

На правах рукописи

ЖОРЖОЛАДЗЕ НИНО ВЛАДИМИРОВНА

**КЛИНИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ БОЛЕЗНИ ШТАРГАРДА**

14.01.07 — глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2017

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук
доктор биологических наук

Шерemet Наталия Леонидовна
Стрельников Владимир Викторович

Официальные оппоненты:

Киселева Татьяна Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, начальник отдела ультразвуковых исследований

Мосин Илья Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ «Детская клиническая больница имени З.А.Башляевой» Департамента здравоохранения города Москвы, заведующий офтальмологическим отделением

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

Защита диссертации состоится 20 марта 2017г. В 14-00 на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней», 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».

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

М.Н.Иванов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень её разработанности

Болезнь Штаргардта (БШ) является наиболее распространенным заболеванием среди наследственных дистрофий сетчатки, частота встречаемости варьирует в разных популяциях, в среднем оценивается как 1:10000 [Bessant D.A., 2001].

Разнообразие офтальмологических симптомов у пациентов, в том числе из одной семьи, или частое сочетание клинических признаков, характерных для различных дистрофий сетчатки, у одного пациента затрудняют клиническую оценку БШ. Сложности дифференциальной диагностики также возникают в ранние сроки заболевания с невыраженной симптоматикой или при значительных хориоретинальных изменениях, что приводит к позднему выявлению этиологии заболевания, затрудняет последующее прогнозирование течения заболевания и не позволяет рекомендовать пациенту адекватные патогенетические способы лечения и профилактики активного прогрессирования дистрофии.

Выявление морфофункциональных патогномоничных особенностей БШ имеет большую значимость для своевременной дифференциальной диагностики среди других центральных дистрофий сетчатки, оценки тяжести поражения и определения тактики ведения пациентов на разных стадиях заболевания. Морфологические и функциональные исследования, взаимно дополняя друг друга, позволяют получить наиболее полную клиническую картину, определить корреляционную зависимость различных показателей, что важно для определения особенностей и механизмов развития заболевания.

Изучение молекулярно-генетической основы БШ позволило выявить в настоящее время несколько генов (*ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1*, *CNGB3*), повреждения которых приводят к сходным клиническим проявлениям. Хотя мутации гена *ABCA4* являются наиболее частой и изученной причиной БШ, их обнаружение колеблется в пределах 40% - 65% [Chacón-Camacho O.F., 2013; Hargitai J., 2005; Maia-Lopes S., 2009]. Выявляемость мутаций, как отмечают

многие авторы, зависит от различных факторов, и в первую очередь от технических возможностей методов молекулярно-генетического анализа.

Предполагается, что внедрение методов секвенирования нового поколения, позволяющих в короткие сроки проводить одновременный скрининг генетических вариантов большого количества генов, повысит эффективность ДНК-диагностики при БШ и позволит проводить более полный анализ клинико-генетических корреляций.

В последнее время все больше внимания уделяют мутациям в интронных участках гена, которые могут генерировать новые сайты сплайсинга. Секвенирование данных участков гена *ABCA4* описано в единичных работах, однако это исследование дает возможность выявления глубоких интронных вариантов мутаций в 1- 29% случаев [*Braun T.A., 2013; Michaelides M., 2010*].

В Российской Федерации до настоящего времени проводили исследование частых мутаций гена *ABCA4* при БШ с низкой эффективностью генетической верификации заболевания. Поэтому разработка диагностической панели генетических маркеров БШ на основе секвенирования нового поколения является актуальной задачей. Возможность одновременного анализа нуклеотидных последовательностей нескольких генов (*ABCA4, ELOVL4, PROM1, CNGB3*), ассоциированных с БШ, должна повысить эффективность ДНК-диагностики и создать условия для изучения особенностей фенотипических проявлений различных сочетаний мутаций.

Целью настоящей работы является повышение эффективности клинической и молекулярно-генетической диагностики болезни Штаргардта.

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

1. Изучить особенности клинического течения и морфофункциональные характеристики БШ на основании использования современных высокотехнологичных методов диагностики.
2. Разработать систему молекулярно-генетической диагностики БШ на основе секвенирования нового поколения.

3. Провести скрининг генетических вариантов в выборке пациентов с БШ с использованием экспресс-панели для диагностики 5 наиболее частых мутаций в гене *ABCA4* и высокопроизводительного параллельного секвенирования всех кодирующих участков генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1*, *CNGB3* и криптоических сайтов сплайсинга в некодирующих областях гена *ABCA4*, сравнить их эффективность.
4. Изучить особенности клинических проявлений выявленных генетических вариантов БШ.
5. Разработать эффективный алгоритм клинической и молекулярно-генетической диагностики БШ.

Научная новизна

Впервые на основании комплексных клинических и молекулярно-генетических исследований, проведенных в выборке больных с БШ, разработан алгоритм диагностических мероприятий, повысивший эффективность генетической верификации заболевания до 84%.

Впервые в РФ разработана диагностическая панель для исследования БШ с использованием высокопроизводительного параллельного секвенирования всех кодирующих участков генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1*, *CNGB3* и криптоических сайтов сплайсинга в некодирующих областях гена *ABCA4*.

Впервые в российской популяции пациентов с БШ проведен поиск глубоких интронных мутаций гена *ABCA4*.

На основании комплексного обследования с помощью современных высокотехнологичных методов диагностики выявлены клинические особенности течения БШ, определены морфофункциональные варианты заболевания и информативные критерии морфометрических изменений макулярной зоны для дифференцирования БШ и оценки тяжести заболевания.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования показали высокую теоретическую и практическую информативность комплексной клинической и молекулярно-генетической диагностики БШ.

Применение разработанной диагностической панели с полным покрытием всех кодирующих областей генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1*, *CNGB3*, а также некодирующих участков концевых экзонов и участков генов, ответственных за сплайсинг мРНК, обеспечивает высокую эффективность выявления редких экзонных мутаций и генетической верификации БШ.

Разработанная диагностическая панель молекулярно-генетического анализа может быть использована для подтверждающей, дифференциальной, пресимптоматической диагностики БШ.

Определены особенности течения, клинической картины БШ, которые могут помочь практикующим врачам заподозрить заболевание, сократить сроки обследования, повысить точность и уровень диагностики.

Разработан алгоритм современной диагностики и профилактики БШ, включающий морфофункциональные и визуализирующие методы оценки состояния сетчатки, молекулярно-генетическое исследование.

