

На правах рукописи

МИКАЕЛЯН АЗНИВ АШОТОВНА

**СОСТОЯНИЕ И ВОЗМОЖНОСТЬ КОРРЕКЦИИ НЕЙРОЭПИТЕЛИЯ
ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ДИСТРОФИЯХ СЕТЧАТКИ
(клинико-экспериментальное исследование)**

3.1.5. - Офтальмология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М.Краснова».

Научные руководители:

доктор медицинских наук
доктор биологических наук

Шерemet Наталия Леонидовна
Киселев Сергей Львович

Официальные оппоненты:

Киселева Татьяна Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, начальник отдела ультразвуковых исследований

Лоскутов Игорь Анатольевич, доктор медицинских наук, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф.Владимирского», руководитель офтальмологического отделения

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н.Федорова» Министерства здравоохранения РФ

Защита диссертации состоится 20 марта 2023 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета 24.1.174.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М.Краснова», по адресу: 119021, г. Москва, ул. Россолимо, д.11, корп. А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М.Краснова».

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

М.Н.Иванов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень её разработанности

Наследственные дистрофии сетчатки (НДС), такие как пигментная аблотиофия (ПА), болезнь Штаргардта (БШ), палочко-колбочковая дистрофия (ПКД) и другие, связанные с повреждением ретинального пигментного эпителия - самые частые причины необратимой потери зрения у взрослых в промышленно развитых странах (Sami Al-Nawaiseh, 2016).

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) представляет собой монослой кубических поляризованных пигментных клеток, который выполняет высокоспециализированные и уникальные функции, необходимые для поддержания гомеостаза нейросенсорной сетчатки.

Считается, что первичный патогенный механизм при сухой ВМД и вышеперечисленных наследственных дистрофиях сетчатки возникает в комплексе РПЭ/МБ/хориокапилляры. Для структурной оценки РПЭ наиболее эффективным методом является аутофлюоресценция (АФ), которая возникает за счет возбуждения коротковолновой частью спектра липофусцина РПЭ (Ю. С. Астахов, 2008). Еще одним современным высокоинформативным методом диагностики заболеваний сетчатки является спектральная оптическая когерентная томография (ОКТ), которая позволяет оценить особенности строения тканей послойно. На сегодняшний день электрофизиологические методы исследования, такие как электроокулография и электроретинография (ЭРГ) выполняют значимую роль в исследовании функции РПЭ и ФР при НДС, в частности для уточнения диагноза и выявления даже незначительных изменений на доклинических стадиях.

Поскольку на данный момент возможности терапевтического лечения для восстановления РПЭ и его связей с прилежащими фоторецепторами отсутствуют, наиболее перспективным методом лечения является хирургическая трансплантация стволовых клеток (СК) (S. Al-Nawaiseh, 2016),

полученных из человеческих эмбриональных стволовых клеток (чЭСК-РПЭ) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК-РПЭ). При этом СК могут быть представлены как в виде нейрональных предшественников (НП), так и терминально дифференцированного РПЭ.

Одними из наиболее подходящих моделей животных для доклинических исследований считаются кролики, поскольку большие глаза кроликов позволяют выполнять хирургическую технику при помощи приборов, идентичных в клинических условиях (А.А. el Dirini et al., 1992) и в естественных условиях отслеживать состояние трансплантированных клеток и сетчатки в течение времени (А. Plaza Reyes, 2016).

Учитывая интра- и постоперационные осложнения ранее созданных моделей повреждения РПЭ, сохраняется актуальность разработки наиболее безопасного и эффективного способа повреждения сетчатки и дальнейшей трансплантации СК.

Целью настоящей работы является исследование особенностей повреждения РПЭ и фоторецепторов при наследственных дистрофиях сетчатки и трансплантации нейрональных предшественников, полученных из иПСК, на модели животного.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать особенности повреждения РПЭ и фоторецепторов при наследственных дистрофиях сетчатки на основании использования современных высокотехнологичных методов диагностики.
2. Оценить взаимосвязь морфологических и функциональных параметров РПЭ и фоторецепторов при наследственных дистрофиях сетчатки.
3. Разработать метод дифференцировки иПСК в НП.
4. Разработать метод повреждения РПЭ и трансплантации НП в субретинальное пространство глаза на модели кролика.
5. Оценить влияние трансплантации НП на РПЭ и ФР с помощью клинико-морфологических методов исследования.

Научная новизна

На основании данных АФ выявлено шесть паттернов изменения РПЭ при НДС.

Создана модель повреждения РПЭ в экспериментах на кроликах.

С помощью клинико-морфологических методов исследования определено влияние субретинального введения НП на РПЭ и ФР.

Впервые в РФ проведена субретинальная трансплантация НП *in vivo* и оценено влияние трансплантации на структуру сетчатки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования показали высокую теоретическую и практическую информативность комплексной диагностики НДС и практическую значимость экспериментальной работы для возможности разработки лечения пациентов с НДС.

На основании данных АФ выявлено шесть паттернов изменения РПЭ, при этом в 19,2% случаев АФ обнаруживает изменения, не выявляемые при офтальмоскопии.

В 9,6% случаев при отсутствии офтальмоскопических и АФ изменений, основополагающими методами диагностики НДС являются функциональные и структурные методы исследования.

Мультифокальная ЭРГ (мфЭРГ) является информативным методом исследования состояния биоэлектрической активности центральной зоны сетчатки при ПР при нерегистрируемых ЭОГ и ганцфельд-ЭРГ (гЭРГ).

Разработанный в ходе эксперимента протокол создания модели повреждения РПЭ позволяет получить клиническую картину схожую с таковой при НДС.

