни сохраняется только центральное поле зрения (туннельное зрение).

По одному исследованию на каждый глаз в пределах 90° эксцентриситета было выполнено для каждого пациента. Пациент был проинструктирован смотреть на точку фиксации и нажимать

кнопку как только он/она увидит раздражитель. Никаких фильтров и корректировок не использовалось для оценки периферических изоптер (линий, соединяющих на схеме полей зрения точки, соответствующие участкам сетчатки с одинаковой световой чувствительностью). Внутри центрального поля зрения 30° для каждого пациента проводилась подробная оценка полей зрения с дополнительной поправкой на возраст и скорость реакции. Три вида стимула (V4e, III4e и I4e) с постоянной угловой скоростью 3° в секунду с использовалась для оценки. Эта скорость движения при кинетической периметрии была выбрана в качестве компромисса между 4° в секунду, рекомендованной Джонсоном и Кельтнер, и 1–2° в секунду, предложенной Лахенмайром. В исследованиях использовалась скорость 3° в секунду у пациентов с большой потерей полей зрения и наличием друз диска зрительного нерва. Индивидуальную скорость реакции – временной интервал между началом стимула и реакцией пациента – измеряли предварительно, давая не менее двух кинетических стимулов размером III и яркостью 4e в зоне видимых полей зрения внутри изоптеры. В этом исследовании два вектора скорости реакции были расположены в центре поля зрения вокруг точки фиксации (то есть внутри 20°). Два других были расположены на периферии, около границы полей зрения (начиная примерно с 5° внутри границы отдельной изоптеры).

Один из векторов скорости реакции располагался вдоль носового горизонтального меридиана, другой – вдоль наклонного верхнего меридиана 45°. Они были направлены центростремительно. В случае сильного сужения полей зрения только два вектора скорости реакции помещались в центр. Скорость реакции может влиять на положение изоптер и, следовательно, на их площадь. Площадь каждой изоптеры измерялась в градусах и корректировалась на скорость реакции. Любая область скотом была вычтена из общей площади полей зрения. Результаты периметрии были классифицированы в соответствии со шкалой Гровера, который предложил три модели прогрессирования потери полей зрения при пигментном ретините: 1) начальное легкое ограничение, начинающееся сверху, 2) концентрическое сужение и 3) кольцевая скотома.

Поскольку исследовались оба глаза каждого пациента, статистический анализ применяли отдельно для измерения площади изоптер и скорости реакции правого и левого глаза. Области изоптер и индивидуальные скорости реакции описывались медианами и минимальным и максимальным значением. Различия в площади изоптер между первым и последним исследованием, а также значения скорости реакции были рассчитаны с использованием непараметрического критерия Фридмана (ANOVA), который является обобщением критерия Уилкоксона и применяется для сопоставления условий измерения n объектов (испытуемых) с ранжированием по индивидуальным значениям измерений. Коэффициент корреляции Спирмена

использовался для оценки взаимосвязи между площадью изоптер, скоростью реакции и возрастом пациентов.

В третьей группе из 662 пациентов было 427 пациентов (814 глаз) с умеренным ограничением полей зрения, 172 пациента (344 глаз) с кольцевыми скотомами и 63 пациента (126 глаз) с выраженным концентрическим сужением полей зрения. Средний возраст был 29 лет (± 11,5 лет) в группе с легким сужением, 32 года (± 6,5 лет) в группе с кольцевыми скотомами и 44 года (± 7 лет) в группе с выраженным концентрическим сужением.

Для каждого пациента ни средние площади изоптер V4e ($p = 0,89$), ни III4e ($p = 0,63$) существенно не различались между результатами до лечения и через 24 месяца после начала курсов лечения. Средняя площадь изоптеры V4e во время первого обследования составила $4346°^2$ (от 518 – до $8352°^2$) и $2637°^2$ (407 – $7478°^2$) через 24 месяца после начала курсов лечения. Средняя площадь изоптеры III4e во время первого исследования составила $741°^2$ (85 – $4713°^2$) и $615°^2$ (63 – $4269°^2$) после курса лечения.

Площади изоптер различались между первым исследованием и через 24 месяца для изоптеры V4e на $1709°^2$ (462 – $7915°^2$), составляющие 39,2% от начальной площади, для изоптеры III4e на $126°^2$ (74 – $4491°^2$), составляющие 17,0%. Площадь изоптеры I4e значительно уменьшилась (ANOVA) по сравнению с первым обследованием ($p = 0,006$). Средняя площадь изоптеры I4e во время первого исследования составила $316°^2$ (0 – $1657°^2$) и $207°^2$ (0 – $1363°^2$) во время четвертого исследования через 24 мес. Разница составила $109°^2$ (0 – $1510°^2$), что составляет 34,4% от начальной площади изоптеры соответственно.

Площадь изоптер V4e и III4e увеличилась у 29 пациентов (52 глаза) и уменьшилась у 95 (180 глаз) пациентов. Площадь изоптер I4e увеличилась у 17 пациентов (31 глаз) и уменьшилась у 108 пациентов (207 глаз).

Медиана скорости реакции составила 668 мс (±110 мс) во время первого обследования, 732 мс (±246 мс) во время второго обследования через 6 месяцев, 693 мс (±202 мс) во время обследования через 12 месяцев и 678 мс (±208 мс) во время измерения через 24 месяца после начала терапии. Различия между измерениями не были достоверными ($p = 0,2$). Была обнаружена корреляция между площадью всех изоптер и возрастом пациентов ($R = -0,5$), а также между площадью изоптеры I4e и остротой зрения ($R = -0,5$). Корреляции площади изоптеры со скоростью реакции не обнаружено.

В исследованной группе пациентов, получавших стандартное лечение, были количественно охарактеризованы потеря полей зрения и увеличение времени реакции, по результатам полуавтоматической периметрии в течение двух лет (24 месяца) в группе из 662 пациентов, страдающих наследственными дистрофиями сетчатки. В мировой практике поля

зрения у пациентов с ПР обычно оценивают с помощью мануальной кинетической периметрии Гольдмана. Однако существует высокая вариативность между результатами обследования.

Средние значения времени реакции в миллисекундах во время четырех последовательных обследований до начала лечения, через 6 мес., 12 мес. и 24 месяца после начала лечения 662 пациентов с пигментным ретинитом составило 679 мс (±110 мс) во время первого обследования, 714 мс (±246 мс) во время второго обследования через 6 месяцев, 690 мс (±202 мс) во время обследования через 12 месяцев, 699 мс (±208 мс) во время измерения через 24 месяца и не показало статистически значимых отличий между результатами исследования (ANOVA p = 0,49).

Гровер использовал стимулы II4e или V4e и 28 наблюдается в зонах потери полей зрения. Фишман использовал стимулы как II4e, так и V4e и относительно недавно использовал стимулы V4e и I4e. Различные методы измерения потерь площадей изоптер использовались для оценки. В большинстве исследований области полей зрения определялись по планиметрии и выражались в квадратных сантиметрах с помощью планшета для оцифровки и компьютерного программного обеспечения. Измеряли средний период выпадения половины области полей зрения, который определяется как время, в течение которого половина оставшейся площади поля будет потеряна. Обнаружилось, что средние значения периода 50%-го выпадения полей зрения составляли 7,3 года для стимула V4e и 6,8 года для размера стимула II4e, которые статистически не различались. Наш анализ наиболее близко сравнивается с исследованием Berson, который усреднил изоптерную площадь V4e для всех участников исследования на исходном уровне и сравнил его со средними площадями через один, два и три года наблюдения. Он наблюдал 4,6% потери площади изоптер в год, что эквивалентно 15-летнему периоду потери половины полей зрения. Berson опубликовал исследование 140 пациентов с доминантными формами пигментного ретинита за 8,7-летний период наблюдения. Он отметил сокращение на 2,6% в год площади изоптеры V4e с использованием ручной кинетической периметрии.

Результаты полуавтоматической кинетической периметрии уже сравнивались с результатами ручной кинетической периметрии Гольдмана у пациентов с ПР. Изоптеры, полученные Гольдманном, были на 20% меньше, чем изоптеры, полученные с помощью полуавтоматической кинетической периметрии. Причина в том, что стимул периметрии Гольдмана управляется вручную исследователем, скорость не является постоянной. В полуавтоматической кинетической периметрии скорость постоянна, кроме того, исключается скорость реакции человека, проводящего исследование. В периметрии Гольдмана скорость движения стимула выше, чем 3° в секунду, поэтому граница изоптер смещена к центру поля зрения. В нашем исследовании были использованы три изоптеры - V4e, III4e. I4e - для всех пациентов с ПР. В предыдущих исследованиях, посвященных измерениям полей зрения у пациентов с ПР, использовались только один или два стимула для оценки как изоптер V4e, так и

I4e. Пациенты с синдромом Ашера II типа могут иметь более высокие темпы прогрессирования заболевания, чем пациенты с ПР в среднем. В нашем исследовании мы проанализировали поля зрения 34 пациентов с синдромом Ашера II типа в группе из 662 пациентов с ПР. В настоящем исследовании площади изоптер были измерены с помощью полуавтоматической кинетической периметрии сразу после исследования и выражены в градусах. Это исследование выполняется быстро и может применяться в клинической практике. Не было найдено каких-либо существенных изменений в области поле зрения для V4e и изоптерами III4e между исследованием до лечения и через 24 месяца после начала курсов лечения ($p>0,05$).

Однако для изоптеры I4e была замечена значительная потеря полей зрения по сравнению с исходным уровнем. Таким образом, для наблюдения за пациентами с ПР необходимо анализировать более, чем одну изоптеру.

Использование стимулов V снижает вариабельность результатов между исследованиями. Это может быть вызвано тем, что рецептивные поля ганглиозных клеток сетчатки более редки с повреждением полей зрения, что приводит к недостаточной выборке стимулов.

Межсессионная изменчивость измерения полей зрения с использованием статической периметрии Хамфри при ПР, составляет примерно 5–10 дБ для каждого тестового участка для 5 и 3 размера стимула. Было оценено, что вариабельность 5–10 дБ эквивалентна различиям между тестами и повторными тестами в пределах до 16% у пациентов с хорошей средней чувствительностью или до 100% у пациентов с плохой средней чувствительностью Также была измерена индивидуальная скорость реакции для корректировки результатов измерения площади изоптеры на скорость реакции. Доказано, что ареал изоптер находится под влиянием скорости реакции.

Средняя скорость реакции в норме составляет 702 мс, тогда как в группе пациентов, прошедших стандартную терапию, среднее время реакции составляло 748 мс. Не было существенных различий в значениях времени реакции между последовательными исследованиями с течением времени, и не было обнаружено связи между временем реакции и площадью областей изоптер. Таким образом, корректировка размера поля для движения стимула, происходящего во время реакции, повышает точность кинетической периметрии. Это представляет собой новый и важный вклад в методологию проведения периметрии при наследственных периферических и смешанных дистрофиях сетчатки.

Таким образом, полученные результаты показывают, что полуавтоматическая кинетическая периметрия обеспечивает метод оценки прогрессирования потери полей зрения у пациентов, страдающих от наследственных дистрофий сетчатки, путем измерения площади полей зрения с течением времени. В качестве стандартизированного теста этот метод поможет точно определить клинические подгруппы для клинических испытаний, в частности, для оценки

эффективности новых методов лечения с участием пациентов с далеко зашедшими стадиями заболеваний сетчатки. Таким образом, этот метод может быть использован как инструмент для надежного консультирования пациентов.

Количественные результаты **микропериметрии** были получены для пациентов, которые составили группу стандартного лечения после исключения пациентов, у которых были такие осложнения, как кистозный макулярный отек, эпиретинальная мембрана с макулярными тракциями и выраженная катаракта, и/или состояние которых было связано с другими глазными заболеваниями, такими как увеит, а также сопутствующие/перенесенные сосудистые заболевания сетчатки. Также были исключили случаи пациентов с ненадежными результатами обследования микропериметрии (частота ложноположительных результатов >33% и частота ложноотрицательных результатов >33%) или ОКТ изображения были низкого качества (индекс сигнала <0,6), и те, у кого наружный плексиформный слой (OPL) не был дифференцирован на ОКТ. Всего было проанализировано 303 пациента (579 глаз) из этой группы пациентов. Средняя чувствительность сетчатки в момент первоначального осмотра до лечения составила 3,3 дБ (варьировала от 0,1 до 15,9 дБ), центральная чувствительность в макуле равнялась 9,4 дБ (варьировала от 1,0 до 18,9 дБ), парацентральная чувствительность макулы составила 1,4 дБ (варьировала от 0,6 до 19,5 дБ), чувствительность края скотомы составила 5,3 дБ (варьировала от 1,7 до 14,2 дБ).

Было установлено, что чувствительность сетчатки, измеренная с помощью микропериметрии, и острота зрения положительно коррелируют. Однако, хотя острота зрения часто используется в качестве первичного результата в клинических испытаниях, она может измерять только зрительную функцию в центральной зоне сетчатки. Очень часто пациенты с пигментным ретинитом (и другими дистрофиями сетчатки) имеют неповрежденные зрительная функция в фовеальной зоне, со стабильной фиксацией. Таким образом, микропериметрия является лучшим маркером зрительной функции у таких пациентов, потому что она представляет данные о чувствительности на большей площади сетчатки, чем при оценке остроты зрения. Кроме того, способность выполнять повседневные жизненные задачи сильно зависит от сохранности поля зрения, поэтому микропериметрия также может быть лучшим индикатором практически важных параметров оцени зрительных функций. Полученные данные подтвердили эти соображения.

Через 24 месяца после начала курса лечения средняя чувствительность сетчатки составила 3,2 дБ (варьировала от 0,1 до 15,5 дБ), центральная чувствительность в макуле была равна 9,4 дБ (варьировала от 1,1 до 18,7 дБ), парацентральная чувствительность макулы составила 1,3 дБ (варьировала от 0,5 до 19,4 дБ), чувствительность края скотомы составила 4,3 дБ (варьировала от 1,1 до 12,2 дБ).

Было обнаружено, что исходная острота зрения коррелировала со всеми параметрами чувствительности сетчатки, наиболее сильно с чувствительностью в макулярной зоне. Однако, в отличие от чувствительности сетчатки, она существенно не уменьшилась в течение оцениваемого периода наблюдения (24 месяца). Это можно объяснить тем фактом, что чувствительность сетчатки более чувствительна к структурным изменениям, чем острота зрения, и, следовательно, она может иметь большую величину изменения за тот же период, чем острота зрения. Усредненная чувствительность – наиболее часто используемая мера микропериметрии. Однако, хотя исследование показало снижение усредненной чувствительности, в большинстве случаев оно не превышало порога статистической значимости. Кроме того, у пациентов с выраженными скотомами на исходном уровне становится трудно сравнивать и комментировать какие-либо изменения в усредненной чувствительности из-за низких цифр значений, приближающихся к пороговым, которые сложно сравнивать.

Чтобы преодолеть эту проблему и выявить более значительные изменения, проводилось исследование региональной чувствительности в каждом случае, используя 2 метода.

Метод 1 – топографическое разделение макулы на 2 области: центральную и парацентральную, что более клинически значимо для мониторинга прогрессирования заболевания. Центральная чувствительность сетчатки раньше использовалась в качестве конечной точки. Однако, используя метод 1, получилось выявить лишь несколько случаев с изменениями, превышающими порог статистической значимости, чем это было возможно с использованием сравнения усредненной чувствительности.

Метод 2 – функциональное разделение был лучше в обнаружении изменений с течением времени, поскольку он позволял применять более индивидуализированный подход к анализу, демонстрируя большие отличия от исходного уровня. Наиболее чувствительным оказался метод оценки краевой скотомы и этот параметр имел самую высокую скорость изменения. Несмотря на то, что у этого метода нет собственного определенного порога повторяемости, метод 2 смог обнаружить почти в два раза больше пациентов, у которых превышена разница в 2,4 дБ от исходного уровня, чем у метода 1. Однако у этого метода есть ряд ограничений. Во-первых, поскольку количество точек, используемых при вычислении краевой скотомы, различается, невозможно стандартизировать результаты для сравнения между пациентами. Кроме того, невозможно применить этот метод, если у пациента не было абсолютной скотомы на исходном уровне, хотя это может не привести к серьезным просчетам в оценке результатов, поскольку критерии включения в большинство клинических исследований требуют, чтобы у пациентов имелись хотя бы некоторые поражения макулярной области. С другой стороны, если у пациента обширная скотома, невозможно очертить зону функционально сохранной сетчатки, что делает краевую скотому единственной зоной, доступной для анализа.

Еще одним значительным ограничением этого метода является тот факт, что при ретроспективном анализе невозможно учесть и рассчитать кривую обучения, связанную с полуавтоматической кинетической периметрией, которая, как известно, затрудняет последующий анализ обследований. Поскольку имеются данные последующего наблюдения изменения результатов микропериметрии у 68 пациентов (136 глаз) через 30 и 36 месяцев после начала лечения, можно наблюдать определенную тенденцию к снижению чувствительности сетчатки. Постепенно продолжится дальнейшее исследование для анализа этих методов с большим размером выборки пациентов и проспективным последующим наблюдением, чтобы результаты можно было лучше сопоставить.

Обучение пациентов микропериметрии, чтобы они могли предварительно ознакомиться с тестом, также может служить решением этой проблемы. В заключение можно сказать, проведенная работа описывает новый метод анализа региональной чувствительности сетчатки по результатам микропериметрии при наследственных дистрофиях сетчатки и демонстрирует, что может наблюдаться статистически значимое снижение региональной чувствительности в течение года, даже при стабильной остроте зрения и сохранении точки фиксации. Это может оказаться полезным функциональным результатом для будущих клинических исследований для измерения и сравнения прогрессирования заболевания.

Также для оценки функционального состояния сетчатки в динамике при наследственных дистрофиях применялся **количественный метод анализа ЭРГ (электроретинографии).** Для оценки локальной функции сетчатки у 431 пациента (862 глаза) с пигментным ретинитом с остротой зрения лучше видящего глаза 0,6 или выше были получены мультифокальная, ганцфельд ЭРГ и ЭРГ на вспышку (30 Гц), а также пороги чувствительности макулярной зоны сетчатки (по данным измерения с помощью полуавтоматической кинетической периметрии). У всех пациентов латентность по данным мультифокальной ЭРГ имела нормальные значения в пределах 5 градусов от центра. Однако синхронизации в областях за пределами центральных 7,5 градусов было недостаточно. Латентность при измерении ганцфельд ЭРГ и ЭРГ на вспышку была увеличена, что отражало задержку ответа палочковых фоторецепторов. Лишь у 26 (6%) пациентов ганцфельд ЭРГ и ЭРГ на вспышку были с нормальными значениями латентности. Амплитуда пиков ответа была снижена. Подробные количественные данные результатов ЭРГ приведены в разделе 5.7.1 в табл. 37.

Поскольку при ганцфельд ЭРГ преобладают ответы клеток с периферии сетчатки (палочковые фоторецепторы), полученные данные подтверждают известные факты о патофизиологических процессах при палочковых и смешанных дистрофиях сетчатки. Что касается амплитуды, только 22 пациента (3,3%) показали ответы с амплитудами, близкими к

нормальным при мультифокальной ЭРГ и 14 пациентов (2,1%) – при ганцфельд ЭРГ. Снижение амплитуды сигнала – предиктор прогрессирования патологического процесса.

Изменения латентности являются ранним признаком локального повреждения центральной зоны сетчатки. Почти все области (96%) с потерей чувствительности более 0,5 логарифмических единиц и некоторые области (42%) с сохранностью нормальной чувствительности показали значительную задержку реакции на мультифокальной ЭРГ. Наконец, области с крайней потерей чувствительности демонстрируют мультифокальные ответы с широким диапазоном амплитуд и разброс показателя латентности у разных пациентов, что свидетельствует о различных механизмах действия болезни у разных пациентов.

Может оказаться полезным в практическом здравоохранении оценка **магнитно-резонансной томографии** с большей чувствительностью, чем стандартные офтальмологические методы обследования у пациентов с пигментным ретинитом и смешанными дистрофиями сетчатки на поздних стадиях заболевания. При угасающей ЭРГ и отсутствующих зрительных вызванных потенциалах (ЗВП), зачастую острота зрения пациента представляет собой различение света от тьмы или восприятие движения руки у лица, или слабое предметное зрение. В таком случае пациентам проводилось сканирование с помощью магнитно-резонансной томографии, и их поведенческие характеристики коррелировали с сигналом, вызванным вспышками света, измеренным в первичной зрительной коре головного мозга. Анализ ответов на функциональной МРТ выполняли только в области первичной зрительной коры, потому что эта область показывает четкие анатомические ориентиры, позволяя сделать относительно определенную идентификацию границ на уровне отдельного пациента, тогда как другие области более высокого порядка более разнообразно расположены через борозды и извилины. Толщина коры также была рассчитана и коррелировала с нарушением зрения, как это было измерено с помощью психофизических тестов.

Контрастная чувствительность измерялась движущейся решеткой на мониторе. Вспышки слабой яркости вызвали значимые ответы в полосатой и экстрастриарной коре головного мозга, несмотря на то, что во время сканирования в покое стимулы не дифференцировались от шума. Важно отметить, что пациенты с менее серьезным нарушением контрастной чувствительности показали более сильные ответы зрительной коры V1. Толщина экстрастриарной коры головного мозга не коррелировала со зрительной чувствительностью на МРТ.

Ответы по результатам МРТ обеспечивают более чувствительный и надежный показатель зрительной сохранности, чем ЗВП или ЭРГ, которые часто отсутствуют у пациентов с ПР. Минимальное остаточное зрение может быть оценено с помощью оптимальной визуальной стимуляции в двух альтернативных задачах разграничения и принудительного выбора. Методы

визуализации предоставляют полезную информацию для отслеживания прогрессирующей потери зрения.

Функциональная магнитно-резонансная томография может быть практическим инструментом для оценки сохранности зрения, поскольку она более осуществима и чувствительна, чем психофизическое или офтальмологическое тестирование.

4.3.2. Оценка анатомической структуры сетчатки

Появление оптической когерентной томографии с высоким разрешением позволило получать снимки с контрастными очертаниями слоев сетчатки, и в последние годы ассоциацией офтальмологов были согласованы многие анатомические корреляции этих слоев. Тем не менее, некоторые анатомические корреляты все еще остаются спорными, например, вторая гиперрефлективная полоса, которая называется эллипсоидной зоной и отражает границу наружных и внутренних сегментов фоторецепторов. Несмотря на отсутствие единого мнения о фактическом происхождении зоны эллипсоида, большой интерес к оценке ее целостности и интенсивности при различных патологических процессах дает возможность применять эту информацию в практических целях. Применялась градуированная шкала, описанная Hirji N. и соавт., 2017 в анализе изменений, обнаруженных на ОКТ и при аутофлуоресценции. Репрезентативные изображения семи фенотипов оптической когерентной томографии в центральной области при дистрофиях сетчатки по нарастанию тяжести повреждения: (I) эллипсоид внутреннего сегмента непрерывен, (II) целостность эллипсоида внутреннего сегмента нарушена, (III) эллипсоид внутреннего сегмента отсутствует, (IV) наличие гипорефлективной зоны в субфовеальной зоне, (V) атрофия наружного нейроэпителия сетчатки, включая потерю РПЭ, (VI) выраженная атрофия наружного нейроэпителия сетчатки, включая потерю РПЭ и наличие друз, (VII) полная потеря наружного нейроэпителия с выраженным складчатым нарушением профиля сетчатки и включениями гиперрефлективного материала.

Применение описанной шкалы позволило распределить пациентов третьей группы количественно по каждой из категорий, I – 79 пациентов (148 глаз) II – 270 пациентов (532 глаза) III – 142 пациентов (274 глаз) IV – 15 пациентов (30 глаз) V – 103 пациентов (196 глаз) VI – 41 пациент (82 глаза) VII – 12 (22 глаза). Полученные результаты позволяют судить о том, что наибольшее количество пациентов было во 2-й (40,7%), 3-й (21,4%) и 5-й (15,5%) категориях.

Во время применения патогенетически направленного лечения наиболее выраженный терапевтический эффект следует ожидать в группе пациентов с фенотипами ОКТ 1 – 3 категорий.

Во время проведения курса терапии в группе пациентов стандартного лечения за 24 месяца наблюдения улучшение фенотипа профиля сетчатки на ОКТ было зафиксировано у 14 пациентов (28 глаз) из III категории до II категории и у 8 пациентов (13 глаз) из V категории в IV категорию. Однако одновременно с этим наблюдалось ухудшение клинической картины и усугубление фенотипа повреждения сетчатки по данным ОКТ у 45 пациентов (82 глаза) от II категории до III, у 28 пациентов (37 глаз) от III категории до IV и у 3-х пациентов (6 глаз) от IV до V категории, что означает несоразмерность терапевтического влияния применяемого лечения скорости протекания патологических процессов.

Для оценки изменений данных аутофлуоресценции сетчатки (FAF) применялась адаптированная градуированная шкала, описанная Hirji N. и соавт., 2017. (A) Нормальный внешний вид FAF, (B) Сниженный сигнал FAF в центре с хорошо видимой границей, (C) Центральное усиление сигнала аутофлуоресценции на FAF, (D) Изменения равномерности сигнала в зоне сосудистых аркад (в виде «булыжной мостовой», «пчелиных сот», крапчатости, точек и других паттернов), (E) Диффузные изменения, затрагивающие центральную и периферическую зоны сетчатки (с выходом за зону сосудистых аркад).

Для 152 пациентов из группы стандартного лечения, которым было проведено исследование аутофлуоресценции сетчатки, распределение по градуированной шкале категорий составило следующую картину: (A) 12 пациентов (24 глаза), (B) 37 пациентов (61 глаз), (C) 27 пациентов (54 глаза), (D) 45 пациентов (90 глаз), (E) 31 пациент (58 глаз). Полученные данные позволяют судить о преобладании фенотипа аутофлуоресценции со сниженным сигналом и хорошо видимой границей (B), с центральной и парацентральной дифференцирующейся патологией в виде крапчатости, неравномерности, изменения рисунка в виде пчелиных сот или булыжной мостовой, а также (E) диффузные изменения, затрагивающие центральную и периферическую зоны сетчатки с выходом за зону сосудистых аркад. Примечательно, что за 24 месяца наблюдений в ходе проводимого стандартного лечения результаты измерений аутофлуоресценции практически не изменились и фенотипы всех пациентов остались в прежних категориях.

4.3.3. Субъективные результаты лечения по оценке пациентов

Оценка качества жизни пациентов проводилась по двум шкалам – FLORA тесту и VFQ-25 опроснику. В разделе 5.7.3 на рис. 63 указаны результаты изменения качества жизни до и после

лечения в исследуемых группах. Мы наблюдаем в группе №3 статистически значимое ухудшение качества зрения за 24 месяца после начала стандартной терапии (рис. 63В) и как следствие снижение показателей субъективной оценки качества жизни.

Тест FLORA изначально был разработан и принят к применению в практическом здравоохранении специалистами по зрительной реабилитации пациентов с глубокими необратимыми нарушениями зрительных функций, в том числе в качестве возможного теста оценки эффективности имплантируемых устройств зрительных протезов. Позже данная методика ввиду своей чувствительности и эффективности стала применяться и у пациентов с далеко зашедшей формой дистрофии сетчатки. Пилотная оценка функциональной сохранности зрения в случае тяжелой степени слабовидения (FLORA) включала раздел самоотчета, список функциональных зрительных задач для наблюдения за работой и краткое изложение случая из жизни. Результаты, полученные от пациентов из третьей группы, получавших стандартное лечения, с максимально корригируемой остротой зрения лучше видящего глаза менее 0,05 были проанализированы, чтобы определить, подходят ли вопросы интервью и функциональные зрительные задачи для этой группы пациентов со сверхслабым зрением и страдает ли оценка результатов теста от влияния крайних пограничных значений. 33 пациента с тяжелой далеко зашедшей стадией пигментного ретинита были включены в анализ ответов после опросника FLORA. Были заданы все 14 вопросов интервью. Все 35 задач были выбраны для оценки по крайней мере один раз, при этом в среднем оценивались по каждому элементу теста. Два независимых оценщика теста использовали все четыре варианта оценки теста и пациенты их 3-й подгруппы оказались распределены следующим образом: терминальный (34%), сложный (23%), умеренный (24%) и легкий (19%).

MLMT тест был релевантен к применению у 16 пациентов из группы стандартного лечения. Сравнительные результаты его применения освещены на рис. 67.

Табл. 15. Характеристика применяемых препаратов и процедур для проведения стандартных схем лечения в группе 3.

Кол-во пац-тов	**Диагноз**	**Группа препаратов**	**Препарат**	**Кратность приема**	**Длительность лечения**	**Путь приема**
184	RP, MD. STGD, LCA, CRD	Олигопептиды	Ретиналамин (полипептиды сетчатки глаз скота)_	1 р/сут	10 уколов	п/б
293	STGD, RP, CRD	Метаболиты	Милдронат	2 р/сут	30 таб	п/о
			АТФ (аденозин трифосфат натрия)	1 р/сут	10 уколов	в/м
328			Нобен (идебенон)	2 р/сут	30 таб	п/о

	CSNB, RP, MD. STGD, LCA, CRD	Ноотропные препараты	Сермион			
			Фезам, пирацетам, циннаризин	1 р/сут	30 таб	п/о
			Кортексин	1 р/сут	30 таб	п/о
440	CSNB, ESCS, RP, MD. STGD, LCA, CRD	Витамины	Нутроф тотал, перфект айз	1 р/сут	90 таб	п/о
			Вита-таурин, тауфон	1 р/сут	Курс 1 мес	м/к
			Рибофлавин	1 р/сут	10 уколов	в/м
			Мильгамма,	1 р/сут	10 уколов	в/м
92	MD	Пигментные добавки	Лютеин/зеаксантин	1 р/сут	90 дн	п/о
			Вазонит	1 р/сут	90 дн	п/о
65	RP, STGD	Магнитоофрез	Прибор Амо-Атос	1 р/сут	10 процедур	м/к

CSNB - congenital stationary night blindness - врожденная стационарная ночная слепота. ESCS - enhanced S-cone syndrome - синдром повышенного ответа колбочек. MD - macula dystrophy - макулярная дистрофия (ранняя форма). LCA - Leber congenital amaurosis - врожденный амавроз Лебера. CRD - cone-rod dystrophy - колбочко-палочковая дистрофия. RP - retinitis pigmentosa - пигментный ретинит. STGD - болезнь Штаргардта. п/б – парабульбарно, п/о – перорально в/м – внутримышечно м/к – местно капельно.

ГЛАВА 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Для некоторых форм моногенных заболеваний сетчатки имеется возможность провести то лечение, которое даст шансы на стабильное сохранение зрительных функций и в некоторых случаях на их кратное улучшение. Для 48 пациентов из всех обследуемых (**5,6%**) была возможность применить такое таргетное лечение, 59 пациентов, имеющих мутации в тех же генах (Табл. 17), по различным причинам не вошли в группу пациентов, получивших генотерапевтическое лечение. В основном причиной являлся возраст и экономический / организационный фактор, а также принятие информированного добровольного решение пациентом и его родственниками после взвешивания всех за и против проведения терапии. Три препарата из примененных зарегистрированы в Европе и США и доступны в схемах лечения (воретиген непарвовек, деферипрон и рисутеганиб), остальные 12 препаратов находятся на фазах клинических исследований: 4 препарата на 3-й фазе (CEP290, CNGA3, CNGB3, RS1) и 8 препаратов на 1/2 фазе клинического обследования (*RPGR, CDHR1, USH2A, EYS, CRB1, NR2E3, RHO* и *CLN3*).

Ключевые методы оценки зрительных функций до и через 1, 6, 12 и 24 мес. после лечения в каждой подгруппе пациентов 1 группы представлены в табл. 16.

Табл. 16. Ключевые методы оценки зрительных функций до и после лечения в каждой подгруппе пациентов 1 группы (патогенетическое лечение).

Ген	MLMT	VFQ	FLORA	Hue	Vis	ОКТ	Перим	МикроП	ЭРГ	ТА	КЧСМ	FAF	МРТ
RS1		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		**X**		
RPGR		**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	
RPE65	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**				**X**	**X**	**X**	
CDHR1		**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**	
USH2A		**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	
EYS	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	
CRB1	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	
CEP290	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**		
NR2E3		**X**	**X**		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		
RHO		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		
CLN3		**X**	**X**		**X**	**X**	**X**		**X**		**X**		**X**
C19orf12		**X**	**X**		**X**	**X**	**X**		**X**		**X**		**X**
CNGA3		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**				
CNGB3		**X**	**X**	**X**	**X**	**X**		**X**	**X**				

MLMT – оценка подвижности, VFQ – опросник качества зрения, FLORA – субхективный опросник качества жизни, связанного со зрением, Hue – тест цветовоприятия, Vis – оценка остроты зрения, ОКТ – оптическая когерентная томография, Перим – периметрия, МикроП – микропериметрия, ЭРГ – Электроретинограмма, ТА – темновая адаптация, КЧСМ – критическая частота слияния мельканий, FAF – аутофлуоресценция глазного дна, МРТ – магнитно-резонансная томография.

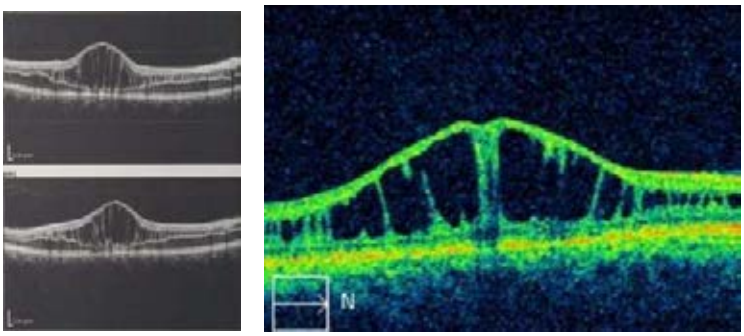
Табл. 17. Количество пациентов в подгруппе патогенетического лечения в сравнении с пациентами, имеющими те же формы заболевания, но вошедших в группу стандартного лечения или лечения стволовыми клетками.

Подгруппа пациентов	RS1	RPGR	RPE65	CDHR1	USH2A	EYS	CRB1	CEP290	NR2E3	RHO	CLN3	C19orf12	CNGA3	CNGB3
Патогенетическое лечение	5	2	2	2	13	8	1	3	2	2	3	1	2	2
Стандартное лечение	6	5	2	0	29	1	3	1	2	2	0	0	4	3

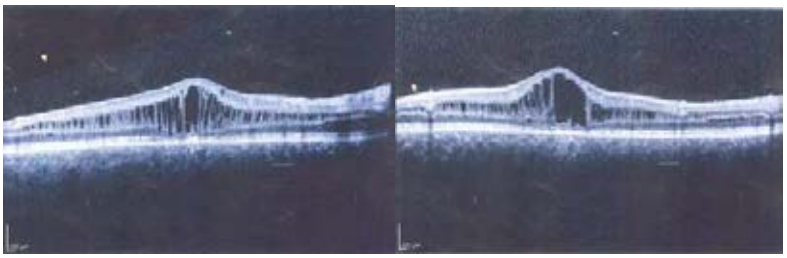
В связи с различием возраста и разнообразием проявлений клинической картины невозможно было провести статистическое сравнение групп пациентов, прошедших генотерапевтическое лечение и по каким-либо причинам не прошедших патогенетический курс терапии, но применявших стандартные схемы лечения (Табл.15). Кроме того, есть подгруппы пациентов (CDRH1, CLN3, C19orf12), где все пациенты прошли патогенетическое генотерапевтическое лечение.

5.1. Результаты лечения пациентов с ювенильным ретиношизисом (RS1)

5 пациентов мужского пола получили интравитреальные инъекции препаратом rAAV2tYF-CB-hRS1 в рамках клинического исследования NCT02416622 по протоколу для восстановления недостаточной функции белка ретиношизина. На рис. 22 показана ОКТ картина центральной зоны сетчатки пациентов этой группы до начала лечения.



P1 P2



P4 *P5*

Рис.22. ОСТ пациентов с Х-сцепленным ретиношизисом до начала лечения.

В табл.18 приведена сводная характеристика подгруппы пациентов с диагнозом Х-сцепленный ретиношизис, получивших лечение.

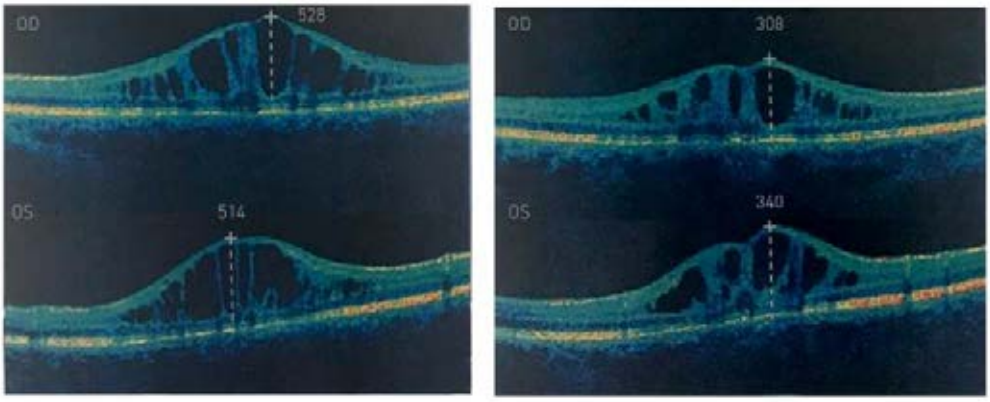
Ген RS1 кодирует белок ретиношизин, который экспрессируется в фоторецепторах сетчатки и биполярных клетках, выделяется в межфоторецепторное пространство (глава 1.1.5 обзора литературы) и играет роль в организации архитектуры и функции сетчатки. Мутации в гене RS1 вызывают Х-сцепленный ювенильный ретиношизис (XLRS), который является одной из форм моногенных заболеваний сетчатки.

Табл. 18. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом Х-сцепленный ювенильный ретиношизис в исследуемой группе.

Р	Возраст манифестации*	Возраст на начало лечения	Мутация в гене *RS1*	Экзон
Р1	14	26	*c.554C>A p.Thr185Lys*	6
Р2	12	24	*c.637C>T p.Arg213Trp*	4
Р3	6	11	*c.274T>G p.Trp92Gly*	4
Р4	14	36	*c.274delT p.Trp92fs*	4
Р5	5	6	*c.286T>C p.Trp96Arg*	4

* возраст манифестации первых признаков заболевания

На рис. 23 приведены результаты ОКТ контроля по уменьшению интраретинального шизиса в макулярной зоне на **41,6% (220 мкм)** на правом глазу и на **33,8% (174 мкм)** на левом глазу у одного пациента Р3 через 2 недели после инъекции *rAAV2tYF-CB-hRS1*.



А До лечения Б. 2 недели после лечения

Рис.23. Результаты ОКТ до и через 2 недели после инъекции rAAV2tYF-CB-hRS1 у пациента P3. Снимки взяты с разрешения витреоретинального хирурга Tae Kwon Park, обладающего правами на данное изображение.

В табл. 19. приведена характеристика остроты зрения правого (OD) и левого (OS) глаза до и через 12 месяцев после лечения у пациентов с подтвержденным диагнозом Х-сцепленный ювенильный ретиношизис

Табл. 19. Характеристика остроты зрения правого (OD) и левого (OS) глаза до и через 12 месяцев после лечения у пациентов с подтвержденным диагнозом Х-сцепленный ювенильный ретиношизис.

P	Мутация в гене *RS1*	Vis OD		Vis OS	
		до	через 12 мес.	до	через 12 мес.
P1	*c.554C>A p.Thr185Lys*	0,25	0,35	0,1	0,25
P2	*c.637C>T p.Arg213Trp*	0.3	0.4	0.3	0.4
P3	*c.274T>G p.Trp92Gly*	0.3	0.4	0.6	0.8
P4	*c.274delT p.Trp92fs*	0.15	0.2	0.2	0.3
P5	*c.286T>C p.Trp96Arg*	0.02	0.08	0.3	0.4

Острота зрения у пациента P3 повысилась на правом глазу с 0,3 до 0,4 и на левом глазу с 0,6 до 0,8 через две недели после инъекции. Эффект лечения оставался стойким через 6 месяцев, 12 месяцев и 18 месяцев после инъекции с незначительными флуктуациями между датами осмотра.

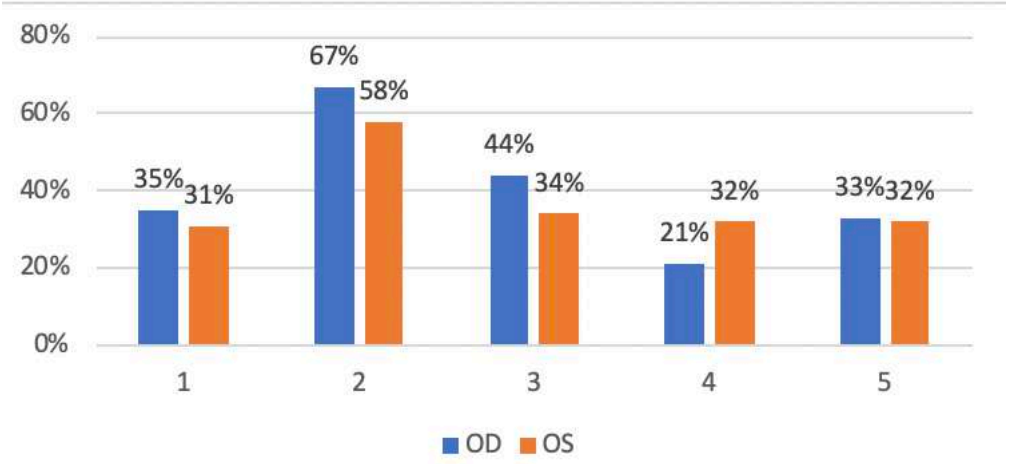


Рис. 24. Стойкое снижение макулярного шизиса через 12 мес. после терапии. Эффект указан в процентах от исходной толщины шизиса центральной зоны у 1-го – 5-го пациентов (по оси x).

Табл. 20. Снижение толщины центрального шизиса правого (OD) и левого (OS) глаза на количество мкм и в процентном отношении от исходной толщины сетчатки в центре.

	OD		OS	
	%	мкм	%	мкм
P1	35	160	31	152
P2	67	340	58	312
P3	44	236	34	178
P4	21	135	32	192
P5	33	157	32	170

На рис. 24 и в табл.20 мы наблюдаем повторяемый эффект снижения толщины центральной зоны сетчатки, что подтверждает эффективность проведенного лечения.

5.2. Результаты патогенетического генотерапевтического лечения пациентов с изолированными рецессивными формами пигментного ретинита

5.2.1. Результат лечения *RPGR*-ассоциированной ретинопатии

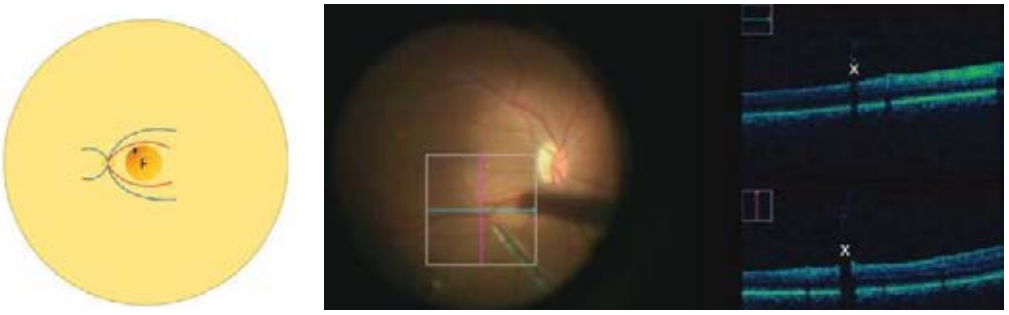
Два пациента с *RPGR*-ассоциированным пигментным ретинитом получили субретинальную инъекцию **0,07 мл rAAV2tYF-GRK1-hRPGRco в средней дозе (6×10^{11} мкг/мл)**, парный глаз служил контролем. rAAV2tYF-GRK1-hRPGRco применяли для лечения X-

сцепленного пигментного ретинита (XLRP) у пациентов с мутациями в гене регулятора ГТФазы пигментного ретинита (RPGR). Подробная характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом RPGR-ассоциированный пигментный ретинит представлена в табл.21. Вектор содержит кодон-оптимизированную человеческую кДНК гена *RPGR* (hRPGRco), управляемую фоторецептор-специфическим промотором GRK1 (рецепторная киназа 1, связанная с G-белком), и упакован в капсидный вариант AAV2 с тремя поверхностными остатками тирозина, замененными на фенилаланин (AAV2tYF). Во время инъекции проводился контроль с помощью ОКТ (рис.25).

Табл. 21. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *RPGR*-ассоциированный пигментный ретинит в 1-й группе.

Р	Возраст манифестации	Возраст на начало лечения	Мутация в гене *RPGR*	Экзон
Р1	14	36	*c.3092delA p.Glu1031fs*	18
Р2	16	34	*c.1652C>G p.Ser551Ter*	14

* возраст манифестации первых признаков заболевания



А Б

Рис. 25. А. Топография проведения субретинальной инъекции. F – фовеола. Черная точка – место инъекции. **Б.** Интраоперационная ОКТ для контроля топографии инъекции (использовано с разрешения, права на изображения Dr. Robert MacLaren)

Электроретинография, визуализация сетчатки in vivo и гистологический анализ (глава 5.7.2) показали восстановление функции и структуры фоторецепторов в отсутствие токсичности для глаз по сравнению с контрольным глазом.

Острота зрения у пациентов Р1 и Р2 повысилась на правом глазу с 0,3 до 0,4 и на левом глазу с 0,6 до 0,8 через 6 мес. после инъекции. Эффект лечения оставался стойким через 12 месяцев и 18 месяцев после инъекции с незначительными флуктуациями между датами осмотра.

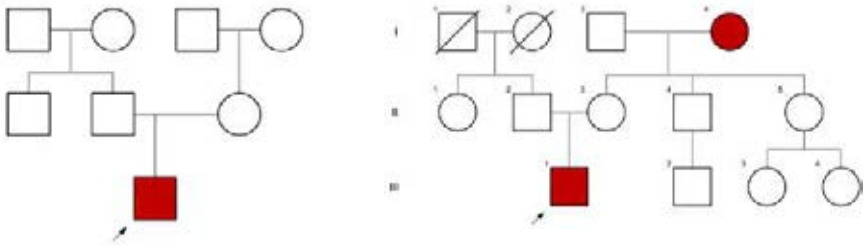
Данные исследований VFQ-25 и теста FLORA в группе сравнения двух пациентов, получивших таргетную терапию и пяти пациентов, получивших стандартное лечение отличаются

в лучшую сторону в группе таргетной терапии, статистически обсчитываемых данных на выборке такого размера получить не удается. MLMT тест в данной группе пациентов релевантен только на уровне освещенности 4 и выше (от 0 до 10 люкс), при освещенности выше 50 люкс пациенты с легкостью проходили все препятствия. Сравнительные данные периметрии в исследуемых группах представлены в разделе 5.7. В целом субретинальные инъекции хорошо переносились и не были связаны с системной токсичностью. Осложнения лечения в данной группе пациентов представлены следующими проявлениями: в раннем послеоперационном периоде наблюдалась слабая конъюнктивальная гиперемия, конъюнктивальный хемоз, пигментация в месте инъекции или вне инъецируемой области, к отсроченным осложнениям относились: витреальный кровяной сгусток, предретинальное кровоизлияние, начинающаяся задняя субкапсулярная катаракта, сегментарная отслойка сетчатки. Подробный анализ осложнений и побочных эффектов приведен в главе 7:

5.2.2. Результат патогенетического лечения *RPE65*- ассоциированной ретинопатии

Два пациента оба с биаллельными (подтверждено анализом сегрегации по Сэнгеру) компаунд-гетерозиготными мутациями в гене RPE65 прошли двустороннее лечение в виде субретинальных инъекций препаратом воретиген непарвовек. Характеристика пациентов и возраста манифестации представлена в таблице 27.

Характерные жалобы пациентов были на отсутствие предметного зрения с рождения, гемералопию, нистагм, окулодигитальный синдром с 3-х месяцев после рождения, который со временем нивелировал.



P1 P2

Рис. 26. Семейный анамнез (генеалогическое древо) пациентов P1 и P2.

У первого пациента неизвестно наличие росдтвенников с таким же диагнозом, у второго бабушка имела тот же диагноз (рис.26). P1: Vis OD = Vis OS = движение руки у лица. ВГД OD 13 мм. рт. ст., OD 14 мм. рт. ст. Рефракция OD M -4.5 OS M -4.0. Объективно положение глаз в глазнице правильное, придаточный аппарат глаза в пределах возрастной нормы.

Мелкоразмашистый горизонтальный нистагм, усиливается при взгляде в стороны. *Передний отрезок*: конъюнктива: сосудистый рисунок незначительно усилен. Роговица прозрачна, сферична, зеркальна, чувствительность сохранена, передняя камера средней глубины, влага чистая, УПК (угол передней камеры) открыт, дисгенеза нет. Радужная оболочка структурна, лакуны нормального строения, пигментная кайма сохранена. Хрусталик прозрачен. Единичная вакуолизация OS. *Стекловидное тело*: единичные плавающие помутнения OU. **Глазное дно** (рис. 27): OU ДЗН бледный, монотонный, границы четкие, физиологическая экскавация диска зрительного нерва отсутствует, незначительная перипапиллярная атрофия хориоидеи. Артериолы сужены. Макулярный рефлекс деформирован с единичными белесоватыми очагами вокруг макулы. На средней периферии участки истончения сетчатки, перераспределения пигмента, на крайней периферии единичные зерна пигмента OU. На OS на 2 часах невус размером 1ДД (см. фото глазного дна Р1 на рис.27). **ЭРГ** не регистрируемая, периметрию провести не удается в связи с низкими зрительными функциями. По результатам генетического анализа обнаружены 2 мутации в гене RPE65: c.1102T>C p.(Tyr368His) и c.131G>A p.(Arg44Gln) в компаунд-гетерозиготном состоянии (после анализа сегрегации, проведенном по Сэнгеру).

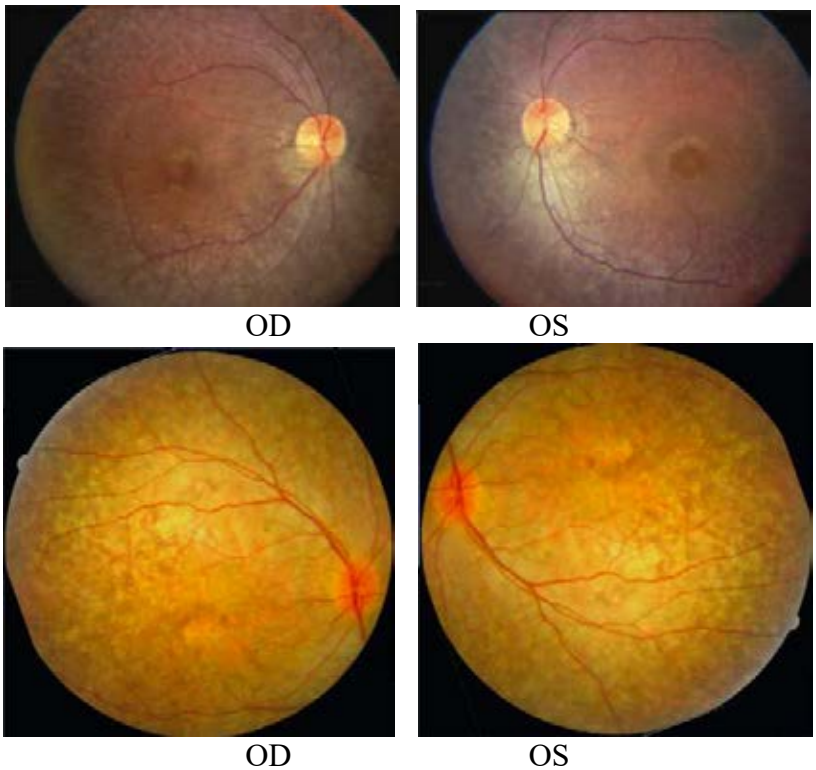


Рис. 27. Глазное дно пациента Р1 (вверху) и пациента Р2 (внизу).

Р2: Объективно: положение глаз в глазнице правильное, придаточный аппарат глаза в пределах возрастной нормы. Мелкоразмашистый горизонтальный нистагм. *Передний отрезок*: конъюнктива: сосудистый рисунок незначительно усилен. Роговица прозрачна, сферична, зеркальна, чувствительность сохранена, передняя камера средней глубины, влага чистая, угол

передней камеры в норме. Радужная оболочка структурна. Хрусталик прозрачен. ***Глазное дно***: (рис.27) OU ДЗН восковидный, границы четкие, физиологическая экскавация диска зрительного нерва отсутствует, артериолы значительно истончены. Макулярный рефлекс отсутствует. На всем протяжении сетчатка значительно истончена, малопигментирована, на крайней периферии единичные зерна пигмента OU (см. фото глазного дна P2 на рис.27) **ЭРГ** не регистрируемая, периметрию провести не возможно.

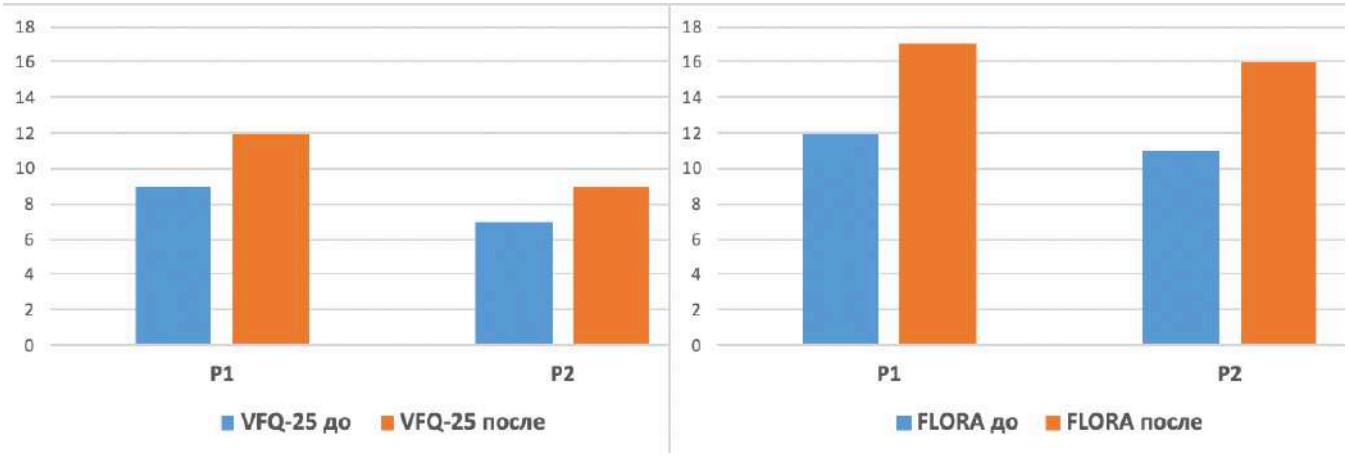
По результатам генетического анализа обнаружены 2 мутации в гене RPE65: c.271C>T p.(Arg91Trp) c.11+5G>A p.(-) – мутация в каноническом сайте сплайсинга в компаунд-гетерозиготном состоянии (после анализа сегрегации, проведенном по Сэнгеру).

Обоим пациентам была проведена однократная монокулярная субретинальная инъекция **воретигена непарвовека** в дозе 0.45 мл с 1.33×10^{12} вирусных геномов. Парный глаз был инъецирован той же дозой препарата через 12 дней после первой инъекции. Повторную ЭРГ и оценку зрительных функций, также оценку мобильности (MLMT) делали через 1 мес, 6, 12, 18 и 24 мес. после проведения лечения.

Табл. 22. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом RPE65-ассоциированный амавроз Лебера в исследуемой группе.

P	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутация в гене RPE65**	**Экзон**
P1	M	С рождения	15	c.1102T>C p.(Tyr368His)	10
				c.131G>A p.(Arg44Gln)	3
P2	M	С рождения	11	c.271C>T p.(Arg91Trp)	4
				c.11+5G>A p.(-)	инт.1

Оба пациента отмечали более комфортное прохождение теста через 12 мес. после инъекции, чем до лечения, а также повышение комфорта передвижения в темное время суток в ежедневной жизни. Порог световой чувствительности во всем поле зрения (full-field light sensitivity threshold – FST) снижался через 12 мес. после применения терапии, что подтверждает функциональную эффективность проведенной терапии



А Б

Рис. 28. График изменения удовлетворенностью ежедневной жизнью в баллах (А – VFQ-25, Б – FLORA тест) до прохождения лечения и через 12 мес после прохождения лечения у двоих пациентов с *RPE65* ассоциированным амаврозом Лебера в исследуемой группе.

Мы наблюдаем значительное увеличение удовлетворенностью ежедневной жизнью у пациентов с 9 до 12 и с 7 до 9 баллов по шкале опросника VFQ-25 (рис 28А) у пациента 1 и 2 соответственно, а также с 12 до 17 баллов и с 11 до 16 баллов по шкале опросника FLORA (Рис 28Б) у пациента 1 и 2 соответственно. Эти результаты дают возможность констатировать положительную динамику течения заболевания (Табл. 23) после применения таргетного лечения по сравнению со стандартной поддерживающей терапией, применяемой в этой группе пациентов.

Табл. 23. Результаты в баллах после прохождения опросника пациентами с *RPE65* ассоциированным амаврозом Лебера до прохождения лечения и через 12 мес. после прохождения лечения.

	VFQ-25		FLORA		MLMT	
	до	12 мес. после	до	12 мес. после	до	12 мес. после
P1	9	12	12	17	4 мин	2,5 мин
P2	7	9	11	16	4 мин	2,5 мин
P3	9	9	7	7	5 мин	5 мин
P4	8	8	9	9	4 мин	4 мин

Полученные данные не представляется возможности сравнить с данными не леченных двух пациентов с *RPE65* ассоциированным амаврозом Лебера, прошедших курс стандартного лечения в исследуемой группе пациентов, так как имеются возрастные различия в группе пролеченных пациентов и в группе не пролеченных пациентов (не прошедших критериев отбора для применения лечения): средний возраст 13 лет (15 и 11 лет) в группе патогенетического лечения и 49 лет (50 и 48 лет) в группе стандартного лечения.

Данные VFQ-25, FLORA и MLMT шкал субъективной оценки изменения зрения, а также данные клинического обследования остались полностью без изменений через 12 месяцев стандартного лечения у двух пациентов с *RPE65* ассоциированным амаврозом Лебера 50 и 48 лет, которые не попали в группу патогенетического лечения.

Также важно принимать во внимание психологический субъективный факт получения генотерапевтического лечения пациентами 15-и и 11-и лет, что может незначительно повышать результаты субъективных методов оценки зрения, так называемый положительный плацебо эффект, вклад которого учитывали при подсчете шкал.

5.2.3. Результаты лечения *CDHR1*-ассоциированной ретинопатии

В группу пациентов, прошедших патогенетическое лечение CDHR1-ассоциированной ретинопатии, попали два пациента в возрасте 43 и 44 года с мутациями c.783G>A p.(Pro261=), которая не приводит к замене аминокислоты, но влияет на сайт сплайсинга в 8-м экзоне и c.1553+1delG p.(-), которая приводит к нарушению сайта сплайсинга в 14-м интроне, а также c.1231C>T p.(Gln411Ter) в 12-м экзоне, которая приводит к преждевременной терминации трансляции в 411-м кодоне (табл. 24). Результаты ОКТ, фото и FAF глазного дна приведены на рис. 29A-E. У первого пациента Vis OD (BCVA) = 0,2, Vis OS (BCVA) = 0,2, у второй пациентки Vis OD (BCVA) = 0,3, Vis OS (BCVA) = 0,25.