Разработанная диагностическая панель для исследования БШ позволит обследовать большую выборку пациентов, определить характер и частоты мутаций у пациентов с БШ в РФ.

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

Клиническая картина БШ, несмотря на специфичность проявлений, характеризуется частым сочетанием клинических признаков, характерных для различных дистрофий сетчатки, особенностями течения и возраста манифестации заболевания, низкими показателями отягощенности наследственного анамнеза.

Комплексная морфофункциональная и визуализирующая оценка сетчатки на основании использования современных высокотехнологичных методов

диагностики выявляет особенности фенотипа, течения и прогрессирования заболевания, ассоциированные с генетическим дефектом.

Оценка распространенности потери и дезорганизации зоны раздела наружных и внутренних сегментов фоторецепторов (IS/OS) сетчатки с помощью спектральной ОКТ является наиболее важным критерием для дифференцирования БШ и оценки тяжести заболевания.

Оценка зоны атрофии РПЭ и накопления липофусцина важна для анализа распространенности и мониторинга дистрофических изменений сетчатки, не позволяет судить о функциональных зрительных потерях.

Дизайн разработанной диагностической панели повышает эффективность генетической верификации БШ, позволяет выявлять редкие мутации генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1*, *CNGB3* и глубокие интронные мутации *ABCA4*, увеличивает возможности профилактики и лечения, в том числе проведения генотерапии.

Личный вклад автора в проведенное исследование

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

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 VI Научно-практической конференции «Актуальные вопросы офтальмологии» (Москва, 2014), VIII

всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014», X Съезде офтальмологов России (Москва, 2015), заседании проблемной комиссии ФГБНУ «НИИГБ» от 20 июня 2016г.

Внедрение результатов работы в практику

Результаты работы внедрены в клиническую практику на кафедре глазных болезней ПМГМУ им. И.М. Сеченова и в ФГБНУ «НИИГБ».

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 - в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 184 источников, из них 27 отечественных и 157 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 32 таблицами и 38 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика материала и методов исследования.

Клиническое исследование включало анализ данных обследования 60 пациентов (120 глаз) с БШ, из них 48,3% мужчин и 51,7% женщин, в возрасте на момент обследования от 6 до 73 лет (средний возраст $36 \pm 17,3$). Критерием исключения из исследования было наличие других глазных заболеваний, кроме БШ, которые могли повлиять на изменение функций зрения и анализ результатов обследования.

В группы контроля были набраны здоровые добровольцы для проведения мультифокальной ЭРГ (мф-ЭРГ) (15 человек, 30 глаз), ганцфельд-ЭРГ (гЭРГ) (17 человек, 34 глаза), ОКТ (17 человек, 33 глаза). Группы пациентов и группы

контроля были однородны по возрасту (критерий Колмогорова-Смирнова, $p > 0,1$).

Офтальмологические методы обследования пациентов.

Традиционные офтальмологические методы обследования включали визометрию с максимальной коррекцией аметропии, рефрактометрию, биомикроскопию, обратную офтальмоскопию, тонометрию. Цветовое зрение оценивали по полихроматическим таблицам для исследования цветоощущения Е.Б. Рабкина.

Флюоресцентную ангиографию глазного дна (ФАГ) проводили стандартным методом на фундус-камере FF 450 plus (ФФ 450 плюс) «Карл Цейс» (Германия) с встроенной цифровой камерой и HRT3 Heidelberg Engineering (Германия). Аутофлюоресценцию (АФ) выполняли на конфокальном сканирующем лазерном офтальмоскопе (HRA-2 «Heidelberg Engineering», Германия). По АФ картине глазного дна с помощью специального программного обеспечения прибора оценивали горизонтальный и вертикальный размеры атрофического очага, соответствующего атрофии РПЭ (зоны абсолютной гипофлюоресценции), измерения проводили строго через центр фовеа.

ОКТ сетчатки и зрительного нерва проводили с помощью спектральных ретинотомографов RTVue-100 (США), Cirrus HD-OCT (Carl Zeiss). Для оценки структурных изменений использовали следующие протоколы: cross line, MM5, ONH и 3D Disc. В режиме cross line оценивали изменения РПЭ сетчатки и зоны IS/OS, а также с помощью компьютерного программного обеспечения измеряли горизонтальный и вертикальный размеры зоны потери IS/OS, проходящие через центр фовеа.

Компьютерную периметрию проводили с помощью статической программы M Standart/Dynamic (макулярной программы) и полуавтоматической кинетической программы с объектом III/4e на периметре Octopus 900 (Interzeag AG, Switzerland).

Электрофизиологические исследования включали регистрацию гЭРГ и мф-ЭРГ («Tomey EP-1000 Multifocal», Германия).

Молекулярно-генетические исследования.

Скрининг 5 наиболее частых мутаций p.G863A, p.L541P, p.A1038V, p.G1961E, p.P1380L в гене *ABCA4* проводили 54 пациентам с помощью MLPA-анализа. Высокопроизводительное параллельное секвенирование кодирующих (экзонных) последовательностей и прилежащих участков интронов генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1* и *CNGB3* проводили на приборе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты клинических исследований.

Средний возраст дебюта заболевания, оцененный со слов пациентов и по результатам анализа медицинской документации, составил $17,9 \pm 11,4$ (3 года/43 года), длительность заболевания – $17 \pm 12,5$ лет (2года/45 лет).

В табл. 1 приведено распределение пациентов по выявленному возрасту дебюта заболевания. Из данных таблицы следует, что у большинства пациентов дебют заболевания приходится на первые две декады жизни.

Таблица 1

Распределение пациентов по возрасту дебюта БШ.

<i>Возраст дебюта заболевания</i>	<i>До 10 лет</i>	<i>11-20 лет</i>	<i>21-30 лет</i>	<i>31-40 лет</i>	<i>41-50 лет</i>
<i>Количество пациентов</i>	22	19	6	9	4
<i>Средний возраст, лет*</i>	$7 \pm 2,1$	$15,8 \pm 2,9$	$25,7 \pm 3$	$34,7 \pm 2,6$	$44,5 \pm 3,1$

*Примечание: * - среднее значение \pm стандартное отклонение.*

При сравнении групп пациентов в зависимости от возраста дебюта заболевания у 4 пациентов (8 глаз) с манифестацией БШ после 40 лет было отмечено более медленное снижение зрения в течение первой декады заболевания, более сохраненные структурные показатели сетчатки, такие как объем в пределах 3 и 6 мм, толщина сетчатки в пара- и перифовеа, меньшие потери зоны IS/OS по сравнению с пациентами с ранним дебютом ($p < 0,05$).