Созданная модель повреждения РПЭ может служить универсальной моделью для исследования выживания и интеграции различных видов СК.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической основой диссертационной работы явилось применение комплекса методов научного познания. Работа выполнена в дизайне проспективного открытого исследования с использованием клинических, инструментальных, аналитических и статистических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Комплексное применение морфофункциональных методов исследования (АФ, ОСТ, КП, гЭРГ, мфЭРГ, ЭОГ) обеспечивает фенотипирование НДС, что позволяет определять объем генетического исследования, а также прогнозировать течение заболевания.
2. Электрофизиологические исследования (ЭОГ, гЭРГ) и компьютерная периметрия демонстрируют большую площадь поражения РПЭ/ФР, нежели это можно визуализировать с помощью АФ, офтальмоскопии и спектральной ОКТ у пациентов с НДС.
3. Предложена модель повреждения РПЭ в экспериментах на кроликах направленная на разработку эффективного метода лечения пациентов с наследственными и возрастными дегенеративными заболеваниями сетчатки, обусловленными повреждением РПЭ.
4. Впервые в РФ проведена субретинальная трансплантация НП, полученных из ИПСК человека, *in vivo* и оценено влияние трансплантации на структуру сетчатки.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов исследования определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок, использованием современных методов исследования и подтверждена в процессе статистической обработки материала. Анализ результатов исследования и статистическая обработка выполнены с применением современных методов сбора и обработки научных данных. Научные положения и выводы, сформулированные в

диссертации, аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов клинических и лабораторных исследований.

Основные положения диссертации доложены на Всероссийском научно-практическом конгрессе с международным участием «Орфанные болезни» (Москва, 2018г.), Первой международной научно-практической конференции «Геномное редактирование в медицинской генетике 2018», XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения - 2019», XII Съезде офтальмологов России (Москва, 2020г.), заседании проблемной комиссии ФГБНУ «НИИГБ» от 21 июня 2021г.

Личный вклад автора в проведенное исследование.

Личный вклад автора состоит в проведении клинических и экспериментальных исследований, апробации результатов исследования, подготовке докладов и публикаций по теме диссертации. Обработка и интерпретация полученных результатов выполнена лично автором.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты работы внедрены в клиническую практику в ФГБНУ «НИИГБ».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 6 - в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, патент Российской Федерации на изобретение «Способ моделирования повреждения ретинального пигментного эпителия (РПЭ) для изучения влияния на него трансплантированных стволовых клеток».

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и

состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 125 источников, из них 18 отечественных и 107 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 21 рисунком.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика материала и методов исследования.

Клинические исследования

В исследовании принимали участие 52 пациента (104 глаза) с НДС в возрасте на момент исследования в среднем $41,8 \pm 15,8$ лет.

Критерием исключения из исследования было наличие других глазных заболеваний, кроме БШ, ПКД и ПА. В группы контроля были набраны здоровые добровольцы для проведения ОКТ (17 человек, 33 глаза), ЭОГ (8 человек, 16 глаз), мфЭРГ (15 человек, 30 глаз) и гЭРГ (17 человек, 34 глаз). Группы пациентов и группы контроля были однородны по возрасту.

Помимо традиционных офтальмологических методов обследования оценивали цветовое зрение по полихроматическим таблицам для исследования цветоощущения Е.Б. Рабкина. АФ выполняли на конфокальном сканирующем лазерном офтальмоскопе (HRA-2 «Heidelberg Engineering»).

ОКТ сетчатки и зрительного нерва проводили с помощью спектрального ретинотомографа RTVue-100 (США). Для оценки структурных изменений использовали следующие протоколы: cross line, MM5, ONH.

Компьютерную периметрию проводили с помощью статической программы M Dynamic (макулярной программы), при низкой остроте зрения – по программе LVC (Low vision) и полуавтоматической кинетической программы с объектом III/4e на периметре Octopus 900 (Interzeag AG, Switzerland).

Электрофизиологические исследования включали регистрацию максимальной ганцфельд-ЭРГ (гЭРГ), мультифокальной ЭРГ (мфЭРГ) и электроокулографии (ЭОГ) («Tomey EP-1000 Multifocal», Германия).

Экспериментальные исследования.

Исследование проведено на 31 глазе 31 кролика породы Шиншилла, в возрасте 2,5-3,5 месяцев и весом 2,5-3,5 кг. Все работы проведены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целях №123 от 18.03.1986 г. и Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1975 г. “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных”.

Все экспериментальные животные были разделены на три группы в зависимости от метода повреждающего воздействия на РПЭ:

1 группа – субретинальное введение сбалансированного солевого раствора (BSS) (5 кроликов, 5 глаз) без лазеркоагуляции и витрэктомии (для создания модели повреждения РПЭ);

2 группа - субретинальное введение BSS с выполнением витрэктомии, смещением инъекционного пузыря в сторону от места вкола при помощи ПФОС и лазеркоагуляцией (13 кроликов, 13 глаз);

3 группа – субретинальная трансплантация культура нейрональных предшественников (НП) (13 кроликов, 13 глаз).

Для проведения оперативного вмешательства животные вводились в состояние медикаментозного сна (внутримышечные инъекции Tiletamine Hydrochloride/Zolazepam Hydrochloride в комбинации с Xylazine Hydrochloride в соотношении 60% к 40% (0,5 мл на кролика весом 3 кг)). За 30 минут до операции кроликам в глаз инстильировали Proxymetacaine для местной анестезии и Tropicamide для расширения зрачка. После операции кролики получали внутримышечно раствор дексаметазона 2 мг/кг, местно инстильиции дексаметазона 1мг/мл, неомицин 3мг/мл, полимиксина В сульфат 6000ЕД/мл по 1 кап. 2 раза в день.

На 1, 3, 5, 15 и 21 день после операции проводилась офтальмоскопия, спектральная оптическая когерентная томография (ОКТ), коротковолновая

аутофлюоресценция BluePeak (BAF, АФ 488нм) и снимки в инфракрасном режиме (IR) (Heidelberg Engineering GmbH, Germany).

Животные были выведены из эксперимента методом воздушной эмболии под общим эфирным наркозом (согласно приказу МинВуза СССР №724 от 13.11.1984).

