

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«МЕЖОТРАСЛЕВОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС
«МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н. ФЕДОРОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ВОСКРЕСЕНСКАЯ

Анна Александровна

**РАЗРАБОТКА КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОГО АЛГОРИТМА
ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ТЕЧЕНИЯ
РАХ6-АССОЦИИРОВАННОЙ ВРОЖДЕННОЙ АНИРИДИИ**

14.01.07 – глазные болезни

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Поздеева Надежда Александровна

Научный консультант:

кандидат биологических наук

Марахонов Андрей Владимирович

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Молекулярно-генетические основы врожденной аниридии.....	15
1.2 Клинические проявления <i>РАХ6</i> -ассоциированной врожденной аниридии.....	18
1.2.1 Радужная оболочка.....	18
1.2.2 Аниридийная кератопатия.....	20
1.2.3 Аниридийная катаракта.....	26
1.2.4 Аниридийная глаукома.....	27
1.2.5 Сетчатка и диск зрительного нерва.....	29
1.2.6 Экстраокулярная патология.....	31
1.3 Гено-фенотипические корреляции.....	32
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
2.1 Материал исследования.....	38
2.2 Методы исследования.....	39
2.2.1 Методы офтальмологического обследования.....	39
2.2.2 Изучение морфометрических характеристик хрусталика и глубины передней камеры у пациентов с <i>РАХ6</i> -ассоциированной врожденной аниридией в сравнении с возрастной нормой.....	44
2.2.3 Анализ изменений роговицы на разных стадиях аниридийной кератопатии по данным лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и оптической когерентной томографии.....	46
2.2.4 Молекулярно-генетические методы исследования.....	49
2.2.5 Анализ гено-фенотипических зависимостей.....	50
2.2.6 Статистический анализ.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С <i>РАХ6</i> -АССОЦИИРОВАННОЙ ВРОЖДЕННОЙ АНИРИДИЕЙ.....	53
3.1 Глазные проявления <i>РАХ6</i> -ассоциированной врожденной аниридии.....	53

3.2 Клинико-возрастные особенности развития аниридийной кератопатии	56
3.3 Катаракта у пациентов с <i>РАХ6</i> -ассоциированной врожденной аниридией	60
3.4 Анализ морфометрических показателей хрусталика и передней камеры у пациентов с <i>РАХ6</i> -ассоциированной врожденной аниридией	65
3.5 Клинико-возрастные особенности глаукомы, ассоциированной с врожденной аниридией.....	69
3.6 Анализ особенностей глазного дна.....	71
3.7 Анализ данных визометрии и рефрактометрии	75
3.8 Анализ экстраокулярной патологии	77
3.9 Разработка балльной системы оценки тяжести глазных проявлений <i>РАХ6</i> -ассоциированной врожденной аниридии	79
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ РОГОВИЦЫ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ АНИРИДИЙНОЙ КЕРАТОПАТИИ	82
4.1 Клинико-морфологические проявления аниридийной кератопатии по данным лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и оптической когерентной томографии.....	82
4.2 Анализ прогрессирования аниридийной кератопатии после хирургических вмешательств.....	93
ГЛАВА 5. ГЕНО-ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ТИПОМ МУТАЦИЙ И КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМ <i>РАХ6</i>-АССОЦИИРОВАННОЙ ВРОЖДЕННОЙ АНИРИДИИ	96
5.1 Внутригенные мутации <i>РАХ6</i>	97
5.2 Крупные делеции.....	99
5.3 Разработка метода выявления гено-фенотипических зависимостей на основе вероятностной модели.....	100
5.4 Оценка гено-фенотипических взаимосвязей	103
5.4.1 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с миссенс-мутациями	104
5.4.2 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с инактивирующими мутациями	105
5.4.3 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с мутациями, изменяющими сплайсинг	108

5.4.4 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с крупными делециями <i>PAX6</i>	110
5.4.5 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с делециями 3'- <i>цис</i> -регуляторного региона <i>PAX6</i>	111
5.4.6 Сравнительный анализ фенотипических проявлений <i>PAX6</i> -ВА.....	113
5.5 Влияние результатов молекулярно-генетического анализа на фенотипические проявления аниридийной кератопатии	116
5.6 Разработка клинико-диагностического алгоритма исследований для прогнозирования течения <i>PAX6</i> -ассоциированной врожденной аниридии....	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
ВЫВОДЫ.....	150
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	152
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, АББРЕВИАТУР И АКРОНИМОВ.....	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	156
ПРИЛОЖЕНИЕ	179

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В развитых странах половина зарегистрированных случаев слепоты и слабовидения у детей вызывается генетическими заболеваниями (Gilbert С., 2001; Solebo А., 2017). Дефекты генов часто приводят к аномалиям развития со специфическими фенотипами, отражающими важные функции генов в эмбриогенезе. Такие пороки развития возникают вследствие инактивации или нарушения регуляции эволюционных генов на постимплантационном этапе внутриутробного развития. Аномалии пренатального происхождения обозначаются термином «врожденные», указывая на завершённый процесс патогенеза к моменту рождения ребенка. Встречаемость врожденных пороков развития (ВПР) органа зрения значительно варьирует в разных регионах земного шара. В Испании количество ВПР органа зрения составляет 3,68 случаев на 10 000 новорождённых (Vermejo E., 1998), в России этот показатель равен 2,7 (Хлебникова О.В., 2014). Несмотря на разнообразную структуру причинных факторов, моногенная этиология ВПР глаза описана не менее чем в 25% случаев (Хлебникова О.В., 2014).

Врожденная аниридия (ВА) (ОМIM, 106210) является прогрессирующим панокулярным ВПР, приводящим в большинстве случаев к стойкому снижению зрительных функций и слепоте. Она зарегистрирована как орфанное заболевание ORPHA77, в том числе и в Российской Федерации, с 2014 года. По данным Национальной организации редких заболеваний (NORD, <https://rarediseases.org>), ее встречаемость в мире колеблется от 1:64 000 до 1:96 000 случаев (Wawrocka A., 2013).

ВА является моногенным пороком развития, который в 80–95% случаев ассоциирован с возникновением гетерозиготных мутаций в гене *PAX6* (ОМIM *607108), появлением хромосомных перестроек с вовлечением локуса гена (11p13) (van Heyningen V., 2002; Crolla J.A., 2002; Robinson D., 2008) или с

захватом теломерно расположенных удаленных *цис*-регуляторных элементов (Fantes J., 1995; Landsend E.S., 2018).

Ген *PAX6* является одним из ключевых регуляторов эмбриогенеза, активная экспрессия которого необходима в период формирования и дифференцировки тканей глаза, некоторых участков головного мозга, обонятельной луковицы, невральнoй трубки, пищеварительного тракта и поджелудочной железы (Stoykova A., 1994; Quinn J.C., 1996; Callaerts P., 1997; Grindley J.C., 1997; Dohrmann C., 2000; Ashery-Padan R., 2001; Simpson T., 2002). Мальформации при ВА затрагивают как передний, так и задний отрезки глаза, включая роговицу, хрусталик, радужную оболочку, структуры угла передней камеры глаза (УПК), сетчатку и диск зрительного нерва (ДЗН), а также сопровождаются системными проявлениями с неврологическими расстройствами и нарушением обмена веществ.

Клинически ВА может манифестировать как заболевание, изолированно поражающее глаза без вовлечения других органов и систем. Однако в 2,5–13% случаев ВА сочетается с опухолью Вильмса и является частью WAGR синдрома (**W**ilms' tumor, **A**niridia, **G**enitourinary anomalies, mental **R**etardation) (OMIM 194072). WAGR синдром возникает вследствие обширных делеций региона хромосомы 11p13, включающего ген *PAX6* и ген предрасположенности к развитию нефробластомы *WT1* (OMIM *607102) (Yamamoto T., 2014). Еще в 2–5% случаев аниридия может встречаться в составе редких хромосомных аномалий (Kokotas H., 2010) и дисгенезов переднего отрезка глаза, вызванных мутациями в генах *FOXC1*, *FOXC2*, *PITX2*, *PITX3*, *CYP11B1*, *COL4A1*, *BMP4* и *B3GALTL* (Reis L., 2011).

Прогрессирующий характер течения ВА, приводящий в большинстве случаев к стойкому снижению зрительных функций и слепоте, определяет социальную значимость и актуальность изучения данного ВПР. Отсутствие сведений о клинических проявлениях ВА в популяции российских пациентов делает необходимым изучение данной патологии с целью расширения клинической базы данных, систематизации результатов и проведения кросс-когортных исследований с другими географически удаленными, генетически гетерогенными популяциями пациентов. Кроме того, с учетом

проградиентного характера течения *РАХ6*-ВА необходимо выделение прогностически важных признаков, влияющих на тяжесть глазного фенотипа с возрастом и при различных типах мутационных изменений. В существующих на сегодняшний день работах по анализу гено-фенотипических корреляций делаются противоречивые выводы о наличии зависимости между типом мутационных изменений и их клиническими последствиями (Tzoulaki I., 2005; Hingorani M., 2009; Dubey S.K., 2015; Yokoi T., 2016; Lima Cunha D., 2019). Неоднородность глазных проявлений *РАХ6*-ВА (Hingorani M., 2009), различная скорость прогрессирования ее осложнений затрудняют понимание патогенетических механизмов течения данного заболевания и замедляют разработку общих рекомендаций по ведению данной категории пациентов.

Таким образом, анализ клинических особенностей *РАХ6*-ВА, выявление сроков манифестации ее осложнений, оценка морфологических изменений роговицы, поиск гено-фенотипических взаимосвязей и определение предсказательного значения генотипа, несомненно, важны для оценки риска прогрессирования заболевания и разработки алгоритма дальнейшей реабилитации пациентов с данной офтальмопатологией.

Цель исследования

На основе разработанного комплекса клинико-функциональных, морфологических и генетических исследований создать клинико-диагностический алгоритм прогнозирования течения *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии.

Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие **задачи** исследования:

1. На основании ретроспективных данных проанализировать глазные проявления *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии у пациентов разных возрастных групп.

2. На основании данных лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и оптической когерентной томографии оценить клинкоморфологические изменения роговицы на разных стадиях аниридийной кератопатии.

3. Проанализировать спектр мутаций гена *PAX6* и региона 11p13 и разработать метод выявления и оценки гено-фенотипических зависимостей на основе вероятностной модели с совместным использованием критерия Фишера и отношения правдоподобия.

4. Изучить гено-фенотипическую взаимосвязь между типом мутаций в гене *PAX6* и регионе 11p13 с клиническими проявлениями врожденной аниридии.

5. Разработать клинко-диагностический алгоритм прогнозирования течения *PAX6*-ассоциированной врожденной аниридии.

Научная новизна

1. Впервые описана фенотипическая картина офтальмологических проявлений *PAX6*-ассоциированной врожденной аниридии в популяции российских пациентов, характеризующаяся достоверным увеличением частоты встречаемости катаракты, подвывиха хрусталика, тяжелых стадий аниридийной кератопатии, слепоты и птоза у взрослых субъектов и отсутствием разницы в количестве случаев нистагма, глаукомы, аномалий рефракций и косоглазия между пациентами младшей и старшей возрастных групп.

2. Впервые представлен альтернативный способ оценки сохранности прогениторных структур лимба на основе оптической когерентной томографии в режиме En Face, отличающийся от лазерной сканирующей конфокальной микроскопии неинвазивностью, панорамностью получаемых снимков, быстротой и возможностью применения в педиатрической практике.

3. Впервые разработана прогрессивная шкала комплексной оценки тяжести глазного фенотипа, позволяющая систематизировать структурные и

функциональные нарушения органа зрения у пациентов с *PAX6*-ассоциированной врожденной аниридией.

4. Впервые разработана вероятностная математическая модель анализа гено-фенотипических зависимостей, позволяющая выявить взаимосвязи между типом мутаций и клиническими проявлениями *PAX6*-ассоциированной врожденной аниридии.

5. Впервые разработан алгоритм прогнозирования течения *PAX6*-ассоциированной врожденной аниридии в зависимости от типа мутационных дефектов, затрагивающих кодирующие и удаленные 3'-*цис*-регуляторные области гена *PAX6*.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный клинико-диагностический алгоритм обследования пациентов с *PAX6*-ассоциированной врожденной аниридией, включающий анализ клинико-функциональных нарушений органа зрения с определением глазных проявлений, изменчивых во времени и по степени тяжести, оценку морфологических изменений роговицы с выделением двух клинико-морфологических вариантов благоприятного и неблагоприятного течения аниридийной кератопатии на основе выявления сохранных прогениторных структур лимба и признаков лимбальной недостаточности и верификацию генетических дефектов, локализующихся в кодирующих и удаленных 3'-*цис*-регуляторных областях гена *PAX6*, позволяет прогнозировать дальнейшее течение данной офтальмопатологии.

2. Выявленные сходства между клиническими проявлениями инактивирующих мутаций и делеций региона 11p13 с захватом гена *PAX6*, заключающиеся в сопоставимой остроте зрения ($p=0,95$), одинаковой частоте полной аниридии ($p=0,54$), нистагма ($p=1,0$), аниридийной кератопатии ($p=1,0$), катаракты ($p=1,0$), подвывиха хрусталика ($p=1,0$), глаукомы ($p=0,74$), гипоплазии фовеа 4-й степени ($p=1,0$), герминативных структур лимба ($p=0,52$), и их отличия от глазного статуса пациентов с делециями удаленных 3'-*цис*-регуляторных областей гена *PAX6*, соответствующего легкой степени

тяжести офтальмологических проявлений в виде высокой остроты зрения ($p=0,000$), отсутствия нистагма ($p=0,000$), аниридийной кератопатии ($p=0,000$), наличия лимбальных палисад Фогта ($p=0,000$) и структурной сохранности макулярной области ($p=0,000$), существенно влияют на выбор лечебной тактики ведения пациентов с *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридией.

Практическая значимость

1. Выявленные особенности клинической картины *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии формируют полный офтальмологический портрет пациента с аниридийным синдромом в разных возрастных группах, что способствует целостному пониманию паночулярного характера глазных нарушений и обуславливает необходимость прицельной диагностики возможных осложнений.

2. Морфологические изменения, обнаруживаемые при помощи лазерной сканирующей конфокальной микроскопии, позволяют прогнозировать благоприятное и неблагоприятное течение аниридийной кератопатии на основе выявления сохраненных прогениторных структур лимба и выраженности признаков лимбальной недостаточности, что может служить основой для дальнейшего поиска корреляций между существующими нарушениями и результатами молекулярной диагностики *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии.

3. Установленная высокая информативность оптической когерентной томографии роговицы в оценке сохранности прогениторных лимбальных структур у пациентов с аниридийной кератопатией и неинвазивный характер процедуры определяют целесообразность ее использования для обследования пациентов с патологией роговицы на фоне лимбальной недостаточности.

4. Разработанная балльная система оценки глазных проявлений *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии, включающая совокупность индивидуальных особенностей офтальмологического статуса, позволяет определить степень тяжести глазного фенотипа.

5. Картина классического фенотипа *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии у носителей мутаций, ведущих к потере функции белка, характеризуется неоднородной тяжестью глазных проявлений, проградентным характером течения аниридийной кератопатии и риском ее прогрессирования в послеоперационном периоде, что определяет необходимость взвешенного подхода к выбору тактики хирургического лечения данной категории пациентов.

6. Уникальность клинической картины пациентов с делециями *3'-cis*-регуляторного региона *РАХ6*, отличающейся от классического аниридийного фенотипа, позволяет выделить отдельный гено-фенотипический вариант, обладающий благоприятным зрительным прогнозом и хорошей переносимостью хирургических вмешательств.

7. Разработанный клинико-диагностический алгоритм прогнозирования течения *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии обеспечивает системный подход к эффективному решению лечебных задач с определением индивидуальной тактики ведения пациентов с данным врожденным пороком развития.

Степень достоверности и апробация результатов

В основу диссертационного исследования вошли результаты комплексного обследования 110 пациентов (79 семей) с ВА. Дизайн работы включал в себя обработку данных клинико-функционального, морфологического и молекулярно-генетического обследования с использованием современных диагностических методов. Достоверность полученных результатов подтверждается анализом большого клинического материала, длительным сроком наблюдения за пациентами, архивацией данных в первичной медицинской документации, фото- и видеоматериалах, а также статистической обработкой полученных сведений.

Основные материалы работы доложены и обсуждены на заседаниях научных обществ, а также региональных, всероссийских и международных конференциях и конгрессах: на 2-й Европейской конференции по аниридии

(Венеция, 2014); Всероссийской конференции с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии с вопросами врожденной аниридии» (Чебоксары, 2015); X Всероссийской научной конференции молодых ученых «Актуальные вопросы офтальмологии» (Москва, 2015); X съезде офтальмологов России (Москва, 2015), Съезде медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015), научной конференции офтальмологов «Невские горизонты–2016» (Санкт-Петербург, 2016); научно-клинической конференции МНТК «Микрохирургия глаза» (Москва, 2016), XIII–XV Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Федоровские чтения» (Москва, 2016; 2017; 2018); Всероссийской научно-практической конференции с интернет-трансляцией «Фундаментальные исследования в офтальмологии» под эгидой «Общества офтальмологов России» (Новосибирск, 2016; 2017); XVII, XVIII научно-практических конференциях с международным участием «Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии» (Москва, 2016; 2017; 2019); Конгрессе Всеиндийского общества офтальмологов (Калькутта, 2016); XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные технологии лечения витреоретинальной патологии» (Сочи, 2017); Всероссийской научно-практической конференции «Новые технологии в офтальмологии – 2018» (Казань, 2018); Международном конгрессе Американского общества катарактальных и рефракционных хирургов (ASCRS) и Американского общества администраторов в сфере офтальмологии (ASOA) (Вашингтон, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 20 работ, из них 14 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также две публикации в зарубежных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus; издано одно практическое руководство, получен один патент на изобретение № 2654756 от 24.05.2018 и одно свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2019612211 от 13.02.2019.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 179 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 38 рисунками и 28 таблицами. Список литературы содержит 267 источников, из них 6 публикаций отечественных и 261 – иностранных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ВА (OMIM #106210) относится к группе ВПР органа зрения преимущественно моногенной этиологии, с аутосомно-доминантным типом наследования, полной пенетрантностью и варьирующей экспрессивностью [53; 99]. Клинические проявления ВА в 90% случаев обусловлены мутациями в гене *PAX6* (11p13; OMIM *607108), играющем ключевую роль в процессе глазного морфогенеза и определяющем паночулярный характер возникающих повреждений [99; 241]. Глазные проявления ВА складываются из комплексного поражения роговицы, хрусталика, радужной оболочки, декомпенсации внутриглазного давления (ВГД), гипоплазии фовеа и ДЗН [137; 163].

Первое описание ВА встречается в публикации 1819 года А. Morison «Observation on a child whose eyes had no iris» [159], задолго до появления современных диагностических методов генетического анализа. С 1844 года термин «аниридия» (с греч. а- (an-) – «отсутствие», -iridos – «радужная оболочка») входит в офтальмологическую практику. С конца XVIII – начала XIX века выдающиеся офтальмологи, такие как F. Ammon, W. Manz, E. Fuchs, A. Vogt, I. Mann, G. Badtke, дают более или менее детализированные описания данной патологии, пока в 1909 году не появляется публикация R. Seefelder «Aniridia as a developmental suppression of the retina», описывающая ВА как заболевание, включающее не только изменения радужной оболочки, но и недоразвитие цилиарного тела, макулы, помутнение хрусталика и роговицы [208]. R. Seefelder впервые говорит о том, что отсутствие радужной оболочки, являясь очевидным признаком ВА, не отражает сути заболевания. Он впервые вводит понятие аниридийного синдрома, а также связывает низкие зрительные функции пациентов с морфологической незрелостью фовеальной области.

Социальная значимость ВА отмечается в публикации «Британского медицинского журнала» начала XX века [63]. Статья призывает медицинское сообщество обратить внимание не только на прогрессирующее снижение зрения, наблюдаемое у пациентов с ВА, но и на экономическую

составляющую, связанную с проблемами трудоустройства этих пациентов. В Германии в период национал-социализма на законодательном уровне обсуждалась необходимость стерилизации аниридных пациентов с низкой остротой зрения, нистагмом и глаукомой как источников «наследственной слепоты». До настоящего времени факты дефертилизации в период с 1933 по 1945 год точно не установлены.

Встречаемость ВА в мире колеблется от 1:40 000 в Дании [90], 1:76 000 в Норвегии и Швеции [71] до 1:100 000 новорожденных в Испании [26] вне зависимости от расы и пола [92; 163]. Фактическая распространённость ВА, вероятно, выше, так как часть случаев заболевания остается незарегистрированной. Соотношение спорадической и семейной ВА варьирует, по данным разных авторов, от 1:3 [99; 164] до 2:3 [92; 163; 174].

1.1 Молекулярно-генетические основы врожденной аниридии

РАХ6-ассоциированная ВА (*РАХ6*-ВА) – первая описанная человеческая мальформация, вызванная изменениями в гомеобоксном гене *РАХ6* [237]. Она представляет собой редкий панокулярный порок развития, характеризующийся комплексом глазных проявлений и ассоциированный с мутациями в гене *РАХ6*, хромосомными перестройками, захватывающими locus 11p13 или удаленную 3'-*цис*-регуляторную область, контролирующую экспрессию гена *РАХ6*.

Человеческий ген *РАХ6* впервые был клонирован в 1991 году [235]. В последующем было обнаружено, что ген занимает 30 тыс. п.н. (28 kb) на коротком плече 11 хромосомы (11p13) и состоит из 14 экзонов (от 0 до 13) [82]. Ген *РАХ6* кодирует транскрипционный фактор *РАХ6*, состоящий из 422 аминокислотных остатков и содержащий два высококонсервативных ДНК-связывающих домена: парный бокс (PD, paired domain) и гомеобокс (HD, homeobox domain), которые состоят из 128 и 61 аминокислотных остатков соответственно. Домены связаны 72-аминокислотным линкерным сегментом, богатым глицином. Кроме того, на С-конце располагается трансактиваторный

PST домен (proline – serine – threonine rich region), богатый пролином, серином, треонином и содержащий 152 аминокислотных остатка [57; 229; 240].

Домен парного бокса кодируется экзонами с 4 по 7 и содержит два отдельных мотива, соответствующих N- и C-концевым субдоменам – PAI и RED. Оба субдомена парного бокса и гомеобоксный домен способны дифференциально активировать различные гены-мишени путем взаимодействия с сайтами связывания в дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК). Функциональная активность PAX6 определяется не только взаимодействием между доменами белка, но и уровнем экспрессированных транскрипционных вариантов PAX6 [42; 165]. Многообразие изоформ белка зависит от расположения точки старта транскрипции (промоутеры P0, P1, P α и P4 [111; 118; 262]) и посттранскрипционного альтернативного сплайсинга.

Сложный паттерн экспрессии *PAX6* контролируется различными регуляторными элементами, которые располагаются в интронах гена, а также проксимально и дистально от транскрипционной единицы [111; 118; 184; 185; 257; 262]. Так, наряду с повреждением кодирующей части гена *PAX6* и его энхансеров, рядом авторов была отмечена причинная роль хромосомных перестроек удаленной 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* в формировании аниридийного фенотипа [53; 74; 133]. В отдаленном эволюционно консервативном регуляторном регионе (DRR, downstream regulatory region), расположенном в области одного из интронов гена *ELP4*, были обнаружены гиперчувствительные к ДНКазе I сайты и тканеспецифические элементы в виде хрусталикового (SIMO) и ретинального энхансеров [120], а также EI и RB фрагменты, содержащие регуляторы экспрессии *PAX6* в мозжечке и шишковидной железе соответственно [119]. Делеция данных регуляторных элементов (DRR) приводила к нарушению тканеспецифической экспрессии *PAX6*, несмотря на существование дублирующих проксимальных энхансеров с перекрывающимся активирующим действием, и подтверждала существование сложной системы взаимодействия между элементами управления, обеспечивающими устойчивую работу гена [119].

Аномальная экспрессия гена приводит к комплексу глазных и нейроанатомических мальформаций, которые тесно связаны с уровнем

экспрессируемого белка PAX6 [7; 75; 205; 81]. Гомозиготный фенотип проявляется полным нарушением глазного морфогенеза (аноптальмия, микрофтальмия), отсутствием назальных структур, грубыми аномалиями головного мозга (агенезия мозолистого тела, микроцефалия, полимикрогирия) и ранней неонатальной смертностью [82; 206; 207; 221]. В случае гаплонедостаточности *PAX6* (гетерозиготный фенотип), белка, продуцируемого одной копией гена, не хватает для поддержания нормальной функции PAX6, что проявляется картиной аниридии у человека [82; 110; 136; 235] и фенотипом малых глаз Smalleye (Sey) у мышей [98]. Оверэкспрессия *Pax6*, так же как и гаплонедостаточность, в свою очередь, может приводить к микрофтальмии, нарушению развития роговицы и хрусталика у мышей [114; 115; 119; 205].

Белок PAX6 человека жизненно важен для эмбрионального развития глаз, центральной нервной системы (ЦНС), обонятельной области и поджелудочной железы [225]. Он широко экспрессируется в ранней нервной пластинке во время нейруляции и способствует дифференцировке эмбриональных стволовых клеток в нейроэктодерму [265]. PAX6 требуется для спецификации судьбы нейрональных клеток и их соответствующей миграции во время кортикогенеза [249]. Однако, несмотря на раннюю экспрессию *Pax6* и определенную способность к запуску индукции глаза [94], его гаплонедостаточность не является критичной в процессах раннего морфогенеза глазного пузыря и ретинальной спецификации [90; 151]. Роль *Pax6* более значима в поздних процессах паттернинга глазного пузыря, формирования глазного бокала и последующей дифференциации глазных тканей [22; 23; 184; 195].

Точная настройка функций *Pax6* достигается на нескольких уровнях, которые создают динамичную и сложную регуляторную сеть. *Pax6* координирует транскрипционные факторы *Mitf* [36] и *bHLH* [169], передачу сигналов инсулина, взаимодействует с модификаторами хроматина *Brg1* и *p300* [54; 55], различными факторами роста и сигнальными путями, такими как *Wnt*, *TGF- β* и *MAPK* [209; 260].

1.2 Клинические проявления *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии

Достижения в области офтальмологической диагностики позволяют расширять спектр наблюдаемых при *РАХ6*-ВА изменений. Встречаемость клинических проявлений ВА в зависимости от возраста представлена в Таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Частота клинических проявлений ВА по литературным данным

Глазные проявления	Частота проявлений ВА в зависимости от возраста пациентов, %			Источники
	Все возраста	≤18–20 лет	>18–20 лет	
Нистагм	80–100	68–89	71	[39; 68; 100; 139; 153; 223]
Катаракта	50–90	44–55	57	[12; 39; 68; 69; 72; 153; 163; 164; 174; 223; 237; 264]
Подвывих хрусталика	16,7–56	4–15,3	18–35	[2; 68; 69; 86; 125; 204; 217; 223]
Глаукома	6–76,2	20–71,4	45,7–86	[12; 33; 39; 68; 153; 162; 204; 217; 223; 264]
Кератопатия	46–90	18–64	71–90	[39; 68; 73; 145; 164; 167; 176; 223; 264]
Гипоплазия фовеа	41–96	91	14	[39; 68; 139; 164; 174; 217; 223; 264]
Гипоплазия ДЗН	2,7–75	27	14	[12; 86; 134; 154; 217; 264]
Птоз	2,2–6,2	-	-	[181; 217]
Микрокорнеа	*2,7	-	-	[28; 59; 85; 217; 222]
Микрофтальм	*	-	-	[59; 217; 222]
Отслойка сетчатки	1,1–2,2	-	-	[66; 217]

* Единичные случаи.

1.2.1 Радужная оболочка

Отсутствие радужки или ее гипоплазия являются первыми клиническими признаками, привлекающими внимание родителей, педиатров,

офтальмологов и заставляющими задуматься о возможном диагнозе ВА. В то же время аниридия может рассматриваться как клинический признак, входящий в состав других аномалий развития переднего отрезка глаза (ASDA – anterior segment developmental anomalies) и ассоциированный с мутациями в генах *EYAI* (OMIM *601653), *MAF* (OMIM *177075), *PITX2* (OMIM *601094), *PITX3* (OMIM *602669), *FOXC1* (OMIM *601090), *FOXE3* (OMIM *601094), *CYP11B1* (OMIM *601771), *PXDN* (OMIM *605158), *JAG1* (OMIM *601920), *LAMB2* (OMIM *15032), *VMP4* (OMIM *112262) и пр. [194; 121].

Отсутствие радужной оболочки становится причиной снижения остроты зрения за счет увеличения сферических aberrаций по мере прохождения света через периферическую часть роговицы. Кроме того, снижение контрастной чувствительности, уменьшение глубины фокуса, наличие засветов и фотофобии дополнительно снижают качество получаемого изображения.

Степень презентации радужной ткани на фоне мутаций в гене *PAX6* может варьировать от небольшой рудиментарной ткани в углу передней камеры глаза до легких изменений поверхностной архитектуры мезенхимального листка радужки в форме эллиптических дефектов [100; 136; 177; 210]. Использование термина «полная аниридия» для характеристики количественного присутствия радужки является довольно условным в связи с тем, что остатки радужной ткани всегда присутствуют по всей окружности и хорошо визуализируются при гониоскопии или ультразвуковой биомикроскопии (УБМ). В литературе встречаются описания атипичных *PAX6*-ассоциированных дефектов радужной оболочки в виде «колобомы радужки» [93], корэктопии, выворота зрачковой каймы [256] или условно «интактной» радужки с сохраняющимися элементами зрачковой мембраны [41]. В то же время незначительные изменения радужной оболочки, определяемые биомикроскопически, по данным флуоресцентной ангиографии демонстрируют незавершенный ангиогенез ее сосудов и коллатералей [10].