У пациентов с БШ отмечено выраженное снижение показателей визометрии к 4-9 годам заболевания с последующим более плавным и постепенным изменением

зрительных функций до $0,09 \pm 0,08$ (нижняя/верхняя квартиль $0,03/0,1$), нарушение цветового зрения в виде генерализованной дисхроматопсии, пациенты не читали $17,8 \pm 7,6$ из 27 таблиц Е.Б. Рабкина. Не обнаружено значимой разницы в степени дисхроматопсии в различные временные периоды заболевания ($p > 0,05$).

У всех пациентов отмечено развитие центральной относительной и/или абсолютной скотомы различной площади и степени депрессии световой чувствительности. В зависимости от распространенности снижения пороговой световой чувствительности были выделены три подгруппы пациентов: изменения в пределах центральных 15° поля зрения у 28 пациентов (56 глаз), в пределах 30° – 14 пациентов (28 глаз), в пределах 60° – 13 пациентов (26 глаз). Пациенты в этих группах не отличались по возрасту начала и длительности заболевания ($p > 0,05$).

Острота зрения в трех группах пациентов, распределенных по данным статической периметрии, была практически идентичной, однако в I группе была установлена менее выраженная дисхроматопсия ($p < 0,001$). Между степенью дисхроматопсии и изменениями поля зрения была выявлена корреляционная связь ($R = 0,55$; $p < 0,05$).

На основании офтальмоскопической, АФ и ФАГ картины глазного дна пациенты были разделены на три группы в зависимости от типа БШ: БШ I тип – 33 пациента (66 глаза) с центральным атрофическим очагом; БШ II тип – 13 пациентов (26 глаз) с центральным атрофическим очагом и локализованными пара- и перифовеальными желтовато-белыми пятнами; БШ III типа – 14 пациентов (28 глаз) с центральным атрофическим очагом и многочисленными желтовато-белыми пятнами по всему глазному дну.

При сравнении показателей возраста начала и длительности заболевания, остроты зрения, цветового зрения, показателей мф-ЭРГ и гЭРГ не было получено значимой разницы у пациентов с 3 типами БШ. Более значимое снижение световой чувствительности MS и увеличение среднего дефекта световой чувствительности MD выявлены при III типе БШ ($p < 0,02$), а также обнаружено превалирование при I и II типах БШ изменений поля зрения в пределах 15° (соответственно в 56,0% и 73,9% случаев) и изменений в пределах 30 - 60° при III

типе БШ (90,9% случаев). Тем не менее средней и сильной степени корреляционная связь между типом БШ и функциональными нарушениями не была выявлена.

По данным ОКТ исследования показатели толщины и объема сетчатки в фовеа, пара- и перифовеа у пациентов с БШ значительно отличались от данных контрольной группы ($p < 0,00001$). Обнаружено, что небольшие, ограниченные 15° изменения в поле зрения наблюдаются у пациентов с более сохранной по толщине сетчаткой в перифовеа ($p < 0,006$).

По ОКТ срезу пациенты были разделены на три основные группы: 1-я группа (24 пациента, 47 глаз) - потеря зоны IS/OS в макулярной зоне и сохранение зоны IS/OS на всем остальном протяжении ОКТ среза сетчатки (рис.1); 2-я группа (17 пациентов, 32 глаза) - потеря зоны IS/OS в макулярной зоне с распространением дезорганизации IS/OS на всем остальном протяжении ОКТ среза сетчатки; 3-я группа (12 пациентов, 24 глаза) - распространенная потеря зоны IS/OS на всем протяжении ОКТ среза сетчатки.