Обоим пациентам была проведена однократная монокулярная субретинальная инъекция экспериментальным генотерапевтическим препаратом rAAV8-CB-hCDHR1 в дозе 0.3 мл с 3.0×10^{12} вирусных геномов на мл. Парный глаз был инъецирован той же дозой препарата через 12 дней после первой инъекции, так как не было зарегистрировано ранних послеинъекционных побочных эффектов. Повторное офтальмологическое обследование, ЭРГ, ОСТ, оценку зрительных функций, и функции цветовосприятия делали через 1 мес, 6, 12, 18 и 24 мес. после проведения лечения.

Были зарегистрированы незначительные изменения в красном и зеленом спектре восприятия на уровне колбочкового аппарата (6 и 8 баллов соответственно).

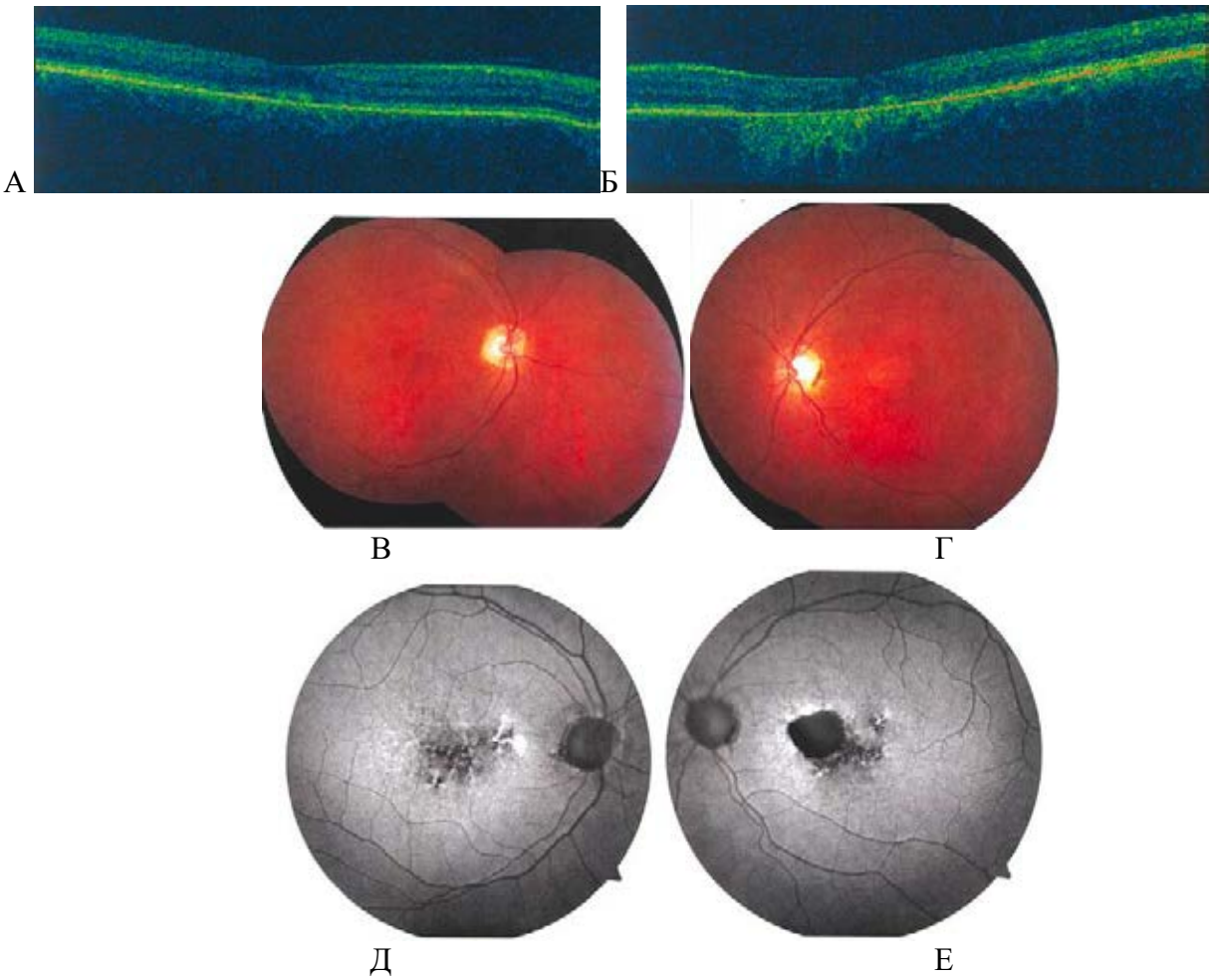


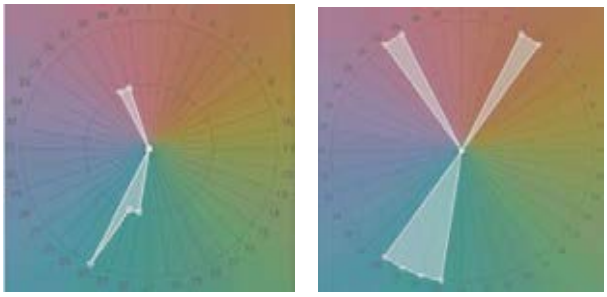
Рис. 29. А – ОКТ OD **Б** – ОКТ OS **В** – фото глазного дна OD **Г** – фото глазного дна OS **Д** – аутофлуоресценция глазного дна OD **Е** – аутофлуоресценция глазного дна OS у пациента с мутацией в гене *CDHR1*.

Табл. 24. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом CDHR1 ассоциированным пигментным ретинитом в исследуемой группе.

Р	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутация в гене CDHR1**	**Экзон**
Р1	М	С 23 лет	43	c.783G>A p.(Pro261=)	8
				c.1553+1delG p.(-)	инт.14
Р2	Ж	С 11 лет	44	c.1231C>T p.(Gln411Ter)	12
				c.1231C>T p.(Gln411Ter)	12

Одним из наиболее частых осложнений, сопутствующих CDHR1-ассоциированному пигментному ретиниту, является КМО – кистоидный макулярный отек, который в некоторых случаях при длительном резистентном его присутствии ухудшает функцию центральной области сетчатки, в том числе цветовоприятия, а не только остроты зрения. На рис. 30 приведены данные

результатов теста Хью у пациентов из этой группы. Мы наблюдаем спайковые изменения в характерном красном и зеленом спектрах в обоих случаях.



А. 6 баллов **Б. 8 баллов**

Рис. 30. Изменения в цветовосприятия в красном и зеленом спектре при CDHR1-ассоциированном пигментном ретините у пациента 1 (А) и пациентки 2 (Б).

Рисутеганиб (Risuteganib), ранее известный как Luminate, Allegro Ophthalmics – это первый в своем классе препарат анти-интегрин, который разрабатывался для лечения диабетического макулярного отека (ДМО) и неэкссудативной ВМД, но также может быть эффективным при кистоидном макулярном отеке. В исследованиях фазы II рисутеганиб продемонстрировал особую пользу для улучшения зрения и анатомических результатов у пациентов с ДМО и КМО, которые не отвечали на терапию анти-VEGF. Рисутеганиб представляет собой пептид с низкой молекулярной массой RGD-класса (аргинилглициласпарагиновой кислоты), который имеет длительный период полураспада в сетчатке около 21 дня.

Фармакологические исследования предоставили доказательства, подтверждающие действие препарата против множества патологических состояний, связанных с ВМД, включая воспаление, цитотоксичность и митохондриальную дисфункцию, он снижает функцию интегринов и направлен на повышение реакции на окислительный стресс, затем он инициирует множественные метаболические пути, участвующие в промежуточной сухой фазе ВМД», а также при диабетическом и кистоидном макулярном отеке, поэтому пациенты из группы CDHR1-ассоциированного пигментного ретинита проводили три ежемесячные интравитреальные инъекции рисутеганиба в дозировке 0,1 мг в 0,3 мл. Снижение высоты макулярного отека через 2 недели после первой инъекции у одного из них приведено на рис. 31.

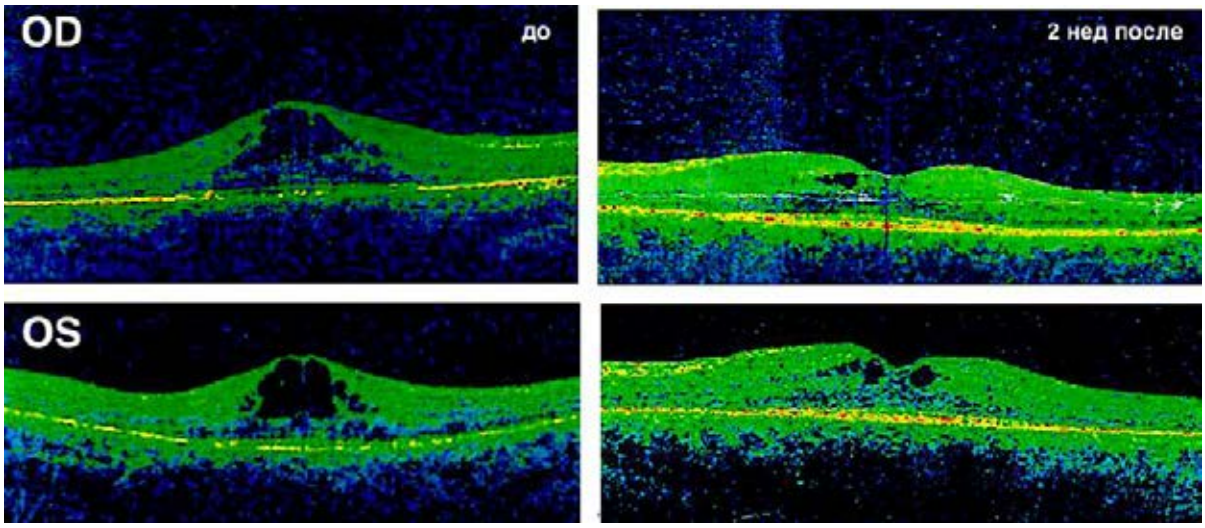


Рис. 31. Снижение высоты макулярного отека у пациента с CDHR1-ассоциированным пигментным ретинитом через 2 недели после начала применения рисутеганиба в дозировке 0,1 мг в 0,3 мл в виде интравитреальных инъекций.

После лечения у первого пациента Vis OD (BCVA) = 0,25, Vis OS (BCVA) = 0,3, у второй пациентки Vis OD (BCVA) = 0,35, Vis OS (BCVA) = 0,3.

5.3. Результаты лечения олигонуклеотидами пациентов с изолированными рецессивными формами пигментного ретинита

5.3.1. Результаты лечения *USH2A*-ассоциированной ретинопатии

Ген USH2A (ушерин) кодирует белок, содержащий мотивы EGF ламинина, домен пентаксина и множество мотивов фибронектина типа III. Белок находится в базальной мембране и играет важную роль в развитии и гомеостазе внутреннего уха и сетчатки. Мутации в этом гене были связаны с синдромом Ашера типа IIa и пигментным ретинитом. Для этого гена было обнаружено несколько вариантов транскриптов, кодирующих разные изоформы. Этот ген имеет размер порядка 800 кб и насчитывает 72 экзона, являясь одним из самых больших по размеру генов в организме человека, поэтому технологии векторной доставки такого большого конструкта не могут быть реализованы имеющимися в арсенале векторами. В этом случае используется технологи антисмысловых олигонуклеотидов – AON – antisense oligonucleotides, когда мутированный участок гена «закрывают» участком комплементарной цепи ДНК. Как следствие происходит пропуск трансляции мутировавшей части гена. В результате получается

неполная, однако достаточно функциональная версия белка, которая позволяет значительно смягчить тяжесть протекания клинической картины.

Мутации в этом гене встречаются довольно часто среди пациентов с пигментным ретинитом и синдромом Ашера 2А типа. Данные собственной эпидемиологической статистики дают цифры 39% встречаемости среди пациентов с синдромом Ашера (Ivanova M.E. et al, 2018) и 9% среди пациентов с пигментным ретинитом (не опубликованные данные).

Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом USH2A ассоциированным пигментным ретинитом, получивших патогенетическое лечение, приведена в табл.25. Данные исследований VFQ-25 и теста FLORA в группе сравнения тринадцати пациентов, получивших таргетную терапию и двадцати девяти пациентов, получивших стандартное лечение или лечение стволовыми клетками, значительно отличаются в лучшую сторону в группе таргетной терапии, статистически обсчитываемых данных на выборке такого размера получить не удается. MLMT тест в данной группе пациентов релевантен на уровне освещенности 3 и выше (от 0 до 50 люкс), при освещенности выше 50 люкс пациенты с легкостью проходили все препятствия. Сравнительные данные периметрии в исследуемых группах представлены в главе 5.7.

В целом интравитреальные инъекции хорошо переносились и не были связаны с системной токсичностью. Осложнения лечения в данной группе пациентов в раннем послеоперационном периоде включали конъюнктивальную гиперемию, незначительный хемоз, в позднем послеоперационном периоде заднюю субкапсулярную катаракту. Подробный анализ осложнений и побочных эффектов приведен в главе 7:

Острота зрения, данные ОКТ, периметрии, микропериметрии и ЭРГ в динамике через 1, 6, 12 и 18 мес. после патогенетического лечения 13 пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом USH2A-ассоциированный пигментный ретинит, по сравнению с теми же параметрами 29 пациентов, прошедших стандартное лечение или лечение стволовыми клетками, не позволяют сделать статистически достоверные выводы об эффективности лечения, однако наблюдается явная тенденция к увеличению амплитуды а-волны смешанной ЭРГ и замедлению потери чувствительности палочковых фоторецепторов. В среднем Vis OU (BCVA) = 0,4±0,1, после лечения Vis OU (BCVA) = 0,5±0,1. Подробный анализ этих исследований в сравнении 1 – 3 групп пациентов приведен в главе 5.7. Данные темновой адаптации повторяют динамику MLMT теста и значительно лучше у 13 пациентов, прошедших патогенетическое лечение, чем у 29 пациентов, получавших стандартное лечение / лечение стволовыми клетками. Данные КЧСМ не имели статистических различий до и после лечения в исследуемых группах.

Табл. 25. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом USH2A ассоциированным пигментным ретинитом в исследуемой группе.

Р	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутация в гене USH2A**	**Экзон**
Р1	М	С 14 лет	25	*c.4210G>T p.Glu1404**	13
				c.2276G>T p.Cys759Phe	19
Р2	Ж	С 8 лет	35	*c.14489C>G p.Ser4830Ter*	66
				c.14489C>G p.Ser4830Ter	*66*
Р3	М	С 17 лет	32	*c.11864G>A p.Trp3955Ter*	61
				c.11864G>A p.Trp3955Ter	61
Р4	М	С 8 лет	38	*c.11156G>A p.Arg3719His*	57
				c.11156G>A p.Arg3719His	57
Р5	Ж	С 9 лет	33	*c.11156G>A p.Arg3719His*	57
				c.2610C>A p.Cys870Ter	13
Р6	М	С 22 лет	43	*c.8682-9A>G p-*	Интрон
				c.2610C>A p.Cys870Ter	13
Р7	Ж	С 21 лет	43	*c.8682-9A>G p.-*	Интрон
				c.2299delG p.Glu767fs	13
Р8	Ж	С 26 лет	49	*c.11864G>A p.Trp3955Ter*	61
				c.4758+1G>A p.-	Интрон
Р9	М	С 17 лет	31	*c.9424G>T p.Gly3142Ter*	48
				c.13393A>T p.Lys4465Ter	63
Р10	М	С 22 лет	31	*c.4957C>T p.Arg1653Ter*	24
				c.11585C>G p.Thr386Arg	60
Р11	М	С 12 лет	36	*c.5588T>C p.Met1863Thr*	28
				c.2802T>G p.Cys934Trp	13
Р12	Ж	С 15 лет	36	*c.3932C>A p.Ser1311Ter*	18
				c.1752C>A p.Cys584Ter	10
Р13	М	С 16 лет	38	*c.1687C>T p.Gln563Ter*	10
				c.3713C>G p.Thr1238Arg	17

5.3.2. Результаты лечения *EYS*-ассоциированной ретинопатии

Этот белок демонстрирует исключительную экспрессию во внешних сегментах фоторецепторов, функционирует в процессе зрительного восприятия (фототрансдукции) и локализуется в аксоне́ме (осевой нити реснички фоторецептора, которая является организованным цитоскелетным комплексом). *(*Рис. 9*).* Мутации в гене EYS являются одними из наиболее частых причин пигментного ретинита и некоторых других типов наследственных заболеваний сетчатки. Семейный анамнез обследованных пациентов представлен на рис. 32.

В обследованной группе у троих пациентов рецессивный тип наследования (пациенты 3, 6 и 8) и у пятерых спорадический случай или недоказанный рецессивный тип наследования (пациенты 1, 2, 4, 5, 7). (Рис 32)

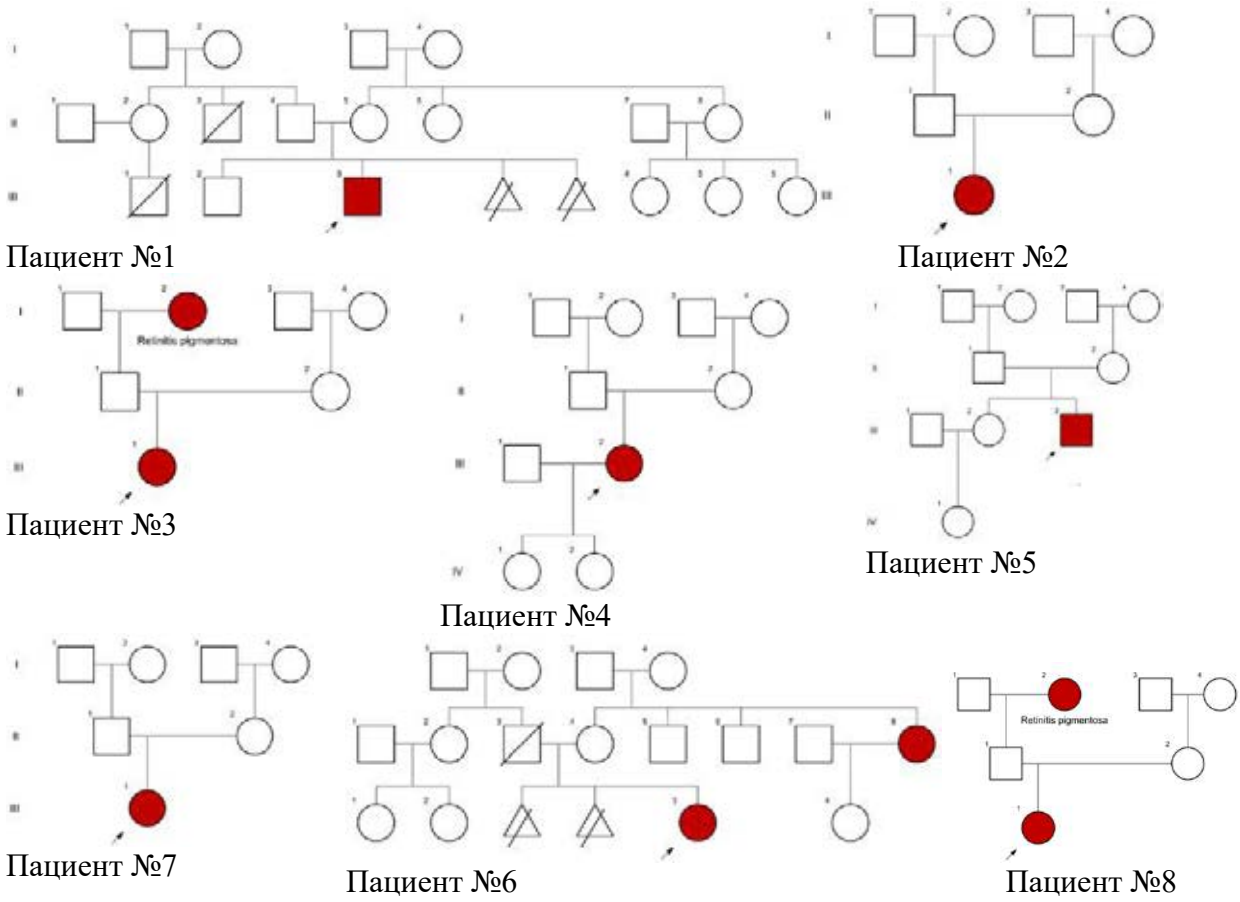


Рис. 32 Генеалогическое дерево и типы наследования пигментного ретинита в исследуемой группе пациентов. 2 рецессивных типа наследования EYS.

Проведена оценка течения заболевания сетчатки и изменение зрительных функций, а также результатов лечения в когорте из 8 пациентов с биаллельными компаунд-гетерозиготными мутациями гена EYS (подтверждено путем анализа сегрегации в тех семьях, где возможно произвести забор биоматериала родителей пробанда P1, P2, P3, P5, P7, P8), находящихся под наблюдением от 2 до 5 лет, прошедших патогенетическое лечение и одного пациента, который провел курс стандартной терапии Эти данные помогают улучшить консультирование пациентов по прогнозу и предоставить рекомендации по срокам терапевтического вмешательства. Чтобы найти объяснение генерализованной и более локализованной дистрофии сетчатки у разных пациентов изучаемой группы, дополнительно к стандартному обследованию был проведен функциональный анализ и биоинформатический поиск природы трех новых обнаруженных патогенных вариантов,, а также проведен анализ функционального влияния на белок обнаруженных мутаций.

По две мутации обнаружены в 4, 7, 26 и 37 экзонах, по одной мутации в 11, 15, 19 экзонах. В обследованной когорте пациентов мутации встречаются чаще либо вначале сплайсинга (4 и 7 экзоны), либо в конце сплайсинга (26, 37 экзоны). Новые мутации описаны в 7, 26 и 37-м экзонах (рис.33).

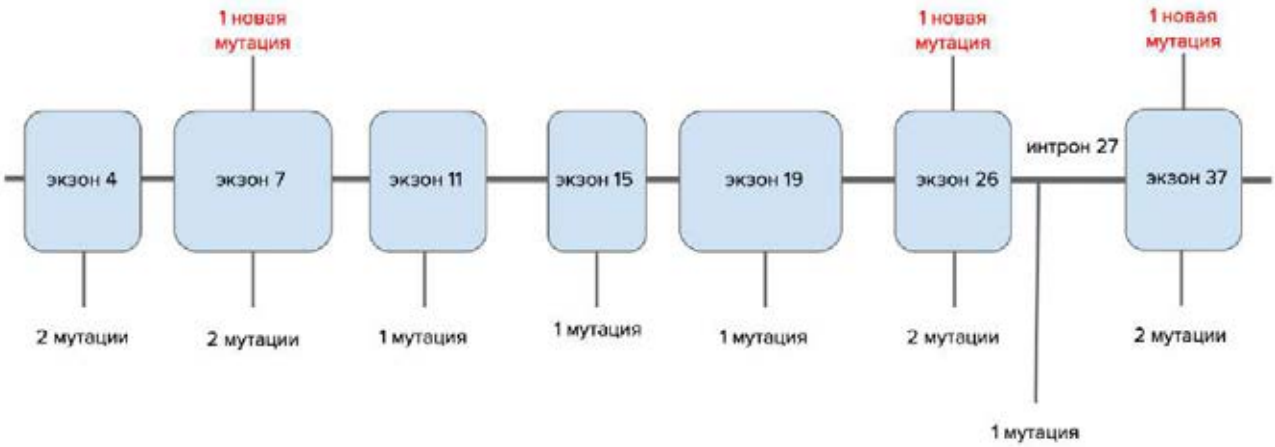


Рис 33. Отображение мутаций в гене EYS, описанных у пациентов из когорты с пигментным ретинитом.

Характерная клиническая картина и проявления на глазном дне при *EYS* ассоциированном пигментном ретините у пациента №2, а именно фоторегистрация глазного дна в центральной и периферической области сетчатки, а также ОСТ представлена на рис.34. В среднем в группе Vis OU (BCVA) = 0,08±0,03, после лечения Vis OU (BCVA) = 0,1±0,08.

Ортолог Drosophila EYS играет важную роль в морфогенезе и архитектуре сетчатки. EYS помогает поддерживать стабильность аксонемы ресничек как в палочках, так и в колбочках, а также целостность цилиарного кармана у колбочек. Белок EYS, взаимодействуя с белками **проминин, крамбс (CRB1)** (см. главу 5.3.3.) и хаоптин имеет важное значение для структурной целостности фоторецепторов. Однако точная функция белка EYS и роль различных изоформ в сетчатке человека все еще остается не до конца ясной.

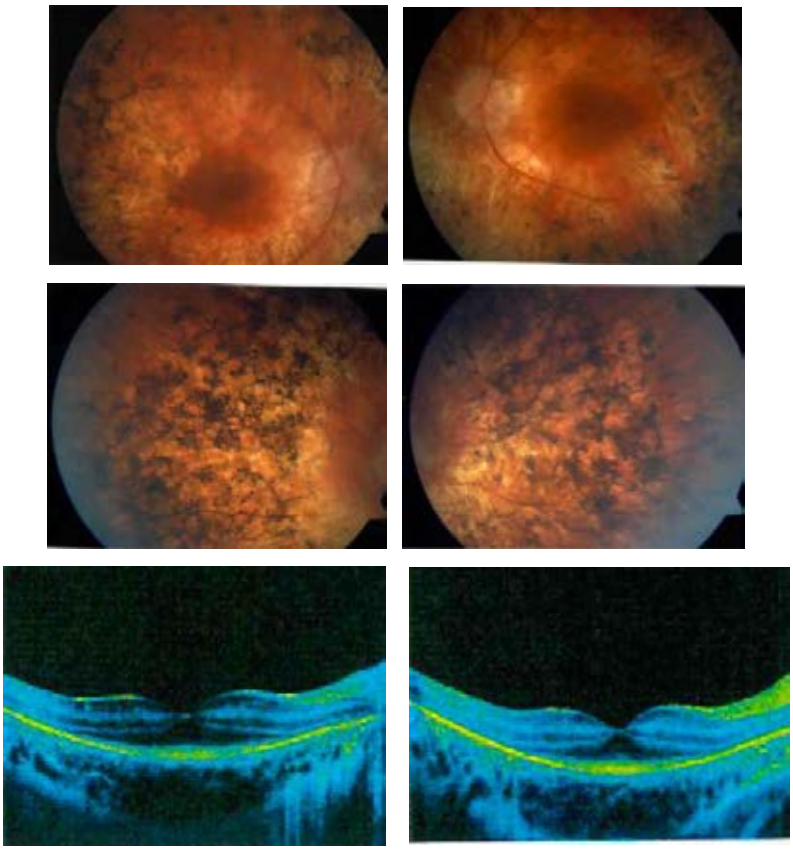
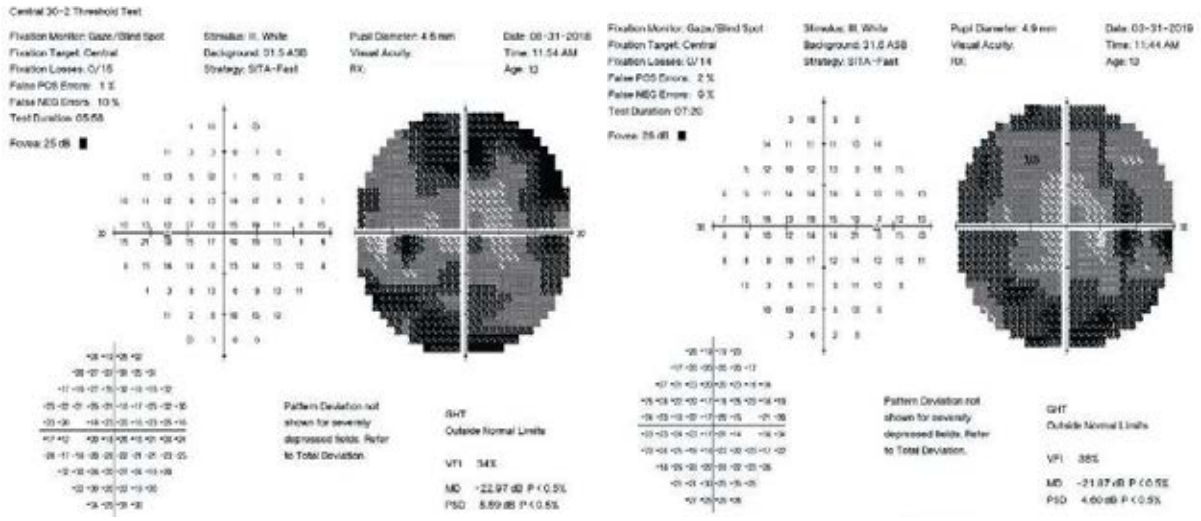


Рис 34. Центральная (вверху), периферическая (средний ряд) область сетчатки и ОСТ (нижний ряд) пациента 2 с EYS-ассоциированным пигментным ретинитом.

Основные генетические характеристики изучаемой группы пациентов с мутациями в гене *EYS*, приводящими к развитию периферических дистрофий сетчатки, получивших патогенетическое лечение, представлены в табл. 26.

Табл. 26. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом EYS ассоциированным пигментным ретинитом в исследуемой группе.

Р	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутация в гене EYS**	**Экзон**
Р1	М	С 12 лет	40	*c.5835+1G>A p.-*	инт.27
				c.2989_2990insAA p.-	инт.19
Р2	Ж	С 6 лет	13	*c.4350_4356del p.Ile1451fs*	26
				c.32dupT p.Met12fs	*4*
Р3	Ж	С 10 лет	27	*c.1155T>A p.Cys385Ter*	7
				c.7276T>G p.Tyr2426Asp	*37*
Р4	Ж	С 17 лет	44	*c.C7394G p.T2465S*	37
				c.525_527del p.175_176del	*4*
Р5	М	С 7 лет	53	*c.1057-1G>C p.-*	7
				c.2259+1G>A p.-	15
Р6	Ж	С 12 лет	33	*c.4815_4816delCAinsATAG p.Thr1606fs*	26
				c.1641_1644delTCAG p.Ser547fs	*11*
Р7	Ж	С 15 лет	38	*c.3676G>T p.Gly1226**	24
				*c.1155T>A p.Cys385**	7
Р8	М	С 13 лет	34	*c.1155T>A p.Cys385Ter*	7
				c.8648_8655del pThr2883fs	43



А Б

Рис 35. Результаты периметрии леченного хуже видящего правого глаза пациента 2 до (**А**) и через 6 мес. после (**Б**) патогенетического лечения.

Характерным при EYS ассоциированным пигментным ретинитом является нерегистрируемая смешанная ЭРГ, что свидетельствует об отсутствии функции наружных и средних слоев периферической сетчатки. Макулярная хроматическая ЭРГ на красный стимул резко субнормальна (снижение амплитуды a-волны и b-волны, увеличение латентности), что указывает на снижении функции наружных и средних слоев также макулярной области сетчатки. Изменения результатов периметрии леченного хуже видящего правого глаза пациента №2 до (А) и через 6 мес. после (Б) патогенетического лечения представлены на рис. 35.

Пониманию выраженности этого типа наследственной дегенерации сетчатки помогли исследования in vitro, модели на животных, точно имитирующие состояние человека, и гистопатологические исследования донорских сетчаток. Не существует животных моделей заболевания EYS человека (у млекопитающих). Патология изучалась на гистопатологических срезах сетчатки трех доноров с мутацией в EYS. Доноры были пожилыми (72, 91 и 97 лет) на момент смерти, но по результатам исследования были сделаны важные выводы: в периферической сетчатке не было колбочек; меченые родопсином клетки были редки или отсутствовали на исследуемых участках (периферические и перифовеальные области); перифовеа была описана как видный внутренний ядерный слой (INL) с пятнистыми неорганизованными колбочками; и были локализованные участки атрофии пигментного эпителия сетчатки (РПЭ) в перифовее. Кроме гистопатологических исследований важным следующим шагом в изучении возможных терапевтических подходов является изучение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с EYS ассоциированным пигментным ретинитом (глава 8).

Основным подходом к лечению ввиду большого размера гена *EYS* и отсутствия технологии векторной доставки такого большого конструкта является технологи антисмысловых олигонуклеотидов (AON), при которой мутированный участок гена «закрывают» участком комплементарной цепи ДНК. В этом случае в виде интравитреальной инъекции вводят короткие участки (100 – 150 нуклеотидов) в непосредственной близости от парамакулярной области в дозировке 0,1 мг в 0,3 мл. В каждом конкретном случае синтез олигонуклеотидов проводят кастомно в зависимости от положения мутации. Подбор праймеров производят с помощью той же методологии, что и в случае *USH2A* лечения AON.

Данные исследований VFQ-25 и теста FLORA в группе сравнения восьми пациентов, получивших таргетную патогенетическую терапию отличаются в лучшую сторону через 6, 12 и 18 мес. наблюдения по сравнению с группой стандартного лечения. MLMT тест в данной группе пациентов также после проведения лечения пациенты проходили с большей легкостью, начиная с освещенности 4 люкс и выше. Данные обследования пациента с EYS дистрофией сетчатки, прошедшего стандартное лечение, остались на прежнем уровне до и после лечения, кроме результатов ЭРГ, которая стала нерегистрируемой.

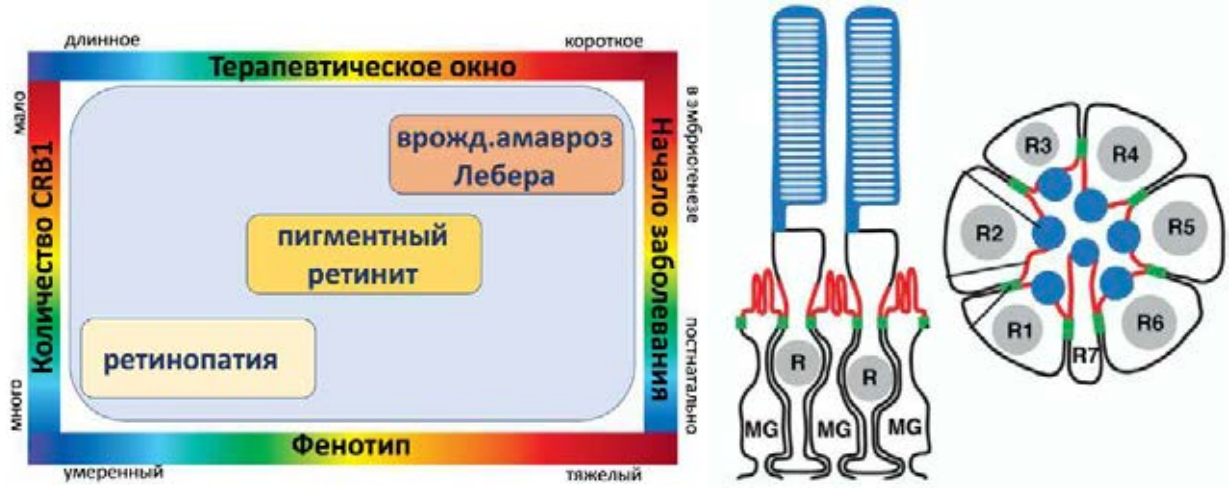
Сравнительные данные MLMT теста, периметрии, остроты зрения и ЭРГ в исследуемой группе представлены в главе 5.7. Данные темновой адаптации повторяют динамику MLMT теста и значительно лучше у 8 пациентов, прошедших патогенетическое лечение, чем у 1 пациента, проходившего курс стандартного лечения. Данные КЧСМ не имели статистических различий до и после лечения в исследуемых группах, однако имелась тенденция к сохранению исходного уровня КЧСМ у пациентов, получивших патогенетическое лечение. Данные теста Хью в целом были сходными с исходными, что говорит в целом в пользу длительной сохранности функции колбочкового аппарата центральной зоны сетчатки.

В целом интравитреальные инъекции хорошо переносились и не были связаны с системной токсичностью. Осложнения лечения в данной группе пациентов в раннем послеоперационном периоде включали конъюнктивальную гиперемию, незначительный хемоз, в позднем послеоперационном периоде заднюю субкапсулярную катаракту и эпиретинальный фиброз. Подробный анализ осложнений и побочных эффектов приведен в главе 7.

5.3.3. Результаты лечения *CRB1*-ассоциированной ретинопатии

Этот ген располагается на первой хромосоме (1q31.3), имеет размер приблизительно 276 Кб и насчитывает 17 экзонов. Он кодирует белок, который расположен во внутреннем сегменте фоторецепторов млекопитающих и является компонентом молекулярного каркаса, который контролирует правильное развитие полярности в глазу в эмбриогенезе (рис. 36Б). Мутации в этом гене связаны с тяжелой формой пигментного ретинита и с врожденным амаврозом Лебера (рис. 37.). Альтернативный сплайсинг приводит к нескольким вариантам транскриптов, кодированию некоторых белков и небелковых транскриптов.

Тяжелые мутации в гене CRB1 приводят к раннему началу заболевания, более тяжелым формам протекания и крайней ограниченностью сроков терапевтических возможностей (рис.36А). Кроме того, важно обратить внимание на разнообразие фенотипов в зависимости от типа мутации (рис. 36А). Существует довольно четкое соответствие между типом мутации и предсказанием количественного содержания транскриптов CRB1, длительности терапевтического окна, сроков развития заболевания (в эмбриогенезе или в раннем постнатальном периоде) и как следствие тяжести фенотипа от пигментного ретинита до врожденного амавроза Лебера.



А Б

Рис. 36. А. Собственное схематическое представление различий фенотипа, тяжести и времени начала заболевания, а также сроков возможности терапевтического влияния в зависимости от тяжести мутации в гене CRB1 (и как следствие малого или достаточного количества нормального CRB1 белка). **Б.** Схема человеческих палочек (R) и связанных Мюллеровых клеток глии (MG). Распределение белка CRB1 в сетчатке человека отмечено **красным** цветом. CRB1 обнаруживается в базальных аспектах внутреннего сегмента палочек только апикально к внешней ограничивающей мембране и зоне адгезии (указано зеленым) и в апикальных

мембранах Мюллеровых глиальных клеток. Схема 36Б приведена с согласия автора: исследовательницы Milena Pellikka.

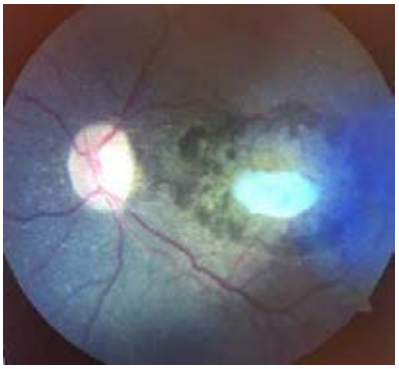


Рис. 37. Характерное глазное дно при *CRB1*-ассоциированном амаврозе Лебера/пигментном ретините у P1.

Характеристика генетической картины пациента с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом CRB1-ассоциированная ретинопатия, получившего патогенетическое лечение, приведена в табл.27. Также в таблице приведены данные трех других пациентов, патогенетическое лечение для которых на текущий момент недоступно. Данные исследований VFQ-25, теста FLORA и MLMT теста до и после лечения (период наблюдения 24 мес.) отличается в лучшую сторону с небольшим различием в сравнении с исходными данными. Периметрия и ЭРГ не регистрируемы у всех пациентов. Сравнительные данные других методов исследования представлены в разделе 5.7. В среднем Vis OU (BCVA) = 0,15±0,1, после лечения Vis OU (BCVA) = 0,2±0,1.

Табл. 27. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *CRB1*- ассоциированный пигментный ретинит.

P	Возраст манифе-стации*	Возраст на начало лечения	Мутация в гене *CRB1*	Экзон
P1	1	6	*c.2843G>A Cys948Tyr*	6
			c.2480G>T Gly827Val	4
P2	с рожд.	9	*c.4014 4015dupTG p.Asp1339Valfs*	12
			c.4014 4015dupTG p.Asp1339Valfs	12
P3	с рожд.	23	*c.2843G>A p.Cys948Tyr*	6
			c.3668G>C p.Cys1223Ser	10
P4	с рожд.	18	*c.2843G>A p.Cys948Tyr*	6
			c.2129-1G>C p(-)	инт.4

5.3.4. Результаты лечения *CEP290*-ассоциированной ретинопатии

Ген *CEP290* располагается на 12-й хромосоме (12q.21.32), имеет размер 93 Кб и насчитывает 60 экзонов, кодирует белок с 13 предполагаемыми доменами спирализованной спирали, областью, гомологичной АТФазам сегрегации хромосом, тремя доменами гомологии тропомиозина и мотивом сайта связывания АТФ/ГТФ. Белок локализован в центросоме и ресничках клеток, в основном в фоторецепторах и имеет сайты для N-гликозилирования, сульфирования тирозина, фосфорилирования, N-миристоилирования и амидирования. Ген имеет один основной транскрипт. Характерная картина глазного дна у одного из пациентов представлена на рис. 38. Также как и в случае генов *USH2A, EYS, CRB1* в связи с размером гена для лечения применяются интравитреальные инъекции малых молекул – антисмысловые олигонуклеотиды (AON).

Трем пациентам (P1, P2, P3) из исследуемой группы 1 с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом амавроз Лебера, вызванный биаллельной компаунд геерозиготной или гомозиготной мутацией в гене *CEP290*, хотя бы одной из которых являлась наиболее распространенная мутация c.2991+1655A>G (p.Cys998X) было произведено интравитреальное введение 1 мг препарата Сепофарсен (Sepofarsen) в 0,3 мл стерильной жидкости (производитель – компания ProQR) с регулярностью 1 инъекция в 6 месяцев. Препарат создан для коррекции мутации c.2991+1655A>G p.Cys998X в гене CEP290 и представляет собой раствор олигонуклеотидов, связывающихся с РНК, получаемой с мутированного участка комплементарной ДНК: TGTCAATGGA**G**GCTGAAGTTT. Характеристика исследуемой группы представлена в табл. 28.

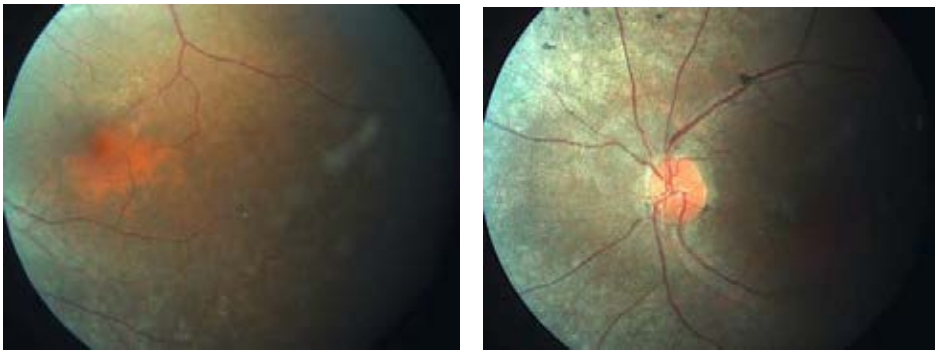


Рис. 38. Центральная и периферическая часть сетчатки пациента №3 с мутацией в гене *CEP290*

Данные исследований MLMT, VFQ-25 и теста FLORA в группе сравнения трех пациентов, получивших таргетную патогенетическую терапию отличаются в лучшую сторону через 1, 6 и 12 мес. наблюдения по сравнению с группой стандартного лечения. MLMT тест в данной группе

пациентов после проведения лечения пациенты проходили хуже, чем в группе USH2A, но незначительно лучше, чем до лечения на уровне освещенности 5 (50 люкс) и 4 (100 люкс). В среднем Vis OU (BCVA) = 0,09±0,03, после лечения Vis OU (BCVA) = 0,1±0,05. Данные обследования пациентки с CEP290 ассоциированным амаврозом Лебера, находящейся под наблюдением специалиста офтальмолога и не принимавшей никакое лечение ввиду малого возраста (2 года) показывают постепенное снижение восприятия света и сохранение окулодигитального симптома, а также нистагма на прежнем уровне в момент исходного обследования и после установки молекулярно-генетического диагноза. Лечение эта пациентка также не получила ввиду возрастных ограничений применения терапии. Результаты смешанной ЭРГ у всех пациентов группы нерегистрируемая как до, так и после лечения.

Сравнительные данные MLMT теста, микропериметрии, остроты зрения и ЭРГ в исследуемой группе представлены в главе 5.7. Данные КЧСМ не имели статистических различий до и после лечения в исследуемых группах, однако имелась тенденция к сохранению исходного уровня КЧСМ у пациентов, получивших патогенетическое лечение. Данные теста Хью невозможно зарегистрировать ввиду низкой остроты зрения у данной группы пациентов.

В целом интравитреальные инъекции хорошо переносились и не были связаны с системной токсичностью. Осложнения лечения в данной группе пациентов в раннем послеоперационном периоде включали конъюнктивальную гиперемию, незначительный хемоз, в позднем послеоперационном периоде заднюю субкапсулярную катаракту. Подробный анализ осложнений и побочных эффектов приведен в главе 7.

Табл. 28. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом CEP290- ассоциированным пигментным ретинитом в исследуемой группе.

P	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутация в гене *CEP290***	**Экзон**
P1	M	С рождения	10	*c.4723A>T p.(Lys1575Ter)*	36
				c.2991+1655A>G (p.Cys998X)	26
P2	Ж	С рождения	19	*c.2991+1655A>G (p.Cys998X)*	26
				c.939G>A p.(Trp313Ter)	11
P3	M	С рождения	23	*c.2991+1655A>G (p.Cys998X)*	26
				c.4962_4963delAA p.(Glu1656fs)	37
P4	Ж	С рождения	Под наблюдением 2018 гр	*c.6604delA p.Ile2202fs*	48
				c.1666delA p.Ile556fs	17

Проводилась оценка MLMT, FLORA, VFQ-25, микропериметрии, ЭРГ по стандартам международного общества клинической электрофизиологии зрения (ISCEV) для клинической ганцфельд-ЭРГ, нистагма, проверка порога чувствительности к свету (FST) для белого, красного и синего светового спектра, Также измерялись изменения во внутреннем / внешнем сегменте фоторецепторов на ОКТ , изменения в зрительных функциях пациентов, о которых сообщалось, с помощью CVAQC – Кардиффском опроснике – педиатрический аналог VFQ-25 по зрительным способностям для детей относительно исходного уровня, изменение общего впечатления пациента от тяжести заболевания (PGI-S), о ходе течения заболевания (PRO), изменения в результатах офтальмологического осмотра и отслеживание изменений клинической картины, серьезность глазных побочных эффектов, частота неглазных и системных побочных эффектов.

Важно отметить, что помимо терапевтического подхода «заплатки» антисмысловыми олигонуклеотидами активно разрабатывается подход генного редактирования этой наиболее распространенной мутации методом CRISPR-Cas без двойного разрыва двуспиральной ДНК. В этом подходе используется SaCas9 для удаления аберрантного донора сплайсинга, созданного мутацией IVS26 в гене *CEP290*. У пациентов *CEP290* IVS26 во всех обработанных глазах достигали целевого терапевтического уровня редактирования (10%), когда доза AAV составляла не менее 1×10^{12} мкг/мл.

5.4. Результаты лечения пациентов с доминантными формами пигментного ретинита

5.4.1. Результаты лечения *NR2E3*-ассоциированной ретинопатии

Мутации в гене *NR2E3* вызывают синдром усиленного ответа колбочек (enhanced S-cone syndrome – ESCS). Ген *NR2E3* из подсемейства ядерных рецепторов 2, член 3 группы E, находится на 15-й хромосоме (15p.23) и имеет 8 экзонов, общий размер гена 7.7 кб. Этот белок NR2E3 является частью большого семейства факторов транскрипции ядерных рецепторов, участвующих в сигнальных путях. Было показано, что ядерные рецепторы регулируют пути, участвующие в эмбриональном развитии, а также в поддержании правильной функции клеток у глаза. Члены этого семейства характеризуются дискретными доменами, которые участвуют в связывании ДНК и лиганда. Этот ген кодирует ядерный рецептор сетчатки, который является лиганд-зависимым фактором транскрипции. Были идентифицированы альтернативно сплайсированные варианты транскриптов, кодирующие разные изоформы.

На сегодняшний день описано более 30 различных патогенных мутаций в *NR2E3*. Тем не менее, одна из наиболее распространенных мутаций *NR2E3*, – это c.119-2A>C, которая попадает в канонический акцепторный сайт сплайсинга первого интрона. Чтобы продемонстрировать функциональный эффект этой мутации, временно трансфицировали фибробластоподобные клетки экспрессионной плазмидой, содержащей копию гена *NR2E3*, несущего патогенный вариант **c.119-2A>C**. Анализ последовательности показал, что в дополнение к нормальному транскрипту имеется аберрантный транскрипт, у которого отсутствует второй экзон и содержится преждевременный стоп-кодон в третьем экзоне.

Характерным признаком *NR2E3* ассоциированного пигментного ретинита является наличие избытка интраретинальной жидкости в макулярной зоне, что хорошо видно на ОКТ (рис. 39)

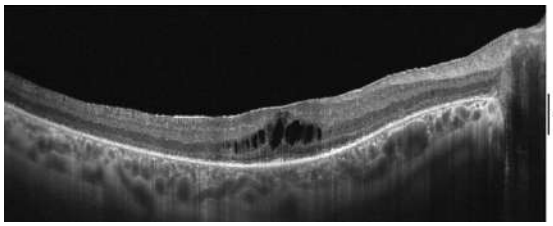


Рис. 39. Характерная ОКТ картина пациента с *NR2E3*-ассоциированным пигментным ретинитом. Черная шкала справа указывает масштаб 250 мкм.

В главе 8 подробно описан процесс культивирования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациента с мутацией c.119-2A>C в гене *NR2E3.* На рис. 40 приведена хроматограмма секвенирования по Сэнгеру в нередактированном аллеле и при гомологичном направленном редактировании CRISPR c.119-2A>C в гене *NR2E3* в культивированных клетках. Стрелками указана мутация, приводящая к развитию заболевания и синонимичная C>T PAM мутация, которая была индуцирована в кассету HDR (гомологично направленного редактирования) для предотвращения повторного редактирования.

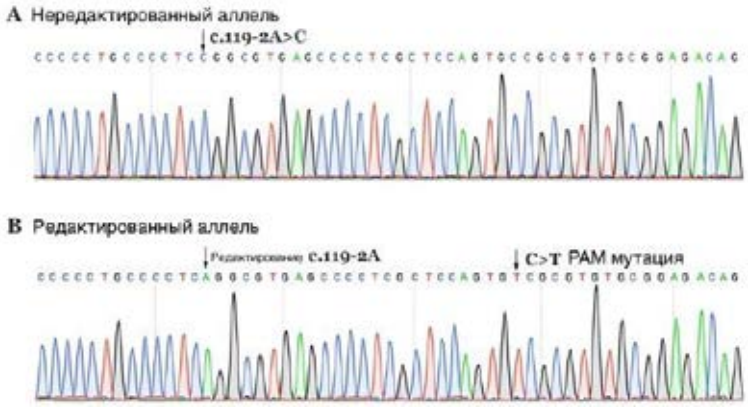


Рис. 40. Хроматограммы секвенирования по Сэнгеру (**A**) в нередактированном аллеле и (**B**) при гомологичном направленном редактировании CRISPR c.119-2A>C в гене *NR2E3* Стрелками указана мутация, приводящая к развитию заболевания и синонимичная C>T PAM мутация,

которая была индуцирована в кассету HDR (гомологично направленного редактирования) для предотвращения повторного редактирования. Изображение хроматограмм использовано с разрешения Шагина Д.А.

Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *NR2E3*-ассоциированным пигментным ретинитом в исследуемой группе приведена в табл. 29.

Табл. 29. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *NR2E3*- ассоциированным пигментным ретинитом в исследуемой группе.

Р	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутация в гене *NR2E3***	**Экзон**
Р1	М	С 5 лет	18	*c.119-2A>C p.(-)*	инт.1
				c.227G>A (p.Arg76Gln)	2
Р2	Ж	С 7 лет	19	*c.119-2A>C p.(-) гомозиготная*	инт.1
Р3	Ж	С 19 лет	28	c.230G>A p.Arg77Gln	2
Р4	Ж	С 15 лет	39	*c.119-2A>C p.(-)*	инт.1

Данные исследований VFQ-25 и теста FLORA в группе из двоих пациентов, получивших таргетную терапию и двух пациенток, получивших стандартное лечение, не отличаются в лучшую сторону в группе таргетной терапии, статистически обсчитываемых данных на выборке такого размера получить не удается. MLMT тест в данной группе пациентов релевантен на уровне освещенности 5 и выше (от 10 люкс), при освещенности выше 10 люкс пациенты с легкостью проходили все препятствия. В среднем Vis OU (BCVA) = 0,4±0,1, после лечения Vis OU (BCVA) = 0,5±0,15. Сравнительные данные периметрии в исследуемых группах представлены в разделе 5.7.

В целом субретинальные инъекции хорошо переносились и не были связаны с системной токсичностью. Осложнения лечения в данной группе пациентов в раннем послеоперационном периоде включали конъюнктивальную гиперемию, незначительный хемоз, в позднем послеоперационном периоде заднюю субкапсулярную катаракту и транзиторную отслойку сетчатки. Подробный анализ осложнений и побочных эффектов приведен в главе 7:

Острота зрения, данные ОКТ, периметрии, микропериметрии и ЭРГ в динамике через 1, 6, 12 и 18 мес. после патогенетического лечения 2 пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом ESCS, по сравнению с теми же параметрами 2 пациентов, не вошедших в группу таргетного лечения по критериям отбора, и потому прошедших стандартное лечение, не позволяют сделать статистически достоверные выводы об эффективности лечения, однако наблюдается явная тенденция к субъективному повышению удовлетворенностью своим

зрением и жизнью в целом, увеличению амплитуды а-волны смешанной ЭРГ и замедлению потери чувствительности палочковых фоторецепторов. Подробный анализ этих исследований в сравнении 1 – 3 групп пациентов приведен в главе 5.7. Данные темновой адаптации повторяют динамику MLMT теста и значительно лучше у 2 пациентов, прошедших патогенетическое лечение, чем у 2 пациентов, получавших стандартное лечение. Данные КЧСМ не имели статистических различий до и после лечения в исследуемых группах.

При наличии избытка субретинальной жидкости при *NR2E3* ассоциированном ПР интерферон гамма-1b, применяемый местно капельно, помогает снизить иммунный ответ и воспалительный компонент реакции, сохраняя таким образом остроту центрального зрения выше, чем если его не применять. Поэтому применяется в суточной дозе 112 мг в виде глазных капель 4 раза в день в течение 2 недель. Глазные капли интерферон гамма-1b безопасны для людей с моногенными заболеваниями сетчатки или с синдромом усиленного ответа колбочек. Некоторые побочные эффекты описаны и проанализированы в главе 7.

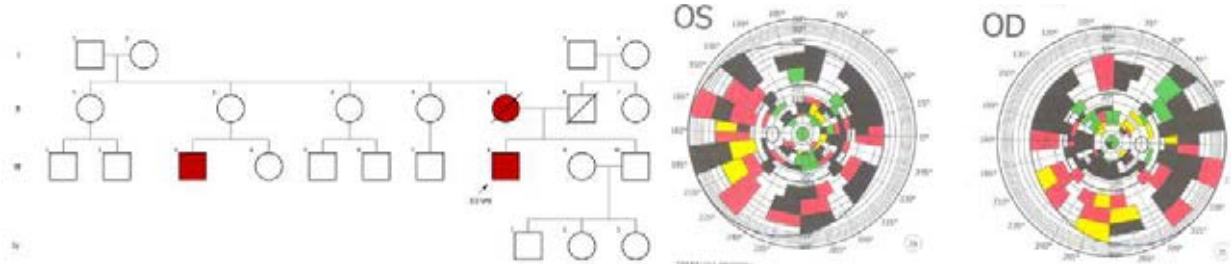
5.4.2. Результаты лечения *RHO*-ассоциированной ретинопатии

Ген родопсин находится на длинном плече 3-й хромосомы (3q.22.1), имеет размер 6,7 кб и содержит 5 экзонов. Белок родопсин, кодируемый этим геном, находится в палочковых фоторецепторах сетчатки и необходим для зрения в условиях низкой освещенности, являясь основным компонентом зрительного цикла. Кодируемый белок связывается с 11-цис-ретиналем и активируется, когда свет попадает на молекулу родопсина сетчатки. Дефекты этого гена являются причиной врожденной стационарной ночной слепоты.

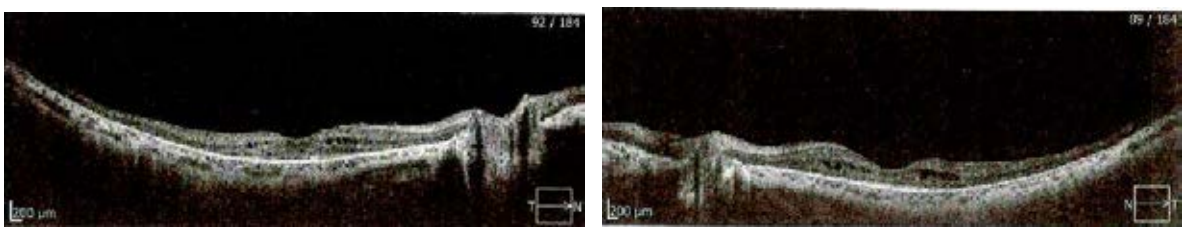
В группу патогенетического лечения были отобраны два пациента с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *RHO*-ассоциированный пигментный ретинит, причиной которого была мутация c.68C>A (p.Pro23His). В группу сравнения, проходивших лечение стволовыми клетками, попали два пациента, сибса (брата) из одной семьи 42 и 49 лет с подтвержденными гетерозиготными мутациями во 2-м экзоне гена *RHO* (NM_000539.3) c.491C>A, приводящими к замене в белке родопсин аминокислоты аланин на глутамин в 164-м положении p.Ala164Glu.

Жалобы у всех были схожими: плохое сумеречное и ночное зрение с детства, метаморфопсии, значительное снижение ночного зрения. *Семейный анамнез P1*: у матери гемералопия с детства, двоюродный брат инвалид по зрению с 17 лет (диагноз отслойка сетчатки), со стороны матери у многих родственников миопия, со стороны отца серьезных

глазных заболеваний нет. (см. генеалогическое древо на рис. 41А) *Сопутствующие заболевания*: отрицает. Проводимое регулярное лечение: изотин (глазные капли), черника, бета-каротин, полиненасыщенные жирные кислоты. Vis OD = 0.05 с sph -3.25D = 0.8 н.к. Vis OS = 0.05 с sph -2.5D cyl -1.5 ax 0 = 0.2 н.к ВГД OD 12 мм. рт. ст., OD 12 мм. рт. ст. **Объективно**: положение глаз в глазнице правильное, придаточный аппарат глаза - норма. *Передний отрезок*: конъюнктива: сосудистый рисунок незначительно усилен. Роговица прозрачна, сферична, зеркальна, чувствительность сохранена, передняя камера средней глубины, влага чистая, УПК (угол передней камеры) открыт, дисгенеза нет. Радужная оболочка структурна, лакуны нормального строения, пигментная кайма сохранена. Факосклероз. Единичная вакуолизация OS. *Стекловидное тело*: единичные плавающие помутнения OU. ***Глазное дно***: OU ДЗН монотонный, границы четкие, пигментация по краю диска, миопический конус физиологическая экскавация диска зрительного нерва отсутствует. Сосуды а:в = 1:2. Артерии незначительно сужены. Макулярный рефлекс искажен (рис. 41В,Г), фовеальный рефлекс сглажен. Мед.мидриаз: на средней периферии участки истончения сетчатки, единичные очаги перераспределения пигмента, **на средней и крайней периферии очаги в виде «костных телец»**. Поля зрения сужены (рис. 41Б). Характеристика четырех пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *RHO* ассоциированным пигментным ретинитом в исследуемой группе приведена в табл. 30. Двое неродственных пациентов (Р1 и Р2), у которых была обнаружена мутация c.68C>A (p.Pro23His), получили патогенетическое лечение – однократную субретинальную инъекцию 0.4 мл с 2.0×10^{12} вирусных геномов в мл в рамках протокола NCT04123626 и были обследованы через 1, 6, 12, 18 и 24 мес. после инъекции. Двое других пациентов (Р3 и Р4 – родные братья), мутация которых была подтверждена: c.491C>A p.Ala164Glu, прошли 4 курса лечения стволовыми клетками 1 раз в 6 месяцев, длительность курса составила 2 года.