Чаще всего атипичные радужные дефекты ассоциированы с миссенс-мутациями *PAX6*. Выявление подобных «мягких» фенотипов является важным звеном в постановке диагноза *PAX6*-ВА и в ее дифференциальной диагностике с другими ASDA (аномалия Аксенфельда – Ригера, аномалия Петерса,

иридогониодисгенез, врожденный выворот радужки) и синдромальными состояниями (синдром Алажиля, иридокорнеальный эндотелиальный синдром, синдром Гиллеспи, синдром мультисистемной дисфункции гладкомышечной мускулатуры и пр.) [155; 192; 199; 200; 245].

Таким образом, в связи с большим многообразием фенотипических проявлений ASDA, в которых полное или частичное отсутствие радужной оболочки выступает в качестве симптома, генетическое подтверждение клинического диагноза является необходимым условием правильной диагностики заболевания, определения дальнейшей тактики ведения пациента и зрительного прогноза в целом.

1.2.2 Аниридийная кератопатия

Впервые аниридийная кератопатия (АК) была описана в 1979 году G. Maskman с соавторами [148]. Она является одним из наиболее частых осложнений ВА, приводящих к значительному снижению зрительных функций и дискомфорту [153]. Важной чертой АК является ее двухсторонний характер и постоянно прогрессирующее течение. В большинстве исследований частота обнаружения видимых изменений роговицы колеблется от 46 до 90% [167; 212], из них в 20–27% случаев помутнения роговицы приводят к снижению зрения [137; 163; 174; 176]. Разброс частоты встречаемости АК связан с тем, что при рождении и в первую декаду жизни человека изменения роговицы могут не определяться невооруженным глазом, однако их ранний дебют подтверждается данными постмортального гистологического исследования младенческих глаз. В единичных случаях АК может приводить к значимому снижению зрения у детей младше 5 лет [73]. Очень редко на фоне *РАХ6*-гаплонедостаточности возникают кератолентикулярные сращения, формирующие врожденные помутнения роговицы [166]. Медленное прогрессирование АК сопровождается центростремительным нарастанием конъюнктивального паннуса, неоваскуляризацией, появлением фиброзных участков, захватывающих эпителий роговицы и ее переднюю строму. Клинически АК проявляется

симптомами синдрома «сухого глаза» (ССГ), рецидивирующими эрозиями, светобоязнью и эпифорой [145].

Причину возникновения АК связывают с первичной недостаточностью лимбальных стволовых клеток (НЛСК) [67] и альтерацией лимбального микроокружения вследствие мутации в гене *PAX6* [190]. В норме экспрессия *PAX6* сохраняется в эпителиальных клетках роговицы во взрослом состоянии [51; 122], она поддерживает целостность эпителиальной поверхности и участвует в заживлении ее дефектов [122; 218]. Несмотря на сохранение экспрессии *PAX6* в роговичном эпителии на уровне 60–70% нормального, появление признаков АК является результатом гетерозиготной транскрипции гена *PAX6*^{+/-} [140].

Наличие лимбальных стволовых клеток (ЛСК) является необходимым условием для сохранения прозрачности роговицы и ее регенераторных свойств. В экспериментальных работах доказана локализация ЛСК в лимбальных криптах и фокальных стромальных проекциях роговицы (ФСП) [43; 214]. Присутствие данных структур является клиническим маркером, указывающим на наличие ЛСК [116], а их отсутствие вследствие химического или термического ожога, генетического дефекта (ВА) – предиктором развития картины НЛСК [214].

По данным К. Ramaesh с соавторами, в 78% случаев в основе патогенеза АК лежит разрушение лимбального микроокружения, приводящее к формированию аномального репаративного ответа, нарушению миграции роговичных клеток, эпителиальной дифференцировке и пролиферации [173; 190]. В настоящее время доказана роль *Pax6* в метаболизме экстрацеллюлярного матрикса, нормальной экспрессии белков цитоскелета и молекул клеточной адгезии в роговице [190; 215]. *PAX6* регулирует экспрессию цитокератина 12 (К12), который формирует промежуточные белковые филаменты роговичного эпителия. Этот цитокератин играет важную роль в формировании межклеточных контактов и закрепляет клетки на поверхности базальной мембраны. Аномальная экспрессия *Pax6* во взрослом состоянии усиливает недостаточность К12, приводит к большей хрупкости поверхностного эпителия и продолжающейся потере эпителиальных слоев [48;

144]. В клетках эпителия отмечено нарушение морфологии ядра и митохондрий [50; 236]. Снижение экспрессии молекул адгезии (десмоглеина, β -катенина и γ -катенина) увеличивает межклеточные промежутки [60], а дефицит гликоконъюгатов на роговичной поверхности у $Raxb^{+/-}$ гетерозиготных мышей снижает репаративные возможности эпителиальных клеток и их миграцию к очагу повреждения [124]. В целом, все эти факты делают роговичную поверхность неустойчивой к внешним повреждениям, склонной к рецидивирующим эрозиям и изъязвлениям.

Эпителиальные клетки на фоне ВА более чувствительны к окислительному стрессу, который приводит к апоптозу и аномальному заживлению. Аккумуляция окисленных продуктов происходит параллельно с развитием стромальных помутнений. Оксидативный стресс держит клетки $Raxb^{+/-}$ в состоянии хронического повреждения, что может стать триггером для выключения ядерного $Raxb^{+/-}$ и трансдифференцировки эпителия роговицы по нероговичному фенотипу [178]. Кроме того, формирование помутнений и потеря прозрачности роговицы связаны с дефицитом матричных металлопротеиназ (в частности ММП-9), присутствие которых регулируется $Raxb$ [218]. Матричные металлопротеиназы ответственны за разрушение коллагена в процессе нормального ремоделирования экстрацеллюлярного матрикса и заживления ран. Их нехватка приводит к накоплению фибрина и инфильтрации роговичной ткани клетками воспаления. Таким образом, ведущая патогенетическая роль гена $RAX6$ в поддержании гомеостаза роговичного эпителия может открывать новые перспективы для развития генной терапии в качестве альтернативы существующим способам лечения АК.

ССГ является частым проявлением АК и коррелирует с тяжестью роговичного процесса [107]. В его основе в большей степени лежит изменение качественного состава слезной пленки, чем ее количества [107; 197]. Недавние исследования показали уменьшение времени разрыва слезной пленки [4; 70; 180], повышение ее осмолярности [4; 129], снижение чувствительности роговицы [129], уменьшение количества мейбомиевых желез и выделяемого ими секрета [129]. Был обнаружен различный уровень белков в слезной

жидкости аниридийных пациентов в сравнении со слезой здоровых добровольцев [104]. В частности отмечено уменьшение концентрации α -энолазы, пероксиредоксина б, цистатина S, гельсолина и аполипопротеина A-1 в сочетании с увеличением уровня VEGF-C и провоспалительных цитокинов [132]. По мнению авторов, нарушение баланса между про- и антиангиогенными факторами в слезе пациентов с ВА может стать причиной патологического гем- и лимфангиогенеза и манифестации АК [104]. В свою очередь, повышение уровня динуклеотидов Ar_4A и Ar_5A является компенсаторным механизмом, направленным на стимуляцию пролиферации и дифференцировки клеток на фоне НЛСК [180].

Изменения роговицы при АК захватывают не только ее эпителиальные слои. Отмечено аномальное развитие базальной мембраны эпителия, боуменовой мембраны, увеличение толщины стромы роговицы [70; 127; 174; 254]. В то же время морфологические изменения не затрагивают десцеметову мембрану и эндотелиоциты [24; 70; 174].

Установлено, что процесс АК развивается постадийно с постепенным продвижением от периферии роговицы к центру. Существует несколько классификаций АК, одна из которых разработана шведскими учеными в 2010 году в зависимости от площади поражения и структурных изменений роговицы [73], другая, предложенная Lopez-Garcia в 2006, делает акцент на клинических признаках НЛСК [145] (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Классификация АК (по Eden, 2010)

Степень	Роговичные проявления
0	Прозрачная роговица
I	Периферическое помутнение роговицы с вращением сосудов
II	Периферическая неоваскуляризация по всей окружности, не нарушающая центральное зрение
III	Вовлечение центральной части роговицы, осмотр глазного дна затруднен, субэпителиальный фиброз, стромальный хейз, центральный рост сосудов
IV	Мутная, непрозрачная роговица
V	Конечная стадия, иррегулярная структура роговицы, не определяется ни один из ее слоев

Диагностика проявлений АК должна осуществляться с самого раннего возраста, так как, несмотря на отсутствие клинической симптоматики, начальные признаки потери прозрачности роговицы могут наблюдаться уже с

рождения, предопределяя высокий риск прогрессирования АК в дальнейшем. Обследование пациентов с ВА включает как рутинные методы диагностики, так и исследования, направленные на оценку выраженности НЛСК.

Импрессионная цитология является высокоспецифичным тестом, используемым для диагностики выраженности НЛСК. Информативность данной методики значительно повышается при иммунофлюоресцентном окрашивании образцов с использованием антител к цитокератину K12 и K19 с целью фенотипирования эпителиальных клеток. В свою очередь, импрессионная цитология может приводить к появлению локальных эпителиальных дефектов, что на фоне низкой скорости эпителизации у пациентов с АК значительно ограничивает использование данного метода.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛСКМ) является важнейшим клиническим диагностическим методом, позволяющим прижизненно изучать клеточную морфологию глазной поверхности, в особенности всех слоев роговицы, конъюнктивы и лимба. Клинические исследования выявили у некоторых пациентов с ранней стадией АК (0–I стадии) наличие лимбальных структур с сохранной прогениторной функцией, которые обеспечивали регенерацию и самообновление роговицы [127]. В большинстве случаев прогрессирование НЛСК при АК коррелировало с деградацией лимбальных палисад Фогта (ЛПФ), возникновением клеток воспаления и потерей суббазальных нервных волокон [127].

В настоящее время нет доказанных эффективных способов медикаментозного лечения, которые могли бы замедлить или приостановить прогрессирование процесса [146]. Целью современной терапии АК является коррекция ее проявлений и нивелирование факторов риска, включающих избыточное попадание солнечного света, инвазивные методы обследования, хирургические вмешательства, затрагивающие лимбальную зону, и наличие консервантов в составе топикальных медикаментозных средств [163].

Использование более инвазивных методов хирургического лечения АК оправдано при появлении помутнений роговицы, затрагивающих оптическую зону, значительно снижающих остроту зрения и/или при часто повторяющихся эрозиях. Способы поддержания лимбального

микроокружения и сохранения прозрачности роговицы включают пересадку культивированного лимбального эпителиального аллогraftа (allo-CLET) [175; 213], трансплантацию аллогенной кератолимбальной ткани (KLAL) [101] или аутологичной слизистой оболочки ротовой полости (COMIT) [202]. Успех от трансплантации стволовых клеток очень вариабелен. Он сохраняется в течение трех лет у 53–75% пациентов [202; 213] и повышается при длительном применении системных иммуносупрессантов [101] в сравнении с использованием только местных цитостатиков [175]. Сквозная кератопластика (СКП) самостоятельно, без дополнительной трансплантации лимбальных стволовых клеток, за исключением единичных случаев [234], имеет плохой прогноз [83; 123; 147; 204; 234] и может приводить к усугублению АК [153].

Перспективной в настоящее время является экспериментальная разработка биосинтетических коллагеновых мембран и биосовместимых эластомерных нановолокон в качестве альтернативы амниотической мембране в лечении АК [78]. 3D-технологии воссоздают биоинженерные палисадоподобные крипты на основе коллагена в качестве носителей ЛСК с целью восстановления разрушенной лимбальной архитектуры [141]. Разработка новых, потенциально перспективных методов лечения на основе фундаментальных генетических исследований также дает надежду на остановку или обратное развитие АК для пациентов прежде всего с нонсенс-мутациями [89; 248]. В настоящее время начата II фаза рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого клинического исследования STAR с целью изучения эффективности и безопасности использования аталурена в коррекции *PAX6*-связанных дефектов развития глаза.

Таким образом, оптимальное медицинское сопровождение пациентов с АК требует понимания сложности ее патофизиологии, включающей знания молекулярных, клинических, морфологических и генетических аспектов. Актуальным остается вопрос снижения возможных рисков прогрессирования АК после различных инвазивных диагностических манипуляций и хирургических вмешательств. Необходимо детальное изучение морфологических изменений роговичной поверхности с учетом стадии АК,

данных генетического тестирования и возрастных особенностей течения кератопатии. В то же время оценка выраженности НЛСК по данным конфокальной микроскопии очень трудоемка и не всегда выполнима у пациентов с ВА. Учитывая большую хрупкость корнеального эпителия при АК, необходимость использования топиальных анестетиков, нистагм, невозможность проведения процедуры у детей младшего возраста, требуется поиск альтернативных способов диагностики прогениторных структур роговицы и оценка возможности их применения в клинической практике.

1.2.3 Аниридийная катаракта

Катаракта на фоне ВА встречается в 50–90% глаз [163; 164; 174; 237]. Врожденный характер помутнений хрусталика у детей и подростков до 20 лет описан в 44–82,5% случаев [11; 69; 174]. Большую долю из них составляют передние и задние полярные катаракты, располагающиеся вдоль оптической оси глаза [99; 163]. Анализ гомозиготных эмбрионов *Sey/Sey* показал, что пораженный ген *Rax6* играет фундаментальную роль в формировании презумптивной плакиды хрусталика. Формирование катаракты при ВА является результатом снижения активности *Rax6*, который продолжает экспрессироваться постнатально в переднем эпителии хрусталика и является необходимым условием направленной дифференцировки хрусталиковых волокон.

Аномалии развития хрусталика включают его эктопию в 18–56% случаев [35; 217], люк்சацию в стекловидное тело [28], деформацию края, колобому хрусталика [2; 217], *tunica vasculosa lentis* [99], персистирующую зрачковую мембрану, задний лентиконус [217] и микросферофакию [217]. Степень подвывиха может варьировать от перерастяжения цинновых связок с легкой децентрацией до выраженной сублюксации со смещением хрусталика кверху. На фоне анализа частоты катарактальных помутнений обзор случаев подвывиха хрусталика, его выраженности освещен лишь в единичных публикациях. Существует необходимость дополнительного анализа

клинического материала для выявления закономерностей прогрессирования сублюксации, оценки влияния временного фактора и интраокулярной хирургии на процесс эктопии хрусталика. В настоящее время неизученными остаются морфометрические характеристики и параметры передней камеры глаза в *РАХб*-компрометированных глазах. Эти сведения вызывают не только фундаментальный интерес в уточнении роли *РАХб* в процессах глазного эмбриогенеза, но также важны с практической точки зрения в вопросах коррекции рутинной хирургической техники.

1.2.4 Аниридийная глаукома

Тяжелым проявлением ВА, влияющим на зрительный прогноз заболевания, является глаукома, возникающая в 6–75% случаев [86; 163; 164; 204; 217] и дебютирующая чаще всего в детском и подростковом возрасте [69; 86; 163; 164; 217]. Большинство авторов отмечали развитие глаукомы у 50% пациентов [164; 174]. Случаи врожденной глаукомы в виде буфтальма и отека роговицы, как правило, редки [45; 69; 163; 172; 174]. По данным E. Gramer с соавторами, у 15% пациентов с ВА каждое десятилетие выявляются новые случаи глаукомы вплоть до 40-летнего возраста. В возрастном промежутке 40–49 лет количество новых случаев повышения ВГД резко возрастает до 35% [86].

Причины развития глаукомы связаны с иридогониодисгенезом на фоне аномальной миграции клеток нервного гребня. Различная степень выраженности иридогониодисгенеза определяет сроки манифестации глаукомы и ее тяжесть. Выявлена значительная корреляция между степенью недоразвития радужной ткани, объемом ее дефекта и развитием глаукомного процесса [69]. В работах D. Vaulmann с соавторами показана роль экспрессии *Raxb* в пре- и раннем постнатальном периодах в формировании структур дренажной системы глаза. У гетерозиготных мышей с дефицитом экспрессии гена *Raxb*^{LacZ/+} трабекулярная ткань остается незрелой, шлеммов канал полностью отсутствует [29]. Эти результаты согласуются со сходными данными гистопатологического исследования структур передней камеры глаза у двух пациентов с WAGR синдромом [150], а также с картиной, выявляемой

при гониоскопии. Последние исследования УБМ, однако, позволили обнаружить частичное сохранение шлеммова канала в 91% обследованных глаз [242].

Препятствие оттоку водянистой влаги через УПК реализуется различными механизмами: блокадой УПК ротированным корнем радужки, дисгенезом трабекулярной сети и шлеммова канала, наличием периферических передних синехий [87, 137, 150]. Данные УБМ показывают отсутствие значимых различий в строении УПК у аниридийных пациентов с/без глаукомы, что подтверждает преобладание открытоугольного механизма над закрытоугольным в патогенезе повышения ВГД [170]. Интраокулярная хирургия является дополнительным фактором риска развития глаукомы или ее прогрессирования. Так, установка кератопротеза [47] и кератопластика [174] у аниридийных пациентов всегда ассоциированы с высоким риском повышения ВГД на фоне длительного использования стероидных препаратов и влияния хронических профибротических стимулов на структуры УПК [163].

Диагноз глаукомы выставляется на основе комплексного обследования. Трудности в оценке данных тонометрии у пациентов с ВА связаны с наличием нистагма, неровностью глазной поверхности, увеличением толщины роговицы [32; 70; 127; 174; 254]. Сложности в оценке состояния зрительного нерва сопряжены с непрозрачностью оптических сред (АК, катарактой) и врожденными аномалиями ДЗН (дисплазией, гипоплазией, колобомой ДЗН). Необходимым условием для подтверждения диагноза и динамического наблюдения являются исследование полей зрения, зрительных вызванных потенциалов, определение толщины слоя нервных волокон и фоторегистрация глазного дна [112]. Существующие ограничения, а также наличие сомнений в достоверности клинических данных оправдывают использование кратковременной седации или анестезии у детей младшего возраста с целью уточнения диагноза.

Применение гипотензивных препаратов всегда является первой линией лечения в медицинском сопровождении аниридийной глаукомы. При хорошем ответе и переносимости гипотензивных средств их использование позволяет длительно контролировать уровень ВГД [77; 164]. В то же время, по данным

P. Netland, необходимость в хирургическом лечении глаукомы существует более чем у половины пациентов с ВА [164; 255].

Выбор вида хирургического вмешательства во многом определяется предпочтениями хирурга и индивидуальными характеристиками пациента (возрастом, перенесенными операциями, наличием рубцовых изменений конъюнктивы и пр.) [105]. Эффективность антиглаукомных операций (АГО) значительно варьирует, среднее количество оперативных вмешательств составляет от 1,7 до 2,8 [164; 255]. Не более 50% пациентов достигают нормотонуса даже после нескольких хирургических вмешательств [8].

В популяции российских пациентов сообщения о случаях развития вторичной глаукомы на фоне ВА встречаются в единичных публикациях. Во многих из них диагноз ВА не имеет генетического подтверждения, что может приводить к анализу фенотипически сходных, но генетически разнородных выборок пациентов. В связи с этим существует необходимость изучения глаукомного процесса в генетически верифицированных случаях *РАХ6*-ВА с целью понимания частоты его возникновения и характера течения.

1.2.5 Сетчатка и диск зрительного нерва

Гипоплазия фовеа является одной из основных причин, обуславливающих низкие зрительные функции у пациентов с ВА. Частота обнаружения данного признака, по данным литературы, колеблется от 41 до 86% [100; 138; 163; 164; 174; 204]. Диагностика основана на данных офтальмоскопии и оптической когерентной томографии (ОКТ) [88; 232]. Созданная на основе данных ОКТ классификация степени недоразвития центральной ямки сетчатки позволяет использовать ее в качестве индикатора зрительного прогноза [232], в том числе и у пациентов с нистагмоидными движениями глаз. Так, по сообщению М. Thomas с соавторами, наличие нистагма не ограничивает возможности ОКТ-визуализации и позволяет получать воспроизводимые результаты при повторных исследованиях [233]. Согласно классификации диагностическим критерием гипоплазии является внедрение плексиформных слоев в центральную зону сетчатки (Рисунок 1.1).

Степень гипоплазии фовеа	Структурные характеристики, определяемые по данным ОКТ	Наличие/отсутствие признака	
Норма	а – экстррузия плексиформных слоев б – фовеальная ямка в – удлинение наружных сегментов ФР г – расширение наружного ядерного слоя	а – есть б – есть в – есть г – есть	
1	а – экстррузия плексиформных слоев б – сглаживание фовеальной ямки в – удлинение наружных сегментов ФР г – расширение наружного ядерного слоя	а – нет б – есть в – есть г – есть	
2	а – экстррузия плексиформных слоев б – фовеальная ямка в – удлинение наружных сегментов ФР г – расширение наружного ядерного слоя	а – нет б – нет в – есть г – есть	
3	а – экстррузия плексиформных слоев б – фовеальная ямка в – удлинение наружных сегментов ФР г – расширение наружного ядерного слоя	а – нет б – нет в – нет г – есть	
4	а – экстррузия плексиформных слоев б – фовеальная ямка в – удлинение наружных сегментов ФР г – расширение наружного ядерного слоя	а – нет б – нет в – нет г – нет	
Атипичная	а – экстррузия плексиформных слоев б – сглаживание фовеальной ямки д – разрушение связи между внутренними и наружными сегментами ФР	а – нет б – есть д – есть	

Рисунок 1.1 – Классификация гипоплазии фовеа по М. Thomas (2011)

Признаки ретинальной дисфункции, по данным электроретинографии, встречаются у 74–100% пациентов с ВА; ее выраженность может варьировать от практически нормальных показателей до значительного нарушения функций [102; 238; 261; 264]. В то же время существует недооценка значения роли электрофизиологических показателей у пациентов с гипотрофией радужки и сохранной фовеальной ямкой.

В сравнении с гипоплазией фовеа гипоплазия ДЗН встречается намного реже и отмечена у 10,7–23% пациентов [100; 154]. Ее развитие у пациентов с ВА связывают с прямым результатом мутации в гене *PAX6* независимо от наличия гипоплазии фовеа [154]. В то же время D. Angmo с соавторами свидетельствует о присутствии той или иной степени недоразвития ДЗН у 75% аниридийных пациентов [12]. В редких случаях описано возникновение колобомы ДЗН [85; 135].

Кроме того, отмечены изменения периферических отделов сетчатки в виде множественных маленьких белых пятен, расположенных по окружности зубчатой линии и напоминающих липидные отложения [108]. Встречаются

случаи ассоциации *РАХ6-ВА* с ретинальными разрывами, отслойкой [66] и колобомой сетчатки [59]. Клиническое наблюдение трех детей с буфтальмом и сублюксацией хрусталика показало возможность формирования гигантских ретинальных разрывов на 120–360° [66]. Развитие отслойки сетчатки с выраженной пролиферативной витреоретинопатией в этих случаях не было последствием хирургических вмешательств. В качестве возможных регматогенных причин может рассматриваться существование дополнительной витреоретинальной адгезии в периферических отделах стекловидного тела [11], буфтальм [52] и увеличение передне-задней оси глаза [58].

Таким образом, патологические изменения заднего отрезка глаза, включая морфофункциональную незрелость макулярной зоны, являются важными клиническими проявлениями, подтверждающими паночулярный характер *РАХ6-ВА*. Данный вопрос практически не имеет отражения в отечественной литературе и требует дальнейшего изучения с целью расширения сведений о структурной сохранности макулярной зоны и ее возможной взаимосвязи с характером генетических изменений в *РАХ6*, частоте гипоплазии ДЗН, оценке изменений в центральных и периферических отделах сетчатки на фоне изучаемой офтальмопатологии в российской популяции пациентов с *РАХ6-ВА*.

1.2.6 Экстраокулярная патология

Птоз встречается у 2,2–6,2% пациентов с *РАХ6-ВА* и, по данным R. Peralta, в 100% случаев ассоциирован с АК [181]. В литературе описано несколько клинических случаев ассоциации врожденного птоза с *РАХ6-ВА* [49; 103; 149; 211; 246] и умственной отсталостью [103; 149]. По данным R. Peralta, устранение птоза в 53,8% глаз сопровождается послеоперационной кератопатией и усугублением исходного роговичного статуса вплоть до необходимости выполнения кератопротезирования через несколько месяцев после операции [181]. С этим связаны рекомендации по выбору переднего доступа к мышце, поднимающей верхнее веко, с целью предотвращения дополнительной резекции вспомогательных слезных желез [181].

Существует предположение о том, что птоз является результатом плейотропного и вариативного действия гена *PAX6* [149]. Исследования на рыбках данио и куриных эмбрионах показали, что развитие экстраокулярных мышц зависит от взаимодействия формирующегося глазного яблока и клеток нервного гребня, которые мигрируют в орбиту [31]. Таким образом, мутации в *PAX6* влияют на оба стимула, обеспечивающих правильный морфогенез экстраокулярных структур, и приводят к снижению функции верхнего левотора [49; 181; 183].

В настоящее время литературных данных о частоте экстраокулярной патологии в российской популяции пациентов с *PAX6*-ВА не обнаружено. Данная проблема требует дополнительного рассмотрения с целью определения распространенности птоза и изучения влияния временного фактора на его прогрессирование.

1.3 Гено-фенотипические корреляции

Большая часть мутаций, возникающих в гене *PAX6*, приводит к формированию аниридийного фенотипа различной степени выраженности [30; 240].

Моноаллельные мутации

Более 90% внутригенных изменений относятся к группе инактивирующих мутаций (нонсенс-мутации, мутации сдвига открытой рамки считывания, большинство мутаций, нарушающих нормальный сплайсинг), которые ассоциированы с формированием преждевременного стоп-кодона (premature termination codon, PTC) и деградацией нефункциональной рибонуклеиновой кислоты (РНК) по нонсенс-опосредованному механизму (nonsense-mediated decay, NMD) [44; 99; 113; 121; 198; 244]. В этом случае функция белкового продукта мутантного аллеля теряется, а нормальный белок *PAX6*, экспрессирующийся с аллеля дикого типа, не достигает порогового уровня, необходимого для нормального развития глаза и других внеглазных структур. Так проявляется универсальный эффект гаплонедостаточности – потеря функции одной копии гена. Клиническая картина заболевания в 99%

случаев имеет классический аниридийный фенотип в виде полного отсутствия радужной оболочки, быстро прогрессирующей кератопатии, нистагма, катаракты, гипоплазии фовеа, развития вторичной глаукомы [158].

Другой механизм повреждения *РАХ6* отмечается при сдвиге открытой рамки считывания в 3' нетранслируемую область за пределы естественного стоп кодона и синтеза удлиненного аномального белка (C terminal extension, СТЕ мутации или «gun-on» мутации). Доминантно-негативный эффект в этих случаях реализуется за счет подавления функции нормального белка измененным токсичным мутантным белком. В ряде работ фенотип подобных мутаций характеризуется более тяжелой клинической картиной, ассоциированной с выраженной кератопатией, птозом, экссудативной отслойкой сетчатки, гипоплазией ДЗН, низкой остротой зрения в сочетании с незначительными изменениями радужной оболочки [9; 100]. В других сообщениях СТЕ мутации представлены более легкой глазной симптоматикой в виде нистагма, полной аниридии и начальных признаков АК [223].

Миссенс-мутации возникают в результате замены одной аминокислоты на другую и составляют приблизительно 10–12% из числа всех мутаций [244; 267]. Большинство несинонимичных замен (68%) сосредоточены в домене парного бокса [100]. Клинические проявления миссенс-мутаций определяются степенью сохранности структуры и функции белка, они могут варьировать от «мягких» аниридийных фенотипов (аномалия ДЗН [85; 160]; изолированная гипоплазия фовеа [19]) до тяжелых форм в виде микрофтальма и аномалии Петерса [40; 161]. Несмотря на минимальные изменения в радужке (корэктопия, эктропион увеа, секторальная гипоплазия) [34; 222], другие глазные проявления *РАХ6*-ВА могут быть выражены более значительно. Так, на фоне точковых мутаций описаны случаи развития тяжелой кератопатии и помутнения роговицы вследствие первичной НЛСК [219]. Структурно-функциональная характеристика белка, образующегося вследствие миссенс-мутаций, требует экспериментального подтверждения, так как они могут приводить как к синтезу полноразмерного белка с измененной структурой и функцией, так и к возникновению аморфного аллеля и эффекту гаплонедостаточности [95; 216; 258].

Крупные делеции и хромосомные перестройки

На большие делеции и хромосомные перестройки региона 11p13 приходится до половины всех спорадических случаев ВА [53; 92; 252]. В результате хромосомных делеций полностью теряется транскрипционная активность делетированной копии гена, что фенотипически проявляется картиной «классической» *PAX6*-ВА.