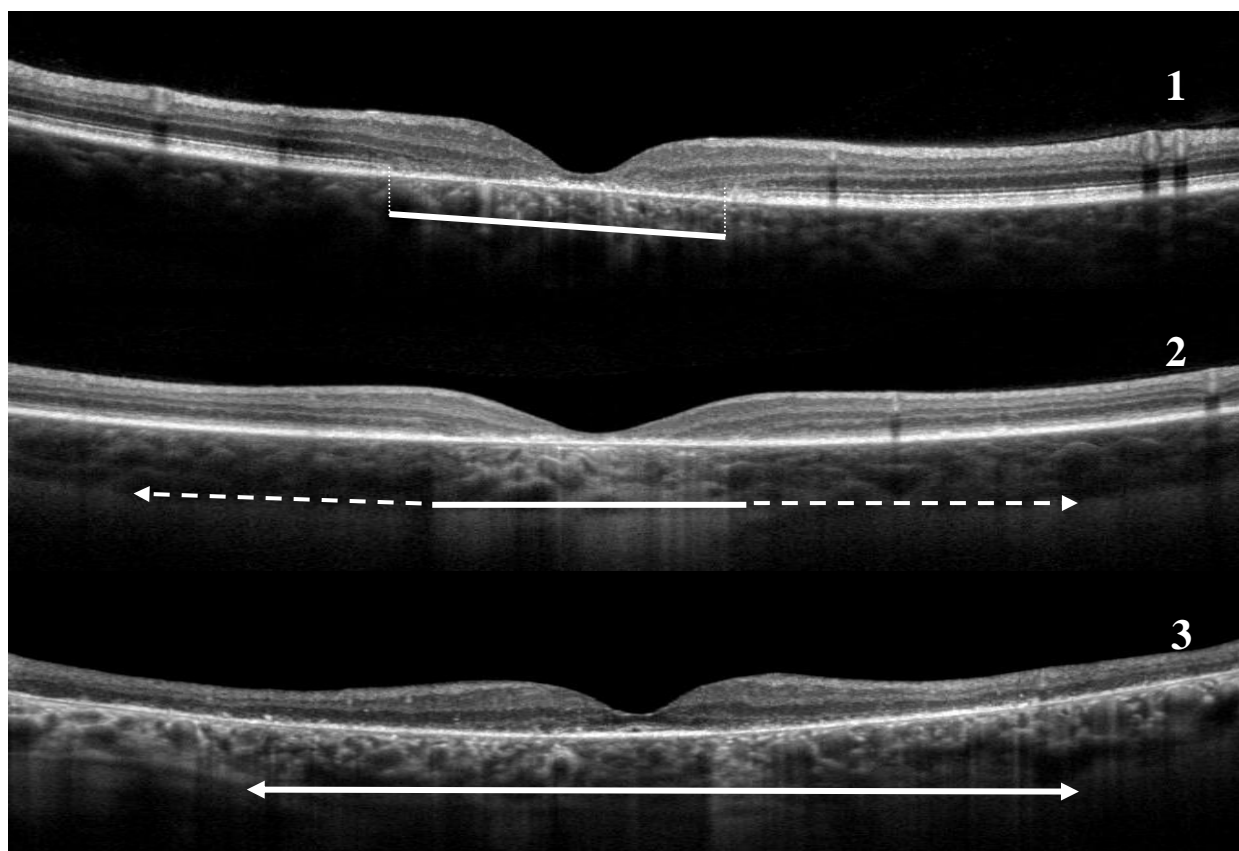


Рисунок 1. ОКТ срез сетчатки пациентов: 1 – 1-й группы, 2 - 2-й группы, 3 - 3-й группы. Потеря IS/OS в макулярной зоне (белый фрагмент) с распространением дезорганизации IS/OS на всем остальном протяжении (стрелка пунктиром), распространенная потеря зоны IS/OS на всем протяжении (сплошная стрелка).

При исследовании цветового зрения была установлена прямая связь между степенью повреждения зоны IS/OS и количеством нечитаемых таблиц ($R=0,66$; $p<0,05$). Световая чувствительность MS по данным статической периметрии уменьшалась, а средний дефект световой чувствительности MD увеличивался соответственно с потерей IS/OS слоя, достигая максимальных изменений в 3 группе IS/OS (табл.2). Выявлена разница по основным показателям статической периметрии в трех IS/OS группах, а также установлена корреляционная связь между степенью поражения IS/OS и показателями MD ($R=0,68$; $p<0,05$) и MS ($R=-0,66$; $p<0,05$). Была установлена сильная прямая связь между степенью повреждения зоны IS/OS и распространенностью периметрических изменений (коэффициент гамма корреляции $R=0,8$; $p<0,05$).

При сравнительном анализе параметров мф-ЭРГ ($P_{1\mu v}$, P_{1ms} , P_{1nv/deg^2}) в трех IS/OS группах пациентов в 1-3-х (центральных) «кольцах» отсутствовали статистически значимые различия между группами, в 4-м и 5-м «кольцах» уровень достоверности различий по анализируемым параметрам мф-ЭРГ варьировал от $p<0,00003$ до $p<0,03$ и был более значимым в 3-й группе IS/OS. Установлена прямая и обратная корреляционная связь между степенью повреждения зоны IS/OS и изменениями параметров мф-ЭРГ в периферических «кольцах» ($R=0,49-0,7$; $p<0,05$).

Таблица 2

Показатели остроты зрения, цветового зрения и компьютерной периметрии пациентов с БШ по трем основным IS/OS группам.

Группа IS/OS	Острота зрения	Кол-во нечитаемых таблиц	Показатели периметрии		
			MD, дБ	sLV, дБ	MS, дБ
1 группа	0,19±0,2	12,5 4/19	8,2 5,5/14,6	6,7 5,6/8,4	22,5 14/25
2 группа	0,18±0,1	18,8 11,75/20,5	15 12,1/18,9	6,4 5,4/7,5	14,5 10,1/19,2
3 группа	0,22±0,22	25 23,5/27	25,9 21,9/28,2	5,15 4,1/6,3	2,35 0,7/7
<i>p</i>	$p>0,05$	I-III гр $p<0,00001$ II-III гр $p<0,00001$	I-III гр $p<0,001$ I-III гр $p<0,00001$ II-III гр $p<0,006$	I-III гр $p<0,001$ II-III гр $p<0,02$	I-III гр $p<0,007$ I-III гр $p<0,00001$ II-III гр $p<0,002$

При сравнении размеров потери зоны IS/OS и размеров атрофического очага РПЭ у части пациентов был выявлен ограниченный атрофический очаг РПЭ по АФ картине и практически полная потеря IS/OS на ОКТ (29,7% глаз). У значительного числа пациентов атрофический очаг РПЭ был меньше, чем потеря IS/OS (59,5% глаз). Практически одинаковые потери РПЭ и IS/OS были выявлены в 10,8% глаз (табл.3).

Таблица 3

Размеры атрофического очага РПЭ по АФ картине и потери IS/OS на ОКТ срезе у пациентов с БШ.

<i>Горизонтальные и вертикальные размеры по ОКТ и АФ картине</i>	<i>Группы пациентов в зависимости от соотношения размеров атрофического очага РПЭ по АФ картине и потери IS/OS на ОКТ срезе</i>		
	<i>ограниченный атрофический очаг РПЭ и полная потеря IS/OS</i>	<i>атрофический очаг РПЭ меньше, чем потеря IS/OS</i>	<i>одинаковые размеры атрофического очага РПЭ и потери IS/OS</i>
<i>Горизонтальный размер ОКТ, мм</i>	NA	3,41 2,31/4,13	2,50 2,20/3,00
<i>Вертикальный размер ОКТ, мм</i>	NA	2,69 2,02/3,21	2,46 2,27/3,21
<i>Горизонтальный размер АФ, мм</i>	2,54 1,22/3,88	1,73 1,29/2,06	2,88 2,48/3,16
<i>Вертикальный размер АФ, мм</i>	2,68 0,74/2,93	1,66 1,35/2,21	3,09 2,49/3,32

Примечание: NA – (not available) Данные не определены.

Таким образом, по данным АФ и ОКТ в большинстве случаев потери слоя IS/OS преобладали над размерами атрофических изменений РПЭ, и только в 10,8% случаев размеры были соизмеримы. У всех пациентов с помощью ОКТ была проведена количественная оценка перипапиллярного СНВС, что позволило у 19 пациентов (28 глаз) выявить истончение СНВС по среднему показателю и показателям в отдельных секторах (табл.4). Толщина СНВС в назальном секторе у пациентов с БШ без истончения СНВС согласно нормативной базе данных прибора находится в пределах нормы, однако по сравнению с показателями группы контроля отмечено снижение толщины СНВС в этом секторе ($p < 0,00008$). Было обнаружено, что истончение СНВС развивается у пациентов с более ранним началом БШ, при этом ее возникновение не зависит от длительности заболевания, возраста пациента, типа БШ (табл. 5).