Работы по культивированию клеток, анализ биологической полноценности клеток проводил на базе лаборатории Института общей генетики им. Н.И. Вавилова д.б.н. Киселев С.Л. Для получения линий клеток для 3-й экспериментальной группы были использованы ранее установленные в ИОГен РАН линии ПСК человека.

Методы информационной обработки данных.

Статистический анализ и оценка достоверности получаемых результатов проведены с помощью программы Statistica 6.0. Статистический анализ результатов проводили с использованием непараметрических статистик (критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона, дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, ранговая корреляция по Спирмену, гамма корреляции, критерий Хи-квадрат Пирсона). Для характеристики рядов данных рассчитывали медиану, среднее значение, стандартное отклонение, для оценки диапазона – минимальное и максимальное значение, нижнюю и верхнюю квартили.

РЕЗУЛЬТАТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В исследование были включены 52 пациента (104 глаза), из них 23 человека с БШ, 19 - с ПКД, 10 - с ПА с сопоставимой длительностью заболевания.

Средний возраст дебюта заболевания составил $28 \pm 16,8$ лет (5 лет/63 года), длительность заболевания – $14 \pm 11,3$ лет (1год/54 года).

Общая характеристика пациентов с НДС представлена в **табл.1**.

Таблица 1. Характеристика пациентов и показатели функций зрения у пациентов с БШ (I-III тип), ПКД и ПА.

НДС (кол-во пациентов/глаз)	Дебют заболевания, возраст*	Длительность заболевания, лет*	Острота зрения**	Показатели периметрии*	
				MD, дБ	MS, дБ
I гр. - БШ I тип (5/10)	16 (15/20)	5 (3/9)	0,3±0,13	6,8 (5,6/9,2)	23,9 (21,1/25,1)
II гр. - БШ II тип (9/18)	29 (11/36)	12 (9/19)	0,2±0,18	16,6 (9,1/19,9)	13,9 (10,6/20,8)
III гр. – БШ III тип (9/18)	15 (8/26)	12 (10/15)	0,1±0,13	13,6 (9,1/25,0)	16,8 (5,0/21,3)
IV гр. - ПКД*** (19/38)	37 (24/55)	7,5 (5/15)	0,5±0,34	12,9 (6,1/21,2)	16,6 (7,5/22,1)
V гр. - ПА*** (10/20)	28 (16/35)	15 (5/23)	0,5± 0,26	19,4 (15,7/22,6)	8,6 (5,0/11,9)
$P <^{\#}$			III-IV гр. 0,0006 III-V гр. 0,001	I-V гр. 0,005	I-V гр. 0,0005 IV-V гр. 0,049

Примечание: Здесь и далее * - медиана (нижняя/верхняя квартили);

** - среднее значение ± стандартное отклонение;

*** - в таблице не учтены показатели статической КП одного пациента с ПКД и трех пациентов с ПА в связи с невозможностью проведения исследования из-за выраженного концентрического сужения полей зрения;

$\#$ - степень значимости между группами (критерий Краскела-Уоллиса).

Пациенты с БШ были разделены на три группы, в зависимости от типа поражения РПЭ по данным коротковолновой АФ: I тип – атрофия РПЭ в центральной зоне, II тип - атрофия РПЭ в пределах сосудистых аркад с пара- и перифовеальными очагами, III тип – атрофия РПЭ в центральной и периферической зоне, что соответствует 1-3 АФ картине на **рис.1**. В целом следует отметить, что при отсутствии разницы в группах по дебюту и длительности заболевания, у пациентов с ПКД и ПА относительно сохранна острота зрения, и выражено изменены показатели периметрии за счет преимущественного повреждения палочкового аппарата.

При сравнении показателей ЭОГ (дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса) у пациентов с БШ I типа, имевших локальные повреждения РПЭ,

не выявлено достоверных различий с показателями ЭОГ контрольной группы (Табл.2.). Однако при попарном сравнении этих групп (критерий Манна-Уитни) обнаружено снижение показателя базового потенциала ($p < 0,01$), а также увеличение латентности темнового спада ($p < 0,02$) («запаздывающая» ЭОГ) в группе БШ I типа, что свидетельствует о нарушении работы комплекса ФР/РПЭ.

При сравнении данных контрольной группы и пациентов с БШ II- III типа, ПКД и ПА отмечено нарастание различий показателей ЭОГ (снижение амплитуды базового, темнового и светового потенциалов, увеличение латентности темнового спада и светового подъема) по мере увеличения площади и глубины повреждения РПЭ. Выявлено достоверное различие значений базового потенциала, латентности светового подъема между контрольной и II-V группами пациентов, а также его межгрупповые различия в парах I-V, II-V, IV-V групп. Статистически значимыми оказались и различия между I и II-IV группами по показателям латентности светового подъема, амплитуде потенциала темнового спада, по коэффициенту.

У 3-х пациентов с БШ III типа зарегистрирована «плоская» ЭОГ с не дифференцированным темновым спадом и световым подъемом.

В группе ПКД, отличающейся значительным полиморфизмом клинической картины, данные ЭОГ также варьировали, однако в большинстве случаев отмечено значительное снижение темнового и светового потенциалов, снижение КА. Электроокулограмма имела вид изолинии у 5 больных этой группы.

Наиболее грубые изменения параметров ЭОГ зарегистрированы в группе ПА: у всех пациентов на фоне резкого снижения базового потенциала практически отсутствовали темновой спад и световой подъем постоянного потенциала глаза.

Таблица 2. Показатели электроокулографии у пациентов с БШ (I-III), ПКД, ПА и контрольной группе.