Варианты, нарушающие *цис*-регуляцию *PAX6*

Наряду с непосредственным повреждением *PAX6* рядом авторов были описаны хромосомные перестройки, затрагивающие отдаленные регуляторные области данного гена. Молекулярные механизмы действия подобных мутаций на регуляторные области гена *PAX6* были изучены J. Lauderdale с соавторами в 2000 году [133]. Описанные ими хромосомные aberrации затрагивали отдаленный 3'-*цис*-регуляторный регион в области гена *ELP4* и оставляли интактными кодирующие экзоны *PAX6*. Авторами была доказана важная роль данной высококонсервативной последовательности в активации экспрессии гена *PAX6* и формировании аниридийного фенотипа. Кроме того, изменения в 3' регуляторной области ассоциировались не только с потерей хромосомного материала, но и со сбалансированными перестройками в виде парацентрических инверсий или реципрокных транслокаций («эффект положения») [74; 235], а также с однонуклеотидными заменами в сайте связывания, приводящими к нарушению механизма положительной обратной связи, необходимой для поддержания правильной экспрессии гена *PAX6* [27].

Двуаллельные мутации

Компаунд-гетерозиготные мутации приводят к функциональной потере обеих копий *PAX6* у человека и проявляются множественными дефектами ЦНС, грубыми аномалиями развития глаза и высокой перинатальной смертностью [81; 97; 98; 207; 221; 225].

Другие неаниридийные фенотипы, связанные с мутацией в *PAX6*

Мутации *PAX6* могут приводить к появлению нетипичных клинических проявлений в виде изолированной гипоплазии макулярной зоны [19], аномалий ДЗН [21; 85; 135; 160], колобом сосудистой оболочки [85], гипоплазии радужки и заднего эмбриотаксона [96], микрофтальма [259],

микрокорнеа [85], аномалии Петерса [96; 187; 247; 267], эктопии зрачка [20] и нистагма [95; 135]. Многие из этих фенотипов могут быть примерами различной экспрессивности клинических проявлений «классической» *PAX6*-ВА.

В большинстве случаев фенотипическая вариабельность клинических проявлений описана для миссенс-мутаций *PAX6* [19–21; 59; 85; 96; 135; 187], в то же время «неаниридийные» фенотипы среди зарегистрированных нонсенс-мутаций встречаются в единичных случаях. Так 10 из 11 (91%) мутаций, ассоциированных с аномалией Петерса, являются миссенс-мутациями, в то время как среди всех ранее описанных мутаций *PAX6* только 28% относятся к собственно несинонимичным заменам [253]. Восемь из десяти миссенс-мутаций (80%), связанных с аномалией Петерса, расположены в высококонсервативном домене парного бокса, одна – в линкерном сегменте гена, и по одной нонсенс- и миссенс-мутации – в С-концевой области [253]. Единственный описанный в литературе случай нонсенс-мутации (R317X) был ассоциирован с унилатеральной аномалией Петерса у ребенка с двухсторонней аниридией [203].

Аниридия-подобные фенотипы могут возникать при мутациях в других генах, отвечающих за развитие переднего отрезка глаза, таких как *PITX2* [182], *FOXC1* [13; 106; 200] и др. Однако, несмотря на расширенный генетический анализ, в 5% случаев не удается установить генетическую причину аниридии [13].

До недавнего времени не было установлено конкретных взаимосвязей между типом мутации гена *PAX6* или его делециями с особенностями клинической картины ВА. В большинстве работ, выполненных по данной проблематике, корреляционные взаимосвязи не были определены в связи с небольшим числом обследованных пациентов, выраженным клиническим полиморфизмом и генетической гетерогенностью ВА [121; 137; 158; 264]. Так в хрестоматийной работе М. Hingorani был проведён анализ тяжести наблюдаемых фенотипов в зависимости от изменения функций белка, однако полученные результаты не были подкреплены статистическим анализом [100]. Авторы другой работы во главе с I. Tzoulaki, не находя никаких статистически значимых гено-фенотипических корреляций, объясняли сглаживание различий в последствиях нонсенс-мутаций, ошибок сплайсинга и мутаций сдвига

открытой рамки считывания вне зависимости от места локализации внутригенных нарушений существованием универсального механизма деградации матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), предупреждающего образование укороченных белков. Основные механизмы, определяющие разнообразие фенотипической картины *PAX6*-ВА, были ассоциированы с несинонимичными вариантами и неаниридийными фенотипами (миссенс-мутации), а также с С-концевым удлинением белка в сочетании с более тяжелой глазной симптоматикой (СТЕ мутации) [240]. Отсутствие корреляционных взаимосвязей также было отмечено в исследовании Т. Уокоі, который обратил внимание на почти полную идентичность фенотипических проявлений в обоих глазах одного пациента [264], в свою очередь значительный меж- и внутрисемейный полиморфизм глазных признаков был зафиксирован во многих когортных исследованиях ВА [68; 179].

Совместно с генетиками нами впервые были выявлены закономерности, определяющие некоторые взаимосвязи между типом мутационных изменений и фенотипической картиной *PAX6*-ВА [1]. Первоначально статистический анализ был основан на построении таблиц сопряженности и использовании критерия Фишера для оценки взаимосвязи между типом мутации в гене *PAX6* или его делецией с клиническими характеристиками ВА. Критерий Фишера позволил определить наличие зависимости между признаками, не указывая на характер этих отношений, поэтому поиск новых статистических методов для оценки влияния типа мутаций на клинические проявления ВА (их ослабление или усиление) является необходимым звеном в разработке предиктивной системы анализа гено-фенотипических взаимосвязей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Настоящая работа базируется на анализе клинико-функциональных, клинико-морфологических и молекулярно-генетических результатов обследований 110 пациентов с *РАХ6*-ВА (Таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Дизайн работы

I. Клинико-функциональный анализ результатов обследования пациентов с ВА	
1. Анализ офтальмологических проявлений <i>РАХ6</i> -ВА в различных возрастных группах	I группа дети и подростки до 18 лет – 46 человек II группа взрослые пациенты – 64 человека
2. Изучение морфометрических характеристик хрусталика и глубины передней камеры	I группа пациенты с <i>РАХ6</i> -ВА – 88 человек II группа группа контроля – 334 человека
3. Изучение клинических и морфологических изменений роговицы на разных стадиях АК по данным ЛСКМ и ОСТ	I группа пациенты с <i>РАХ6</i> -ВА – 36 человек II группа группа контроля – 30 человек
II. Молекулярно-генетический анализ пациентов с ВА	
Изучение частоты и спектра мутаций в гене <i>РАХ6</i> , оценка клинико-генетических взаимосвязей	105 человек

Клиническое обследование всех пациентов с ВА осуществлялось на базе Чебоксарского филиала Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. В анализ были включены как первично обратившиеся за медицинской помощью пациенты, так и пациенты, ранее наблюдавшиеся и получавшие лечение в других лечебных учреждениях.

Молекулярно-генетическая диагностика биологических образцов пациентов с ВА проводилась на базе лаборатории генетической эпидемиологии Федерального государственного бюджетного научного

учреждения «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» (г. Москва, канд. биол. наук Васильева Т.А.).

Статистический анализ взаимосвязей клинических проявлений ВА с типами генетических мутаций проводился на базе кафедры вычислительных систем и технологий Нижегородского государственного технического университета им. Р.Е. Алексеева (г. Н. Новгород, д-р техн. наук Ломакина Л.С., канд. техн. наук Ломакин Д.В., Канев О.К.).

Всеми пациентами или их законными представителями (родителями) были подписаны добровольные информированные согласия на выполнение генетического анализа и участие в медицинском обследовании.

2.1 Материал исследования

В период с 2003 по 2018 год под наблюдением находились 110 пациентов (220 глаз) с *РАХ6*-ВА из 79 неродственных семей. Средний период наблюдения за больными составил 3 года (от 6 месяцев до 14 лет). Средний возраст пациентов на момент первоначального визита – $22,6 \pm 16,6$ лет (от 2 месяцев до 67 лет). Соотношение мужчин и женщин составило 1:1,3. Основные демографические данные представлены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Демографические данные пациентов с *РАХ6*-ВА

Показатели	Количество пациентов с ВА, n (%)
Пол	
женский	62 (56,4)
мужской	48 (43,6)
Характер наследования	
спорадическая аниридия	29 (26,4)
семейная аниридия	73 (66,4)
тип наследования не определен	8 (7,2)
Возраст, лет	
≤10	36 (32,7)
10≤20*	12 (11)
20≤30	26 (23,6)
30≤40	21 (19,1)
>40	15 (13,6)

* Пациенты в возрасте 18–20 лет в выборке не встречались.

В соответствии с поставленной задачей анализ особенностей офтальмологических проявлений ВА проводился в двух возрастных группах.

I группу составили 46 человек (92 глаза), в нее вошли дети и подростки до 18 лет включительно, средний возраст – $6,2 \pm 5$ лет (Me – 4,8 года). Во II группу вошли 64 пациента (128 глаз) старше 18 лет, средний возраст которых составил $34,7 \pm 10$ лет (Me – 33 года). С целью защиты личности изучаемых субъектов всем пациентам были присвоены кодирующие номера.

2.2 Методы исследования

Обследование пациентов включало анализ семейной истории ВА с построением генеалогического древа. При общем осмотре обращалось внимание на наличие признаков дисморфогенеза с целью исключения случаев аниридии в составе синдромальной патологии. С целью выявления средовых и тератогенных воздействий, предшествующих рождению ребенка, собирались данные о течении перинатального периода. Объективному обследованию органа зрения предшествовал тщательный сбор анамнеза по поводу количества и вида перенесенных офтальмологических вмешательств, инстилляций лекарственных препаратов, времени возникновения и динамики жалоб на снижение зрения. В начале офтальмологического приема проводился первичный осмотр с оценкой положения глаз, головы, верхнего века и объема работы глазодвигательных мышц. С целью определения выраженности птоза использовалась классификация птоза по степени тяжести Брэка и Бертмана, дополненная В. Атамановым в 2000 году.

2.2.1 Методы офтальмологического обследования

Визометрию без коррекции и с максимальной коррекцией проводили на фороптере Nuvitz CDR-3100 (Корея) с использованием проектора знаков Торсон АСР-5 (Япония) и стандартного набора очковых линз. Исследования базировались на данных авторефрактометра Tomey RC-5000 (Япония).

Получение рефракционных данных было невозможным у детей младше трех лет, а также у пациентов с выраженным нистагмом и центрально расположенными помутнениями роговицы. Рефракцию у детей младшего возраста исследовали с помощью скиаскопии и использования авторефрактометра Retinomax K-plus 3 (Righton, Япония) в скоростном режиме Quick. Слепота пациента определялась в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [231] как острота зрения менее 0,05 на лучшем видящем глазу с максимальной коррекцией.

Для оценки **ВГД** использовалась точечная контактная тонометрия при помощи прибора iCare-TA01i (Финляндия), а также пневмотонометрия по данным бесконтактного компьютерного тонометра NIDEK NT-530 (Япония). Использование традиционных аппланационных методов офтальмотонометрии и метода двунаправленной пневмоаппланации роговицы у большинства пациентов было невозможным в связи с наличием выраженного нистагма, неровностью роговичной поверхности и нежелательностью применения контактных диагностических методов исследования на фоне АК.

По данным **биомикроскопии** на щелевой лампе модели SL-980-5x (Италия) определялась степень сохранности радужной ткани, вовлеченность в патологический процесс роговицы, хрусталика и стекловидного тела. Диагноз микрокорнеа выставлялся при горизонтальном размере роговицы менее 10 мм. На основании биомикроскопических данных оценивали характер, степень и локализацию помутнений хрусталика, степень его люксации, наличие остаточной фетальной васкуляризации на передней капсулярной поверхности, а также целостность цинновых связок.

С целью верификации стадии АК использовалась классификация U. Eden, предложенная в 2010 году (см. Таблицу 1.2, Рисунок 2.1) [73]. Для выявления ранних стадий АК и возможных дефектов роговичной поверхности применялась методика «позднего окрашивания» раствором флюоресцеина с использованием синего кобальтового фильтра. Наличие аномальной конъюнктивальной ткани, связанной с НЛСК, проявлялось более слабым свечением через 3–6 минут после окрашивания, чем при обычном эпителиальном дефекте роговицы.

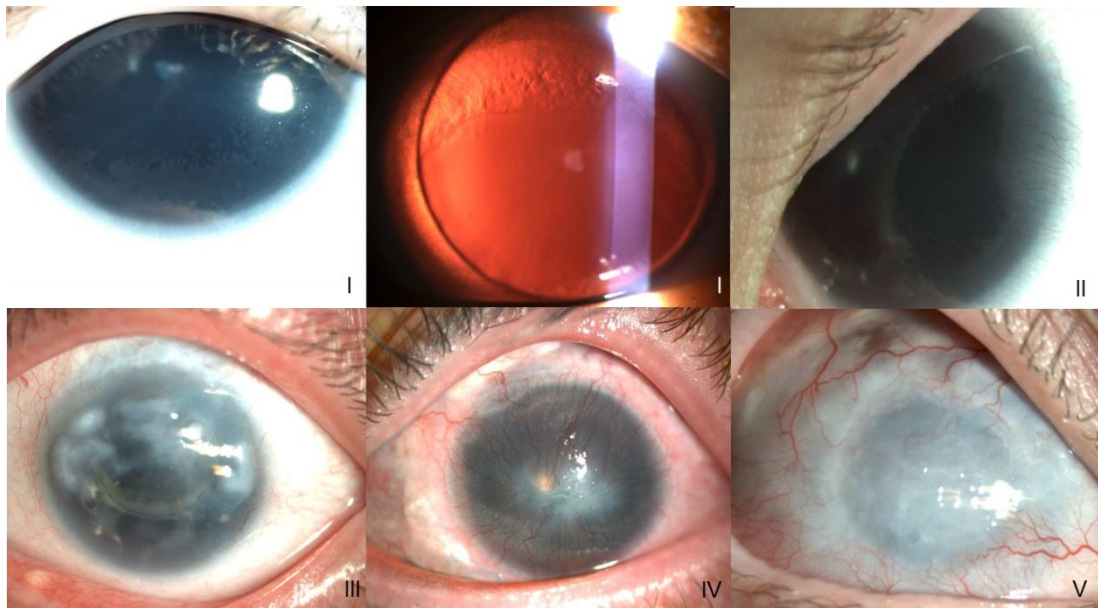


Рисунок 2.1 – Фото глаз с разными стадиями АК по Eden

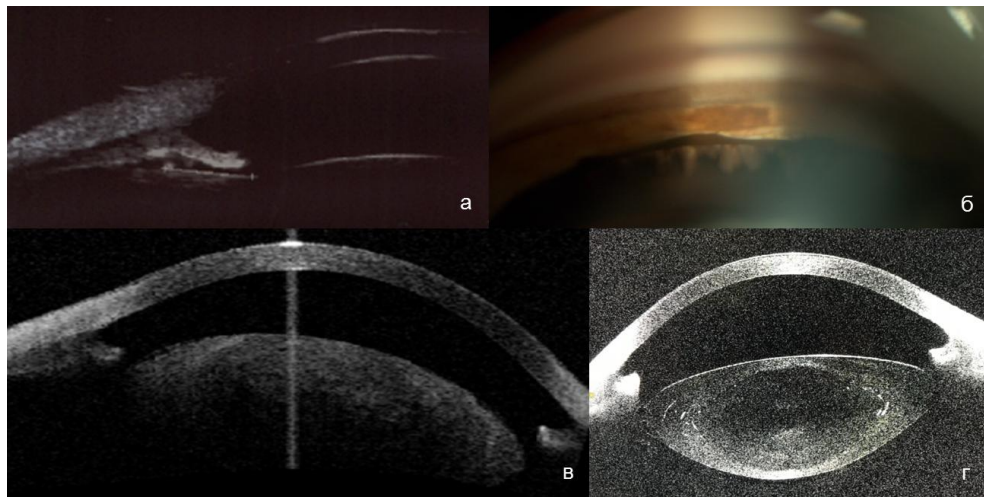
На основании биомикроскопических данных оценивали характер, степень и локализацию помутнений хрусталика, степень его люксации, наличие остаточной фетальной васкуляризации на передней капсулярной поверхности, а также целостность цинновых связок.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) выполняли на приборе A/B Scan фирмы Alcon (США) по транспальпебральной методике с целью выявления патологии стекловидного тела, сетчатки и сосудистой оболочки. Важность визуализации структур задней камеры особенно возрастала при непрозрачности оптических сред глаза.

При достаточной визуализации **осмотр глазного дна** осуществлялся при помощи широкоугольной бесконтактной асферической линзы OsherMaxField 78D (США) с целью выявления особенностей ДЗН и макулярной зоны. Диагноз гипоплазии фовеа выставлялся на основании отсутствия фовеального рефлекса, фовеального углубления, нарушения пигментации макулярной области и наличия ретинальных сосудов в аваскулярной зоне. Клинический диагноз подтверждался снимками **ОКТ**, выполненными по протоколам 3D Retina и Cross Line с помощью спектрального томографа RTVue XR Avanti (Optovue Inc., США). Степень гипоплазии фовеа оценивалась согласно классификации M. Thomas (см. Рисунок 1.2) [232].

Диагноз гипоплазии ДЗН при офтальмоскопии выставлялся при обнаружении уменьшенного в размерах ДЗН, симптома «двойного кольца» и наблюдаемой извитости крупных вен сетчатки. Осмотр крайней периферии и выявление участков хориоретинальной дистрофии, немых и явных разрывов были необходимы для исключения регматогенной патологии и своевременного выполнения ограничительной лазеркоагуляции сетчатки.

Исследование структур УПК глаза проводили при помощи различных методов визуализации в зависимости от поставленных задач, выраженности нистагма и АК (Рисунок 2.2).



а – данные УБМ; б – данные гониоскопии; в – ОКТ переднего отрезка глаза (Visante OCT);
г – ОКТ переднего отрезка глаза (CASIA2).

Рисунок 2.2 – Визуализация структур передней камеры глаза

Гониоскопию выполняли при помощи 4-зеркального гониоскопа Ван-Бойнингена, щелевой лампы или операционного микроскопа с целью оценки состояния дренажной зоны УПК, выраженности гониосинехий, их протяженности и расположения рудиментарных остатков радужной оболочки. В глазах с «полной» аниридией гониоскопия также позволяла субъективно оценить состояние цилиарных отростков, их форму и размеры.

ОКТ переднего отрезка на томографах Visante OCT (Carl Zeiss Meditec, Германия), CASIA2 (Tomey, Япония) использовалась для изучения анатомии роговицы, глубины передней камеры, дренажных структур, наличия

корнеохрусталиковых сращениях и иридокорнеальной адгезии. Отсутствие радужной оболочки позволяло обследовать пространство задней камеры, выявлять дефекты связочного аппарата, анализировать правильность расположения интраокулярной линзы (ИОЛ)/иридохрусталиковой диафрагмы (ИХД) в послеоперационном периоде, их взаимоотношения с цилиарной зоной, остатками капсулы хрусталика и радужной оболочкой. Бесконтактность методики ОКТ позволяла избегать дополнительного повреждения роговичного эпителия и использования местных анестетиков перед проведением процедуры.

УБМ выполняли при помощи ультразвукового биомикроскопа фирмы Paradigm модели P40 (Medical Industries, США) с частотой датчика 50 мГц, аксиальной разрешающей способностью 50 мкм и глубиной проникновения 5 мм. Данная методика позволяла определять параметры структур переднего сегмента глаза, недоступных обычной световой биомикроскопии, и их пространственные соотношения при патологии связочного аппарата хрусталика. Ценность методики была высока при измерении толщины цилиарного тела, длины цилиарных отростков, особенно в условиях непрозрачности оптических сред глаза.

Ультразвуковую эхобиометрию глаза выполняли на А-сканбиометрах Model 820 (Humphrey, США), Nidek US-1800 (Япония) или Mentor Teknar Ophthasonic (США) с целью определения передне-задней оси глаза, глубины передней камеры и максимальной толщины хрусталика. Диагноз микрофтальма выставлялся при длине передне-задней оси менее 21 мм у взрослых и 19 мм у годовалого ребенка. Оценку длины глаза проводили исходя из критериев, представляющих собой уменьшение размеров глаза не менее чем на два стандартных отклонения ниже нормы.

Фоторегистрацию глаз пациентов осуществляли при помощи фотоцелевых ламп Topcon DC-1 (Япония) и BQ 900 с модулем обработки изображения IM 900® (Haag-Shreit, Швейцария). Видеосигнал для **видеорегистрации** хирургических вмешательств получали с помощью

цифровой трехматричной видеокамеры Medilive Trio Eye $\frac{1}{2}$ 3CCD PAL (Carl Zeiss Meditec, Германия), коаксиально соединенной с объективом операционного микроскопа Carl Zeiss (Германия), который далее передавался для записи и хранения на видеорекордер Pioneer DVR-940 NH (Великобритания).

Ограничения в применении некоторых диагностических методик (ОКТ, гониоскопии, офтальмоскопии) были связаны с возрастными особенностями (детский возраст), непрозрачностью оптических сред и наличием выраженного нистагма. Обследование новорожденных и детей малого возраста проводилось под общим наркозом с применением наркозного ингаляционного средства «Севоран» или путем внутривенного введения натрия оксибата.

2.2.2 Изучение морфометрических характеристик хрусталика и глубины передней камеры у пациентов с *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридией в сравнении с возрастной нормой

С целью определения темпов роста хрусталика в глазах с *РАХ6*-ВА, характера инволюционных изменений его параметров, а также соответствия полученных данных нормативным показателям у здоровых лиц было проведено измерение его сагиттальных размеров в разных возрастных группах.

В исследование толщины хрусталика вошли 88 аниридийных пациентов (88 глаз) в возрасте от 2 месяцев до 60 лет (в среднем $23,2 \pm 16,6$ года), из них 48 женщин и 40 мужчин. Группу контроля составили 344 здоровых пациента (344 глаза), проходивших стандартное диагностическое обследование в Чебоксарском филиале МНТК «Микрохирургия глаза», без признаков катарактальных помутнений в хрусталике, без данных, свидетельствующих о наличии глаукомы, увеита и ретинопатии недоношенных, а также без глазных травм и операций в анамнезе. Средний возраст здоровых субъектов составил $26,5 \pm 16,2$ лет (от 2 месяцев до 59 лет), соотношение по полу

мужчины/женщины: 1:1,4 (201/143). Средние значения сферозвивалента составили $-0,81 \pm 4,8$ дптр (Me – [-0,81] дптр) и $-0,59 \pm 2,8$ дптр (Me – 0 дптр) в аниридийной группе и группе контроля соответственно ($p=0,39$). Длина глаза у пациентов обеих групп не отличалась между собой ($p>0,05$) (Приложение А).

Ультразвуковая биометрия выполнялась на А-сканбиометре US-1800 (Nidek, Япония). Учитывая наличие у большинства пациентов нистагма, с целью нивелирования вероятности ошибки проводились трехкратные измерения с вычислением среднего значения. Детям до 4 лет исследование выполнялось под общей анестезией в процессе диагностического обследования, для пациентов старшего возраста применялась топиальная анестезия раствором 0,4% оксибупрокаина.

С учетом отсутствия гендерных различий в размере хрусталика у людей [18] исследуемые группы по половому признаку не разделялись. В исследование не вошли пациенты со значительной степенью сублюксации хрусталика, затрудняющей измерение его толщины в максимальной точке, а также пациенты с микрофтальмом. С целью устранения аккомодационного стимула измерение толщины хрусталика проводили в условиях циклоплегии через 25 минут после двукратной инстилляцией 0,5% или 1% раствора тропикамида.

В двух случаях диаметр хрусталика был оценен путем прямого измерения. Нативный материал был получен после интракапсулярной экстракции катаракты с сохранением неповрежденной капсулы хрусталика. Выбор вида операции был обусловлен наличием у 30- и 40-летних пациенток подвывиха хрусталика III степени со значительным его смещением кверху (Рисунок 2.3). Диаметр хрусталика измерялся в двух перпендикулярных осях под операционным микроскопом при помощи разметочного циркуля с последующим переносом результатов на микрометр Mitutoyo Digimatic (Japan).

2.2.3 Анализ изменений роговицы на разных стадиях аниридной кератопатии по данным лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и оптической когерентной томографии

Целью исследования стало изучение морфологических изменений в палисадах Фогта на разных стадиях АК, возможность визуализации лимбальных прогениторных структур у пациентов с ВА при помощи ОКТ, а также оценка согласованности результатов диагностики ЛПФ, выполненных методами ЛСКМ и ОКТ.

Были обследованы 36 пациентов (68 глаз) с РАХ6-ВА, из них 20 женщин, 16 – мужчин. Семейный характер наследования был отмечен у 26 человек, спорадические случаи ВА выявлены у 10 пациентов. Средний возраст больных был равен $32,4 \pm 13,4$ лет (от 4 до 56 лет). В группу контроля вошли 30 здоровых добровольцев (30 глаз), без патологии переднего отрезка глаза, без признаков НЛСК, не носивших контактные линзы, без оперативных вмешательств и травм в анамнезе [3]. Средний возраст испытуемых составил $38,5 \pm 13$ лет (от 23 до 56), среди них было 12 мужчин и 18 женщин. Всем испытуемым проводили обследование периферической и центральной зон роговицы при помощи ОКТ и ЛСКМ по нижеописанной методике.

ЛСКМ с целью детального обследования центральной зоны роговицы, определения плотности крыловидных, базальных, а также эндотелиальных клеток, оценки структуры ЛПФ и зоны перехода между лимбальной и роговичной тканями, выявления воспалительных изменений в верхнем и нижнем лимбе проводилась на Гейдельбергском лазерном ретинальном томографе HRT3 с роговичным модулем Rostock Cornea Module (Heidelberg Engineering, Германия). Размер получаемых снимков составил $400 \times 400 \mu\text{m}$, глубина оптического среза – $4 \mu\text{m}$. Оценку ЛПФ осуществляли в верхнем и нижнем лимбальных секторах в пределах 90° , учитывая их преимущественную локализацию в вертикальном меридиане роговицы [214]. Средние значения плотности крыловидных, базальных и эндотелиальных клеток в центральной зоне роговицы определялись после их трехкратного измерения в каждом слое. Плотность эндотелиальных клеток подсчитывалась

у пациентов с ВА, не перенесших интраокулярные вмешательства в прошлом. Подсчет клеток осуществлялся в специальной оригинальной программе конфокального микроскопа Cell Count.

К морфологическим критериям сохранности прогениторных структур лимбальной зоны относили сочетание трех признаков:

- наличие лимбальных базальных клеток с темной цитоплазмой и четкими светлыми границами;
- визуализацию ЛПФ в виде хорошо дифференцируемых высокорекфлексивных двухконтурных структур, расположенных в форме параллельных линий или частокола на уровне базального эпителия;
- визуализацию ФСП в виде двухконтурных округлых или овальных образований, располагающихся в апикальной части лимбальных крипт.

При отсутствии хорошо видимых интактных прогениторных зон снимки оценивались на наличие различных палисадоподобных структур или частично сохранных ЛПФ. Деформированные лимбальные прогениторные структуры были представлены менее контрастными укороченными ЛПФ, потерявшими вид частокола, двойной контур и четкие границы, и ФСП с пониженной рефлективностью и измененными размерами. Факт отсутствия прогениторных структур устанавливался в случае необнаружения палисадоподобных образований и ФСП по всей обследованной зоне.

Морфологически роговичный эпителий определялся по наличию базальных эпителиальных клеток с темной цитоплазмой, четкими и светлыми границами и их мозаичной структуре. Конъюнктивальный эпителий характеризовался наличием клеток со светлой цитоплазмой, трудноразличимыми клеточными стенками, присутствием бокаловидных и округлых воспалительных клеток. Смешанный эпителиальный фенотип был представлен роговичным эпителием со значительной инвазией конъюнктивальных клеток. Зрелые дендритные клетки (клетки Лангерганса) идентифицировались по их морфологии, преимущественной локализации в суббазальном нервном сплетении и наличию длинных дендритных отростков. Незрелые дендритные клетки имели вид небольших ярких клеточных тел без/с небольшими короткими дендритами. Другие воспалительные клетки

(лейкоциты миелоидного происхождения) характеризовались высокой отражательной способностью, преимущественно округлой формой и расположением в эпителиальной и субэпителиальной областях [128]. Бокаловидные клетки, в свою очередь, имели диффузную отражающую способность, округлую форму и большие размеры.

Учитывая наличие нистагма у большинства пациентов с АК, невозможность фиксации взора и определения точной зоны сканирования, изменения, обнаруживаемые по данным ЛСКМ, анализировались с помощью полуколичественного метода с целью оценки наличия или отсутствия того или иного морфологического признака у конкретного индивида.

ОКТ переднего отрезка глаза с целью исследования лимбальных структур осуществлялась с помощью спектрального оптического когерентного томографа RTVue XR Avanti (Optovue, США, версия программного обеспечения 2016.1.0.26) с насадкой для исследования переднего отрезка глаза. С целью визуализации ЛПФ в верхнем и нижнем лимбе применялись протоколы 3D Cornea в режиме En Face и Cornea Cross Line. Размеры зон сканирования по протоколу 3D Cornea составляли 4×4 и 4×6 мм, аксиальная разрешающая способность – 5 μm. Всем пациентам сканирование проводили в верхнем и нижнем лимбальных секторах протяженностью 90°. Для визуализации ЛПФ в оптимальном качестве использовали режим En Face, включающий стандартную толщину слоя сканирования 30 мкм. С целью поиска прогениторных структур изменяли положение линии сканирования по глубине до получения наиболее четкого изображения. Полученные данные анализировали на предмет наличия ЛПФ, а также оценивали структуру и степень их визуализации. Протокол Cornea Cross Line использовали для визуализации уровня расположения палисад в верхнем и нижнем лимбе.