А Б



В Г

Рис. 41. А. Генеалогическое древо пациента №1, **Б.** Поля зрения, **В-Г.** данные ОКТ правого и левого глаза соответственно, до применения лечения.

В целом субретинальные инъекции хорошо переносились и не были связаны с системной токсичностью. Осложнения лечения в данной группе пациентов в раннем послеоперационном периоде включали конъюнктивальную гиперемию, в позднем послеоперационном периоде транзиторную отслойку сетчатки. Подробный анализ осложнений и побочных эффектов приведен в главе 7:

Табл. 30. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *RHO* ассоциированным пигментным ретинитом в исследуемой группе.

Р	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутация в гене *RHO***	**Экзон**
Р1	М	С 5 лет	38	*c.68C>A (p.Pro23His)*	1
Р2	Ж	С 7 лет	42	*c.68C>A (p.Pro23His)*	1
Р3	М	С 7 лет	42	*c.491C>A p.Ala164Glu*	2
Р4	М	С 6 лет	49	*c.491C>A p.Ala164Glu*	2

Острота зрения, данные ОКТ, периметрии, микропериметрии и ЭРГ в динамике через 1, 6, 12 и 18 мес. после патогенетического лечения 2 пациентов с молекулярно-генетически подтвержденными мутациями в гене родопсина, по сравнению с теми же параметрами 2 пациентов, не вошедших в группу таргетного лечения по критериям отбора, и потому прошедших лечение стволовыми клетками, не позволяют сделать статистически достоверные выводы об эффективности лечения, однако наблюдается явная тенденция к субъективному повышению удовлетворенностью своим зрением и жизнью в целом (по данным теста VFQ-25 и теста FLORA), увеличению амплитуды а-волны смешанной ЭРГ и замедлению потери чувствительности палочковых фоторецепторов. После лечения Vis OD = 0.06 с sph -3.25D = 0.8 н.к. Vis OS = 0.06 с sph -2.5D cyl -1.5 ax 0 = 0.25 н.к Подробный анализ исследований в сравнении 1 – 3 групп пациентов приведен в главе 5.7. Данные темновой адаптации повторяют динамику MLMT теста и значительно лучше у 2 пациентов, прошедших патогенетическое лечение, чем у 2 пациентов, получавших лечение стволовыми клетками. MLMT тест в данной группе пациентов релевантен на уровне освещенности 4 и выше (от 50 люкс), при освещенности выше 50 люкс пациенты с легкостью проходили все препятствия. Сравнительные данные периметрии в исследуемых группах представлены в разделе 5.7.

Также была проведена сравнительная характеристика теста Хью, который показал, что начиная с 12 месяцев после проведения лечения, группа таргетного лечения статистически более

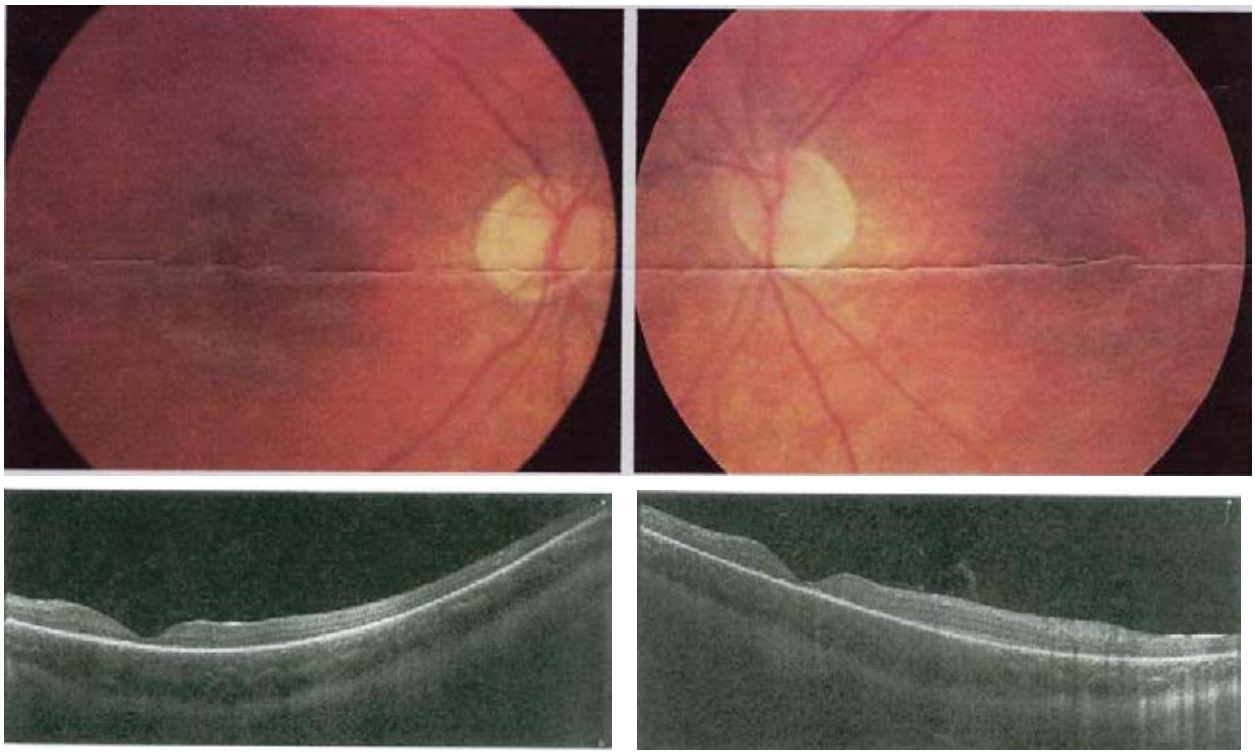
точно отвечала на расстановку цветных оттенков, чем группа стволовых клеток. Это может служить косвенным доказательством большей сохранности колбочек, то есть меньшей токсичности отмирающих колбочек в группе патогенетического лечения по сравнению с лечением стволовыми клетками.

5.5. Результаты лечения пациентов с синдромными формами пигментного ретинита

5.5.1. Результаты лечения нейронального цероидного липофусциноза CLN3

Ген *CLN3* располагается на коротком плече 16-й хромосомы (16p12.1), имеет размер 25,4 кб и насчитывает 16 экзонов. Этот ген кодирует белок, который участвует в лизосомной функции. Мутации в этом гене, а также в других генах нейронального цероидного липофусциноза вызывают нейродегенеративные заболевания, обычно известные как болезнь Баттена или вместе известные как нейрональные цероидные липофусцинозы (NCL). Для этого гена было найдено множество альтернативно сплайсированных вариантов транскриптов. Зачастую первыми признаками заболевания является прогрессирующее ухудшение зрения, которое диагностируют как атрофия зрительного нерва или беспигментная форма пигментной абиотрофии сетчатки. Подсказкой для клинициста может служить нехарактерное сужение полей зрения, выявляемое по результатам периметрии (рис. 43Б). Без лечения болезнь является жизнеугрожающей, которая при манифестации в детском возрасте приводит к смерти в раннем или позднем юношеском возрасте. Фото глазного дна и ОКТ пациента с болезнью Баттена представлены на рис. 42: отсутствует дифференциация слоев наружных сегментов фоторецепторов и ядерных слоев (наружного и внутреннего). Также отмечаются преретинальные включения в стекловидное тело.

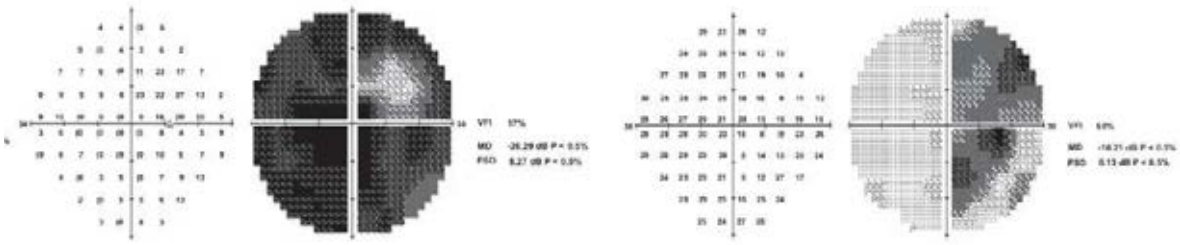
При атрофиях зрительного нерва, неврологических и инфекционных заболеваниях, а также при генетических заболеваниях, затрагивающих в большей степени функцию нейронов, а не зрительный цикл фоторецепторов, наблюдается нехарактерное секторальное изменение полей зрения, как при нейрональном цероидном липофусцинозе (ген *CLN3*), что оценивалось в количественном выражении (Humphrey), а также использовалось для дифференциальной диагностики состояния пациента (рис.43).



OD

OS

Рис. 42 Фото глазного дна и ОКТ при болезни Баттена (*CLN3*). Отсутствует дифференциация слоев наружных сегментов фоторецепторов и ядерных слоев (наружного и внутреннего). Также отмечаются преретинальные включения в стекловидное тело.



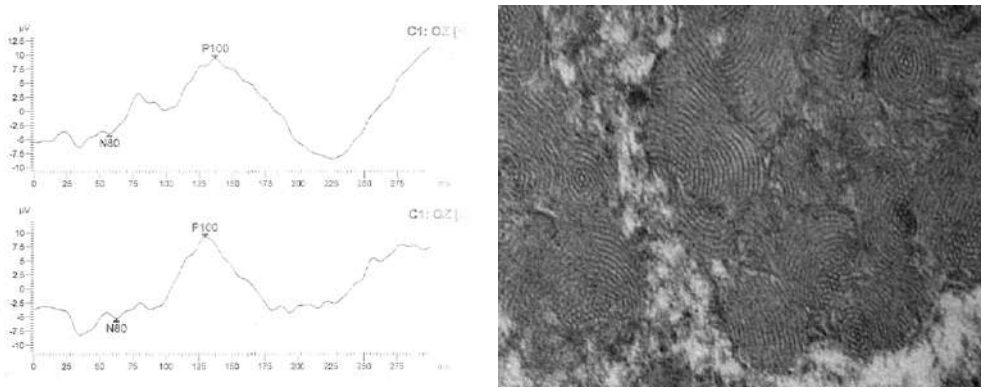
А Б

Рис.43. А. Характерное при пигментном ретините и **Б.** нехарактерное при болезни Баттена (*CLN3*) сужение и потеря полей зрения в количественном выражении (Humphrey).

По результатам проведения полноэкзомного секвенирования у Р1 выявлена ранее описанная гетерозиготная мутация в 14 экзоне гена *CLN3* (chr16:28493433AG>A, c.1048delC p.Leu350fs rs386833696), приводящая к сдвигу рамки считывания, начиная с 350 кодона (p.Leu350fs, NM_001042432.1), OMIM: 204200. По итогам анализа покрытия получены данные в пользу наличия гетерозиготной делеции сегмента хромосомы 16 с приблизительными границами 28497606 – 28497944 п.о. (пар оснований), захватывающей 8 – 9 экзон гена CLN3 (LOD 5.21 NM_001042432) границы которой уточнены методом MLPA. У Р2 и Р3 выявлены гомозиготные

делеции, приводящие к потере 8-9 экзонов гена *CLN3*. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *Болезнь Баттена (CLN3)* приведена в табл.31

На момент обследования у P1 Vis OD = 0.1 c sph +0.75D cyl +0.5 ax 0= 0.2 н.к. Vis OS = 0.1 c sph +0.75D cyl +0.5 ax 0 = 0.2 н.к ВГД OD 12 мм. рт. ст., OD 12 мм. рт. ст., мелко размашистый горизонтальный нистагм, придатки глаз не изменены, хрусталики прозрачны. На ОКТ значительное уменьшение толщины сетчатки в макулярной зоне (рис.42). Результаты проведения ЭРГ при болезни Баттена представлены на рис. 44. Дополнительно было проведено гистологическое исследование рис. 44Б;



А Б

Рис. 44. **А.** ЭРГ при болезни Баттена (нейрональный цероидный липофусциноз), CLN3, у P1, замедление афферентного проведения по зрительному пути (исследование проводила Косороткина Т.И.). **Б.** Включения по типу «отпечатков пальцев» в эндотелиальных клетках в случае мутаций гена *CLN3* (ультратонкий срез, окрашенный уранил ацетатом и цитратом свинца х 42 000, изображение из архива морфологической лаборатории ФГАУ НМИЦ Здоровья Детей МЗ РФ, зав.лаб. Семикина Е.Л.)

В исследуемую группу попали 3 пациента с подтвержденной мутацией в гене *CLN3*. По этическим соображениям ввиду тяжести протекания заболевания всем пациентам проводилось экспериментальное (в фазе 1/2) патогенетическое генотерапевтическое лечение. Наблюдение за пациентами и лечение проводилось в рамках протокола NCT037705721.

Поля базы данных динамического обследования включали измерение следующих параметров 1) возраст при постановке клинического диагноза, 2) возраст на момент молекулярной диагностики, 3) семейный анамнез, возможность близкородственного брака, и обследование других членов семьи, 4) особенности протекания беременности, 5) вес при рождении, 6) раннее психомоторное развитие, 7) возраст появления симптомов, 8) описание первого симптома, 9) эпилепсия, тип приступов, противосудорожные препараты и реакция на лечение, 10) нарушение зрения, 11) атаксия, нарушения походки (апрактическая), 12) пирамидальные расстройства, 13) спастичность и втягивание конечностей 14) электроэнцефалографические данные, 15) атрофия головного мозга / мозжечка на МРТ / КТ, 16)

электроретинографические данные, зрительные вызванные потенциалы, 17) ферментные анализы, 18) вакуолизированные лимфоциты, 19) электронно-микроскопические особенности, 20) возраст потери способности ходить, 21) возраст потери способности сидеть, 22) возраст потери целенаправленного использования рук, 23) возраст потери речевого общения, 24) возраст потери невербального общения, 25) дисфагия, 26) возраст введения назогастрального зонда, 27) динамика задержки в обучении, умственная отсталость, 28) брадипсихия, 29) аутичное поведение.

Табл. 31. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом *Болезнь Баттена (CLN3)* ассоциированной нейропатией в исследуемой группе.

Р	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутация в гене *CLN3***	**Экзон**
Р1	Ж	С 2 лет	6	*c.1048del (p.Leu350fs)*	14
				делеция 28497606 – 28497944	8-9
Р2	Ж	С 4 лет	10	*делеция 28497600 – 28498000*	8-9
				делеция 28497600 – 28498000	8-9
Р3	М	С 2 лет	9	*делеция 28497606 – 28497944*	8-9
				делеция 28497606 – 28497944	8-9

Лечение проводилось по протоколу NCT03770572, в котором **интратекально** (субарахноидально, эпидурально) вводили 2 x10 ^{12} вирусных геномов scAAV9/MeCP2-hCLN3, разведенных в 2 мл стерильного солевого раствора под контролем бета-актинового и MeCP2 промоторов. Бета-актин экспрессируется повсеместно, и его промотор стимулирует высокую экспрессию трансгена. В отличие от бета-актина, промотор MeCP2 жестко регулируется, поскольку повышение его экспрессии в 2 раза приводит к неврологическим осложнениям. Уровни MeCP2 повышаются постнатально, и постоянная экспрессия имеет важное значение в течение всей взрослой жизни. Ген MECP2 (метил-CpG-связывающий белок 2) – это ген, который кодирует белок MECP2, необходимый для нормального функционирования нервных клеток. Этот белок особенно важен для зрелых нервных клеток, где он присутствует в больших количествах. Белок MECP2 участвует в отключении или подавлении функции нескольких других генов. Это позволяет генам не производить белки в тот момент, когда они не нужны.

Поскольку нейроны являются основным типом клеток, погибающих во время болезни Баттена, разработанная для лечения стратегия нацелена именно на эту популяцию с относительно высокой частотой, поскольку перекрестная коррекция невозможна на основе того факта, что *CLN3* кодирует трансмембранный белок. Именно поэтому с этой целью использовался

самокомплементарный (self-complementary) аденоассоциированный вектор 9 серотипа, scAAV9, несущий человеческую кДНК гена *CLN3* под контролем промоторов экспрессии в высокой степени бета-актина и в низкой степени MeCP2 для оценки потенциального влияния дозы гена на исход заболевания.

Результаты лечения оценивали по включению белка в лизосомы, активации астроцитов в сравнении с нормой, исходным состоянием пациентов с молекулярно-генетически подтвержденной болезнью Баттена и после лечения представлены в табл.32. Также проводили оценку МРТ, лабораторных показателей, полей зрения, функциональных тестов.

Результаты лечения до и через 6, 12 месяцев после интратекальной инъекции сравнивались с опубликованными данными клинического течения болезни Баттена. Через 12 мес. острота зрения у P1 не изменилась: Vis OD = 0.1 c sph +0.75D cyl +0.5 ax 0= 0.2 н.к. Vis OS = 0.1 c sph +0.75D cyl +0.5 ax 0 = 0.2 н.к.

Табл.32. Качественное оценочное изменение показателей до, через 6 и 12 месяцев после генной терапии *CLN3.*

	На момент осмотра	Через 6 мес. после лечения	Через 12 мес. после лечения	Данные литературы ч/з 12 мес.
Эпиприступы	отсут.	отсут.	отсут.	↑↑
Атаксия	отсут.	↑	↑	↑↑
Пирамидальные расстройства	отсут.	↑	↑	↑↑
Данные КТ/МРТ	↓	↓	↓↓	↓↓↓
Когнитивные функции	↓	↓	↓	↓↓
ЭРГ / ЗВП	↓	=	=	↓↓
Ферменты	↑	↑	↑	↑↑↑
Дисфагия	отсут.	↑	↑	↑↑↑
Поля зрения	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓
ЭЭГ	↓	↓	↓	↓↓↓
Психоментальный тест	↓	↓	↓	↓↓↓

В Табл.32. приведены качественные оценочные изменения показателей до, через 6 и 12 месяцев после генной терапии *CLN3* по сравнению с литературными данными, описывающими классическое течение болезни Баттена. Мы наблюдаем тенденцию к сохранению когнитивных функций, отсутствие эпи-приступов, атаксии, пирамидальных расстройств и дисфагии на момент

первоначального осмотра. Все эти признаки в незначительной степени проявляются в течение года после начала наблюдения за пациентами, однако они выражены значительно меньше, чем при среднестатистическом течении заболевания без применения лечения согласно обзорным данным литературы, описывающим ход течения (natural history) заболевания.

Для оценки функциональных результатов лечения болезни Баттена у трех пациентов из группы лечения также был проведен расчет оценочной прогностической кривой выживаемости Каплана-Мейера. Совокупность сохранности неврологических, зрительных и общесоматических функций бралась за 100% (ось y, в долях от 1,0) от исходного уровня и проводился расчет процента угасания функций с течением времени (ось x – возраст). Возраст на момент начала исследования составлял 6, 10 и 9 лет соответственно у пациентов P1, P2 и P3, поэтому на рис. 45 слева указаны прогностические кривые изменения функций, опираясь на данные литературы, в соотнесенных по возрасту клинических группах, серым указано прогностическое угасания. На рис. 45 справа отображены фактические данные неврологических, зрительных и общесоматических обследований пациентов P1, P2 и P3.

Мы наглядно видим более пологие графики угасания функций, что явно свидетельствует об эффективности проводимой патогенетически ориентированной терапии по восстановлению функции гена *CLN3*, однако размера выборки недостаточно, чтобы провести доказательство статистически достоверных различий. Пациенты продолжают находиться под наблюдением, их функции регулярно обследуются в динамике в рамках клинического протокола лечения NCT03770572.

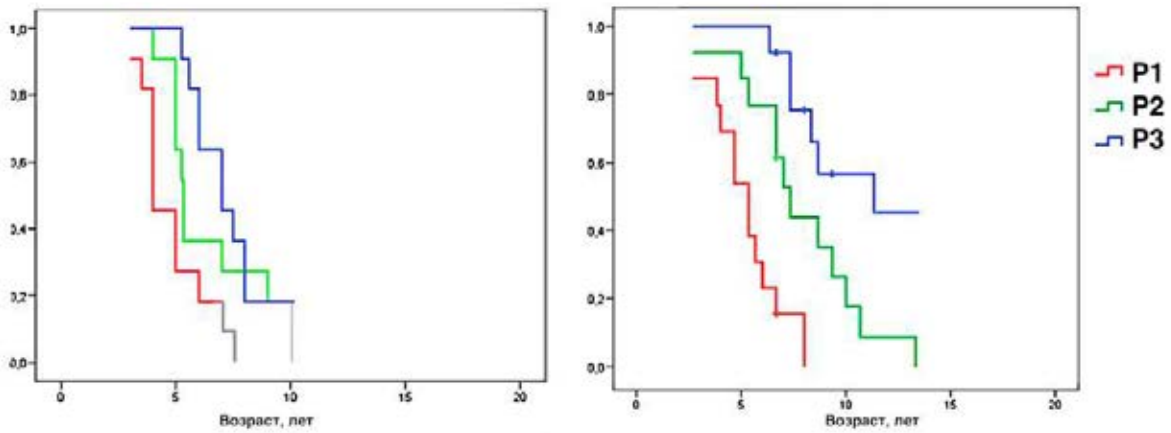


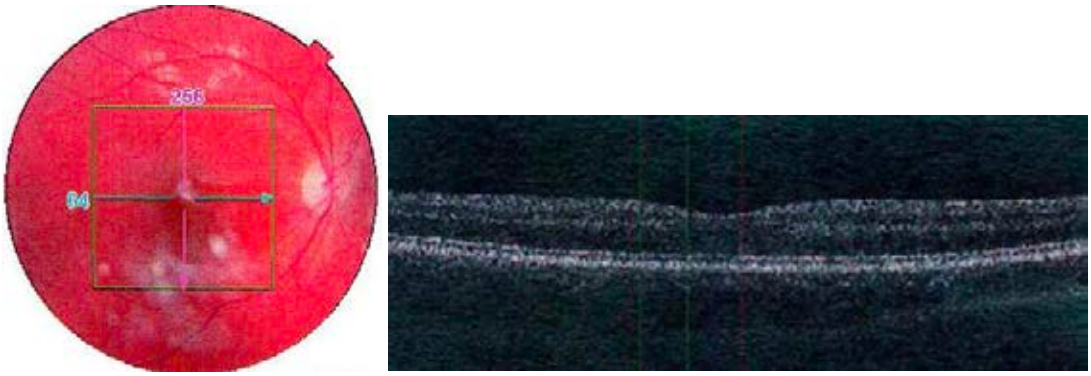
Рис. 45. Оценочный прогностический тест Каплана-Мейера возраст пациентов на момент регресса приобретенных навыков, когнитивного спада, а также основных признаков и симптомов заболевания среди трех пациентов с болезнью Баттена в исследуемой группе по сравнению с литературными данными. Лечение дает положительную динамику, особенно в сравнении с 12-и месячными результатами.

5.5.2. Результаты лечения *C19orf12*-ассоциированного накопления железа

Этот ген располагается на длинном плече 9-й хромосомы (19q12), имеет размер 16 кб и насчитывает 9 экзонов. Он кодирует небольшой трансмембранный белок. Мутации в этом гене являются причиной нейродегенерации с накоплением в мозге железа-4 (NBIA4), но конкретная функция кодируемого белка неизвестна. Для этого гена наблюдаются альтернативно сплайсированные варианты транскриптов, кодирующие несколько изоформ. В исследуемой группе наблюдался только один пациент с таким типом заболевания.

У мальчика 7 лет в течение 2 лет значительно снизилось зрение без видимой причины, очковая коррекция не давала улучшения зрения до 100%. При обследовании была выявлена частичная атрофия зрительных нервов, проведены консультации неврологом, нейроофтальмологом (патология сетчатки, зрительного нерва врожденного характера). Выявлена гиперрефлексия, изменение походки (ходит на носочках), незначительная задержка речевого развития. Другой характерной клинической неврологической симптоматики не наблюдалось. Телосложение нормостеничное, рост 140 см, вес 30 кг, роды в срок, стигм дизэмбриогенеза не выявлено, перинатальных инфекций не было. При офтальмологическом обследовании Vis OD = 0,5 sph -0,5D = 0,8 н.к. Vis OS = 0,5 sph -0,5D = 0,8 н.к. *Пневмотонометрия* OD 22 мм рт. ст., OS 18 мм рт. ст. *Status oculorum*: положение глаз в орбите правильное, глазные структуры сформированы полностью, врожденных пороков органа зрения не наблюдается, движение глаз в полном объеме, девиация по Гиршбергу 0 градусов, передняя камера средней глубины, влага чистая, радужная оболочка в норме, зрачки в центре округлой формы, диаметр OD=OS=4 мм, прямая и содружественная фотореакция зрачков в норме, хрусталики в задней камере, прозрачны, в стекловидном теле единичные плавающие помутнения. *Офтальмоскопия*: глазное дно: OU — диски зрительного нерва бледные, монотонные, границы четкие, сосудистый пучок в центре, сосуды сужены, макулярный и фовеальный рефлексы четкие, периферия сетчатки без патологии. По данным *электроретинографии (ЭРГ)* выявлено нарушение электрогенеза наружных и средних слоев в макулярной зоне. *Зрительные вызванные потенциалы:* на паттерн, амплитуда снижена на 30 угловых минут OD, на 60 угловых минут OS. *Оптическая когерентная томография (ОКТ)* показала равномерное истончение наружных слоев сетчатки (рис. 46Б). Макулярный рефлекс слабо дифференцируется (рис. 46А). *Периметрия* (результаты полностью достоверны в связи с возрастом пациента): сужение полей зрения до 20–25 градусов. *Цветовосприятие*: сохранено,

тест Хью 0 баллов.



А Б

Рис. 46. А. Фото глазного дна правого глаза и **Б.** ОКТ правого глаза пациента с мутацией в 3-м экзоне гена *C19orf12*

По результатам *магнитно-резонансной томографии (МРТ)* очаговой патологии не выявлено. Отмечается формирование симптома «пустого турецкого седла» и накопление железа по типу «тигровый глаз» (рис. 47А)

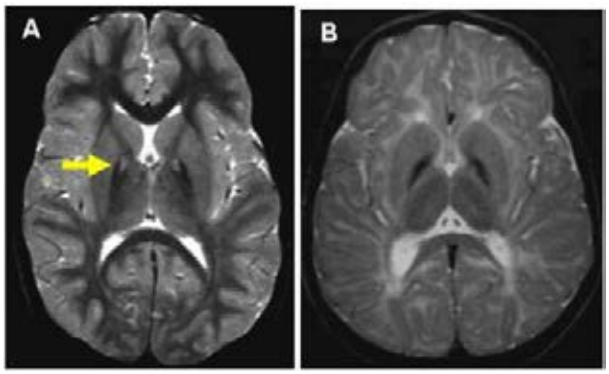


Рис. 47. А. МРТ пациента с мутацией в 3-м экзоне гена *C19orf12*. Желтой стрелкой указан признак «тигрового глаза» (изображение использовано с разрешения проф. Серовой Н.К.). **Б.** МРТ в норме для сравнения.

Консультация генетика: родители здоровы, национальность — русские, родственный брак полностью исключить не представляется возможным. У пробанда три старших брата, ни у кого в семье схожих заболеваний не было. У самого старшего брата выявлена миопия -4,0 дптр, а также склонность к нервным тикам. Других заболеваний глаз, нервной системы и других органов у старших братьев пробанда не обнаружено.

По результатам полноэкзомного секвенирования выявлена гомозиготная мутация в 3-м экзоне *C19orf12* (chr19:30193863AACAGCCCCCCG>A, rs515726204), приводящая к сдвигу рамки считывания, начиная с 69-го кодона (p.Gly69fs, NM_001031726.3). Схематичное строение белка *C19orf12* и его строения в норме и при обнаруженной мутации приведено на рис. 48А-С.

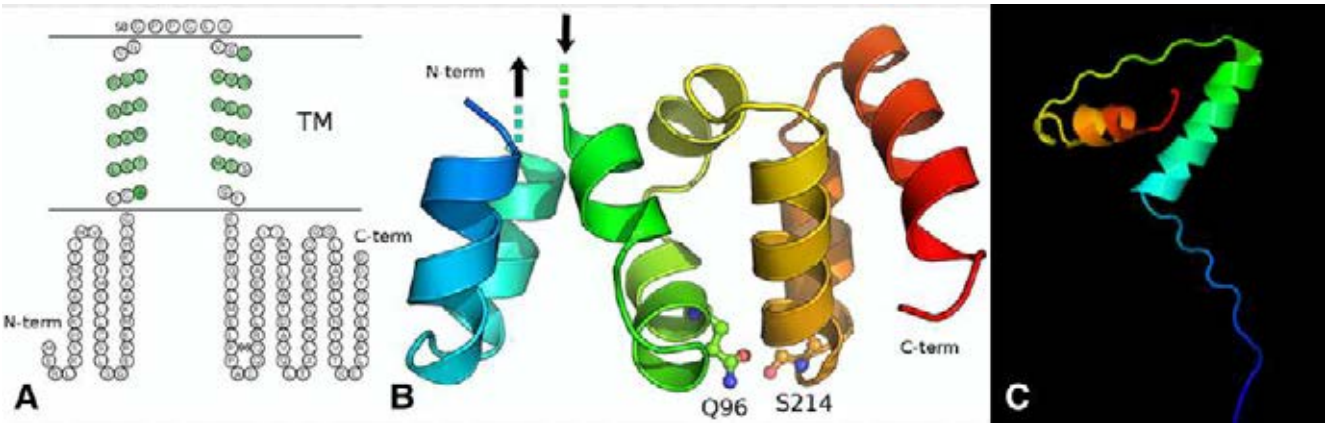


Рис. 48. А. Схематичное строение белка *C19orf12* (Схема заимствована у Venco P. и соавт, 2015 с изменениями*).* TM – трансмембранный домен митохондриальной мембраны и мембраны эндоплазматического ретикулума, где наблюдается расположение большей части белка *C19orf12*. **B.** Пространственное строение нормального белка *C19orf12* **C.** Предиктивный in silico анализ возможного изменения структуры белка у данного пациента вследствие frameshift мутации в 3 экзоне chr19:30193863AACAGCCCCCCG>A, rs515726204c со сдвигом рамки считывания, начиная с 69 кодона p.Gly69fs с применением online программного инструмента Phyre2.

Для лечения в данном случае целесообразно применять хелатные препараты, например деферипрон (Феррипрокс) для уменьшения накопления железа в нейронах головного мозга с целью снижения потенциального прогрессирования неврологической и офтальмологической симптоматики. Назначено регулярное применение хелатных препаратов железа в течение 2 лет с дальнейшей оценкой клинического и функционального состояния, проведение МРТ в динамике. Пациенту показано наблюдение в динамике для определения накопления железа по типу «тигровый глаз». Через 12 мес. лечения и наблюдения острота зрения: Vis OD = 0,5 sph -0,5D = 0,8 н.к. Vis OS = 0,5 sph -0,5D = 0,8 н.к.

Данный случай иллюстрирует важность своевременной и точной диагностики пациентов с различными формами аномалий сетчатки и зрительного нерва, в т. ч. с применением технологий секвенирования нового поколения. В данном случае по результатам генетического анализа был значительно уточнен клинический и генетический диагноз нейродегенерации с накоплением железа в мозге (NBIA), что дает шанс замедлить прогрессирование заболевания с помощью препаратов, влияющих на метаболизм железа в организме. Несмотря на то, что некоторые клиницисты низко оценивают перспективы патогенетически направленной терапии хелатами,

применение препаратов, влияющих на различные звенья патогенеза данного заболевания, в свете подробных знаний о нем позволит облегчить течение болезни.

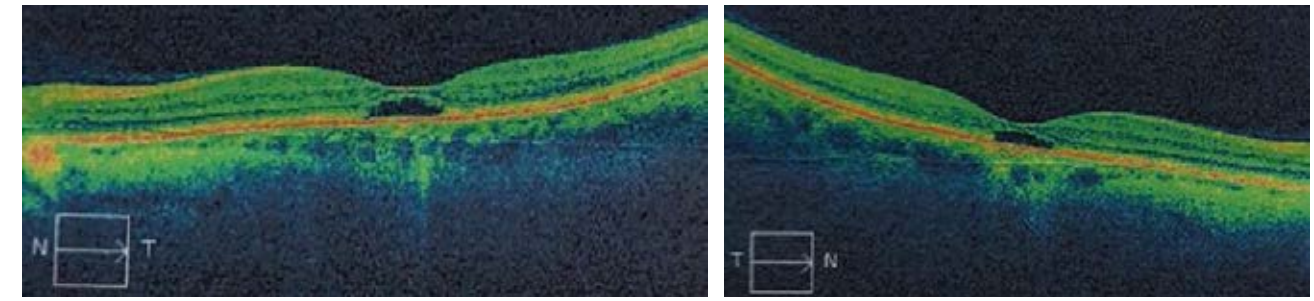
5.6. Результаты лечения пациентов с центральными дистрофиями сетчатки

5.6.1. Результаты лечения *CNGA3*-ассоциированной ретинопатии

Ген *CNGA3* располагается на длинном плече 2-й хромосомы (2q11.2), имеет размер 52кб и содержит 9 экзонов. Этот ген кодирует альфа субъединицу члена семейства белков циклических нуклеотид-управляемых катионных каналов, который необходим для нормального зрения. Мутации в этом гене связаны с ахроматопсией и дальтонизмом. Были описаны два альтернативно сплайсированных транскрипта, кодирующих разные изоформы.

5.6.2. Результаты лечения *CNGB3*-ассоциированной ретинопатии

Ген *CNGB3* располагается на длинном плече 8-й хромосомы (8q21.3), имеет размер 170 кб и содержит 19 экзонов Этот ген кодирует бета-субъединицу циклического нуклеотид-управляемого ионного канала, которая играет роль в модуляции функции канала в фоторецепторах колбочек во время зрительного цикла. Этот гетеротетрамерный канал необходим для сенсорной трансдукции, и мутации в этом гене связаны с ахроматопсией, прогрессирующей дистрофией колбочек, ювенильной макулярной дегенерацией, болезнью Штаргардта. Характерная клиническая картина пациента с мутацией в гене *CNGB3* представлена на рис. 49A-E.



А Б

В Г Д Е

Рис. 49. Характерная клиническая картина пациента с мутацией в гене *CNGB3* **А** – ОСТ OD **Б** – ОКТ OS **В** – фото глазного дна OD **Г** – фото глазного дна OS **Д** – аутофлуоресценция глазного дна OD **Е** – аутофлуоресценция глазного дна OS у пациента с мутацией в гене *CNGB3*.

Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом ахроматопсия, ассоциированная с мутациями в генах *CNGA3* или *CNGB3*, получивших патогенетическое лечение, приведена в табл.33. Количественные результаты микропериметрии у пациентки Р4 с мутацией в гене *CNGB3* представлены на рис.50. Данные исследований VFQ-25 и теста FLORA в группе сравнения 4 пациентов, получивших таргетную терапию и семи пациентов, получивших стандартное лечение или лечение стволовыми клетками, в связи с непрохождением критериев включения в группу лечения значительно отличаются в лучшую сторону в группе таргетной терапии. Статистически достоверных данных на выборке такого размера получить не удается. MLMT тест в данной группе пациентов не релевантен, так как пациенты хорошо ориентируются в темноте, с легкостью проходили все препятствия и имеют относительно высокую остроту зрения. В среднем до лечения Vis OU (BCVA) = 0,08±0,06, после лечения Vis OU (BCVA) = 0,12±0,05. Сравнительные данные периметрии и теста Хью в исследуемых группах представлены в главе 5.7.

*Критерии включения***:** клинический диагноз ахроматопсия, подтвержденные биаллельные мутации в гене *CNGA3* или *CNGB3*, лучшая корригируемая острота зрения (BCVA) ≥ 0,05, минимальная толщина внешнего ядерного слоя 10 мкм при 3° эксцентриситете фовеа в исследуемом глазу (в норме = 38 ± 6 мкм)**,** способность понимать и готовность соглашаться на

протокол обучения и лечения**,** отрицательный тест на беременность у женщин с детородным потенциалом

*Критерии исключения***:** сопутствующие глазные заболевания (например, увеит, запущенная катаракта) в исследуемом глазу**,** системные состояния (ишемическая болезнь сердца, аутоиммунные расстройства), которые могут повлиять на участие в исследовании или показатели результата**,** текущее или недавнее участие в другом исследовании или введении биологического агента в течение последних трех месяцев**,** недавняя (6 месяцев) глазная хирургия, интравитреальная или субретинальная имплантация медицинского устройства**,** известная чувствительность к любому соединению, используемому в исследовании**,** противопоказания к системной иммуносупрессии**,** пациент или партнер пациента детородного возраста, не желающий использовать адекватную контрацепцию на четыре месяца**,** кормящая или беременная женщина**,** любая другая причина, которая, по мнению исследователя, делает потенциальных субъектов не подходящими для лечения**,** мутации в другом гене ахроматопсии**,** противопоказания в связи с планируемой операцией (например, анемия, тяжелая степень коагулопатии, сильные колебания артериального давления)**,** непрозрачность глазных сред или зрелая катаракта**,** глазная инфекция вирусом простого герпеса, история злокачественных новообразований глаз, нарушения внутренних слоев сетчатки (например, отслоение сетчатки в анамнезе пациента), глаукома и/или повреждение зрительного нерва, сосудистая окклюзия сетчатки, пациенты с диабетом, страдающие от ретинопатии и/или макулярного отека, пациенты, получавшие пероральные кортикоиды в течение 14 дней до включения в исследование. системное заболевание или значимые с медицинской точки зрения аномальные лабораторные показатели в крови, аномалии функции почек и/или печени при включении в исследование, отсутствие зрения в контралатеральном глазу.

Табл. 33. Характеристика пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом CNGA3/CNGB3 ассоциированная колбочковая дистрофия в исследуемой группе

Р	**Пол**	**Манифестация заболевания**	**Возраст начала лечения**	**Мутации в гене CNGA3**	**Экзон**
Р1	Ж	С рождения	11	c.784G>C p.Ala262Pro	8
				c.1088T>C p.Leu363Pro	8
Р2	Ж	С рождения	6	c.1641C>A p.Phe547Leu	8
				c.1021T>C p.Ser341Pro	8
				Мутации в гене CNGB3:	
Р3	М	С рождения	7	c.1148delC p.Thr383fs	10
				c.1148delC p.Thr383fs	10

P4	Ж	С рождения	16	c.1148delC p.Thr383fs	10
				c.819_826delCAGACTCC	6

Пациенты с CNGA3-ассоциированным заболеванием проходили лечение по адаптированному протоколу NCT03758404 с CNGB3-ассоциированным заболеванием – по адаптированным протоколам NCT03278873 и NCT03001310.

Обоснование дозировки. Два пациента получили однократную монолатеральную субретинальную инъекцию правильной версией гена *CNGA3* на векторном носителе AAV2-hArr3-nCNGA3и два пациента инъекцию правильной версией гена *CNGB3* - AAV2/8-hCARp.hCNGB3 в количестве $5,0\times10^{11}$ вирусных геномов на 1 глаз, вводимых в предварительно сформированное субретинальное пространство. Наиболее релевантным для лечения является количество частиц векторных геномов, содержащих частицы, и количество клеток-мишеней, которые находятся в физическом контакте с раствором, содержащим вектор. Субретинальная инъекция rAAV.hCNGA3 вектором проводилась с применением стандартной трехпортовой 23G pars plana витрэктомии со сбалансированным солевым раствором (BSS). BSS использовался, чтобы вызвать неглубокое локализованное первичное отслоение сетчатки, вовлекающее фовеа, с использованием расширяемой канюли 41G с ретинотомией, расположенной в центре верхней височной ветви центральной артерии сетчатки (рис. 25). После того как субретинальное пространство было предварительно сформировано, вводили 200 - 500 мкл. раствора, содержащего вектор с правильной копией генома *CNGA3* или *CNGB3*. Все порты для витрэктомии герметично зашивались в конце операции. В послеоперационном периоде назначалась системная терапия стероидами перорально в дозе 1,0 мг / кг массы тела, начиная с первого дня после операции, а затем дозу снижали после 19-го дня на усмотрение врача (например, 40/30/20/15/10 мг).

В списке оцениваемых параметров до и после лечения присутствуют анализы, которые выполнялись в соответствии с клиническими стандартами: глазной и хирургический анамнез, индекс массы тела (ИМТ), показатели жизненно важных функций, тест на беременность, общий и биохимический анализ крови: гемоглобин, гематокрит, количество тромбоцитов, глюкоза, натрий, калий, мочевая кислота, креатинин, креатининкиназа, ЛДГ, общий билирубин, прямой билирубин, АСТ, ALT, γGT, щелочная фосфатаза, электрофорез белков, коагуляция, ЦРБ определяют ЦРБ и антитела IgG и IgM.

Антитела к AAV2/8 (адено-ассоциированный вектор 2/8 серотипа) количественно определяли методом ИФА, клеточный иммунный ответ оценивали путем анализа потенциала активации субпопуляций клеток после стимуляции частицами AAV8. Поиск потенциального системного генома вируса rAAV8 в крови, моче, слюне и слезной жидкости проводился при скрининге на 14-й день и позже при необходимости с помощью ПЦР генома AAV. Контрастная

чувствительность определялась количественно с помощью программы Зебра, этот тест проводится на расстоянии 1м в обоих глазах при стандартных условиях освещения. Также проводили оценку и постоянства цветовосприятия, то есть хроматической адаптации, когда пациентов просят оценить цветность появляющейся гексагональной тестовой накладки на разноцветном дисплее. *Аномалоскопией* (аномалоскоп Nagel) дифференцировали шесть видов аномалий цветовосприятия, проверяли исходный уровень и уровень восстановления различения цветов. Уравнение Рэлея количественно оценивало результаты. Пороги различения цветов определяли *Тестом Хью с цветным тестом Cambridge Color*. *Микропериметрией* (20 градусов) проверяли чувствительность сетчатки, проецируя определенные световые стимулы в определенные места в макуле в мезопических условиях. Непроизвольные движения глаз корректировались в режиме реального времени, а стабильность фиксации определялась количественно. *Базовый офтальмологический осмотр* включал в себя фундускопию с мидриазом: стереоскопическую биомикроскопию полного глазного дна с использованием 90 D линзы (Volk) или эквивалента для проверки на наличие признаков воспаления и патологии сетчатки. Тест на адаптацию к темноте проводили после 3 минут засвета ярким белым светом, а затем применяли ступенчатую оценку порогов обнаружения для красного и зеленого цветов.

Безопасность как первичная конечная точка оценивалась клиническим исследованием воспалительного процесса в глазу. (щелевая лампа, биомикроскопия глазного дна, ангиография, периметрия или электрофизиология). Системная безопасность оценивалась с помощью показателей жизнедеятельности, рутинного клинического химического тестирования и полных / дифференциальных показателей крови. Иммунопатологические анализы включали специфические иммуноферментные анализы для гуморальных антител против капсидного белка rAAV2 и rAAV8. Биораспределение контролировалось с помощью исследований полимеразной цепной реакции (ПЦР) на геном rAAV8 в крови, моче, слюне и слезной жидкости.

Вторичные конечные точки: вторичными целями исследования являлись изучение эффектов лечения, отраженных в субъективных отчетах пациентов, в анкете для конкретного исследования и эффективности вмешательства по зрительной функции, а также оценка изображений сетчатки.

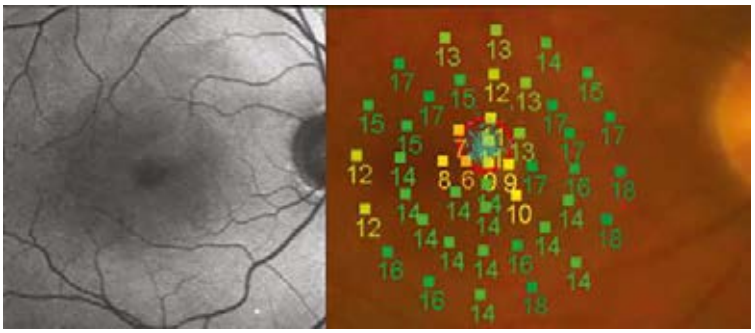


Рис. 50. Количественные результаты микропериметрии у пациентки Р4 с мутацией в гене *CNGB3*.

В целом в этой группе пациентов субретинальные инъекции хорошо переносились и не были связаны с системной токсичностью. Осложнения лечения в раннем послеоперационном периоде включали конъюнктивальную гиперемию, незначительный хемоз, в позднем послеоперационном периоде заднюю субкапсулярную катаракту. Подробный анализ осложнений и побочных эффектов приведен в главе 7:

Острота зрения, данные ОКТ, периметрии, микропериметрии, аутофлуоресценции сетчатки и ЭРГ в динамике через 1, 6, 12, 18 и 24 мес. после патогенетического лечения 4 пациентов с молекулярно-генетически подтвержденным диагнозом ахроматопсия, по сравнению с теми же параметрами 7 пациентов, прошедших стандартное лечение или лечение стволовыми клетками, не позволяют сделать статистически достоверные выводы об эффективности лечения, однако наблюдается явная тенденция к увеличению амплитуды а-волны макулярной ЭРГ уменьшение латентности. Подробный анализ этих исследований в сравнении 1 – 3 групп пациентов приведен в главе 5.7. Данные КЧСМ не имели статистических различий до и после лечения в исследуемых группах. Данные тестов VFQ-25 и FLORA тестов в группе патогенетического лечения имели тенденцию к улучшению.

Как мы наблюдаем по результатам микропериметрии (рис. 50) количественные показатели фовеальных и макулярных изменений снижены, в то время как на средней периметрии светочувствительность фоторецепторов сохранена. Наиболее показательным результатом терапии было повышение остроты зрения и улучшение цветовосприятия. Данные теста Хью до и через 6, 12, 18 мес. после лечения значительно улучшались (рис.51).

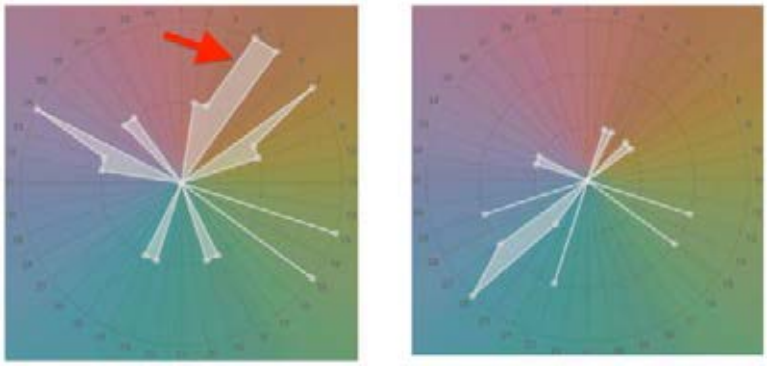


Рис.51. Изменения показателей цветовосприятия по результатам теста Хью до и после таргетного лечения (период наблюдения 24 мес.). Слева указан результат оценки цветовосприятия перед началом лечения (24 - количество баллов, большая потеря восприятия в красном спектре, указано красной стрелкой), Справа указан результат оценки цветовосприятия через 24 мес. после начала лечения (20 – количество баллов, улучшение цветовосприятия красного цветового спектра).

5.7 Сравнительные результаты лечения группы пациентов, прошедших патогенетическое лечение

5.7.1. Оценка функционального состояния сетчатки

- **Острота зрения**

Анализ изменения остроты зрения за период наблюдения за пациентами проводился по российской (децимальной) и международной (logMAR) шкалам. Усредненный период наблюдения и снятия показаний составил 2 – 5 лет. В табл. 34 указаны сроки наблюдения 12 мес. Мы видим, что в исследуемой группе №1, получавшей таргетное лечение, острота зрения за 12 мес. в среднем повысилась на две строки. Во №2 и №3 группах острота зрения снизилась на 1 и 2 строки соответственно.

Табл. 34. Острота зрения в исследуемых группах пациентов до лечения, а также через 6 и 12 мес. после начала лечения.

	Группа 1			**Группа 2**			**Группа 3**		
	до	6 мес	12мес	до	6 мес	12мес	до	6 мес	12мес
Vis (M±σ)	0,3±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1
LogMar (M)	+0,5	+0,3	+0,3	+0,5	+0,5	+0,7	+0,5	+0,7	+1,0

- **Цветотест Хью. Оценка изменения цветовосприятия**

Если для оценки эффекта от лечения периферической дистрофии сетчатки необходима оценка полей зрения: 1) их расширение, 2) задействованность зон пенумбра (полутени – где клетки испытывали серьезные морфологические изменения, но еще оставались живыми), 3) функциональная активность клеток и 4) анатомическое расположение экспрессируемого белка, то для оценки функции центральной зоны сетчатки необходима оценка 1) повышения остроты зрения и 2) цветовосприятия помимо оценки 3) анатомического расположения экспрессируемого белка.

На рис. 51. приведено изменение показателей цветовосприятия по результатам теста Хью до и после таргетного лечения (период наблюдения 24 мес.) у пациента с мутацией в гене CNGA3 (18 лет). Слева указан результат оценки цветовосприятия перед началом лечения (24 балла). Большая потеря восприятия наблюдается в красном спектре, что указано красной стрелкой. Справа указан результат оценки цветовопрсятия через 24 мес после начала лечения (20 баллов). Мы наблюдаем улучшение цветовосприятия красного цветового спектра.

В табл. 35 представлены количественные результаты изменения теста Хью до и через 12/24 мес. после начала лечения в группе №1 по сравнению с группами №2 и №3.

Табл. 35. Изменение цветовосприятия до и после лечения (M±σ) в исследуемых группах пациентов в баллах по результатам 24-х оттеночного теста Хью.

	Группа 1 (n=48)	Группа 2 (n=142)	Группа 3 (n=662)
До лечения	26±8	32±12	31±24
Через 12 мес.	21±5	29±10	30±18
Через 24 мес.	20±6	24±12	31±21
p	***0.028***	***0.012***	***0.4***

- **Периметрия**

Для оценки расширения полей зрения, темновой адаптации и повышения сохранности палочкового аппарата сетчатки в группах №1, №2 и №3 до и после лечения применялись сравнительные оценочные шкалы (рис. 52) на основе данных микропериметрии и периметрии Humphrey.

Мы видим, что в группе №1 через 24 мес. после применения лечения поля зрения расширяются и возникают активные участки периферической сетчатки (показаны желтым, рис. 6) в отличие от группы №2 и группы №3, где наблюдается отрицательная динамика (зоны потери

светочувствительности указаны серым, рис. 52). Цифрами указаны количественные показатели светочувствительности (в децибелах, дБ) в различных топологических участках сетчатки в зависимости от эксцентриситета в градусах, приведенного по оси *x* и *y*

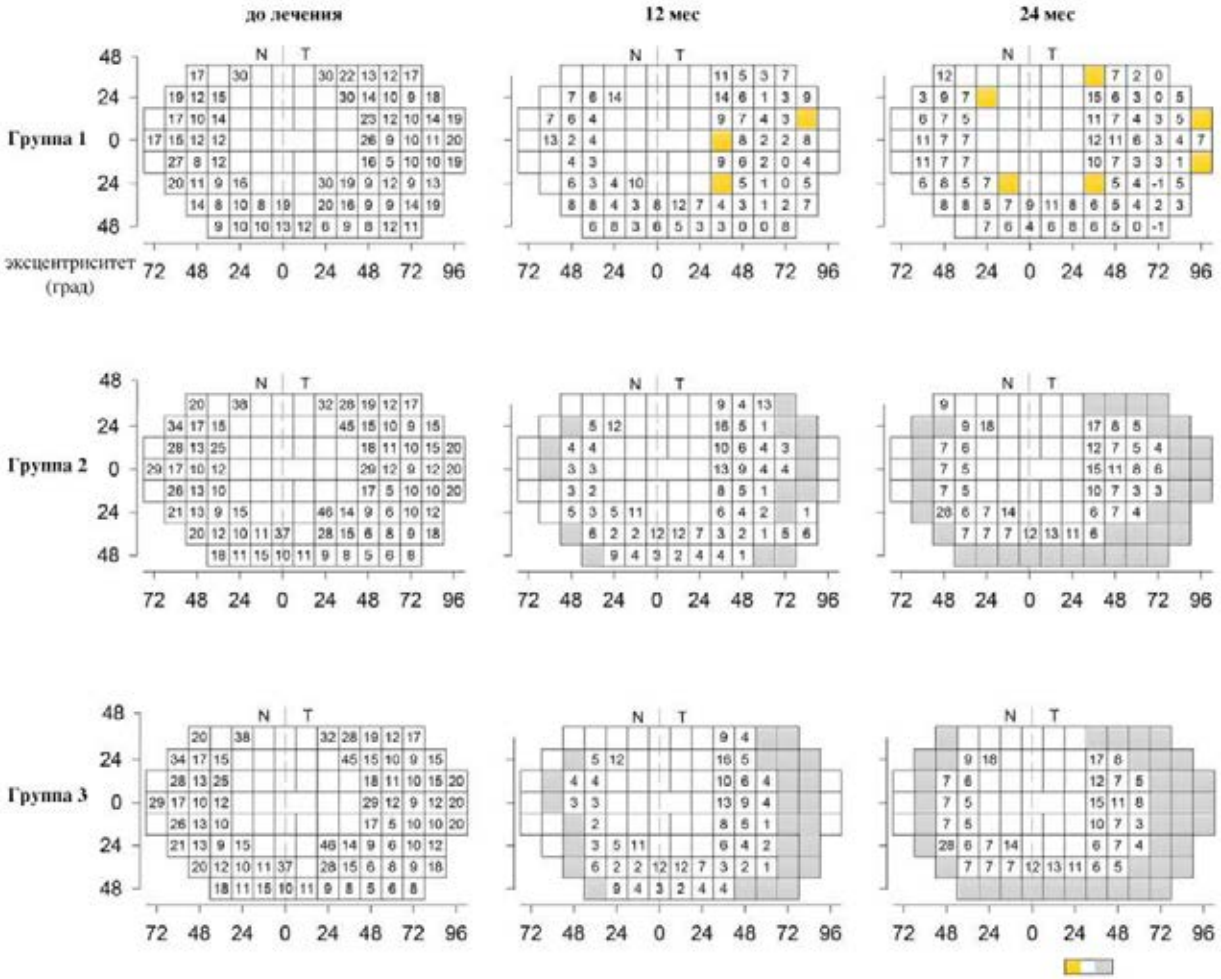


Рис.52. Усредненное схематическое изображение изменения чувствительности палочек до начала лечения, через 12 мес. и через 24 мес. после начала лечения в 1, 2 и 3 группах исследуемых пациентов. Желтым указаны участки с положительной динамикой активности, серым – с отрицательной. Проведение исследования основано на методике, описанной в работе Cideciyan A.V. и соавт., 2018.

Для анализа изменения фоточувствительности периферической сетчатки использовали алгоритм количественного усреднения данных периметрии Humphrey. На рис.21 приведены в качестве примера исходные данные периметрии для анализа. При пигментном ретините наблюдается характерное постепенное концентрическое сужение полей зрения, которое можно измерить количественно (рис.52).

Серым отмечены топологические участки сетчатки, снижение светочувствительности которых превышало 7дБ. Желтым отмечены топологические участки пенумбры сетчатки, светочувствительность которых повысилась на 5дБ и более.

Усредненное количественное изменение светочувствительности палочек до начала лечения, через 12 мес. и через 24 мес. после начала лечения в 1, 2 и 3 группах исследуемых пациентов представлены на рис. 53.

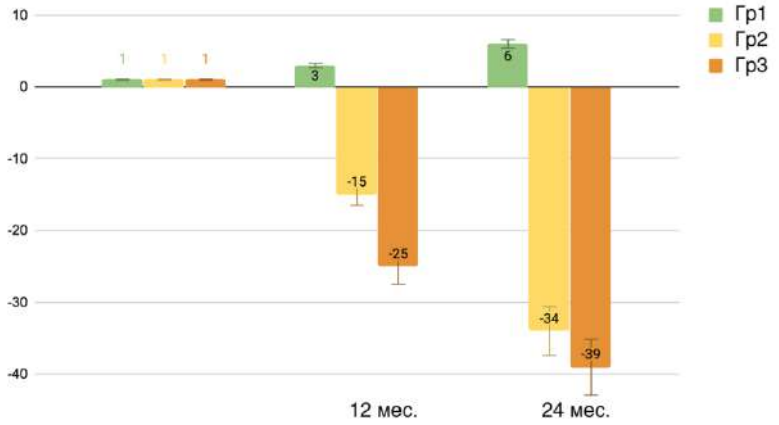


Рис.53. Усредненное количественное изменение светочувствительности палочек до начала лечения, через 12 мес. и через 24 мес. после начала лечения в 1, 2 и 3 группах исследуемых пациентов.

- **Микропериметрия**

К точным методам оценки результатов патогенетического и стандартного лечения также относится микропериметрия, которая позволяет оценивать даже малые изменения. Мы наблюдаем статистически значимое повышение функциональной активности клеток сетчатки у пациентов в группе №1 по сравнению с группой №3 (рис.54).

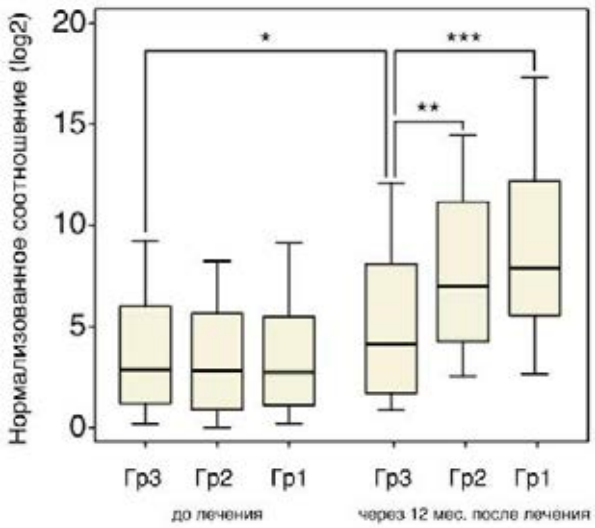


Рис.54. Нормализованное соотношение (log_2) данных микропериметрии до и через 12 мес. после лечения в исследуемых группах.* $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,005$.