Группа по НДС (кол-во пациентов/ глаз)	Базовый потенциал, mV	Потенциал темнового спада, mV	Латентность темнового спада, min	Потенциал светового подъема, mV	Латентность светового подъема, min	КА
БШ I тип (5/10)	0,32 (0,21/0,37)	0,24 (0,14/0,30)	10,0 (8,80/10,80)	0,60 (0,37/0,88)	22,2 (21,90/22,40)	299,5 (222/379)
БШ II тип (9/18)	0,27 (0,14/0,40)	0,14 (0,10/0,31)	10,65 (9,80/12,50)	0,40 (0,35/0,60)	24,6 (23,7/25,3)	277 (179/320)
БШ III тип (6/12)	0,25 (0,17/0,29)	0,13 (0,10/0,14)	11,05 (9,85/14,40)	0,35 (0,24/0,43)	25,2 (23,10/25,75)	243 (183/357)
ПКД (14/28)	0,28 (0,22/0,33)	0,24 (0,19/0,31)	11,5 (9,90/13,15)	0,45 (0,32/0,59)	24,55 (23,25/26,25)	187 (143/258)
ПА (10/20)	0,17 (0,13/0,23)	темновой спад и световой подъем ЭОГ отсутствуют у всех пациентов				
Контроль (8/16)	0,47 (0,36/0,56)	0,28 (0,23/0,34)	8,5 (8,3/9,5)	0,77 (0,66/0,93)	23,15 (22,7/24,1)	263 (249/271)
P <	К-2 гр.0,02 К-3 гр. 0,0004 К-4 гр.0,01 К-5 гр.0,00000 1-5 гр.0,008 4-5 гр.0,002	К-2 0,04 К-3 0,0002 3-4 0,003	К-2 0,007 К-3 0,003 К-4 0,00002	К-2 гр. 0,003 К-3 гр. 0,000005 К-4 гр. 0,0009	К-2 гр. 0,02 1-2 гр. 0,00007 1-3 гр. 0,004 1-4 гр. 0,0002	1-4 гр. 0,005 2-4 гр. 0,03

Полученные данные свидетельствует о тесной взаимосвязи функциональных нарушений комплекса ФР/РПЭ со степенью и площадью его морфологических повреждений.

У 16 пациентов (32 глаза) с центральным повреждением РПЭ, размер которого можно было измерить, была выявлена корреляционная связь между размерами потери РПЭ и латентностью ($K=0,49-0,57$, $p<0,05$) и амплитудой светового подъема ($K=-0,37-0,63$, $p<0,05$) ЭОГ. Невысокие корреляционные коэффициенты свидетельствуют, по-видимому, о большей площади поражения РПЭ, нежели это можно визуализировать с помощью АФ и офтальмоскопии.

На основании данных АФ все пациенты были распределены на шесть групп в зависимости от глубины и распространенности атрофии РПЭ:

1 гр. – 6 пациентов (12 глаз) с локализованной атрофией РПЭ в центральной зоне; 2 гр. – 11 пациентов (22 глаза) с полной/неполной атрофией РПЭ в пределах сосудистых аркад и локализованными пара- и перифовеальными гипо- и гиперавтофлюоресцентными пятнами; 3 гр. – 10 пациентов (20 глаз) с распространенной атрофией РПЭ в центральных и периферических отделах; 4 гр. - 13 пациентов (26 глаз) атрофические изменения на периферии глазного дна и гиперавтофлюоресцентным кольцом в парамакулярной области; 5 гр. - 7 пациентов (14 глаз) сливающиеся крупноочаговые атрофические изменения; 6 гр. - 5 пациентов (10 глаз) - глазное дно без очаговых изменений (**рис. 1**).

Следует отметить, что АФ в некоторых случаях (19,2%, 20 глаз) обнаруживает изменения, не выявляемые при офтальмоскопии. В то же время, в 9,6% случаев (5 пациентов, 10 глаз с ПКД) ни при офтальмоскопии, ни при АФ не было выявлено никаких отклонений от нормы (**см. рис.1е, табл 3**). Этот факт подчеркивает необходимость применения при диагностике НДС не только визуализирующих, но и функциональных методов исследования.

При анализе групп по атрофии РПЭ по АФ видно, что БШ I-III типов соответствуют **рис.1-3** АФ картины. При ПКД наблюдали все паттерны изменения РПЭ, однако 4-й паттерн – чаще. При ПА были отмечены только 4-й и 5-й паттерн изменения РПЭ.

При анализе данных ЭОГ в группах, образованных в соответствии со степенью повреждения РПЭ, оказалось, что «плоская» ЭОГ регистрировались у 3 пациентов из 3 группы, 8 пациентов из 4 группы, 6 пациентов из 5 группы и у 1 пациента из 6 группы (**табл. 3**). При сравнении