В протоколе Pachymetry+CPwr оценивалась центральная толщина роговицы (ЦТР) и ее эпителия в пределах 2-миллиметровой зоны. Учитывая наличие у большинства пациентов нистагма, с целью нивелирования вероятности ошибки в результате смещения центра роговицы проводились трехкратные измерения с вычислением среднего значения.

2.2.4 Молекулярно-генетические методы исследования

Всего было исследовано 105 образцов замороженной цельной крови с антикоагулянтом (этилендиаминтетрауксусной кислотой) в объеме 6–8 мл. Забор крови у пациентов проводился в Чебоксарском филиале МНТК «Микрохирургия глаза» после подписания информированного согласия на медицинское вмешательство и генетическое исследование. После заморозки кровь транспортировалась в ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова» (г. Москва) при низком температурном режиме в атмосфере «сухого льда». ДНК была выделена из лейкоцитов периферической крови с помощью набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., США) согласно протоколу производителя.

Анализ мутаций в гене *PAX6*

Молекулярно-генетическая диагностика включала прямое двунаправленное автоматическое секвенирование 14 экзонов гена *PAX6* и мультиплексную реакцию лигазозависимой амплификации зондов (MLPA).

Для секвенирования по Сэнгеру были подобраны праймеры (к экзонам транскрипционного варианта NM_000280.4 и к экзону 5a (транскрипционный вариант NM_001604.5), расположенному внутри интрона 5 главной изоформы). Праймеры использовались для амплификации экзонных и фланкирующих их интронных последовательностей по стандартным алгоритмам. Продукты полимеразной цепной реакции секвенировали и анализировали с использованием BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit на анализаторе 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Все внутригенные мутации были названы в соответствии с транскрипционным вариантом 1 гена *PAX6* (NM_000280.4).

Во всех случаях было подтверждено отсутствие мутации пробанда у доступных здоровых членов семьи и наличие мутации пробанда у больных родственников. В случае обнаружения у пробанда ранее неописанной миссенс-мутации, синонимичной замены или возможно патогенного интронного варианта последовательности поиск мутации проводился у всех

доступных членов семьи, а также подтверждалось биологическое родство пробанда и родителей.

Анализ хромосомных перестроек с вовлечением региона 11p13

MLPA-анализ проводился с использованием SALSA MLPA набора проб P219-B2 PAX6 (MRC-Holland, Нидерланды) в соответствии с рекомендациями производителя [191], с последующей обработкой результатов в программе Coffalyser.Net (MRC-Holland).

Набор MLPA проб P219-B2 покрывал область chr11:27636398–35117389 (NCBI 36/hg18) и содержал пробы на каждый экзон гена *PAX6*, несколько проб на экзоны гена *WT1* и ген *RCN1*. Кроме того, в набор были включены пробы на гены *BDNF*, *FSHB*, *DCDC1* и *ELP4*, расположенные теломернее гена *PAX6*, и пробы на *HIPK3*, *LMO2*, *EHF* и *CD44*, расположенные центромернее от гена *WT1*, а также контрольные пробы на ген *SOX2*, расположенного на хромосоме 3.

Границы делеций назывались в соответствии с положением MLPA проб с уменьшенным сигналом (и в соответствии со сборкой генома NCBI 36/hg18) (<https://genome.ucsc.edu/>). Для верификации результатов MLPA в случаях выявления микроделеций в коротком плече хромосомы 11(p13), затрагивающих ген *WT1*, была проведена таргетная флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) с локус-специфичным ДНК-зондом (LSP WT1). Для проведения FISH использовался набор FA0275 (Abnova, Тайвань).

2.2.5 Анализ гено-фенотипических зависимостей

С целью анализа гено-фенотипических зависимостей между типом мутаций и клиническими проявлениями *PAX6*-ВА были проанализированы результаты офтальмологического осмотра 68 пробандов. Ввиду наличия только одного пациента с СТЕ мутацией (100AN) он не был включен в дальнейшее рассмотрение. Разделение пациентов по типам мутаций представлено в Таблице 2.3. Возрастные различия между подгруппами были статистически незначимы ($p_H=0,8413$).

Офтальмологическая характеристика пробандов включала анализ наличия нистагма, АК, глаукомы, катаракты, ЛПФ по данным ЛСКМ и оценки степени гипоплазии фовеа по данным ОКТ.

Таблица 2.3 – Характеристика групп пациентов с разными типами мутаций

Тип мутаций	Количество пробандов	Возраст пробандов, лет		
		M±σ	Me	(Q25%; 75%)
Миссенс-мутации	3	11,6±13,3	5	(3; 27)
Инактивирующие мутации*	32	23,6±11,7	27	(11; 31)
Мутации, изменяющие сплайсинг	12	22,6±18,2	27	(4; 35)
Делеции 3'- <i>цис</i> -регуляторной области гена <i>PAX6</i>	7	20,6±14,3	29,5	(3; 31)
Хромосомные перестройки без делеций 3'- <i>цис</i> -регуляторной области гена <i>PAX6</i>	14	22,1±16,5	23	(3; 37)

* Инактивирующие мутации включали в себя нонсенс-мутации, мутации сдвига открытой рамки считывания и мутации сайта инициации трансляции.

В связи с немногочисленностью подгруппы пациентов с миссенс-мутациями (3 пробанда) и отсутствием сведений о вероятном влиянии замены аминокислоты на структуру и функцию белка, ее статистический анализ в рамках гено-фенотипических корреляций не проводился. В состав группы инактивирующих (loss of function (Lof) мутаций вошли внутригенные мутации, ассоциированные с формированием преждевременного стоп-кодона и деградацией нефункциональной РНК по нонсенс-опосредованному механизму (нонсенс-мутации, мутации сдвига открытой рамки считывания и мутации сайта инициации трансляции). В связи с неясными последствиями нарушения нормального сплайсинга и необходимостью функционального анализа структуры и уровня мРНК данный тип внутригенных нарушений был рассмотрен отдельно от инактивирующих мутаций. Хромосомные перестройки, в свою очередь, были разделены на подгруппу делеций 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* и подгруппу делеций, захватывающих кодирующую часть гена.

2.2.6 Статистический анализ

При создании первичной базы данных, а также построении графиков использовался редактор электронных таблиц Microsoft Excel for Windows. Данные были статистически проанализированы с помощью пакета прикладных программ STATISTICA версия 6.1 (StatSoft Inc., США). Полученные результаты были обработаны общепринятыми методами дескриптивной статистики. Для выборок с распределением значений признака, близким к нормальному, согласно критерию Колмагорова – Смирнова, данные представляли в виде среднеарифметической (M) и стандартного отклонения (σ), $M \pm \sigma$. Для выборок с ненормальным распределением признаков указывали медиану (Me), нижний и верхний квартили [Me (Q25%; Q75%)]. Статистически значимые различия определялись с использованием критериев непараметрической и параметрической статистики для независимых (Манна – Уитни (U), t -критерия Стьюдента (t -тест), критерия Краскела – Уоллиса (H) и зависимых выборок (критерий Вилькоксона (T), критерий Фридмана). Критерий Фишера и χ^2 использовались для сравнения качественных переменных. Условием определения статистически значимых различий считали значение $p < 0,05$.

Анализ зависимости между методами прямой (ЛСКМ) и непрямой (ОКТ) визуализации ЛПФ осуществлялся на основе корреляционного анализа по Спирмену. Значения непараметрических признаков были заменены на следующие ранги: 0 – отсутствие палисад; 1 – наличие измененных палисад или палисадоподобных структур; 2 – наличие полноценных палисад.

С целью снижения влияния парных глаз на результаты статистического анализа в работу был включен лишь один глаз одного пациента, выбранный путем рандомизации.

С целью определения корреляционных взаимосвязей между типом генетических мутаций и клиническими проявлениями *PAX6*-ВА, а также степенью тяжести фенотипа был разработан метод статистического анализа на основании вероятностной модели, подробно описанной в разделе 5.3.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ С *РАХ6*-АССОЦИИРОВАННОЙ ВРОЖДЕННОЙ АНИРИДИЕЙ

С целью создания полного офтальмологического портрета пациента с *РАХ6*-ВА была изучена частота глазных проявлений ВА, включающих поражение переднего и заднего отрезков глаза, экстраокулярную патологию и рефракционные нарушения. В представленной главе отражены результаты комплексной оценки клинической картины *РАХ6*-ВА, а также рассмотрены особенности фенотипических проявлений ВА в разных возрастных группах с целью выявления признаков, оказывающих прогностическое влияние на течение данной офтальмопатологии.

3.1 Глазные проявления *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии

Было проведено полное ретроспективное офтальмологическое обследование 110 пациентов (220 глаз) с *РАХ6*-ВА из 79 неродственных семей. Распределение пациентов по возрастным группам, характер наследования и основные демографические показатели представлены в Таблице 2.2 предшествующей главы. Частота глазных проявлений *РАХ6*-ВА представлена в Таблице 3.1. Клинические проявления, встречающиеся более чем в 70% глаз (полная аниридия, нистагм, кератопатия, помутнения хрусталика, гипоплазия фовеа, рефракционные нарушения), были рассмотрены в качестве «классического» фенотипа *РАХ6*-ВА.

С целью определения клинических признаков, имеющих прогностическое значение для течения заболевания в будущем, а также выявления окулярных проявлений ВА, носящих прогрессирующий характер, было выполнено сравнение частоты глазных проявлений *РАХ6*-ВА в разных возрастных группах (Таблица 3.2).

Таблица 3.1 – Глазные проявления *РАХ6*-ВА

Глазные проявления	Количество выявленных случаев, <i>n</i> / количество обследованных глаз, <i>n</i>	Частота выявленных случаев, %
Полная аниридия	82/110	74,5
Частичная аниридия	28/110	25,5
Нистагм	94/110	85,5
Кератопатия	83/110	75,5
Катаракта	87/110	79,1
Подвывих хрусталика	24/110	21,8
Глаукома	36/110	32,7
Гипоплазия фовеа	87/97	89,7
Гипоплазия ДЗН	14/81	17,3
Отслойка сетчатки	2/110	1,8
Аномалии рефракции	75/78	96,2
Птоз	25/110	22,7
Микрокорнеа	4/109	3,7
Микрофтальм	11/107	10,3
Косоглазие	54/110	49,1

Таблица 3.2 – Частота глазных проявлений *РАХ6*-ВА в зависимости от возраста

Глазные проявления	Частота выявленных случаев у пациентов ≤ 18 лет, %	Частота выявленных случаев у пациентов > 18 лет, %	<i>p</i> *
Нистагм	84,8	86	1,0
Кератопатия	69,5	79,6	0,264
Катаракта	63	90,6	0,000
Подвывих хрусталика	13	28	0,046
Глаукома	32,6	32,8	1,0
Птоз	13	29,7	0,032
Гипоплазия фовеа**	90	80,7	0,262
Аномалии рефракции	96,9	95,7	1,0
Косоглазие	52,2	46,9	0,699

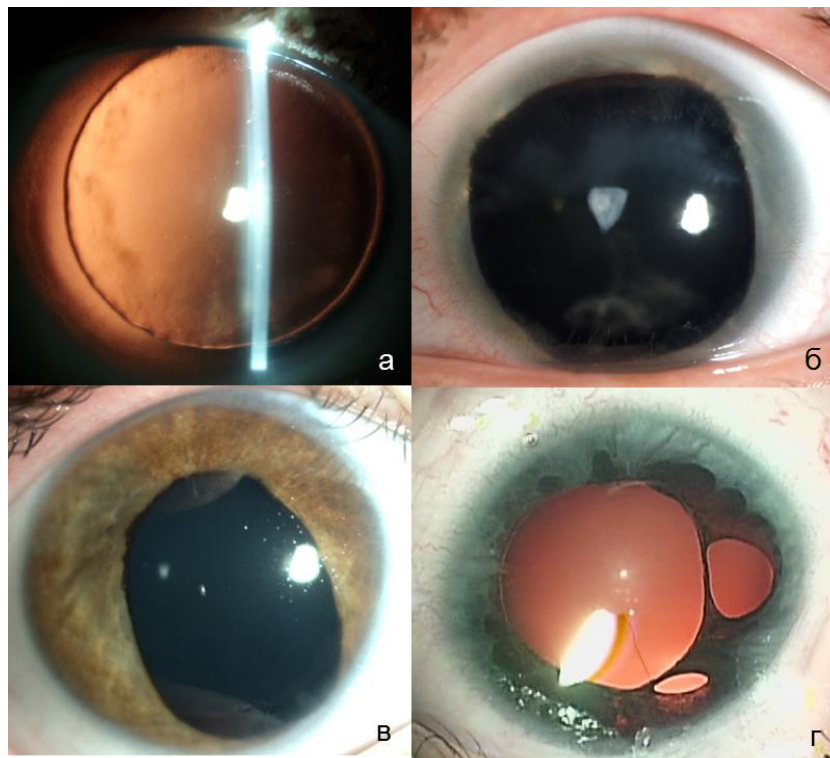
* Двухсторонний точный критерий Фишера.

** Гипоплазия фовеа 4-й степени.

Сравнение двух возрастных категорий пациентов показало наличие статистически значимых различий между группами в частоте развития катаракты ($p=0,000$), подвывиха хрусталика ($p=0,046$) и птоза ($p=0,032$). Далее в разделах Главы 3 будут рассмотрены основные глазные проявления *РАХ6-ВА*, приведенные в Таблице 3.1, с анализом возрастных особенностей в обозначенных клинических категориях.

Нистагмоидные движения глаз с различной амплитудой колебательных движений с наличием или отсутствием нулевой точки фиксации наблюдались у большинства пациентов с *РАХ6-ВА* (85,5%). Нистагм наблюдался как в горизонтальной, так и вертикальной плоскостях, а также имел ротаторный характер. У двух пациентов было отмечено вынужденное положение головы, компенсирующее величину нистагма и увеличивающее время фовеальной фиксации (глазной тортиколлис).

В обследованной группе пациентов полная аниридия с сохранением рудиментарных остатков шириной 0,5–1,5 мм была диагностирована в 74,5% глаз (Рисунок 3.1а).



а – полная аниридия; б – частичная аниридия; в – колобомоподобный дефект радужки;
г – гипоплазия радужки, псевдополикория.

Рисунок 3.1 – Фото глаз с различной степенью презентации радужной ткани

Частичная аниридия в виде хорошо визуализируемого ободка радужной ткани была обнаружена в 25,5% случаев, в том числе включая глаза с асимметричными колоболоподобными дефектами, участками секторальной гипоплазии и эффектом псевдополикории. Из них в 28% случаев чаще всего в верхне-наружном квадранте было отмечено формирование зрачкового края радужки с частичным сохранением пигментной каймы (Рисунок 3.1 б, в).

Частота микрофтальма и микрокорнеа составила 10,3 и 3,7% соответственно. В 36,4% микрофтальм сочетался с микрокорнеа, случаев изолированной микрокорнеа в группе пациентов с *РАХ6-ВА* выявлено не было. Средняя длина передне-задней оси в глазах с микрофтальмом у взрослых пациентов составила $20,4 \pm 0,43$ мм (от 19,15 до 20,93 мм).

3.2 Клинико-возрастные особенности развития аниридийной кератопатии

С целью изучения АК у пациентов с *РАХ6-ВА* были проанализированы клинико-возрастные особенности ее течения в двух возрастных группах. Кератопатия различной степени тяжести была выявлена в 75,5% случаев. Распределение АК по стадиям в зависимости от возраста пациентов представлено на Рисунке 3.2.

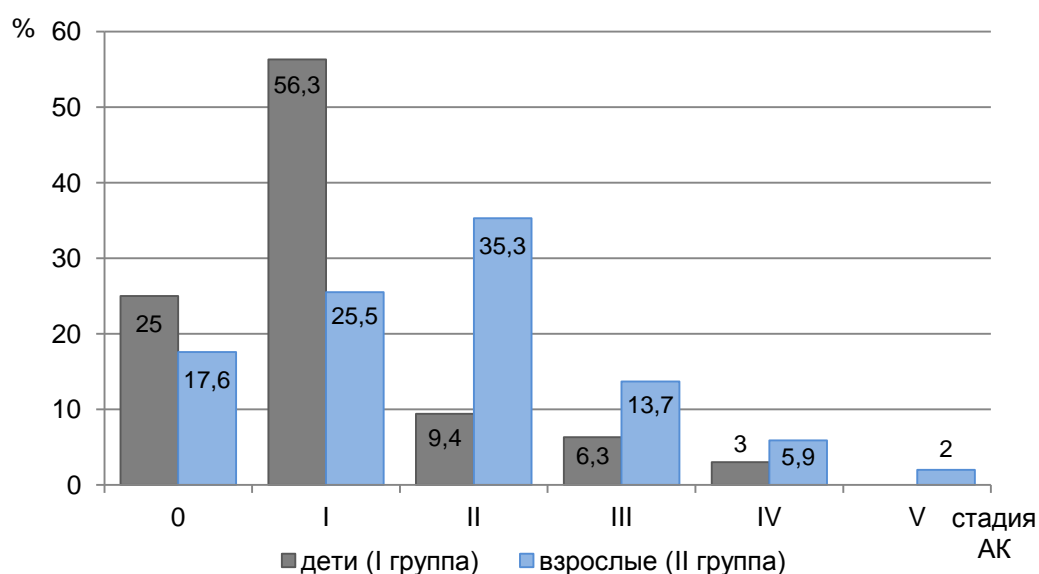
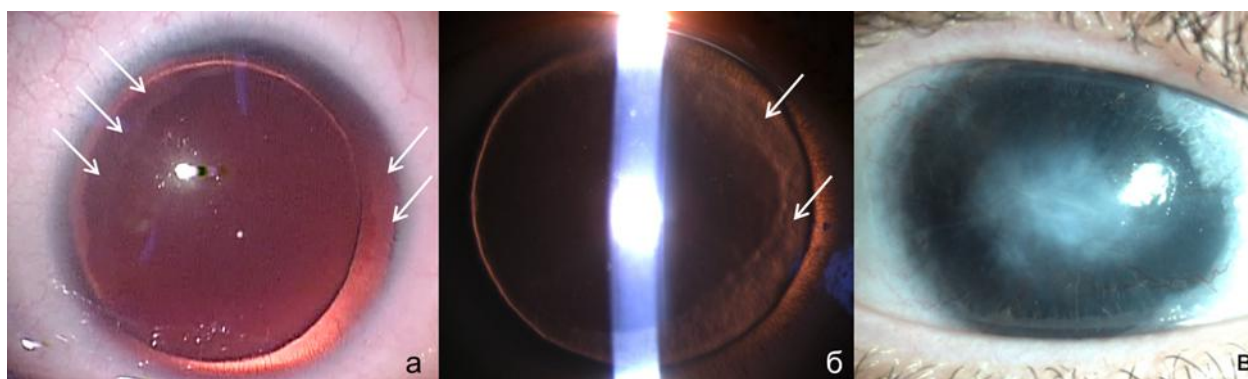


Рисунок 3.2 – Распределение АК по стадиям в зависимости от возраста

I возрастная группа

У детей до 18 лет АК встречалась в 69,5% глаз, из них в 81,3% случаев выраженность АК не превышала I стадии. У новорождённых и детей до трех лет начальные изменения роговицы были обнаружены в 64% случаев, в группе пациентов от 3 до 10 лет – в 68%, в старших подростковых группах (10 лет и старше) кератопатия встречалась в 87,5% глаз. Наименьший возраст ребенка с признаками АК составил 14 месяцев (Рисунок 3.3а).



а – I стадия АК у ребенка в возрасте 14 месяцев: видны легкие периферические помутнения роговицы (указаны стрелками); б – II стадия АК у ребенка в возрасте 12 лет: определяется периферическая неоваскуляризация, распространяющаяся в сторону оптического центра роговицы (указана стрелками); в – IV стадия АК у подростка в возрасте 17 лет с грубым стромальным помутнением центральной зоны роговицы.

Рисунок 3.3 – Фотографии глаз с АК у пациентов I возрастной группы

Изменения роговицы варьировали от расширения сосудистой сети лимба до появления поверхностных помутнений, распространяющихся на 1–1,5 мм в сторону оптического центра. У четырех пациентов в возрасте 8–16 лет без оперативных вмешательств в анамнезе было выявлено значительное прогрессирование АК до II стадии с распространением васкуляризованного паннуса к центру без вовлечения оптической зоны роговицы и снижения зрения (Рисунок 3.3б). Депривированная роль потери прозрачности роговицы в снижении остроты зрения (III–IV стадии АК) была отмечена у двух подростков в возрасте 8 и 17 лет после многочисленных хирургических операций на переднем отрезке глаза с целью компенсации ВГД (Рисунок 3.3в)

и у 3-летнего ребенка с *РАХ6*-ассоциированной аномалией Петерса и семейным случаем *РАХ6*-ВА.

Средние значения возраста пациентов I группы с 0, I, II, III–IV стадиями АК соответственно были равны 5 [3 (0,7; 6,2)]; 5,4 [4,3 (2,3; 9,2)]; 10,6 [10,2 (7,2; 14)]; 9 [9 (3; 15)] годам. В ходе анализа с помощью критерия Краскела – Уоллиса в I группе статистически значимой разницы между возрастом пациентов и выраженностью АК выявить не удалось ($p=0,14$).

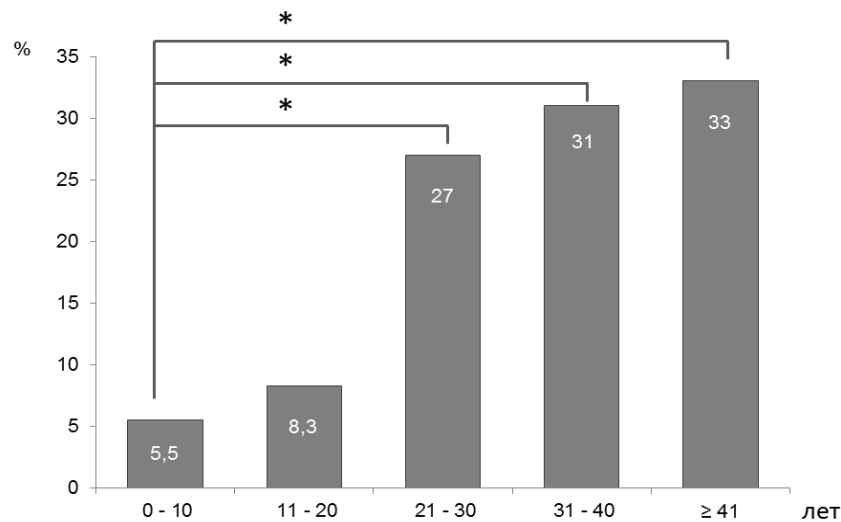
Следует отметить, что в детском возрасте АК протекала бессимптомно, пациенты не испытывали дискомфорта, ощущения инородного тела в глазу, практически отсутствовали фотофобия и жалобы на боль, эрозии роговицы не возникали, реактивный птоз не был выявлен. Многие дети хорошо переносили солнечный свет без солнцезащитных очков, что создавало картину внешнего благополучия.

II возрастная группа

У пациентов старше 18 лет АК была выявлена в 79,6% случаев, из них I–II стадии преобладали в 60,8% глаз (Рисунок 3.2). Средние значения возраста пациентов с 0, I, II, III и IV стадиями АК соответственно были равны 35,2 [31 (27; 35)]; 32,7 [31 (26; 38)]; 35,7 [35 (25; 42)]; 36 [30 (27; 43)]; 36 [34 (32; 40)] годам. В ходе анализа с помощью критерия Краскела – Уоллиса во II группе статистически значимой разницы между возрастом пациентов и выраженностью АК выявить не удалось ($p=0,89$). Потеря прозрачности центральных отделов роговицы в связи с центростремительным ростом васкуляризованного паннуса либо вследствие формирования в оптическом центре бело-серых узелков Зальцмана (АК III–IV стадии) наблюдалась в среднем в $32,4 \pm 9,8$ года. К этому возрасту прогрессирование НЛСК усугублялось проведением хирургических вмешательств, затрагивающих лимбальную зону и ускоряющих процессы декомпенсации роговицы.

С целью детализации динамики процесса прогрессирования АК и определения разницы в распространённости поздних стадий АК (III–IV) изучаемые возрастные категории были дополнительно разделены на

подгруппы с 10-летним интервалом. Сравнение нескольких групп с помощью критерия χ^2 с поправкой Бонферрони позволило выявить достоверную разницу в частоте встречаемости тяжелых стадий АК (III–IV), приводящих к снижению центрального зрения, между пациентами младшей возрастной группы (0–10 лет) и взрослыми пациентами (21 год и старше) ($p < 0,008$). Подобная разница между подгруппами пациентов II группы не была обнаружена ($p = 0,814$). (Рисунок 3.4).

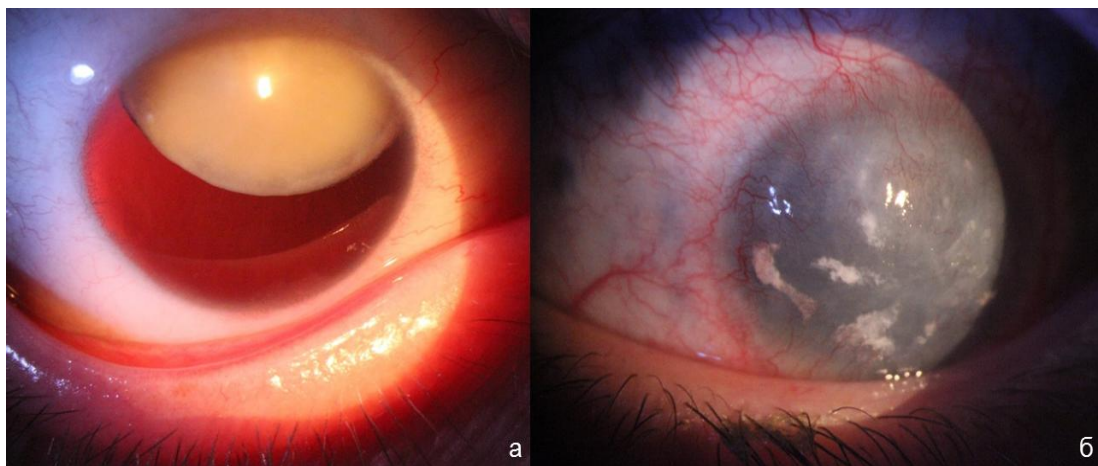


* Разница между группами статистически значима.

Рисунок 3.4 – Количество пациентов с тяжелыми стадиями АК (III–IV) в разных возрастных подгруппах

В 82% случаев АК протекала симметрично на обоих глазах у одного и того же пациента, в 11% глаз выраженность АК в парных глазах отличалась на одну стадию, в 6% – на две, в 1% случаев – на три стадии.

У четверти пациентов с асимметрией течения роговичного процесса между глазами в одну стадию хирургических вмешательств в анамнезе не было. В то же время различие в степени проявлений АК между глазами в две-три стадии в 100% случаев было обусловлено наличием в анамнезе одного или нескольких оперативных вмешательств, затрагивающих лимбальную зону роговицы (Рисунок 3.5).



а – I стадия АК; б– IV стадия АК после нескольких АГО.

Рисунок 3.5 – Фотография парных глаз одного и того же пациента с разной степенью выраженности АК

В результате обследования была выявлена большая частота АК у пациентов в обеих возрастных группах. Статистически значимая разница между возрастом пациента и выраженностью АК как в младшей, так и в старшей аниридийных группах не была обнаружена. В то же время у взрослых пациентов тяжелые стадии АК с потерей прозрачности центральных отделов роговицы встречались в 3,5 раза чаще, чем у детей до 10 лет ($p < 0,008$). В большинстве случаев АК протекала симметрично на обоих глазах, за исключением глаз с многочисленными хирургическими вмешательствами в анамнезе, чаще всего направленными на нормализацию ВГД.

3.3 Катаракта у пациентов с *PAX6*-ассоциированной врожденной аниридией

С целью изучения особенностей катарактальных проявлений у пациентов с *PAX6*-ВА были проанализированы характер помутнений хрусталика, изменение его формы и положения в различных возрастных группах.

Катарактальные изменения в хрусталике были обнаружены в 79,1% случаев, из них врожденная катаракта была диагностирована в 28,7% случаев

(25 глаз). Врожденные помутнения в хрусталике были представлены передней полярной катарактой (11 глаз), задней полярной (4 глаза), пылевидной (6 глаз), частичной атипичной катарактой (4 глаза). В 36 глазах наблюдалось развитие частичной осложнённой, в 13 случаях – полной осложненной катаракты, в 4 глазах имелась послеоперационная афакия, в 9 – артификация (Рисунок 3.6). Разница в частоте развития катаракты у пациентов I и II возрастных групп была статистически значимой ($p=0,000$).