- **Измерение изменения чувствительности фоторецепторов**

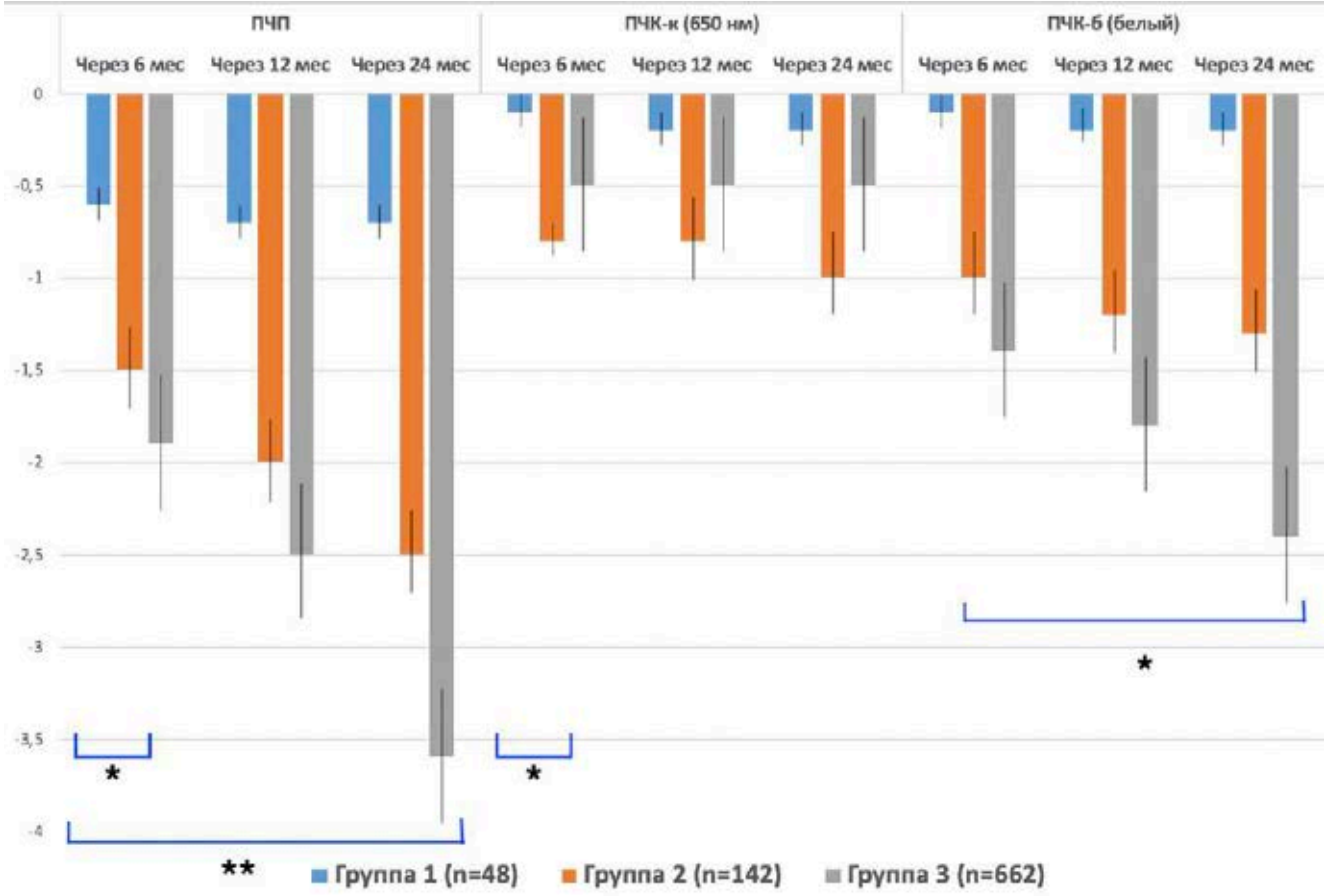


Рис. 55. Относительная потеря чувствительности фоторецепторов – палочек (ПЧП) и колбочек (ПЧБ – общего количества колбочек, ПЧК – колбочек красного спектра), через 6, 12 и 24 мес. после лечения в 1, 2 и 3-ей группах пациентов *p<0,05, ** p<0,005.

Мы наблюдаем стабильно высокий результат сохранности чувствительности обоих типов фоторецепторов (и палочек, и колбочек) в первой группе пациентов, прошедших патогенетически направленное лечение, в течение всего срока наблюдения (24 мес.). (рис. 55). Наибольшая потеря чувствительности фоторецепторов, а именно палочкового аппарата наблюдается у пациентов третьей группы (см. табл. 36). Это может объясняться наибольшим размером группы, ее разнородностью и отсутствием влияния на механизмы развития заболевания. Наибольшая потеря чувствительности колбочек красного спектра наблюдается вот второй группе лечения – стволовыми клетками. Наиболее вероятно, это вызвано опосредованным истощением функции палочек вследствие изначального накопления активных ростовых факторов, содержащихся в мезенхимальных стромальных клетках.

Табл. 36. Показатели исходной чувствительности фоторецепторов (в люксах) и изменение чувствительности фоторецепторов через 6, 12, 24 мес. после лечения в исследуемых группах пациентов (в люксах).

Чувствитель-ность ф-ров	срок	Группа 1 (n=48)	Группа 2 (n=142)	Группа 3 (n=662)
	Исходн.чув-ть	22	23	21
ПЧП	Через 6 мес	-0,6	-1,5	-1,9
	Через 12 мес	-0,7	-2,0	-2,5
	Через 24 мес	-0,7	-2,5	-3,6
	Исходн.чув-ть	24	23	22
ПЧК-к (650 нм)	Через 6 мес	-0,1	-0,8	-0,5
	Через 12 мес	-0,2	-0,8	-0,5
	Через 24 мес	-0,2	-1,0	-0,5
	Исходн.чув-ть	24	24	24
ПЧК-б (белый)	Через 6 мес	-0,1	-1,0	-1,4
	Через 12 мес	-0,2	-1,2	-1,8
	Через 24 мес	-0,2	-1,3	-2,4

ПЧП – потеря чувствительности палочек (на стимул в синем спектре), ПЧК – потеря чувствительности колбочек (на красный 650 нм и на белый стимул) в люксах. Отрицательные значения показывают потерю чувствительности относительно исходной.

- **Аутофлуоресценция глазного дна**

Характерная картина центральной моногенной колбочковой дистрофии сетчатки при исследовании аутофлуоресценции представлена на рис. 56.

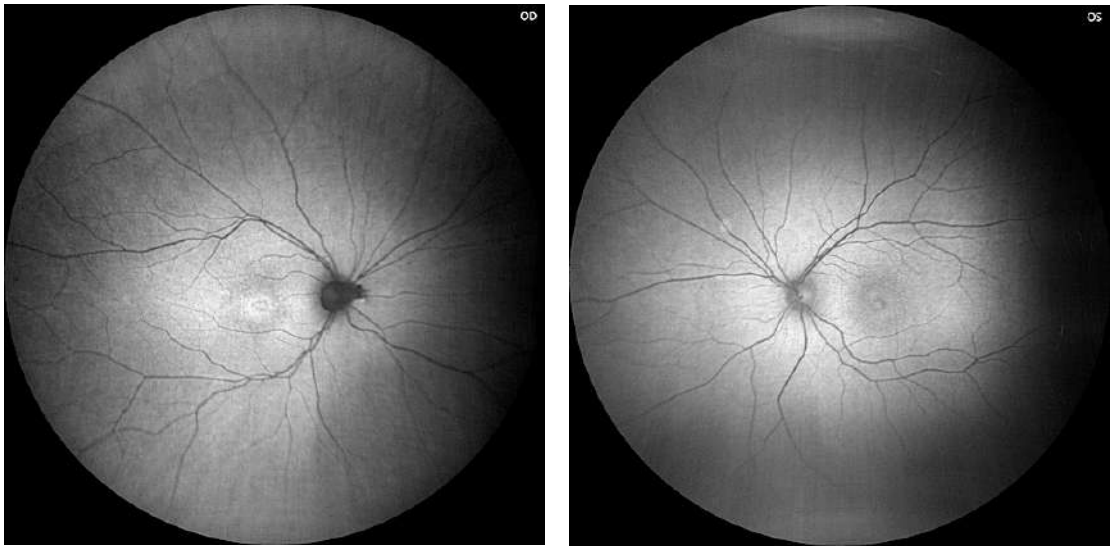


Рис. 56. Характерная картина центральной моногенной колбочковой дистрофии сетчатки

Измерение аутофлуоресценции проводилось на аппарате Zeiss Clarus.

- **ЭРГ (электроретинография)**

Одним из наиболее точных и объективных методов оценки состояния сетчатки является ЭРГ. При центральных дистрофиях сетчатки наблюдаются значимые изменения колбочкового ответа на макулярной ЭРГ. При периферических дистрофиях мы видим постепенное угасание амплитуды и удлинения латентности на темновой и ганцфельд-ЭРГ. В табл.37 приведены результаты исследований ЭРГ в группах №1, №2 и №3, где мы наблюдаем сохранение амплитуды и лишь незначительное удлинение латентности в группе №1 по сравнению с группами №2 и №3, где амплитуда значительно падает, а латентность увеличивается по времени.

Табл. 37. Максимальная ЭРГ до и после лечения в исследуемых группах пациентов

группа	n			*перед лечением*	*6 мес.*	*12 мес.*	*24 мес.*
№1	48	*a-волна*	лат, мс.	25±12	19±13	22±10	22±10
			ампл, мкВ	60±32	60±21	55±18	55±18
		b-волна	лат, мс.	45±10	35±15	40±17	40±17
			ампл, мкВ	100±35	90±24	90±22	90±22
№2	142	*a-волна*	лат, мс.	30±10	28±13	29±15	29±15
			ампл, мкВ	45±12	40±18	50±18	50±18
		b-волна	лат, мс.	56±15	50±30	50±32	50±32
			ампл, мкВ	40±21	30±21	34±18	34±18
№3	431 из 662	*a-волна*	лат, мс.	48±12	55±23	60±23	60±23
			ампл, мкВ	52±6	47±8	30±5	10±5
		b-волна	лат, мс.	110±70	100±42	100±40	100±40
			ампл, мкВ	55±18	40±12	18±5	8±5

n – количество пациентов в группе, лат – латентность, мс., ампл – амплитуда, мкВ.

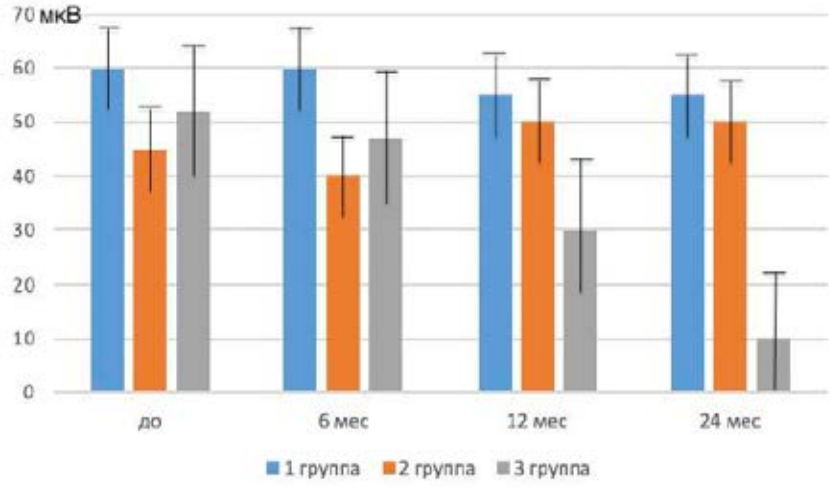


Рис. 57. А-волна максимальной ЭРГ в исследуемых группах пациентов перед началом лечения, через 6, 12 и 24 месяцев после проведения лечения.

А-волна максимальной ЭРГ в исследуемых группах пациентов перед началом лечения, через 6, 12 и 24 месяцев после проведения лечения представлена на рис. 57. Наиболее наглядным является иллюстрирование изменений ЭРГ в каждом конкретном случае применения таргетной терапии, как в случае с *RPGR*-ассоциированным пигментным ретинитом (рис.58), где мы видим значительное восстановление функции парацентральных палочек по результатам измерений электрической активности клеток, что сказывается и на функциональном результате – расширении полей зрения (рис. 58B, D).

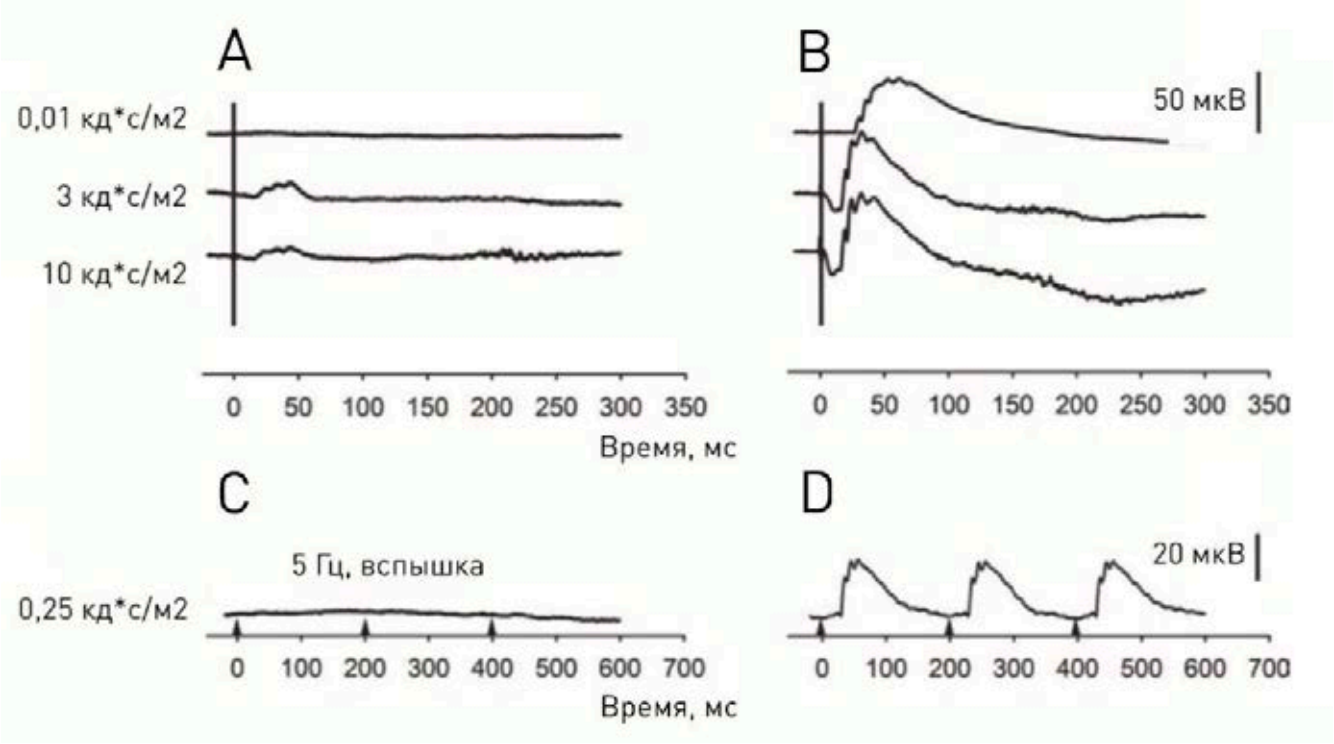


Рис.58. Изменение показателей Ганцфельд ЭРГ до (A) и после (B) и ЭРГ на вспышку до лечения (C) и после (D) применения препарата rAAV2t –hRPGR у пациента. (результаты ЭРГ доктора Mu Liu, с изменениями).

Для оценки характерных функциональных изменений в процессе прогрессирования дистрофии сетчатки и эффекта от лечения применяли оценку параметров ЭРГ. Макулярную для центральных дистрофий сетчатки, темновую и Ганцфельд ЭРГ для периферических дистрофий сетчатки (табл. 37). Мы видим, что в 1-й группе таргетного лечения потеря чувствительности фоторецепторов ниже, чем в группах №2 и №3.

5.7.2 Оценка анатомической структуры сетчатки

- **Гистологические исследования**

Результаты положительных изменений ЭРГ после патогенетически ориенированной терапии одной из форм пигментного ретинита (RPGR) многократно подтверждаются гистологически в собственной культуре выращенных клеток сетчатки (рис. 59, также см. главу материалы и методы) пациента, где мы наблюдаем отсутствие белка RPGR до инъекции и достоверную правильную локализацию экспрессированного белка через 2 недели после инъекции rAAV2t – *hRPGR* (указано желтой стрелкой).

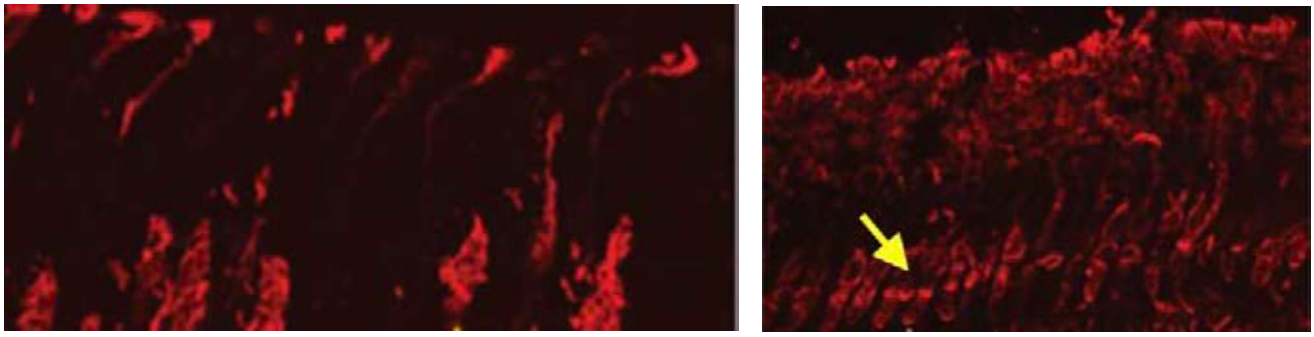


Рис.59. Отсутствие экспрессии белка RPGR до и наличие экспрессии белка RPGR (указано желтой стрелкой) через 12 мес. после лечения rAAV2t –hRPGR. Фото результатов совместного иммуногистохимического анализа использованы с разрешения Dr. Aguirre G.D.

- **Сравнительное изменение толщины наружного ядерного слоя (ONL) сетчатки**

По результатам 12 мес. наблюдения после лечения пациентов из группы 1 наблюдалось увеличение толщины сетчатки с 231/232 до 241/243 мкм (OD/OS соответственно) на 4,1% и 4.5% соответственно (рис. 60) за счет утолщения слоя наружных сегментов фоторецепторов, что является одним из важных признаков эффективности проведенного лечения и не наблюдается в группе пациентов, получавших стандартную терапию.

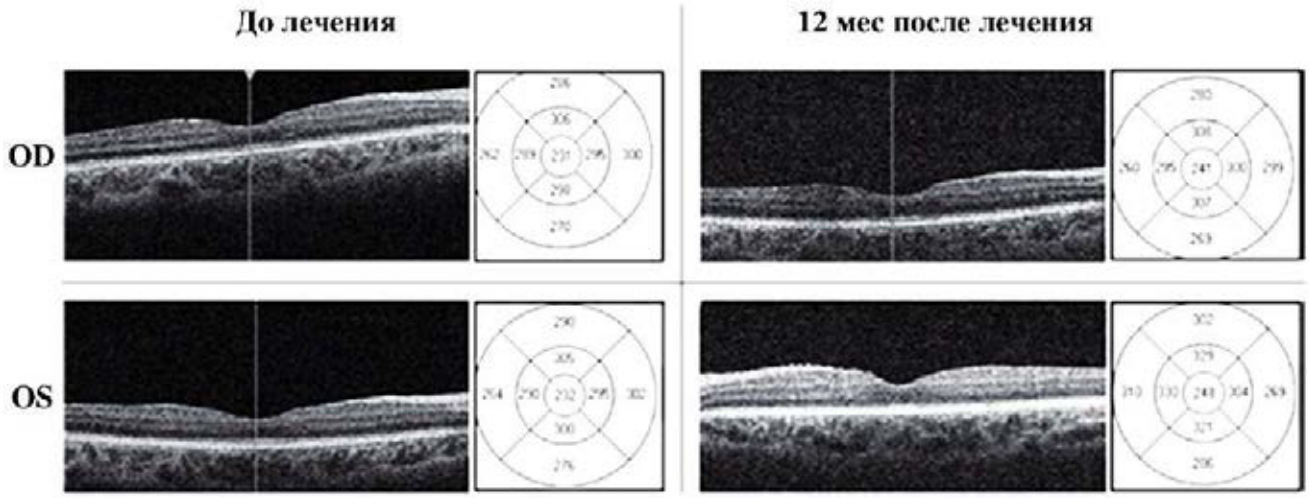
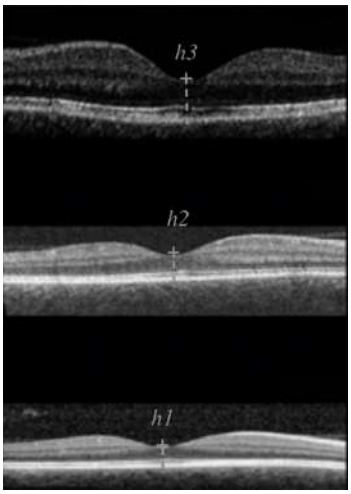


Рис.60. Усредненные показатели ОКТ до и через 12 мес. после лечения в 1-й группе пациентов.

Усредненные параметры ОКТ по группам указаны в табл. 38. Увеличение толщины сетчатки за счет утолщения слоя наружных сегментов фоторецепторов (рис. 61) в **группе 1**, а не за счет увеличения макулярного отека или межфоторецепторного пространства указывает на то, что целевые анатомические показатели лечения достигнуты, что в совокупности с положительным функциональным результатом лечения дает подтверждение положительных результатов лечения.

Табл. 38. Относительное увеличение толщины слоя наружных сегментов фоторецепторов, выраженное количественно, у пациентов 1 группы относительно пациентов 2-й и 3-й группы через 12 мес. после начала лечения в исследуемых группах. Все результаты *p<0,05.

	Группа 3	Группа 2	Группа 1	p<0,05
кол-во пациентов	48	142	662	
кол-во глаз	62	284	1284	
RPE65	0,4	2,1	3,8	*
RPGR	0,05	0,9	1,4	*
CNGA3	0,1	1	2,3	*
CNGB3	0,25	1	1,4	*
RS1	0,07	1,2	3	*
CLN3	0,01	0,9	2,4	*
CDHR1	0,15	1	1,3	*
CEP290	0,03	1	1,6	*
EYS	0,15	0,9	2,8	*
USH2A	0,1	0,8	2,4	*
CRB1	0,15	0,8	1,8	*
NR2E3	0,1	1	1,3	*
RHO	0,1	1,2	1,7	*
C19orf12	0,2	1,3	1,1	*



(h1 – h3):(h2 – h3) = k

$$\frac{h1 - h3}{h2 - h3} = k$$

k – коэффициент относительного увеличения толщины слоя наружных сегментов фоторецепторов

h1 – средняя толщина сетчатки в центре (мкм) в группе 1

h2 – средняя толщина сетчатки в центре (мкм) в группе 2

h3 – средняя толщина сетчатки в центре (мкм) в группе 3

Рис.61. Коэффициент ***«к»*** относительного увеличения толщины слоя наружных сегментов фоторецепторов.

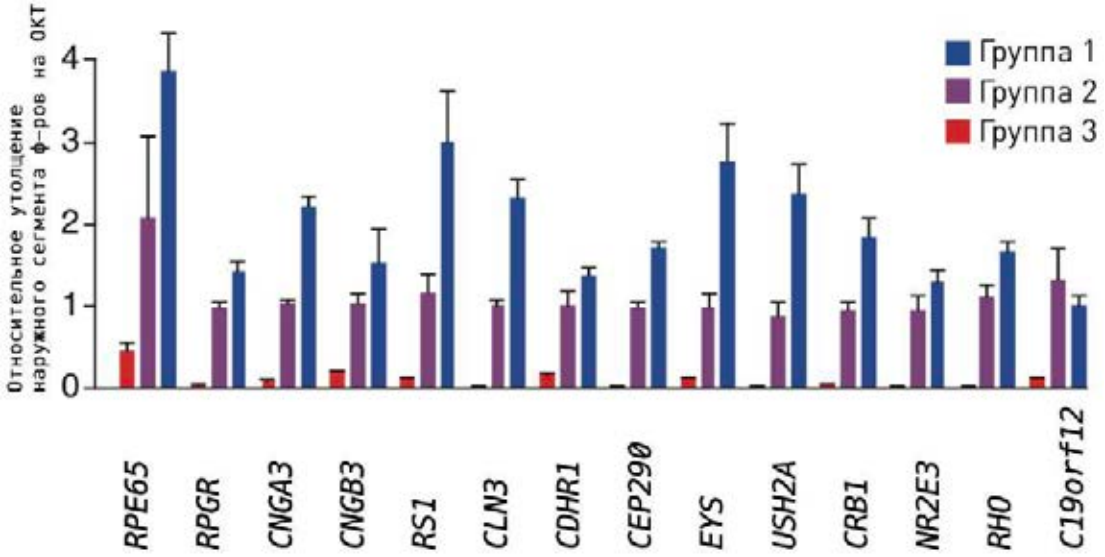


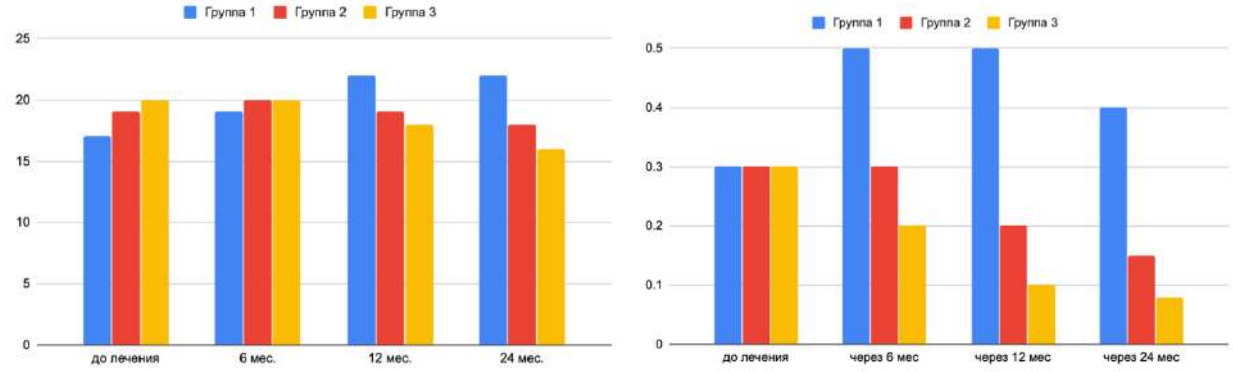
Рис.62. Относительное увеличение толщины слоя наружных сегментов фоторецепторов через 12 мес. после начала лечения в исследуемых группах. По оси у – коэффициент к. Все результаты *p<0,05.

Относительное увеличение толщины слоя наружных сегментов фоторецепторов через 12 мес. после начала лечения в исследуемых группах приведено на рис.62.

5.7.3. Субъективные результаты лечения по оценке пациентов

- **FLORA тест результаты**

Оценка качества жизни пациентов проводилась по двум шкалам – FLORA тесту и VFQ-25 опроснику. На рис. 63 указаны результаты изменения качества жизни до и после лечения в исследуемых группах. Мы наблюдаем стабильное повышение удовлетворенности пациентов качеством своего зрения и жизни в целом в исследуемой группе №1 (рис.63А), в то время как в группе №3 наблюдалось значительное ухудшение качества зрения за 24 мес. после начала стандартной терапии (рис. 63В).



- А В

Рис.63. Результаты FLORA теста качества жизни и опросника VFQ-25 (А) и изменение остроты зрения (В) по в исследуемых группах 1 и 3 до, через 6, 12 и 24 мес. после начала лечения.

- **Результаты VFQ-25 теста**

В связи с множественностью параметров, получаемых в результате проведения VFQ-25 теста и в связи с разнородностью исследуемых групп вызывает затруднение представить результаты обследования в наглядном виде. В качестве наглядной переменной по оси у была выбрана шкала оценки R квадрат – это единица минус доля необъяснённой дисперсии или дисперсии случайной ошибки модели, условной по факторам дисперсии зависимой переменной, в дисперсии зависимой переменной. R квадрат рассматривают как универсальную меру зависимости одной случайной величины от нескольких других, получаемых в результате проведения опросника VFQ-25. В частном случае линейной зависимости R квадрат является квадратом множественного коэффициента корреляции между зависимой переменной и объясняющими переменными. В данном случае зависимыми переменными являлись (1) цветовое зрение, (2) возможность вождения автомобиля, активность (3) вблизи и (4) на далеком расстоянии, (5) зависимость от других людей, общие показания (6) зрения и (7) самочувствия, (8) психическое здоровье, (9) боль

в глазах, (10) периферическое зрение, (11) выполнение социальных функций и ролей, (12) затруднения в повседневной жизни, а также усредненный (13) общий показатель.

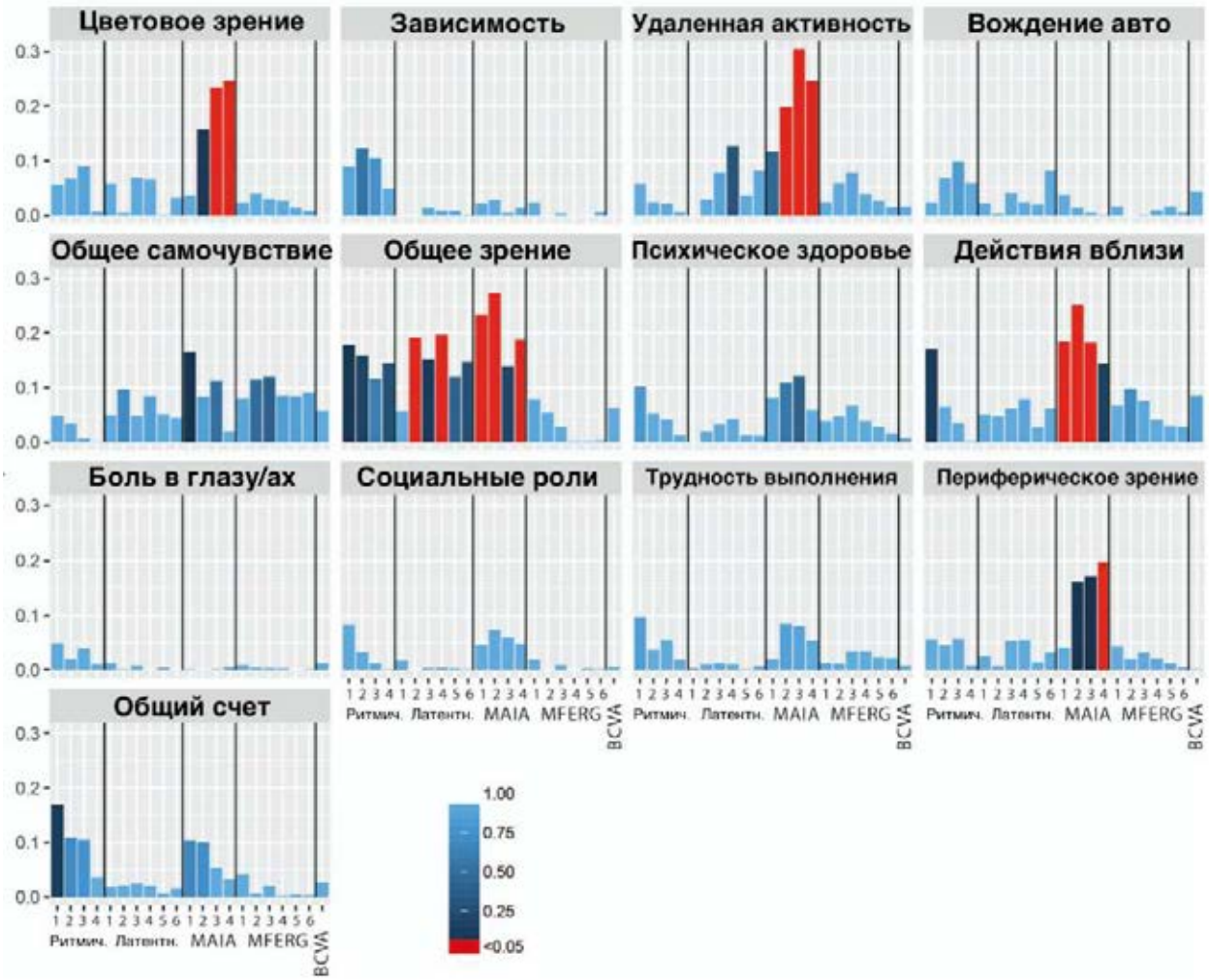


Рис. 64. Корреляция между различными функциональными параметрами и результатами теста-опросника VFQ-25 для 1-й группы пациентов, прошедших патогенетическое лечение. На шкале указана степень статистически значимых отличий p<0,05 указан красным цветом. Чем более светлый цвет шкалы, тем менее коррелировали данные сравнения шкал со статистически значимым результатом. По оси у указан R квадрат. Ритмич. – ЭРГ на вспышку. Латентн. – латентность по данным ганцфельд ЭРГ, MAIA – результаты оценки микропериметрии (Macula Assessment Integrity Analyzer), MFERG – среднее значение степени ответа фоторецепторов по результатам мультифокальной ЭРГ, BCVA – максимально корригируемая острота зрения.

Как мы видим из рис. 64 цветовое зрение, активность вблизи и на расстоянии, общее зрение, а также периферическое зрение имеют статистически достоверные различия до и после лечения в первой группе пациентов, прошедших патогенетическое лечение.

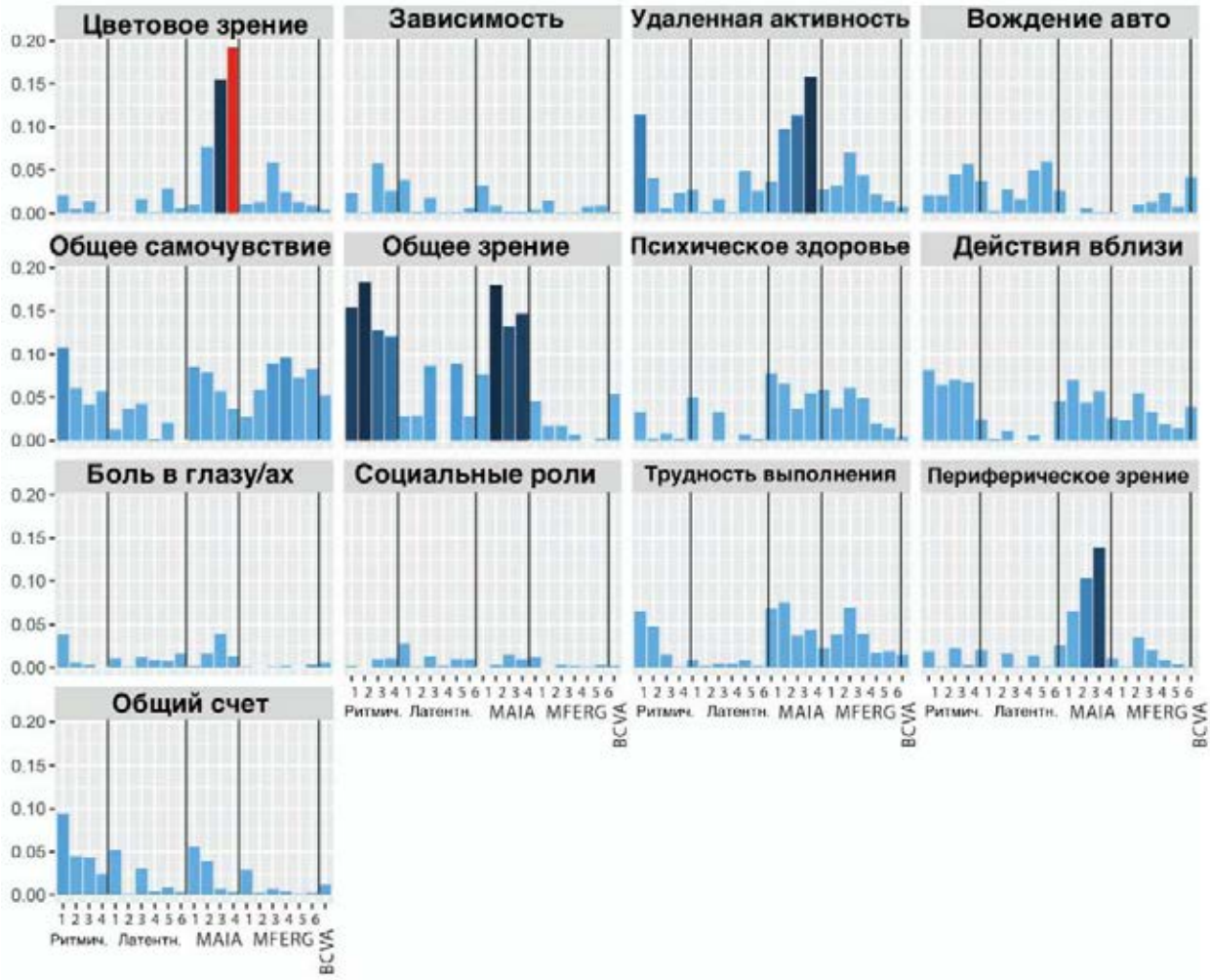


Рис. 65 Корреляция между различными функциональными параметрами и результатами теста-опросника VFQ-25 для 3-й группы пациентов, прошедших стандартные курсы лечения. На шкале указана степень статистически значимых отличий $p<0,05$ указан красным цветом. Чем более светлый цвет шкалы, тем менее коррелировали данные сравнения шкал со статистически значимым результатом. По оси у указан R квадрат. Ритмич. – ЭРГ на вспышку. Латентн. – латентность по данным ганцфельд ЭРГ, MAIA – результаты оценки микропериметрии (Macula Assessment Integrity Analyzer), MFERG – среднее значение степени ответа фоторецепторов по результатам мультифокальной ЭРГ, BCVA – максимально корригируемая острота зрения.

В отличие от рис. 64 на рис. 65 мы наблюдаем только один из параметров сравнения цветовой чувствительности имел достоверную степень корреляции до и после лечения, тогда как все другие параметры оставались в степени изменений, которые нельзя назвать статистически значимыми.

Возможно, более наглядно можно представить усредненные результаты изменения VFQ-25 как функцию изменения остроты зрения через 6 и 12 месяцев после лечения в исследуемых группах (рис. 66).

Усредненное изменение результатов VFQ-25 - специфичные по зрению субшкалы как функция изменения остроты зрения через 6 и 12 мес. Через 12 месяцев эффект патогенетического лечения становится более очевидным, как представлено на рис. 66. То есть все остальные области жизни – социализация, выполнение задач и ролей, психическое здоровье улучшались, зависимость от родственников уменьшалась.

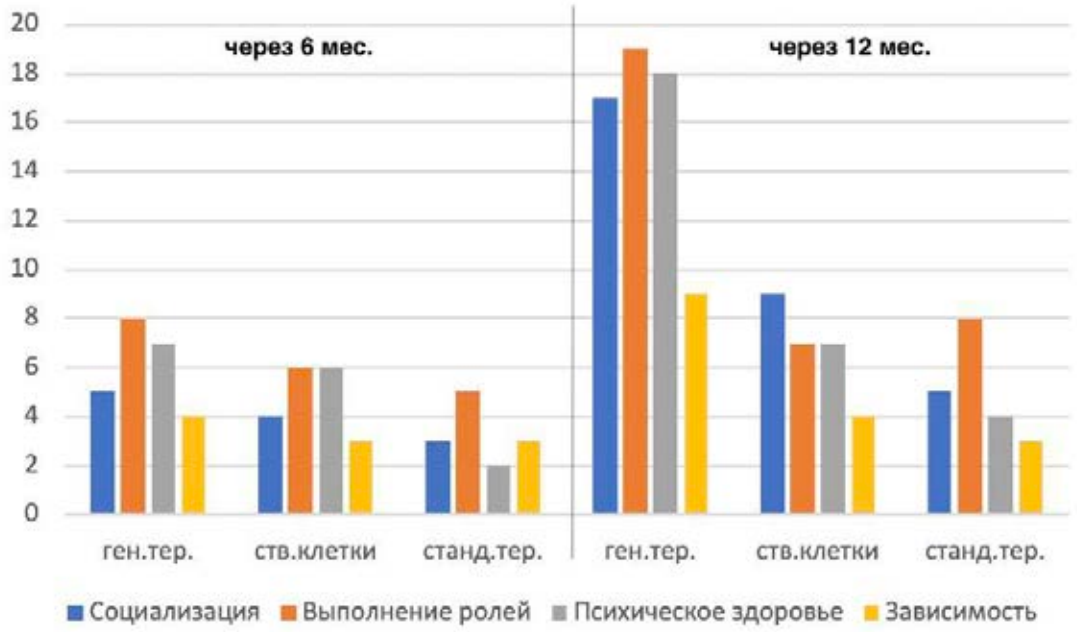


Рис. 66. Усредненное изменение результатов VFQ-25 - специфичные по зрению под-шкалы как функция изменения остроты зрения через 6 и 12 мес.

- **MLMT тест**

Для нормы были протестированы 30 добровольцев с остротой зрения 1,0 и сохраненными полями зрения.

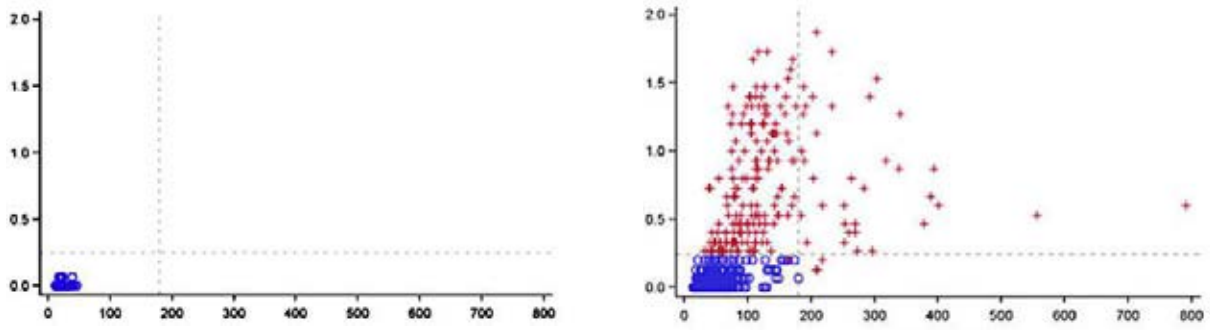


Рис. 67.А. Длительность прохождения MLMT теста в норме, сек, слева и при пигментном ретините, справа. По оси х – время, сек, по оси у – шкала точности прохождения теста.

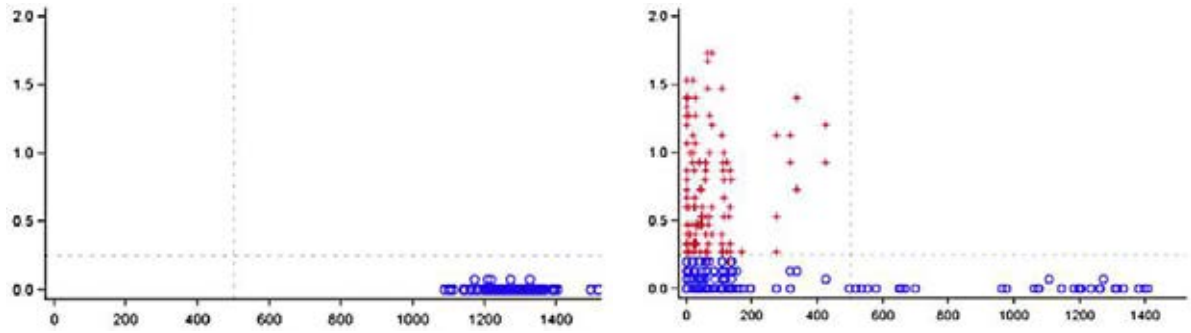


Рис. 67. Б. Шкала прохождения теста подвижности (MLMT) в норме (слева) и при пигментном ретините в зависимости от степени потери полей зрения. По оси x – суммарное количество градусов полей зрения по основным меридианам, по оси y – шкала точности прохождения теста.

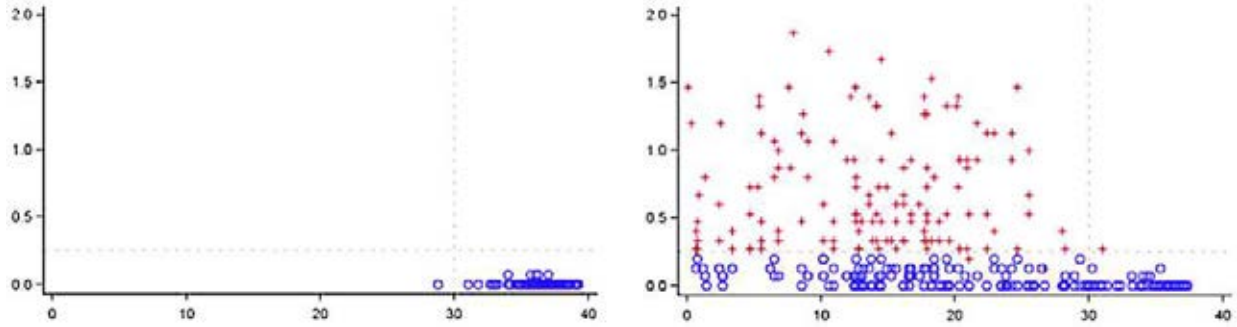


Рис. 67. В. Оценка макулярной функции: порог светочувствительности и точность, по статусу «прошел» / «не прошел», в группе с нормальным зрением (слева) и в группе пациентов с пигментным ретинитом (справа). По оси x – порог светочувствительности макулярной области сетчатки (в дБ), по оси y – шкала точности прохождения теста.

Показатели времени и точности в разбивке по статусу «прошел / не прошел» при сохранном зрении и в исследуемой группе с нарушениями зрения представлены на рис 67А.Все субъекты с нормальным зрением получили оценку «пройдено» по тесту на подвижность по нескольким градациям яркости (MLMT) при всех проверенных уровнях освещенности. В отличие от них, люди с ослабленным зрением показывали разную производительность как по времени, так и по точности при различных уровнях освещенности. Каждая точка данных представляет собой измерение отдельного человека во время посещения, нанесено несколько точек по каждому предмету. Испытуемые сдавали тест точности «прошел» (голубой кружок), если уровень их ошибок был $\leq$0,25 (указан горизонтальной пунктирной линией) и длительность прохождения теста составляла менее 180 секунд (указана вертикальной пунктирной линией). Если испытуемые заваливали тест по длительности или точности прохождения, то это отражалось в виде красного крестика с указанием временнЫх и точностных параметров прохождения теста.

Шкала прохождения теста подвижности (MLMT) в норме (слева) и при пигментном ретините в зависимости от степени потери полей зрения представлена на рис. 67Б.. По оси x – суммарное количество градусов полей зрения по основным 32 меридианам, по оси y – шкала точности прохождения теста. Испытуемые сдавали тест точности «прошел» (голубой кружок), если уровень их ошибок был ≤0,25 (указан горизонтальной пунктирной линией). Также из этой диаграммы рассеяния мы видим, что при суммарной сохранности полей зрения обоих глаз менее 500 градусов (то есть в среднем 8 градусов на каждый из меридианов, указано вертикальной пунктирной линией) все пациенты испытывают трудности при прохождении MLMT теста любого уровня освещенности, что отражается в красных крестиках «не прошел».

Оценка порога светочувствительности центральной, макулярной зоны сетчатки с помощью MLMT теста в группе пациентов с очень низкой остротой зрения (справа) по сравнению с группой здоровых добровольцев (слева) представлена на рис. 67.В.. Оценивалась точность прохождения теста «прошел» / «не прошел» на уровне ошибок ≤0,25 (указан горизонтальной пунктирной линией), в группе с нормальным зрением (слева) и в группе пациентов с пигментным ретинитом (справа), при снижении порога светочувствительности ниже 30 дБ (указан вертикальной пунктирной линией) пройти с необходимой точностью и уложиться в требуемое время MLMT тест практически не возможно, что мы наблюдаем на этой диаграмме рассеяния.

Дифференциальная диагностика *C19orf12* ассоциированного пигментного ретинита важна для подбора правильного лечения. Своевременная дифференциальная диагностика болезни Баттена (*CLN3*) критично важна для понимания серьезности нарастания системной клинической картины, для подбора симптоматического лечения в дополнение с патогенетическими подходами важно учитывать неврологическую симптоматику пациента.

Сравнение технологии генной терапии и терапии антисмысловыми олигонуклеотидами (AON) имеет свои преимущества и ограничения. К примеру, генная терапия применяется однократно, в отличие от AON лечения, которое необходимо применять 1 раз в 6 месяцев.

Возможно предположить и заранее предсказать плейотропность действия некоторых генотерапевтических препаратов на основе знаний метаболических путей и физиологических особенностей. На примере препарата, нацеленного на коррекцию функции гена *PDE6B* (Ocu400 компании Ocugen) было подтверждено положительное влияние на течение клинической картины у пациентов с дистрофиями сетчатки, вызванными мутациями в генах *RHO, NR2E3, CEP290.*

Проведение некоторых диагностических процедур позволяет косвенно оценить тяжесть протекаемого патологического процесса. Например, ухудшения показателей цветотеста Хью при палочковых дистрофиях – косвенный индикатор токсичности для колбочек разрушающихся палочковых фоторецепторов.

Сроки проведения динамических обследований через 1, 6, 12, 18 и 24 мес. после применения лечения обоснованы международными стандартными протоколами наблюдения пациентов с наследственными заболеваниями сетчатки.

Что касается сравнения возрастных групп пациентов – важно начать лечение вначале развития патологического процесса, то есть чем раньше, тем лучше, но в то же время имеются ограничения – маленьким пациентам до 3-х лет не разрешено вводить генотерапевтические препараты в ЕС и США. Имеется тенденция к более раннему разрешению применения препарата, если он показал свою безопасность.

На сегодняшний день описано порядка 300 генов, вызывающих моногенные заболевания сетчатки. В данную работу вошла только часть описанных генов, это связано с методологией отбора пациентов в группу исследования (см. главу 2) и с временными ограничениями проведения работы.

CDHR1-ассоциированный макулярный отек

Анализ метаболических путей остается важным инструментом в поиске лечения КМО. Хотя этиология КМО остается неизвестной, предложено несколько механизмов, которые могут способствовать формированию КМО, в том числе: а) разрушение гематоофтальмического барьера, б) нарушение функции механизма транспорта в РПЭ, в) отек и дисфункция клеток Мюллера, г) антиретинальные антитела и д) тракции стекловидного тела.

В связи с тремя различными применяемыми терапевтическими тактиками при КМО была возможность сравнить эффективность лечения рисутеганибом, ранибизумабом и дексаметазоном. Серозная нейроретинальная отслойка, или КМО – кистоидный макулярный отек, оценивались по изменению BCVA – максимальной корригируемой остроты зрения, по изменению чувствительности сетчатки в пределах центральных 4° и 12° (децибел) на микропериметрии, а также по изменению ЦТМ –центральной толщины сетчатки макулы (мкм) по результатам ОКТ. Клинически значимая корреляция в табл.39 выделена жирным шрифтом. p-значение t-критерия Стьюдента.

Более высокая экспрессия шести молекул адгезии клеток была связана со снижением уровня макулярного отека. Эти данные подтверждены с использованием данных Международного консорциума по геному на основе количественного сравнения и использования кривых Каплана-Мейера, а также многовариантного анализа Кокса.

Табл. 39. Сравнительный эффект от лечения макулярного отека в различных группах

Группа лечения	BCVA	4° ΔдБ	12° ΔдБ	ЦТМ, мкм
Рисутеганиб	6.56 ± 9.95	−0.96 ± 0.83	−0.34 ± 1.26	**−472.4 ± 214.2**
Ранибизумаб	6.71 ± 4.39	3.10 ± 5.39	1.73 ± 2.80	**−215.4 ± 150.8**

Дексаметазон	4.00 ± 3.16	**−1.19 ± 1.63**	**−1.80 ± 1.41**	−183.8 ± 117.1
Без лечения	5.60 ± 5.44	**2.60 ± 2.25**	**1.38 ± 0.87**	−130.1 ± 104.3
p-критерий	0.372	**< 0.001**	**0.005**	**0.003**

Патогенетическое обоснование применения рисутеганиба для лечения КМО и соответственно объяснение статистически значимой достоверности эффекта от лечения этим препаратом можно более наглядно иллюстрировать картами генетического взаимодействия и взаимовлияния (рис.68).

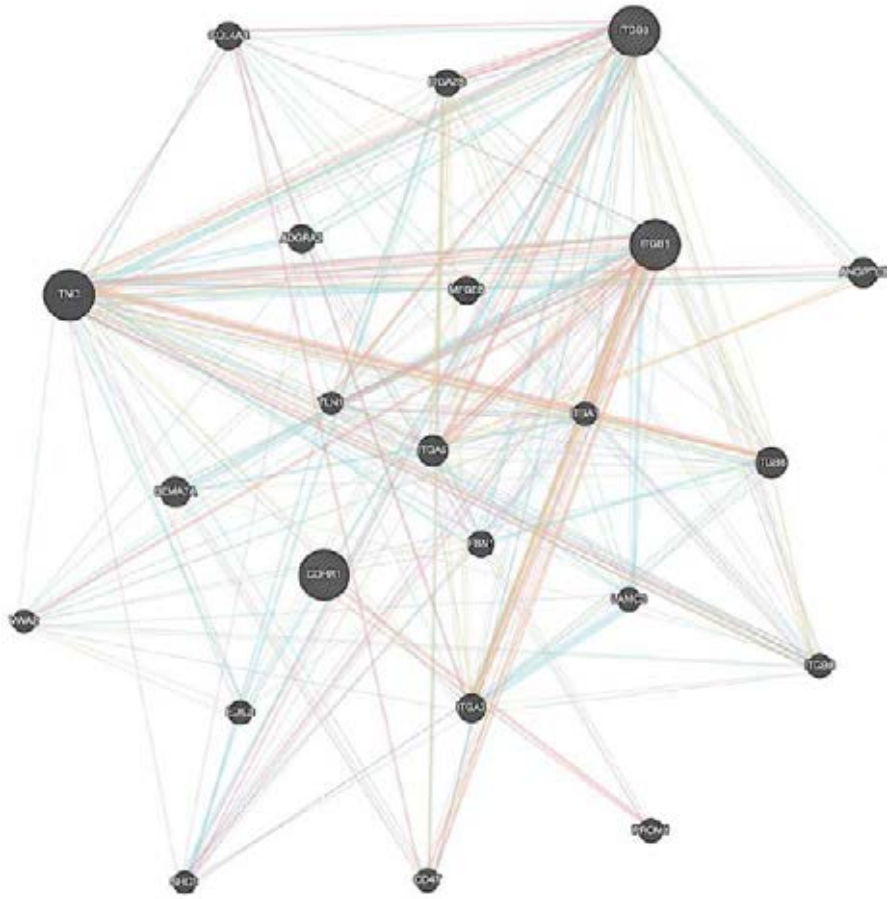


Рис. 68 Карта метаболического взаимодействия *CDHR1* с интегринами *ITGB1, ITGB3, ITGAV.* Патогенетическое обоснования применения рисутеганиба. Построено с помощью инструмента genemania.

Кадгерины (ген рецептора к кадгерину *CDHR1*) и интегрины (*ITGA3, ITGA2B, ITGA5*, *ITGB1, ITGB3, ITGAV*) – два наиболее изученных класса рецепторов адгезии, они имеют общие сигнальные молекулы. Механически управляемые перекрестные препятствия между интегринами и кадгеринами (механочувствительность) регулируют пространственное распределение этих рецепторов и их промежуточных продуктов передачи сигналов и сборку фибронектинового матрикса между клетками пигментного эпителия и фоторецепторами.

Кластерные интегрины связываются с мультибелковыми комплексами, в том числе с актиновым цитоскелетом. Адгезивные соединения на основе кадгерина, которые состоят из α-катенина, β-катенина и p120-катенина (также известного как CTNND1) в качестве основных молекулярных компонентов, играют аналогичную роль во взаимодействиях кадгерин-актин. На клеточном уровне участие как интегринов, так и кадгеринов стимулирует семейство родопсиновых ГТФаз (Rho GTPases) для адаптивного ремоделирования архитектуры актинового цитоскелета в ответ на слипание клеток между собой.

Кластерные интегрины и кадгерины регулируют передачу сигналов, а также транскрипционные события, которые контролируют фундаментальные биологические процессы, включая адгезию, пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз. На тканевом уровне скоординированное взаимодействие между интегринами и кадгеринами передает локальную информацию о том, как должна выглядеть группа клеток и насколько плотными должны быть контакты между ними. Поэтому при балансированной функции интегринов и кадгеринов сетчатка представляет собой четко дифференцированные и расположенные в пространстве монослои клеток, тогда как при нарушении функции хотя бы одного из компонентов, пространственное расположение клеток и их контакты могут быть нарушены, что приводит к серозной нейроретинальной отслойке, или КМО – кистоидному макулярному отеку.

Развитие различных техник, которые сейчас обычно используются для изучения физических и адгезивных сред клетки, позволило глубже изучить и понять механохимическое взаимодействие между интегринами и кадгеринами. Взаимодействие между местными контактами и плотными контактами контролирует поляризацию сил и направленную подвижность. Миграция клеток происходит посредством сложного набора механохимических сигнальных событий, которые включают точную пространственно-временную координацию плотных контактов между клетками, фокальных адгезий и внутриклеточного напряжения. Точный баланс между сцеплением с субстратом и межклеточной адгезией диктует коллективную миграцию клеток внутри ткани. Эта механическая связь между клетками также приводят к пропорциональному увеличению размера их плотных контактов.

Помимо интегринов и кадгеринов для создания и поддержания целостных контактов между клетками и слоями сетчатки необходима правильная транскрипция и функциональность следующих белков (рис.68): ***FBN1***, фибриллин-1 – гликопротеин внеклеточного матрикса, который служит структурным компонентом кальций-связывающих микрофибрилл, которые обеспечивают структурную поддержку эластичной и неэластичной соединительной ткани и эндотелия сосудов сетчатки и хориоидеи. ***LAMC3***, ламинин 3 из семейства гликопротеинов внеклеточного матрикса, который является основным неколлагеновым компонентом базальных мембран и вовлечен в клеточную адгезию, дифференцировку, миграцию, передачу сигналов, рост

нейронов и клеток сетчатки. Ламинины структурно состоят из 3-х неидентичных цепей: ламинина альфа, бета и гамма и образуют крестообразную структуру, состоящую из 3 коротких плеч, каждое из которых образовано отдельной цепью, и длинного плеча, состоящего из всех 3 цепей. ***COL4A3***, этот ген кодирует альфа-3 субъединицу коллагена IV типа, основной структурный компонент базальных мембран, представляет собой мультимерный белок, состоящий из 3 альфа-субъединиц. Эти субъединицы кодируются 6 различными генами, от альфа 1 до альфа 6, каждый из которых может образовывать структуру тройной спирали с двумя другими субъединицами с образованием коллагена IV типа. ***SEMA7A*** – ген семейства белков семафоринов, кодирует предшественник зрелого гликозилфосфатидилинозитола – белка, который заякоривает в мембране другие белки, участвует в процессах развития и дифференцировки нервных клеток и клеток сетчатки.

Каждый из перечисленных генов может стать потенциальной мишенью для разработки лекарств, нацеленных на снижение кистоидного макулярного отека при дистрофиях сетчатки с целью повышения остроты зрения и снятия остроты симптомов протекающего патологического процесса.

EYS-ассоциированная ретинопатия

По имеющимся в литературе данным (https://string-db.org/network/9606.ENSP00000424243) и на основании проведенных экспериментальных анализов известно, что белок EYS взаимодействует продуктами генов *ABCA4*, *C2orf71* и *DAG1* (на рис. 69 эти связи указаны фиолетовым), а также *CRB1*, проминин и хаоптин. Эти полученные данные дают новую информацию о том, каким образом может применяться лечение, направленное на регуляцию гена, входящего в интерактом гена EYS.

К примеру, может быть объяснено применение повышенных доз витамина А (в том числе модифицированных форм ретинола ацетата) при мутациях в гене *EYS*, так как это способствует компенсаторной активации зрительного цикла путем *ABCA4*-опосредованного транспорта.