Таблица 4

Показатели толщины слоя нервных волокон сетчатки у пациентов с БШ в зависимости от наличия истончения СНВС.

Группы пациентов	Средняя толщина СНВС	Толщина СНВС по секторам			
		верхний	носовой	нижний	височный
БШ в сочетании с истончением СНВС	95,9 88,9/99,3	116,3 110,0/122,0	76,8 69,8/84,8	120,8 116,5/131,8	70,0 64,5/80,3
БШ без истончения СНВС	108,2 102,7/114,5	129,0 120,8/144,5	81,3 72,5/86,3	136,0 126,5/150,5	82,3 75,5/91,5
Контрольная группа	111,0 107,7/121,4	136,5 124,5/147,5	90,5 83,0/97,5	142,5 127,0/157,0	84,5 78,5/88,0
<i>p</i>	<i>I-II группы</i> <i>p</i> <0,00000 <i>I-K группы</i> <i>p</i> <0,00000	<i>I-II группы</i> <i>p</i> <0,000004 <i>I-K группы</i> <i>p</i> <0,000002	<i>I-K группы</i> <i>p</i> <0,00002 <i>II-K группы</i> <i>p</i> <0,00008	<i>I-II группы</i> <i>p</i> <0,0001 <i>I-K группы</i> <i>p</i> <0,0002	<i>I-II группы</i> <i>p</i> <0,00007 <i>I-K группы</i> <i>p</i> <0,0002

Развитие истончения СНВС отмечено у пациентов с более выраженным снижением толщины сетчатки в периферии ($p < 0,001$) и ее объема в пределах 6мм ($p < 0,002$).

Таблица 5

Характеристика пациентов с БШ в зависимости от наличия истончения СНВС.

Группы пациентов	Возраст дебюта ШТ	Возраст пациента на момент обследования	Длительность заболевания	Тип БШ (кол-во глаз)
БШ в сочетании с истончением СНВС	8,0 5,0/14,0	30,0 19,0/42,0	16,0 13,0/31,0	I тип - 18 II тип - 4 III тип - 6
БШ без истончения СНВС	18,0 10,0/29,0	35,0 26,0/48,5	14,5 6,0/24,0	I тип - 37 II тип - 18 III тип - 13
<i>p</i>	<i>p</i> <0,0002	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05	<i>p</i> >0,05

Результаты генетических исследований.

Скрининг 5 мутаций в гене *ABCA4* был выполнен 54 пациентам с БШ и позволил выявить по крайней мере одну мутацию у 27 пациентов (50%), из них две мутации были выявлены у 7 больных (13%) (табл.6). При этом гаплотип

L541P/A1038V, обнаруженный у 15 пациентов, принимали за единую мутацию («комплексная мутация»).

Для совершенствования молекулярно-генетической диагностики БШ в РФ по результатам анализа профильной научной литературы была разработана диагностическая панель, включающая гены *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1* и *CNGB3*. Дизайн системы праймеров для геномного секвенирования обеспечивает полное покрытие всех кодирующих областей выбранных для исследования генов,

Таблица 6

Распределение пациентов с БШ в зависимости от выявленных частых мутаций гена *ABCA4*.

Частые мутации гена <i>ABCA4</i>					Пациенты с БШ	
G863A	G1961E	A1038V	L541P	P1380L	Количество человек	%
N/N	N/N	N/N	N/N	N/N	27	50
N/N	N/mut	N/N	N/N	N/N	8	14
N/N	N/mut	N/mut	N/mut	N/N	5	9
N/N	N/mut	N/N	N/mut	N/N	1	2
N/N	N/mut	N/N	N/N	N/mut	1	2
N/N	N/N	N/mut	N/mut	N/N	10	19
N/N	N/N	N/N	N/mut	N/N	1	2
N/mut	N/N	N/N	N/N	N/N	1	2
					54	100%

Примечание: N/N – мутация не выявлена, N/mut – выявлена гетерозиготная мутация.

а также некодирующих участков концевых экзонов и участков генов, мутации в которых могут приводить к нарушениям сплайсинга РНК.

По результатам высокопроизводительного параллельного секвенирования генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1* и *CNGB3*, по крайней мере одна мутация в одном из 4 генов была обнаружена у 23 из 25 больных (91,7%). Полное молекулярно-генетическое подтверждение клинического диагноза БШ получено для 21 из 25 пациентов (84%).

Один патогенный аллель гена *ABCA4* в гетерозиготном состоянии выявлен у 2 больных. Подавляющее большинство мутаций пришлось на ген *ABCA4* (83% от всех пациентов с выявленными мутациями); мутации в гене промиелина выявлены у 3-х человек (*PROM1*: exon10:c.1117C>T:p.R373C;

c.1114C>T;p.Q372X;), у одного пациента обнаружено две мутации в гене *CNGB3* (exon10:c.1148delC:p.T383fs; exon6:c.819_826del:p.P273fs).

Обнаруженные мутации гена *ABCA4* равномерно распределены по всему гену, тем не менее, встречаемость мутаций в экзонах 12, 21 и 42 повышена за счет частых в исследованной группе больных мутаций - p.L541P, p.A1038V и p.G1961E, соответственно (Рис.2). Однако только у трех пациентов в двух аллелях были обнаружены вышеперечисленные частые мутации, что позволило генетически верифицировать БШ. В остальных случаях (76% от всех обследованных пациентов) именно редкие мутации, встречающиеся в данном исследовании в единичных случаях, дали возможность полного молекулярно-генетического анализа. В том числе у 4 больных были выявлены мутации, локализованные в сайте сплайсинга (в прилежащих интронных областях генов, на стыке экзона и интрона): c.768-1G>T, c.4540-1G>A, c.4634+1G>-, c.5714+5C>T.