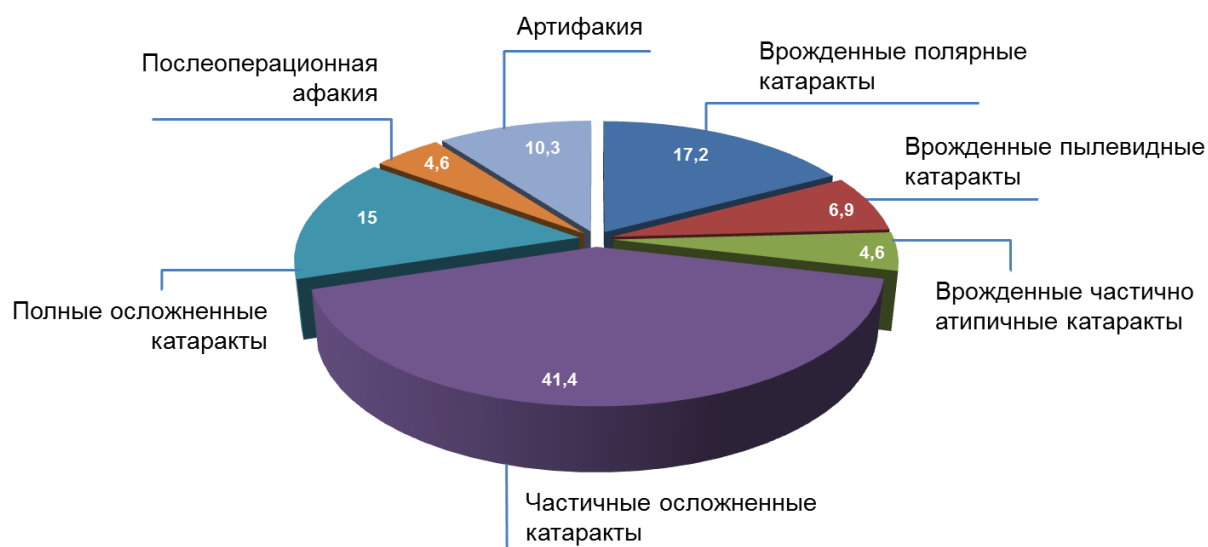
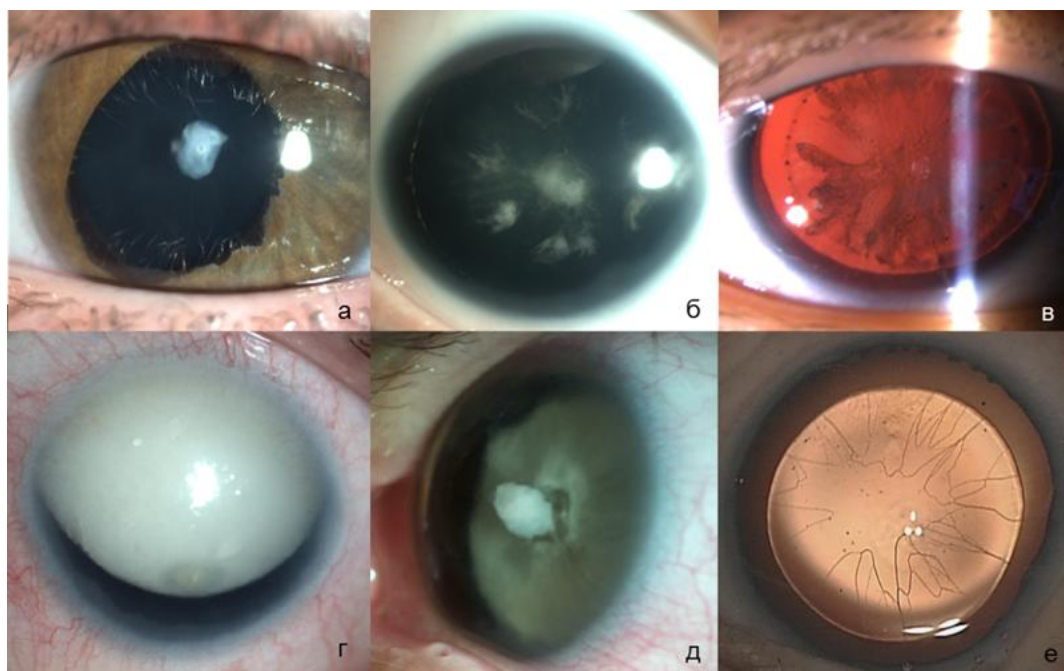


Рисунок 3.6 – Частота встречаемости различных форм катарактальных помутнений у пациентов с ВА

I возрастная группа

В I группе пациентов частота катарактальных помутнений составила 63%, из них врожденные полярные катаракты доминировали (51,7%). Минимальный возраст пациентов с помутнениями в хрусталике составил 2 месяца. Минимальный возраст ребенка с катарактальными помутнениями, приводящими к развитию обскурационной амблиопии, был равен 6 месяцам. Большую долю врожденных катаракт составили передние и задние полярные катаракты, располагающиеся вдоль оптической оси глаза. В большинстве случаев они имели небольшие размеры, практически не прогрессировали и в условиях отсутствия радужной оболочки не приводили к значительной депривации зрительных функций. Сравнение данных визометрии у детей с

прозрачными хрусталиками и полярными катарактами не выявило достоверной разницы между группами ($p=0,83$). В подростковом возрасте снижение остроты зрения происходило за счет развития осложненных катаракт, вызывающих помутнение кортикальных и задних субкапсулярных слоев хрусталика (Рисунок 3.7 а–в, е). Согласно анамнестическим данным средний возраст выполнения хирургических вмешательств по поводу катаракты в этой группе составил 14 ± 3 года (Me – 15 лет).



а – врожденная передняя полярная катаракта; б, в – частичные осложненные катаракты; г – полная осложненная катаракта; д – полная осложненная катаракта с передним лентиконусом; е – остатки tunica vasculosa lentis на передней поверхности хрусталика.

Рисунок 3.7 – Различные формы катарактальных помутнений

II возрастная группа

У взрослых пациентов помутнения хрусталика встречались в 90,6% случаев. Из них в 13% глаз врожденная катаракта осложнялась помутнениями ядерных и кортикальных слоев хрусталика. В целом катарактальные проявления варьировали от незначительных субкортикальных помутнений, аморфных ватообразных очагов между ядром и экватором хрусталика до полных осложненных катаракт (Рисунок 3.7 г, д). Пик хирургической активности по поводу экстракции катаракты в этой группе был равен 34 ± 10 лет (Me – 34 года).

Аномалии формы и положения хрусталика

Деформация и неровный край хрусталика были отмечены в 5 глазах (4,5%), фетальная васкуляризация на передней капсулярной поверхности (*tunica vasculosa lentis*) сохранилась в 6 случаях (5,5%), в 2 глазах присутствовал передний лентиконус (Рисунок 3.7 д, е). Подвывих хрусталика различной степени выраженности наблюдался в 21,8% случаев. Перерастяжение цинновых связок с легким смещением хрусталика в верхнюю половину было обнаружено в 10 глазах (9,1%), факоденез – в 7 (6,4%). Подобная степень децентрации была характерна для пациентов I возрастной группы (Рисунок 3.8).

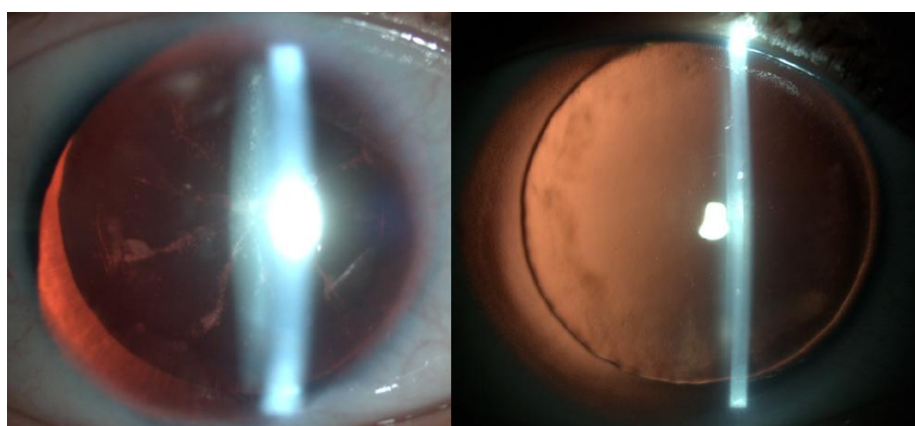


Рисунок 3.8 – Наблюдаемое у детей незначительное смещение хрусталика в верхне-внутренний квадрант

Более значимое смещение хрусталика кверху, в некоторых случаях до уровня предполагаемого зрачка, было отмечено у пациентов I и II групп в 4 (3,6%) и 11 случаях (10%) соответственно ($p=0,16$) (Рисунок 3.9).



Рисунок 3.9 – Аномалии положения хрусталика у взрослых пациентов

Минимальный возраст пациента с подобным подвывихом соответствовал 9 годам. В большинстве случаев подвывих хрусталика был двусторонним, лишь в одном глазу 11-летнего ребенка наблюдалось унилатеральное смещение хрусталика кверху после проникающей хирургии глаукомы и циклодиализа. В дальнейшем, в возрасте 22 лет, была отмечена полная дислокация хрусталика в стекловидное тело на фоне хронической декомпенсации глаукомного процесса. Еще один случай люксации хрусталика также был обнаружен в глазу с длительно существующей вторичной гипертензией без оперативных вмешательств в анамнезе. У одного пациента (2 глаза) с микросферофакией на фоне сочетания *РАХ6*-ВА и синдрома Марфана наблюдался вывих хрусталика в переднюю камеру.

В ходе работы была показана большая частота катарактальных помутнений у пациентов как I, так и II возрастных групп (63 и 90,6% соответственно). В детском возрасте преобладали дискретные помутнения хрусталика (51,7% полярных помутнений), которые не имели тенденции к прогрессированию и не приводили к снижению зрительных функций. Разница в частоте развития катаракты у пациентов I и II возрастных групп была статистически значимой ($p=0,000$), пик хирургической активности по поводу экстракции катаракты в обеих группах составил 14 ± 3 года (Me – 15 лет) и 34 ± 10 лет (Me – 34 года) соответственно. Аномалии положения хрусталика были обнаружены практически у каждого пятого пациента с *РАХ6*-ВА. С возрастом наблюдалась тенденция к увеличению числа случаев децентрации хрусталика по сравнению с педиатрическими данными (I группа – 13%; II группа – 28%, $p=0,046$). Все эпизоды значительного подвывиха хрусталика в детском возрасте были отмечены после проникающей хирургии врожденной или инфантильной глаукомы. Эктопия хрусталика в верхнюю половину является отличительной чертой *РАХ6*-ВА по сравнению с инволюционной гравитационной дислокацией, наблюдаемой у пациентов с возрастной катарактой.

3.4 Анализ морфометрических показателей хрусталика и передней камеры у пациентов с *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридией

С целью моделирования процессов, происходящих в хрусталике и переднем отрезке глаза под влиянием нефункционального или недостаточно функционального *РАХ6*, мы провели анализ темпа роста хрусталика и измерение глубины передней камеры в группе пациентов с *РАХ6*-ВА. Измерение толщины хрусталика было выполнено в 88 аниридийных глазах и 334 глазах здоровых добровольцев, составивших группу контроля. Данные ультразвуковой биометрии и распределение пациентов по возрастным группам представлены на Рисунке 3.10 и в Таблице 3.3.

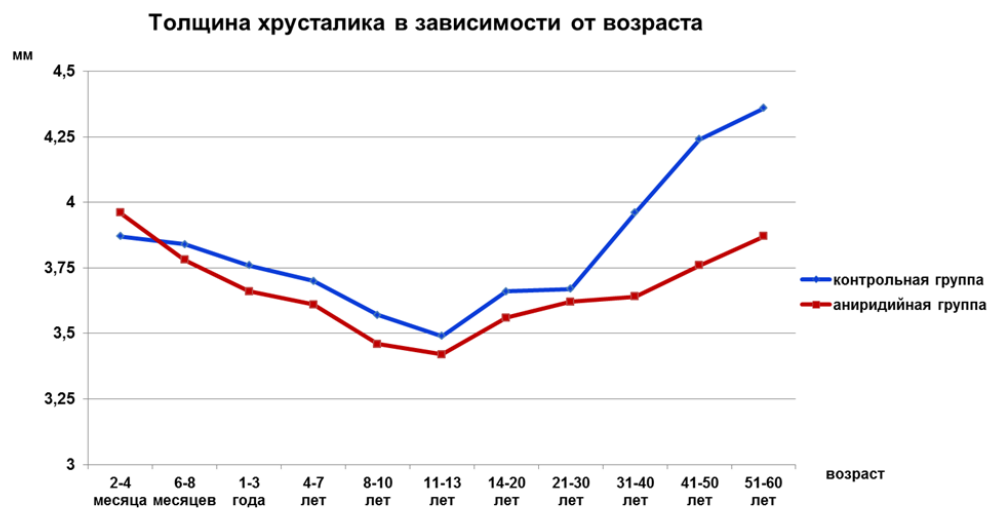


Рисунок 3.10 – График роста толщины хрусталика в зависимости от возраста

Максимальная толщина хрусталика наблюдалась у детей с *РАХ6*-ВА в возрасте 2–4 месяцев после рождения и была равна $3,96 \pm 0,05$ мм. Последующее постепенное снижение толщины хрусталика продолжалось до 11–13 лет (среднее значение $11,75 \pm 0,18$ лет) и достигло минимального значения в $3,42 \pm 0,39$ мм. С этого момента и до 60-летнего возраста происходило постепенное увеличение толщины хрусталика со средней скоростью $0,008$ мм/год в группе пациентов с *РАХ6*-ВА и $0,019$ мм/год в группе здоровых субъектов. Значимые различия в толщине хрусталика между группами была отмечены у пациентов старше 30 лет ($p < 0,05$).

Таблица 3.3 – Толщина хрусталика в разных возрастных группах

Возраст	Контрольная группа			Группа пациентов с РАХ6-ВА			p*
	Количество глаз, n	Толщина хрусталика, мм (M±σ)	Диапазон данных, мм (Min–Max)	Количество глаз, n	Толщина хрусталика, мм (M±σ)	Диапазон данных, мм (Min–Max)	
2–4 месяца	22	3,87±0,19	3,73–4,10	4	3,96±0,05	3,90–4,01	0,72
6–8 месяцев	32	3,84±0,13	3,63–4,03	7	3,78±0,4	3,50–4,46	0,84
1–3 года	35	3,76±0,2	3,41–4,11	6	3,64±0,24	3,38–4,06	0,58
4–7 лет	35	3,7±0,26	3,31–4,13	7	3,62±0,19	3,42–3,81	0,52
8–10 лет	31	3,57±0,25	3,17–3,94	9	3,47±0,16	3,21–3,63	0,33
11–13 лет	29	3,49±0,21	3,16–3,90	10	3,42±0,39	3,07–3,96	0,59
14–20 лет	31	3,66±0,31	3,25–4,26	8	3,52±0,29	3,11–3,61	0,44
21–30 лет	30	3,67±0,26	3,14–4,17	14	3,62±0,26	3,24–4,07	0,68
31–40 лет	32	3,96±0,24	3,46–4,32	10	3,66±0,35	3,12–4,41	0,027
41–50 лет	35	4,24±0,32	3,71–4,78	7	3,74±0,34	3,30–4,43	0,022
51–60 лет	32	4,36±0,34	3,72–5,07	6	3,89±0,23	3,68–4,23	0,010

* Критерий Манна – Уитни.

Результаты сравнения глубины передней камеры в обеих группах продемонстрировали уменьшение ее аксиальных размеров в глазах с *РАХ6-ВА* по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Подобная разница определялась у лиц всех возрастных категорий, кроме детей в возрасте 2–4 месяцев (Рисунок 3.11, Таблица 3.4).

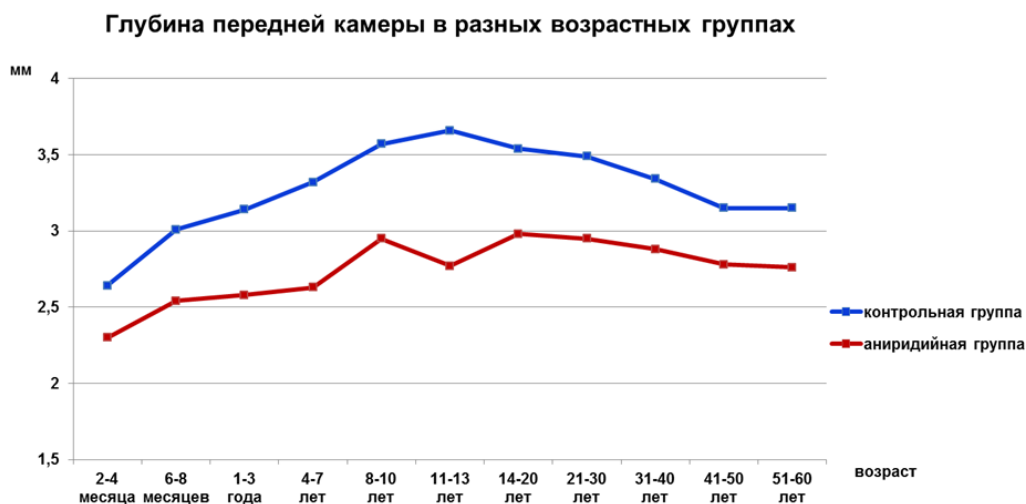


Рисунок 3.11 – Изменение глубины передней камеры в зависимости от возраста

Прямое измерение диаметра удаленного в ходе интракапсулярной экстракции хрусталика выявило значительную разницу в величине его вертикального и горизонтального размеров, которые составили 5,9 и 8,8 мм соответственно.

В ходе исследований результаты биометрии хрусталика показали сходный характер временных изменений, соответствующий группе контроля и включающий процессы ремоделирования хрусталика и его последующего роста. Несмотря на это, скорость увеличения сагиттальных размеров хрусталика у пациентов с *РАХ6-ВА* старше 30 лет значительно уступала возрастной норме ($p < 0,02$). Прямое измерение диаметра хрусталика также выявило асимметричное уменьшение его истинных размеров с признаками лизиса кортикальных слоев и abortивной редукции. Наряду с аномалиями формы, размера и положения хрусталика, дисгенез переднего отрезка глаза сочетался с уменьшением глубины передней камеры во всех возрастных группах, за исключением детей первых четырех месяцев жизни ($p < 0,05$).

Таблица 3.4 – Глубина передней камеры в разных возрастных группах

Возраст	Контрольная группа			Группа пациентов с PAX6-BA			p*
	Количество глаз, n	Глубина передней камеры, мм (M±σ)	Диапазон данных, мм (Min–Max)	Количество глаз, n	Глубина передней камеры, мм (M ± σ)	Диапазон данных, мм (Min–Max)	
2–4 месяца	22	2,64±0,48	2,22–3,17	4	2,30±0,30	2,03–2,58	0,59
6–8 месяцев	32	3,01±0,23	2,87–3,43	7	2,54±0,30	2,11–2,95	0,011
1–3 года	35	3,14±0,26	2,91–3,60	6	2,58±0,33	2,22–3,16	0,011
4–7 лет	35	3,32±0,36	2,57–3,76	7	2,65±0,04	2,58–2,67	0,045
8–10 лет	31	3,57±0,26	3,17–3,94	9	2,97±0,19	2,66–3,14	0,0033
11–13 лет	29	3,66±0,26	3,26–4,21	10	2,85±0,42	2,49–3,46	0,007
14–20 лет	31	3,54±0,35	3,02–4,18	8	3,00±0,33	2,66–3,49	0,02
21–30 лет	30	3,49±0,30	2,91–3,86	14	2,94±0,57	2,32–4,40	0,0007
31–40 лет	32	3,34±0,28	2,79–3,88	10	2,80±0,36	2,29–3,36	0,0001
41–50 лет	35	3,15±0,30	2,47–3,53	7	2,78±0,40	2,09–3,26	0,041
51–60 лет	32	3,13±0,37	3,52–3,75	6	2,79±0,42	2,42–3,40	0,046

* Критерий Манна – Уитни.

3.5 Клинико-возрастные особенности глаукомы, ассоциированной с врожденной аниридией

С целью изучения течения глаукомного процесса у пациентов с *РАХ6-ВА* были проанализированы структурные особенности УПК и сроки декомпенсации ВГД в различных возрастных группах.

Глаукома была диагностирована у 36 пациентов (32,7%), из них в возрасте до 3 лет – у трех детей (8,6%). Сроки манифестации глаукомы определялись различной степенью выраженности гониодисгенеза. Несмотря на отсутствие на момент осмотра данных за глаукому, у 92% пациентов при гониоскопии структуры УПК не дифференцировались. По всей окружности или частично УПК был прикрыт мезенхимальной тканью с/без элементов васкуляризации, глыбками пигмента, иридокорнеальными сращениями, наблюдалось высокое прикрепление корня радужки к трабекуле с прикрытием склеральной шпоры, шлеммов канал не дифференцировался (Рисунок 3.12).

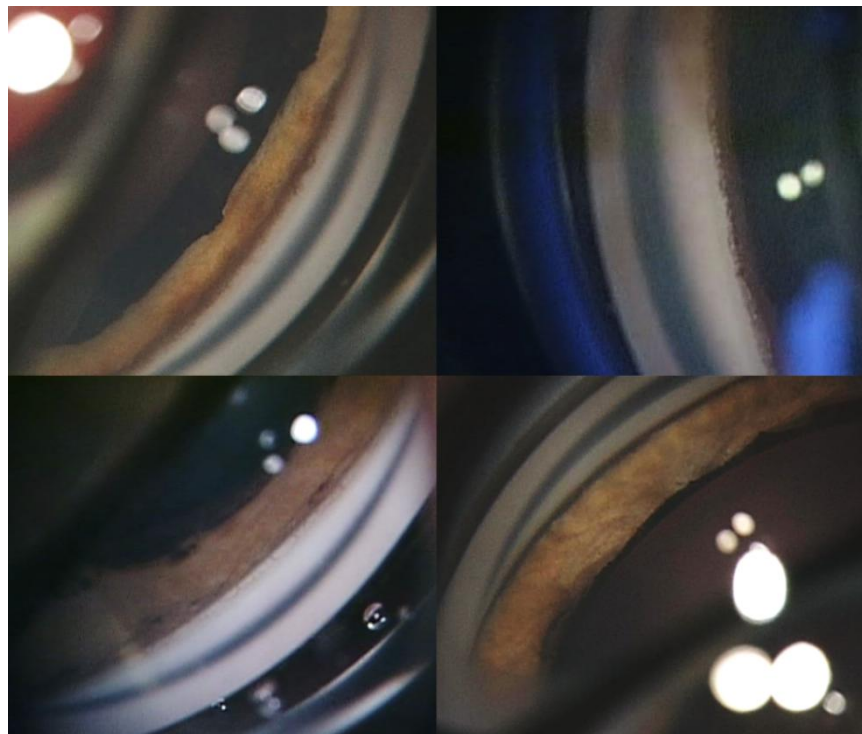


Рисунок 3.12 – Выраженность гониодисгенеза по данным гониоскопии

У двух детей (4 глаза) с гипотрофией стромального листка радужки и псевдополикорией (см. Рисунки 3.1г и 4.5а) УПК был открыт на всем

протяжении, структуры УПК хорошо просматривались, гониосинехии отсутствовали. Была выявлена умеренная корреляционная связь между степенью сохранности радужной ткани и визуализацией структур УПК при гониоскопии ($r_s=0,311$, $p=0,01$). Зависимость между объемом сохранной радужной оболочки и развитием глаукомы была слабо выраженной ($r_s=-0,26$, $p<0,05$).

I возрастная группа

В детском возрасте диагноз глаукома был выставлен 15 пациентам, в 80% случаев патология была билатеральной. Средний возраст постановки диагноза составил $6,5\pm 4,5$ года (Me – 5 лет). В большинстве случаев (93,3%) моменту постановки диагноза не предшествовало никаких хирургических вмешательств. Лишь в двух глазах одного пациента было выполнено удаление эктопированных в переднюю камеру хрусталиков на фоне существующего синдрома Марфана. Снижение зрительных функций до слепоты по критериям ВОЗ было выявлено у 13,3% глаукомных пациентов.

II возрастная группа

Вторичная глаукома была выявлена у 21 взрослого пациента. Средний возраст постановки диагноза был равен $32,4\pm 8$ лет (Me – 30 лет). В 47,6% случаев (10 глаз) повышение ВГД было отмечено в интактных глазах с отсутствием в анамнезе данных о каких-либо интраокулярных вмешательствах, из них у 60% пациентов глаукомный процесс был билатеральным. В остальных случаях были выполнены операции по поводу экстракции катаракты, интраокулярной коррекции афакии и восстановления прозрачности роговицы. Статистически достоверной разницы между временем дебюта глаукомы в интактных и уже прооперированных глазах выявлено не было ($p_{M-U}=0,82$).

Слепота, возникшая на фоне длительно существующего глаукомного процесса, была диагностирована у 38% пациентов со средним стажем заболевания $7,5\pm 6,8$ лет (от 1 до 23 лет, Me – 4 года), что достоверно не отличается от частоты низких зрительных функций в I группе пациентов ($p=0,14$).

У трех пациентов (6 глаз) с дебютом глаукомного процесса в возрасте $22,8 \pm 8,7$ лет (Me – 35 лет) биомикроскопический осмотр выявил наличие интеркалярных стафилом разной степени выраженности. Стафиломы склеры в виде одного или нескольких возвышений темно-синего цвета между роговицей и областью проекции переднего края ресничного тела локализовались в верхней половине лимба (Рисунок 3.13).

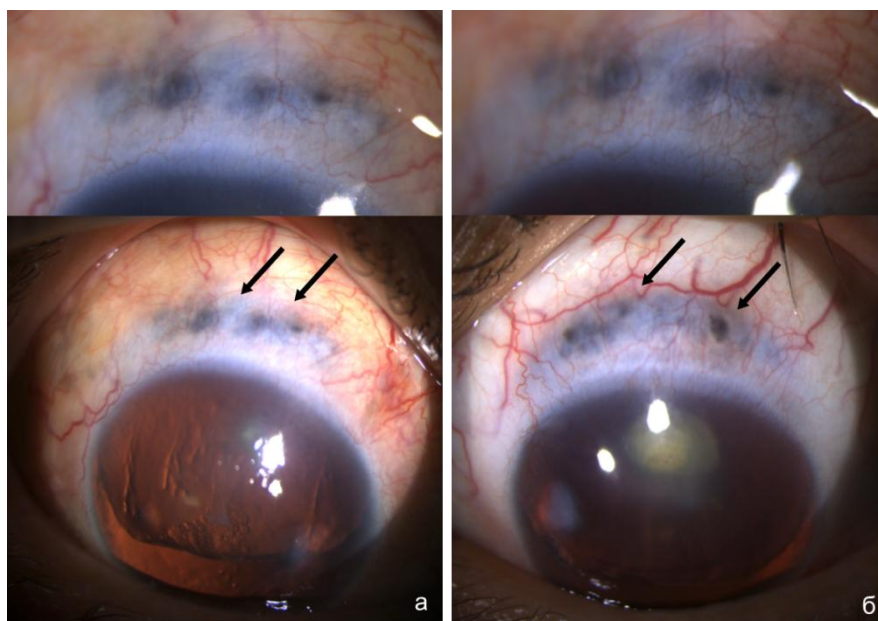


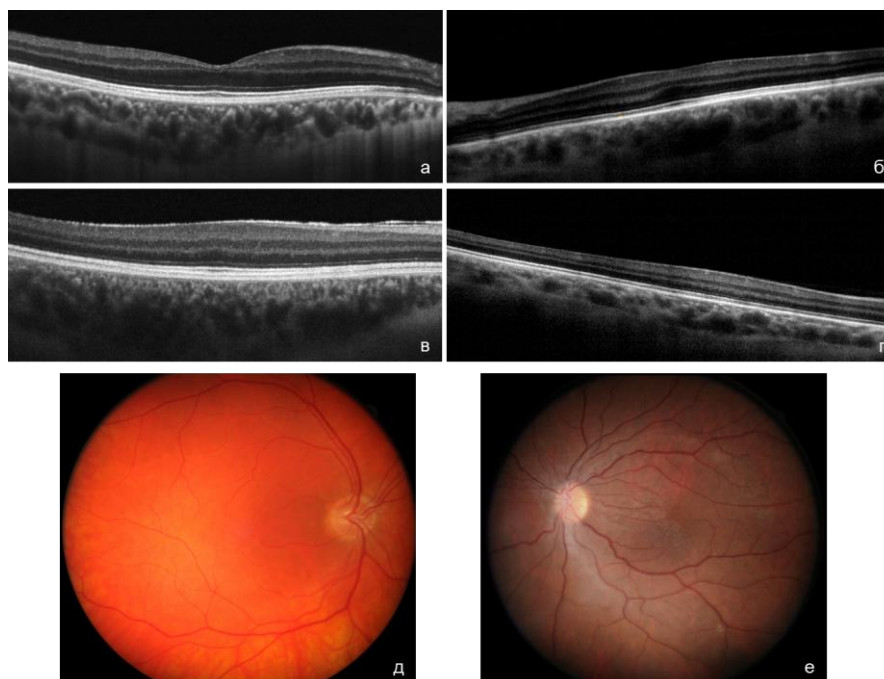
Рисунок 3.13 – Интеркалярная стафилома

У всех пациентов в анамнезе отсутствовали какие-либо хирургические вмешательства, способные спровоцировать возникновение эктазии в месте формирования слабой рубцовой ткани. На момент первичного осмотра в пяти глазах наблюдался высокий уровень ВГД в течение длительного периода времени, перерастяжение цинновых связок с дислокацией хрусталика кверху (сублюксация II–III степени) и удлинение передне-задней оси глаза до средних значений $25,3 \pm 2,6$ мм (Me – 24,8 мм).