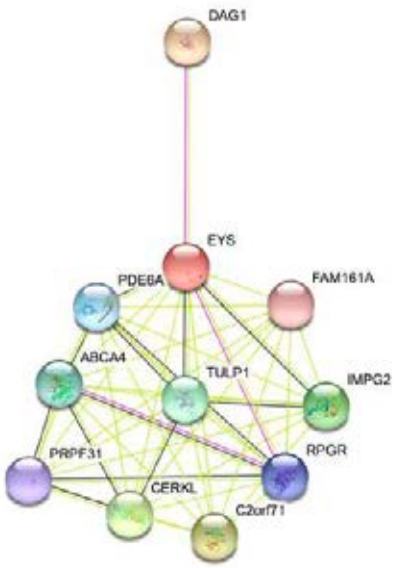


Рис 69. Схема функционального взаимодействия интерактома гена EYS. Фиолетовым указаны экспериментально подтвержденные взаимодействия.

Предполагаемые функциональные партнеры гена *EYS*: ***DAG1***: Комплекс дистрогликана участвует в ряде процессов, включая сборку ламинина и базальной мембраны, стабильность сарколеммы, выживание клеток, миелинизацию периферических нервов, структуру узлов, миграцию клеток и поляризацию эпителия. ***C2orf71*:** играет важную роль в развитии нормального зрения, подробные механизмы пока не изучены (1288 аминокислот). ***CERKL***: Церамид-киназоподобный белок; Сверхэкспрессия *CERKL* защищает клетки от апоптоза в условиях окислительного стресса. ***IMPG2***: хондроитинсульфат- и гиалуронан-связывающий протеогликан, связывает гепарин, участвующий в организации межфоторецепторного матрикса, участвовует в созревании и поддержании внешнего сегмента фоторецептора. ***TULP1***: тубулоподобный белок 1; необходим для нормального развития фоторецепторных синапсов. Требуется для нормальной функции фоторецепторов и для длительного выживания фоторецепторных клеток. Взаимодействует с белками цитоскелета. ***ABCA4*:** Ретинально-специфический АТФ-связывающий кассетный транспортер; в зрительном цикле, выступающем в роли направленной внутрь ретиноидной флипазы, ретиноидные субстраты, импортируемые ABCA4 с поверхности внеклеточной или внутридисковой мембраны на поверхность цитоплазматической мембраны, представляют собой полностью транс-ретинальдегид (ATR) и N-ретинилфосфатидил-этаноламин (NR-PE). ***PDE6A***: цГМФ-специфическая фосфодиэстераза Этот белок участвует в процессах передачи и усиления зрительного сигнала. ***RPGR***: Х-сцепленный регулятор ГТФазы; фактор, высвобождающий гуанин-нуклеотид. Регулирует формирование ресничек путем регулирования стрессовых нитей актина и сократительной способности клеток и участвует в организации микротрубочек и регуляции транспорта в первичных ресничках.

PRPF31: U4 / U6 малый ядерный рибонуклеопротеин PRP31; участвует в сплайсинге пре-мРНК. Требуется для сборки комплекса tri-snRNP U4 / U5 / U6, одного из строительных блоков сплайсосомы;

В связи с вышеизложенным для определения оптимальных подходов к сохранению функции фоторецепторов при мутации в гене *EYS* необходимо учитывать функциональное состояние клетки в синтезе перечисленных белков. Повышение активности генов белков, перечисленных выше, может влиять и частично компенсировать недостаток функции гена *EYS.*

Кроме этого, возможно перекрестное действие различных фармацевтических препаратов, влияющих на сигнальные каскады зрительного цикла – в том числе предсказание эффективности препаратов

***NR2E3* и *RHO* доминантные формы пигментного ретинита**

Поскольку экспрессия генов *NR2E3* и *RHO* в основном ограничена фоторецепторами, имеет потенциально высокие шансы быть эффективной терапия, не только нацеленная на точечное генное редактирование с помощью системы CRISPR-Cas, но и терапия антисмысловыми олигонуклеотидами, причем следует проводить ко-трансфекцию конструкций гена дикого типа и антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на специфические мутировавшие аллели пациента в клетки пигментного эпителия и фоторецепторов Общее снижение экспрессии *NR2E3* и *RHO* можно наблюдать для всех антисмысловых олигонуклеотидов как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Однако на уровне мРНК с помощью вестерн-блоттинга можно увидеть более детально различие в экспрессии разных антисмысловых олигонуклеотидов. Помимо того факта, что вестерн-блоттинг является полуколичественным методом определения, наблюдаемые различия в количестве мРНК / белок могут быть объяснены различной активностью антисмысловых олигонуклеотидов в ядре по сравнению с цитоплазмой.

Прошедшие проверку антисмысловые олигонуклеотиды подавляют экспрессию NR2E3 до 28–60% на уровне мРНК и на уровне 9–70% подавляют экспрессию белка. Важно отметить, что в контексте доминантно-отрицательной мутации генов *NR2E3* и *RHO* полный нокдаун мутантного аллеля, индуцированный антисмысловыми олигонуклеотидами, для улучшения клинической картины пациента не требуется. Были описаны улучшения морфологических характеристик клеток и общее улучшение фенотипа в результате умеренного снижения количества мутантного белка при сохранении белка дикого типа или изменения соотношения дикий/мутантный белок соответственно. Было показано, что нацеливание на однонуклеотидный полиморфизм в генах *NR2E3* или RHO вызывает подавление мРНК гена коллагена типа *COL6A2*, хотя преимущественно с участием мутантного аллеля (10% разница в соотношении мутантных и

диких аллелей). В целом это приводит к значительному улучшению тяжелого клеточного фенотипа в клетках пациентов.

Чтобы повысить аллель-специфичность антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на нивелирование мутаций в генах *NR2E3* или *RHO*, можно модифицировать как клеточную систему, так и последовательности антисмысловых олигонуклеотидов. В клетках, экспрессирующих NR2E3 и RHO, полученных от пациента, конкуренция за связывание антисмысловых олигонуклеотидов может приводить к более сильной аллель-специфичности антисмысловых олигонуклеотидов. В этом отношении иППСК были перепрограммированы из фибробластов конкретных пациентов с конкретной мутацией. Эти клетки будут далее дифференцироваться в плюрипотентные клетки, которые будут представлять соответствующую клеточную модель для дальнейшего развития методики лечения антисмысловыми олигонуклеотидами.

Помимо использования другой клеточной системы, можно сделать несколько модификаций антисмысловых олигонуклеотидов для получения более избирательного нокдауна мутантного аллеля. Первой потенциальной модификацией может быть сдвиг антисмысловых олигонуклеотидов на несколько нуклеотидов в ту или иную сторону. Были исследованы три вариации антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на мутацию, но несколько исследований показали, что даже изменение одной пары нуклеотидов может иметь существенное влияние на аллельную дискриминацию. Также уменьшение длины антисмысловых олигонуклеотидов может положительно повлиять на способность распознавания. Было показано, что длинная последовательность антисмысловых олигонуклеотидов может снижать аллель-специфичность. Укорочение антисмысловых олигонуклеотидов до 16 нуклеотидов может увеличить специфичность, с одной стороны, но с другой стороны, привести к увеличению возможных нецелевых эффектов. Также было высказано предположение, что различение одиночных нуклеотидов между аллелями РНК может быть улучшено путем введения определенных схем несовпадений между дуплексами РНК/антисмысловые олигонуклеотиды, поскольку присутствие неканонических пар оснований снижает термодинамическую стабильность дуплексов. В случае замены G>A было показано, что присутствие G-dT в дуплексе РНК дикого типа вместо A-dT не нарушает структуру дуплекса. Однако введение тандемных пуриновых несовпадений на 5'-конце разрыва ДНК сильно снижает термодинамическую стабильность. Это, в сочетании с третьим несоответствием в месте мутации, снижает эффективность расщепления РНК дикого типа.

Дальнейшие исследования необходимы для оценки различных модификаций антисмысловых олигонуклеотидов на соответствующей клеточной модели каждого конкретного пациента. Также необходима разработка релевантных диагностических и клинических

протоколов для сравнения результатов лечения путем генного редактирования с помощью системы CRISPR-Cas и с помощью сайленсинга одиночной нуклеотидной замены антисмысловыми олигонуклеотидами с доминантно негативным эффектом в качестве терапевтического подхода для доминантных видов дистрофий сетчатки.

5.8. Сравнительная характеристика остроты и полей зрения в группе детей и взрослых до и после лечения

Общая характеристика методов и критериев оценки результатов периметрии приведена в разделе 4.3.1. Те же инструменты были использованы для проверки различий в изменении полей зрения до и после лечения в группе детей и в группе взрослых пациентов, чтобы выяснить количественно, насколько анатомические и функциональные особенности сетчатки молодых пациентов (до 18 лет включительно) позволяют сохранять и улучшать периферическую чувствительность сетчатки к световым стимулам по сравнению с группой пациентов старшего возраста (табл.40).

Табл. 40. Полуколичественная характеристика остроты и полей зрения в группе детей и взрослых до и через 24 месяца после лечения.

	Дети (12,7±6,5 лет)			Взрослые (36,3±12,8 лет)		
	1	2	3	1	2	3
Острота зрения	↑↑↑		St.idem	↑↑	↓	↓↓
Поля зрения	↑↑↑		St.idem	↑↑	↓	↓↓

Для каждой из двух сравниваемых групп средние площади изоптер V4e ($p = 0,03$) и III4e ($p = 0,01$) существенно различались до лечения и через 24 месяца после начала курсов лечения. Средняя площадь изоптеры V4e у детей во время первого обследования составила $4946^{\circ 2}$ ($\pm 3106^{\circ 2}$), а через 24 месяца после начала курсов лечения составила соответственно $4724^{\circ 2}$ ($\pm 2805^{\circ 2}$). Средняя площадь изоптеры III4e во время первого исследования составила $2750^{\circ 2}$ ($\pm 1470^{\circ 2}$), а после курса лечения через 24 месяца $2515^{\circ 2}$ ($\pm 1055^{\circ 2}$).

Площади изоптер V4e и III4e различались в группе детей (143 пациента) между первым исследованием и через 24 месяца на $13^{\circ 2}$ ($\pm 37^{\circ 2}$), составляющее 6% (±15%) от начальной площади для изоптеры V4e, и на $6^{\circ 2}$ ($\pm 90^{\circ 2}$), составляющее 3% (±24%) для изоптеры III4e. Только площадь

изоптеры I4e незначительно уменьшилась (ANOVA p = 0,006) по сравнению с первым обследованием (p = 0,006). Средняя площадь изоптеры I4e во время первого исследования составила 528°^{2} (±340°^{2}) и 507°^{2} (±164°^{2}) через 24 месяца после курсов терапии. Разница составила 21°^{2} (±38°^{2}), что составляет 11% (±23%) от начальной площади изоптеры соответственно.

Площадь изоптер V4e и III4e в группе взрослых увеличилась у 2 пациентов (4 глаза) и уменьшилась у 78 (144 глаза) пациентов. Площадь изоптер I4e увеличилась у 1 пациента (31 глаз) и уменьшилась у 35 пациентов (70 глаз) между первым исследованием и через 24 месяца на 43°^{2} (±103°^{2}), составляющее 12% (±12%) от начальной площади для изоптеры V4e, и на 32°^{2} (±81°^{2}), составляющее 7% (±21%) для изоптеры III4e. Различия между измерениями были достоверными (p = 0,02). Была обнаружена корреляция между площадью всех изоптер и возрастом пациентов (R = -0,78), а также между площадью изоптеры I4e и остротой зрения (R = -0,5). Корреляции площади изоптеры со скоростью реакции не обнаружено. Полученные данные позволяют количественно определить (R = -0,78) эффективность терапии, если применять ее в молодом возрасте по сравнению с терапией в более зрелом возрасте.

Как показывают полученные результаты измерений полей зрения и ЭРГ до и после лечения, при начале таргетного лечения в возрасте пациента до 10 лет эффективность сохранения зрительных функций на 420% выше, чем если лечение проводится в возрасте старше 25 лет. Полученные данные отражены в Приложении №1 в таблицах №41 – 43. Это доказывают и субъективные ощущения пациентов и их родственников по данным теста VFQ-25. Полученные данные соотносятся с данными зарубежных исследований (Hauswirth, W.W. и соавт., 2019).

5.9. Общие данные сравнительной характеристики показателей в исследуемой группе

Был проведен общий анализ результатов визометрии, биомикроскопии, рефрактометрии, пневмотонометрии, офтальмоскопии с фоторегистрацией глазного дна обоих глаз при отсутствии затрудняющих факторов (помутнения оптических сред глаза), КЧСМ, теста Хью по результатам оценки цветового зрения и темновой адаптометрии. Визометрия вместе с оценкой контрастной чувствительности, а также рефрактометрия проводились во время каждого визита пациента: до лечения, непосредственно после курса лечения, через 1 мес., 2 мес., 6 мес. после лечения, перед повторным курсом лечения, а также на 7 мес. после первичного наблюдения, через 12 мес., 18 мес., и 24 мес. Для пациентов, находящихся на курсах лечения и наблюдения дольше указанных сроков, визометрия проводилась при каждом последующем приеме, который

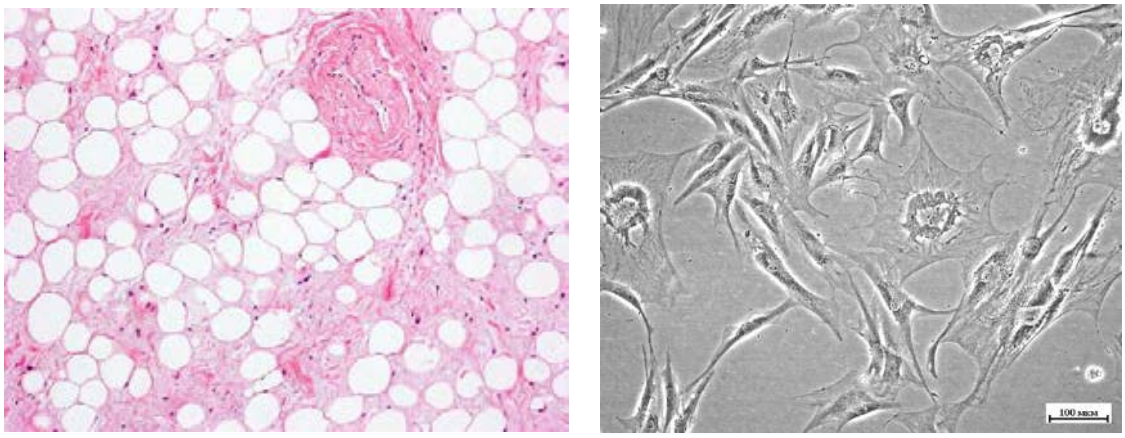
проводился каждые 4 – 6 мес. Длительность наблюдения пациентов составила до 7 лет (84 мес.). Особое внимание уделялось оценке точных количественных методов обследования: оптическая когерентная томография макулярной зоны и зоны диска зрительного нерва, периметрия, микропериметрия, электроретинография, аутофлуоресценция сетчатки, по показаниям флюоресцентная ангиография. Отдельно анализировались субъективные показатели, полученные на основе оценки пациентами исходного состояния и состояния зрения после курсов лечения: FLORA, VFQ, MLMT – тест. На основе совокупности полученных данных было проведено многопараметрическое сравнение для различных категорий, распределенных и стратифицированных по подгруппам пациентов для более точного статистического сравнения полученных результатов. Общие количественные данные по каждой подгруппе приведены в главе 4.

Анализ коморбидности проводили по каждой из нозологий. Наиболее часто встречающимися сопутствующими заболеваниями были аномалии рефракции и нарушение прозрачности оптических сред глаза. Среди аномалий рефракции наиболее частыми были миопия слабой степени и миопический астигматизм, а также катаракта.

Анализ осложнений проведенной терапии проводился по шкалам Клавьен-Диндо, а также по времени возникновения осложнения – ранние, отсроченные, поздние осложнения. Подробный анализ осложнений во всех трех исследуемых группах приводится в главе 7.

ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Суть применяемого лечения состояла в том, что у пациента производился забор собственных мезенхимальных стромальных клеток, проводилась их культивация по стандартному протоколу (см. главу 2.2.3. Методика лечения стволовыми клетками) с дальнейшим введением их в субтеноново пространство (рис. 70) 1 раз в 6 месяцев на протяжении от 2-х до 7 лет, Данный тип лечения является одним из вариантов выбора для тех пациентов, у кого молекулярную причину заболевания установить не удалось (19,96% в исследуемой группе), при очень низких исходных зрительных функциях, а также при установлении причины развития заболевания, но при отсутствии доступности разработанного патогенетического лечения.



А Б

Рис. 70. А. Гистологическая картина аспирата жировой ткани после пункции (окраска гематоксилин-эозином). **Б**. Морфофункциональная характеристика мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека до начала их культивации. Снимки гистологических срезов использованы с разрешения Еремина И.И., Пулина А.А.

Пациенты, вошедшие в группу лечения мезенхимальными стромальными стволовыми клетками (2 группа), имели подтвержденные диагнозы: пигментная абиотрофия сетчатки (тапеторетинальная абиотрофия), атрофия зрительного нерва, палочко-колбочковая дистрофия сетчатки, смешанная дистрофия сетчатки, ПВХРД (периферическая витреохориоретинальная дистрофия), амблиопия средней/высокой степени, ахроматопсия, хориоидеремия, ангиоидные полосы сетчатки, серпингинозная хориопатия, белоточечное глазное дно (fundus albipunctatus).

6.1.Общая характеристика полученных результатов

6.1.1. Оценка функционального состояния сетчатки

По результатам четырех проведенных курсов терапии мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани через 24 месяца после первичного визита была проведена проверка показателей **темновой адаптометрии** у 142 пациентов с дистрофиями сетчатки (274 глаза). Подробное описание кратности проведенных процедур лечения мезенхимальными стромальными стволовыми клетками из жировой ткани представлено в табл. 44 (Приложение №1). Результаты составили следующую картину (в скобках указаны нормальные значения): log-threshold-cone = 4.22±0.14 (3.69±0.12) p<0,03, log-threshold-rod = 2.21±0.18 (1.52±0.12) p=0,04, exponential-constant cone = 1.25±0.17 (1.56±0.14) p=0,01, exponential-constant rod = 0.15±0.02 (0.17±0.01) p=0,05, % change/min cone = 72±5 (76±3) p=0,1, % change/min rod = 13±2 (15±1) p=0,01. Как мы видим, двухлетняя терапия мезенхимальными стволовыми клетками сохраняет порог чувствительности как палочек, так и колбочек, так как в среднем он лишь на 0,02 и на 0,03 соответственно ниже, чем в норме. Экспоненциальная константа изменения чувствительности более выраженно изменялась в колбочковых фоторецепторах, в среднем на 0.06, тогда как показатели палочковых фоторецепторов оставались практически без изменений (0,01). Показатели процента изменения чувствительности в минуту остались практически без изменений: 1% у колбочковых и 2% у палочковых фоторецепторов. Это отражает то, что молекулярная скорость темновой фазы процесса фототрансдукции практически интактна при генетически обусловленных заболеваниях сетчатки и не подвержена влиянию в зависимости от типа проводимой терапии.

Периметрия, а также **микропериметрия** проводились во время каждого визита пациента: до лечения, непосредственно после курса лечения, через 1 мес., 6 мес. после лечения, перед повторным курсом лечения (6 мес.), а также через 12 мес., 18 мес., и 24 мес. по такой же методологии, как описано в разделе 4.3.1.

Во второй группе пациентов, прошедших курсы лечения мезенхимальными стволовыми клетками из 142 пациентов (274 глаза) у 29 пациентов (58 глаз) были умеренные ограничения полей зрения, у 71 пациента (132 глаза) были кольцевые скотомы и 42 пациентов (84 глаза) наблюдались выраженные концентрические сужения полей зрения. Средний возраст был 36 лет (± 8,5 лет) в группе с легким сужением, 32 года (± 9,5 лет) в группе с кольцевыми скотомами и 43 года (± 7 лет) в группе с выраженным концентрическим сужением.

Для каждой и подгрупп пациентов средние площади изоптер V4e (p = 0,03), и III4e (p = 0,04) незначительно различались между результатом до лечения и через 24 месяца после начала курсов лечения. Средняя площадь изоптеры V4e во время первого обследования составила 4300°^{2} (1995 – 6420°^{2}) и 3860° ^{2} (1200 – 5990°^{2}) через 24 месяца после начала курсов лечения. Средняя площадь изоптеры III4e во время первого исследования составила 900°^{2} (410 –1300°^{2}) и 725°^{2} (675 – 775°^{2}) после курсов лечения. Площади изоптер V4e и III4e различались между первым исследованием и через 24 месяца на 32°^{2} (±126°^{2}), составляющее 4% (±11%) от начальной площади для изоптеры V4e, и на 2°^{2} (±190°^{2}), составляющее 3% (±21%) для изоптеры III4e (ANOVA p = 0,01) по сравнению с первым обследованием (p = 0,03). Средняя площадь изоптеры I4e во время первого исследования составила 350°^{2} (0 – 890°^{2}) и через 24 месяца – 297°^{2} (0 – 853°^{2}). Разница составила 55°^{2}, что составляет 9% от начальной площади изоптеры соответственно.

Всего было проанализировано 92 пациента (184 глаза) из этой группы пациентов. Средняя чувствительность сетчатки в момент первоначального осмотра до лечения составила 3,5 дБ (варьировала от 0,1 до 16,7 дБ), центральная чувствительность в макуле равнялась 7,4 дБ (варьировала от 0,8 до 11,0 дБ), парацентральная чувствительность макулы составила 1,3 дБ (варьировала от 0,9 до 8,5 дБ), чувствительность края скотомы составила 5,1 дБ (варьировала от 1,2 до 13,2 дБ).

Через 24 месяца после начала курса лечения средняя чувствительность сетчатки составила 3,3 дБ (варьировала от 0,1 до 15,5 дБ), центральная чувствительность в макуле была равна 7,6 дБ (варьировала от 1,2 до 15,7 дБ), парацентральная чувствительность макулы составила 1,3 дБ (варьировала от 0,9 до 12,4 дБ), чувствительность края скотомы составила 5,0 дБ (варьировала от 1,1 до 12,2 дБ).

Также для оценки функционального состояния сетчатки во второй группе пациентов, получавших курсы лечения мезенхимальными стволовыми клетками в динамике при наследственных дистрофиях сетчатки, применялся **количественный метод анализа ЭРГ (электроретинографии).** Для оценки локальной функции сетчатки у 142 пациента (274 глаза) с пигментным ретинитом с остротой зрения лучше видящего глаза 0,1 или выше были получены мультифокальная, ганцфельд ЭРГ и ЭРГ на вспышку (30 Гц), а также пороги чувствительности макулярной зоны сетчатки (по данным измерения с помощью полуавтоматической кинетической периметрии).

У 45 (31,6%) пациентов латентность по данным мультифокальной ЭРГ имела нормальные значения в пределах 5 градусов от центра. В областях за пределами центральных 7,5 градусов латентность была увеличена в среднем на 45%. Латентность при измерении ганцфельд ЭРГ и ЭРГ на вспышку была увеличена, что отражало задержку ответа палочковых фоторецепторов.

Лишь у 12 (8,4%) пациентов ганцфельд ЭРГ и ЭРГ на вспышку были с нормальными значениями латентности. Амплитуда пиков ответа была снижена. Подробные количественные данные результатов ЭРГ приведены в разделе 5.7.1 в табл. 37. Поскольку при ганцфельд ЭРГ преобладают ответы клеток с периферии сетчатки (палочковые фоторецепторы), полученные данные подтверждают известные факты о патофизиологических процессах при палочковых и смешанных дистрофиях сетчатки. Что касается амплитуды, только 7 пациентов (4,9%) показали ответы с амплитудами, близкими к нормальным при мультифокальной ЭРГ и 9 пациентов (6,3%) – при ганцфельд ЭРГ. Снижение амплитуды сигнала – предиктор прогрессирования патологического процесса дистрофии сетчатки.

6.1.2. Оценка анатомической структуры сетчатки

Репрезентативные изображения семи фенотипов оптической когерентной томографии в центральной области при дистрофиях сетчатки по нарастанию тяжести повреждения во второй группе пациентов, прошедших курсы лечения мезенхимальными стволовыми клетками в динамике проводились по той же методологии оценки и сравнения, как описано в разделе 4.3.2. (I) эллипсоид внутреннего сегмента непрерывен, (II) целостность эллипсоида внутреннего сегмента нарушена, (III) эллипсоид внутреннего сегмента отсутствует, (IV) наличие гипорефлективной зоны в субфовеальной зоне, (V) атрофия наружного нейроэпителия сетчатки, включая потерю РПЭ, (VI) выраженная атрофия наружного нейроэпителия сетчатки, включая потерю РПЭ и наличие друз, (VII) полная потеря наружного нейроэпителия с выраженным складчатым нарушением профиля сетчатки и включениями гиперрефлективного материала.

Применение описанной шкалы позволило распределить пациентов второй группы количественно по каждой из категорий, I – 7 пациентов (13 глаз) II – 9 пациентов (18 глаз) III – 56 пациентов (104 глаз) IV – 36 пациентов (71 глаз) V – 21 пациент (42 глаза) VI – 11 пациентов (22 глаза) VII – 2 пациента (4 глаза). Полученные результаты позволяют судить о том, что наибольшее количество пациентов было в 3-й (39,4%) и 4-й (25,3%) категориях. То есть относительно пациентов первой группы распределение по результатам ОКТ дает более мягкую клиническую картину в целом.

Во время применения патогенетически направленного лечения наиболее выраженный терапевтический эффект следует ожидать в группе пациентов с фенотипами ОКТ 1 – 3 категорий. Во время проведения курса терапии в группе пациентов, прошедших курсы лечения

мезенхимальными стволовыми клетками в динамике за 24 месяца наблюдения улучшение фенотипа профиля сетчатки на ОКТ было зафиксировано у 15 пациентов (29 глаз) из IV категории до III категории и у 19 пациентов (38 глаз) из III категории во II категорию. Однако одновременно с этим наблюдалось ухудшение клинической картины и усугубление фенотипа повреждения сетчатки по данным ОКТ у 5 пациентов (9 глаз) от II категории до III, у 5 пациентов (10 глаз) от III категории до IV и у 2-х пациентов (3 глаза) от IV до V категории. При сравнении аналогичных цифр с группой стандартного лечения с применением поправочного коэффициента можно прийти к выводу о том, что состояние сетчатки по данным ОКТ за 24 месяца наблюдения по результатам терапии более стабильно во второй группе пациентов.

Для оценки изменений данных аутофлуоресценции сетчатки (FAF) применялась адаптированная градуированная шкала, описанная Hirji N. и соавт., 2017. (A) Нормальный внешний вид FAF, (B) Сниженный сигнал FAF в центре с хорошо видимой границей, (C) Центральное усиление сигнала аутофлуоресценции на FAF, (D) Изменения равномерности сигнала в зоне сосудистых аркад (в виде «булыжной мостовой», «пчелиных сот», крапчатости, точек и других паттернов), (E) Диффузные изменения, затрагивающие центральную и периферическую зоны сетчатки (с выходом за зону сосудистых аркад).

Для 92-х пациентов из группы лечения стволовыми клетками, которым было проведено исследование аутофлуоресценции сетчатки, распределение по градуированной шкале категорий составило следующую картину: (A) 17 пациент (34 глаза), (B) 41 пациентов (82 глаз), (C) 12 пациентов (24 глаза), (D) 15 пациентов (30 глаз), (E) 7 пациентов (14 глаз). Полученные данные позволяют судить о преобладании фенотипа аутофлуоресценции со сниженным сигналом и хорошо видимой границей (B), с центральной и парацентральной дифференцирующейся патологией в виде крапчатости, неравномерности, изменения рисунка в виде пчелиных сот или булыжной мостовой. Примечательно, что за 24 месяца наблюдений в ходе проводимых курсов лечения стволовыми клетками результаты измерений аутофлуоресценции давали четкое отслеживание динамики наблюдаемой клинической картины, так как возможно было точно измерить размер очага, очерченного хорошо видимой границей. Площадь очага имела тенденцию к увеличению за период наблюдения.

6.1.3. Субъективные результаты лечения по оценке пациентов

Оценка качества жизни пациентов проводилась по двум шкалам – FLORA тесту и VFQ-25 опроснику по методике, описанной в разделе «Материалы и методы», а также в главе 4.3.3. В

разделе 5.7.3 на рис. 63 указаны результаты изменения качества жизни до и после лечения в исследуемых группах пациентов. Мы наблюдаем в группе №2 лечения мезенхимальными стволовыми клетками незначительное ухудшение качества зрения за 24 месяца после начала курсов терапии (рис. 63Б) и как следствие некоторое снижение показателей субъективной оценки качества жизни.

Оценка функциональной сохранности зрения в случае тяжелой степени слабовидения (FLORA) в группе №2 пациентов, получавших лечение мезенхимальными стволовыми клетками, включала раздел самоотчета, список функциональных зрительных задач для наблюдения за работой и краткое изложение случая из жизни. Результаты, полученные от пациентов из второй группы, с максимально корригируемой остротой зрения лучше видящего глаза менее 0,05 были проанализированы, чтобы определить, подходят ли вопросы интервью и функциональные зрительные задачи для этой группы пациентов со сверхслабым зрением и страдает ли оценка результатов теста от влияния крайних пограничных значений. 12 пациентов с тяжелой далеко зашедшей стадией пигментного ретинита были включены в анализ ответов после опросника FLORA. Были заданы все 14 вопросов интервью. Все 35 задач были выбраны для оценки по крайней мере один раз, при этом в среднем оценивались по каждому элементу теста. Два независимых оценщика теста использовали все четыре варианта оценки теста и пациенты их 2-й подгруппы оказались распределены следующим образом: терминальный (26%), сложный (31%), умеренный (36%) и легкий (7%). MLMT тест был релевантен к применению у 13 пациентов из группы пациентов, получавших лечение мезенхимальными стволовыми клетками. Сравнительные результаты его применения освещены на рис. 67

6.1.4. Системные эффекты лечения стволовыми клетками

Побочные и системные побочные эффекты после лечения стволовыми клетками приведены в разделе 7.4. Однако положительные системные эффекты и коэффициент корреляции между FLORA тестом, опросником VFQ-25, средне-взвешенной децимальной остротой зрения, результатами периметрии и микропериметрии в группе лечения стволовыми клетками (№2) относительно группы стандартного лечения (№3) представлен на рис. 71. Как мы видим из рисунка, красным представлены методы обследования, необходимые для оценки центральной области сетчатки, синим – методы обследования периферической части сетчатки. Также из рисунка мы видим ожидаемо высокий коэффициент корреляции результатов методов диагностики и результатов молекулярно-генетического теста (средний столбец со списком генов) в случае центральных (красный) и периферических (синий) дистрофий сетчатки. В самом низу указан коэффициент корреляции стандартного лечения. Усредненный коэффициент корреляции

между FLORA тестом, опросником VFQ-25 и остротой зрения подтверждает предположения о результатах лечения.

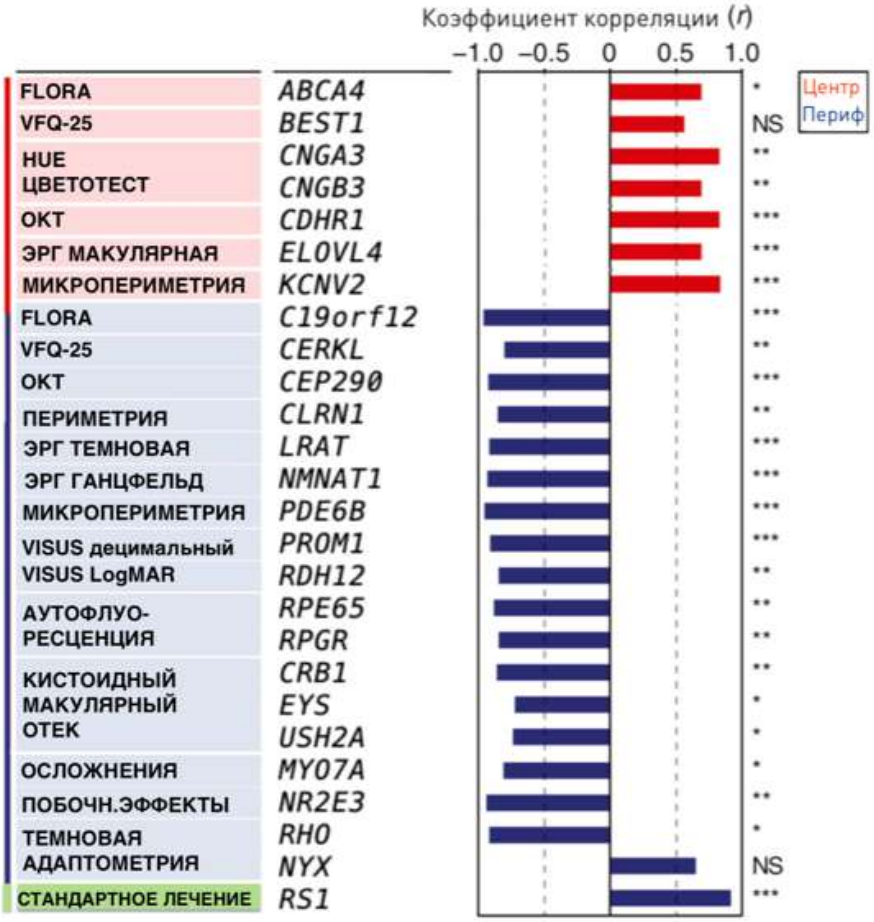


Рис. 71. Усредненный коэффициент корреляции между FLORA тестом, опросником VFQ-25, средне-взвешенной децимальной остротой зрения, результатами периметрии и микропериметрии в исследуемых группах относительно стандартного лечения.

Мы наблюдаем, что коэффициент корреляции FLORA теста, опросника качества жизни VFQ-25, средне-взвешенной децимальной остроты зрения, результатов периметрии и микропериметрии в исследуемых группах №1 и №2 (рис. 71) имеют положительную корреляцию относительно стандартного лечения.

ГЛАВА 7. ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ И ОСЛОЖНЕНИЯ ЛЕЧЕНИЯ

7.1. Применяемые шкалы и градации побочных эффектов

Методология оценки побочных эффектов была применена на основе рекомендаций Н.В. Ворониной и А.А.Упницкого. Использовались три основных вида фиксации и анализа неблагоприятных побочных эффектов (НПЭ): 1) активный мониторинг параметров в условиях дневного стационара и во время офтальмологических обследований, 2) учет всех медицинских записей о пациенте и наиболее формализованный 3) когортное исследование.

Применяли стандартную классификацию неблагоприятных побочных эффектов по четырем типам в зависимости от механизмов возникновения, тяжести течения и прогноза, а также рассчитывали частоты их встречаемости. Итак, по количеству побочных эффектов совокупная их встречаемость в зависимости от типа была следующей: тип А: токсичность, связанная с передозировкой 0 пациентов (0%); вторичные НПЭ 41 пациент (4,8%). Тип В: лекарственная непереносимость зарегистрирована у 12 пациентов (1,8%), идиосинкразия у 1 пациента (0,1%); реакции гиперчувствительности (иммунологические) у 52 пациентов (7,8%), из них слабой степени у 32 пациентов (4,8%), средней степени у 18 пациентов (2,7%), сильной степени у 2 пациентов (0,3%), псевдоаллергические реакции (неиммунологические) у 5 пациентов (0,7%). Тип С: лекарственная зависимость 0, толерантность 0; синдром отмены 0; кумулятивные эффекты зафиксированы у 2 пациентов (0,3%), Тип D – отсроченные эффекты, которые отслеживались на основании отчетов, зафиксированных от пациентов: канцерогенные, мутагенные, тератогенные эффекты – 0 (0%).

7.2. Классификация осложнений терапии

Наиболее характерными интраоперационными, ранними постоперационными и отсроченными осложнениями лечения во всех трех группах с применением операционного вмешательства были признаки отклонения от нормы переднего и заднего отрезка глаза. Для оценки степени осложнения применялась балльная шкала Клавьен-Диндо:

- Степень 1 – любое отклонение от нормального постоперационного течения
- Степень 2 – нормальное течение изменено
- Степень 3 – осложнения, которые требуют вмешательств разной степени
- Степень 4 – осложнения, угрожающие жизни пациента

Характеристика самих осложнений приведена в разделе 7.3 – местные и 7.4 – системные побочные эффекты.

7.3. Местные осложнения и побочные эффекты

К местным интраоперационным и ранним постоперационным осложнениям и побочным эффектам относили следующие проявления и события. Данные приведены для 48 пациентов из 1 группы, прошедших хирургическое таргетное лечение.

1. Конъюнктивальная гиперемия – 2 пациента (4,1%)
2. Конъюнктивальный хемоз – 2 пациента (4,1%)
3. Витреальный тромбоз – 2 пациента (4,1%)
4. Предретинальное (витреальное) кровоизлияние – 1 пациент (2,0%)
5. Начинающаяся задняя субкапсулярная катаракта – 5 пациентов (10,4%)
6. Пигментация в месте инъекции – 2 пациента (4,1%)
7. Изменение пигментации вне инъецируемой области – 3 пациента (6,2%)
8. Отслойка сетчатки – 1 пациент (2,0%)
9. Изменение степени миопии, астигматизма, гиперметропии (аномалий рефракции) за период наблюдения – 1 пациент (2,0%)
10. Инфекционные и локальные аутоиммунные осложнения – 2 пациента (4,1%)

Пациенты из 2-й и 3-й групп больше были подвержены системным осложнениям и побочным эффектам, рассмотренным в разделе 7.4. (3 группа – принимавшая стандартное лечение) при отсутствии операционного вмешательства и локальным послеинъекционным аллергическим реакциям (2 группа - лечения мезенхимальными стволовыми клетками). У одного пациента (0,1%) из всех групп через 2 месяца после проведения очередного курса инъекций мезенхимальными стволовыми клетками стало затуманиваться зрение, по результатам диагностики был поставлен диагноз неврит зрительного нерва правого глаза. Вероятность причинно-следственного характера данного осложнения после проведенного курса клеточной терапии составляет 32% (по расчетам на основе калькулятора Cleveland clinic). Было назначено дополнительное лечение, через 1 мес. острота зрения вернулась к уровню до начала лечения

стволовыми клетками. В дальнейшем у данного пациента не было зафиксировано отсроченных осложнений терапии за период наблюдения 36 месяцев.

7.4. Системные осложнения и побочные эффекты

К системным послеинъекционным и ранним постоперационным осложнениям и побочным эффектам относили следующие проявления и события:

1. Гиперемия кожи век – у 31 пациента (3,6%)
2. Системная кожная гиперемия – у 5 пациентов (0,6%)
3. Транзиторная системная гипертермия – у 12 пациентов (1,4%)
4. Рефрактерный отсроченный субфебрилитет – у 4 пациентов (0,5%)
5. Ухудшения психического состояния – у 2 пациентов (0,2%)
6. Сосудистые нарушения, системный тромбоз – у 8 пациентов (0,9%)
7. Ревматические и суставные отсроченные нежелательные явления – у 9 пациентов (1,0%)
8. Системные инфекционные и аутоиммунные осложнения – у 12 пациентов (1,4%)

Представлены совокупные данные для всех трех исследуемых групп. Для снижения влияния системных осложнений на долгосрочные результаты лечения были применены соответствующие профилактические и лечебные меры в каждом конкретном случае у пациентов.

7.5. Коморбидность моногенных заболеваний сетчатки

Особое внимание в изучении коморбидности отводилось инфекционным и аутоиммунным (неинфекционным) осложнениям лечения, а также изменения в степени аномалий рефракции до и после лечения, как наиболее частые и наиболее значимые события. Как мы видим из рис. 72 во всех трех исследуемых группах уровень инфекционных и аутоиммунных (неинфекционных) осложнений лечения был на уровне среднестатистических цифр при такого рода вмешательствах и не было статистически значимого различия между каждой из трех групп. Имелась устойчивая тенденция к более редкой встречаемости витреального кровяного сгустка, предретинального витреального кровоизлияния, изменению пигментации вне инъецируемой

области, а также конъюнктивальной гиперемии в группе пациентов, получавших таргетное лечение, относительно группы стандартного лечения №3: $p<0,05$ (рис. 72).

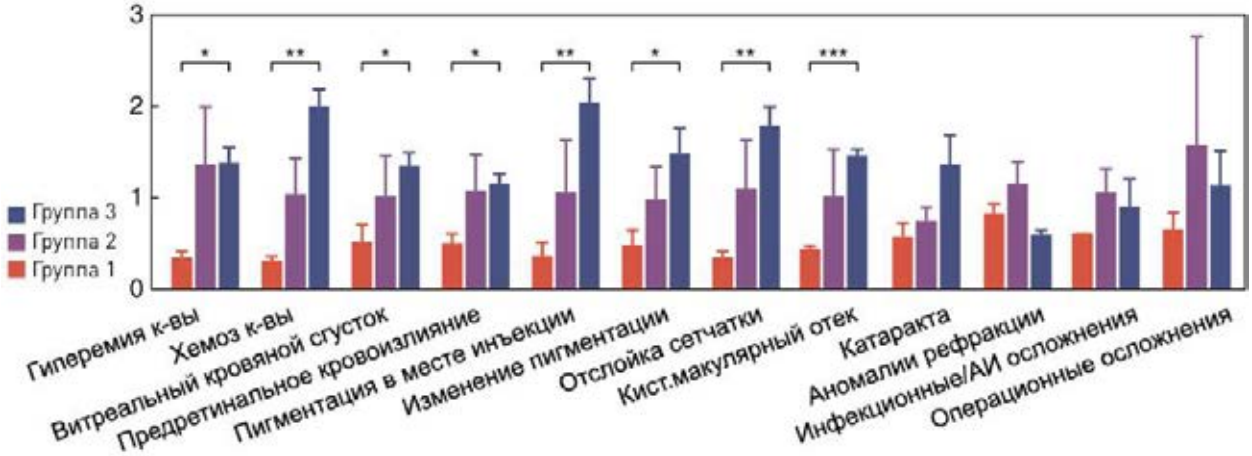


Рис.72. Побочные эффекты в результате лечения в группе №1, №2 и №3. Анализ коморбидности с аномалиями рефракции, инфекционными и аутоиммунными (АИ) осложнениями, а также частоты и степени начинающейся задней субкапсулярной катаракты показал отсутствие различий во всех трех исследуемых группах. *$p<0,05$, **$p<0,005$, ***$p<0,005$.

7.6. Методы управления рисками и осложнениями лечения

Реагирование на реализованные различные категории рисков зависело от их характера:

- диагностические (риски некорректной диагностики, дефекты информационного взаимодействия)
- лечебные (риски хирургического лечения, риски фармакотерапии, риски взаимодействия врачей и преемственности оказания медицинской помощи, риски развития осложнений и нежелательных лекарственных реакций)
- реабилитационные риски (дефекты реабилитации);
- риски вспомогательных процессов - финансовые; снабжения материальными ресурсами (отсутствие необходимых медикаментов, отключение электроэнергии, воды); уборки учреждения (некачественная уборка, возникновение внутрибольничных инфекций)

Управление рисками проводилось путем системы мер по противодействию рискам: человекоориентированный и системный (организационный). Человекоориентированный подход был стандартным и минимизировал риски, связанные с некомпетентностью или невнимательностью персонала. Организационный подход был нацелен на предотвращение ошибок и/или компенсации их последствий. Для этого проводили регистрацию инцидентов и

регистрацию клинических происшествий, после чего проводили анализ причин их возникновения, а также построения дерева решения инцидентов. Для системы управления рисками использовали также следующие методы: анонимный сбор информации об инцидентах; ретроспективный анализ медицинской документации; проведение опросов (интервьюирование) медицинского персонала и пациентов; непосредственное наблюдение за процессом оказания медицинской помощи; отчётность сотрудников об ошибках и неблагоприятных событиях; анализ жалоб; компьютерный мониторинг электронной базы медицинских данных на наличие неточностей и несовпадений записей о пациентах, анализ первичной медицинской документации.

Четкое следование протоколам клинических исследований для диагностики и лечения пациентов, а также проверка введенной медицинской информации в базу данных независимым оценщиком являлось самой действенной мерой в управлении рисками в данном исследовании. Совокупная шкала реализованных рисков составила 5% для лечебных рисков и 7% для диагностических рисков, что лежит в пределах допустимых значений при проведении обсервационных и интервенционных генотерапевтических офтальмологических клинических исследований.

Подходы к корректировке терапии. Проводилась оценка тяжести и длительности побочных эффектов лечения в группе №1, №2 и №3 (рис. 72). В группе №1 таргетного лечения отслойка сетчатки и отсроченная ее пигментация в месте инъекции были достоверно ниже, чем в группе №2 и №3 ($p<0,005$), так же как и конъюнктивальный хемоз встречался значительно реже.

Одной из патогенетических особенностей протекания моногенных дистрофий сетчатки является наличие рецидивирующего кистоидного макулярного отека (КМО). Это является одной из причин, почему применение таргетного патогенетического лечения (группа №1) кардинально снижает процент КМО в исследуемой группе №1 по сравнению с контрольной группой №3 (рис. 72).

На рис.73 приведено относительное снижение высоты кистоидного макулярного отека до (в момент первоначального обследования) и после лечения (через 12 мес.) в исследуемых группах пациентов с применяемым патогенетически направленным подходом к лечению по сравнению с группой сравнения №3. Как мы видим, в группе периферических дистрофий сетчатки при применении таргетного лечения процент снижения рецидивов и выраженности КМО значительно выше, чем в контрольной группе (*CEP290, CRB1, EYS, USH2A, MYO7A, NR2E3, RHO*). В группе центральных дистрофий только у пациентов с мутациями в гене *CDHR1* и *C3* наблюдалось выраженное снижение КМО при применении таргетного лечения. У пациентов с *ABCA4, BEST1, CNGA3, CNGB3* – ассоциированной центральной дистрофией сетчатки

статистически значимых отличий не наблюдалось в связи с редкой встречаемостью КМО в этой группе по причине особенностей патофизиологического процесса при данных дистрофиях.

Сравнение КМО в группе №2 и группе №3 затруднено в связи с разнородностью выборки по патофизиологии протекания дистрофий сетчатки и не дало статистически значимых отличий.

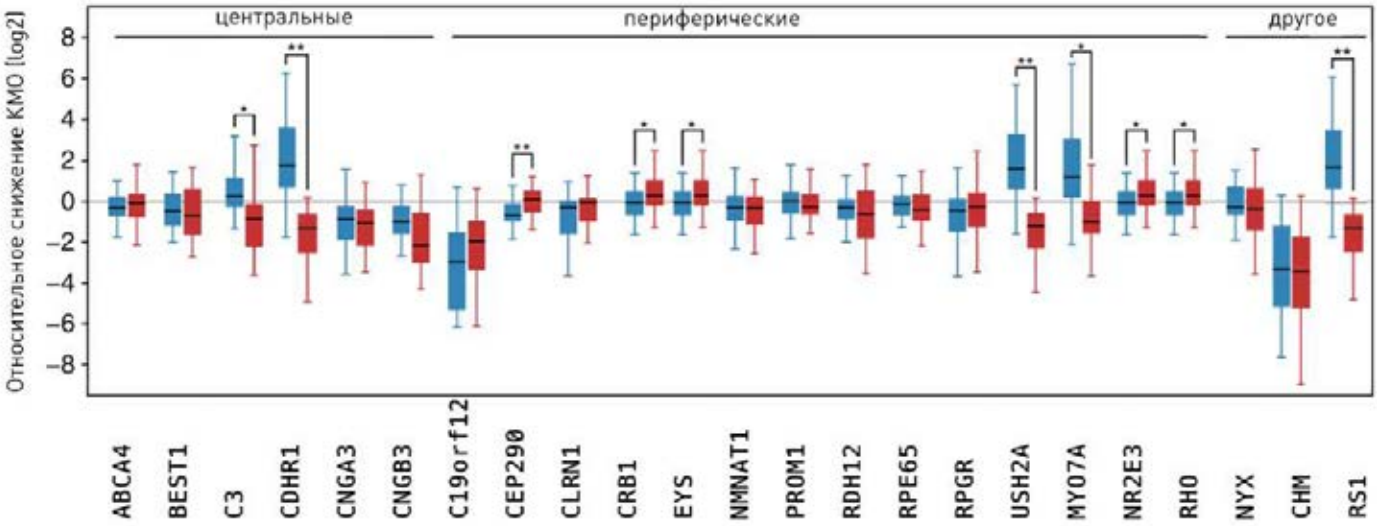


Рис.73. Относительное снижение высоты кистоидного макулярного отека до (в момент первоначального обследования) и после лечения (через 12 мес.) в исследуемых группах пациентов с применяемым таргетным подходом к лечению по сравнению с группой сравнения №3. * $p<0,05$ ** $p<0,005$.

ГЛАВА 8. ПРИМЕНЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

Подготовку к применению индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иППСК, iPSC) проводили по протоколу NCT02162953 и Calado 2018 путем однократной биопсии кусочка кожи и забора 5 мл цельной венозной крови

8.1. Характеристика культивируемых иППСК

Характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иППСК, iPSC) имеет несколько важных параметров.

8.1.1. иППСК пациента с мутацией в гене *NR2E3*

У одного пациента с доминантной формой пигментного ретинита с подтвержденной мутацией в гене *NR2E3* была произведена биопсия кусочка кожи для последующей культивации индуцированных стволовых клеток (iPSC см. главу 1.6.1. iPSC и 2.3. Методы подготовки индуцированных стволовых клеток) с конкретной генетической поломкой пациента.

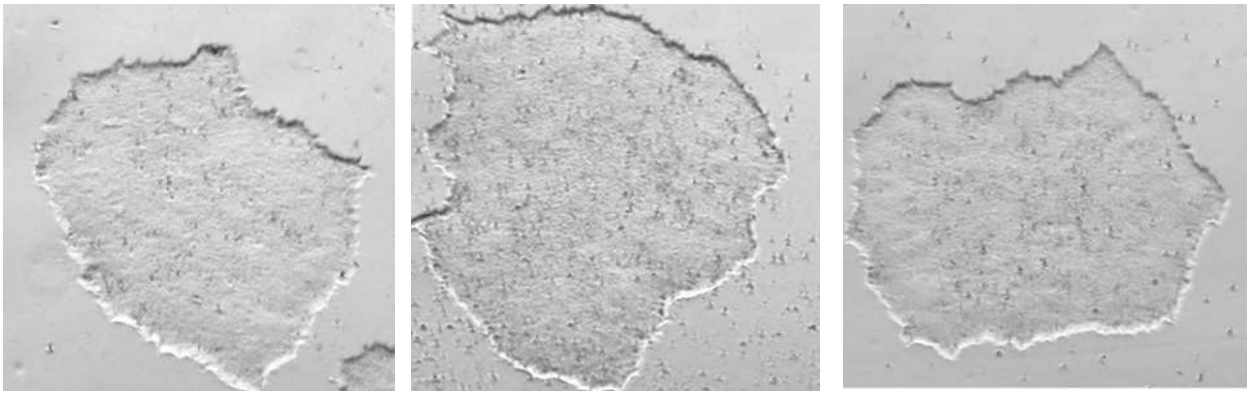
Восстановление уровня транскрипции полноразмерного белка NR2E3 после CRISPR/Cas9 редактирования в иППСК, полученных от пациента с мутацией в гене *NR2E3*.

NR2E3 представляет собой фактор ядерной транскрипции, который необходим для генезиса палочковых фоторецепторных клеток; таким образом, чтобы подтвердить, что геномная коррекция на основе CRISPR восстанавливает экспрессию транскрипта NR2E3, ИПСК были дифференцированы в клетки сетчатки. иППСК, полученные от пациента 1, который является гомозиготным по мутации сайта сплайсинга c.119-2A>C, имели наиболее явный молекулярный фенотип, поэтому они были выбраны для транскрипционного анализа. Как показано на рис. 74, через 35 – 40 дней после дифференцировки трехмерные везикулы, синтезирующиеся в контрольных здоровых клетках и у пациента после CRISPR-Cas9 редактирования морфологически и функционально идентичны (Рис. 74A и Рис. 74B).

Чтобы оценить нормальную кинетику экспрессии белка NR2E3, контрольные клетки сетчатки, полученные из иППСК оценивали через 42–50 дней после начала дифференцировки. Экспрессия белка NR2E3 впервые обнаруживается примерно через 70 дней дифференцировки и

сильно выражена в сроки 90 – 140 дней. После 63 дней дифференцировки транскрипт NR2E3 дикого типа обнаруживался в клетках-предшественниках сетчатки, скорректированных с помощью CRISPR/Cas9 (Рис. 74В), в отличие от не редактированных клеток-предшественников сетчатки, полученных из иППСК (рис 74.Б). К 100-му дню устойчивую экспрессию транскрипта NR2E3 дикого типа можно было обнаружить в клетках редактированной CRISPR/Cas9 сетчатки.

Так же к 100-му дню обнаруживался как в редактированных, так и нередактированных клетках второй более крупный транскрипт NR2E3. После очистки в геле и секвенирования было обнаружено, что второй транскрипт фактически отличается всего на 32 п.н. Более крупный транскрипт включал 143 п.н. интрона 1, за которым следует экзон 2, а меньший - 111 п.н. интрона 1, за которым следует экзон 2. В обоих случаях включение этой интронной последовательности приводило к сдвигу рамки считывания и созданию преждевременного стоп-кодона всего на 47 п.н. ранее канонической границы экзона 1. Проведенным in vitro анализом показано, что даже моноаллельная геномная коррекция варианта c.119-2A>C в иППСК, полученных от пациента, восстанавливает способность клеток производить транскрипт NR2E3 дикого типа во время дифференцировки клеток сетчатки.



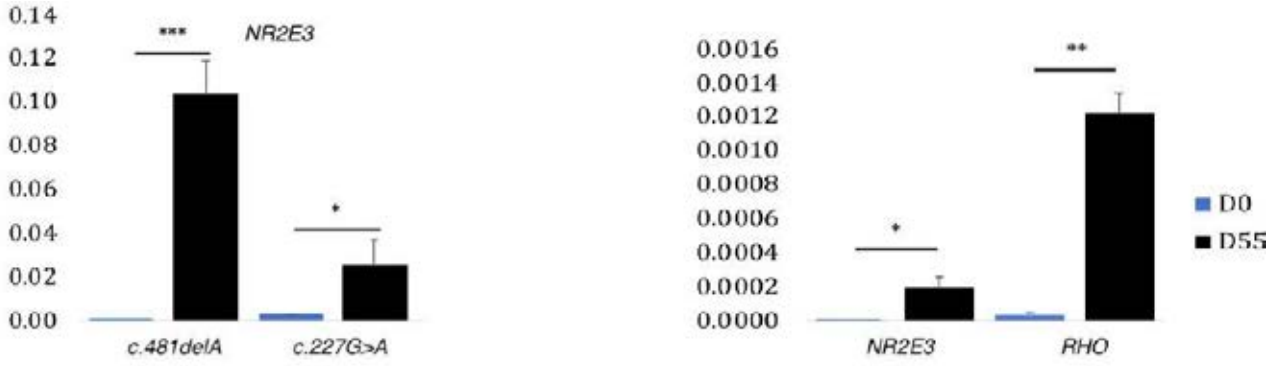
А Б В

Рис. 74. Изображения под световым микроскопом уровня экспрессии (черные точки) укороченной версии c.219-2A>G белка NR2E3 в иППСК контрольной клетки (**A**), клетки иППСК пациента с *NR2E3* c.219-2A>G (**B**) и клетки иППСК пациента с *NR2E3* c.219-2A>G через 35 дней после редактирования с помощью системы CRISPR/Cas (**C**). Гистологические снимки совместного исследования приведены с разрешения Bohrer L.R.

Тотальную РНК выделяли из культивируемых клеток hiPS, далее ее использовали в качестве матрицы для получения кДНК. Затем определяли вирусный клиренс и анализировали маркеры плюрипотентности, затем проводили реакцию ртПЦР, продукты ПЦР анализировали для оценки дифференцировки клеток in vitro. Она проводилось с помощью формирования эмбриоидного тела для создания трех зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и

эктодермы). Клетки hiPS отделяли вручную от питающих клеток и культивировали в среде iPS без в течение следующих 7 дней. Затем эмбриоидное тело высевали на стеклянные покровные стекла и культивировали в течение одной недели, затем покровные стекла фиксировали в 4% формальдегиде и анализировали методом иммунофлуоресценции.

Относительные уровни экспрессии мРНК, измеренные на 55-й день культивации (D55) по сравнению с нулевым днем начала (D0) представлены на рис. 75. Маркеры ретинальных клеток предшественников, экспрессирующих мутантную мРНК c.481delA.Thr161fs в 4-м экзоне (слева) и c.227G>A p.Arg76Gln во 2-м экзоне (справа) и относительные уровни экспрессии мРНК генов *RHO* и *NR2E3* на 55-й день культивации



А Б

Рис. 75. Относительные уровни экспрессии мРНК, измеренные на 55-й день культивации (D55) по сравнению с нулевым днем начала (D0). А – маркеры ретинальных клеток предшественников, экспрессирующих мутантную мРНК c.481delA.Thr161fs в 4-м экзоне (слева) и c.227G>A p.Arg76Gln во 2-м экзоне (справа). Б – относительные уровни экспрессии мРНК генов *RHO* и *NR2E3* на 55-й день культивации.

8.1.2. иППСК пациента с мутацией в гене *RHO*

У одного пациента с доминантной формой пигментного ретинита с подтвержденной мутацией в гене *RHO* была произведена биопсия кусочка кожи для последующей культивации индуцированных стволовых клеток (iPSC см. главу 1.6.1. iPSC и 2.3. Методы подготовки индуцированных стволовых клеток) с генетической поломкой конкретного пациента. **Восстановление уровня транскрипции полноразмерного белка RHO** после CRISPR/Cas9 редактирования в иППСК, полученных от пациента с мутацией в гене *RHO* (c.1040C>A p.Pro347Gln, 5 экзон). Были выделены фибробласты пациента, которые затем были

перепрограммированы в индуцированные плюрипотентные клетки (иППСК). Клетки РПЭ были получены из иППСК. Клетки культивировали ($1{,}0 \times 10^6$ клеток) в среде для роста. Тотальную РНК выделяли из культивируемых клеток hiPS. Дифференцирование in vitro проводилось с помощью формирования эмбриоидного тела для создания трех зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и эктодермы). Клетки hiPS отделяли вручную от питающих клеток и культивировали в неприлипающих условиях в среде iPS без bFGF. Конструкции sgRNA и CRISPR-Cas9 трансфицировали в культивируемые клетки. Контрольные иППСК трансфицировали 2 мкг плазмиды с использованием системы трансфекции. Доставку sgRNA-Cas9 и HDR конструкта в *RHO*-специфические иППСК пациента проводили по специфическому механизму CRISPR-Cas9. Плазмиды sg4-spCas9 и HDR трансфицировали в молярном соотношении 1:2 в иППСК пациента с помощью липофектаминовой основы, а затем секвенировали для подтверждения проведенной коррекции.

Всю методологию культивации проводили тем же образом, что и для иППСК NR2E3. Относительные уровни экспрессии мРНК гена *RHO* на 55-й день культивации представлен на рис. 75Б.

Целостность генома клеток hiPS анализировали с помощью кариотипирования. Подготовку клеток иППСК проводили от пациентов с подтвержденными мутациями в генах *RHO* (c.1040C>A p.Pro347Gln, 5 экзон) и *NR2E3* (c.481delA p.Thr161fs экзон 4 и c.227G>A p.Arg76Gln экзон 2). Инъекция иППСК пациентам, донорам материала для культивации иППСК до текущего момента не проводилась. В дальнейшем планируется геномное редактирование этих клеток с последующим их введением в эпиретинальное пространство пациентов для возможности восстановления утраченной структуры клеток слоев сетчатки (фоторецепторов, клеток РПЭ и ганглиозных клеток).