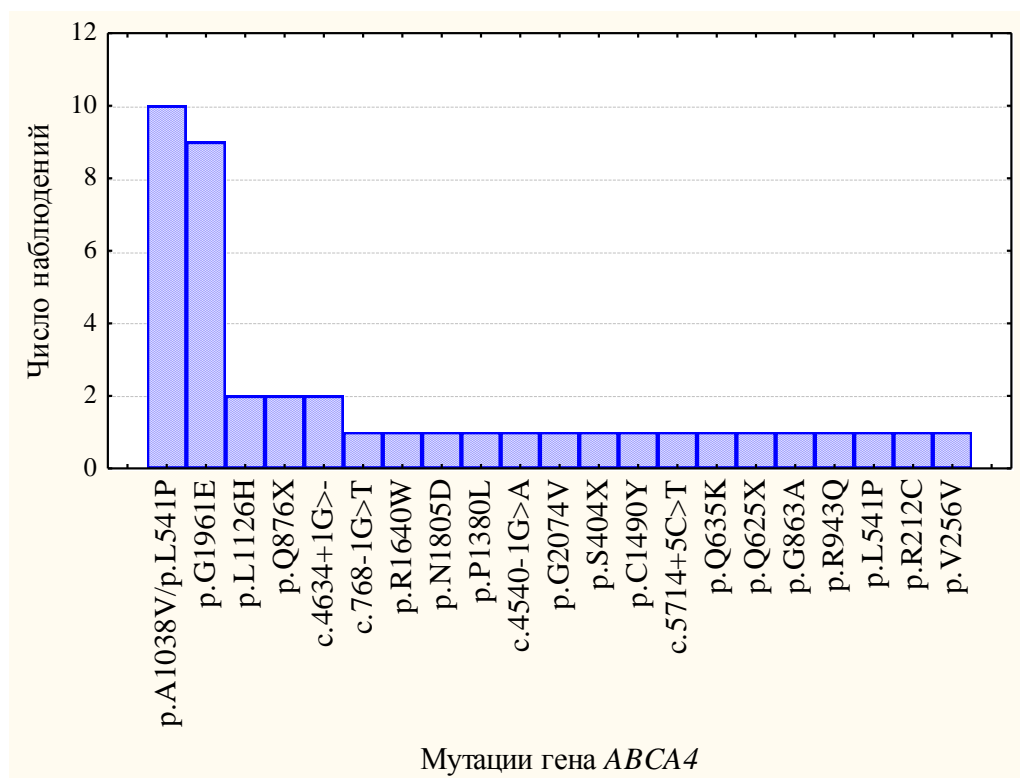


Рисунок 2. Частота встречаемости мутаций гена *ABCA4* у пациентов с БШ.

Учитывая, что у 2-х пациентов не были выявлены мутации, и у 2-х пациентов определен один патогенный аллель гена *ABCA4* в гетерозиготном

состоянии, в данной работе был осуществлен поиск генетических вариантов в сайтах сплайсинга минорных аллелей гена *ABCA4*. В исследованной выборке больных с БШ нами не выявлено ни одной из ранее описанных патогенных глубоких интронных мутаций.

У 67,5% пациентов (27 чел) по данным ФАГ отмечали симптом «молчания хориоидеи» - характерная картина затемнения сосудистой оболочки. Учитывая, что ранее была отмечена связь между наличием положительного симптома «молчание хориоидеи» и мутациями гена *ABCA4*, в данном исследовании картина ФАГ была сопоставлена с локализацией мутаций. Выявили, что в группе пациентов (14 чел), которым проводили ФАГ и генетическое исследование, у 10 из 11 пациентов с «молчанием хориоидеи» обнаружена мутация гена *ABCA4*, у 1 больного мутация не обнаружена.

В нашей выборке пациентов во всех случаях были выявлены гетерозиготные варианты мутаций в гене *ABCA4* (табл.7).

Мутации p.A1038V/p.L541P и p.G1961E встречались наиболее часто, были обнаружены у 10 и 9 пациентов соответственно.

Клиническая картина трех пациентов с гетерозиготной мутацией p.G1961E, которая по данным литературы в гомозиготном варианте обуславливает более легкие формы заболевания, и миссенс-мутациями p.R1640W, p.N1805D и p.P1380L характеризовались более поздним началом заболевания в 42, 20 и 32 года соответственно.

Однако при сравнении клинических данных этих пациентов с показателями других больных с соответствующей длительностью заболевания существенной разницы получено не было. БШ у пациента с гетерозиготной мутацией p.G1961E и миссенс-мутацией p.P1380L, которую некоторые авторы описывают как «мягкую» мутацию [Hwang J.C., 2009], в нашем исследовании сопровождалась значительными морфофункциональными изменениями с низкой остротой зрения Vis OD/OS = 0,02/0,02, выраженными изменениями поля зрения в пределах 60°, несмотря на позднее начало (32 года) и небольшую длительность заболевания (13 лет).

Таблица 7

Частота встречаемости мутаций *ABCA4*, *PROM1*, *CNGB3* у пациентов с генетически верифицированной БШ*.

Гены	Мутации			Количество пациентов
	1 аллель	2 аллель	3 аллель	
<i>ABCA4</i>	p.G1961E	p.A1038V p.L541P		4
	p.G1961E	p.R1640W p.N1805D p.P1380L c.4540-1G>A p.V256V		1 1 1 1 1
	p.A1038V p.L541P	p.R212C p.S404X p.C1490Y IVS40+5 G>A c.4634+1G>-		1 1 1 1 2
	p.Q625X	p.G863A	p.R943Q	1
	p.L541P	p.Q635K		1
	p.L1126H	p.Q876X		2
	<i>PROM1</i>	p.Q372X		1
	p.R373C		2	
<i>CNGB3</i>	p.T383fs	p.P273fs	1	
Всего			23	

*Примечание:** - в таблицу дополнительно включены 2 пациента с генетически верифицированной БШ, обследованных на 5 частых мутаций гена *ABCA4*.

Комплексная мутация p.A1038V/p.L541P в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией G1961E, а также в комбинации с другими мутациями (p.R212C, p.S404X, p.C1490Y, IVS40+5 G>A, c.4634+1G>-) была обнаружена соответственно у 4 и 6 пациентов с I-III типом БШ, дебют заболевания которых был отмечен в возрасте 5-14 лет. Учитывая, что длительность заболевания в этой группе пациентов была различна (от 4-8 до 35-39 лет), а также мутации второго аллеля отличались по влиянию на структуру белкового продукта (миссенс, сайта сплайсинга, нонсенс), сравнение клинических показателей было затруднено. Остальные мутации встречены в единичных случаях, краткая характеристика клинической картины представлена в материалах диссертации. Таким образом, генетическая гетерогенность, лежащая в основе БШ, затрудняет клинико-генетические корреляции, предназначенные для улучшения точной молекулярной и клинической диагностики, а также прогноза течения заболевания.