3.6 Анализ особенностей глазного дна

Визуальный осмотр глазного дна был возможен в 88% глаз, в остальных случаях наличие выраженной АК, помутнений хрусталика и нистагма затрудняло проведение офтальмоскопии. Помимо вышеназванных причин

выполнение ОКТ макулярной области было ограничено поведением и малым возрастом обследуемых пациентов. Анализ полученных по данным ОКТ изображений был проведен в 77,3% глаз (Рисунок 3.14).



а, б, в, г – снимки ОКТ, соответствующие 1–4-й степеням гипоплазии фовеа (по классификации М. Thomas); д, е – фото глазного дна пациентов с *PAX6*-ВА и гипоплазией фовеа, отсутствие аваскулярной зоны и фовеального рефлекса.

Рисунок 3.14 – Результаты обследования глазного дна

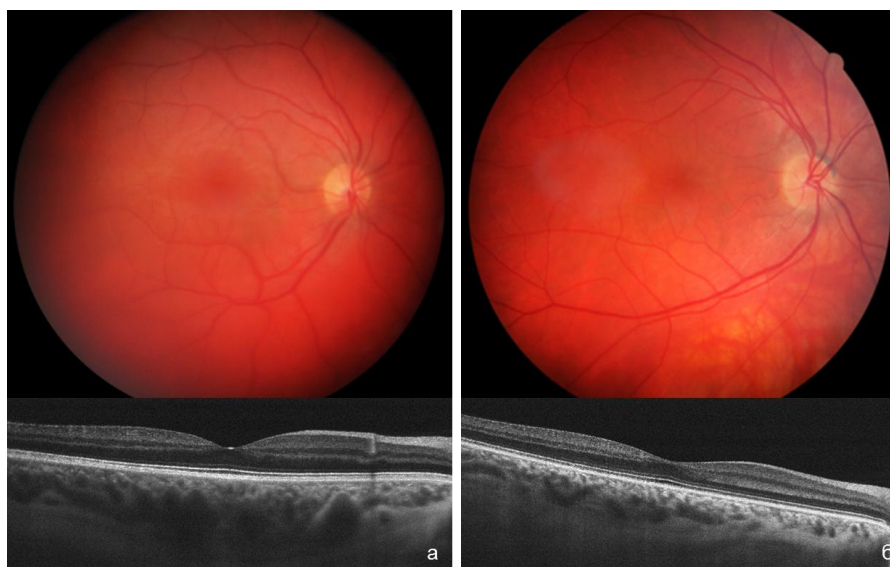
Офтальмоскопические признаки фовеальной гипоплазии в виде отсутствия фовеальной депрессии, пересечения центральной зоны ретинальными сосудами, неравномерности пигментации макулярной области были диагностированы в 89,7% глаз. По данным ОКТ 4-я степень гипоплазии фовеа была выявлена в 78,7% глаз (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Максимальная корригированная острота зрения (МКОЗ) у пациентов с разной степенью гипоплазии фовеа по данным ОКТ

Степень гипоплазии	Количество глаз, n (%)	МКОЗ, М±σ (Min–Max)
Норма	4 (5,3)	0,46±0,16 (0,2–0,8)
1-я	5 (6,7)	0,325±0,16 (0,1–0,55)
2-я	3 (4)	0,3±0,11 (0,2–0,4)
3-я	4 (5,3)	0,18±0,06 (0,15–0,2)
4-я	59 (78,7)	0,08±0,06 (0,005–0,32)

В ходе анализа данных визометрии в глазах без длительного глаукомного стажа и влияния тяжелых стадий АК на снижение зрительных функций была обнаружена отрицательная корреляционная связь между степенью структурной сохранности макулярной зоны и остротой зрения ($r_s = -0,47$, $p < 0,05$).

В 5,3% случаев по данным ОКТ наблюдалось наличие сформированной фовеолярной ямки с сохранением всех структур ретинального интерфейса (Рисунок 3.15). Именно для этой группы пациентов была характерна максимальная острота зрения ($0,46 \pm 0,16$).



а, б – фото глазного дна и данные ОКТ макулярной зоны двух пациентов с нормально сформированным фовеальным интерфейсом.

Рисунок 3.15 – Результаты осмотра глазного дна пациентов с делецией 3'-*cis*-регуляторного региона гена *PAX6*

Помимо гипоплазии фовеа при офтальмоскопии были выявлены эпиретинальная мембрана, легкий эпиретинальный фиброз в глазах, перенесших катарактальную хирургию, обеднение сосудистого рисунка в миопических глазах, периферическая хориоретинальная дистрофия, потребовавшая ограничительной лазерной коагуляции в каждом четвертом случае (25%), периферические друзы и белесоватые ретинальные включения, один случай локальной тракционной отслойки сетчатки на фоне посттромботической ретинопатии. В одном интактном глазу без истории предшествующих оперативных вмешательств была диагностирована

тотальная отслойка сетчатки. Данная регматогенная патология была прооперирована при помощи эписклерального пломбирования и временной тампонады силиконовым маслом с достижением полного прилегания сетчатки. В 22 глазах было отмечено нарушение распределения пигмента в центральном (9%) и периферических (11%) отделах сетчатки (Таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Сопутствующая патология глазного дна

Сопутствующая патология	Количество случаев, n
Эпиретинальная мембрана	1
Эпиретинальный фиброз	4
Миопическая центральная хориоретинальная дистрофия	4
Перераспределение макулярного пигмента, «крапчатость»	10
Периферическая хориоретинальная дистрофия	17
Депигментация периферических отделов сетчатки	12
Периферические друзы	2
Посттромботическая ретинопатия	1
Регматогенная отслойка сетчатки	1

Изменения, обнаруженные в ДЗН, носили различный характер. Гипоплазия ДЗН была диагностирована в 14 глазах (17,3%), патологические глаукомные изменения ДЗН были выявлены в 28,4% случаев. Признаки частичной или полной атрофии зрительного нерва по данным офтальмоскопии, результатам электрофизиологических исследований (лабильность зрительного нерва, регистрация вызванных зрительных потенциалов), анамнеза (церебральная ишемия, внутриутробная гипоксия, гипертензионно-гидроцефальный синдром у плода, сосудистая патология ДЗН, отслойка сетчатки) были обнаружены в 11,1% глаз.

В ходе работы было показано, что центральные и периферические изменения глазного дна на фоне РАХ6-ВА носили как врожденный, так и приобретенный характер. В 78,7% глаз по данным ОКТ была выявлена 4-я степень гипоплазии фовеа, во многом определяющая низкие зрительные функции пациентов. Гипоплазия ДЗН встречалась в 17,3% случаев,

дополнительно состояние зрительных проводящих путей могло отягощаться неблагоприятным течением перинатального периода и декомпенсацией ВГД.

3.7 Анализ данных визометрии и рефрактометрии

Анализ данных визометрии у детей младше трех лет (14 человек) не проводился. Основные показатели остроты зрения в 93,7 и 76,1% случаев у пациентов I и II возрастных групп соответственно на момент первоначального обращения распределились между значениями от 0,005 до 0,3 (Рисунок 3.16). У детей и подростков доля глаз с остротой зрения 0,1–0,3 в 1,5 раза превышала таковую у взрослых пациентов. Факты уменьшения количества глаз с относительно высокой остротой зрения, появления пациентов с неправильным светоощущением и отсутствием зрения во II группе были связаны со снижением зрительных функций у аниридийных пациентов на фоне декомпенсации глаукомного процесса, помутнения роговицы и осложнений хирургических вмешательств. Причиной снижения зрения до правильной светопроекции в 75% случаев стало наличие полной осложненной катаракты.

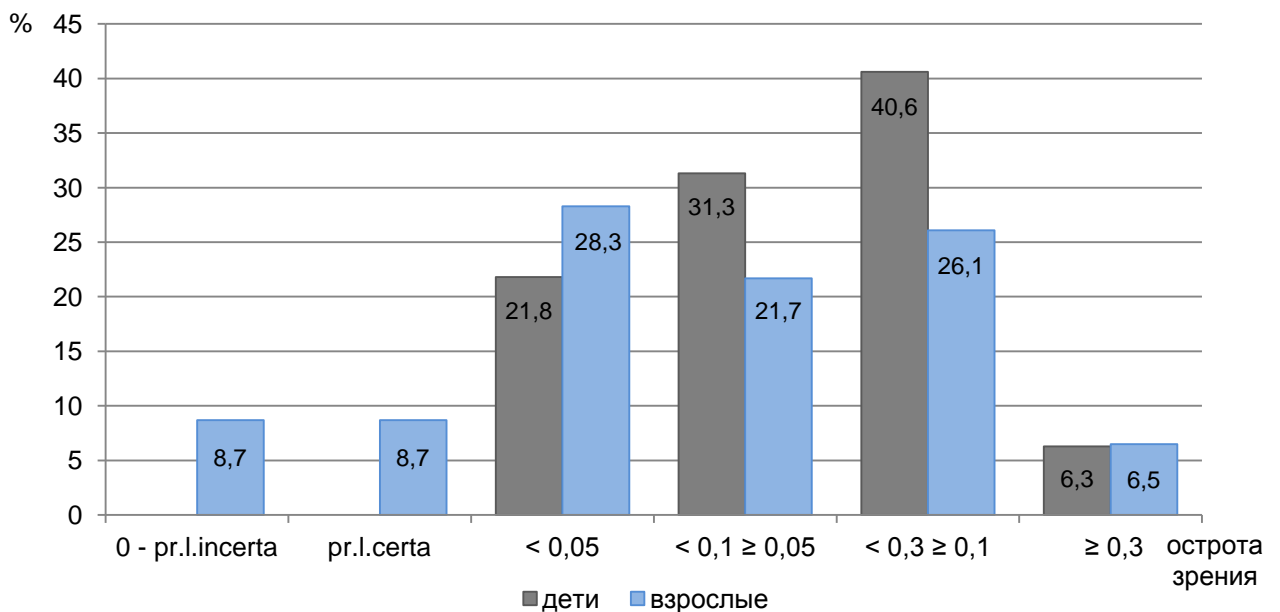


Рисунок 3.16 – Данные МКОЗ

Средние значения МКОЗ после устранения катарактальных помутнений у пациентов I и II возрастных групп были соответственно равны $0,13 \pm 0,11$ (Me – 0,1) и $0,099 \pm 0,1$ (Me – 0,05) ($p=0,062$). Количество пациентов с выраженным снижением зрительных функций ($<0,1$) в обеих группах было также сопоставимым (33 и 53%, χ^2 с поправкой Йетса $p=0,11$). В то же время различия в количестве пациентов с остротой зрения, соответствующей слепоте по критериям ВОЗ, были значимыми и составили 13% среди педиатрических пациентов и 37,5% у субъектов старшего возраста (χ^2 с поправкой Йетса $p=0,026$).

Степень аметропии удалось определить в 71% глаз, в остальных случаях рефрактокератометрия была невозможна в связи с непрозрачностью оптических сред на фоне выраженной АК и помутнений хрусталика. У большинства обследованных пациентов (96,2%) были обнаружены отклонения рефракции от эмметропии и возрастной нормы (Рисунок 3.17).

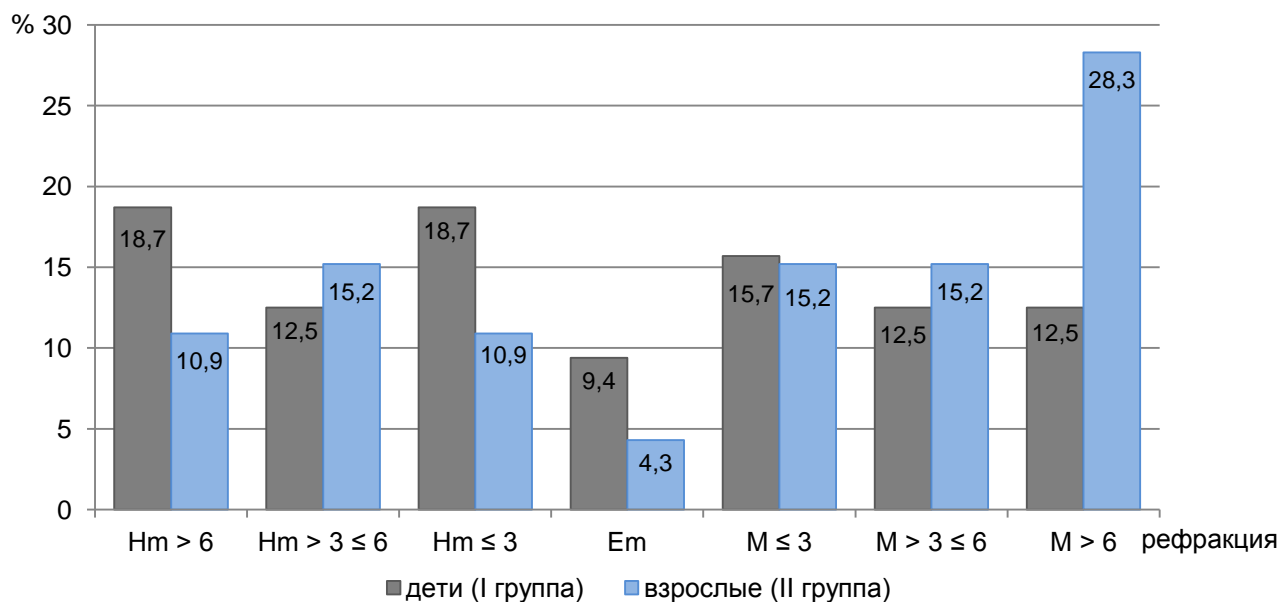


Рисунок 3.17 – Данные рефрактометрии: Hm – гиперметропия, M – миопия, Em – эмметропия

В 86% случаев аномалии рефракции сочетались с астигматизмом. В среднем величина астигматизма у пациентов с 0–II стадией АК составила $-1,25 \pm 1,61$ дптр (Me – [-1,5] дптр, от -4,0 до 4,25 дптр). Средние значения астигматизма у пациентов I и II возрастных групп значимо не отличались друг от друга (-1,44 дптр и -1,06 соответственно, $p=0,07$). У взрослых пациентов

незначительно преобладали случаи миопической рефракции (58,7%), из них близорукость высокой степени была отмечена в 48% глаз. Среднее значение сферозэквивалента в этой подгруппе было равным $-8,02 \pm 1,42$ дптр (Me – [-8,0] дптр). Генез миопии высокой степени был ассоциирован с удлинением передне-задней оси глаза, усилением рефракции на фоне прогрессирования катарактальных помутнений, а также со случаями врожденной аметропии с экстремальными значениями рефракции до -23,0 дптр.

Исследование показало, что острота зрения у пациентов младшей и старшей возрастных групп находилась в диапазоне от 0,005 до 0,3 в 93,7 и 76,1% случаев соответственно. Низкие зрительные функции были следствием нескольких причин, включающих недоразвитие центральной ямки сетчатки, уменьшение времени фовеальной фиксации на фоне нистагма, наличие светорассеяния и аномалии рефракции (96,2%). В дальнейшем исходные низкие зрительные функции усугублялись за счет прогрессирования сопутствующих заболеваний роговицы, хрусталика, глаукомных изменений зрительного нерва и осложнений хирургических вмешательств. Все это достоверно увеличивало количество пациентов старшей возрастной группы с МКОЗ менее 0,05 на лучше видящем глазу по сравнению с молодыми субъектами ($p=0,026$). Анализ рефракционных данных выявил значительные рефракционные нарушения (96,2% пациентов) и отсутствие сферичности роговицы в 86% случаев, что следует учитывать при подборе очковой коррекции аметропии у данной категории пациентов.

3.8 Анализ экстраокулярной патологии

Нарушение функции глазодвигательных мышц было выявлено у 49,1% пациентов (18 человек – альтернирующее сходящееся косоглазие, 20 – альтернирующее расходящееся косоглазие, 6 и 9 пациентов – монолатеральное расходящееся и сходящееся косоглазие соответственно, в одном случае диагностировано паралитическое сходящееся косоглазие)

(Рисунок 3.18а). На фоне косоглазия и некорригированной аметропии стереопсис отсутствовал в 98,2% случаев, у 91% обследованных пациентов был отмечен монокулярный характер зрения, у 6,4% – одновременное восприятие объекта.



а – фото глаз с различными видами косоглазия; б – фото глаз с различной степенью выраженности птоза.

Рисунок 3.18 – Экстраокулярная патология на фоне *РАХ6-ВА*

Птоз был выявлен в 25 глазах (22,7%) (Рисунок 3.18б), разница в частоте птоза у пациентов I (13%) и II (29,7%) возрастных групп была статистически значимой ($p=0,032$). У пациентов старшего возраста было отмечено развитие реактивного птоза, который носил компенсаторный характер в ответ на прогрессирование АК (III–V стадии АК). Степень тяжести птоза представлена в Таблице 3.7. Была выявлена корреляционная связь умеренной силы между возрастом пациента и выраженностью опущения верхнего века ($r_s=0,4$ $p<0,05$).

Таблица 3.7 – Выраженность птоза

Выраженность птоза	Частота встречаемости, %
Малая степень (1–2 мм)	36
Средняя степень (3–4 мм)	40
Тяжелая степень (5–7 мм)	24

3.9 Разработка балльной системы оценки тяжести глазных проявлений РАХ6-ассоциированной врожденной аниридии

Для определения степени тяжести глазного фенотипа впервые была разработана балльная система оценки клинических проявлений РАХ6-ВА (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Балльная система оценки глазного статуса

Клинический признак	Критерий	Баллы
Острота зрения на худшем глазу	$\geq 0,3$	1
	$< 0,3 \geq 0,1$	2
	$< 0,1$	3
	LP-0	4
Стадия АК на худшем глазу	0 стадия	0
	I стадия	1
	II стадия	2
	III стадия у взрослых пациентов, II стадия у пациентов моложе 16 лет	3
	IV стадия	4
Гипоплазия фовеа по данным ОКТ	0-я степень	0
	1-я степень	1
	2-я степень	1
	3-я степень	2
	4-я степень	2
Подвывих хрусталика	нет	0
	перерастянутасть связок	1
	выраженный подвывих	2
Нистагм	нет есть	0 1
Катаракта		
Глаукома		
Птоз		
Микрофтальм		
Микрокорнеа		
Стафилома склеры		
Периферическая дистрофия сетчатки		
Осложнения хирургических вмешательств: - отслойка сетчатки - аниридийный фиброзный синдром (АФС), субатрофия глазного яблока - выраженное прогрессирование АК (эрозии, язвы, рост периферического паннуса и пр.)	нет	0
	есть	1

Фенотип каждого пациента был оценен с учетом выраженности анатомических изменений глаза, особенностей течения заболевания, сведений об осложнениях хирургических вмешательств, а также степени нарушения зрения (Таблица 3.8, 3.9).

Таблица 3.9 – Распределение фенотипов по степени тяжести глазного статуса

Степень тяжести фенотипа	Количество баллов
Легкая	1–3
Средняя	4–7
Тяжелая	8–9
Очень тяжелая	более 10

Согласно коэффициенту ранговой корреляции Спирмена была обнаружена корреляционная связь между степенью тяжести глазного фенотипа *PAX6*-ВА и стадией АК ($r_s=0,836$, $p<0,05$), глаукомой ($r_s=0,413$, $p<0,05$), гипоплазией макулы ($r_s=0,478$, $p<0,05$).

В ходе проведенного анализа клинико-функциональных результатов обследования пациентов с *PAX6*-ВА было показано, что плеiotропность действия гена *PAX6* вызывает комплексное поражение окулярных структур, включая развитие АК (75,5%), нистагм (85,5%), катаракту (79,1%), глаукому (31,8%), полную аниридию (74,5%), гипоплазию фовеа (89,7%) и ДЗН (17,3%), подвывих хрусталика (21,8%), рефракционные нарушения (96,2%), косоглазие (49,1%), птоз (22,7%), микрофтальм (10,3%) и микрокорнеа (3,7%). Прогрессирующий характер течения клинических проявлений приводит к статистически значимому увеличению частоты тяжелых стадий АК ($p=0,008$), катаракты ($p=0,000$), птоза ($p=0,032$), подвывиха хрусталика ($p=0,046$) и слепоты ($p=0,026$) у пациентов старшей возрастной группы. Помимо действия временного фактора была отмечена роль оперативных вмешательств в зоне лимба, вызывающих прогрессирование АК и асимметричное течение роговичного процесса по сравнению с хирургически интактным парным глазом. На общую тяжесть глазного фенотипа оказывают влияние

выраженность стадии АК ($r_s=0,836$, $p<0,05$), наличие глаукомы ($r_s=0,413$, $p<0,05$) и гипоплазии макулы ($r_s=0,478$, $p<0,05$).

Изучение морфометрических особенностей переднего отрезка глаза показало отставание темпов роста хрусталика (0,008 мм/год) по сравнению с группой контроля (0,019 мм/год) и достоверное уменьшение его толщины у пациентов старше 30 лет в сравнении с возрастной нормой ($p<0,05$). Аномалии развития переднего отрезка глаза дополнялись уменьшением глубины передней камеры глаза и дисгенезом структур УПК, наблюдаемым у 92% пациентов и отрицательно коррелирующим со степенью сохранности радужной ткани ($r_s=0,311$, $p=0,01$). Учитывая данный факт, обнаружение полной аниридии может быть рассмотрено в качестве неблагоприятного прогностического признака незрелости дренажной системы глаза у пациентов с *РАХ6-ВА*.

Таким образом, существующие особенности офтальмологического статуса, формирующего *РАХ6*-ассоциированный аниридийный фенотип, а также динамический характер временных изменений обуславливают необходимость своевременного обнаружения прогрессирующих проявлений *РАХ6-ВА* и реализации комплексного подхода к диагностическому обследованию пациентов с данной офтальмопатологией.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ РОГОВИЦЫ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ АНИРИДИЙНОЙ КЕРАТОПАТИИ

С целью понимания морфологических изменений, происходящих в центральных и периферических отделах роговицы на разных стадиях АК, 36 пациентам (68 глаз) с РАХ6-ВА были выполнены ЛСКМ и ОКТ переднего отрезка. На основании данных ЛСКМ была проведена оценка состояния ЛПФ как клинических маркеров присутствия ЛСК и анализ возможности визуализации лимбальных прогениторных структур с помощью альтернативного способа диагностического обследования – ОКТ. Была оценена прогностическая роль лимбальных прогениторных структур в сохранении прозрачности роговицы после хирургических вмешательств в позднем послеоперационном периоде.

4.1 Клинико-морфологические проявления аниридийной кератопатии по данным лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и оптической когерентной томографии

Результаты ЛСКМ и ОКТ зоны лимба у пациентов с РАХ6-ВА изучались в ассоциации с демографическими характеристиками и стадией АК (Приложение Б). В связи с выраженностью нистагма и отсутствием фиксации взора выполнение конфокальной микроскопии было невозможно в пяти глазах, анализ изображений лимбальной зоны, полученных методом ОКТ, в связи с большим количеством артефактов был затруднен в девяти глазах, протокол Pachymetry+SRwt был выполнен всем пациентам.

Роговичный статус оценивался по характеру эпителиальных изменений (преобладанию эпителия роговичного, конъюнктивального или смешанного типов), наличию патологической неоваскуляризации, появлению зрелых

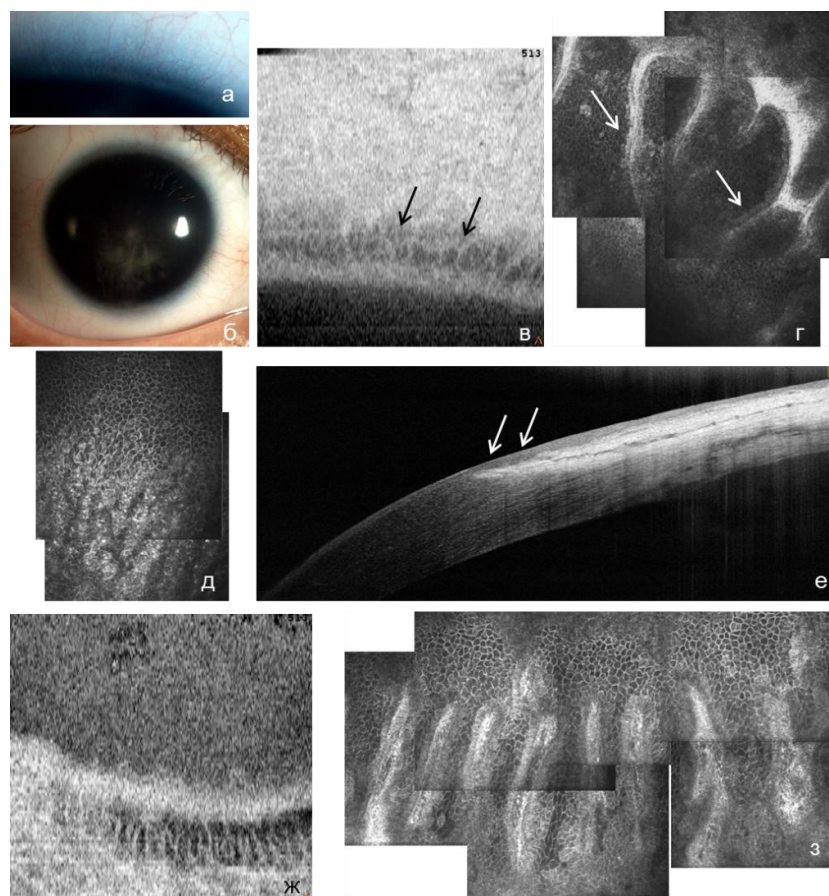
дендритных, бокаловидных и/или воспалительных клеток в центральных и парацентральных отделах роговицы.

Результаты ЛСКМ пациентов с 0 стадией АК показали обнаружение ЛПФ хотя бы в одной из зон сканирования, сохранение роговичного эпителиального фенотипа с максимальным приближением результатов ЛСКМ к морфологическим характеристикам здоровой роговицы. Центральная зона роговицы в I стадии АК была представлена роговичным и смешанным типами эпителизации, II стадия ассоциировалась преимущественно со смешанным фенотипом, в III и IV стадиях доминировал эпителий конъюнктивального типа с фиброваскулярными изменениями. С нарастанием тяжести АК наблюдалась постепенная фенотипическая трансформация нормальной эпителиальной системы в патологическую, включая изменение типа эпителизации роговицы, увеличение инвазии воспалительных клеток ($p=0,03$, критерий χ^2) и патологической неоваскуляризации ($p=0,006$, критерий χ^2). Разница в количестве бокаловидных клеток на разных стадиях АК была статистически незначимой ($p=0,1$, критерий χ^2). Начиная с I стадии АК было отмечено значительное увеличение зрелых (антиген-презентирующих) дендритных клеток в центральной зоне роговицы с последующим снижением их количества по мере прогрессирования АК ($p=0,005$, критерий χ^2).

0 стадия АК с отсутствием клинических признаков НЛСК по данным биомикроскопии была обнаружена у семи пациентов. У всех пациентов в нижней гемисфере были обнаружены лимбальные прогениторные структуры, у двух из них (1А, 3) ЛПФ имели усеченный деформированный вид (Приложение Б).

Так, у одного из сибсов (1Б) с семейным анамнезом ВА были идентифицированы неизмененные ЛПФ как в верхнем, так и в нижнем лимбе. Морфология прогениторных структур была полностью сохранена и соответствовала картине ЛСКМ здоровых пациентов. Структура лимбальных крипт в верхней гемисфере роговицы носила сетчатый характер, хорошо визуализировалась зона темных «ручейков» (чередование гипер- и гипорефлективных участков базального эпителия, свидетельствующих о центростремительной миграции лимбальных эпителиальных клеток). По данным обследования Cornea Cross Line просматривалась зона

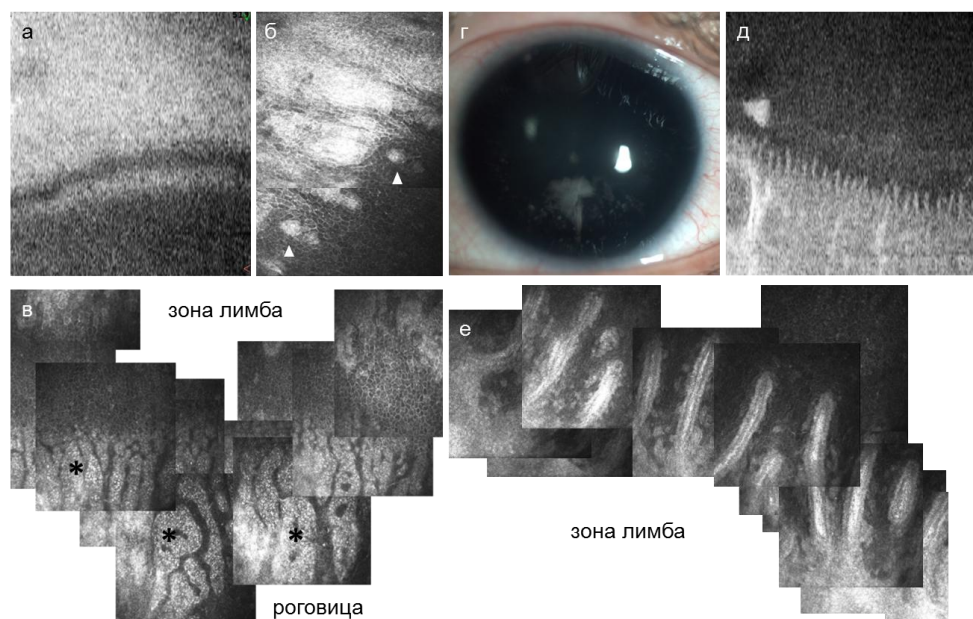
корнеосклерального перехода с постепенной сменой оптически прозрачного эпителия роговицы оптически более плотным конъюнктивальным эпителием. ЛПФ в нижней половине роговицы располагались в виде классического частокола, лимбальные крипты были окружены гиперрефлективным ореолом из лимбальных базальных клеток. Данные ОКТ лимбальных зон в режиме En Face соответствовали результатам обследования роговицы методом ЛСКМ и хорошо визуализировали структуру ЛПФ (Рисунок 4.1).