8.1.3. Создание иППСК для транскрипции других генов

Разработка технологии иППСК, создание протоколов для успешной тканеспецифичной дифференцировки, рост и развитие отредактированных клеток генома на основе CRISPR/Cas9 технологии – все это позволило изучить патофизиологические процессы в тканях сетчатки, что ранее было недоступно для изучения в такой степени подробности. Например, способность генерировать фоторецепторные клетки, полученные от пациентов с молекулярно недиагностированным пигментным ретинитом, позволила продемонстрировать, как недавно идентифицированная мутация в гене киназы *MAK* вызывает заболевание, специфичное для

фоторецепторных клеток [Tucker B.A., 2011]. Так же, генерируя клетки РПЭ от пациента с подозрением на врожденный амавроз Лебера, связанный с мутацией в гене *RPE65*, авторы смогли продемонстрировать, что у ребенка родом с Гаити появился de novo интронный вариант, который легко мог быть не патогенным этническим полиморфизмом, но в случае этого ребенка приводил к изменению сплайсинга и нарушал нормальную продукцию транскриптов *RPE65* [Tucker B.A., 2015].

Те двери, которые открывает применение новой технологии культивации иППСК, дадут возможность кратно повысить качество и точность проводимых экспериментов и проверки клинических гипотез на культурах клеток конкретных пациентов, а также привлекает возможное значительное ускорение разработки терапевтических стратегий для тех форм дистрофий сетчатки, для которых пока лечение не доступно, ни на фазе клинических исследований, ни на доклинических фазах.

Косвенным подтверждением состоятельности технологии иППСК и расширенных границ ее применения в будущем является обсуждение клеточных линий иППСК для корректировки мутаций в генах *AIPL1, MYO7A, EYS* и других, что мы видим при анализе новых источников литературы.

8.2. Результаты внесения изменений в геном культивируемых иППСК

8.2.1.Доставка до таргетной ткани и клеточного окружения

Плюрипотентные стволовые клетки могут быть дифференцированы в трехмерные органоиды сетчатки, при этом основные типы клеток формируют самостоятельные поляризованные слоистые структуры. В статических культурах развитию органоидов могут препятствовать ограничения диффузии кислорода и питательных веществ, поэтому применяют так называемые биореакторы с вращающимися стенками для культивирования органоидов сетчатки, полученных из плюрипотентных стволовых клеток.

Органоиды в биореакторе с вращающимися стенками демонстрируют усиленную пролиферацию с четко определенной морфологией и улучшенной дифференцировкой нейронов, включая ганглиозные клетки и колбочковые фоторецепторы. Кроме того, органоиды на 25-й день обнаруживают сходный профиль созревания и транскриптома с таковыми на 32-х дневной статической культуре, точно повторяя пространственно-временное развитие постнатального 6-

го дня сетчатки. Однако органоиды сетчатки не дифференцируются дальше in vitro, что предполагает дополнительные требования для функционального созревания сетчатки. Необходим поиск условий, в том числе доставки до таргетной ткани и клеточного окружения, которые могут ускорять и улучшать рост и дифференциацию органоидов для моделирования заболеваний сетчатки и оценки методов лечения.

8.2.2.Пространственная архитектура и сложность встраивания в существующую анатомию сетчатки

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (иППСК) обеспечивают несколько преимуществ для открытия лекарств, но в основном они обеспечивают источник исследований на клинически значимой ткани. Кроме того, использование иППСК, культивируемых в трехмерных (3D) системах, в отличие от традиционных двухмерных (2D) подходов к культивированию, лучше отражает сложную архитектуру ткани in vivo. Использование иППСК в культуре трехмерных сфероидов и органоидов в настоящее время растет, но особенно при использовании линий нервной системы и сетчатки. Культура органоидных клеток оказывает наиболее заметное влияние на исследования и открытие лекарств, в которых трехмерные культуры клеток сетчатки позволяют напрямую моделировать наслоение клеток и их активность. Учитывая специфическую дегенерацию конкретных типов клеток при наследственных дистрофиях сетчатки, системы культивирования иППСК оказались значительным достижением. Чтобы получить представление о механизмах заболевания, необходимо моделировать его непосредственно на клетках конкретного пациента с конкретной мутацией, однако также непростой задачей после успешного этапа проверки состоятельности такой модели станет задача внедрения клеток сетчатки с правильным фенотипом в уже имеющуюся дегенерировавшую архитектуру клеток сетчатки пациента in vivo.

8.3. За и против применения иППСК

Одним из наиболее важных вопросов, волнующих исследователей и клиницистов, имеющих дело с иППСК, является понимание и оценка риска онкологических осложнений в долгосрочной перспективе, способы своевременного отслеживания реализации этого

осложнения и вмешательства при необходимости, чтобы нивелировать этот риск без ущерба для здоровья и жизни пациента. Развивается целая область знаний, посвященная данному вопросу, которая не является темой данной работы, и которая с довольно высокой точностью может прогнозировать и отслеживать неконтролируемый рост клеток после подсадки дифференцированных иППСК, а также может прогнозировать перспективы применения иППСК. Также к недостаткам метода иППСК относят низкую скорость применения этого метода (требуется затратить от нескольких месяцев до года) и как одно из следствий – высокую стоимость данной технологии на текущем этапе ее развития.

Значительно больше привлекают заманчивые перспективы применения иППСК сторонников этого метода, в том числе замена животных моделей, ускорение исследований и вывода препаратов на стадию клинических исследований.

В быстрорастущей области генной терапии сетчатки, где для включения в клиническое испытание по усилению активности определенного гена требуется молекулярное подтверждение генотипа пациента, вызывающего заболевание, возможность использовать подходы индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иППСК) для демонстрации того, что у пациента действительно есть заболевание, для которого есть технологии усиления функции гена, будет неоценимо ценной и незаменимой.

Помимо того, что иППСК полезны для подтверждения генотипа, вызывающего заболевание, специфические для болезни фенотипы, идентифицированные в клетках, полученных от пациента (которые могут быть подтверждены с помощью геномной коррекции на основе CRISPR), оказались полезными для оценки и разработки новых терапевтических средств.

Например, было продемонстрировано, что доставка гена *CLN3* с помощью аденоассоциированного вирусного носителя и смягчение молекулярного фенотипа в фоторецепторных клетках, полученных от пациента, предпочтительнее для демонстрации эффективности лечения, **чем использование животной модели**, которая не точно воспроизводит болезнь [Wiley L.A., 2016].

В этой главе было показано, как иППСК, полученные от пациентов, и редактирование генома на основе CRISPR могут использоваться для оценки молекулярного фенотипа, связанного с синдромом усиленного ответа колбочек, который вызван мутациями в гене *NR2E3*, которые нарушают развитие палочковых фоторецепторных клеток и приводят к перепроизводству синих колбочек. Определив, как генетические изменения в экспрессии *NR2E3* влияют на прогрессирование заболевания и на процент колбочек и палочек фоторецепторных клеток, мы сможем дополнительно усовершенствовать текущие протоколы дифференцировки сетчатки и протоколы лечения.

С точки зрения замены фоторецепторных клеток, для восстановления остроты зрения потребуется трансплантация колбочек в среду сетчатки, где плотность клеток и так уже высока. Существует несколько многообещающих стратегий выделения колбочек из органоидов сетчатки, которые в зависимости от клеточной линии и используемого протокола дифференцировки могут иметь различное процентное соотношение палочек и колбочек, которые являются результатом использования текущих протоколов дифференцировки сетчатки; однако все они требуют тщательного культивирования, чтобы получить достаточное количество колбочек после отбора для трансплантации сетчатки.

Ценным усовершенствованием был бы метод направления дифференцировки сетчатки по селективному пути колбочек. Как правило, исследователи опираются на данные биологии развития и разрабатывают эксперименты, чтобы изменять тип, дозировку и время доставки экзогенного фактора, когда они пытаются ускорить или сдвинуть дифференцировку в том или ином направлении [Riazifar, H., 2014, Ueda, K. 2018]. Хотя это и не является традиционным подходом, изучение хода естественного генетического заболевания, при котором изменения одной пары оснований могут кардинально изменить фенотипический результат, также может быть полезным. Как было показано в этой главе, одна стратегия HDR (гомологичной направленной репарации) на основе CRISPR может быть использована для исправления множества различных мутаций, охватывающих несколько экзонов гена *NR2E3*. Сравнивая эти изменения как с фенотипом in vitro, так и с анамнезом пациента, можно идентифицировать варианты, которые избирательно способствуют генезу колбочек с незначительной дегенерацией сетчатки или без нее.

Один из наиболее важных постулатов в этой главе относится к молекулярному механизму действия мутации c.119-2A>C в гене *NR2E3*. Более ранние исследования применяли на клетках обезьян экспрессионную плазмиду, содержащую ген *NR2E3* мутацией c.119-2A>C. Транскрипционный анализ в той системе показал, что эта мутация привела к пропуску экзона 2, что вызвало сдвиг рамки считывания и создание преждевременного стоп-кодона в **экзоне 3** [Bernal, S., 2008]. В текущем эксперименте in vitro внимание сосредоточено на эндогенно экспрессируемом *NR2E3* в фоторецепторных клетках *человека*, полученных от пациентов. Было обнаружено, что мутация c.119-2A>C на самом деле генерирует *аномальный* транскрипт, который включает сегмент интрона 1, за которым следует **экзон 2**, что также вызывает сдвиг рамки считывания и создание преждевременного стоп-кодона.

Важно, что анализ аллелей дикого типа и мутантных аллелей с помощью программы ESEFinder 3.0 (rulai.cshl.edu) выявил разницу в предсказанных сайтах связывания факторов сплайсинга. Было обнаружено, что сайт SRSF1 присутствует у дикого типа, но отсутствует у мутанта, а сайт SRSF6, который отсутствует у дикого типа, присутствует в мутанте. Есть

основания полагать, что изменение связывания фактора сплайсинга активировало скрытый акцепторный сайт сплайсинга в интроне 1 в клетках сетчатки, происходящих от иППСК.

Таким образом, складывается понимание, что механизм сплайсинга, используемый клетками обезьяны, несколько отличается от того, что используется фоторецепторными клетками человека. Этот факт иллюстрирует *важность использования соответствующего типа клеток, полученных от представляющих интерес видов*, *чтобы делать выводы о функциях различных генетических вариантов*. Это будет особенно верно при попытке определить патогенность недавно идентифицированных генетических вариантов в эпоху клинической молекулярной медицины и позволит кратно снизить потребность в животных моделях, что также затрагивает и этические вопросы.

ГЛАВА 9. ИЗУЧЕНИЕ ПЛЕЙОТРОПНОГО ЭФФЕКТА ПРЕПАРАТОВ И ПРЕДСКАЗАНИЕ ИХ ЭФФЕКТИВНОСТИ

9.1. Анализ офф-таргет эффективности

Необходимо изучение метаболических путей при моногенной патологии сетчатки. В основном задействованы пути цилиарного транспорта, вирлинового комплекса, транспорта энергии в клетках фоторецепторов и в ганглиозных клетках. Изучение метаболических путей позволяет предсказывать и оценивать шансы перекрестной эффективности уже имеющихся или разрабатываемых высокотехнологичных препаратов для тех видов патологии, для которых еще нет лечения.

9.2. Анализ метаболических путей патофизиологического действия препаратов

В сетчатке большая часть молекул белка миозина MYO7A находится в пигментном эпителии сетчатки (РПЭ), где происходят многие реакции зрительного ретиноидного цикла. Сетчатка с мутациями в гене *MYO7A* устойчива к острому световому повреждению по причине более низкого уровня *RPE65*, изомеразы RPE, которая играет ключевую роль в ретиноидном цикле. Было показано, что белок RPE65 обычно подвергается светозависимой транслокации, чтобы стать более сконцентрированным в центральной области клеток RPE. Эта транслокация требует участия моторного белка MYO7A, поэтому при мутациях в гене *MYO7A* белок RPE65 частично локализован на свету и распадается быстрее, возможно, из-за его неправильной локализации, что дает правдоподобное объяснение того, почему его количество снижено. После 50–60%-го засвета белым цветом сетчатка с мутацией в гене *MYO7A* демонстрирует повышенные уровни всех транс-ретиниловых эфиров на начальных стадиях темнового восстановления, что согласуется с дефицитом активности белка RPE65. Белки MYO7A и RPE65 совместно иммунопреципитируются из клеточного лизата РПЭ антителами против любого из белков, и два белка были локализованы в одних и тех же участках клетки, что указывает на прямое их взаимодействие. Результаты лабораторных исследований подтверждают роль белка миозина

(MYO7A) в транслокации белка изомеразы (RPE65), иллюстрируя участие молекулярного мотора в пространственно-временной организации ретиноидного цикла в процессе фототрансдукции.

На основе этих исследований есть основания полагать, что воретиген непарвовек, зарегистрированный и разрешенный к применению в США и ЕС генотерапевтический препарат *RPE65*, может показать свою эффективность также у пациентов с *MYO7A*-ассоциированным синдромом Ашера, так как изучен перекрест метаболических путей и механизмов их действия. Данный подход широко не обсуждается на текущий момент офтальмологическим и генетическим сообществом, однако он может оказаться перспективным в сохранении зрения пациентам с синдромом Ашера.

Аналогично применение аминогликозидов может быть эффективно в лечении *CDH23, USH2A, USH1C, CRB1* и *PCDH15*-ассоциированного пигментного ретинита и синдрома Ашера, что на текущий момент является off-label применением данной группы препаратов у пациентов со стоп-кодонами или нонсенс-мутациями в этих генах.

Аминогликозиды в данном случае работают путем ослабления строгого механизма отбора рибосомой при синтезе белка из мРНК. Как при антибактериальном действии, когда они нарушают правильную генерацию полипептидов бактерий, так и в этом случае, расслабляя трансляцию, аминогликозид позволяет вставлять аминокислоту в область стоп-кодона вместо обрыва синтеза белка. Хотя эта аминокислота может быть не той аминокислотой, которая наблюдается в белке дикого типа, существует возможность восстановления правильной функции или, по крайней мере, лучшая функциональность получаемого белка ушерина, кадгерина или протокадгерина.

Взаимодействие и возможные взаимосвязи между генами и влияние на возможную перекрестную эффективность генотерапевтических препаратов и препаратов, нацеленных на воздействие, препятствующее патофизиологическим процессам в клетках сетчатки, изображено на рис. 16.

Используя предсказательные алгоритмы (см. главу 2.4 Методы анализа данных), была сформирована «тепловая карта» (heat map) (рис.76) для генов, мутации в которых были обнаружены в исследуемой группе пациентов с наиболее вероятной перспективой получения таргетного лечения, в которой мы наблюдаем наиболее сильную потенциальную перекрестную эффективность у препаратов, влияющих на функцию генов *RDH12 и KCNV2, PROM1 и CRB1, RHO и PROM1, NYX и GPR179,* а также *CERKL и KCNV2.*

Аналогично, возможно предсказание усиления и торможения проявлений побочных действий применяемых препаратов. Например, пары препаратов, влияющих на функцию гена

CEP290 и *LRAT,* а также *CEP290* и *CLRN1* имеют потенциально тормозящее/блокирующее влияние друг на друга.

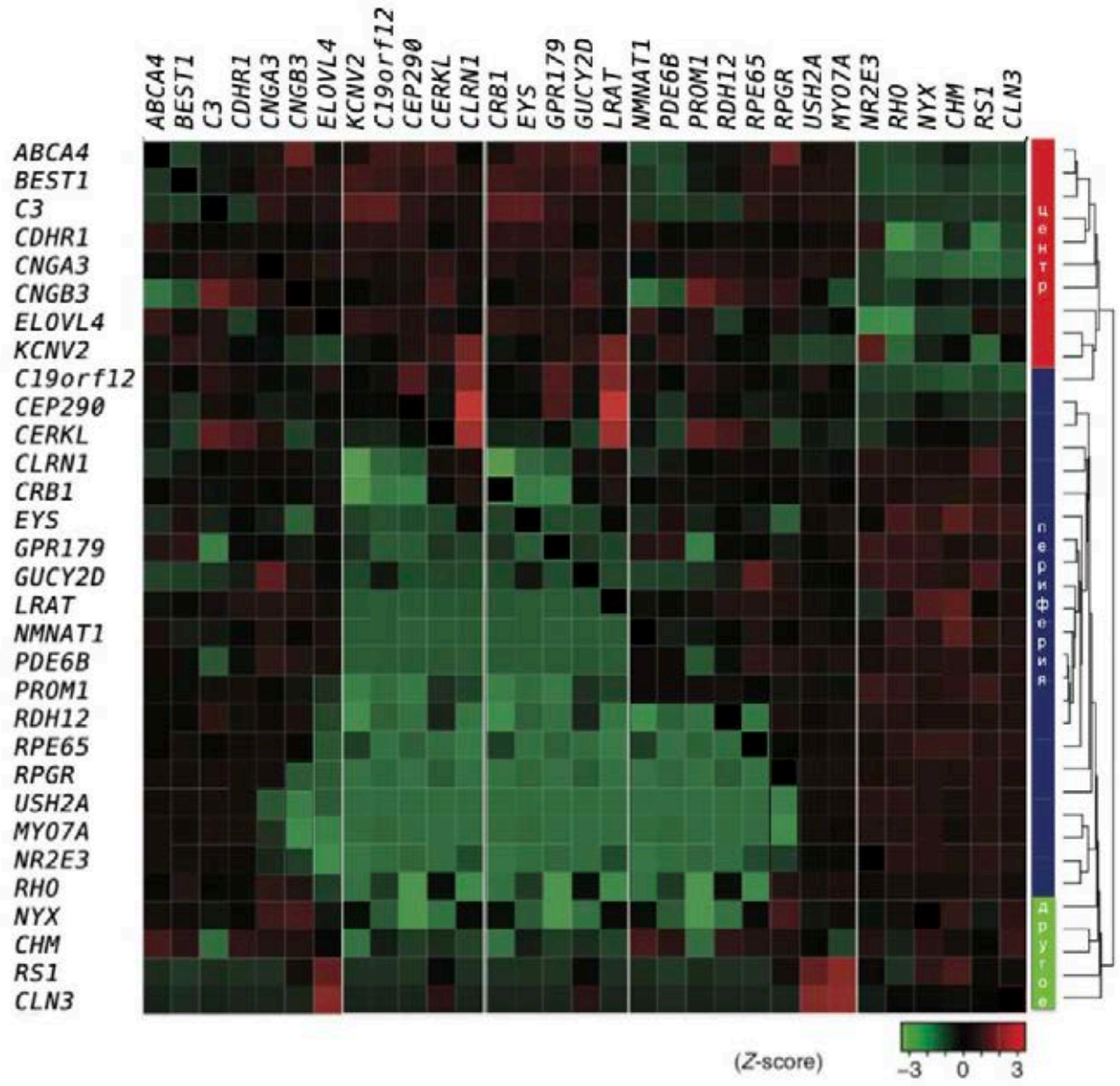


Рис.76. Взаимодействие и возможные взаимосвязи между генами и влияние на возможную перекрестную эффективность генотерапевтических препаратов и препаратов, нацеленных на воздействие, препятствующее патофизиологическим процессам в клетках сетчатки. Зеленым указаны зоны возможной перекрестной эффективности.

Как мы видим на рис.77 при различном применении таргетного лечения моногенных заболеваний сетчатки необходимо принимать во внимание ко-экспрессию, ко-локализацию, участие в общих метаболических путях, наличие схожих белковых доменов, а также прямое взаимодействие генов для анализа возможного побочного действия того или иного препарата, а также анализа перекрестной эффективности или торможения применения дополнительного препарата.

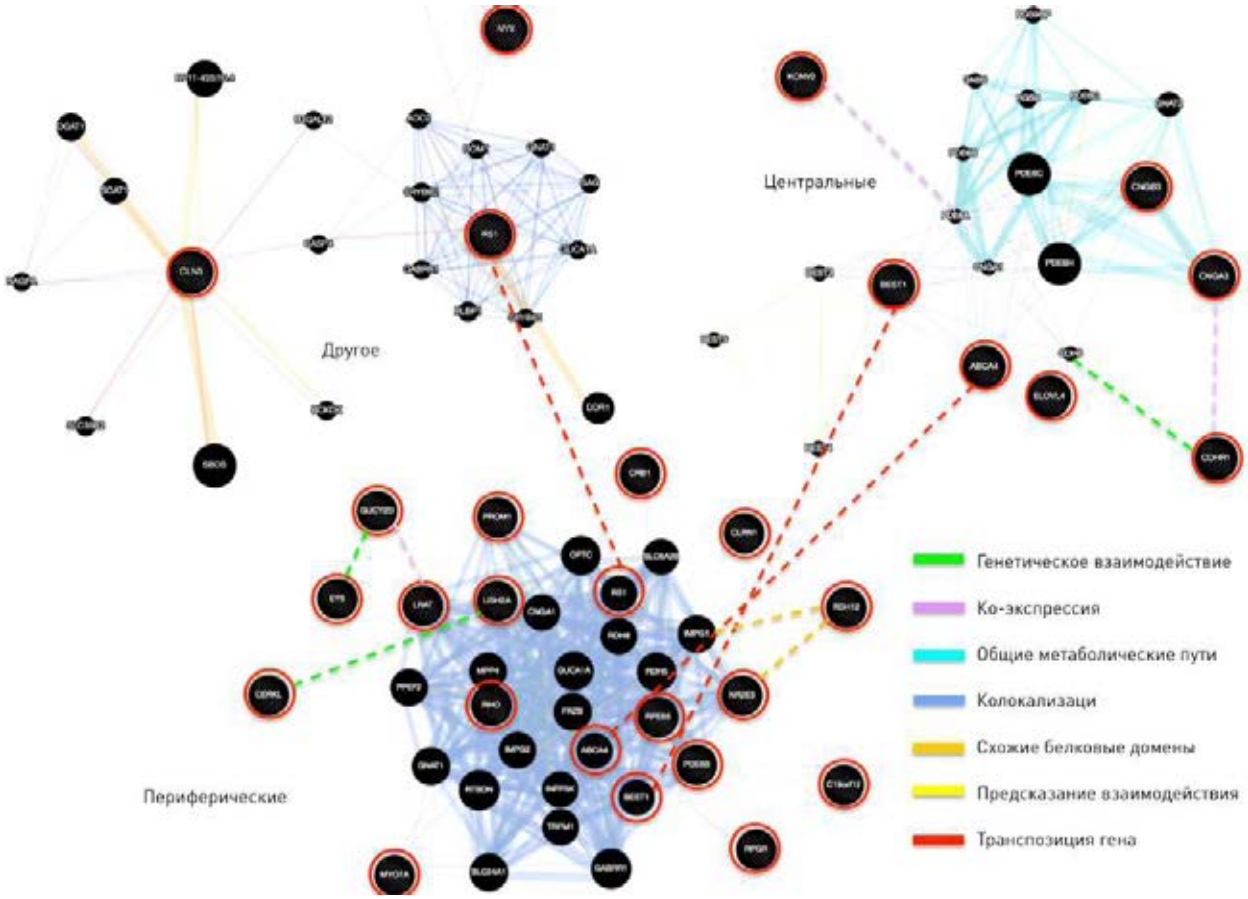


Рис.77. Схема интерактома изучаемых причинных генов при центральных, периферических и смешанных дистрофиях сетчатки, а также синдромных состояний в зависимости от типа взаимодействия генов с целью прогнозирования перекрестной эффективности таргетных лекарственных препаратов. Изучаемые типы взаимодействия – ко-экспрессия, ко-локализация, участие в общих метаболических путях, наличие схожих белковых доменов, прямое взаимодействие генов, а также предсказание косвенного взаимодействия на основе нескольких параметров.

Например, ген фактора транскрипции *EYS* путем прямого генетического взаимодействия с геном гуанилатциклазы *GUCY2D*, который ко-экспрессируется с геном лецитин ретинолтрансферазы *LRAT* может ускорить снижение зрительных функций посредством нарастания накопления транс-форм ретинола и отсутствия их изомеризации в клетках РПЭ в зрительном цикле, что объясняет раннее проявление клинических признаков при мутациях в гене *EYS*, а также дает возможность применять фармацевтические препараты, содержащие цинк (например, протопорфирин IX цинка (II) (рис. 78) для ингибирования гуанилатциклазы, для снижения этого эффекта, что не является очевидным шагом в данном случае.

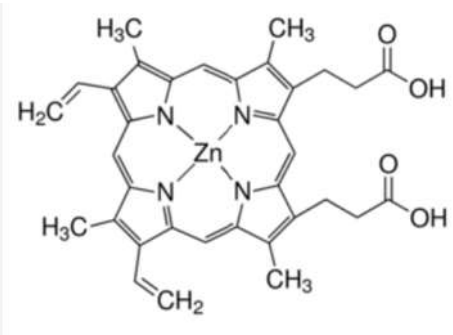


Рис.78. Формула протопорфирина, ингибитора гуанилатциклазы, для сохранения остроты зрения при EYS ассоциированном пигментном ретините, как потенциальная терапевтическая мишень. Структурная формула протопорфирина приведена из Большой Медицинской Энциклопедии.

9.3. Плейотропный эффект препаратов

Этиология многих врожденных заболеваний носит мультигенный характер. Трудности описания и диагностики конкретных генетических патологий сетчатки показывают, что ряд мутаций не коррелирует с фенотипическими проявлениями, а многие обладают плейотропным эффектом. Мутации генов, общих для многих тканей и органов, часто могут вызывать развитие вторичных патологий глаза, к примеру. диабетическая ретинопатия, дегенерация сетчатки при глаукоме. Один хорошо известный пример - мутация гена гомеобокса PROX1, которая вызывает патологию поджелудочной железы, а дегенерация сетчатки возникает как вторичный эффект.

В том же ключе методом обратной дедукции будет работать метод подбора мишеней для терапии в случае плейотропного эффекта. Разберем основные подгруппы моногенных заболеваний сетчатки, в которых плейотропный эффект препаратов наиболее предсказуем.

9.3.1. В группе пациентов с изолированными рецессивными формами

Было доказано, что препарат генной терапии, нацеленный на замещение функции гена *CEP290* не до конца понятным способом также компенсирует нехватку функции еще трех генов, мутации в которых приводят к моногенным заболеваниям сетчатки, один из которых приводит к рецессивным формам заболевания (*PDE6B*) и два других к доминантным формам заболевания *RHO* и *NR2E3*, что продолжает поддерживать потенциал прорывной платформы генной терапии

препарата окуген для лечения нескольких форм моногенных заболеваний сетчатки, в том числе у 15% пациентов, которые не могут быть диагностированы генетическим методом, что затрудняет разработку индивидуальных методов лечения для них и дает надежду на лечение этой группе пациентов. Традиционные подходы к генной терапии или редактированию генов могут потребовать более 150 препаратов, чтобы спасти этих пациентов от потери зрения. Окуген – единый препарат, который имеет потенциал для решения проблем пигментного ретинита широкого спектра.

9.3.2. В группе пациентов с доминантными формами

Из-за своего плейотропного эффекта терапевтические стратегии, основанные на miRNA, также были протестированы с многообещающими результатами. Эффект miR-124 на рост аксонов ганглиозных клеток, происходящих из клеток Мюллера, был протестирован как in vitro, так и in vivo на модели животных. Выделенные клетки Мюллера дедифференцировали в стволовые клетки сетчатки, индуцировали дифференцировку в ганглиозные клетки и затем трансфицировали их miR-124 или анти-miR-124. miR-124 способствует росту аксонов ганглиозных клеток, дифференцированных из стволовых клеток сетчатки. Рост аксонов был самой большим в группе, пролеченной miR-124 и самым маленьким в группе анти-miR-124, что указывает на то, что miR-124 имеет трансляционный потенциал для генной терапии и других глазных заболеваний, например, глаукомы.

9.3.3. В группе пациентов с синдромными формами

Необходимо принимать во внимание системы органов, вовлеченные в патофизиологический процесс, как в случае цилиопатий на примере синдрома Барде-Бидля или синдрома Ашера. В таких случаях свою эффективность доказало таргетированное воздействие на молекулярный вирлиновый комплекс, лежащий в основе ресничного комплекса в клетках вестибулярного аппарата, внутреннего уха, ворсинок урогенитального тракта. В ближайшие годы ожидается появление минимум десяти препаратов, нацеленных на коррекцию функции этого комплекса, как постнатально, так и перинатально, поэтому совокупная эффективность

разрабатываемых методов лечения обещает быть достаточной для длительного поддержания зрительных и других функций организма пациентов.

9.3.4. В группе пациентов с центральными дистрофиями сетчатки

Одной из наиболее частых молекулярных причин раннего снижения центральной остроты зрения является патология транспортной системы белков ABCA4. Помимо попыток генной терапии, затрудненных большим размером гена, большого количества уже описанных интронных и ежедневно пополняемой базы новых интронных мутаций, гипоморфности некоторых описанных мутаций очень важное значение следует уделять поиску метаболических мишеней терапии, которые позволят снизить накопление друз в сетчатке и сохранять остроту зрения высокой как можно более долгое время.

9.4. In silico поиск предполагаемых общих мишеней: генная терапия, биологическая терапия, терапия малыми молекулами

Генетическая гетерогенность моногенных заболеваний сетчатки, а также различные связанные с ними фенотипы создают серьезные проблемы для понимания патологии заболевания, прогнозирования эффективности лечения и выбора критериев исхода и конечных точек для клинических испытаний. Очень важно выбирать показатели, используемые для определения пользы от лечения, поскольку при некоторых заболеваниях значительного улучшения зрительных функций пока невозможно достичь. Вместо этого терапевтическим эффектом может служить отсрочка прогрессирования заболевания и замедление потери зрения.

Уникальные методики проверки зрения используются для выбора нескольких категорий итоговых показателей. Для использования в качестве конечных точек в клинических исследованиях важно выбирать критерии, результат оценки которых просто получать, иметь высокую повторяемость с минимальной погрешностью измерения, также критерии нужно выбирать до начала сбора данных. Четко определенная первичная конечная точка используется для оценки безопасности или эффективности лечения, также обычно оцениваются многочисленные вторичные конечные точки, так как они увеличивают вероятность подтверждения наличия или отсутствия эффекта от лечения, а также его безопасности.

При проведении клинических исследований по лечению моногенных заболеваний сетчатки конечные точки, которые необходимо оценивать, включают в себя стандартные и специфические показатели: острота зрения, поля зрения, объективные показатели аутофлуоресценции и данных ОКТ, цветовое зрение, контрастная чувствительность, размер очага поражения сетчатки, степень светобоязни, изменение сосудов сетчатки, макулярная чувствительность (в дБ), передвижение в пространстве без помощи посторонних, субъективное ощущение пациента о результате лечения, качество жизни, возможность читать.

Также анализ метаболических путей остается важным инструментом в поиске лечения кистоидного макулярного отека (КМО). Хотя этиология КМО остается неизвестной, предложено несколько механизмов, которые способствуют формированию КМО, в том числе: а) разрушение барьера между кровью и сетчаткой, б) нарушение механизма перекачивания молекул клетками РПЭ, в) отек и дисфункция клеток Мюллера, г) антиретинальные антитела и д) тракции стекловидного тела.

КМО является распространенным явлением среди пациентов с ПР и встречается во всех возрастных группах. У детей с патогенными вариантами в гене *CRB1* или *RP1*, а также у молодых людей с мутациями в гене *PRPF31* или *USH2A* помимо кистоидного макулярного отека (КМО) было отмечено наличие взвеси клеток (лейкоцитов) в стекловидном теле. Эти клинические признаки могут привести к неправильному диагнозу увеит, особенно у детей с ПР, у которых аномалии сетчатки едва различимы или вообще отсутствуют. До настоящего времени не было проведено ни одного крупного рандомизированного контролируемого клинического исследования для оценки эффекта лечения КМО у пациентов с ПР. Средство выбора при лечении КМО – ингибиторы карбоангидразы внутрь (125-500 мг в день). Лечение приводит к уменьшению толщины центральной зоны сетчатки по данным ОКТ в среднем на 46% Однако не всегда существует корреляция между анатомическим и функциональным улучшением, а также может произойти рецидив после прекращения лечения ингибитором карбоангидразы или наблюдаться резистентный отек. Если на какой-то период прекратить применение ингибиторов карбоангидразы, то через несколько месяцев повторное назначение этих препаратов может снова иметь благоприятный эффект. Эффективность может снижаться при длительном лечении.

Резистентный КМО можно уменьшить с помощью применения стероидных препаратов интравитреально. Обоснованность использования препаратов анти-VEGF (сосудистого эндотелиального фактора роста) интравитреально у пациентов с ПР остается неясным, поскольку нет опубликованных положительных результатов исследований. Важно отметить, что КМО может со временем уменьшаться, особенно у детей, даже без терапевтического вмешательства. Это следует учитывать во время лечения.

Анализ метаболических путей в организме проливает свет на патогенез многих процессов, в том числе на причину возникновения кистоидного макулярного отека (КМО) при ретинопатии, особенно часто при *CDHR1*-ассоциированной ретинопатии. На примере молекулярных и in silico исследований можно наглядно провести причинно-следственные взаимосвязи между мутациями в гене *CDHR1* и формированием КМО. На первый взгляд, вовлечение кадгеринового рецептора не имеет очевидной связи с возникновением отека, однако изучение патофизиологических последствий неравномерного накопления ионов в межклеточном пространстве фоторецепторов, которые под действием осмотических сил вызывают протекание растворимого компонента плазмы под фовеолу объясняет суть процесса. Ионные каналы, которые функционируют в ответ на связывание циклических нуклеотидов – *CNGA3* ко-экспрессируются с геном кадгерин-связанного белка *CDHR1 (*рис. 77*)*, который в свою очередь генетически взаимодействует с геном кадгерина-6 *CDH6*. Ген *CDH6* в свою очередь опосредованно угнетает функцию гена АТФ-связывающей кассеты (*ABCA4*), что приводит к выраженным изменениям палочкового и колбочкового аппарата сетчатки, приводя к накоплению осмотически активных молекул в межклеточном веществе.

Быстро увеличивающееся количество клинических исследований моногенных заболеваний сетчатки поставило новую задачу улучшить организационные процессы и решить ряд этических вопросов, связанных с набором пациентов, а также с дизайном, проведением и анализом результатов самих исследований. Решение этих задач позволит продвинуть на новый уровень исследования моногенных заболеваний сетчатки в области использования генной и клеточной терапии. Чтобы продвинуть клинические исследования в течение следующих 5–10 лет, необходимо четко определять критерии отбора и целевые показатели высокоспециализированных критериев оценки результатов, а также решить вопрос с включением детей младшего возраста (до шести лет) в первую и вторую фазы исследования.

Важность изучения естественного течения заболевания для формирования дизайна клинического исследования. Сложность и разнообразие фенотипических проявлений моногенных заболеваний сетчатки создает серьезную проблему для оценки эффективности лечения с использованием стандартных показателей оценки функции и структуры сетчатки. Даже среди людей с одной и той же мутацией могут быть большие различия в возрасте начала, степени тяжести и скорости прогрессирования заболевания. Без предоставления контекста относительно естественного течения болезни, только самые выраженные результаты лечения будут очевидными. Кроме того, существуют границы терапевтического окна, за пределами которых лечение для данной формы заболевания не может принести значимой пользы пациенту.

Изучение естественного течения заболевания (natural history) – один из наиболее эффективных подходов к определению показателей для прогнозирования течения болезни в

группе пациентов. Однако трудности с получением значительного финансирования и относительно низкая распространенность моногенных заболеваний сетчатки создают серьезные препятствия. В исследования естественного течения заболевания обычно включают относительно большое количество пациентов. Кроме того, до сих пор менее половины общего числа пациентов с моногенными заболеваниями сетчатки имеют генетически подтвержденный диагноз, что является препятствием для участия в большинстве исследований. Необходимо обеспечить доступ пациентов к генетическому тестированию, определять варианты неизвестной значимости (VUS), характеристику структурных вариантов и включение стандартизованных фенотипических данных в базы данных мутаций.

По мере выявления генетически охарактеризованных подгрупп моногенных заболеваний сетчатки потребуются обширные исследования естественного течения заболевания для определения критических периодов в прогрессировании заболевания. Существенным дополнительным преимуществом является потенциальная идентификация когорт пациентов, которые могут быть включены в реестры и выбраны для будущего лечения. Учитывая, что подобные исследования в прошлом занимали десятилетия, достижение актуальности для текущих трансляционных усилий потребует сокращения сроков до нескольких лет. Участие в международных консорциумах будет важно для достижения необходимого объема и масштаба набора пациентов, а также клинического их обследования, особенно для крайне редких моногенных заболеваний сетчатки. Стратегии усовершенствования технологий, применяемых к фенотипированию, также будут важны. Эти стратегии могут включать разработку и оценку биомаркеров в образцах пациентов, таких как водянистая влага, стекловидное тело и кровь. Долгосрочные последующие исследования существующих участников испытаний также будут иметь решающее значение для разработки дизайна будущих клинических исследований.

Разработка показателей результатов лечения, значимых для пациентов. Хотя использование стандартных клинических исследований останется основой оценки результатов клинических испытаний, показатели, позволяющие оценить, имеют ли потенциальные методы лечения значение для пациента, крайне необходимы. В некоторой степени это потребует не только использования точных субъективных и объективных клинических измерений, но и результатов, сообщаемых пациентами. Задача будет заключаться в том, чтобы найти компромисс между желанием получить точную цифру и необходимостью достичь соответствия опыту пациента и повседневной деятельности. Решение этой задачи потребует определения зрительных действий, значимых для пациентов (например, чтение, вождение автомобиля, подвижность при ярком или тусклом освещении) и потенциально изменяемых терапевтических целей. Поддающиеся количественной оценке показатели, связанные с этими видами деятельности и отражающие первичный фенотип, связанный с заболеванием, можно использовать для оценки

корреляции функционального зрения с клинически значимыми показателями зрительной функции (например, результаты оценки способности к передвижению и темновой адаптированной периметрии). По мере развития этой области также будет важно установить корреляции между структурой и функцией, которые точно отражают терапевтическую эффективность, и подтвердить новые критерии результатов, используя текущие и новые исследования хода течения наследственной глазной патологии.

Разработка терапевтической тактики в педиатрической практике. Поскольку дети все чаще становятся объектом выбора в исследованиях 1/2 фазы, первостепенное значение будет иметь сосредоточение внимания на биологии и этике лечения педиатрических пациентов. Некоторые методы лечения могут работать только у детей, что приводит к ситуациям, в которых после демонстрации безопасности у взрослых могут быть запланированы испытания для детей без предварительных доказательств эффективности у людей. Необходима разработка педиатрический схемы действий, основанный на коллективных данных, касающихся биологии и естественного хода течения болезни, терапевтической эффективности и безопасности. Действия должны включать создание реестров педиатрических пациентов, сеть педиатрических экспертов по заболеваниям сетчатки и рекомендации по генетическому консультированию, разработанные при участии экспертов по педиатрической этике и клиническим исследованиям.

Уменьшение воспаления, связанного с наследственными заболеваниями сетчатки и генной терапией. Усилия по разработке методов лечения для широких слоев населения в основном сосредоточены на стратегиях, направленных на общие патогенетические механизмы. Ограниченный успех, достигнутый до сих пор этими усилиями, подчеркивает необходимость лучшего понимания механизмов гибели и выживания фоторецепторных клеток, которые различаются между палочками и колбочками, причинными генами, классами мутаций и стадиями заболевания. Также существует острая необходимость в приоритетном изучении патогенетических путей, общих для различных форм заболеваний сетчатки. Среди представляющих интерес механизмов растет осознание исключительной важности воспаления, которое разрушает ткани, ухудшает терапевтические результаты и его трудно моделировать, предотвращать и контролировать. Хотя давно известно, что воспаление возникает как следствие дистрофии сетчатки, лишь недавно было изучено его влияние на прогрессирование заболевания. Будущие потребности включают разработку клинически значимых моделей воспалительных реакций человека при моногенных дистрофиях сетчатки, определение причин и механизмов воспаления, связанных с гибелью фоторецепторных клеток, и оценку эффективности стратегий иммуномодуляции по отношению к фенотипу заболевания.

Иммунная активация и воспаление также значительные побочные эффекты, вызванные внутриглазным введением вирусных векторов и клеточной терапии, и, таким образом, представляют собой серьезные проблемы, которые необходимо преодолеть, чтобы максимизировать эффективность при минимизации побочных эффектов. Необходимо выявить основные причины воспаления, вклад вирусного капсида, векторной ДНК и белкового компонента в воспалительной реакции, а также поиск эффективных противовоспалительных режимов. Для снижения иммунного ответа производят поиск оптимальной наименьшей дозы вектора, а также направленную эволюцию капсида AAV для создания векторов с повышенной эффективностью трансдукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа представляет результат наблюдения за 3514 пациентами с наследственной моногенной патологией сетчатки и оценки лечения в долгосрочной перспективе (до 7 лет), из которых по критериям включения были отобраны 852 пациента для подробного анализа результатов лечения. Этнический состав исследуемых групп пациентов не выявил преобладания ПР и других форм моногенных заболеваний сетчатки ни в одной из этнических групп. Наибольший процент пациентов были русской, татарской, украинской национальностей и составляли 80% первой группы, 58% второй группы и 60% третьей группы соответственно. Остальные национальности были представлены евреями, армянами, белорусами, бурятами, узбеками, башкирами, таджиками, чувашами и якутами.

В представленной работе подробно описаны виды изолированных и синдромальных моногенных дистрофий сетчатки, их коморбидность, диагностика и дифференциальная диагностика. Усовершенствован имеющийся план и внедрен в практику собственный алгоритм дифференциальной диагностики пациентов с этими заболеваниями.

В работе подробно обсуждаются имеющиеся экспериментальные методы патогенетического лечения моногенных заболеваний сетчатки, проведено очень тщательное формирование и описание исследуемой когорты пациентов с разделением их на группы.

В работе дана характеристика впервые обнаруженным 54-м каузативным мутациям, которые являются причиной развития заболеваний сетчатки у обследованных пациентов, а также приведены подробные схемы их лечения и обсуждены возможные способы их лечения.

Подробно расписан алгоритм отбора пациентов в группу лечения стволовыми клетками, что является важным с точки зрения практикующего врача-офтальмолога, который сталкивается в ежедневной практике с пациентами, прошедшими курсы лечения мезенхимальными стволовыми клетками и при направлении на лечение.

Результаты стандартного лечения заболеваний сетчатки в группе №3, состоящей из 662 пациентов, приведены по множеству параметров, полученных с помощью методов обследования, подробно описанных в разделе методы и объекты исследования. Наиболее важными являются 8 основных характеристик, включающих оценку анатомического строения сетчатки и функциональной активности, а также методы субъективной оценки пациентами изменения зрения.

Приведены результаты патогенетического лечения первой группы пациентов, подробно приведены методы редактирования и заместительной терапии при мутациях в генах *RS1, RPGR, RPE65, CLN3, CDHR1, CNGA3, CNGB3, CEP290, EYS, USH2A, CRB1, NR2E3, RHO, C19orf12.*

Область молекулярной медицины и генного редактирования быстро развивается и дает надежду получить сравнимое по эффективности лечение при своевременной диагностике и лечении с такими патологиями, как катаракта, аномалии рефракции, теми областями офтальмологии, которые бурно развивались 20 – 30 лет назад, принеся малоинвазивные, безопасные и очень эффективные методы лечения.

Впервые в данной работе введены и адаптированы для клинического применения методология полуавтоматической кинетической периметрии, а также критерии оценки параметров темновой адаптации.

Наибольшего эффекта можно достичь, применяя таргетное лечение моногенных заболеваний сетчатки у детей при своевременной постановке диагноза, поэтому ранняя диагностика и современная своевременная дифференциальная диагностика являются залогом успеха лечения. При начале таргетного лечения в возрасте пациента до 10 лет эффективность сохранения и восстановления зрительных функций на 420% выше, чем если лечение проводится в возрасте старше 25 лет.

Наибольшую эффективность в лечении дают надежду таргетная генная терапия и применение iPSC (иППСК), выращенных из клеток самого пациента и редактирования генома этих стволовых клеток, для получения в дальнейшем здоровых клеток-потомков, дифференцирующихся в клетки сетчатки, после подавления их онкогенной активности и контроля их дифференцировки.

Если говорить о направлении исследований в этой области на ближайшие два десятилетия, то можно предполагать бурное развития области флуоресцентных белков, оптогенетических исследований, которые также относятся к направлению редактирования генома человека, хоть и не лишены своих недостатков (в виде повышенной иммуногенности). В данной области необходима объемная работа по стандартизации применяемых методик лечения и оценки результатов вмешательств. Требует решения ряд этических вопросов: редактирование соматических и герминальных клеток до внедрения в широкую практику методов лечения.

С учетом редкой встречаемости некоторых из форм моногенных заболеваний сетчатки будет крайне важно найти и обосновать наличие плейотропного эффекта уже разрабатываемых препаратов, так как это позволит дать надежду на лечение тем пациентам, для которых в связи с редкостью затраты на исследования и регистрацию препаратов не могут окупиться.

В работе проведен анализ рисков и подробный разбор встречавшихся побочных эффектов лечения в раннем и позднем послеоперационном периоде, а также предложены методики снижения осложнений.

В работе большое внимание уделяется in silico предсказанию эффективности разрабатываемых препаратов и развитию этой области знаний. С учетом развития информационных технологий также важно применять алгоритмы настройки и обучения нейросетей и AI (artificial intelligence) искусственного интеллекта в поиске путей сохранения и восстановления зрения.

С точки зрения организации медицинской помощи еще требуют решения вопросы создания, актуализации и методичного ведения реестров пациентов, формирование когорт и стратификации по группам, формировании диалога с Минздравом и взаимодействия исследовательских групп друг с другом. Важно разработать схемы финансирования лечения с привлечением государства для того, чтобы сделать лечение доступным для пациентов.

ВЫВОДЫ

1. По результатам генетического обследования пациентов были выявлены **54** новые патогенные мутации, ранее не описанные в мире, которые являются причинными в развитии моногенных заболеваний сетчатки.
2. Моногенная патология сетчатки характеризуется генетическими дефектами, которые приводят к тяжелым прогрессирующим угасаниям зрительных функций, с неизбежной инвалидностью. Изменения затрагивают поля зрения, остроту зрения и цветоощущение. Стандартная поддерживающая терапия не позволяет остановить прогрессирующее снижение зрения у этих пациентов.
3. На основе изучения патогенеза различных форм заболеваний сетчатки помимо замещения функции недостающих структурных белков необходимо применение методов, влияющих на активность регуляторных факторов и факторов транскрипции, в том числе активных в период эмбриогенеза органа зрения (EYS, CRB1).
4. В эксперименте показано, что для лечения моногенных заболеваний сетчатки в перспективе эффективно применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток после подавления и контроля их онкогенной активности.
5. Эффективность сохранения и восстановления зрительных функций при терапии мезенхимальными стволовыми клетками выше, чем при стандартной поддерживающей

терапии. Порог чувствительности палочек и колбочек в 1.35 раза увеличен в группе стандартного лечения, что доказывает функциональную несостоятельность фоторецепторов со временем при стандартной терапии.

6. Наблюдается стабильное повышение удовлетворенности пациентов качеством своего зрения и жизни в целом по результатам субъективных методов обследования в группе таргетного лечения (на 33%) по сравнению с группой стандартного лечения (снизилось на 15%). В группе лечения мезенхимальными стволовыми клетками субъективное состояние пациентов не меняется.
7. Эффективность применяемого лечения в возрастной группе 0 – 18 лет в 5,8 раз более эффективно сохраняет остроту зрения по результатам MLMT теста на подвижность по нескольким градациям яркости, чем в возрастной группе 40 – 65 лет. Успешность таргетного метода лечения зависит от ранней правильной диагностики моногенных заболеваний сетчатки на основе применения клинических рекомендаций. При начале таргетного лечения в возрасте пациента до 10 лет эффективность сохранения зрительных функций на 420% выше по данным собственных исследований, что соотносится с данными зарубежных исследований.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При проведении молекулярно-генетического подтверждения диагноза важно детальное описание манифестации, течения заболевания, семейного анамнеза, а также описание наличия или отсутствия синдромальных проявлений в совокупности с назначаемым методом обследования.
2. Важно своевременно назначать и проводить диагностику заболевания для более раннего назначения лечения в период терапевтического окна, когда лечение максимально эффективно.
3. Необходимо назначать максимально релевантное лечение, направленное на устранение причины развития заболевания.
4. Рекомендовано регулярное наблюдение пациентов, прошедших устраняющее причины развития заболевания лечение, для отслеживания динамики и предотвращения развития побочных эффектов и отсроченных осложнений лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баурина М.М., Шабанова М.Е., Красноштанова А.А., Панфилов В.И., Якубович Л.М. Комплексный препарат нуклеотидов широкого спектра действия – получение свойства применение. Бутлеровские сообщения. М. 2017. Т. 50. № 5. С. 100-108.
2. Жукова С.И., Пашковский А.А., Аверьянов Д.А., Малышев В.В. Способ лечения макулярного отека у больных пигментным ретинитом Патент на изобретение RU 2338496 C1 20.11.2008. Заявка № 2007105204/14 от 13.02.2007.
3. Зольникова И.В., Милаш С.В., Егорова И.В., Еремеева Е.А., Борисова С.А., Рогова С.Ю. Способ определения стадии пигментной и беспигментной формы пигментного ретинита Патент на изобретение RU 2707368 26.11.2019. Заявка № 2018139794 от 12.11.2018.
4. Зольникова И.В., Милаш С.В., Черняк А.Б., Егорова И.В., Рогатина Е.В., Еремеева Е.А., Рогова С.Ю. Толщина фоторецепторных слоев сетчатки хориоидеи и биоэлектрическая активность макулярной области при пигментном ретините. // Вестник офтальмологии. 2019. Т. 135. № 3. С. 39-45.
5. Зольникова И.В., Левина Д.В., Охоцимская Т.Д., Фадеева В.А., Егорова И.В., Рогатина Е.В., Еремеева Е.А., Деменкова О.Н., Рогова С.Ю. Электроретинография и ОКТ-ангиография сетчатки и зрительного нерва при пигментном ретините. // Российский офтальмологический журнал. 2017. Т. 10. № 3. С. 22-28.
6. Зольникова И.В., Киселева Т.Н., Иванова М.Е., Охоцимская Т.Д., Рогатина Е.В., Рамазанова К.А., Егорова И.В., Фадеева В.А., Еремеева Е.А., Левина Д.В., Деменкова О.Н., Рогова С.Ю. Аутофлюоресценция оптическая когерентная томография ОКТ-ангиография периметрия цветовое допплеровское картирование и импульсная допплерография в сравнении с электроретинографией при пигментном ретините. // Сборник трудов Российский общенациональный офтальмологический форум. М. 2017. Т. 1. С. 59-63.
7. Зольникова И.В., Кадышев В.В., Зинченко Р.А., и др. Внутрисемейный клинический полиморфизм при пигментном ретините RP25 при различных мутациях в гене EYS (описание клинических случаев). Точка зрения. Восток – Запад. М.2019. № 2. С. 94-97.
8. Зольникова И.В., Деменкова О.Н., Рогатина Е.В., Левина Д.В., Егорова И.В., Рогова С.Ю. Биоэлектрическая активность макулярной области сетчатки и световая чувствительность при пигментном ретините с атрофической макулопатией и кистозным макулярным отеком. // Российский офтальмологический журнал. 2016. Т. 9. № 1. С. 12-18.

9. Зольникова И.В., Иванова М.Е., Стрельников В.В., Деменкова О.Н., Танас А.С., Рогатина Е.В., Егорова И.В., Рогова С.Ю. Фенотипическая вариабельность клинико-функциональных проявлений синдрома Ашера 2А типа (USH2A) с молекулярно-генетической верификацией диагноза. // Российский офтальмологический журнал. 2014. 7. 2. С. 83-89
10. Зольникова И.В., Кадышев В.В., Зинченко Р.А., Егорова И.В. Палочково-колбочковая дистрофия с мутацией в гене *GUCY2D* (клинический случай). // Саратовский научно-медицинский журнал. 2018. 14. 4. С. 928-931.
11. Киселева Т.Н., Зольникова И.В., Деменкова О.Н., Рамазанова К.А., Егорова И.В., Рогатина Е.В., Рогова С.Ю. Особенности гемодинамики глаза и электрогенеза сетчатки при пигментном ретините. // Вестник офтальмологии. 2015. 131. 5. С. 14-19.
12. Кс С.К., Уоллэйс Д.М., Худ Д., Баррога Ш.Ф. Дикетоны и гидроксикетоны в качестве активатора сигнального пути катенина Патент на изобретение RU 2592694 C2 27.07.2016. Заявка № 2013111835/04 от 17.08.2011.
13. Мамедзаде А.Н., Касимов Э.М., Меджидова С.Р., Алиева Н.И. Результаты исследования глазного кровотока и показателей клеточного иммунитета при пигментном ретините. // Ультразвуковая и функциональная диагностика. 2015. 5S. С.108.
14. Нехорошева А.А., Попова Т.С., Батищева Ю.С., Колбенев И.О. Современные аспекты диагностики и мониторинга тапеторетинальной абиотрофии сетчатки. // Саратовский научно-медицинский журнал. 2017. 13. 2. С. 422-426.
15. Островский М.А., Каламкаров Г.Р. Молекулярные механизмы зрительной рецепции // М. 2002. Наука ISBN: 5-02-006420-3 279 С.
16. Першин Б.С., Масчан А.А., Смирнова А.Б. Зависимость клиники цитомегаловирусного ретинита от основного заболевания. // Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2019. 6. S1. С.109-110.
17. Сидоренко Е.И., Агаева Т.С., Талыбова С.Р. Патогенетическое лечение пигментного ретинита. // Сб. Пролиферативный синдром в биологии и медицине. Материалы II Российского конгресса с международным участием. М. 2016. С. 177-182.
18. Тахчиди Х.П., Качалина Г.Ф., Тахчиди Н.Х., Маноян Р.А., Глизница П.В. Клинико-функциональные результаты раннего послеоперационного периода у пациента с пигментным ретинитом после хирургической имплантации эпиретинального протеза ARGUS II. // Современные технологии в офтальмологии. 2018. 1. С. 346-350.
19. Хасиева Б.А. Наш опыт применения вазоактивных и ноотропных препаратов в комплексном лечении больных с тапеторетинальной абиотрофией сетчатки. // Офтальмология. 2017. 2. С. 67-71.

20. Шелудченко В.М., Будзинская М.В., Ронзина И.А., Смирнова Т.В. Эффективность новых технологий интраокулярного введения стволовых клеток в лечении пигментного ретинита. // Вестник офтальмологии. 2019. 135. № 5-2. С. 267-271.
21. Шлепотина Н.М., Пешикова М.В. Генетические аспекты пигментного ретинита. // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. 2019. Т. 2. № 3 (26). С. 48-52.
22. Ямамото С. Лечение пигментного ретинита. // Точка зрения. Восток – Запад. 2016. № 2. С. 84-85.
23. Abd El-Aziz M.M., Barragan I., O'Driscoll C.A., Goodstadt L., Prigmore E., Borrego S., Mena M., Pieras J.I., El-Ashry M.F., Safieh L.A., Shah A., Cheetham M.E., Carter N.P., Chakarova C., Ponting C.P., Bhattacharya S.S., Antinolo G. EYS encoding an ortholog of Drosophila unctaten is mutated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. // Nat Genet 2008. 40. P.1285-1287.
24. Abraham F.A., Ivry M., Tsvieli R. Sector retinitis pigmentosa: a fluorescein angiographic study. // Ophthalmologica. 1976. 172. P.287-297.
25. Abu-Safieh L., Alrashed M., Anazi S., Alkuraya H., Khan A.O., Al-Owain M., Al-Zahrani J., Al-Abdi L., Hashem M., Al-Tarimi S., Sebai M.A., Shamia A., Ray-Zack M.D., Nassan M., Al-Hassnan Z.N., Rahbeeni Z., Waheeb S., Alkharashi A., Abboud E., Al-Hazzaa S.A., Alkuraya F.S., Autozygome-guided exome sequencing in retinal dystrophy patients reveals pathogenetic mutations and novel candidate disease genes. // Genome Res. 2013. 23. 236-247.
26. Acharya S., Foletta V.C., Lee J.W., Rayborn M.E., Rodriguez I.R., Young W.S., 3rd Hollyfield J.G., SPACRCAN a novel human interphotoreceptor matrix hyaluronan-binding proteoglycan synthesized by photoreceptors and pinealocytes. // J. Biol. Chem. 2000. 275. 6945-6955.
27. Aizawa S., Mitamura Y., Baba T., Hagiwara A., Ogata K., Yamamoto S., Correlation between visual function and photoreceptor inner/outer segment junction in patients with retinitis pigmentosa. // Eye (Lond.) 2009. 23 304-308.
28. Ajmal M., Khan M.I., Neveling K., Khan Y.M., Azam M., Waheed N.K., Hamel C.P., Ben-Yosef T., De Baere E., Koenekoop R.K., Collin R.W., Qamar R., Cremers F.P., A missense mutation in the splicing factor gene DHX38 is associated with early-onset retinitis pigmentosa with macular coloboma. // J. Med. Genet. 2014. 51 P.444-448.
29. Al-Ubaidi M.R., Naash M.I., Conley S.M., A perspective on the role of the extracellular matrix in progressive retinal degenerative disorders. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.2013. 54 8119-8124.
30. Aleman T.S., Cideciyan A.V., Aguirre G.K., Huang W.C., Mullins C.L., Roman A.J., Sumaroka A., Olivares M.B., Tsai F.F., Schwartz S.B., Vandenberghe L.H., Limberis M.P., Stone E.M.,

Bell P., Wilson J.M., Jacobson S.G., Human CRB1-associated retinal degeneration: comparison with the rd8 Crb1-mutant mouse model. Invest. Ophthalmol. // Vis. Sci. 2011. 52 6898-6910.

31. Aleman T.S., Cideciyan A.V., Sumaroka A., Schwartz S.B., Roman A.J., Windsor E.A., Steinberg J.D., Branham K., Othman M., Swaroop A., Jacobson S.G., Inner retinal abnormalities in X-linked retinitis pigmentosa with RPGR mutations. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007. 48 P.4759-4765.
32. Alfano G., Kruczek P.M., Shah A.Z., Kramarz B., Jeffery G., Zelhof A.C., Bhattacharya S.S., EYS is a protein associated with the ciliary axoneme in rods and cones. // PloS One 2016. 11. P.397.
33. Ando M., Nishimura T., Yamazaki S., Yamaguchi T., Kawana-Tachikawa A., Hayama T., Nakauchi Y., Ando J., Ota Y., Takahashi S., Nishimura K., Ohtaka M., Nakanishi M., Miles J. J., Burrows S. R., Brenner M. K., Nakauchi H. A Safeguard System for Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Rejuvenated T Cell Therapy. // Stem cell reports. — 2015. — Vol. 5 no. 4. — P. 597—608. — doi:10.1016/j.stemcr.2015.07.011. — PMID 26321144
34. Arno G., Carss K.J., Hull S., Zihni C., Robson A.G., Fiorentino A., Hardcastle A.J., Holder G.E., Cheetham M.E., Plagnol V., Moore A.T., Raymond F.L., Matter K., Balda M.S., Webster A.R. Biallelic mutation of ARHGEF18 involved in the determination of epithelial apicobasal polarity causes adult-onset retinal degeneration. //Am. J. Hum. Genet. 2017. 100 P.334-342.
35. Arno G., Hull S., Robson A.G., Holder G.E., Cheetham M.E., Webster A.R., Plagnol V., Moore A.T., Lack of interphotoreceptor retinoid binding protein caused by homozygous mutation of RBP3 is associated with high myopia and retinal dystrophy. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. 56 P.2358-2365.
36. Auffarth G.U., Tetz M.R., Krastel H., Blankenagel A., Volcker H.E., [Complicated cataracts in various forms of retinitis pigmentosa. Type and incidence]. // Ophthalmologe 1997. 94 P. 642-646.
37. Avila-Fernandez A., Perez-Carro R., Corton M., Lopez-Molina M.I., Campello L., Garanto A., Fernandez-Sanchez L., Duijkers L., Lopez-Martinez M.A., Riveiro-Alvarez R., Da Silva L.R., Sanchez- Alcudia R., Martin-Garrido E., Reyes N., Garcia-Garcia F., Dopazo J., Garcia-Sandoval B., Collin R.W., Cuenca N., Ayuso C., Whole-exome sequencing reveals ZNF408 as a new gene associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa with vitreal alterations. // Hum. Mol. Genet. 2015. 24 P.4037-4048.
38. Bainbridge J.W., Smith A.J., Barker S.S., Robbie S., Henderson R., Balaggan K., Viswanathan A., Holder G.E., Stockman A., Tyler N., Petersen-Jones S., Bhattacharya S.S., Thrasher A.J., Fitzke F.W., Carter B.J., Rubin G.S., Moore A.T., Ali R.R. Effect of gene therapy on visual function in Leber’s congenital amaurosis. // N. Engl. J. Med. 2008. 358. P.2231-2239.