На основании результатов клинического и молекулярно-генетического анализа БШ был составлен алгоритм диагностики (рис.3).

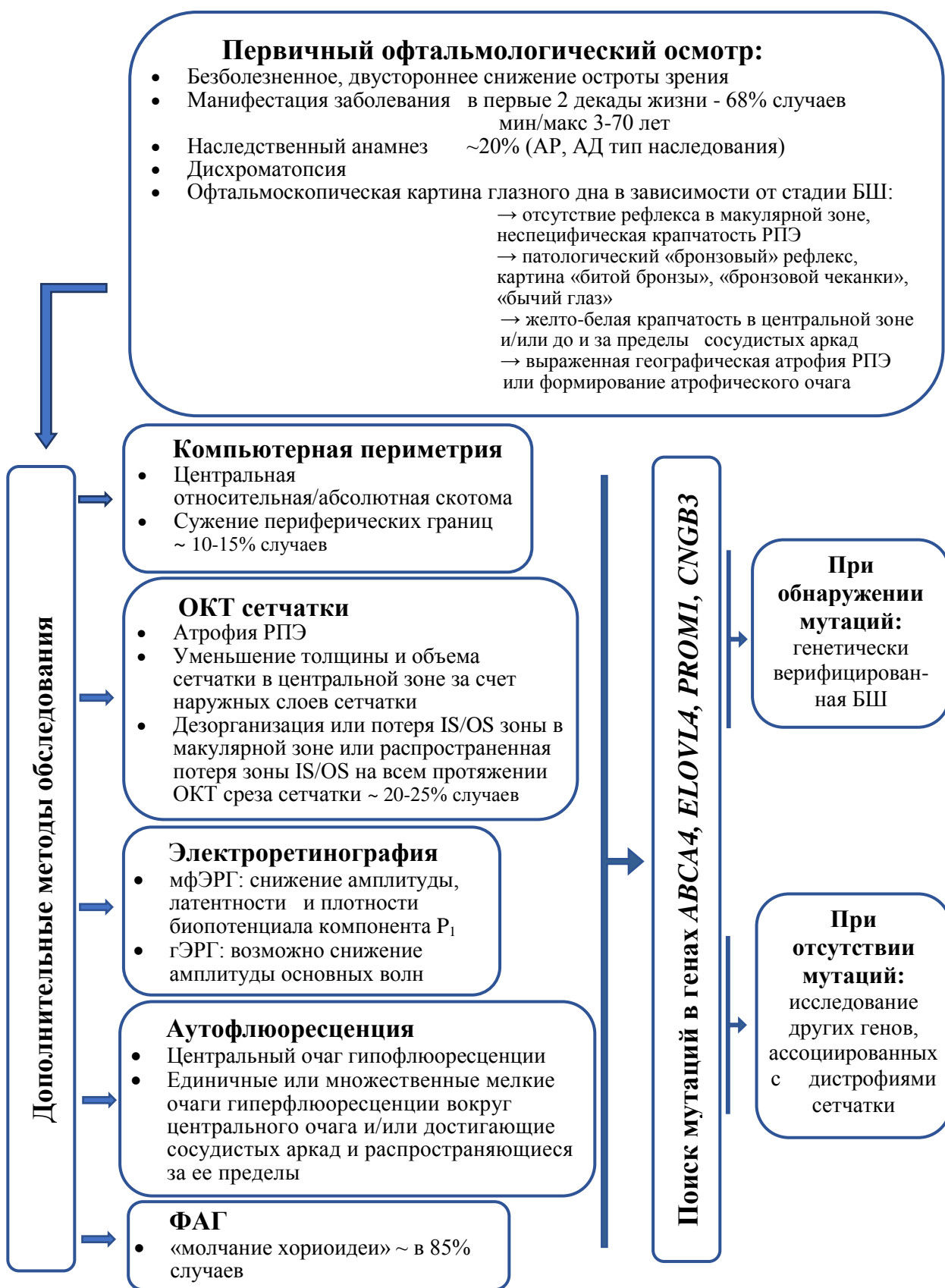


Рисунок 3. Алгоритм диагностики болезни Штаргардта.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на достаточном клиническом материале (60 пациентов) проведен клинический и молекулярно-генетический анализ БШ на основе современных высокотехнологичных методов диагностики и высокопроизводительного параллельного секвенирования ДНК, повысивший эффективность генетической верификации заболевания до 84%.

2. Клинико-диагностическое исследование позволило выявить следующее:

- Поздний дебют БШ отмечен у 22% пациентов в диапазоне 32-48 лет (медиана 35 лет). При манифестации БШ после 41 года выявлены более медленное снижение зрения и более сохраненные структурные показатели сетчатки (толщина сетчатки в пара- и перифовеа и ее объем в пределах 3 и 6 мм, размеры потери зоны IS/OS ($p < 0,05$)) по сравнению с пациентами с ранним дебютом.

- Оценка зоны IS/OS фоторецепторов сетчатки с помощью спектральной ОКТ является наиболее важным критерием для дифференцирования БШ и оценки тяжести заболевания. Установлена корреляционная связь между степенью повреждения зоны IS/OS и количеством нечитаемых полихроматических таблиц для исследования цветоощущения Е.Б. Рабкина (коэффициент гамма корреляции $R=0,66$; $p < 0,05$), показателями статической периметрии MD ($R=0,68$; $p < 0,05$) и MS ($R=-0,66$; $p < 0,05$), распространенностью периметрических изменений ($R=0,8$; $p < 0,05$), изменениями параметров мф-ЭРГ в 4-м и 5-м «кольцах» ($R=0,47-0,7$; $p < 0,05$).

- Истончение СНВС по среднему показателю и показателям в отдельных секторах было выявлено в 27,2% глаз у пациентов с более ранним началом БШ ($p < 0,0002$) и более выраженным снижением толщины сетчатки в перифовеа и ее объема в 6мм ($p < 0,002$).

- Потери слоя IS/OS в 89,2% случаев преобладают над размерами атрофических изменений РПЭ, распространенность которых не отражают степень функциональных нарушений сетчатки

3. В результате поиска пяти частых мутаций в гене *ABCA4* (p.L541P, p.G863A, p.A1038V, p.L1940P, p.G1961E) одна мутация была обнаружена у 37% пациентов

с клиническим диагнозом БШ, диагноз был генетически верифицирован у пациентов с двумя мутациями в 13% случаев.