а – фотография лимба без признаков периферического помутнения роговицы;
 б – фотография глаза: прозрачная по всей окружности роговица; в – снимок ОКТ верхнего лимба в режиме En Face: видна сетчатая структура ЛПФ (указана стрелками); г – снимок ЛСКМ идентичного участка лимбальной зоны, стрелками указаны ЛПФ, окруженные светлым ореолом из базальных лимбальных клеток; д – характерная картина зоны «ручейков», или «треснувшей земли» (описание в тексте); е – снимок ОКТ верхнего лимба, выполненный по протоколу Cornea Cross Line: видна зона корнеосклерального перехода, стрелками указана зона локализации лимбального эпителия; ж – снимок ОКТ нижнего лимба: просматриваются параллельно расположенные гиперрефлективные линии;
 з – изображение ЛСКМ идентичного участка нижнего лимба: видны сохранные ЛПФ, в межпалисадном пространстве хорошо визуализируется базальный лимбальный эпителий.

Рисунок 4.1 – Данные обследования пациента 1Б, 26 лет, с 0 стадией АК

Анализ данных второго сибса (1В) выявил значительно измененные структуры ЛПФ в верхнем лимбе. Лимбальные крипты плохо дифференцировались, просматривались утолщенные гиперрефлективные палисадоподобные образования с нечеткими контурами и единичные ФСП. Клетки базального эпителия с характерной мозаичностью, темной цитоплазмой и четкими светлыми границами визуализировались хорошо, была видна так называемая зона «треснувшей земли», или зона «ручейков», описанная ранее у здоровых пациентов [3; 157]. По данным ОКТ роговицы в этой зоне не удалось достоверно визуализировать лимбальные структуры. В то же время обследование нижнего лимба выявило сохранные ЛПФ и высокую степень соответствия результатов, полученных двумя диагностическими методами (Рисунок 4.2).



а – на снимках ОКТ верхнего лимба ЛПФ не визуализируются; б – на снимках ЛСКМ видны измененные укороченные гиперрефлективные палисадоподобные структуры, ФСП обозначены треугольными стрелками; в – хорошо выражена широкая зона светлых гиперрефлективных полос, прерывающих мозаичную картину базального эпителия (обозначена звездочками); г – на фотографии глаза визуализируется прозрачная роговица без признаков АК; д – на снимках ОКТ нижнего лимба в режиме En Face видны ЛПФ в виде параллельно расположенного частокола; е – на снимках ЛСКМ идентичного участка схожая структура ЛПФ коррелирует с данными ОКТ.

Рисунок 4.2 – Данные обследования пациента 1В, 30 лет, с 0 стадией АК

У всех пациентов с 0 стадией АК не было нистагма, что позволяло хорошо визуализировать структуры лимбальной зоны методом ЛСКМ, топографически точно обследовать центральную зону роговицы, избегать артефактов и дополнительных шумов при получении изображения по данным ОКТ. Во всех случаях в лимбальной и центральной зонах хорошо дифференцировался эпителий роговичного типа без признаков конъюнктивальной инвазии и лейкоцитарного присутствия; также хорошо визуализировалась зона волнистых «дорожек» в виде гипер- и гипорефлективных участков базального эпителия, берущих начало у апикального конца ЛПФ и распространяющихся в сторону центра роговицы. В одном случае у пациента (3) с картиной частично деформированных ЛПФ в периферических отделах роговицы наблюдалось большое количество активированных дендритных клеток. В центральной зоне роговицы антиген-презентирующие клетки были преимущественно представлены небольшим количеством незрелых клеток Лангерганса и единичными активированными дендроцитами (Рисунок 4.3).

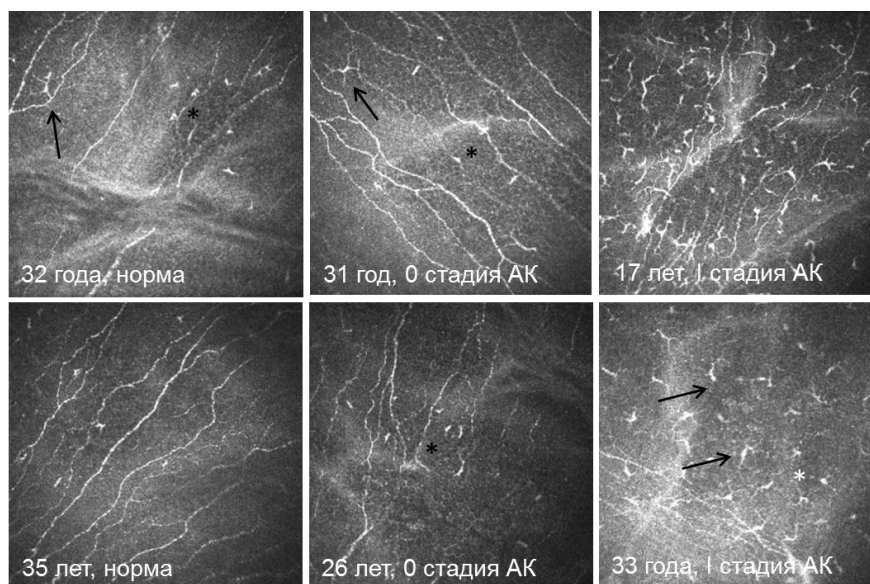


Рисунок 4.3 – Иммунологический статус центральной зоны роговицы в норме и у пациентов с разными стадиями АК (незрелые клетки Лангерганса указаны звездочкой, активированные дендритные клетки – стрелкой)

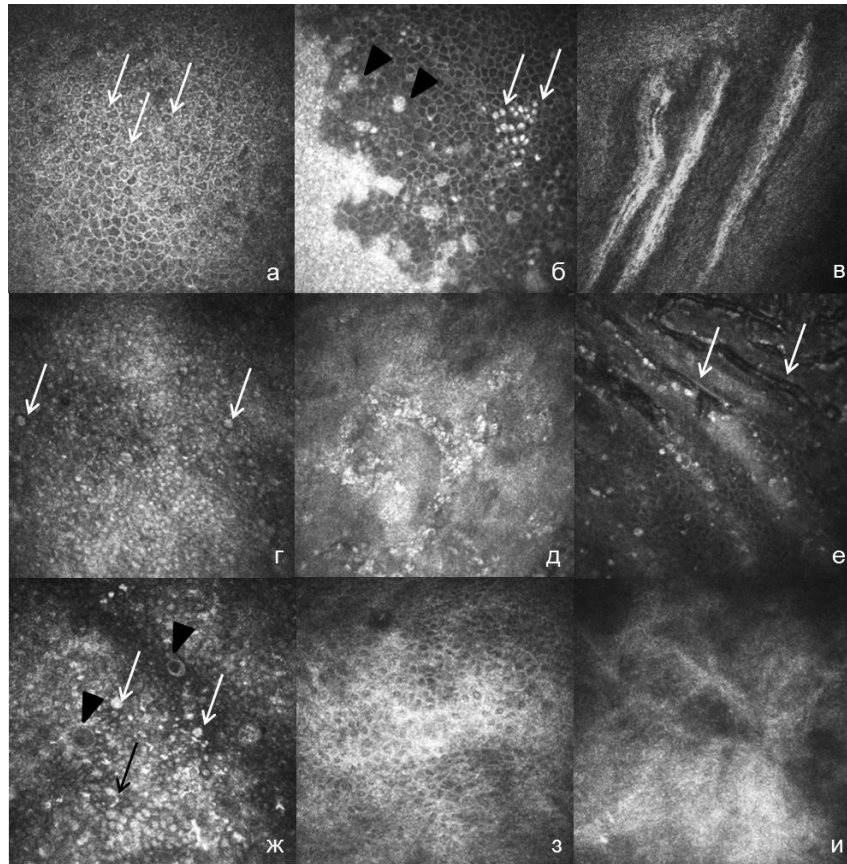
Анализ подтипов дендритных клеток в суббазальном слое нервных волокон центральной зоны роговицы выявил преобладание фенотипически

незрелой популяции над зрелыми активированными клетками. Сравнение иммунного статуса роговицы у пациентов с 0 стадией АК и здоровыми субъектами не показало явного различия между двумя группами.

I стадия АК в виде характерного периферического помутнения роговицы по данным биомикроскопии была диагностирована у 15 пациентов (25 глаз). В глазу одного пациента (5А) удалось обнаружить палисадоподобные структуры, значительно отличающиеся от лимбальных крипт нормальной роговицы. Морфологически наблюдалась выраженная деградация структур ЛПФ с потерей их упорядоченности и контрастности, лимбальные крипты с трудом визуализировались, ФСП отсутствовали.

В других глазах с АК I стадии не удалось выявить прогениторные структуры в лимбальной зоне. На периферии роговицы наряду с роговичным эпителием наблюдалась эпителизация смешанного типа с внедрением конъюнктивальной ткани в виде конъюнктивальных выростов или конъюнктивальных островков различной степени выраженности. В центральных отделах роговицы мозаичная структура базальных клеток была сохранена, клетки имели роговичный фенотип, однако границы клеток были менее четкими, в четырех случаях в крыловидных и базальных клетках визуализировались проминирующие клеточные ядра (Рисунок 4.4 а, б). В одном глазу была отмечена инвазия конъюнктивальных клеток в центральную зону роговицы.

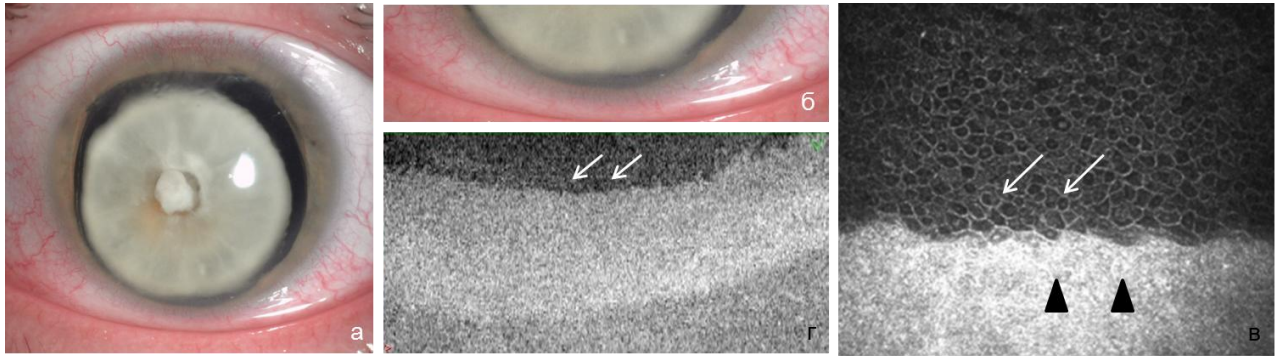
Разрушение лимбального барьера сопровождалось появлением в центральных и парацентральных зонах роговицы единичных клеток воспаления и бокаловидных клеток в 20 и 33% случаев соответственно. В 80% глаз были обнаружены центрально расположенные зрелые дендритные клетки, обладающие антиген-презентирующей функцией, значительно превышающие по количеству неактивированные клетки Лангерганса и потенциально указывающие на иммунную компрометированность роговицы (см. Рисунок 4.3). В 8% случаев в периферических зонах роговицы была выявлена патологическая васкуляризация.



а, б – I стадия АК; а – на снимке видны крыловидные и базальные эпителиальные клетки с яркими активированными ядрами (указаны стрелками) и нечеткими контурами; б – переходная зона между роговичным и конъюнктивальным эпителием: визуализируются скопления меланоцитов (белые стрелки) и начальная инвазия конъюнктивальной ткани в виде конъюнктивальных островков (черный указатель); в, г – II стадия АК; в – измененные ЛПФ, расположенные в виде параллельных линий; в связи с выраженным нистагмом клетки в межпалисадном пространстве четко не визуализируются; г – метаплазия роговичного эпителия по конъюнктивальному типу: клетки имеют большие гиперрефлективные ядра, границы клеток не видны, множественные бокаловидные клетки (белая стрелка); д–и – III–IV стадии АК; д – скопление бокаловидных клеток в виде крипт (указано стрелками), клеточная структура эпителия не просматривается; е – васкуляризация роговицы: хорошо видны кровеносные сосуды на уровне крыловидного эпителия (указаны стрелками); ж – конъюнктивизация роговичного эпителия: потеря структурности расположения клеток, отсутствие клеточных границ, наличие увеличенных клеточных ядер, присутствие интраэпителиальных кистозных изменений (черный указатель), множественных воспалительных (черная стрелка указывает на лейкоцит) и бокаловидных (белые стрелки) клеток; з – визуализируемые клетки роговичного эпителия фенотипически сходны с базальным эпителием конъюнктивы; и – полное разрушение роговичной поверхности.

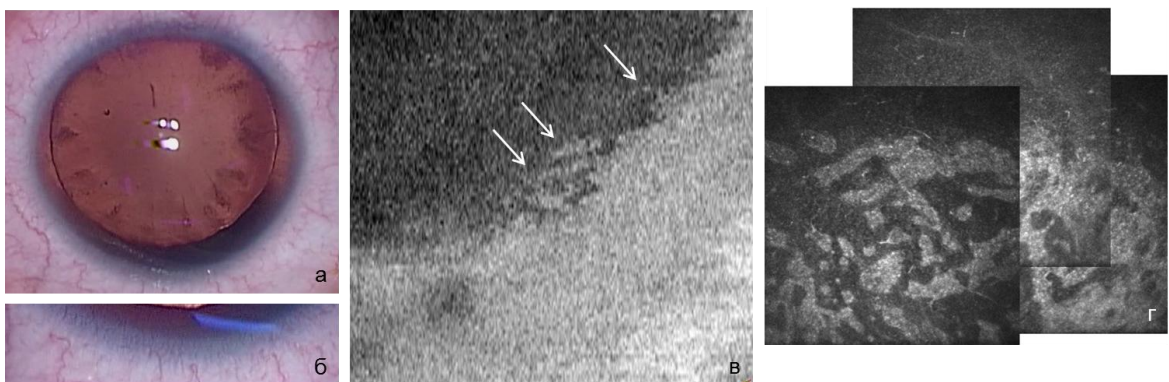
Рисунок 4.4 – Конфокальные снимки морфологических изменений в лимбальной зоне на разных стадиях АК

По данным ОКТ в месте предположительной локализации ЛПФ определялась равномерная монохромная гиперрефлективная полоса без визуализации каких-либо структур (Рисунок 4.5). У ребенка 4 (7А), подростков 10 (8А) и 14 (9) лет с I стадией АК также не удалось обнаружить лимбальные прогениторные структуры как по данным ОКТ, так и по результатам ЛСКМ (Рисунок 4.6).



а – фотография глаза: виден периферический рост сосудов в области верхнего лимба, центральная зона роговицы прозрачна; б – увеличенная фотография нижнего лимба: видно легкое периферическое помутнение поверхностных слоев роговицы; в – снимок ЛСКМ: просматривается четкая граница между конъюнктивальным (черный указатель) и роговичным (белые стрелки) эпителиями, конъюнктивальной инвазии нет, бокаловидные клетки на поверхности роговичного эпителия отсутствуют, сохранена мозаичность клеток роговицы; г – на снимке ОКТ видна гиперрефлективная полоса (указана стрелками) на глубине предположительного залегания ЛПФ.

Рисунок 4.5 – Данные обследования пациента 6, 49 лет, с I стадией АК



а – фотография глаза: заметно поверхностное нежное периферическое помутнение роговицы; б – увеличенная фотография нижнего лимба: виден рост сосудов лимбальной зоны в сторону роговицы; в – на снимках ОКТ ЛПФ в нижнем лимбе не визуализируются, хорошо видны конъюнктивальные островки (указаны стрелками); г – на снимках ЛСКМ также определяются множественные конъюнктивальные островки.

Рисунок 4.6 – Данные обследования пациента 8А, 10 лет, с I стадией АК

Из 10 человек (13 глаз) с признаками периферической неоваскуляризации и помутнениями роговицы (**II стадия АК**) у двух родственных пациентов (22А; 22Б) (2 глаза) были обнаружены измененные, частично деформированные ЛПФ в нижней половине лимба (см. Рисунок 4.4в). В остальных глазах прогениторные структуры не определялись, в лимбальной зоне отмечалась инвазия большого количества воспалительных и бокаловидных клеток на фоне потери эпителием роговичного фенотипа. В центральной зоне роговицы их присутствие составило 60 и 50% соответственно, антиген-презентирующие клетки Лангерганса были обнаружены в 60% случаев. Появление патологической васкуляризации в периферических и парацентральных зонах было отмечено в 70% глаз. Мозаичная картина базальных клеток была нарушена, их границы теряли четкость, а в центре клетки просматривалось небольшое светлое ядро (см. Рисунок 4.3г). Метаплазированный по конъюнктивальному типу эпителий роговицы в виде клеток со светлыми ядрами и нечеткими контурами распространялся в центральные районы роговицы в девяти глазах.

Для **III и IV стадий АК**, девять и три глаза соответственно, было характерно распространение роговичных изменений в центральную зону с преобладанием неоваскуляризации и субэпителиальных помутнений стромы. Изменения роговицы затрагивали все субпопуляции эпителиальных клеток, кератоциты и полностью разрушали структуру оптической поверхности. Бокаловидные клетки встречались в 50% случаев, формировали криптоподобные скопления и в значительном количестве присутствовали вдоль новообразованных сосудов (см. Рисунок 4.4 д–и). Воспалительная инвазия наблюдалась в 83% глаз, дендритные клетки встречались в 25% глаз с III стадией АК и полностью отсутствовали в глазах с IV стадией. Результаты ОКТ зоны лимба соответствовали данным ЛСКМ и не обнаруживали ЛПФ.

Оценка согласованности результатов диагностики ЛПФ, выполненных методом ЛСКМ и ОКТ, выявила наличие сильной положительной связи ($r_s=0,88$, $p<0,05$) при визуализации прогениторных структур в нижней половине лимба. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для верхнего лимба был несколько меньшим ($r_s=0,81$, $p<0,05$). Несоответствие результатов

двух методов диагностики наблюдалось при наличии лимбальных криптов, деформированных по форме, уменьшенных в размерах и наиболее часто локализованных в верхней половине роговицы. Статистически определялась отрицательная связь между стадией АК и сохранностью ЛПФ ($r_s = -0,63$, $p < 0,05$).

В ходе впервые выполненного **анализа плотности эпителиальных клеток у пациентов с PAX6-ВА** была выявлена статистически значимая разница плотности базальных и крыловидных эпителиальных клеток в глазах с I и II стадиями АК в сравнении с плотностью клеток в норме (измеренной в группе контроля) и при 0 стадии АК ($p < 0,05$). Разница в плотности эндотелиальных клеток во всех исследуемых группах была статистически незначимой ($p > 0,05$) (Таблица 4.1). Ограничения данного анализа, связанные с невозможностью количественной оценки структуры эпителия в поздних стадиях АК (III и IV стадии), были обусловлены нарушением морфологии эпителиоцитов, преобладанием клеток с конъюнктивальным фенотипом, нечеткостью получаемых изображений и выраженностью структурных изменений роговицы.

Таблица 4.1 – Средние значения плотности клеток центральной зоны роговицы по данным ЛСКМ

Клетки центральной зоны роговицы	Плотность клеток, кл/мм ²			
	Группа контроля	Аниридийная кератопатия		
		0 стадия	I стадия	II стадия
Базальные эпителиальные	9373±505	9353±871	8826±657*	8266±676*
Крыловидные эпителиальные	6374±291	6355±237	5943±517*	5842±437*
Эндотелиальные	3380±581	3081±188	3315±486	3464±491

* Достоверная разница с группой контроля.

Сравнение ЦТР во всех стадиях АК с контрольной выборкой при помощи критерия Краскела – Уоллиса с поправкой Бонферрони показало достоверную разницу между группами ($p < 0,005$) (Таблица 4.2). По мере прогрессирования АК наблюдалось увеличение общей толщины роговицы и уменьшение высоты ее эпителиального слоя. Однако статистически значимых отличий в толщине роговицы ($p = 0,09$) и ее эпителия ($p = 0,06$) в зависимости от

стадии АК выявлено не было. Корреляционный анализ также не выявил связи между ЦТР и стадией АК ($r_s=0,29$, $p>0,05$).

Таблица 4.2 – Средние значения ЦТР и ее эпителия по данным ОКТ

Стадия АК	Центральная толщина роговицы, мкм	Центральная толщина эпителия, мкм	Группа контроля, мкм
0	589±25*	51±2,1*	552±17*; эпителий 54,6±2,7*
I	600±45*	52±6,2	
II	606±71*	46±9,5	
III–IV	662±90*	43±3,5*	

* Достоверная разница с группой контроля.

Таким образом, изучение морфологических изменений роговицы *in vivo* позволило выделить две группы пациентов с различным течением патологических процессов. В первую группу вошли пациенты с 0 стадией АК, роговичным фенотипом эпителиального слоя, сохранными и/или частично деформированными лимбальными прогениторными структурами и увеличенной по сравнению с возрастной нормой толщиной роговицы. Плотность фенотипических подтипов эпителиальных и эндотелиальных клеток, иммунологический статус в этой категории пациентов не отличались от нормативных показателей. Данная стадия АК не зависела от возраста и встречалась у лиц в возрастном диапазоне от 15 до 55 лет.

Морфологические изменения роговицы во второй группе пациентов носили прогрессирующий характер. Ни у одного из обследованных субъектов не были выявлены сохранные ЛПФ, лишь в трех случаях были обнаружены усеченные, значительно деформированные палисадоподобные структуры (10,3%). Оценка лимбальной зоны в детском возрасте не привела к обнаружению ЛПФ. Фенотипические изменения эпителия по данным ЛСКМ всегда предшествовали определяемым при биомикроскопии признакам конъюнктивизации роговицы. Результаты ЛСКМ продемонстрировали связь прогрессирования АК с постепенной трансформацией роговичного эпителия в конъюнктивальный, начиная с I стадии АК. Прогрессирование АК сопровождалось увеличением количества воспалительных клеток ($p=0,03$),

нарастанием патологической васкуляризации ($p=0,006$), деградацией лимбальных прогениторных структур ($r_s=-0,63$, $p<0,05$), а также уменьшением количества антиген-презентирующих дендритных клеток ($p=0,005$). Признаки хронического воспаления, изменения иммунологического статуса роговицы, снижение плотности эпителиальных клеток наблюдались уже в начальных стадиях АК (I–II). Плотность эндотелиальных клеток в обеих группах статистически не отличалась от группы контроля ($p>0,05$).

Анализ пахиметрических данных выявил увеличение ЦТР во всех стадиях АК в сравнении с группой контроля ($p<0,05$). Уменьшение толщины роговичного эпителия в сочетании со снижением плотности эпителиальных клеток по мере прогрессирования АК ($p<0,05$) косвенно позволяет говорить о нарушении пролиферативного потенциала стволовых клеток роговицы.

Оценка альтернативного способа диагностики прогениторных структур показала возможность ОКТ детально визуализировать структуру и локализацию ЛПФ и высокую степень ее соответствия результатам ЛСКМ ($r_s=0,88$, $p<0,05$). Наиболее важным лимитирующим фактором для ОКТ у пациентов с ВА явилось наличие нистагма, величина и размах которого в некоторых случаях не позволяли получить качественное изображение. По причине выраженных нистагмоидных движений глаз выполнение ОКТ было затруднено в 15% случаев, для ЛСКМ этот показатель был равен 8,2% глаз.

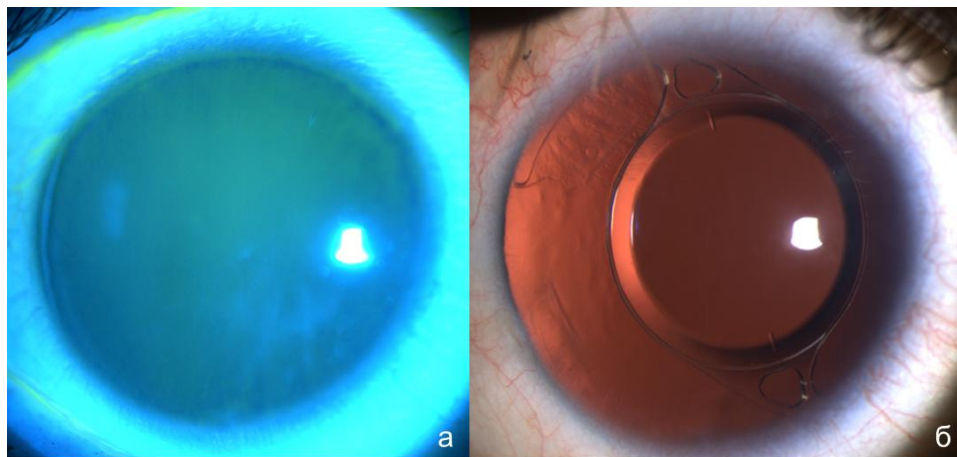
4.2 Анализ прогрессирования аниридийной кератопатии после хирургических вмешательств

С целью определения прогностического влияния лимбальных прогениторных структур на прогрессирование АК после хирургических вмешательств был выполнен сравнительный анализ результатов экстракции катаракты у пациентов с 0 и I–II стадиями АК.

В I группу вошли девять пациентов в возрасте $33\pm 17,6$ лет (Me – 31 год) с 0 стадией АК; II группу составили девять пациентов с I–II стадиями АК в возрасте $35,7\pm 14,2$ лет (Me – 36 лет). Исследуемые группы были сопоставимы

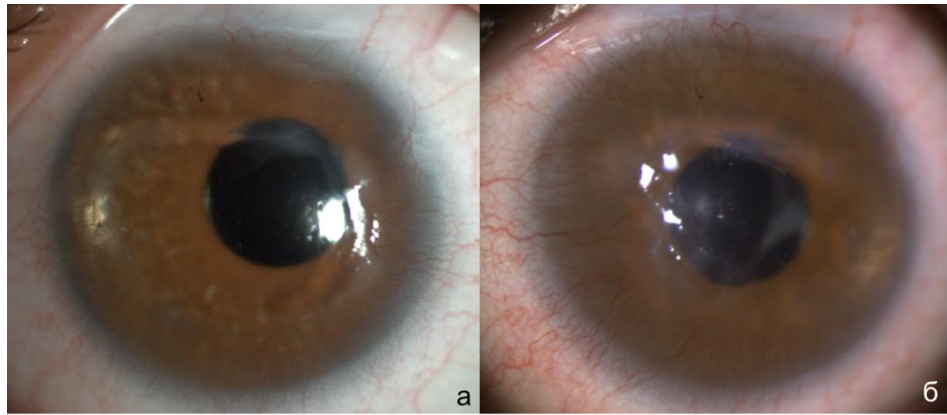
по возрасту ($p=0,86$). По данным ЛСКМ у всех пациентов I группы были обнаружены ЛПФ в сочетании с роговичным фенотипом эпителиальной поверхности. У пациентов II группы только в одном случае были обнаружены деградированные палисадоподобные структуры, во всех остальных глазах исследование *in vivo* не обнаружило следы герминативных структур. В каждой группе были выполнены следующие хирургические вмешательства: факэмульсификация катаракты (ФЭК)+ИОЛ (5 глаз), ФЭК+ИХД (3 глаза), экстракапсулярная экстракция катаракты без имплантации ИОЛ (1 глаз). Послеоперационный период наблюдения составил $4,8\pm 2,6$ и $4,4\pm 2,5$ лет в I и II группе соответственно.

Анализ послеоперационных данных показал отсутствие прогрессирования АК у всех пациентов I группы вне зависимости от метода хирургии катаракты и возраста субъекта (Рисунок 4.7).



а – отсутствие признаков АК при окрашивании флюоресцеином до оперативного вмешательства; б – состояние роговицы через 2 года после имплантации торической ИОЛ.
Рисунок 4.7– Состояние роговицы пациента с 0 стадией АК и наличием ЛПФ

У пяти из девяти пациентов II группы (55,6%) наблюдалось утяжеление АК на одну стадию от исходной в среднем через $2,15\pm 1,8$ года (Рисунок 4.8). В остальных случаях прогрессирование АК не было отмечено. Связь между возрастом пациента и прогрессированием АК в послеоперационном периоде не была обнаружена ($p=0,65$).



а – II стадия АК у пациентки с отсутствием ЛПФ через 1 год после имплантации ИХД;
 б – состояние роговицы через 4,4 года после операции: наблюдается распространение васкуляризованного паннуса в центральные отделы роговицы, появление стромальных помутнений, II–III стадии АК.