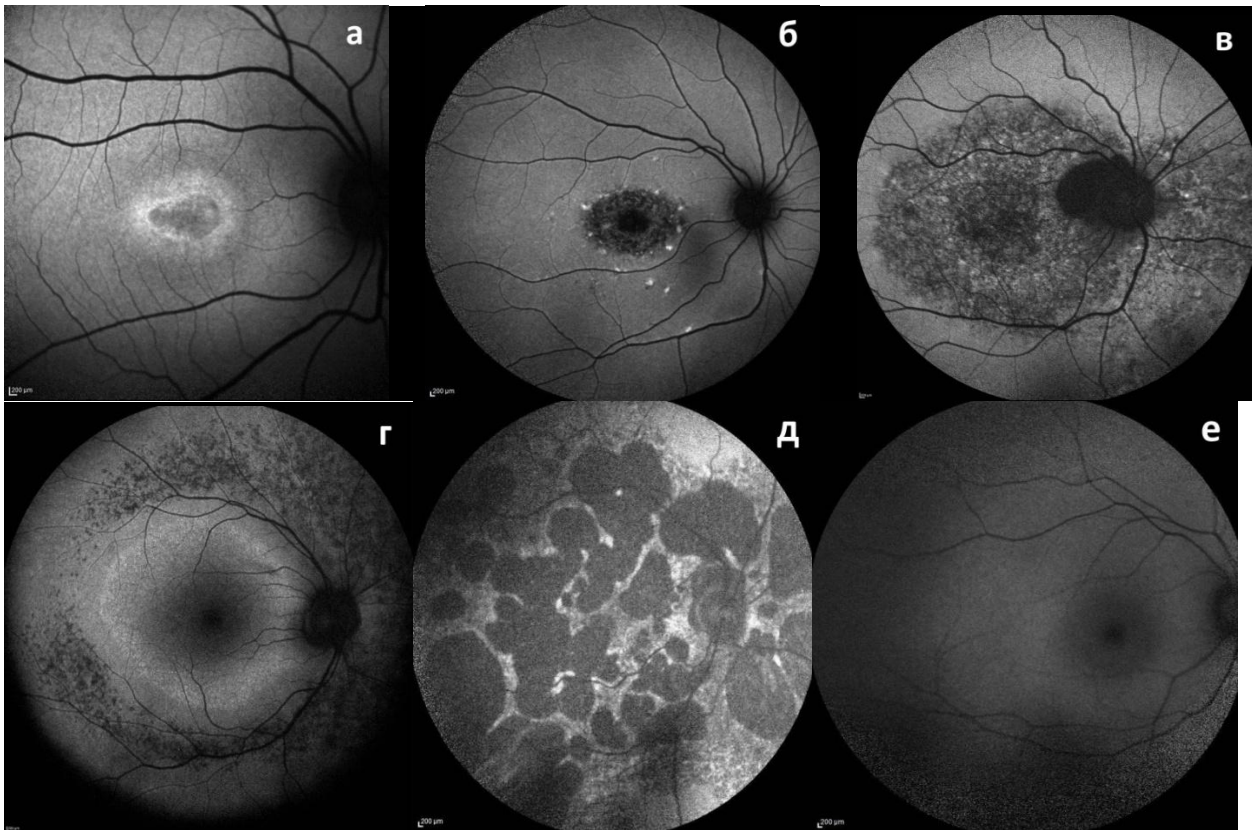


Рис. 1. Аутофлюоресцентная картина глазного дна.

показателей ЭОГ между группами отмечено нарастание различий в связи с выраженностью морфологических изменений РПЭ.

Всем пациентам была проведена гЭРГ. При анализе данных гЭРГ не регистрировалась у 1 пациента с БШ III, 3 с ПКД и у всех пациентов с ПА (10 пациентов). При анализе показателей ЭРГ, по мере увеличения выраженности изменений ФР, отмечено нарастание различий в 1-4-й и контрольной группе по показателям латентности и амплитуды а-волны ($p < 0,05 - 0,000008$) и во 2-4-й группах по амплитуде в-волны ($p < 0,0007 - 0,000000$). Выявлено различие между 2 и 4-й гр. по амплитуде а-волны ($p < 0,01$).

Резюмируя, необходимо обратить внимание на то, что даже у пациентов БШ I типа с небольшим повреждением эллипсоидной зоны, обнаружены статистически достоверные различия параметров ЭОГ и гЭРГ с контрольной группой.

Табл.3. Показатели электроокулографии у пациентов с БШ, ПКД и ПА в группах по повреждению РПЭ и в контрольной группе.

<i>Группа по повреждению РПЭ, (кол-во пациентов/глаз)</i>	<i>Кол-во пациентов/глаз с «плоской» ЭОГ</i>	<i>Базовый потенциал, mV</i>	<i>Потенциал темнового спада, mV</i>	<i>Латентность темнового спада, min</i>	<i>Потенциал светового подъема, mV</i>	<i>Латентность светового подъема, min</i>	<i>КА</i>
I (6/12)	0	0,27 (0,22/0,36)	0,21 (0,15/0,27)	9,75 (8,90/10,55)	0,54 (0,37/0,80)	22,40 (21,95/23,15)	284,5 (247,0/376,0)
II (11/22)	0	0,27 (0,14/0,44)	0,13 (0,10/0,34)	11,35 (10,00/12,70)	0,39 (0,33/0,60)	25,05 (24,20/26,30)	265,0 (191,0/308,-)
III (10/20)	3/6	0,25 (0,17/0,30)	0,13 (0,10/0,15)	11,35 (9,90/14,50)	0,38 (0,24/0,44)	24,85 (23,30/25,70)	236,0 (169,0/343,0)
IV (13/26)	8/16	0,19 (0,16/0,26)	0,21 (0,20/0,26)	9,90 (9,80/11,60)	0,31 (0,29/0,42)	24,05 (23,10/25,20)	144,0 (124,0/172,0)
V* (7/14)	6/12	0,3 0,26	0,3 0,25	10,5 11,2	0,38 0,35	22 22,3	128 143
VI (5/10)	1/2	0,30 (0,28/0,33)	0,23 (0,17/0,27)	12,0 (10,7/12,8)	0,52 (0,46/0,71)	24,40 (23,30/25,40)	256,0 (215,0/274,0)
Контроль (8/16)	0	0,46 (0,35/0,55)	0,28 (0,22/0,34)	8,50 (8,30/9,50)	0,77 (0,65/0,93)	23,1 (22,70/24,10)	262,5 (249,0/271,0)
P		К-2 гр. 0,02 К-3 гр. 0,008 К-4 гр. 0,000002	К-3 гр. 0,004	К-2 гр. 0,0004 К-3 гр. 0,0003 К-6 гр.0,002	К-2 гр. 0,004 К-3 гр. 0,0001 К-4 гр.0,0001	К-2 гр. 0,002 1-2 гр. 0,0004	К-4 гр.0,002 1-4 гр.0,00005 2-4 гр. 0,001 4-6 гр. 0,02

* показатели данной группы не входили в статистический анализ

По данным ОКТ исследования было выделено пять типов изменения эллипсоидной зоны: 1-й - потеря эллипсоидной зоны в макулярной зоне и сохранение эллипсоидной зоны на всем остальном протяжении ОКТ среза сетчатки (20 глаза); 2-й - потеря эллипсоидной зоны в макулярной области с распространением дезорганизации эллипсоидной зоны на всем остальном протяжении ОКТ среза сетчатки (30 глаз); 3-й - распространенная потеря эллипсоидной зоны на всем протяжении ОКТ среза сетчатки (26 глаз); 4-й - сохранение макулярной зоны, потеря эллипсоидной зоны по обе стороны от нее (24 глаза); 5-й - ОКТ срез без изменений (4 глаза).