39. Bandah-Rozenfeld D., Collin R.W., Banin E., van den Born L.I., Coene K.L., Siemiatkowska A.M., Zelinger L., Khan M.I., Lefeber D.J., Erdinest I., Testa F., Simonelli F., Voesenek K., Blokland E.A., Strom T.M., Klaver C.C., Qamar R., Banfi S., Cremers F.P., Sharon D., den Hollander A.I., Mutations in IMPG2 encoding interphotoreceptor matrix proteoglycan 2 cause autosomal-recessive retinitis pigmentosa. // Am. J. Hum. Genet. 2010. 87 P.199-208.
40. Bandah-Rozenfeld D., Mizrahi-Meissonnier L., Farhy C., Obolensky A., Chowers I., Pe'er J., Merin S., Ben-Yosef T., Ashery-Padan R., Banin E., Sharon D., Homozygosity mapping reveals null mutations in FAM161A as a cause of autosomal-recessive retinitis pigmentosa. // Am. J. Hum. Genet. 2010. 87. P.382-391.
41. Bandah D., Merin S., Ashhab M., Banin E., Sharon D., The spectrum of retinal diseases caused by NR2E3 mutations in Israeli and Palestinian patients. // Arch. Ophthalmol. 2009. 127 P.297-302.
42. Ben-David U., Gan Q Golan-Lev T et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen cell. // Stem cell 2013. 12(2) P.167—179 doi:10.1016/j.stem.2012.11.015
43. Berbari N.F., O'Connor A.K., Haycraft C.J., Yoder B.K., The primary cilium as a complex signaling center. // Curr Biol. 2009. 19. P.526-535.
44. Bernal S.; Solans T.; Gamundi M.J.; Hernan I.; de Jorge L.; Carballo M.; Navarro R.; Tizzano E.; Ayuso C.; Baiget M. Analysis of the involvement of the NR2E3 gene in autosomal recessive retinal dystrophies. // Clin. Genet. 2008. 73 P.360–366
45. Berson E.L., Rosner B., Sandberg M.A., Hayes K.C., Nicholson B.W., Weigel-DiFranco C., Willett W., A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. // Arch. Ophthalmol. 1993. 111. P. 761-772.
46. Berson E.L., Rosner B., Weigel-DiFranco C., Dryja T.P., Sandberg M.A. Disease progression in patients with dominant retinitis pigmentosa and rhodopsin mutations. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002. 43. P.3027-3036.
47. Besharse J.C., Hollyfield J.G., Rayborn M.E., Turnover of rod photoreceptor outer segments. II. Membrane addition and loss in relationship to light. // J Cell Biol. 1977. 75 P.507-527.
48. Bhogaraju S., Cajanek L., Fort C., Blisnick T., Weber K., Taschner M., Mizuno N., Lamla S., Bastin P., Nigg E.A., Lorentzen E., Molecular basis of tubulin transport within the cilium by IFT74 and IFT81. // Science (80-) 2013. 341. P.1009-1012.
49. Bietti G. Su alcune forme atipiche o rare di degenerazione retinica (degenerazione tappetoretiniche e quadri morbosi similari). // Boll Oculist 1937. 16. P.1159-1244.
50. Birch D.G., Bennett L.D., Duncan J.L., Weleber R.G., Pennesi M.E., Long-term Follow-up of Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Intraocular Ciliary Neurotrophic Factor Implants.

// Am. J. Ophthalmol. 2016. 170 P.10-14.

51. Bittner A.K., Diener-West M., Dagnelie G., Characteristics and possible visual consequences of photopsias as vision measures are reduced in retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. 52. P.6370-6376.
52. Booij J.C., Florijn R.J., ten Brink J.B., Loves W., Meire F., van Schooneveld M.J., de Jong P.T., Bergen A.A., Identification of mutations in the AIPL1 CRB1 GUCY2D RPE65 and RPGRIP1 genes in patients with juvenile retinitis pigmentosa. // J. Med. Genet. 2005. 42. P.67.
53. Borooah S., Collins C., Wright A., Dhillon B., Late-onset retinal macular degeneration: clinical insights into an inherited retinal degeneration. // Br. J. Ophthalmol. 2009. 93. P.284-289.
54. Boughman J.A., Vernon M., Shaver K.A., Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. // J. Chronic Dis. 1983. 36. P.595-603.
55. Branham K., Yashar B.M. Providing comprehensive genetic-based ophthalmic care. // Clin. Genet. 2013. 84. P.183-189.
56. Brito-Garcia N., Del Pino-Sedeno T., Trujillo-Martin M.M., Coco R.M., Rodriguez de la Rua E., Del Cura-Gonzalez I., Serrano-Aguilar P. Effectiveness and safety of nutritional supplements in the treatment of hereditary retinal dystrophies: a systematic review. // Eye (Lond.) 2017. 31. P. 273-285.
57. Buchholz D. E., Hikita S. T., Rowland T. J., Friedrich A. M., Hinman C. R., Johnson L. V., Clegg D. O. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. // Stem cells (Dayton Ohio). — 2009. — Vol. 27 no. 10. — P. 2427—2434. — doi:10.1002/stem.189. — PMID 19658190
58. Bunker C.H., Berson E.L., Bromley W.C., Hayes R.P., Roderick T.H., Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. // Am. J. Ophthalmol. 1984. 97. P.357-365.
59. Burstedt M.S., Forsman-Semb K., Golovleva I., Janunger T., Wachtmeister L., Sandgren O., Ocular phenotype of Bothnia dystrophy an autosomal recessive retinitis pigmentosa associated with an R234W mutation in the RLBP1 gene. // Arch. Ophthalmol. 2001. 119. P.260-267.
60. Burstedt M.S., Sandgren O., Holmgren G., Forsman-Semb K., Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999. 40. P.995-1000.
61. Busskamp V., Picaud S., Sahel J.A., Roska B. Optogenetic therapy for retinitis pigmentosa. // Gene Ther. 2012. 19. P.169-175.
62. Carrigan M., Duignan E., Humphries P., Palfi A., Kenna P.F., Farrar G.J. A novel homozygous truncating GNAT1 mutation implicated in retinal degeneration. // Br. J. Ophthalmol. 2016. 100. P. 495-500.

63. Carss K.J., Arno G., Erwood M., Stephens J., Sanchis-Juan A., Hull S., Megy K., Grozeva D., Dewhurst E., Malka S., Plagnol V., Penkett C., Stirrups K., Rizzo R., Wright G., Josifova D., Bitner- Glindzicz M., Scott R.H., Clement E., Allen L., Armstrong R., Brady A.F., Carmichael J., Chitre M., Henderson R.H., Hurst J., MacLaren R.E., Murphy E., Paterson J., Rosser E., Thompson D.A., Wakeling E., Ouwehand W.H., Michaelides M., Moore A.T., Consortium N.I.-B.R.D., Webster A.R., Raymond F.L. Comprehensive rare variant analysis via whole-genome sequencing to determine the molecular pathology of inherited retinal disease. // Am. J. Hum. Genet. 2017. 100. P.75-90.

64. Cellini M., Strobbe E., Gizzi C., Campos E.C., ET-1 plasma levels and ocular blood flow in retinitis pigmentosa. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2010. 88 P.630-635.

65. Chakarova C.F., Papaioannou M.G., Khanna H., Lopez I., Waseem N., Shah A., Theis T., Friedman J., Maubaret C., Bujakowska K., Veraitch B., Abd El-Aziz M.M., Prescott de Q., Parapuram S.K., Bickmore W.A., Munro P.M., Gal A., Hamel C.P., Marigo V., Ponting C.P., Wissinger B., Zrenner E., Matter K., Swaroop A., Koenekoop R.K., Bhattacharya S.S., Mutations in TOPORS cause autosomal dominant retinitis pigmentosa with perivascular retinal pigment epithelium atrophy. // Am. J. Hum. Genet. 2007. 81 P.1098-1103.

66. Chakradhar S. An eye to the future: Researchers debate best path for stem cell-derived therapies. // Nat. Med. 2016. 22 P.116-119.

67. Charng J., Cideciyan A.V., Jacobson S.G., Sumaroka A., Schwartz S.B., Swider M., Roman A.J., Sheplock R., Anand M., Peden M.C., Khanna H., Heon E., Wright A.F., Swaroop A., Variegated yet non-random rod and cone photoreceptor disease patterns in RPGR-ORF15-associated retinal degeneration. // Hum. Mol. Genet. 2016. 25 P.5444-5459.

68. Chassine T., Bocquet B., Daien V., Avila-Fernandez A., Ayuso C., Collin R.W., Corton M., Hejtmancik J.F., van den Born L.I., Klevering B.J., Riazuddin S.A., Sendon N., Lacroux A., Meunier I., Hamel C.P. Autosomal recessive retinitis pigmentosa with RP1 mutations is associated with myopia. // Br. J. Ophthalmol. 2015. 99 P.1360-1365.

69. Chebil A., Touati S., Maamouri R., Kort F., El Matri L., Spectral Domain optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa. // Tunis. Med. 2016. 94 P.265-271.

70. Chen X., Sheng X., Liu X., Li H., Liu Y., Rong W., Ha S., Liu W., Kang X., Zhao K., Zhao C., Targeted next-generation sequencing reveals novel USH2A mutations associated with diverse disease phenotypes: implications for clinical and molecular diagnosis. // PloS One 2014. 9 P.439.

71. Cheng D.L., Greenberg P.B., Borton D.A. Advances in retinal prosthetic research: a systematic review of engineering and clinical characteristics of current prosthetic initiatives. // Curr. Eye

Res. 2017. 42 P.334-347.

72. Chih B., Liu P., Chinn Y., Chalouni C., Komuves L.G., Hass P.E., Sandoval W., Peterson A.S., A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. // Nat Cell Biol 2011. 14 P.61-72.
73. Choi J Lee S Mallard W. et al.. A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. // Nature Biotechnology. 2015. P.23 doi:10.1038/nbt.3388
74. Christensen S.T., Pedersen L.B., Schneider L., Satir P., Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease. // Traffic 2007. 8 P.97-109.
75. Chung D.C., McCague S., Yu Z.F. et al. Novel mobility test to assess functional vision in patients with inherited retinal dystrophies. // Clin Exp Ophthalmol. 2018. 46(3): P.247–259. Doi:10.1111/ceo.13022.
76. Cohen A.I. The fine structure of the extrafoveal receptors of the Rhesus monkey. // Exp Eye Res 1961. 1 P.128-136.
77. Cohen A.I., Some cytological and initial biochemical observations on photoreceptors in retinas of rds mice. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983. 24. P.832-843.
78. Collin R.W., Garanto A., Applications of antisense oligonucleotides for the treatment of inherited retinal diseases. // Curr. Opin. Ophthalmol. 2017. 28. P.260-266.
79. Collin R.W., Littink K.W., Klevering B.J., van den Born L.I., Koenekoop R.K., Zonneveld M.N., Blokland E.A., Strom T.M., Hoyng C.B., den Hollander A.I., Cremers F.P., Identification of a 2 Mb human ortholog of Drosophila eyes shut/unctaten that is mutated in patients with retinitis pigmentosa. // Am J Hum Genet 2008. 83 P.594-603.
80. Comander J., Weigel-DiFranco C., Maher M., Place E., Wan A., Harper S., Sandberg M.A., Navarro-Gomez D., Pierce E.A., The genetic basis of pericentral retinitis pigmentosa-a form of mild retinitis pigmentosa. // Genes (Basel) 2017. P.8.
81. Coppieters F., Leroy B.P., Beysen D., Hellemans J., De Bosscher K., Haegeman G., Robberecht K., Wuyts W., Coucke P.J., De Baere E. Recurrent mutation in the first zinc finger of the orphan nuclear receptor NR2E3 causes autosomal dominant retinitis pigmentosa. // Am. J. Hum. Genet. 2007. 81 P.147-157.
82. Cremers F.P., van de Pol D.J., van Driel M., den Hollander A.I., van Haren F.J., Knoers N.V., Tijmes N., Bergen A.A., Rohrschneider K., Blankenagel A., Pinckers A.J., Deutman A.F., Hoyng C.B. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. // Hum. Mol. Genet. 1998.7. P.355-362.
83. da Cruz L., Dorn J.D., Humayun M.S., Dagnelie G., Handa J., Barale P.O., Sahel J.A., Stanga

P.E., Hafezi F., Safran A.B., Salzmann J., Santos A., Birch D., Spencer R., Cideciyan A.V., de Juan E., Duncan J.L., Eliott D., Fawzi A., Olmos de Koo L.C., Ho A.C., Brown G., Haller J., Regillo C., Del Priore L.V., Arditi A., Greenberg R.J. Five-year safety and performance results from the ARGUS II retinal prosthesis system clinical trial. // Ophthalmology 2016. 123. P.2248-2254.

84. Cunningham J.J., Ulbright T.M., Pera M.F., Looijenga L.H. Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. // Nature Biotechnology. 2012. 30 P.849—857 doi:10.1038/nbt.2329
85. Daiger S.P., Rossiter B.J.F., Greenberg J., Christoffels A., Hide W. RetNet the Retinal Information Network. 2017.
86. Daiger S.P., Sullivan L.S., Bowne S.J., 2016. RetNet the Retinal Information Network.
87. Dalkara D., Kolstad K.D., Guerin K.I., Hoffmann N.V., Visel M., Klimczak R.R., Schaffer D.V., Flannery J.G., AAV mediated GDNF secretion from retinal glia slows down retinal degeneration in a rat model of retinitis pigmentosa. // Mol. Ther. 2011.19. P.1602-1608.
88. Davidson A.E., Millar I.D., Urquhart J.E., Burgess-Mullan R., Shweikh Y., Parry N., O'Sullivan J., Maher G.J., McKibbin M., Downes S.M., Lotery A.J., Jacobson S.G., Brown P.D., Black G.C., Manson F.D. Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein bestrophin-1 cause retinitis pigmentosa. // Am. J. Hum. Genet. 2009. 85. P.581-592.
89. de Crecchio G., Alfieri M.C., Cennamo G., D'Esposito F., Forte R., Pericentral pigmentary retinopathy: long-term follow-up. // Eye (Lond.) 2006. 20 P.1408-1410.
90. De Rojas J.O., Schuerch K., Mathews P.M., Cabral T., Hazan A., Sparrow J., Tsang S.H., Suh L.H., Evaluating structural progression of retinitis pigmentosa after cataract surgery. // Am. J. Ophthalmol. 2017. P.113
91. Deigner P.S., Law W.C., Canada F.J., Rando R.R., Membranes as the energy source in the endergonic transformation of vitamin A to 11-cis-retinol. // Science (80) 1989. 244 P.968-971.
92. Delori F.C., Dorey C.K., Staurenghi G., Arend O., Goger D.G., Weiter J.J., In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. 36 P.718-729.
93. DeLuca A.P., Whitmore S.S., Barnes J., Sharma T.P., Westfall T.A., Scott C.A., Weed M.C., Wiley J.S., Wiley L.A., Johnston R.M., Schnieders M.J., Lentz S.R., Tucker B.A., Mullins R.F., Scheetz T.E., Stone E.M., Slusarski D.C. Hypomorphic mutations in TRNT1 cause retinitis pigmentosa with erythrocytic microcytosis. // Hum. Mol. Genet. 2016. 25 P.44-56.
94. Demirci F.Y., Rigatti B.W., Mah T.S., Gorin M.B., A novel RPGR exon ORF15 mutation in a family with X-linked retinitis pigmentosa and Coats'-like exudative vasculopathy. // Am. J.

Ophthalmol. 2006. 141. P.208-210.

95. den Hollander A.I., Heckenlively J.R., van den Born L.I., de Kok Y.J., van der Velde-Visser S.D., Kellner U., Jurklies B., van Schooneveld M.J., Blankenagel A., Rohrschneider K., Wissinger B., Cruysberg J.R., Deutman A.F., Brunner H.G., Apfelstedt-Sylla E., Hoyng C.B., Cremers F.P., Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. // Am. J. Hum. Genet. 2001.69 P.198-203.
96. den Hollander A.I., Lopez I., Yzer S., Zonneveld M.N., Janssen I.M., Strom T.M., Hehir-Kwa J.Y., Veltman J.A., Arends M.L., Meitinger T., Musarella M.A., van den Born L.I., Fishman G.A., Maumenee I.H., Rohrschneider K., Cremers F.P., Koenekoop R.K., Identification of novel mutations in patients with Leber congenital amaurosis and juvenile RP by genome-wide homozygosity mapping with SNP microarrays. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007. 48 P.5690-5698.
97. den Hollander A.I., McGee T.L., Ziviello C., Banfi S., Dryja T.P., Gonzalez-Fernandez F., Ghosh D., Berson E.L. A homozygous missense mutation in the IRBP gene (RBP3) associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. 50 P.1864-1872.
98. Dessalces E., Bocquet B., Bourien J., Zanlonghi X., Verdet R., Meunier I., Hamel C.P., Early-onset foveal involvement in retinitis punctate albescens with mutations in RLBP1. // JAMA Ophthalmol. 2013. 131. P.1314-1323.
99. Dev Borman A., Ocaka L.A., Mackay D.S., Ripamonti C., Henderson R.H., Moradi P., Hall G., Black G.C., Robson A.G., Holder G.E., Webster A.R., Fitzke F., Stockman A., Moore A.T., Early onset retinal dystrophy due to mutations in LRAT: molecular analysis and detailed phenotypic study. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. 53 P.3927-3938.
100. Deveault C., Billingsley G., Duncan J.L., Bin J., Theal R., Vincent A., Fieggen K.J., Gerth C., Noordeh N., Traboulsi E.I., Fishman G.A., Chitayat D., Knueppel T., Millan J.M., Munier F.L., Kennedy D., Jacobson S.G., Innes A.M., Mitchell G.A., Boycott K., Heon E., BBS genotype-phenotype assessment of a multiethnic patient cohort calls for a revision of the disease definition. // Hum. Mutat. 2011. 32 P.610-619.
101. Dhodapkar MV Dhodapkar KM. Spontaneous and therapy-induced immunity to pluripotency genes in humans: clinical implications opportunities and challenges. // Cancer Immunol Immunother. 2011. 60. P.413-418
102. Dikopf M.S., Chow C.C., Mieler W.F., Tu E.Y. Cataract extraction outcomes and the prevalence of zonular insufficiency in retinitis pigmentosa. // Am. J. Ophthalmol. 2013. 156 P.82-88.

103. Ding J.D., Salinas R.Y., Arshavsky V.Y. Discs of mammalian rod photoreceptors form through the membrane evagination mechanism. // J. Cell Biol. 2015. 211. P.495-502.

104. Donders F., Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges. // Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 1857. 3. P.139-165.

105. Dryja T.P., McGee T.L., Reichel E., Hahn L.B., Cowley G.S., Yandell D.W., Sandberg M.A., Berson E.L. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. // Nature 1990. 343 P.364-366.

106. Duncker T., Tabacaru M.R., Lee W., Tsang S.H., Sparrow J.R., Greenstein V.C., Comparison of near-infrared and short-wavelength autofluorescence in retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. 54 P.585-591.

107. Eblimit A., Nguyen T.M., Chen Y., Esteve-Rudd J., Zhong H., Letteboer S., Van Reeuwijk J., Simons D.L., Ding Q., Wu K.M., Li Y., Van Beersum S., Moayedi Y., Xu H., Pickard P., Wang K., Gan L., Wu S.M., Williams D.S., Mardon G., Roepman R., Chen R., Spata7 is a retinal ciliopathy gene critical for correct RPGRIP1 localization and protein trafficking in the retina. // Hum. Mol. Genet. 2015. 24 P.1584-1601.

108. Edrington T.C.t., Lapointe R., Yeagle P.L., Gretzula C.L., Boesze-Battaglia K. Peripherin-2: an intracellular analogy to viral fusion proteins. // Biochemistry. 2007. 46. P.3605-3613.

109. Eichers E.R., Green J.S., Stockton D.W., Jackman C.S., Whelan J., McNamara J.A., Johnson G.J., Lupski J.R., Katsanis N., Newfoundland rod-cone dystrophy an early-onset retinal dystrophy is caused by splice-junction mutations in RLBP1. // Am. J. Hum. Genet. 2002. 70. P.955-964.

110. Emmer B.T., Maric D., Engman D.M., Molecular mechanisms of protein and lipid targeting to ciliary membranes. // J Cell. Sci. 2010. 123 P.529-536.

111. Escher P., Tran H.V., Vaclavik V., Borruat F.X., Schorderet D.F., Munier F.L. Double concentric autofluorescence ring in NR2E3-p.G56R-linked autosomal dominant retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012.53 P.4754-4764.

112. Estrada-Cuzcano A., Koenekoop R.K., Senechal A., De Baere E.B., de Ravel T., Banfi S., Kohl S., Ayuso C., Sharon D., Hoyng C.B., Hamel C.P., Leroy B.P., Ziviello C., Lopez I., Bazinet A., Wissinger B., Sliesoraityte I., Avila-Fernandez A., Littink K.W., Vingolo E.M., Signorini S., Banin E., Mizrahi-Meissonnier L., Zrenner E., Kellner U., Collin R.W., den Hollander A.I., Cremers F.P., Klevering B.J., BBS1 mutations in a wide spectrum of phenotypes ranging from nonsyndromic retinitis pigmentosa to Bardet-Biedl syndrome. // Arch. Ophthalmol. 2012. 130 P.1425-1432.

113. Estrada-Cuzcano A., Roepman R., Cremers F.P., den Hollander A.I., Mans D.A., Non-

syndromic retinal ciliopathies: translating gene discovery into therapy. // Hum. Mol. Genet. 2012 P.332.

114. Faktorovich E.G., Steinberg R.H., Yasumura D., Matthes M.T., LaVail M.M., Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. // Nature. 1990. 347 P.83-86.

115. Falsini B., Galli-Resta L., Fadda A., Ziccardi L., Piccardi M., Iarossi G., Resta G., Long-term decline of central cone function in retinitis pigmentosa evaluated by focal electroretinogram. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. 53 P.7701-7709.

116. Fetter R.D., Corless J.M. Morphological components associated with frog cone outer segment disc margins. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.1987. 28 P.646-657.

117. Flaxel C.J., Jay M., Thiselton D.L., Nayudu M., Hardcastle A.J., Wright A., Bird A.C., Difference between RP2 and RP3 phenotypes in X linked retinitis pigmentosa. // Br. J. Ophthalmol. 1999. 83 P.1144-1148.

118. Flynn M.F., Fishman G.A., Anderson R.J., Roberts D.K., Retrospective longitudinal study of visual acuity change in patients with retinitis pigmentosa. // Retina 2001. 21 P.639-646.

119. Foletta V.C., Nishiyama K., Rayborn M.E., Shadrach K.G., Young W.S., 3rd Hollyfield J.G. SPACRCAN in the developing retina and pineal gland of the rat: spatial and temporal pattern of gene expression and protein synthesis. // J Comp Neurol. 2001. 435 P.354-363.

120. Fujiwara K., Ikeda Y., Murakami Y., Funatsu J., Nakatake S., Tachibana T., Yoshida N., Nakao S., Hisatomi T., Yoshida S., Yoshitomi T., Ishibashi T., Sonoda K.H., Risk factors for posterior subcapsular cataract in retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2017. 58 P.2534-2537.

121. Fujiwara K., Ikeda Y., Murakami Y., Nakatake S., Tachibana T., Yoshida N., Nakao S., Hisatomi T., Yoshida S., Yoshitomi T., Sonoda K.H., Ishibashi T., Association between aqueous flare and epiretinal membrane in retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. 57 P.4282-4286.

122. Garcia-Gonzalo F.R., Corbit K.C., Sirerol-Piquer M.S., Ramaswami G., Otto E.A., Noriega T.R., Seol A.D., Robinson J.F., Bennett C.L., Josifova D.J., Garcia-Verdugo J.M., Katsanis N., Hildebrandt F., Reiter J.F. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. // Nat Genet 2011. 43 P.776-784.

123. Georgiou M., Kalitzeos A., Patterson E.J., Dubra A., Carroll J., Michaelides M. Adaptive optics imaging of inherited retinal diseases. // Br. J. Ophthalmol. 2017. P.34-42

124. Georgiou M Litts KM Kalitzeos A Langlo CS Kane T Singh N Kassilian M Hirji N Kumaran N Dubra A Carroll J Michaelides M. Adaptive Optics Retinal Imaging in CNGA3-Associated Achromatopsia: Retinal Characterization Interocular Symmetry and Intrafamilial

Variability. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2019. 60. P.383-396. Doi: 10.1167/iovs.18-25880. PMID: 30682209; PMCID: PMC6354941.

125. Ghazi N.G., Abboud E.B., Nowilaty S.R., Alkuraya H., Alhommadi A., Cai H., Hou R., Deng W.T., Boye S.L., Almaghamsi A., Al Saikhan F., Al-Dhibi H., Birch D., Chung C., Colak D., LaVail M.M., Vollrath D., Erger K., Wang W., Conlon T., Zhang K., Hauswirth W., Alkuraya F.S., Treatment of retinitis pigmentosa due to MERTK mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: results of a phase I trial. // Hum. Genet. 2016. 135 P.327-343.

126. Godino L., Turchetti D., Jackson L., Hennessy C., Skirton H. Impact of presymptomatic genetic testing on young adults: a systematic review. Eur. J. Hum. Genet. 24 496-503. Goldberg A.F., Moritz O.L., Williams D.S., 2016. Molecular basis for photoreceptor outer segment architecture. // Prog. Retin. Eye Res. 2016. 55 P.52-81.

127. Goldberg N.R., Greenberg J.P., Laud K., Tsang S., Freund K.B. Outer retinal tubulation in degenerative retinal disorders. // Retina. 2013. 33. P.1871-1876.

128. Gonzalez-Fernandez F., Evolution of the visual cycle: the role of retinoid-binding proteins. // J Endocrinol. 2002. 175 P.75-88..

129. Greenstein V.C., Duncker T., Holopigian K., Carr R.E., Greenberg J.P., Tsang S.H., Hood D.C., Structural and functional changes associated with normal and abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa. // Retina 2012. 32 P.349-357.

130. Grover S., Fishman G.A., Brown J., Jr. Frequency of optic disc or parapapillary nerve fiber layer drusen in retinitis pigmentosa. // Ophthalmology 1997. 104 P.295-298.

131. Grunwald J.E., Maguire A.M., Dupont J. Retinal hemodynamics in retinitis pigmentosa. // Am. J. Ophthalmol. 1996. 122 P.502-508.

132. Habibi I., Chebil A., Kort F., Schorderet D.F., El Matri L., Exome sequencing confirms ZNF408 mutations as a cause of familial retinitis pigmentosa. // Ophthalmic Genet. 2017. P.1-4.

133. Haer-Wigman L., van Zelst-Stams W.A., Pfundt R., van den Born L.I., Klaver C.C., Verheij J.B., Hoyng C.B., Breuning M.H., Boon C.J., Kievit A.J., Verhoeven V.J., Pott J.W., Sallevelt S.C., van Hagen J.M., Plomp A.S., Kroes H.Y., Lelieveld S.H., Hehir-Kwa J.Y., Castelein S., Nelen M., Scheffer H., Lugtenberg D., Cremers F.P., Hoefsloot L., Yntema H.G., Diagnostic exome sequencing in 266 Dutch patients with visual impairment. // Eur. J. Hum. Genet. 2017. 25 P.591-599.

134. Haeseleer F., Huang J., Lebioda L., Saari J.C., Palczewski K., Molecular characterization of a novel short-chain dehydrogenase/reductase that reduces all-trans-retinal. // J Biol Chem

1998. 273 P.21790- 21799.

135. Haeseleer F., Sokal I., Li N., Pettenati M., Rao N., Bronson D., Wechter R., Baehr W., Palczewski K., Molecular characterization of a third member of the guanylyl cyclase-activating protein subfamily. // J. Biol. Chem. 1999. 274 P.6526-6535.

136. Hafler B.P., Comander J., Weigel DiFranco C., Place E.M., Pierce E.A. Course of Ocular Function in PRPF31 Retinitis Pigmentosa. // Semin. Ophthalmol. 2016. 31 P.49-52.

137. Hageman G.S., Johnson L.V., Structure composition and function of the retinal interphotoreceptor matrix in: Osborne N., Chader G. (Eds.) // Retinal Research. Pergamon Press New York 1991. P.207-249.

138. Hageman G.S., Marmor M.F., Yao X.Y., Johnson L.V., The interphotoreceptor matrix mediates primate retinal adhesion. // Arch Ophthal 1995. 113 P.655-660.

139. Hagiwara A., Yamamoto S., Ogata K., Sugawara T., Hiramatsu A., Shibata M., Mitamura Y. Macular abnormalities in patients with retinitis pigmentosa: prevalence on OCT examination and outcomes of vitreoretinal surgery. // Acta Ophthalmol 2011. 89 P.122-125.

140. Hajali M., Fishman G.A., Anderson R.J., The prevalence of cystoid macular oedema in retinitis pigmentosa patients determined by optical coherence tomography. // Br. J. Ophthalmol. 2008. 92 P.1065-1068.

141. Hamel C. Retinitis pigmentosa. // Orphanet J. Rare Dis. 2006. 1 P.40.

142. Hamel C.P. Cone rod dystrophies. // Orphanet J. Rare Dis. 2007. 2. P.7.

143. Hanein S., Perrault I., Gerber S., Tanguy G., Rozet J.M., Kaplan J. Leber congenital amaurosis: survey of the genetic heterogeneity refinement of the clinical definition and phenotype- genotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. Clinical and molecular survey in LCA. // Adv. Exp. Med. Biol. 2006. 572. P.15-20.

144. Hao L., Thein M., Brust-Mascher I., Civelekoglu-Scholey G., Lu Y., Acar S., Prevo B., Shaham S., Scholey J.M., Intraflagellar transport delivers tubulin isotypes to sensory cilium middle and distal segments. // Nat Cell Biol 2011. 13. P.790-798.

145. Hauswirth W.W., Aleman T.S., Kaushal S., Cideciyan A.V., Schwartz S.B., Wang L., Conlon T.J., Boye S.L., Flotte T.R., Byrne B.J., Jacobson S.G. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. // Hum. Gene Ther. 2019. P.979-990.

146. Hayashi K., Hayashi H., Matsuo K., Nakao F., Hayashi F., Anterior capsule contraction and intraocular lens dislocation after implant surgery in eyes with retinitis pigmentosa. Ophthalmology 1998. 105. P.1239-1243.

147. Heckenlively J.R., 1988. Retinitis Pigmentosa. J.B. Lippincott Company

Philedelphia. Heckenlively J.R., Rodriguez J.A., Daiger S.P., Autosomal dominant sectoral retinitis pigmentosa: two families with transversion mutation in codon 23 of rhodopsin. // Arch. Ophthalmol. 1991. 109 P.84-91.

148. Heckenlively J.R., Yoser S.L., Friedman L.H., Oversier J.J., Clinical findings and common symptoms in retinitis pigmentosa. // Am. J. Ophthalmol. 1988. 105. P.504-511.

149. Hellner K.A., Rickers J., Familiary bilateral segmental retinopathia pigmentosa. // Ophthalmologica 1973. 166 P.327-341.

150. Henderson R.H., Mackay D.S., Li Z., Moradi P., Sergouniotis P., Russell-Eggitt I., Thompson D.A., Robson A.G., Holder G.E., Webster A.R., Moore A.T., Phenotypic variability in patients with retinal dystrophies due to mutations in CRB1. // Br. J. Ophthalmol. 2011. 95 P.811-817.

151. Hendriks M., Verhoeven V.J.M., Buitendijk G.H.S., Polling J.R., Meester-Smoor M.A., Hofman A., Consortium R.D., Kamermans M., Ingeborgh van den Born L., Klaver C.C.W., Development of refractive errors – what can we learn from inherited retinal dystrophies? // Am. J. Ophthalmol. 2017. P.23

152. Herse P., 2005. Retinitis pigmentosa: visual function and multidisciplinary management. Clin. Exp. Optom. 88 335-350. Hildebrandt F., Benzing T., Katsanis N. // Ciliopathies. N. Engl. J. Med. 2011.364 P.1533-1543.

153. Hipp S., Zobor G., Glockle N., Mohr J., Kohl S., Zrenner E., Weisschuh N., Zobor D. Phenotype variations of retinal dystrophies caused by mutations in the RLBP1 gene. // Acta Ophthalmol 2015. 93 P.281-286.

154. Hollyfield J.G. Hyaluronan and the functional organization of the interphotoreceptor matrix. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.1999. 40 P.2767-2769.

155. Holopigian K., Greenstein V., Seiple W., Carr R.E., Rates of change differ among measures of visual function in patients with retinitis pigmentosa. // Ophthalmology 1996. 103 P.398-405.

156. Hood D.C., Assessing retinal function with the multifocal technique. // Prog. Retin. Eye Res. 2000. 19 P.607-646.

157. Huang H., Wang Y., Chen H., Chen Y., Wu J., Chiang P.W., Fan N., Su Y., Deng J., Chen D., Li Y., Zhang X., Zhang M., Liang S., Banerjee S., Qi M., Liu X., Targeted next generation sequencing identified novel mutations in RPGRIP1 associated with both retinitis pigmentosa and Leber’s congenital amaurosis in unrelated Chinese patients. // Oncotarget. 2017. P.43

158. Huang Q., Chen R., Lin X., Xiang Z. Efficacy of carbonic anhydrase inhibitors in

management of cystoid macular edema in retinitis pigmentosa: A meta-analysis. // PloS One 2017. 12 P.180.

159. Huang X.F., Wu J., Lv J.N., Zhang X., Jin Z.B. Identification of false-negative mutations missed by next-generation sequencing in retinitis pigmentosa patients: a complementary approach to clinical genetic diagnostic testing. // Genet. Med. 2015. 17 P.307-311.

160. Huckfeldt R.M., Comander J., Management of cystoid macular edema in retinitis pigmentosa. // Semin. Ophthalmol. 2017. 32 P.43-51.

161. Hunter J.J., Morgan J.I., Merigan W.H., Sliney D.H., Sparrow J.R., Williams D.R., The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. // Prog. Retin. Eye Res. 2012. 31 P.28- 42.

162. Husain N., Pellikka M., Hong H., Klimentova T., Choe K.M., Clandinin T.R., Tepass U. The agrin/perlecan-related protein eyes shut is essential for epithelial lumen formation in the Drosophila retina. // Dev Cell 2006. 11 P.483-493.

163. Hwang Y.H., Kim S.W., Kim Y.Y., Na J.H., Kim H.K., Sohn Y.H. Optic nerve head retinal nerve fiber layer and macular thickness measurements in young patients with retinitis pigmentosa. // Curr. Eye Res. 2012. 37 P.914-920.

164. Ikeda Y., Yoshida N., Murakami Y., Nakatake S., Notomi S., Hisatomi T., Enaida H., Ishibashi T. Long-term Surgical Outcomes of Epiretinal Membrane in Patients with Retinitis Pigmentosa. // Sci. Rep. 2015. 5 P.13078.

165. Illmensee K., Mintz B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1976. — Vol. 73 no. 2. — P. 549—553. — PMID 1061157

166. Inatani M., Tanihara H. Proteoglycans in retina. // Prog Retin Eye Res 2002. 21 P.429-447.

167. Ivanova ME Zolnikova IV Gorgisheli KV Atarshchikov DS Ghosh P Barh B: Novel frameshift mutation in NYX gene in a Russian family with complete congenital stationary night blindness. // Ophthalmic Genetics 2019. P.143 DOI: 10.1080/13816810.2019.1698617

168. Ivanova ME Trubilin VN Atarshchikov DS Demchinsky AM Strelnikov VV Tanas AS Orlova OM Machalov AS Overchenko KV Markova TV Golenkova DM Anoshkin KI Volodin IV Zaletaev DV Pulin AA Nadelyaeva II Kalinkin AI Barh B Genetic screening of Russian Usher syndrome patients toward selection for gene therapy. // Ophthalmic genetics journal. 2018 P.1–8 https://doi.org/10.1080/13816810.2018.1532527

169. Ivanova ME Atarshchikov DS Pomerantseva EA Tolmacheva ER Konovalov FA Strelnikov VV Kurishev AO Barh D. Whole exome sequencing reveals novel EYS mutations in Russian patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci..

2020. P.134

170. Ishikawa M., Sawada Y., Yoshitomi T. Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells. // Exp Eye Res 2015. 133 P.3-18.

171. Jackson H., Garway-Heath D., Rosen P., Bird A.C., Tuft S.J. Outcome of cataract surgery in patients with retinitis pigmentosa. // Br. J. Ophthalmol. 2001. 85 P.936-938.

172. Jaissle G.B., May C.A., van de Pavert S.A., Wenzel A., Claes-May E., Giessl A., Szurman P., Wolfrum U., Wijnholds J., Fischer M.D., Humphries P., Seeliger M.W. Bone spicule pigment formation in retinitis pigmentosa: insights from a mouse model. // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2010. 248 P.1063-1070.

173. Jin H., White S.R., Shida T., Schulz S., Aguiar M., Gygi S.P., Bazan J.F., Nachury M.V. The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. // Cell 2010. 141 P.1208-1219.

174. Kajiwara K., Sandberg M.A., Berson E.L., Dryja T.P., A null mutation in the human peripherin/RDS gene in a family with autosomal dominant retinitis punctate albescens. // Nat. Genet. 1993. 3. P.208-212.

175. Kanan Y., Hoffhines A., Rauhauser A., Murray A., Al-Ubaidi M.R. Protein tyrosine-O-sulfation in the retina. // Exp Eye Res 2009. 89 P.559-567.

176. Kashani A.H., Chen C.L., Gahm J.K., Zheng F., Richter G.M., Rosenfeld P.J., Shi Y., Wang R.K. Optical coherence tomography angiography: A comprehensive review of current methods and clinical applications. // Prog. Retin. Eye Res. 2017. 60. P.66-100.

177. Kaylor J.J., Cook J.D., Makshanoff J., Bischoff N., Yong J., Travis G.H., Identification of the 11-cis-specific retinyl-ester synthase in retinal Muller cells as multifunctional O-acyltransferase (MFAT). // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2014. 111 P.7302- 7307.

178. Kaylor J.J., Yuan Q., Cook J., Sarfare S., Makshanoff J., Miu A., Kim A., Kim P., Habib S., Roybal C.N., Xu T., Nusinowitz S., Travis G.H., Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Muller glial cells of the retina. // Nat Chem Biol. 2013. 9. P.30-36.

179. Keilhauer C.N., Delori F.C. Near-infrared autofluorescence imaging of the fundus: visualization of ocular melanin. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006. 47. P.3556-3564.

180. Khan J.A., Ide C.H., Strickland M.P. Coats'-type retinitis pigmentosa. // Surv. Ophthalmol. 1988. 32 P.317-332.

181. Kolb H. S-Cone Pathways in: Kolb H., Fernandez E., Nelson R. (Eds.) Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. // Salt Lake City (UT). 1995. P.447

182. Kolmel H.W. Visual illusions and hallucinations. // Baillieres Clin. Neurol. 1993. 2.

P.243-264.

183. Kozminski K.G., Johnson K.A., Forscher P., Rosenbaum J.L., A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993. 90. P.5519-5523.

184. Krantz E.M., Cruickshanks K.J., Klein B.E., Klein R., Huang G.H., Nieto F.J., Measuring refraction in adults in epidemiological studies. // Arch. Ophthalmol. 2010. 128 P.88-92.

185. Kubo T., Brown J.M., Bellve K., Craige B., Craft J.M., Fogarty K., Lechtreck K.F., Witman G.B. Together the IFT81 and IFT74 N-termini form the main module for intraflagellar transport of tubulin. // J Cell Sci 2016. 129 P.2106-2119.

186. Kumaran N., Moore A.T., Weleber R.G., Michaelides M. Leber congenital amaurosis/early- onset severe retinal dystrophy: clinical features molecular genetics and therapeutic interventions. // Br. J. Ophthalmol. 2017. 101 P.1147-1154.

187. Kuroda M., Hirami Y., Hata M., Mandai M., Takahashi M., Kurimoto Y., Intraretinal hyperreflective foci on spectral-domain optical coherence tomographic images of patients with retinitis pigmentosa. // Clin. Ophthalmol. 2014. 8. P.435-440.

188. Lazarus H.S., Hageman G.S. Xyloside-induced disruption of interphotoreceptor matrix proteoglycans results in retinal detachment. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.1992. 33. P.364-376.

189. Lenassi E., Troeger E., Wilke R., Hawlina M., Correlation between macular morphology and sensitivity in patients with retinitis pigmentosa and hyperautofluorescent ring. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. 53 P.47-52.

190. Lenzi L., Coassin M., Lambiase A., Bonini S., Amendola T., Aloe L., Effect of exogenous administration of nerve growth factor in the retina of rats with inherited retinitis pigmentosa. // Vision Res. 2005. 45 P.1491-1500.

191. Leroux M.R.,Taking vesicular transport to the cilium. // Cell 2007. 129 P.1041-1043.

192. Li Y., Chan L., Nguyen H.V., Tsang S.H., Personalized medicine: cell and gene therapy based on patient-specific iPSC-derived retinal pigment epithelium cells. // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. 854 P.549-555.

193. Li Z.Y., Possin D.E., Milam A.H., Histopathology of bone spicule pigmentation in retinitis pigmentosa. // Ophthalmology 1995. 102 P.805-816.

194. Liang F.Q., Aleman T.S., Dejneka N.S., Dudus L., Fisher K.J., Maguire A.M., Jacobson S.G., Bennett J. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. // Mol. Ther. 2001. 4 P.461-472.

195. Liew G., Moore A.T., Webster A.R., Michaelides M. Efficacy and prognostic factors of response to carbonic anhydrase inhibitors in management of cystoid macular edema in retinitis

pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. 56 P.1531-1536.

196. Lima L.H., Cella W., Greenstein V.C., Wang N.K., Busuioc M., Smith R.T., Yannuzzi L.A., Tsang S.H., Structural assessment of hyperautofluorescent ring in patients with retinitis pigmentosa. // Retina 2009. 29. P.1025-1031.

197. Littink K.W., van den Born L.I., Koenekoop R.K., Collin R.W., Zonneveld M.N., Blokland E.A., Khan H., Theelen T., Hoyng C.B., Cremers F.P., den Hollander A.I., Klevering B.J., Mutations in the EYS gene account for approximately 5% of autosomal recessive retinitis pigmentosa and cause a fairly homogeneous phenotype. // Ophthalmology 2010. 117. P.2021-2027.

198. Littink K.W., van Genderen M.M., van Schooneveld M.J., Visser L., Riemslag F.C., Keunen J.E., Bakker B., Zonneveld M.N., den Hollander A.I., Cremers F.P., van den Born L.I. A homozygous frameshift mutation in LRAT causes retinitis punctate albescens. // Ophthalmology 2012. 119 P.1899-1906.

199. Liu G., Du Q., Keyal K., Wang F. Morphologic characteristics and clinical significance of the macular-sparing area in patients with retinitis pigmentosa as revealed by multicolor imaging. // Exp. Ther. Med. 2017. 14 P.5387-5394.

200. Liu G., Liu X., Li H., Du Q., Wang F. Optical coherence tomographic analysis of retina in retinitis pigmentosa patients. // Ophthalmic Res. 2016.56 P.111-122.

201. Liu J., Itagaki Y., Ben-Shabat S., Nakanishi K., Sparrow J.R. The biosynthesis of A2E a fluorophore of aging retina involves the formation of the precursor A2-PE in the photoreceptor outer segment membrane. // J Biol Chem 2000. 275 P.29354-29360.

202. Liu Q., Lyubarsky A., Skalet J.H., Pugh E.N., Jr., Pierce E.A. RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.2003. 44 P.4171-4183.

203. Liu Q., Zuo J., Pierce E.A., The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule- associated protein. // J. Neurosci. 2004. 24 P.6427-6436.

204. Lois N., Forrester J.V., Fundus Autofluorescence Second ed. Wolters Kluwer. Lorenz B., Wabbels B., Wegscheider E., Hamel C.P., Drexler W., Preising M.N., 2004. Lack of fundus autofluorescence to 488 nanometers from childhood on in patients with early-onset severe retinal dystrophy associated with mutations in RPE65. // Ophthalmology 111 2015. P.1585-1594.

205. Lu Z., Hu X., Liu F., Soares D.C., Liu X., Yu S., Gao M., Han S., Qin Y., Li C., Jiang T., Luo D., Guo A.Y., Tang Z., Liu M. Ablation of EYS in zebrafish causes mislocalisation of outer segment proteins F-actin disruption and cone-rod dystrophy. // Sci Rep 2017. 7 P.46098.

206. Ma L., Sheng X.L., Li H.P., Zhang F.X., Liu Y.N., Rong W.N., Zhang J.L., Identification of a novel p.R1443W mutation in RP1 gene associated with retinitis pigmentosa sine pigmento.

// Int J Ophthalmol 2013. 6 P.430-435.

207. Mackay D.S., Dev Borman A., Moradi P., Henderson R.H., Li Z., Wright G.A., Waseem N., Gandra M., Thompson D.A., Bhattacharya S.S., Holder G.E., Webster A.R., Moore A.T., RDH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description. // Mol. Vis. 2011. 17 P.2706-2716.

208. MacLaren R.E., Groppe M., Barnard A.R., Cottriall C.L., Tolmachova T., Seymour L., Clark K.R., During M.J., Cremers F.P., Black G.C., Lotery A.J., Downes S.M., Webster A.R., Seabra M.C., Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase ½ clinical trial. // Lancet 2014. 383 P.1129-1137.

209. Maguire A.M., Simonelli F., Pierce E.A., Pugh E.N., Jr., Mingozzi F., Bennicelli J., Banfi S., Marshall K.A., Testa F., Surace E.M., Rossi S., Lyubarsky A., Arruda V.R., Konkle B., Stone E., Sun J., Jacobs J., Dell'Osso L., Hertle R., Ma J.X., Redmond T.M., Zhu X., Hauck B., Zelenaia O., Shindler K.S., Maguire M.G., Wright J.F., Volpe N.J., McDonnell J.W., Auricchio A., High K.A., Bennett J. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. // N. Engl. J. Med. 2008. 358. P.2240- 2248.

210. Makiyama Y., Oishi A., Otani A., Ogino K., Nakagawa S., Kurimoto M., Yoshimura N. Prevalence and spatial distribution of cystoid spaces in retinitis pigmentosa: investigation with spectral domain optical coherence tomography. // Retina 2014. 34 P.981-988.

211. Mantyjarvi M., Tuppurainen K. Clinical symptoms at different ages in autosomal dominant retinitis pigmentosa. A family study in three generations. // Ophthalmologica 1994. 208. P.23-28.

212. Martin G. R. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. // Science (New York N.Y.). — 1980. — Vol. 209 no. 4458. — P. 768—776. — PMID 6250214

213. Marc R.E., Jones B.W., Watt C.B., Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration. // Prog. Retin. Eye Res. 2003. 22. P.607-655.

214. Mark A. Fields John Hwang Jie Gong Hui Cai and Lucian V. Chapter 1: The Eye as a Target Organ for Stem Cell Therapy // Stem Cell Biology and Regenerative Medicine in Ophthalmology. — Springer 2013. — P. 1—30. — ISBN 9781461454939

215. Marmor M.F., Yao X.Y., Hageman G.S. Retinal adhesiveness in surgically enucleated human eyes. // Retina 1994. 14 P.181-186.

216. Massof R.W., Finkelstein D., Starr S.J., Kenyon K.R., Fleischman J.A., Maumenee I.H. Bilateral symmetry of vision disorders in typical retinitis pigmentosa. // Br. J. Ophthalmol. 1979. 63 P.90-96.

217. Mata N.L., Radu R.A., Clemmons R.C., Travis G.H. Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight.

// Neuron 2002. 36. P.69- 80.

218. Mathijssen I.B., Florijn R.J., van den Born L.I., Zekveld-Vroon R.C., Ten Brink J.B., Plomp A.S., Baas F., Meijers-Heijboer H., Bergen A.A., van Schooneveld M.J., Long-term follow-up of patients with retinitis pigmentosa type 12 caused by CRB1 mutations: a severe phenotype with considerable interindividual variability. // Retina 2017. 37 P.161-172.

219. Matsui R., Cideciyan A.V., Schwartz S.B., Sumaroka A., Roman A.J., Swider M., Huang W.C., Sheplock R., Jacobson S.G., Molecular Heterogeneity Within the Clinical Diagnosis of Pericentral Retinal Degeneration. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2015. 56 P.6007-6018.

220. Mauthner L. Ein Fall von Choroideremia. // Berl Natur-med Ver Innsbruck 1872. 2 191 p.

221. McCulloch D.L., Marmor M.F., Brigell M.G., Hamilton R., Holder G.E., Tzekov R., Bach M., ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). // Doc. Ophthalmol. 2015. 130 P.1-12.

222. Megaw R.D., Soares D.C., Wright A.F., RPGR: Its role in photoreceptor physiology human disease and future therapies. // Exp. Eye Res. 2015. 138 P.32-41.

223. Messias K., Jagle H., Saran R., Ruppert A.D., Siqueira R., Jorge R., Messias A., Psychophysically determined full-field stimulus thresholds (FST) in retinitis pigmentosa: relationships with electroretinography and visual field outcomes. // Doc. Ophthalmol. 2013. 127 P.123-129.

224. Milam A.H., Li Z.Y., Fariss R.N., Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. // Prog. Retin. Eye Res. 1998. 17 P.175-205.

225. Milhavet O., & Lemaitre J. M. Senescent-Derived Pluripotent Stem Cells Are Able to Redifferentiate into Fully Rejuvenated Cells. // In Tumor Dormancy Quiescence and Senescence 2014 2 P. 265—276. Springer Netherlands. Doi:10.1007/978-94-007-7726-2_25

226. Mills J.O., Jalil A., Stanga P.E., Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present. // Eye (Lond.) 2017. 79 p.

227. Mintz B., Cronmiller C., Custer R. P. Somatic cell origin of teratocarcinomas. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 1978. — Vol. 75 no. 6. — P. 2834—2838. — PMID 275854

228. Mockel A., Perdomo Y., Stutzmann F., Letsch J., Marion V., Dollfus H. Retinal dystrophy in Bardet-Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. // Prog. Retin. Eye Res. 2011. 30 P.258-274.

229. Moiseyev G., Chen Y., Takahashi Y., Wu B.X., Ma J.X., RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. // Proc Natl Acad Sci U S A 2005. 102 P.12413-12418.

230. Morimoto T., Fujikado T., Choi J.S., Kanda H., Miyoshi T., Fukuda Y., Tano Y., Transcorneal electrical stimulation promotes the survival of photoreceptors and preserves retinal function in royal college of surgeons rats. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007. 48 P.4725-4732.

231. Morimura H., Berson E.L., Dryja T.P., Recessive mutations in the RLBP1 gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctate albescens. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999. 40 P.1000-1004.

232. Mourao A., Christensen S.T., Lorentzen E., The intraflagellar transport machinery in ciliary signaling. // Curr Opin Struct Biol 2016. 41 P.98-108.

233. Mourao A., Nager A.R., Nachury M.V., Lorentzen E., Structural basis for membrane targeting of the BBSome by ARL6. // Nat Struct Mol Biol 2014. 21 P.1035-1041.

234. Mukhopadhyay R., Holder G.E., Moore A.T., Webster A.R., Unilateral retinitis pigmentosa occurring in an individual with a germline mutation in the RP1 gene. // Arch. Ophthalmol. 2011. 129 P.954-956.

235. Murakami T., Akimoto M., Ooto S., Suzuki T., Ikeda H., Kawagoe N., Takahashi M., Yoshimura N., Association between abnormal autofluorescence and photoreceptor disorganization in retinitis pigmentosa. // Am. J. Ophthalmol. 2008. 145 P.687-694.

236. Murphy D., Singh R., Kolandaivelu S., Ramamurthy V., Stoilov P., Alternative splicing shapes the phenotype of a mutation in BBS8 to cause nonsyndromic retinitis pigmentosa. // Mol. Cell. Biol. 2015. 35 P.1860-1870.

237. Na K.H., Kim H.J., Kim K.H., Han S., Kim P., Hann H.J., Ahn H.S., prevalence age at diagnosis mortality and cause of death in retinitis pigmentosa in korea – a nationwide population-based study. // Am. J. Ophthalmol. 2017. P.34

238. Nachury M.V., Loktev A.V., Zhang Q., Westlake C.J., Peranen J., Merdes A., Slusarski D.C., Scheller R.H., Bazan J.F., Sheffield V.C., Jackson P.K., A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. // Cell 2007. 129 P.1201-1213.

239. Nachury M.V., Seeley E.S., Jin H. Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier? // Annu Rev Cell Dev Biol 2010. 26 P.59-87.

240. Nager A.R., Goldstein J.S., Herranz-Perez V., Portran D., Ye F., Garcia-Verdugo J.M., Nachury M.V. An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. // Cell 2017. 168 P.252-263.

241. Nagy D., Schonfisch B., Zrenner E., Jagle H., Long-term follow-up of retinitis pigmentosa patients with multifocal electroretinography. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008.

49 P.4664-4671.

242. Nakamura Y., Mitamura Y., Hagiwara A., Kumagai K., Miura G., Sugawara T., Egawa M., Yamamoto S. Relationship between retinal microstructures and visual acuity after cataract surgery in patients with retinitis pigmentosa. // Br. J. Ophthalmol. 2015. 99 P.508-511.

243. Nangia V., Jonas J.B., Khare A., Sinha A. Prevalence of retinitis pigmentosa in India: the Central India Eye and Medical Study. // Acta Ophthalmol 2012. 90 P.649-650.

244. Nishiguchi K.M., Tearle R.G., Liu Y.P., Oh E.C., Miyake N., Benaglio P., Harper S., Koskiniemi- Kuendig H., Venturini G., Sharon D., Koenekoop R.K., Nakamura M., Kondo M., Ueno S., Yasuma T.R., Beckmann J.S., Ikegawa S., Matsumoto N., Terasaki H., Berson E.L., Katsanis N., Rivolta C. Whole genome sequencing in patients with retinitis pigmentosa reveals pathogenic DNA structural changes and NEK2 as a new disease gene. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013. 110 P.16139-16144.

245. Novak-Lauŝ K., Kukulj S., Zorić-Geber M., Bastaić O. Primary tapetoretinal dystrophies as the cause of blindness and impaired vision in the republic of Croatia. // Acta Clin. Croat. 2002. 41 P.23-27.

246. O'Hare F., Bentley S.A., Wu Z., Guymer R.H., Luu C.D., Ayton L.N., Charles Bonnet syndrome in advanced retinitis pigmentosa. // Ophthalmology 2015. 122 P.1951-1953.

247. Oishi A., Ogino K., Makiyama Y., Nakagawa S., Kurimoto M., Yoshimura N., Wide-field fundus autofluorescence imaging of retinitis pigmentosa. // Ophthalmology 2013. 120 P.1827-1834.

248. Okoye G., Zimmer J., Sung J., Gehlbach P., Deering T., Nambu H., Hackett S., Melia M., Esumi N., Zack D.J., Campochiaro P.A., Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. // J. Neurosci. 2003. 23 P.4164-4172.

249. Ovelgün R.F., Nyctalopia haereditaria. // Acta physico-medica Academiae Caesareae Leopoldino- Carolinae (Norimbergae) 1744. 7 P.76-77.

250. Pagon R.A. Retinitis pigmentosa. // Surv. Ophthalmol. 1988. 33 P.137-177.

251. Park H. S., Hwang I., Choi K. A., Jeong H., Lee J. Y., & Hong S. Generation of induced pluripotent stem cells without genetic defects by small molecules. // Biomaterials. 2015. 39 P.47-58 doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.055

252. Pearlman J.T., Flood T.P., Seiff S.R. Retinitis pigmentosa without pigment. // Am. J. Ophthalmol. 1976. 81 P.417-419.

253. Peng B., Xiao J., Wang K., So K.F., Tipoe G.L., Lin B. Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa. // J. Neurosci. 2014. 34 P.8139-8150.

254. Penn J.S., Li S., Naash M.I. Ambient hypoxia reverses retinal vascular attenuation in a transgenic mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000. 41 P.4007-4013.

255. Pierrache L.H.M., Kimchi A., Ratnapriya R., Roberts L., Astuti G.D.N., Obolensky A., Beryozkin A., Tjon-Fo-Sang M.J.H., Schuil J., Klaver C.C.W., Bongers E., Haer-Wigman L., Schalij N., Breuning M.H., Fischer G.M., Banin E., Ramesar R.S., Swaroop A., van den Born L.I., Sharon D., Cremers F.P.M., Whole-exome sequencing identifies biallelic IDH3A variants as a cause of retinitis pigmentosa accompanied by pseudocoloboma. // Ophthalmology. 2017. P.22

256. Pinckers A., van Aarem A., Keunen J.E. Colour vision in retinitis pigmentosa. Influence of cystoid macular edema. // Int. Ophthalmol. 1993. 17 P.143-146.

257. Pokorny J., Smith V., Verriest G., Pinckers A., Congenital and a Acquired Color Vision Defects. // Grune & Stratton New York. 1979. - 378 p.

258. Pretorius P.R., Aldahmesh M.A., Alkuraya F.S., Sheffield V.C., Slusarski D.C. Functional analysis of BBS3 A89V that results in non-syndromic retinal degeneration. // Hum Mol Genet 2011. 20 P.1625-1632.

259. Priya S., Nampoothiri S., Sen P., Sripriya S. Bardet-Biedl syndrome: Genetics molecular pathophysiology and disease management. // Indian J. Ophthalmol. 2016. 64 P.620-627.

260. Pugh E.N., Jr. RGS expression level precisely regulates the duration of rod photoresponses. // Neuron 2006. 51. P.391-393.

261. Rackham O. J., Firas J., Fang H., Oates M. E., Holmes M. L., Knaupp A. S., Suzuki H., Nefzger C. M., Daub C. O., Shin J. W., Petretto E., Forrest A. R., Hayashizaki Y., Polo J. M., Gough J. A predictive computational framework for direct reprogramming between human cell types. // Nature genetics. — 2016. — Vol. 48 no. 3. — P. 331—335. — doi:10.1038/ng.3487. — PMID 26780608

262. Rais Y., Zviran A., Geula S., Gafni O., Chomsky E., Viukov S., Mansour A. A., Caspi I., Krupalnik V., Zerbib M., Maza I., Mor N., Baran D., Weinberger L., Jaitin D. A., Lara-Astiaso D., Blecher-Gonen R., Shipony Z., Mukamel Z., Hagai T., Gilad S., Amann-Zalcenstein D., Tanay A., Amit I., Novershtern N., Hanna J. H. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. // Nature. — 2013. — Vol. 502 no. 7469. — P. 65—70. — doi:10.1038/nature12587. — PMID 24048479

263. Ratnam K., Carroll J., Porco T.C., Duncan J.L., Roorda A. Relationship between foveal cone structure and clinical measures of visual function in patients with inherited retinal degenerations. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. 54 P.5836-5847.