4. Впервые в РФ разработана система молекулярно-генетической диагностики БШ на основе секвенирования нового поколения с полным покрытием всех кодирующих областей генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1*, *CNGB3*, а также криптических сайтов сплайсинга в некодирующих областях гена *ABCA4*, с помощью которой в выборке 25 больных БШ по крайней мере одна мутация была обнаружена у 91,7% пациентов, полное молекулярно-генетическое подтверждение клинического диагноза БШ получено в 84% случаев.

5. Мутации гена *ABCA4* выявлены у 19 (83%) пациентов, гена *PROM1* - у 3 (13%), гена *CNGB3* - у 1 (4%). Анализ спектра мутаций гена *ABCA4* выявил частые мутации - p.A1038V/p.L541P (37% обследованных пациентов), p.G1961E (33,3% пациентов) У 79% пациентов с БШ обнаружены редкие мутации гена *ABCA4*. В исследованной выборке больных с БШ не выявлено ни одной из ранее описанных патогенных мутаций криптических сайтов сплайсинга.

6. Анализ клинических показателей пациентов с частыми мутациями p.G1961E и p.A1038V/p.L541P выявил более поздний дебют БШ у пациентов с p.G1961E в компаунд-гетерозиготном состоянии с другими миссенс-мутациями. Других специфических симптомокомплексов получено не было в связи с ограниченной выборкой пациентов и генетическим полиморфизмом.

7. Предложенный алгоритм клинического и молекулярно-генетического обследования позволяет повысить выявляемость БШ, информативность ДНК-диагностики и последующего медико-генетического консультирования.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При подозрении на наследственный генез дистрофии сетчатки помимо сбора анамнеза и стандартного поликлинического обследования необходимо комплексное изучение морфофункциональных параметров сетчатки с помощью: полихроматических таблиц для исследования цветового зрения, ОКТ, КП, мф-ЭРГ, гЭРГ, ФАГ, аутофлюоресценции глазного дна. Отличительной чертой

центральной дистрофии сетчатки является выраженное изменение цветового зрения уже при первых признаках снижения остроты зрения с последующим развитием генерализованной дисхроматопсии.

2. Для клинической дифференциальной верификации БШ среди наследственных дистрофий сетчатки рекомендовано использование представленного в работе алгоритма диагностики БШ с определением комплекса патогномичных особенностей.

3. Пациентов с клиническим диагнозом БШ необходимо направлять на проведение молекулярно-генетического анализа образцов ДНК методом высокопроизводительного параллельного секвенирования всех кодирующих участков генов *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1*, *CNGB3*.

4. При отсутствии мутаций *ABCA4*, *ELOVL4*, *PROM1*, *CNGB3* необходимо исследование других генов, ассоциированных с наследственными дистрофиями сетчатки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бондаренко М.Т., Жоржоладзе Н.В., Шеремет Н.Л., Ронзина И.А., Галоян Н.С., Логинова А.Н., Чухрова А.Л., А.В. Поляков. Болезнь Штаргардта и абнотрофия Франческетти (желто-пятнистое глазное дно): патогенетические, клинические и молекулярно-генетические особенности // **Вестник офтальмологии.- 2014. - № 2. -с.72-76.**
2. Шеремет Н.Л., Ронзина И.А., Стрельников В.В., Жоржоладзе Н.В. Взаимосвязь структурных и функциональных изменений сетчатки при болезни Штаргардта // **Вестник офтальмологии.- 2016. - № 3. – с. 42 – 48.**
3. Карандашева К.О., Жоржоладзе Н.В., Шеремет Н.Л., Кузнецова Е.Б., Танас А.С., Аношкин К.И., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Мутации криптических сайтов сплайсинга в некодирующих областях гена *ABCA4* при болезни Штаргардта // **Медицинская генетика. - 2016.-Том 15. -№6 (168). – с.31-36.**
4. Стрельников В.В., Танас А.С., Иванова М.Е., Кузнецова Е.Б., Зольникова И.В., Деменкова О.Н., Алексеева Е.А., Жоржоладзе Н.В., Залетаев Д.В. Опыт использования секвенирования нового поколения в диагностике глазных болезней // Сборник трудов VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014», Т.2, с.298-299.
5. Жоржоладзе Н.В., Сизова М.В., Сдобникова Л.Е., Шеремет Н.Л.

- Особенности морфофункциональных изменений сетчатки при дистрофии Штаргардта // Научно-практическая конференция. «Федоровские чтения - 2014». – Москва. – 2014. – с.137.
6. Шеремет Н.Л., Ронзина И.А., Жоржолодзе Н.В., Сизова М.В., Сдобникова Л.Е. Взаимосвязь структурных и функциональных изменений сетчатки при болезни Штаргардта // "VII Российский общенациональный офтальмологический форум -2014" -Москва- 2014.- с.165.
 7. Жоржолодзе Н.В., Сдобникова Л.Е., Ронзина И.А., Шеремет Н.Л. Особенности структурных и функциональных изменений и их взаимосвязь при болезни Штаргардта // "XIV Всероссийская школа офтальмолога " . - Москва- 2015.- С.214
 8. Жоржолодзе Н.В., Шеремет Н.Л., Ронзина И.А., Стрельников В.В. Фенотипический полиморфизм абитрофии сетчатки в одной семье // Российский общенациональный офтальмологический форум, 8-й. Сб. науч. тр.: В 2 т./ Под ред. В.В.Нероева. – М.- 2015. Т.2. – с. 1024-1029.
 9. Жоржолодзе Н.В., Шеремет Н.Л., Поляков А.В., Чухрова А.Л., Логинова А.Н., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Совершенствование молекулярно-генетической диагностики болезни Штаргардта в России // Невские горизонты-2016: Материалы научной конференции офтальмологов. СПбГПМУ. – СПб.: Политехника-сервис, 2016. – с. 495-496.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФ - аутофлюоресценция

БШ - болезнь Штаргардта

гЭРГ - ганцфельд-ЭРГ

КП - компьютерная периметрия

мф-ЭРГ - мультифокальная электроретинография

ОКТ - оптическая когерентная томография

РПЭ - ретинальный пигментный эпителий

СНВС - слой нервных волокон сетчатки

ФАГ - флюоресцентная ангиография

IS/OS - inner segment/outer segment junction (сочленение наружных и внутренних слоев фоторецепторов)