В группах БШ и ПКД, в которых в большинстве случаев регистрируется гЭРГ и ЭОГ, потеря эллипсоидной зоны коррелирует с амплитудой а- и b- волны ($K=-0,72-0,77$, $p<0,005$), латентностью b- волны гЭРГ ($K=0,53$, $p<0,005$) и КА ЭОГ ($K=-0,71$, $p<0,005$).

У некоторых пациентов (3,8%, 4 глаза) было отмечено несоответствие небольшого дефекта эллипсоидной зоны и РПЭ значительным поражениям поля зрения и нарушениям показателей ЭОГ и гЭРГ, что свидетельствует о выраженном нарушении функций ФР/РПЭ при их относительно сохранной структуре. У 14 пациентов (все 10 больных с ПА, 3 из группы ПКД и 1 – из группы БШ III), у которых не регистрировалась гЭРГ, также не дифференцировались темновой спад и световой подъем ЭОГ. У 3 пациентов в группе БШ3 и 2 в группе ПКД регистрировалась «плоская» ЭОГ, но удалось зарегистрировать так называемую «угасающую гЭРГ» с резко сниженными амплитудами основных волн. Такие электрофизиологические показатели свидетельствуют о патологических изменениях РПЭ и ФР, в ряде случаев более выраженных и распространенных, чем это показывают методы визуализации. Видимо, этим объясняются невысокие коэффициенты корреляции остроты зрения с повреждением РПЭ ($K=-0,51$, $p<0,05$), показателя световой чувствительности с потерей эллипсоидной зоны ($K=-0,38$, $p<0,05$) и РПЭ ($K=-0,51$, $p<0,05$).

Так же всем пациентам была выполнена мфЭРГ. Ранее проведенные исследования показали, что степень и топография изменений параметров мфЭРГ при БШ и ПКД тесно взаимосвязаны с изменениями толщины сетчатки, макулярного объема, исследуемых при помощи ОКТ.

Поскольку в группе ПА ни в одном случае не удалось зарегистрировать гЭРГ (нерегистрируемая гЭРГ), а также дифференцировать темновой минимум и световой максимум ЭОГ, единственным источником информации о состоянии биоэлектрической активности сетчатки, а именно ее центральной зоны в пределах 30° , в этой группе пациентов оказалась мфЭРГ. Этот метод позволил проанализировать амплитуду, плотность и латентность биопотенциала, усредненную «по кольцам» от центра к периферии, оценить степень нарушения его топографии. При сравнении группы ПА с контрольной группой выявляются межгрупповые различия всех параметров мфЭРГ с высокой степенью достоверности.

При этом, несмотря на то, что в некоторых случаях концентрическое сужение полей зрения по данным КП достигало $5-10^\circ$ от центра, у таких пациентов удавалось зарегистрировать, хоть и резко сниженный, биопотенциал сетчатки за пределами перифовеальной зоны. Это доказывает, что при исследовании степени сохранности зрительных функций в группе ПА мфЭРГ более информативна, чем КП и рутинные электрофизиологические методы.

В целом полученные результаты отражают разнообразие фенотипических проявлений НДС и различную вовлеченность в патологический процесс клеточных элементов, генерирующих постоянный (ЭОГ) и вызванный (ЭРГ) потенциалы сетчатки. Метод ЭОГ является дополнительным методом исследования функций сетчатки у пациентов с НДС. В сочетании с мфЭРГ и гЭРГ, ЭОГ дает возможность оценить степень повреждения фоторецепторного аппарата и РПЭ, поскольку даже при отсутствии видимых или незначительных изменений в структурных

исследованиях у пациентов с НДС по толщине макулы сложно судить о сохранности функций сетчатки, Таким образом, только комплексное исследование пациентов дает полную и точную картина стадии заболевания и его дальнейших прогнозов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка метода дифференцировки iPСК в НП.

Для получения флуоресцентно-меченных линий клеток для 3-й экспериментальной группы ранее установленные в ИОГен РАН линии плюропотентных стволовых клеток (ПСК) человека рассеивались на чашки Петри диаметром 35 мм, покрытые матригелем, в плотности примерно 2 тыс. клеток/см², и культивировались в ростовой среде TeSR E8 (StemCellTechnologies) с добавлением 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина во влажной атмосфере при температуре 37 °C и 5% содержанием CO₂. При достижении клетками 40% плотности монослоя, клетки были трансдуцированы лентивирусным вектором, содержащим GFP и/или RFP (CMV или EF1a соответственно). Трансдукция проводилась в присутствии полибрена (8 мкг/мл) с множественностью заражения 4. После культивирования клеток в течение нескольких дней, колонии ПСК человека, имеющие наибольший процент светящихся клеток были механически отобраны и размножены до количества 10⁶ клеток, после чего светящиеся клетки были отсортированы на сортере Sony SH800. Полученные линии ПСК человека были использованы для последующих экспериментов по дифференцировке и трансплантации.

Разработка метода повреждения РПЭ и трансплантации НП в субретинальное пространство глаза на модели кролика.

У кроликов 1-й экспериментальной группы без предварительной витректомии в 5 мм от ДЗН в нижне-темпоральном направлении произведена

субретинальная инъекция 50 мкл BSS при помощи 41G субретинальной канюли.

После выполнения витрэктомии в максимально полном объеме, 2-й группе произведена субретинальная инъекция 50 мкл BSS, 3-й группе - субретинальная инъекция клеточной суспензии (50000 клеток НП в 100 мкл фосфат-буферного раствора (PBS). Образовавшийся в результате инъекции «пузырь» отдавливался в сторону от места вкола при помощи ПФОС. Вокруг места введения проведена эндолазеркоагуляция. ПФОС удалён и замещен BSS.

Результаты исследований экспериментальных групп в послеоперационном периоде.

В эксперимент вошли 31 кролик (31 глаз).