264. Rattner A., Smallwood P.M., Nathans J. Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments the visual cycle enzyme that reduces all-trans- retinal to all-trans-retinol. // J Biol Chem 2000. 275 P.11034-11043.

265. Rayapudi S., Schwartz S.G., Wang X., Chavis P., Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa. // Cochrane Database Syst Rev 2013. Cd008428.

266. Reiter J.F., Leroux M.R., Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. P.334-42

267. Rhodes J.M., Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. // J Cell Mol Med. 2007. 11 P.176-205.

268. Riazifar H.; Jia Y.; Chen J.; Lynch G.; Huang T. Chemically induced specification of retinal ganglion cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells. // Stem Cells Transl Med. 2014 3 P.424–432.

269. Riazuddin S.A., Iqbal M., Wang Y., Masuda T., Chen Y., Bowne S., Sullivan L.S., Waseem N.H., Bhattacharya S., Daiger S.P., Zhang K., Khan S.N., Riazuddin S., Hejtmancik J.F., Sieving P.A., Zack D.J., Katsanis N. A splice-site mutation in a retina-specific exon of BBS8 causes nonsyndromic retinitis pigmentosa. // Am J Hum Genet 2010. 86 P.805-812.

270. Robson A.G., Lenassi E., Saihan Z., Luong V.A., Fitzke F.W., Holder G.E., Webster A.R. Comparison of fundus autofluorescence with photopic and scotopic fine matrix mapping in patients with retinitis pigmentosa: 4- to 8-year follow-up. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. 53 P.6187-6195.

271. Robson A.G., Tufail A., Fitzke F., Bird A.C., Moore A.T., Holder G.E., Webster A.R. Serial imaging and structure-function correlates of high-density rings of fundus autofluorescence in retinitis pigmentosa. // Retina 2011. 31 P.1670-1679.

272. Roepman R., Wolfrum U. Protein networks and complexes in photoreceptor cilia. Subcell. // Biochem. 2007. 43 P.209-235.

273. Rosenbaum J.L., Witman G.B. Intraflagellar transport. // Nat Rev Mol Cell Biol. 2002. 3 P.813-825.

274. Russell S., Bennett J., Wellman J.A., Chung D.C., Yu Z.F., Tillman A., Wittes J., Pappas J., Elci O., McCague S., Cross D., Marshall K.A., Walshire J., Kehoe T.L., Reichert H., Davis M., Raffini L., George L.A., Hudson F.P., Dingfield L., Zhu X., Haller J.A., Sohn E.H., Mahajan V.B., Pfeifer W., Weckmann M., Johnson C., Gewaily D., Drack A., Stone E., Wachtel K., Simonelli F., Leroy B.P., Wright J.F., High K.A., Maguire A.M. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2- hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a punctatein controlled open-label phase 3 trial. // Lancet. 2017. 390 P.849-860.

275. Saari J.C., Bredberg D.L. Lecithin-retinol acyltransferase in retinal pigment epithelial microsomes. // J Biol Chem. 1989. 264 P.8636-8640.

276. Saari J.C., Nawrot M., Kennedy B.N., Garwin G.G., Hurley J.B., Huang J., Possin D.E., Crabb J.W. Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. // Neuron 2001. 29 P.739-748.

277. Saari J.C., Nawrot M., Stenkamp R.E., Teller D.C., Garwin G.G. Release of 11-cis-retinal from cellular retinaldehyde-binding protein by acidic lipids. // Mol Vis. 2009. 15 P.844-854.

278. Sahu B., Maeda A. Retinol dehydrogenases regulate vitamin a metabolism for visual function. // Nutrients. 2016. P.34

279. Saishin Y., Ishikawa R., Ugawa S., Guo W., Ueda T., Morimura H., Kohama K., Shimizu H., Tano Y., Shimada S. Retinal fascin: functional nature subcellular distribution and chromosomal localization. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.2000. 41 P.2087-2095.

280. Salinas R.Y., Pearring J.N., Ding J.D., Spencer W.J., Hao Y., Arshavsky V.Y. Photoreceptor discs form through peripherin-dependent suppression of ciliary ectosome release. // J. Cell Biol. 2017. 216 P.1489-1499.

281. Sandberg M.A., Brockhurst R.J., Gaudio A.R., Berson E.L. The association between visual acuity and central retinal thickness in retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005. 46 P.3349- 3354.

282. Sandberg M.A., Brockhurst R.J., Gaudio A.R., Berson E.L. Visual acuity is related to parafoveal retinal thickness in patients with retinitis pigmentosa and macular cysts. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008. 49 P.4568-4572.

283. Sandberg M.A., Rosner B., Weigel-DiFranco C., Dryja T.P., Berson E.L. Disease course of patients with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR gene mutations. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007. 48 P.1298-1304.

284. Sandberg M.A., Rosner B., Weigel-DiFranco C., McGee T.L., Dryja T.P., Berson E.L., Disease course in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa due to the USH2A gene. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2008. 49 P.5532-5539.

285. Sang L., Miller J.J., Corbit K.C., Giles R.H., Brauer M.J., Otto E.A., Baye L.M., Wen X., Scales S.J., Kwong M., Huntzicker E.G., Sfakianos M.K., Sandoval W., Bazan J.F., Kulkarni P., Garcia-Gonzalo F.R., Seol A.D., O'Toole J.F., Held S., Reutter H.M., Lane W.S., Rafiq M.A., Noor A., Ansar M., Devi A.R., Sheffield V.C., Slusarski D.C., Vincent J.B., Doherty D.A., Hildebrandt F., Reiter J.F., Jackson P.K., Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. // Cell 2011. 145 P.513-528.

286. Satir P., Christensen S.T. Structure and function of mammalian cilia. // Histochem. Cell

Biol. 2008. 129 P.687-693.

287. Sato M., Nakazawa M., Usui T., Tanimoto N., Abe H., Ohguro H. Mutations in the gene coding for guanylate cyclase-activating protein 2 (GUCA1B gene) in patients with autosomal dominant retinal dystrophies. // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2005. 243 P.235-242.

288. Sayadi J., Miere A., Souied E.H., Cohen S.Y., Type 3 Neovascularization Associated with Retinitis Pigmentosa. // Case Rep Ophthalmol 2017. 8 P.245-249.

289. Schatz A., Pach J., Gosheva M., Naycheva L., Willmann G., Wilhelm B., Peters T., Bartz-Schmidt K.U., Zrenner E., Messias A., Gekeler F. Transcorneal electrical stimulation for patients with retinitis pigmentosa: a prospective randomized sham-controlled follow-up study over 1 year. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2017. 58. P.257-269.

290. Schatz A., Rock T., Naycheva L., Willmann G., Wilhelm B., Peters T., Bartz-Schmidt K.U., Zrenner E., Messias A., Gekeler F., Transcorneal electrical stimulation for patients with retinitis pigmentosa: a prospective randomized sham-controlled exploratory study. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. 52 P.4485-4496.

291. Scholey J.M. Intraflagellar transport. Annu Rev Cell Dev Biol. 2003. 19 P.423-443.

292. Scholl H.P., Strauss R.W., Singh M.S., Dalkara D., Roska B., Picaud S., Sahel J.A. Emerging therapies for inherited retinal degeneration. // Sci. Transl. Med. 2016. 8 P.368.

293. Schon M., 1828. Handbuch der pathologischen Anatomie des menschliches Auges Hamburg // West Germany. 380 P.

294. Schuerch K., Woods R.L., Lee W., Duncker T., Delori F.C., Allikmets R., Tsang S.H., Sparrow J.R. Quantifying Fundus Autofluorescence in Patients With Retinitis Pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2017. 58 P.1843-1855.

295. Schuster A., Janecke A.R., Wilke R., Schmid E., Thompson D.A., Utermann G., Wissinger B., Zrenner E., Gal A. The phenotype of early-onset retinal degeneration in persons with RDH12 mutations. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2007. 48 P.1824-1831.

296. Schwarz N., Lane A., Jovanovich K., Parfitt D.A., Aguila M., Thompson C.L., da Cruz L., Coffey P.J., Chapple J.P., Hardcastle A.J., Cheetham M.E., Arl3 and RP2 regulate the trafficking of ciliary tip kinesins. // Hum. Mol. Genet. 2017. P.156

297. Seiler M.J., Aramant R.B. Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants. // Prog. Retin. Eye Res. 2012. 31 P.661-687.

298. Sergott R.C. Retinal segmentation using multicolor laser imaging. // J. Neuroophthalmol. 2014. 34 Suppl S24-28.

299. Shevach E., Ali M., Mizrahi-Meissonnier L., McKibbin M., El-Asrag M., Watson C.M., Inglehearn C.F., Ben-Yosef T., Blumenfeld A., Jalas C., Banin E., Sharon D. Association

between missense mutations in the BBS2 gene and nonsyndromic retinitis pigmentosa. // JAMA Ophthalmol 2015. 133 P.312-318.

300. Shields C.L., Kaliki S., Al-Dahmash S., Rojanaporn D., Shukla S.Y., Reilly B., Shields J.A. Retinal vasoproliferative tumors: comparative clinical features of primary vs secondary tumors in 334 cases. // JAMA Ophthalmol. 2013. 131 P.328-334.

301. Shoughy S.S., Arevalo J.F., Kozak I. Update on wide- and ultra-widefield retinal imaging. // Indian J. Ophthalmol. 2015. 63 P.575-581.

302. Singla V., Reiter J.F., The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. // Science (80-) 2006. 313 P.629-633.

303. Sjostrand F.S. The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. // J Cell Comp Physiol. 1953. 42 P.15-44.

304. Sokolov M., Lyubarsky A.L., Strissel K.J., Savchenko A.B., Govardovskii V.I., Pugh E.N., Jr., Arshavsky V.Y. Massive light-driven translocation of punctateng between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. // Neuron 2002. 34 P.95-106.

305. Sorrentino F.S., Bonifazzi C., Perri P. The Role of the Endothelin System in the Vascular Dysregulation Involved in Retinitis Pigmentosa. // J Ophthalmol 2015 P.405234.

306. Souied E., Soubrane G., Benlian P., Coscas G.J., Gerber S., Munnich A., Kaplan J., Retinitis punctate albescens associated with the Arg135Trp mutation in the rhodopsin gene. // Am. J. Ophthalmol. 1996. 121 P.19-25.

307. Stecher H., Gelb M.H., Saari J.C., Palczewski K., Preferential release of 11-cis-retinol from retinal pigment epithelial cells in the presence of cellular retinaldehyde-binding protein. // The Journal of biological chemistry 1999. 274 P.8577-8585.

308. Stingl K., Schippert R., Bartz-Schmidt K.U., Besch D., Cottriall C.L., Edwards T.L., Gekeler F., Greppmaier U., Kiel K., Koitschev A., Kuhlewein L., MacLaren R.E., Ramsden J.D., Roider J., Rothermel A., Sachs H., Schroder G.S., Tode J., Troelenberg N., Zrenner E. Interim results of a multicenter trial with the new electronic subretinal implant alpha AMS in 15 patients blind from inherited retinal degenerations. // Front. Neurosci. 2017. 11 P.445.

309. Stevens L. C. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. // Developmental biology. — 1970. — Vol. 21 no. 3. — P. 364—382. — PMID 5436899

310. Stewart C. L., Vanek M., Wagner E. F. Expression of foreign genes from retroviral vectors in mouse teratocarcinoma chimaeras. // The EMBO journal. — 1985. — Vol. 4 no. 13B. — P. 3701—3709. — PMID 2419128

311. Stone J.L., Barlow W.E., Humayun M.S., de Juan E., Jr., Milam A.H., Morphometric analysis of macular photoreceptors and ganglion cells in retinas with retinitis pigmentosa. // Arch. Ophthalmol. 1992. 110 P.1634-1639.

312. Strobbe E., Cellini M., Fresina M., Campos E.C., 2015. ET-1 plasma levels aqueous flare and choroidal thickness in patients with retinitis pigmentosa. // J Ophthalmol 2015 P.292615.

313. Stryer L. Cyclic GMP cascade of vision. // Annu. Rev. Neurosci. 1986. 9 P.87-119.

314. Sujirakul T., Davis R., Erol D., Zhang L., Schillizzi G., Royo-Dujardin L., Shen S., Tsang S. Bilateral concordance of the fundus hyperautofluorescent ring in typical retinitis pigmentosa patients. // Ophthalmic Genet. 2015. 36 P.113-122.

315. Sullivan L.J., Makris G.S., Dickinson P., Mulhall L.E., Forrest S., Cotton R.G., Loughnan M.S. A new codon 15 rhodopsin gene mutation in autosomal dominant retinitis pigmentosa is associated with sectorial disease. // Arch. Ophthalmol. 1993. 111 P.1512-1517.

316. Sullivan L.S., Koboldt D.C., Bowne S.J., Lang S., Blanton S.H., Cadena E., Avery C.E., Lewis R.A., Webb-Jones K., Wheaton D.H., Birch D.G., Coussa R., Ren H., Lopez I., Chakarova C., Koenekoop R.K., Garcia C.A., Fulton R.S., Wilson R.K., Weinstock G.M., Daiger S.P. A dominant mutation in hexokinase 1 (HK1) causes retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2014. 55 P.7147-7158.

317. Sun L.W., Johnson R.D., Langlo C.S., Cooper R.F., Razeen M.M., Russillo M.C., Dubra A., Connor T.B., Jr., Han D.P., Pennesi M.E., Kay C.N., Weinberg D.V., Stepien K.E., Carroll J. Assessing Photoreceptor Structure in Retinitis Pigmentosa and Usher Syndrome. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. 57 P.2428-2442.

318. Szamier R.B. Ultrastructure of the preretinal membrane in retinitis pigmentosa. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1981. 21 P.227-236.

319. Tachibanaki S., Arinobu D., Shimauchi-Matsukawa Y., Tsushima S., Kawamura S. Highly effective phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase 7 of light-activated visual pigment in cones. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005. 102 P.9329- 9334.

320. Tachibanaki S., Tsushima S., Kawamura S. Low amplification and fast visual pigment phosphorylation as mechanisms characterizing cone photoresponses. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001. 98 P.14044-14049.

321. Takao D., Verhey K.J. Gated entry into the ciliary compartment. // Cell. Mol. Life Sci. 2016. 73 P.119- 127.

322. Talib M., van Schooneveld M.J., van Genderen M.M., Wijnholds J., Florijn R.J., Ten Brink J.B., Schalij-Delfos N.E., Dagnelie G., Cremers F.P., Wolterbeek R., Fiocco M., Thiadens

A.A., Hoyng C.B., Klaver C.C., Bergen A.A., Boon C.J. Genotypic and phenotypic characteristics of CRB1-associated retinal dystrophies: a long-term follow-up study. // Ophthalmology. 2017. P.178

323. Tamaki M., Matsuo T. Optical coherence tomographic parameters as objective signs for visual acuity in patients with retinitis pigmentosa future candidates for retinal prostheses. // J Artif Organs 2011. 14 P.140-150.

324. Tang P.H., Kono M., Koutalos Y., Ablonczy Z., Crouch R.K. New insights into retinoid metabolism and cycling within the retina. // Prog Retin Eye Res 2013. 32 P.48-63.

325. Tang Z., Zhang Y., Wang Y., Zhang D., Shen B., Luo M., Gu P. Progress of stem/progenitor cell-based therapy for retinal degeneration. // J. Transl. Med. 2017. 15 P.99.

326. Taschner M., Bhogaraju S., Lorentzen E., Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. // Differentiation 2012. 83 S12-22.

327. Teussink M.M., Lambertus S., de Mul F.F., Rozanowska M.B., Hoyng C.B., Klevering B.J., Theelen T. Lipofuscin-associated photo-oxidative stress during fundus autofluorescence imaging. // PloS One 2017. 12 P.635.

328. Thobani A., Fishman G.A. The use of carbonic anhydrase inhibitors in the retreatment of cystic macular lesions in retinitis pigmentosa and X-linked retinoschisis. // Retina 2011. 31 P.312-315.

329. Tokuzawa Y., Kaiho E., Maruyama M., Takahashi K., Mitsui K., Maeda M., Niwa H., Yamanaka S. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. // Molecular and cellular biology. — 2003. — Vol. 23 no. 8. — P. 2699—2708. — PMID 12665572

330. Trehan A., Canada F.J., Rando R.R. Inhibitors of retinyl ester formation also prevent the biosynthesis of 11-cis-retinol. // Biochemistry 1990. 29 P.309-312.

331. Triolo G., Pierro L., Parodi M.B., De Benedetto U., Gagliardi M., Manitto M.P., Bandello F. Spectral domain optical coherence tomography findings in patients with retinitis pigmentosa. // Ophthalmic Res. 2013. 50 P.160-164.

332. Tubb B.E., Bardien-Kruger S., Kashork C.D., Shaffer L.G., Ramagli L.S., Xu J., Siciliano M.J., Bryan J. Characterization of human retinal fascin gene (FSCN2) at 17q25: close physical linkage of fascin and cytoplasmic actin genes. // Genomics 2000. 65 P.146-156.

333. Tucker B.A.; Scheetz T.E.; Mullins R.F.; DeLuca A.P.; Hoffmann J.M.; Johnston R.M.; Jacobson S.G.; Sheffield V.C.; Stone E.M. Exome sequencing and analysis of induced pluripotent stem cells identify the cilia-related gene male germ cell-associated kinase (MAK) as a cause of retinitis pigmentosa. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011 108 E569–E576

334. Tucker B.A.; Cranston C.M.; Anfinson K.A.; Shrestha S.; Streb L.M.; Leon A.; Mullins R.F.; Stone E.M. Using patient-specific induced pluripotent stem cells to interrogate the pathogenicity of a novel retinal pigment epithelium-specific 65 kDa cryptic splice site mutation and confirm eligibility for enrollment into a clinical gene augmentation trial. // Transl Res. 2015 166 P.740–749.e1.

335. Ueda K.; Onishi A.; Ito S.-I.; Nakamura M.; Takahashi M. Generation of three-dimensional retinal organoids expressing rhodopsin and S- and M-cone opsins from mouse stem cells. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018 495 P.2595–2601.

336. Valverde D., Vazquez-Gundin F., del Rio E., Calaf M., Fernandez J.L., Baiget M., Analysis of the IRBP gene as a cause of RP in 45 ARRP Spanish families. Autosomal recessive retinitis pigmentosa. Interstitial retinol binding protein. Spanish Multicentric and Multidisciplinary Group for Research into Retinitis Pigmentosa. // Ophthalmic Genet. 1998. 19 P.197-202.

337. van den Born L.I., van Soest S., van Schooneveld M.J., Riemslag F.C., de Jong P.T., Bleeker-Wagemakers E.M. Autosomal recessive retinitis pigmentosa with preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium. // Am. J. Ophthalmol. 1994. 118 P.430-439.

338. van Huet R.A., Collin R.W., Siemiatkowska A.M., Klaver C.C., Hoyng C.B., Simonelli F., Khan M.I., Qamar R., Banin E., Cremers F.P., Theelen T., den Hollander A.I., van den Born L.I., Klevering B.J. IMPG2-associated retinitis pigmentosa displays relatively early macular involvement. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2014. 55 P.3939-3953.

339. Van Woerkom C., Ferrucci S. Sector retinitis pigmentosa. // Optometry 2005. 76 P.309-317.

340. Venco P., Bonora M., Giorgi C. et. al. Mutations of C19orf12 coding for a transmembrane glycine zipper containing mitochondrial protein cause mis-localization of the protein inability to respond to oxidative stress and increased mitochondrial Ca2+ // Front. Genet., 2015. P.334 doi.org/10.3389/fgene.2015.00185

341. Verbakel SK van Huet RAC Boon CJF den Hollander AI Collin RWJ Klaver CCW Hoyng CB Roepman R Klevering BJ. Non-syndromic retinitis pigmentosa. // Prog Retin Eye Res. 2018 66: P.157-186. Doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.03.005. PMID: 29597005.

342. Verhagen F., Kuiper J., Nierkens S., Imhof S.M., Radstake T., de Boer J. Systemic inflammatory immune signatures in a patient with CRB1 linked retinal dystrophy. // Expert Rev. Clin. Immunol. 2016. 12 P.1359-1362.

343. Von Ammon F.A., 1838. Klinische Darstellungen der Krankheiten und Bildungsfehler des menschlichen Auges. G Reimer Berlin. von Ruckmann A., Fitzke F.W., Bird A.C. Distribution of pigment epithelium autofluorescence in retinal disease state recorded in vivo and

its change over time. // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 1999. 237 P.1-9.

344. Wachtmeister L. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. // Prog. Retin. Eye Res. 1998. 17 P.485-521.

345. Wagner S.K., Jolly J.K., Pefkianaki M., Gekeler F., Webster A.R., Downes S.M., Maclaren R.E. Transcorneal electrical stimulation for the treatment of retinitis pigmentosa: results from the TESOLAUK trial. // BMJ Open Ophthalmol. 2017. P.2.

346. Wakabayashi T., Sawa M., Gomi F., Tsujikawa M. Correlation of fundus autofluorescence with photoreceptor morphology and functional changes in eyes with retinitis pigmentosa. // Acta Ophthalmol. 2010. 88 P.177-183.

347. Wald G. The molecular basis of visual excitation. // Nat New Biol. 1968. 219 P.800-807.

348. West MD Vaziri H. Back to immortality: the restoration of embryonic telomere length during induced pluripotency. // Regen Med. 2010. 5 P.485-488

349. Wiley L.A.; Burnight E.R.; Drack A.V.; Banach B.B.; Ochoa D.; Cranston C.M.; Madumba R.A.; East J.S.; Mullins R.F.; Stone E.M.; et al. Using patient-specific induced pluripotent stem cells and wild-type mice to develop a gene augmentation-based strategy to treat CLN3-associated retinal degeneration. // Hum. Gene Ther. 2016 27. P.835–846.

350. Witkin A.J., Ko T.H., Fujimoto J.G., Chan A., Drexler W., Schuman J.S., Reichel E., Duker J.S. Ultra-high resolution optical coherence tomography assessment of photoreceptors in retinitis pigmentosa and related diseases. // Am. J. Ophthalmol. 2006. 142 P.945-952.

351. Witmer M.T., Kiss S. Wide-field imaging of the retina. // Surv. Ophthalmol. 2013. 58 P.143-154.

352. Wren K.N., Craft J.M., Tritschler D., Schauer A., Patel D.K., Smith E.F., Porter M.E., Kner P., Lechtreck K.F. A differential cargo-loading model of ciliary length regulation by IFT. // Curr Biol 2013. 23 P.2463-2471.

353. Yamashita T., Liu J., Gao J., LeNoue S., Wang C., Kaminoh J., Bowne S.J., Sullivan L.S., Daiger S.P., Zhang K., Fitzgerald M.E., Kefalov V.J., Zuo J. Essential and synergistic roles of RP1 and RP1L1 in rod photoreceptor axoneme and retinitis pigmentosa. // J Neurosci 2009. 29 P.9748-9760.

354. Yang Z., Chen Y., Lillo C., Chien J., Yu Z., Michaelides M., Klein M., Howes K.A., Li Y., Kaminoh Y., Chen H., Zhao C., Chen Y., Al-Sheikh Y.T., Karan G., Corbeil D., Escher P., Kamaya S., Li C., Johnson S., Frederick J.M., Zhao Y., Wang C., Cameron D.J., Huttner W.B., Schorderet D.F., Munier F.L., Moore A.T., Birch D.G., Baehr W., Hunt D.M., Williams D.S., Zhang K. Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice. // J Clin Invest. 2008. 118 P.2908-2916.

355. Yanik M., Muller B., Song F., Gall J., Wagner F., Wende W., Lorenz B., Stieger K. In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. // Prog. Retin. Eye Res. 2017. 56 P.1-18.

356. Yao X.Y., Hageman G.S., Marmor M.F. Retinal adhesiveness in the monkey. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994. 35 P.744-748.

357. Ye F., Breslow D.K., Koslover E.F., Spakowitz A.J., Nelson W.J., Nachury M.V. Single molecule imaging reveals a major role for diffusion in the exploration of ciliary space by signaling receptors. // eLife 2013. 2 P.00654.

358. Yoshida N., Ikeda Y., Murakami Y., Nakatake S., Fujiwara K., Notomi S., Hisatomi T., Ishibashi T. Factors affecting visual acuity after cataract surgery in patients with retinitis pigmentosa. // Ophthalmology 2015. 122 P.903-908.

359. Yoshida N., Ikeda Y., Murakami Y., Nakatake S., Tachibana T., Notomi S., Hisatomi T., Ishibashi T. Vitreous cysts in patients with retinitis pigmentosa. // Jpn. J. Ophthalmol. 2015. 59 P.373-377.

360. Yoshida N., Ikeda Y., Notomi S., Ishikawa K., Murakami Y., Hisatomi T., Enaida H., Ishibashi T. Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. // Ophthalmology 2013. 120 P.100-105.

361. Young R.W. The renewal of photoreceptor cell outer segments. // J. Cell Biol. 1967. 33 P.61-72.

362. Yu D.Y., Cringle S.J. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. // Exp. Eye Res. 2005. 80 P.745- 751.

363. Zeitz C., Robson A.G., Audo I. Congenital stationary night blindness: an analysis and update of genotype-phenotype correlations and pathogenic mechanisms. // Prog. Retin. Eye Res. 2015. 45 P.58-110.

364. Zelhof A.C., Hardy R.W., Becker A., Zuker C.S. Transforming the architecture of compound eyes. // Nat New Biol. 2006. 443 P.696-699.

365. Zhao L., Zabel M.K., Wang X., Ma W., Shah P., Fariss R.N., Qian H., Parkhurst C.N., Gan W.B., Wong W.T. Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. // EMBO Mol. Med. 2015. 7 P.1179-1197.

366. Zhu YY. BLA Clinical Review Memorandum Luxturna Clinical Review December 16 2017 56 P.

367. Zolnikova IV Ivanova ME Strelnikov VV et al. Variability of clinical and functional manifestations of the phenotype of Usher syndrome of 2A type (USH2A) with molecular and genetic verification of the diagnosis // Russian Ophthalmological Journal. 2014. 2. P.83–89.

368. Zolnikova I.V., Strelnikov V.V., Skvortsova N.A., et al. Stargardt disease-associated mutation spectrum of a Russian Federation cohort. // Eur. J. Med. Genet. 2017. 60 P.140-7. Doi: 10.1016/j.ejmg.2016.12.002

369. Zrenner E., Fighting blindness with microelectronics. // Sci. Transl. Med. 2013. 5. P.210

370. Zrenner E., Bartz-Schmidt K.U., Benav H., Besch D., Bruckmann A., Gabel V.P., Gekeler F., Greppmaier U., Harscher A., Kibbel S., Koch J., Kusnyerik A., Peters T., Stingl K., Sachs H., Stett A., Szurman P., Wilhelm B., Wilke R. Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. // Proc. Biol. Sci. 2011. 278 P.1489-1497.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AMD – age-related macular degeneration;

ARMD - Age-related macular degeneration:;

ARB – аутосомно-рецессивная бестрофинопатия

BCVA – best-corrected visual acuity;

b.p. – base pairs – пары оснований (нуклеотидов)

CI – confidence interval;

CNV – choroidal neovascularization;

COD – аутосомно-доминантная дистрофия колбочек

CORD – аутосомно-рецессивная дистрофия колбочек

FA – fluorescein angiography;

GA – geographic atrophy;

LCA - Leber congenital amaurosis:;

LL-BCVA - low-luminance best-corrected visual acuity;

LL-VD - low-luminance visual acuity deficit;

MRCS – microcornea, палочко-колбочковая дистрофия, катаракта, задняя стафилома

NA: Not available.

NGS – next generation sequencing

OD – правый глаз (oculus dexter)

OS – левый глаз (oculus sinistrum)

SD-OKT – spectral domain OKT

SE – standard error;

TEAE – treatment emergent adverse event;

VEGF – vascular endothelial growth factor. сосудистый эндотелиальный фактор роста

VMD2 – Vitelliform macular dystrophy type 2

VUS – Variant of unknown significance:.

АДРП (ADRP) – аутосомно-доминантный пигментный ретинит

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

ББС (BBS) – синдром Барде-Бидля

БВМД – вителиформную макулярную дистрофию по типу Беста

БМ – буллезная макулопатия

БШ (STGD) – болезнь Штаргардта

ВАЛ (LCA) – врожденный амавроз Лебера

ВСНС (CSNB) – врожденная стационарная ночная слепота

ЖТГД (FFM) – желтоточечное глазное дно

ИКФС – фундоскопия в инфракрасном свете

иППСК (iPSC) – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

КМО (CME) – кистоидный макулярный отек

КМХ – колбочковый монохроматизм

ОКТ – оптическая когерентная томография

ПЗГ (GVF) – поля зрения по Гольдману

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

РПЭ – ретинальный пигментный эпителий

ПР (RP) – пигментный ретинит

ТРКПД (SECORD) – тяжелая ранняя колбочко-палочковая дистрофия

ФАФ – флуоресцентная ангиография

ФА – фундус альбипунктата, белоточечное глазное дно

ФМВДПН (AOFVD) – фовеомакулярная вителлиформная дистрофия позднего начала

ХНВ (CNV) – хориоидальная неоваскуляризация

ЦАХД (CACD) – центральная ареолярная хориоидальная дистрофия

ЭОГ (EOG) – электроокулограмма

ЭРГ – электроретинография

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ГЛОССАРИЙ

Аллель - *(от греч. ἀλλήλων — друг друга, взаимно) — различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом, определяют направление развития конкретного признака.*

Аномалии рефракции *– группа заболеваний в офтальмологии, при которых снижение остроты зрения обусловлено нарушением фокусировки изображения на сетчатке. К аномалиям рефракции относят миопию (близорукость), гиперметропию (дальнозоркость) и астигматизм. Эмметропия – нулевая рефракция, правильное зрение.*

Аутосомно-рецессивное *наследование заболеваний – вид наследования, при котором генетически обусловленная болезнь проявляется в том и только в том случае, если «дефектный» ген был унаследован от обоих родителей и при этом не содержится в половых (X и Y) хромосомах. Мальчики и девочки болеют с одинаковой частотой.*

Аутосомно-доминантное *наследование заболеваний – вид наследования, при котором генетическая обусловленная болезнь проявляется в случае, если у человека есть хотя бы один соответствующий ей «дефектный» ген, причем этот ген не содержится в половых (X и Y) хромосомах. Генетический дефект может быть унаследован от любого из родителей.*

Внутренняя пограничная мембрана (ILM – inner limiting membrane) *один из десяти слоёв сетчатки позвоночных. Образована базальной и плазматической мембраной клеток Мюллера, возможно, и других глиальных клеток. Здесь содержатся также коллагеновые волокна и протеогликаны. Под оптическим микроскопом слой имеет однородный вид и разграничивает сетчатку и стекловидное тело. Внутренняя пограничная мембрана покрывает всю сетчатку и в передней части глаза переходит в зонулярные волокна.*

X-сцепленный тип *наследования (англ. X-linked inheritance) — доминантный или рецессивный – один из видов сцепленного с полом наследования. Такое наследование характерно для признаков, гены которых расположены на X-хромосоме и которые проявляются только в гомозиготном или гемизиготном состоянии. Такой тип наследования имеет ряд врождённых наследственных заболеваний у человека, эти заболевания связаны с дефектом какого-либо из генов, расположенных на половой X-хромосоме.*

Ганцфельд ЭРГ *– стандартная или ганцфельд ЭРГ на одиночные вспышки — метод, позволяющий получить информацию о функции фоторецепторов и биполярных клеток.*

Гемизиготный - *называют диплоидный организм, у которого имеется только один аллель данного гена или один сегмент хромосомы вместо обычных двух. Для организмов, у которых гетерогаметный пол мужской, в норме оно характерно для генов, локализующихся в половых хромосомах у особей гетерогаметного пола. Рецессивные аллели (мутации) в гемизиготном состоянии проявляются фенотипически, что используют, напр., при оценке мутагенности анализируемых факторов. Гемизиготное состояние может возникнуть вследствие анеуплоидии и делеций.*

Гетерозиготный *– называют диплоидные или полиплоидные ядра, клетки или многоклеточные организмы, копии генов, которые в гомологичных хромосомах представлены разными аллелями.*

Гомозиготный *– диплоидный организм или клетка, несущий идентичные аллели гена в гомологичных хромосомах (AA или aa).*

Дейтеранопия *– арактерна для 1 % людей, форма частичной цветовой слепоты, обычно врождённой, которая характеризуется пониженной чувствительностью к некоторым цветам, в основном к зелёному.*

Дисхроматопсия - *(dyschromatopsia; dus- нарушение + греч. chroma, chromatos цвет + opsis зрение) - нарушение цветового зрения;часто носит наследственный характер.*

Доминантно-негативный механизм *– реализации мутации: белковый продукт мутантного аллеля препятствует сборке и функции полимерных молекул, состоящих из белковых продуктов обоих (нормального и мутантного) аллелей.*

Капсулорексис *– это один из важнейших этапов при проведении факоэмульсификации (экстракции катаракты – помутнения хрусталика). Манипуляция заключается во вскрытии (рассечении) капсулы хрусталика.*

кДНК *– комплементарная ДНК (кДНК, англ. cDNA) — это ДНК, синтезированная на матрице зрелой мРНК в реакции, катализируемой обратной транскриптазой. кДНК часто используется для клонирования генов эукариот в прокариотах.*

Компаунд-гетерозиготная мутация *– наличие аллельной гетерогенности нередко приводит к тому, что у больных с аутосомно-рецессивными заболеваниями каждая из двух мутантных хромосом содержит разные мутации в анализируемом гене. Такое состояние называется компаунд-гетерозиготностью (от англ. compound - «составной»).*

Кистоидный макулярный отек *– это симптомокомплекс, в основе которого лежат патологические процессы в центральном отделе сетчатки, приводящие к развитию отека макулы (центральной зоны сетчатки), что становится причиной снижения центрального зрения.*

Локус *– (лат. locus — место) в генетике означает местоположение определённого гена на генетической или цитологической карте хромосомы. Вариант последовательности ДНК в данном локусе называется аллелью (аддлелем).*

Мембрана Бруха *– самый внутренний слой сосудистой оболочки глаза, является пограничной мембраной между хориоидеей и пигментной частью сетчатки.*

Метаморфопсии *– греч. meta – за чем-либо, morphe – форма, вид, opsis – зрение. Нарушение восприятия формы и величины предметов, искривление прямых линий.*

Мюллеровы клетки *– глиальные клетки сетчатки глаза позвоночных. Это вторые по частоте клетки сетчатки после нейронов.*

Нистагм *– непроизвольные колебательные движения глаз высокой частоты (до нескольких сотен в минуту). Название происходит от др.-греч. νυσταγμός — дремота. Нистагм представляет собой ритмичные движения глазных яблок.*

Ортологи *– это гены, которые эволюционировали вертикально от одного предкового гена, принадлежащего общему предку сравниваемых организмов, тогда как паралоги – гены, эволюционировавшие в результате дупликации.*

Паралоги*– гены, эволюционировавшие в результате дупликации*

Пенетрантность *– (генетика популяций) — показатель фенотипического проявления аллеля в популяции. Определяется как отношение (обычно — в процентах) числа особей, у которых наблюдаются фенотипические проявления наличия аллеля*

Перицентральная пигментная ретинопатия *(ППР) – отличается появлением мелкого, чаще атипичного, пигмента, а иногда и хориосклероза в центральных и перицентральных отделах.*

Пигментный ретинит *– часто наследственная, дегенеративная дистроофия сетчатки, которая вызывает сужение полей зрения и впоследствии слепоту. Прогрессирование не является последовательным.*

Пробанд *– человек, с которого начинается составление родословной для изучения процесса наследования какого либо заболевания среди членов одной семьи.*

Протанопия *– это заболевание глаз, которое заключается в невозможности различать красный цвет.*

Рефрактерный макулярный отек *– устойчивый (невосприимчивый) к лечению макулярный отек*

Секвенирование ДНК или белков *– определение их нуклеотидной или аминокислотной последовательности (от лат. sequentum — последовательность).*

Скотома *– (от греч. skotos — «темнота») — слепой участок в поле зрения, не связанный с его периферическими границами. Область сетчатой оболочки глаза с частично изменённой или полностью выпавшей остротой зрения, окружённая нормальными или относительно сохранными световоспринимающими элементами глаза («палочками» и «колбочками»).*

Скотопическая ЭРГ *– электроретинография, записанная в условиях полной темноты с предварительной темновой адаптацией пациента (изучение ответа палочек сетчатки)*

Соединительная ресничка *(connective cilium) – похожий на волосок вырост клетки, покрытый плазмалеммой; немембранная клеточная органелла, образованная микротрубочками: в больших количествах эти органеллы имеются на поверхности ряда эпителиальных и фоторецепторных клеток.ы*

Тапеторетинальная абиотрофия сетчатки *– синоним "пигментный ретинит" – дистрофическое заболевание сетчатки, характеризующееся постепенным сужением полей зрения с наличием или отсутствием характерных "костных телец" на периферии глазного дна.*

Телеангиэктазия сетчатки *– термин был предложен K. Graefe еще в 1808 г. В это понятие он включил сосудистые заболевания сетчатки, протекающие с изменениями микроциркуляторного русла, такие как неравномерная дилатация и несостоятельность микрососудов сетчатки на одном или обоих глазах.*

Тракции стекловидного тела *– стекловидное тело у здоровых молодых людей плотно крепится к сетчатке так называемой задней гиалоидной мембраной — очень тонкой перегородкой между двумя органами глаза. Однако по мере старения организма или в силу патологических изменений в глазу мембрана может отслаиваться, и в этой ситуации тесная связь между сетчаткой и стекловидным телом нарушается — возникает отслойка. Эти участки натяжения называются тракциями, а состояние, при котором они возникают, — синдромом витреомакулярной*

тракции. Частичная отслойка мембраны опасна тем, что может повлечь за собой отслоение сетчатки или ее разрывы в местах прикрепления тракций.

***Тританопия** (сине-желтый дальтонизм) – (англ. tritanopia; от греч. tritos — третий) — крайне редкая форма наследственной цветоаномалии, при которой не функционируют фоторецепторы, преимущественно чувствительные к коротковолновому (синему) участку спектра.*

***Фенотип** – совокупность характеристик, присущих индивиду на определённой стадии развития. Фенотип формируется на основе генотипа, опосредованного рядом внешнесредовых факторов — феногенеза.*

Фотопическая ЭРГ

***Фотопсии** – (от др.-греч. φωτός — свет, ὄψις — зрение) — появление в поле зрения беспредметных образов: движущихся точек, пятен, фигур, молний, чаще светящихся, блестящих. Фотопсии в виде искр именуются спинтеризмом.*

***Фотофобия** –светобоязнь.*

***Хориоидеа** –сосудистая оболочка глаза.*

***Хориокапилляры** – (лат. choroidocapillaris) — капилляры собственно сосудистой оболочки глаза (хориоидеи). Образуют тонкую густую сосудистую сетку — хориокапиллярную пластинку (lamina choroidocapillaris).*

***Цинновы связки** – или ресничный поясок, цилиарные связки (лат. zonula ciliaris), — круговые связки, подвешивающая хрусталик глаза, образованная из тонких гликопротеиновых зонулярных волокон (fibrae zonulares).*

***Экзом** – часть генома, представляющая экзоны, то есть последовательности, которые транскрибируются (считываются) на матричную РНК после того, как интроны удаляются в процессе сплайсинга (“вырезания”) РНК.*

***Экспрессия гена** – процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт — РНК или белок.*

***Эпиретинальная мембрана** – (целлофановая макула) представляет собой разросшуюся непосредственно над макулярной областью (область в центральной зоне сетчатки) прозрачную, тонкую пленку. Специалисты называют ее целлофановой макулой из-за внешнего сходства, определяющегося при инструментальном исследовании глазного дна*

***ЭРГ – электроретинография** – метод изучения функционального состояния сетчатки, основанный на регистрации биопотенциалов, возникающих в ней при световом раздражении.*

ПРИЛОЖЕНИЕ №1

Табл. 41. Результаты лечения третьей группы пациентов – стандартного лечения. Оценка остроты (Visus) и полей зрения, ЭРГ и КЧСМ вначале лечения и в динамике 2-х лет лечения.

Диагноз	Кол-во пациентов	Visus, BCVA, M±SD					Периметрия, площадь изоптер V4e, M, град^2					ЭРГ, амплитуда b-волны, M±SD, мкВ					КЧСМ, M±SD, Гц				
		перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.
Пигментная абиотрофия сетчатки (тапеторетинальная абиотрофия)	249*	0,3±0,2	0,4±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	0,3±0,25	3670	3582	3805	3600	3580	52±21	57±31	50±17	50±18	45±30	32±3	31±3	31±3	30±3	29±3
Атрофия зрительного нерва	79	0,2±0,18	0,25±0,18	0,2±0,18	0,2±0,18	0,18±0,15	4230	4200	4250	4280	4200	45±30	55±32	45±28	48±25	45±28	28±2	28±2	29±2	28±2	27±2
Палочко-колбочковая дистрофия сетчатки	42	0,4±0,3	0,4±0,3	0,3±0,3	0,3±0,3	0,3±0,2	2980	3750	3200	3120	2950	49±18	52±17	43±20	40±22	47±24	32±4	33±4	32±4	31±4	30±4
Смешанная дистрофия сетчатки	181*	0,2±0,3	0,25±0,3	0,18±0,3	0,2±0,3	0,18±0,3	3505	3470	3490	3515	3400	58±23	58±23	65±33	50±25	55±28	31±5	32±4	30±3	29±5	30±3
ПВХРД (периферическая витреохориоретинальная дистрофия)	49	0,6±0,3	0,6±0,3	0,65±0,3	0,6±0,3	0,55±0,3	5090	5106	4780	4890	4870	60±18	51±28	54±22	49±21	45±19	35±5	34±4	35±5	33±5	34±5
Амблиопия средней/высокой степени	42	0,4±0,1	0,45±0,1	0,44±0,1	0,39±0,1	0,4±0,1	3910	3900	3980	4310	4905	58±30	48±32	55±25	56±32	45±31	32±3	30±3	31±3	33±3	33±3
Дистрофия сетчатки по типу Кунта-Юниуса	4	0,05±0,02	0,05±0,02	0,05±0,02	0,05±0,02	0,05±0,02	1950	1730	1840	2080	1900	38±10	32±15	30±24	18±14	18±15	28±2	28±2	27±2	27±2	26±2
Ахроматопсия	2	0,1±0,03	0,1±0,02	0,1±0,01	0,2±0,03	0,1±0,02	3830	3970	3987	3907	3860	90±10	72±12	88±14	85±14	84±12	26±2	27±2	26±2	24±2	25±2
Хориоидеремия	3	0,05±0,02	0,05±0,01	0,07±0,02	0,07±0,02	0,04±0,02	1350	1050	1470	1300	1360	33±12	35±10	32±14	30±13	34±14	28±2	29±2	29±2	30±2	28±2
Ангиоидные полосы сетчатки	3	0,3±0,2	0,35±0,2	0,3±0,25	0,32±0,25	0,28±0,2	2240	2200	2500	2450	2340	45±20	40±22	43±22	40±28	42±25	32±2	31±2	32±2	32±2	31±2
Серпингинозная хориопатия	1	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5	3050	3250	2950	2880	3000	50	46	52	49	47	31	32	30	30	30
Белоточечное глазное дно (fundus albipunctatus)	7	0,09±0,03	0,09±0,03	0,07±0,03	0,08±0,03	0,07±0,04	2560	2330	2320	2180	2060	35±12	30±22	29±22	25±12	27±12	26±3	26±3	24±3	27±3	27±2

*Из них после подтверждения молекулярно-генетического диагноза: 28 пациентов с синдромом Ашера, 9 пациентов с синдромом Барде-Бидля, 2 пациента с синдромом Коэна, 5 – с синдромом Стиклера, 3 – с синдромом Марфана, 5 – с синдромом Жубера, 3 – с синдромом Сениора-Локена, 3 пациента с FEVR – семейной экссудативной витреоретинопатией. BCVA – максимальная корригируемая острота зрения, ЭРГ – электроретинография, КЧСМ – критическая частота слияния мельканий, град^2 – градусы, мкВ – микровольт, Гц – Герц.

Табл. 41 продолжение. Результаты лечения третьей группы пациентов – стандартного лечения. Оценка рефракции, ОКТ, адаптометрии и цветовосприятия вначале лечения и в динамике 2-х лет лечения.

Диагноз	Кол-во пациентов	Рефрактометрия, сфероэквивалент, M, дптр,					ОКТ толщина в центре, мкм M+SD					Темновая адаптометрия, M+SD, мин					Тест Хью (Цветовосприятие), M				
		перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.
Пигментная абиотрофия сетчатки (тапеторетинальная абиотрофия)	249*	-1,5	-1,5	-1,75	-1,75	-1,75	280±20	285±20	240±20	252±20	254±22	>45	>45	>45	>45	>45	6	7	5	6	6
Атрофия зрительного нерва	79	-0,5	-0,5	-0,5	-0,75	-0,75	289±40	289±40	279±40	290±41	280±42	32±3	33±4	32±3	31±3	32±5	18	17	21	20	22
Палочко-колбочковая дистрофия сетчатки	42	-1,0	0,0	0,0	-1,0	-1,0	310±23	270±20	300±23	305±20	290±19	42±5	43±6	41±5	42±5	41±5	4	3	8	6	9
Смешанная дистрофия сетчатки	181*	-0,75	-0,25	-0,75	-0,5	-0,75	250±29	240±39	248±22	240±24	250±25	40±6	40±7	40±5	39±7	40±7	21	28	17	17	19
ПВХРД (периферическая витреохориоретинальная дистрофия)	49	-3,5	-3,75	-3,5	-4,0	-4,5	284±32	280±27	281±29	284±32	282±28	30±5	30±5	30±5	30±5	30±5	3	5	4	6	5
Амблиопия средней/высокой степени	42	-2.25	-2.5	-2.25	-2.25	-2.5	235±20	232±18	233±29	245±25	240±22	32±4	32±5	33±2	34±5	33±5	7	9	10	8	11
Дистрофия сетчатки по типу Кунта-Юниуса (	4	-3,0	-3,0	-3,0	-3,5	-3,5	220±32	220±32	220±32	220±32	220±32	>45	>45	>45	>45	>45	18	20	18	17	17
Ахроматопсия	2	-0,25	-0,25	-0,25	-0,25	-0,2	210±25	210±25	210±25	210±25	210±25	25±2	28±2	27±3	25±3	26±3	189	210	169	205	229
Хориоидеремия	3	-2,5	-2,5	-2,75	-2,75	-2,5	234±45	230±30	242±40	240±32	215±40	>45	>45	>45	>45	>45	16	15	13	16	16
Ангиоидные полосы сетчатки	3	-0,5	-0,5	-0,75	-0,75	-0,5	250±32	250±30	250±30	250±30	250±35	32±5	33±6	32±5	32±6	34±	23	23	25	22	20
Серпингинозная хориопатия	1	+2,5	+2,5	+2,5	+2,5	+2,5	243	243	243	240	243	32	32	33	32	32	7	8	6	7	9

Белоточечное глазное дно (fundus albipunctatus)	7	-2,0	-2,0	-2,5	-2,0	-2,5	235±31	230±30	235±30	225±33	228±30	>45	>45	>45	>45	>45	23	22	25	23	25

Диагноз	Кол-во пациентов	Visus, BCVA, M±SD					Периметрия, площадь изоптер V4e, M, град^2					ЭРГ, амплитуда b-волны, M±SD, мкВ					КЧСМ, M±SD, Гц				
		перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.
синдром Ашера,	28	0,4±0,2	0,4±0,1	0,38±0,2	0,35±0,2	0,36±0,22	3505	3500	3452	3492	3500	49±18	50±14	52±19	49±23	45±14	29±4	30±4	31±3	32±5	30±4
синдром Барде-Бидля	9	0,4±0,3	0,4±0,25	0,3±0,3	0,3±0,3	0,3±0,2	3090	4120	4100	3790	3281	48±23	52±13	55±26	51±21	50±24	30±5	31±5	32±4	30±6	29±5
синдром Коэна	2	0,6±0,1	0,55±0,1	0,6±0,05	0,6±0,08	0,55±0,08	3910	3950	4007	3930	3720	60±18	60±18	58±19	57±15	57±23	35±5	36±4	33±5	33±5	33±6
синдром Стиклера	5	0,5±0,15	0,5±0,2	0,45±0,2	0,5±0,2	0,45±0,15	3950	3970	3860	3750	3721	58±30	60±32	59±28	57±29	57±26	36±3	36±3	35±4	35±7	32±5
синдром Марфана	3	0,7±0,1	0,7±0,2	0,6±0,1	0,65±0,2	0,65±0,2	4505	4310	4480	4500	4420	47±10	48±8	49±14	48±12	49±15	38±2	38±2	38±3	39±4	36±4
синдром Жубера	5	0,5±0,2	0,6±0,2	0,6±0,2	0,6±0,15	0,6±0,2	5090	4850	4920	4930	5023	70±10	72±11	68±12	65±15	60±18	26±2	26±3	25±3	25±4	25±3
синдром Сениора-Локена	3	0,6±0,2	0,6±0,2	0,5±0,2	0,5±0,15	0,45±0,25	4910	4820	4700	4630	4590	53±12	55±10	52±14	55±18	51±18	32±2	32±4	31±5	31±4	30±3
FEVR – семейная экссудативная витреоретинопатия	3	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01	0,02±0,01	1950	1920	1870	1702	1506	35±20	30±15	31±25	31±25	28±22	29±2	29±3	28±4	28±4	27±3

Табл. 42. Результаты лечения третьей группы пациентов – стандартного лечения после подтверждения молекулярно-генетического диагноза. Оценка остроты (Visus) и полей зрения, ЭРГ и КЧСМ вначале лечения и в динамике 2-х лет лечения.

BCVA – максимальная корригируемая острота зрения, ЭРГ – электроретинография, КЧСМ – критическая частота слияния мельканий, град^2 – градусы, мкВ – микровольт, Гц – Герц.

Диагноз	Кол-во пациентов	Рефрактометрия, сфероэквивалент, M, дптр,					ОКТ толщина в центре, мкм M+SD					Темновая адаптометрия, M+SD, мин					Тест Хью (Цветовосприятие), M				
		перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.	перед	1 мес.	6 мес.	12 мес.	24 мес.
синдром Ашера,	28	-0,75	-0,50	-1,00	-0,75	-1,00	309±42	289±23	295±34	301±35	287±31	>45	>45	>45	>45	>45	23	20	25	19	24
синдром Барде-Бидля	9	+1.25	+1.5	+1.00	+1.25	+1.25	310±23	280±21	298±18	288±25	305±20	42±4	41±5	43±5	40±5	40±7	28	30	26	24	25
синдром Коэна	2	-3,0	-3,5	-3,75	-3,75	-3,75	250±29	270±24	280±23	278±24	265±23	40±8	40±6	39±8	41±9	42±8	4	5	3	0	5
синдром Стиклера	5	-4,25	-4,25	-4,50	-4,50	-4,50	284±32	280±28	304±35	301±30	288±25	25±2	28±3	27±5	27±4	27±5	3	4	5	2	2
синдром Марфана	3	-3,5	-3,5	-3,5	-3,5	-3,5	235±20	230±22	257±21	261±34	230±18	42±10	43±10	38±10	38±9	37±11	4	7	4	2	2
синдром Жубера	5	-0,5	-0,25	0,0	-0,25	-0,25	220±32	242±35	234±25	242±41	231±35	42±3	42±5	41±4	40±6	43±9	3	5	6	2	2
синдром Сениора-Локена	3	+2,5	+2,5	+2,75	+2,5	+2,75	280±28	285±22	264±25	270±22	272±25	39±5	36±4	38±8	37±5	38±4	6	3	5	2	4
FEVR – семейная экссудативная витреоретинопатия	3	-0,5	-1,5	-1,5	-2,0	-2,0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Табл. 42 продолжение. Результаты лечения третьей группы пациентов – стандартного лечения после подтверждения молекулярно-генетического диагноза. Оценка рефракции, ОКТ, адаптометрии и цветовосприятия вначале лечения и в динамике 2-х лет лечения

ОКТ – оптическая когерентная томография, n/a невозможно провести исследование в связи с низкими зрительными функциями, дптр – диоптрий, мкм – микрометр, мин – минут.

Табл. 43. Результаты лечения третьей группы пациентов – стандартного лечения. Оценка остроты (Visus) и полей зрения, ЭРГ и КЧСМ вначале лечения и в динамике 5-и лет лечения.

Диагноз	Кол-во пациентов	Visus, BCVA, M±SD					Периметрия, площадь изоптер V4e, M, град^2					ЭРГ, амплитуда b-волны, M±SD, мкВ					КЧСМ, M±SD, Гц				
		перед	1 год	2 года	3 года	5 лет	перед	1 год.	2 года	3 года	5 лет	перед	1 год	2 года	3 года	5 лет	перед	1 год	2 года	3 года	5 лет
Пигментная абиотрофия сетчатки (тапеторетинальная абиотрофия)	62	0,3±0,2	0,4±0,3	0,3±0,3	0,2±0,1	0,15±0,1	3670	3500	3452	3492	3500	52±21	50±14	42±19	39±23	25±14	32±3	30±4	31±3	27±5	25±4
Атрофия зрительного нерва	21	0,2±0,18	0,25±0,2	0,18±0,15	0,2±0,2	0,18±0,1	4230	4120	4100	3790	3281	45±30	52±13	45±26	41±21	30±24	28±2	31±5	28±4	26±6	26±5
Палочко-колбочковая дистрофия сетчатки	18	0,4±0,3	0,5±0,3	0,5±0,3	0,5±0,3	0,45±0,28	2980	3950	3017	3330	3220	49±18	40±18	48±19	47±15	37±23	32±4	36±4	33±5	31±5	30±6
Смешанная дистрофия сетчатки	18	0,3±0,3	0,35±0,1	0,3±0,1	0,35±0,1	0,3±0,1	3505	3970	3860	3750	3721	58±23	50±32	49±28	47±29	30±26	31±5	32±3	29±4	29±7	28±5
ПВХРД (периферическая витреохориоретинальная дистрофия)	4	0,6±0,3	0,6±0,3	0,65±0,3	0,6±0,3	0,55±0,2	5090	4310	4480	4500	4420	60±18	48±8	39±14	28±12	29±15	35±5	33±2	32±3	32±4	31±4
Амблиопия средней/высокой степени	30	0,4±0,1	0,45±0,1	0,4±0,1	0,35±0,1	0,4±0,1	3910	3850	3920	3930	4023	58±30	52±11	48±12	45±15	30±18	32±3	26±3	25±3	25±4	25±3
Дистрофия сетчатки по типу Кунта-Юниуса (	3	0,05±0,02	0,05±0,01	0,07±0,02	0,06±0,01	0,05±0,01	2950	3820	3700	3630	3590	38±10	35±10	32±14	35±18	21±18	28±2	29±4	28±5	28±4	28±3
Ахроматопсия	2	0,1±0,03	0,1±0,02	0,1±0,03	0,1±0,04	0,08±0,03	3830	3920	3870	3702	3506	90±10	60±15	81±25	61±25	78±22	26±2	29±3	28±4	28±4	27±3
Хориоидеремия	3	0,05±0,02	0,05±0,03	0,05±0,01	0,06±0,05	0,04±0,01	1350	1920	1870	1702	1506	33±12	35±18	32±22	25±17	21±18	28±2	26±3	25±4	25±7	25±5
Ангиоидные полосы сетчатки	2	0,3±0,02	0,1±0,03	0,1±0,04	0,2±0,03	0,1±0,02	2240	2582	2805	2600	2580	45±20	40±18	40±19	37±15	30±23	32±2	33±2	34±3	34±4	33±4
Белоточечное глазное дно (fundus albipunctatus)	4	0,09±0,03	0,05±0,02	0,06±0,01	0,06±0,01	0,05±0,03	2560	2850	2920	2930	2021	35±12	35±18	32±22	25±22	21±12	26±3	26±3	25±3	25±4	25±3

Табл. 43 продолжение. Результаты лечения третьей группы пациентов – стандартного лечения. Оценка рефракции, ОКТ, адаптометрии и цветовосприятия вначале лечения и в динамике 5-и лет лечения.

Диагноз	Кол-во пациентов	Рефрактометрия, сфероэквивалент, M, дптр,					ОКТ толщина в центре, мкм M+SD					Темновая адаптометрия, M+SD, мин					Тест Хью (Цветовосприятие), M				
		перед	1 год	2 года	3 года	5 лет	перед	1 год	2 года	3 года	5 лет	перед	1 год	2 года	3 года	5 лет	перед	1 год	2 года	3 года	5 лет
Пигментная абиотрофия сетчатки (тапеторетинальная абиотрофия)	62	-1,5	-0,50	-1,00	-0,75	-1,00	280±20	290±23	292±34	291±35	297±21	>45	>45	>45	>45	>45	6	12	12	15	14
Атрофия зрительного нерва	21	-0,5	+0.5	-1.00	+0.25	+0.25	289±40	280±21	298±18	288±25	305±20	32±3	31±5	33±5	30±5	33±7	18	20	26	24	25
Палочко-колбочковая дистрофия сетчатки	18	-1,0	-3,5	-3,75	-3,75	-3,75	310±23	290±24	280±23	278±24	295±23	42±5	40±6	39±8	41±9	42±8	4	5	3	0	5
Смешанная дистрофия сетчатки	18	-0,75	-2,25	-2,50	-2,50	-2,50	250±29	280±28	294±35	281±30	288±25	40±7	38±3	37±5	37±4	42±5	21	14	15	12	12
ПВХРД (периферическая витреохориоретинальная дистрофия)	4	-3,5	-3,5	-3,75	-3,75	-3,75	284±32	230±22	257±21	261±34	230±18	30±5	33±10	38±10	38±9	37±11	3	7	4	6	7
Амблиопия средней/высокой степени	30	-2.25	-2,25	-3,0	-3,25	-2,75	235±20	242±35	234±25	242±41	231±35	32±4	32±5	31±4	30±6	33±9	7	5	6	6	8
Дистрофия сетчатки по типу Кунта-Юниуса (	3	-3,0	-2,5	-2,75	-2,5	-2,75	220±32	245±22	224±25	230±22	232±25	>45	>45	>45	>45	>45	18	19	18	20	21
Ахроматопсия	2	-0,25	-0,5	-1,0	-1,0	-1,0	210±25	230±22	237±21	231±34	220±18	25±2	31±5	33±5	30±5	30±7	189	192	156	178	203
Хориоидеремия	3	-2,5	-2,75	-2,75	-2,50	-2,50	234±45	242±35	234±25	222±41	221±35	>45	>45	>45	>45	>45	16	23	17	21	25
Ангиоидные полосы сетчатки	2	-0,5	-0,50	-1,00	-0,75	-1,00	250±32	245±22	224±25	230±22	232±25	32±5	32±5	33±5	32±5	34±7	23	30	26	24	25
Белоточечное глазное дно (fundus albipunctatus)	4	-2,0	-3,5	-3,75	-3,75	-3,75	235±31	232±35	234±25	232±41	231±35	>45	>45	>45	>45	>45	14	15	16	14	15

Табл 44. Количество сеансов лечения мезенхимальными стромальными стволовыми клетками у пациентов из 2 группы.

Кол-во пациентов	вначале	6 мес.	1 год	2 года	3 года	5 лет	7 лет
29 пациентов (58 глаз) умеренные ограничения полей зрения	29	29	29	27	25	14	5
71 пациента (132 глаза) кольцевые скотомы	71	71	71	65	58	42	23
42 пациентов (84 глаза) выраженные концентрические сужения полей зрения	42	42	42	40	33	17	12
ИТОГО: 142 пациента	142	142	142	132	116	73	40