По результатам исследования в 1-й группе после субретинального введения раствора BSS без витрэктомии у 3-х кроликов на 2-й день операции была выявлена локальная отслойка нейроэпителия, у 1-го - тотальная отслойка и у 1-го - сетчатка прилежала. Однако в последующие дни у двух кроликов начались витреоретинальные пролиферативные процессы в виде грубой деструкции стекловидного тела, тяжей и тракций.

Экспериментальная работа в двух других группах также сопровождалась рядом осложнений. В 10 глазах во время операции или в послеоперационный период возникли осложнения: гемофтальм интраоперационный – 2 глаза, гемофтальм послеоперационный – 2, эндофтальмит –1, отслойка сетчатки – 5. Таким образом, из 26 кроликов удалось проанализировать АФ и ОСТ результаты 7 глаз из 2-й и 9 глаз из 3-й групп.

По данным офтальмоскопии и ОКТ у 2-й и 3-й групп на 5-21 день в зоне инъекции отмечается прилегание локальной отслойки нейроэпителия, атрофия сетчатки разной степени выраженности.

По данным ОКТ во 2-й группе в течение 21 дня после операции в области образованного пузыря выявлена постепенная атрофия всех слоев

сетчатки, дезорганизация комплекса ФР/РПЭ/МБ, уплотнение внутренней пограничной мембраны. В 3-й группе после субретинального введения НП во все дни исследования по данным ОКТ отмечена гиперрефлективная зона на уровне комплекса РПЭ/мембрана Бруха (МБ), соответствующая месту введения НП. Однако на 15-й и 21-й дни - в гиперрефлективной зоне отмечена дезорганизация эллипсоидной зоны с дальнейшей ее потерей, наружная пограничная мембрана не визуализируется, на сканах отмечены мелкие гиперрефлективные точки во внутренних слоях. Внутренние слои сетчатки теряют четкую структурность. По данным коротковолновой АФ (ВAF) во все дни наблюдения периферичнее места вкола, окруженного лазеркоагулятами, прослеживается зона гипераутофлуоресценции с краевой гипоаутофлуоресценцией, соответствующая описанным изменениям на ОКТ.

Проведенное нами исследование подтвердило результаты других авторов, которые также продемонстрировали высокий риск отслойки сетчатки и пролиферативных процессов в сетчатке кроликов в первую очередь без предварительной витрэктомии, а также в меньшей степени в глазах с витрэктомией при субретинальном введении BSS для формирования модели дегенерации сетчатки.

В исследовании мы так же продемонстрировали новый способ трансплантации клеток в субретинальное пространство сетчатки с предварительной витрэктомией и дальнейшей лазеркоагуляцией. Удаление СТ во время операции может уменьшить риск послеоперационных осложнений, введение ПФОС позволяет нивелировать обратный рефлюкс введённых клеток в СТ и сместить пузырь дальше от места вкола и, таким образом, тампонировать его. Лазеркоагуляция сетчатки вокруг места вкола «закрывает» отверстие и позволяет предупредить отслойку сетчатки в месте инъекции.

ВЫВОДЫ

1. На достаточном клиническом материале (52 пациента) изучены особенности повреждения РПЭ и фоторецепторов при наследственных дистрофиях сетчатки, а также исследована эффективность трансплантации нейрональных предшественников, полученных из ИПСК, на модели животного (29 кроликов).
2. На основании данных АФ выявлено шесть паттернов изменения РПЭ, при этом в 19,2% случаев АФ обнаруживает изменения, не выявляемые при офтальмоскопии. В то же время, в 9,6% случаев при офтальмоскопии и АФ не было выявлено отклонений от нормы, что свидетельствует о необходимости применения при диагностике НДС функциональных и структурных методов исследования.
3. Выявлена нерегистрируемая ЭОГ и гЭРГ соответственно в 36,5% и 26,9% глаз пациентов с НДС. У остальных пациентов установлено:
 - нарастание различий показателей ЭОГ (снижение амплитуды базового, темнового и светового потенциалов, увеличение латентности темнового спада и светового подъема) по мере увеличения площади и глубины повреждения РПЭ.
 - корреляционная связь слабой и средней силы между размерами потери РПЭ и латентностью и амплитудой светового подъема ($K=0,37-0,63$, $p<0,05$) ЭОГ, что свидетельствуют о большей площади поражения РПЭ, нежели это можно визуализировать с помощью АФ и офтальмоскопии.
 - нарастание различий по сравнению с контрольной группой по показателям латентности и амплитуды а-волны ($p<0,05-0,000008$) и по амплитуде в-волны гЭРГ по мере увеличения выраженности изменений ФР.
 - у пациентов с регистрируемой гЭРГ и ЭОГ потеря эллипсоидной зоны коррелирует с амплитудой а- и в- волны ($K=-0,72-0,77$, $p<0,005$), латентностью в- волны гЭРГ ($K=0,53$, $p<0,005$) и КА ЭОГ ($K=-0,71$, $p<0,005$).

4. Выявлено несоответствие небольшого дефекта эллипсоидной зоны и РПЭ значительным поражениям поля зрения и нарушениям показателей ЭОГ и гЭРГ в 3,8% случаев, что свидетельствует о выраженном нарушении функций ФР/РПЭ при их относительно сохранной структуре.
5. Создана модель повреждения РПЭ в экспериментах на кроликах и исследовано субретинальное введение стволовых клеток в сетчатку, что дает возможность наглядно получить модель заболевания сетчатки с повреждением РПЭ.
6. Впервые в РФ проведена субретинальная трансплантация нейрональных предшественников *in vivo* и оценено влияние трансплантации на структуру сетчатки. На 21-й день после операции отмечается уменьшение толщины среза на ОКТ за счет внутренних и внешних слоев сетчатки, наличие гиперрефлективного очага, соответствующего месту введения НП.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с клиническими признаками НДС необходимо проводить комплексную диагностику, включающую ОКТ, АФ, КП, ЭРГ и ЭОГ, что позволяет получить полную и разностороннюю картину состояния сетчатки даже на ранних стадиях заболевания.
2. Офтальмологи поликлинического звена, которые подчас не всегда могут полноценно обследовать пациента, при малейших подозрениях на НДС, должны направлять таких пациентов в специализированные клиники, научно-исследовательские институты для верификации заболевания.
3. При выявлении НДС, пациентов в самые ранние сроки необходимо направлять на генетическое тестирование.
4. Пациентам с ПР при нерегистрируемой гЭРГ и ЭОГ следует проводить мфЭРГ для оценки сохранности центральной зоны сетчатки.
5. Для исследования выживания и интеграции различных видов СК, а также для разработки эффективного метода лечения пациентов с наследственными и возрастными дегенеративными заболеваниями сетчатки,

обусловленными повреждением РПЭ, можно использовать предложенную универсальную модель повреждения РПЭ.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шеремет Н.Л., Грушкэ И.Г., Жоржолодзе Н.В., Ронзина И.А., Микаелян А.А., Танас А.С., Стрельников В.В. Полиморфизм клинических проявлений при мутациях сайта сплайсинга в гене *ABCA4*. // **Вестник офтальмологии**. -2018.-Т.134, №6. –С.82-91. 2018;134(6): 83-93
2. Н.Л. Шеремет, И.Г. Грушкэ, Н.В. Жоржолодзе, И.А. Ронзина, А.А. Микаелян, В.В. Кадышев, А.С. Танас, К.И. Аношкин, В.В. Стрельников. Клинико-генетические корреляции у пациентов с наследственными заболеваниями сетчатки при комплексной мутации [L541P;A1038V] в гене *ABCA4*.// Точка зрения. Восток-Запад: научно-практический журнал. 2018; 2:51-54.
3. Н.Л. Шеремет, И. Г. Грушкэ, Н. В. Жоржолодзе, И. А. Ронзина, А. А. Микаелян, С. А. Курбатов, В. В. Кадышев, К. И. Аношкин, В. В. Стрельников. Спектр молекулярно-генетических нарушений и разнообразие клинических форм Болезни Штаргардта. // **Сибирский научно медицинский журнал** 2018;5(38):65-72
4. Шеремет Н.Л., Микаелян А.А., Андреев А.Ю., Киселев С.Л. Возможности лечения заболеваний сетчатки с повреждением ретинального пигментного эпителия. // **Вестник офтальмология**. 2019; 135 (5-2): 226-234.
5. Н.Л. Шеремет, И.А. Ронзина, В.В. Стрельников, А.А. Микаелян, И.Г. Грушкэ, Н.В. Жоржолодзе, С.Л. Киселев. Возможности электроокулографии в оценке функционального состояния сетчатки.// Точка зрения. Восток-Запад: научно-практический журнал. 2019; 2:71-75.
6. Н.Л. Шеремет, А.А. Микаелян, А.Ю. Андреев, А.А. Плюхова, А.А. Федоров, Н.А. Андреева, С.Л. Киселев. Повреждение пигментного эпителия сетчатки в эксперименте. Современные технологии в офтальмологии № 3. 2019. С. 215-217
7. И.Г. Грушкэ, Н.Л. Шеремет, Н.В. Жоржолодзе, И.А. Ронзина, А.А. Микаелян, А.С. Танас, К.И. Аношкин, В.В. Стрельников. Возможность прогнозирования тяжести клинического течения наследственных заболеваний сетчатки у пациентов с мутацией p.G1961E в гене *ABCA4*. Современные технологии в офтальмологии. 2019; . № 4 2019.Актуальные проблемы офтальмологии. С.63-67.
8. Н.Л. Шеремет, И.Г. Грушкэ, Н.В. Жоржолодзе, И.А. Ронзина, А.А. Микаелян, А.С. Танас, К.И. Аношкин, В.В. Стрельников. Клинико-генетические корреляции у пациентов с наследственными заболеваниями

сетчатки при мутации p.G1961E в гене ABCA4. // **Вестник офтальмологии**. 2019;135(4): 10-18.

9. Н.Л. Шеремет, И.А. Ронзина, А.А. Микаелян, Н.В. Жоржолодзе, А.А. Плюхова, С.Л. Киселев. Морфофункциональные показатели ретинального пигментного эпителия и фоторецепторного аппарата при наследственных заболеваниях сетчатки.// **Вестник офтальмологии**. 2020, Т.136, №4-6, с.5-12.

10. Н.Л. Шеремет, А.А. Микаелян, А.Ю. Андреев, А.А. Плюхова, Н.А. Андреева, С.Л. Киселев. Возможности экспериментального моделирования повреждающего воздействия на пигментный эпителий сетчатки. // **Вестник офтальмологии**. 2021, Т. 137, №1, с. 5-12.

Изобретения по теме диссертации:

Аветисов С.Э., Шеремет Н.Л., Киселев С.Л., Микаелян А.А., Андреев А.Ю., Плюхова А. А., Федоров А.А. Патент РФ на изобретение № 2707264 от 25.11.2019 «Способ моделирования повреждения ретинального пигментного эпителия (РПЭ) для изучения влияния на него трансплантированных стволовых клеток». Опубликовано 25.11.2019 .

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВAF – коротковолновая аутофлюоресценция
BSS – сбалансированный солевой раствор
PBS – фосфат-буферный раствор
АФ - аутофлюоресценция
БШ - болезнь Штаргардта
ВМД – возрастная макулярная дегенерация
гЭРГ - ганцфельд-электроретинография
ДЗН - диск зрительного нерва
КП - компьютерная периметрия
мф-ЭРГ - мультифокальная электроретинография
НДС –наследственные дистрофии сетчатки
НП – нейрональные предшественники
ОКТ - оптическая когерентная томография
ПА – пигментная абиотрофия
ПКД- палочко-колбочковая дистрофия
ПФОС – перфторорганические соединения
РПЭ - ретинальный пигментный эпителий
СК – стволовые клетки
СНВС - слой нервных волокон сетчатки
ФР - фоторецепторы
чЭСК - эмбриональные стволовые клетки человека
ЭОГ - электроокулография