Рисунок 4.8 – Состояние роговицы пациентки с исходной I стадией АК

Таким образом, хирургические манипуляции в лимбальной зоне у пациентов с 0 стадией АК в сочетании с сохранением прогениторных структур не приводили к прогрессированию роговичных помутнений на протяжении длительного периода послеоперационного наблюдения. В случае отсутствия ЛПФ по данным ЛСКМ отмечалось утяжеление фенотипа кератопатии более чем в половине случаев (55,6%). Данные результаты подтверждают положительную прогностическую роль присутствия сохранных герминативных структур лимба (ЛПФ и ФСП) в сохранении прозрачности поверхности роговицы не только у пациентов старшей возрастной группы, но и в отдаленные периоды после хирургических вмешательств.

С учетом предположительно различных генетических механизмов, лежащих в основе формирования того или иного глазного фенотипа и морфологических изменений роговицы, следующим этапом была оценена взаимосвязь между типом мутации гена *PAX6* или делециями региона 11p13 с особенностями клинической картины *PAX6*-ВА, в том числе ее тяжестью.

ГЛАВА 5. ГЕНО-ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ТИПОМ МУТАЦИЙ И КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ *PAX6*-АССОЦИИРОВАННОЙ ВРОЖДЕННОЙ АНИРИДИИ

Целью данной главы стала оценка спектра мутационных изменений в гене *PAX6* и регионе 11p13 у пациентов с *PAX6*-ВА, а также разработка способа выявления гено-фенотипических взаимосвязей между типом мутаций и клиническими проявлениям ВА с последующей оценкой полученных зависимостей и формированием на их основе клинико-диагностического алгоритма прогнозирования течения *PAX6*-ВА.

Анализ внутригенных мутаций и хромосомных перестроек был выполнен у 105 пациентов (69 пробандов). Из всех пробандов 41 не обладалотягощенным семейным анамнезом, в то время как остальные имели поражённых членов семьи первой и/или второй степени родства (28 семей). Результаты двунаправленного секвенирования показали наличие интрагенных мутаций у 48 пробандов (69,6%), MLPA выявила крупные делеции в 21 семье (30,4%). Из 71 пациента с проведенной молекулярно-генетической диагностикой в двух случаях (2,8%) мутацию в *PAX6* выявить не удалось (Рисунок 5.1).

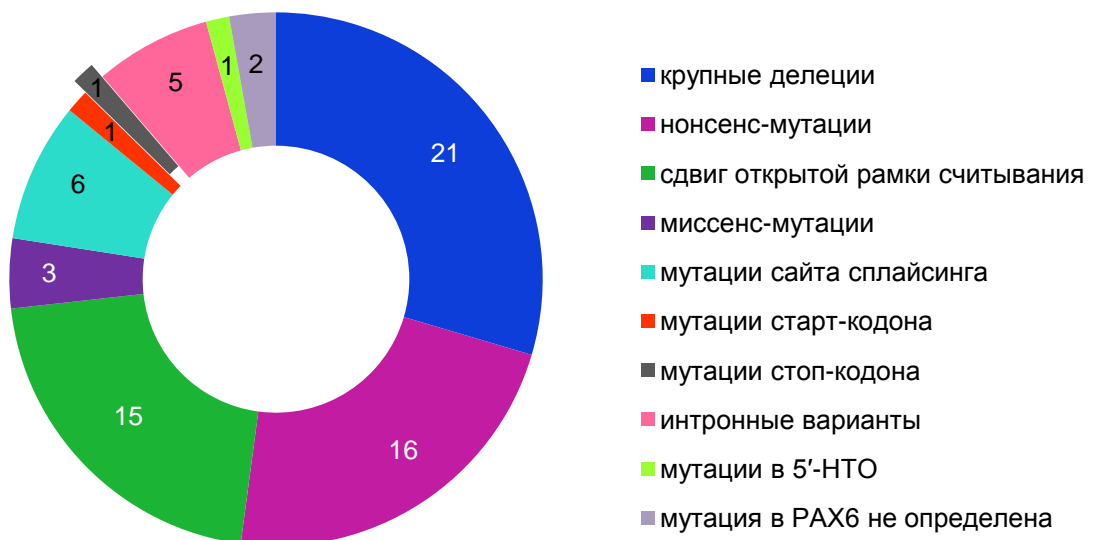


Рисунок 5.1 – Спектр мутаций в *PAX6*

5.1 Внутригенные мутации *PAX6*

Были выявлены 43 разные точковые мутации, в том числе 23 новых (53,5%) и 20 ранее описанных генетических вариантов (Таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Типы внутригенных мутаций в *PAX6*

Типы мутаций	Мутации	
	Новые	Ранее описанные
Нонсенс	c.244G>T, c.1183G>T	c.130C>T, c.265C>T, c.307C>T, c.467G>A, c.607C>T, c.718C>T, c.781C>T, c.794G>A, c.829C>T, c.949C>T
Миссенс	c.19G>C, c.164A>C	c.140A>G
Сдвиг рамки	c.78delG, c.83_89delinsGA, c.114_117dup, c.133_141+4del13, c.291_294dup4(CTTT), c.353delC, c.401delA, c.411delG, c.449_453del5(ACGGG)ins7(CCGGAA C), c.538_544del, c.679del, c.760delA, c.959_960del	c.371delA, c.491delC
Сайта сплайсинга	c.766-2A>C, c.916+1G>A, c.121_141+16dup, c.1184-2_1184delAGGinsGGA	c.142-139T>C, c.1183+2T>C
Интронные варианты	c.142-5T>G	c.1032+1G>T, c.1032+6T>G, c.141+4A>G
Старт-кодона	-	c.1A>G
5'-НТО*	c.-125dupG	-
Стоп-кодона	-	c.1268A>T

* 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область.

Обнаруженные малые мутации в 58% случаев были локализованы с 5-го по 9-й экзоны. Спектр малых мутаций в *PAX6* и их распределение по типу, пробандам и пациентам представлены в Таблицах 5.2 и 5.3 соответственно.

Таблица 5.2 – Частота встречаемости различных внутригенных мутаций среди пациентов с ВА

Типы мутаций	Доля среди пробандов с внутригенными мутациями	
	Миссенс-мутации	3/48
Нонсенс-мутации	16/48	33,3
Мутации сдвига открытой рамки считывания	15/48	31,25%
Мутации сайта сплайсинга	6/48	12,5%
Интронные варианты	5/48	10,4%
Мутации в 5'-НТО	1/48	2,1%
Изменение сайта инициации трансляции	1/48	2,1%
СТЕ мутации	1/48	2,1%

Таблица 5.3 – Количество пробандов и пациентов с разными типами внутригенных мутаций

Типы мутаций	Мутации n=43	Пробанды n=48	Пациенты n=72
Миссенс-мутации	3	3	4
Нонсенс-мутации	12	16	24
Мутации сдвига открытой рамки считывания	15	15	21
Мутации сайта сплайсинга	6	6	9
Интронные варианты	4	5	11
Мутации в 5'-НТО	1	1	1
Изменение сайта инициации трансляции	1	1	1
СТЕ мутации	1	1	1

Были выявлены повторяющиеся нуклеотидные варианты: четыре нонсенс-мутаций и один вариант интронной последовательности, приводящей к нарушению сплайсинга. Однонуклеотидные замены были представлены часто встречающимися в других популяциях и этнических группах мутациями: p.Arg203*, p.Arg240* и p.Trp156*. Кроме того, в двух неродственных семьях была обнаружена ранее зарегистрированная мутация, нарушающая донорный сайт сплайсинга с.141+4A>G.

5.2 Крупные делеции

В 21 семье (31 пациент) MLPA-анализ обнаружил протяжённые хромосомные делеции, захватывающие локус гена *PAX6* и/или локусы соседних генов. Все делеции были ранжированы в зависимости от протяженности хромосомных перестроек и вовлеченных в них фланкирующих генов (Таблица 5.4).

Таблица 5.4 – Делеции, захватывающие *PAX6*

Пациенты	Обозначение	Геномные координаты (hg18*)	Длина делеции	Вовлеченные гены
20.03/ <i>de novo</i>	Del1	30 210 128– 32 413 841	~2,2 млн п.н.	<i>FSHB–DCDC–ELP4–PAX6–RCN–WT1</i>
AN151.03/семейный случай	Del2	31 285 887– 32 081 884	~0,8 млн п.н.	<i>DCDC1–ELP4–PAX6–RCN1</i>
92AN/семейный случай	Del3	31 285 887– 31 794 631	~0,5 млн п.н.	<i>DCDC1–ELP4–PAX6int1</i>
04.14/ <i>de novo</i> 48.03/ <i>de novo</i>	Del4	31 347 785– 31 794 631	~0,45 млн п.н.	<i>DCDC1ex1–ELP4–PAX6int1</i>
02.12./ <i>de novo</i> 30.0к/ <i>de novo</i> 68AN/семейный случай 121AN/семейный случай, 174/семейный случай, А-35/семейный случай А-219/семейный случай	Del5	31 285 887– 31 628 232	~ 0,35 – 1,5 млн п.н.	<i>DCDC1–ELP4ex9</i> (кодирующая часть гена <i>PAX6</i> не затронута)
07.17/ <i>de novo</i> А-5/семейный случай	Del6	31 628 232– 32 413 841	~0,8 млн п.н.	<i>ELP4ex9–PAX6–RCN1–WT1ex1</i>
36.03/ <i>de novo</i>	Del7	31 778 912– 32 208 363	~0,4 млн п.н.	<i>PAX6 ex9–RCN1</i>
169AN/ <i>de novo</i> 183AN/ <i>de novo</i>	Del8	31 628 232– 31 863 698	~0,2 млн п.н.	<i>PAX6del</i>
73AN/семейный случай	Del9	31 784 748– 31 787 957	~3 тыс. п.н.	<i>PAX6ex3</i>
129AN/ <i>de novo</i>	Del10	31 778 912– 31 780 904	~2 тыс. п.н.	<i>PAX6ex5–PAX6ex7</i>
175AN/семейный случай	Del11	31 728 354– 31 729 490	~1 тыс.п.н.	<i>PAX6ex8–PAX6ex10</i>
161AN/ <i>de novo</i>	Del12	31 768 079– 31 772 203	~4 тыс. п.н.	<i>PAX6ex9–PAX6ex13</i>

* *PAX6* coordinates: 31,762,916–31,789,477 (hg18); Del – делеция, int – интрон, ex – экзон.

В трех семьях была обнаружена хромосомная перестройка с захватом областей генов *PAX6* и *WT1* (Del1, Del6). Из них в одном случае у ребенка в возрасте до 3 лет (20.03) была обнаружена критичная для формирования синдрома WAGR делеция (Del1) без признаков клинической манифестации синдрома. У двух взрослых пациентов (07.17, А-5.1) и одного подростка в возрасте 10 лет (А-5) с делецией, захватывающей только 1-й экзон гена *WT1* (Del6), опухоль Вильмса не была обнаружена.

В 7 неродственных семьях (13 человек) была обнаружена делеция удаленной 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6*, расположенная на уровне гена *ELP4* (Del5). Частота встречаемости данной хромосомной перестройки составила 10,1% (7/69 пробандов). Согласно положению проб длина удаленного участка в случае данной делеции могла варьировать от 350 до 1,5 млн п.н., точные границы делеций не определялись. Результаты кариотипирования выявили отсутствие других грубых хромосомных нарушений и синдромальной патологии.

5.3 Разработка метода выявления гено-фенотипических зависимостей на основе вероятностной модели

С целью выявления взаимосвязей между типами мутаций и клиническими проявлениями *PAX6*-ВА использовался статистический метод оценки степени взаимной зависимости на базе вероятностной модели с совместным использованием точного критерия Фишера и отношения правдоподобия.

Решение поставленной задачи было достигнуто с помощью специально разработанной базовой модели, основанной на исходных данных пациентов, обследованных в Чебоксарском филиале МНТК «Микрохирургия глаза». Она описывает конечное множество из N пациентов как совокупность многомерных объектов, представленных в двух признаковых пространствах: пространстве мутаций гена *PAX6* и пространстве клинических проявлений *PAX6*-ВА.

Для представления множества пациентов в пространстве мутаций гена *РАХ6* использовался N -мерный вектор:

$$\mu = \{\mu_1, \dots, \mu_k, \dots, \mu_N\}, \quad (1)$$

где μ_k – номер типа мутации гена *РАХ6* у k -го пациента.

Для представления множества пациентов в пространстве клинических проявлений ВА пациенты описывались матрицей «объект–признак», характеризующей состояние каждого из пациентов на основе C признаков:

$$\varepsilon = \begin{pmatrix} \varepsilon_{11} & \dots & \varepsilon_{1l} & \dots & \varepsilon_{1C} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \varepsilon_{k1} & \dots & \varepsilon_{kl} & \dots & \varepsilon_{kC} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \varepsilon_{N1} & \dots & \varepsilon_{Nl} & \dots & \varepsilon_{NC} \end{pmatrix}, \quad (2)$$

где ε_{kl} – целочисленное значение, характеризующее форму проявления l -го клинического проявления ВА у k -го пациента.

Каждый элемент вектора μ преобразовывался в битовую строку конечной длины L , равной количеству типов мутаций гена *РАХ6*, по следующему принципу: бит, порядковый номер которого совпадал со значением μ_k , устанавливался равным единице, остальные задавались равными нулю. Таким образом, исходный вектор μ преобразовывался в бинарную матрицу «объект – признак»:

$$M = \begin{pmatrix} m_{11} & \dots & m_{1i} & \dots & m_{1L} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ m_{k1} & \dots & m_{ki} & \dots & m_{kL} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ m_{N1} & \dots & m_{Ni} & \dots & m_{NL} \end{pmatrix}, \quad (3)$$

где m_{ki} – бинарное значение, которое свидетельствовало о наличии либо отсутствии i -го типа мутации у k -го пациента.

Аналогичным образом преобразовывали в битовую строку значения тех признаков ε_{kl} , мощность диапазона значений которых была больше двух. Длина битовой строки равнялась количеству возможных значений для данного признака. Те признаки ε_{kl} , мощность диапазона значений которых была равна двум, оставались неизменными. Таким образом, исходная матрица «объект – признак» (2) преобразовывалась в бинарную матрицу «объект – признак»:

$$A = \begin{pmatrix} a_{11} & \cdots & a_{1j} & \cdots & a_{1D} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{k1} & \cdots & a_{kj} & \cdots & a_{kD} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ a_{N1} & \cdots & a_{Nj} & \cdots & a_{ND} \end{pmatrix}, \quad (4)$$

где a_{kj} – бинарное значение, которое свидетельствовало о наличии либо отсутствии j -го клинического проявления ВА у k -го пациента; D – количество бинарных признаков, соответствующих множеству клинических проявлений ВА ($D \geq C$).

Для попарной оценки степени взаимосвязи типов мутаций и клинических проявлений ВА строилась следующая матрица:

$$R = \begin{pmatrix} r_{11} & \cdots & r_{1j} & \cdots & r_{1D} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ r_{i1} & \cdots & r_{ij} & \cdots & r_{iD} \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ r_{L1} & \cdots & r_{Lj} & \cdots & r_{LD} \end{pmatrix}, \quad (5)$$

где r_{ij} – степень взаимосвязи i -го типа мутации и j -го клинического проявления ВА. Ниже приведен алгоритм построения матрицы (5).

Шаг 1. Для каждого i -го типа мутации вычисляли оценку вероятности его встречаемости:

$$P(M_i) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N m_{ki} \quad (6)$$

Шаг 2. Аналогичным образом для каждого j -го клинического проявления ВА вычисляли оценку вероятности его встречаемости:

$$P(A_j) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N a_{kj} \quad (7)$$

Шаг 3. Для каждой пары (i, j) вычисляли оценку вероятности обоюдной встречаемости и i -го типа мутации, и j -го клинического проявления ВА у пациентов по формуле

$$P(M_i, A_j) = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (m_{ki} * a_{kj}) \quad (8)$$

Шаг 4. Для каждой пары (i, j) находили степень взаимосвязи как отношение правдоподобия по следующей формуле:

$$r_{ij} = \frac{P(M_i, A_j)}{P(M_i) * P(A_j)} \quad (9)$$

Таким образом, значение оценки отношения правдоподобия вычислялось по формуле

$$n \times n_{1,1} / n_1 \times n_2, \quad (10)$$

где исходными данными являлась выборка с размером n , в которой у n_1 пациентов была мутация заданного типа, а у n_2 пациентов были выявлены определенные клинические проявления ВА заданного типа. У $n_{1,1}$ пациентов имелось и то, и другое.

Решение о наличии зависимости выносилось в том случае, если значение отношения правдоподобия превышало выбранный порог, который определялся так, чтобы обеспечить заданный уровень значимости, т. е. вероятность ошибки. Необходимым и достаточным условием независимости являлось равенство отношения правдоподобия единице. Если оценка отношения правдоподобия не была равна единице, то имела место зависимость. Положительное отклонение от единицы увеличивало частоту заданного типа клинических проявлений ВА при заданном типе мутации, а отрицательное – свидетельствовало об её уменьшении.

Для вычисления вероятности ошибки дополнительно использовался метод, основанный на критерии Фишера. Критерий Фишера позволял точно вычислять вероятность полученного значения отношения правдоподобия при условии, что заданные типы мутации и клинические признаки ВА являются независимыми. Это значение вероятности принималось за уровень значимости. Уровень значимости более 0,05 указывал на отсутствие зависимости между клиническими проявлениями ВА и типами мутационных изменений.

5.4 Оценка гено-фенотипических взаимосвязей

С целью поиска возможных гено-фенотипических взаимосвязей между клинической картиной *РАХ6*-ВА и типом мутации были сформированы группы пациентов со схожими по молекулярным последствиям генотипами

(см. Таблицу 2.3). В анализ были включены 68 пробандов с генетически верифицированным диагнозом *РАХ6*-ВА.

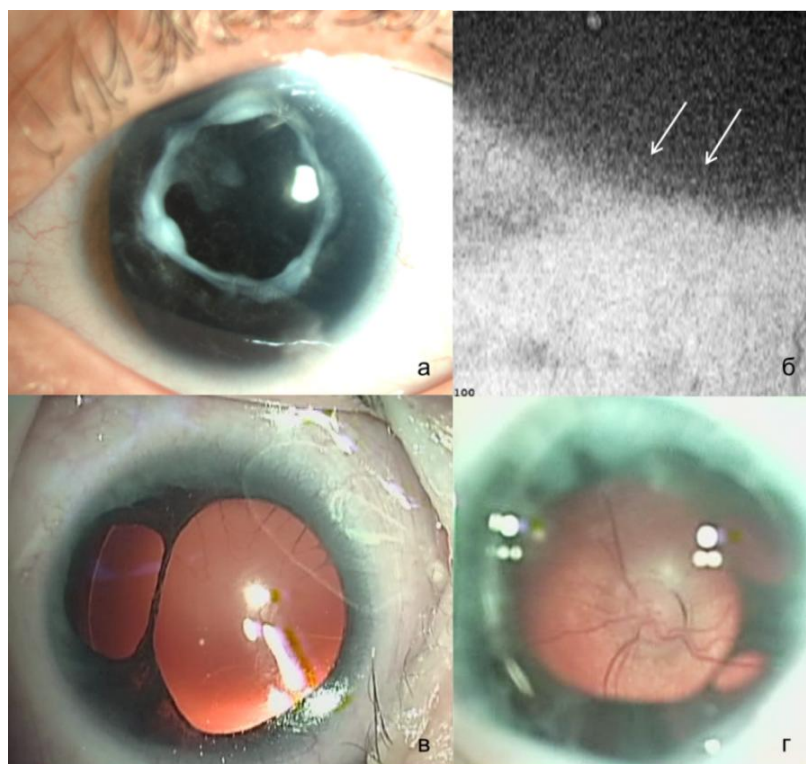
5.4.1 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с миссенс-мутациями

Миссенс-мутации – самый немногочисленный тип мутаций (4,3%, 3/69), который приводит к изменению функции синтезируемого белка *РАХ6*. В исследуемой когорте пациентов у трех пробандов были обнаружены миссенс-мутации, приводящие к замене аминокислоты в белке *РАХ6* (Таблица 5.1). Все мутации были локализованы в 5-м и 6-м экзонах гена *РАХ6*, кодирующих парный домен.

Фенотипически у всех пациентов наблюдался невыраженный мелкокоразмашистый нистагм, начальные проявления АК или ее отсутствие. У трех из четырех пациентов радужная оболочка была частично сохранна и имела атипичную структуру, в одном случае наблюдалась картина полной аниридии. Среднее значение остроты зрения в группе составило $0,22 \pm 0,12$.

В семейном случае ВА с мутацией с.164А>С клиническая картина заболевания была представлена микрокорнеа, микрофтальмом, гипоплазией ДЗН, минимальными изменениями роговицы и незначительным нистагмом; объем радужной ткани варьировал от гипоплазии с эффектом ложной поликории до полной аниридии (Рисунок 5.2).

В связи с невозможностью проведения ЛСКМ из-за небольшого размера глазного яблока, глазной щели и диаметра роговицы, визуализация прогениторных структур была выполнена при помощи ОКТ переднего отрезка (Рисунок 5.2б). Наличие ФСП по данным спектральной ОКТ в этом случае объясняло сохранение прозрачности роговицы у пациентки в возрасте 27 лет. В данной семье была также отмечена значительная фенотипическая вариабельность клинических признаков, затрагивающая прежде всего степень презентации радужной ткани у разных членов одной семьи.



а – пробанд 27 лет с полной аниридией, послеоперационной афакией, фиброзом задней капсулы и прозрачной роговицей; б – снимок ОКТ в режиме En Face, на котором стрелками указаны фокальные стромальные проекции; в – дочь пробанда двух лет с эффектом ложной поликории, прозрачной роговичной поверхностью и отсутствием катаракты; г – гипоплазия ДЗН, виден эффект двойного кольца.

Рисунок 5.2 – Фенотип *PAX6*-ВА, ассоциированный с миссенс-мутацией с.164А>С

5.4.2 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с инактивирующими мутациями

В эту категорию генетических изменений вошли нонсенс-мутации (16), мутации сдвига открытой рамки считывания (15) и мутация сайта инициации трансляции (1), приводящие к формированию преждевременного стоп-кодона, деградации матричной РНК по нонсенс-опосредованному механизму и потере функции одного аллеля (Lof). Вместе пробанды с Lof мутациями составили 66,7% (32/48) всех малых мутаций в *PAX6* и 46,4% (32/69) всех верифицированных мутаций и хромосомных перестроек.

Аниридийный фенотип, сформированный в результате инактивирующих мутаций, характеризовался «классической» картиной клинических проявлений

в виде полной аниридии ($p=0,034$), нистагма ($p=0,002$), кератопатии ($p=0,000$), катаракты ($p=0,000$), гипоплазии макулы ($p=0,005$) и гипоплазии фовеа 4-й степени ($p=0,003$). Полученные клинические данные подтверждались результатами статистического анализа (Таблица 5.5). Уровень значимости фенотипических характеристик по критерию Фишера был меньше 0,05, а значения отношения правдоподобия превышали выбранный порог, что подтверждало положительную взаимосвязь между клиническими признаками ВА и типом мутационных изменений. Связь между Lof мутациями и легкой степенью тяжести офтальмологических проявлений не была выявлена ни в одном случае ($p=0,023$).

Таблица 5.5 – Оценка взаимосвязей между клиническими проявлениями *РАХ6*-ВА и инактивирующими мутациями

Клинические признаки		Критерий Фишера	Отношение правдоподобия
Аниридия	полная	0,03499	1,13314
	частичная	0,03499	0,47696
Нистагм		0,00208	1,18107
Кератопатия		0,00066	1,18966
Катаракта		0,00098	1,3572
Глаукома		0,19057	1,06452
Гипоплазии макулы		0,00585	1,17978
Гипоплазия фовеа	4-й степени	0,00368	1,36022
Микрокорнеа		0,50213	1,1129
Микрофтальм		0,31632	1,1129
Косоглазие		0,18132	1,1129
Птоз		0,21173	0,89032
Степень тяжести фенотипа	легкая	0,02303	0,0

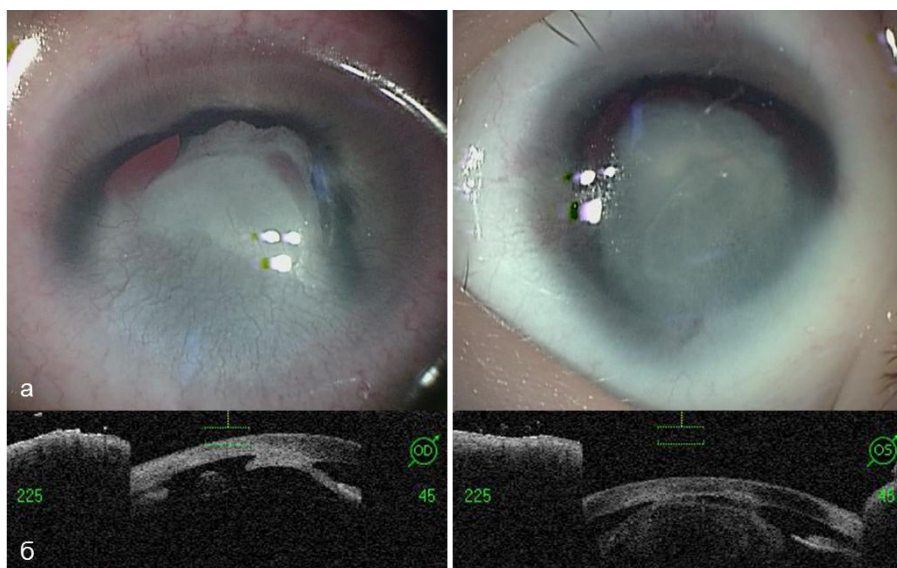
Вариабельность экспрессивности глазных проявлений *РАХ6*-ВА в данной группе не была выражена. Лишь в одном семейном случае с нонсенс-мутацией с.829C>T p.(Gln277Terс) наблюдались формирование «неаниридийного» глазного фенотипа и комбинированные нарушения нейроморфогенеза на фоне неблагоприятных условий внутриутробного

развития плода. Под наблюдением находились три поколения одной семьи с *PAX6*-ВА. У бабушки и отца пробанда отмечалась картина полной аниридии с частичными помутнениями в хрусталике, АК, нистагмом, гипоплазией фовеа и ДЗН. Беременность матери пробанда протекала на фоне алкогольной и наркотической интоксикации, фетоплацентарной недостаточности, внутриутробного инфицирования и задержки внутриутробного развития плода. У новорожденного наблюдались множественные стигмы дисэмбриогенеза в виде отсутствия ногтевых пластинок пальцев рук и ног, изменения формы ушных раковин, гипертелоризма, эпикантуса, расщелины мягкого неба (Рисунок 5.3). Диагностированный фетальный алкогольный синдром с множественными пороками развития включал врожденный порок сердца, врожденную аномалию развития головного мозга (голопроэнцефалия, лобарная форма), врожденную непроходимость носослезного канала.



Рисунок 5.3 – Множественные стигмы дисэмбриогенеза у пациента с фетальным алкогольным синдромом и нонсенс-мутацией в *PAX6* (с.829С>Т) (описание в тексте)

Офтальмологическая картина была представлена двухсторонним Петерс-подобным фенотипом в виде центральных стромальных помутнений роговицы округлой формы (лейкома), корнеолентикулярных сращений, помутнений хрусталика, частичной аниридии, мелкой неравномерной передней камеры, микрофтальма, микрокорнеа, нистагма, гипоплазии фовеа и ДЗН (Рисунок 5.4).



а – фото глаз, демонстрирующее помутнение центральных отделов роговицы, склерокорнеа, микрокорнеа, частичную аниридию, помутнение хрусталика; б – данные ОКТ переднего отрезка с наличием корнеолентикулярных сращений.
Рисунок 5.4 – Офтальмологический статус пациента с Петерс-подобным фенотипом

5.4.3 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с мутациями, изменяющими сплайсинг

В работе было обнаружено 12 пробандов с мутациями, влияющими на нормальный сплайсинг (17,4%, 12/69), из них 5 интронных вариантов, 6 мутаций сайтов сплайсинга кодирующих экзонов и 1 изменение сайта сплайсинга некодирующего экзона 3 в 5'-НТО (см. Таблицу 5.1).

Анализ гено-фенотипических корреляций в этой группе выявил статистически значимое фенотипическое присутствие частичной аниридии ($p=0,031$) и гипоплазии макулы ($p=0,025$) (Таблица 5.6).

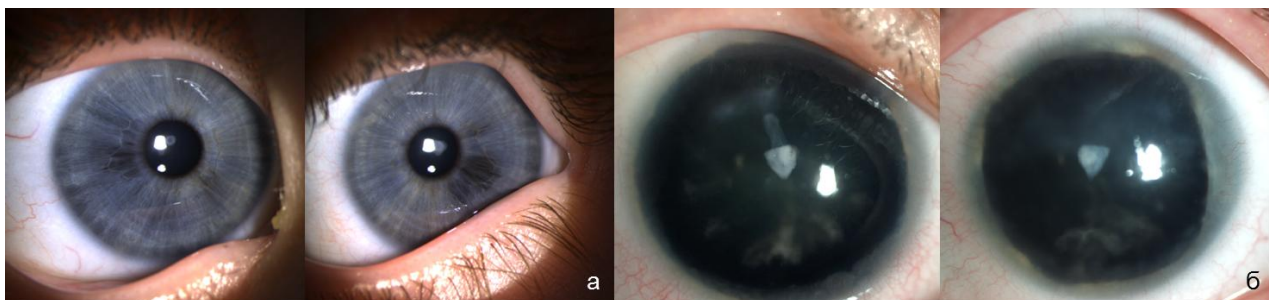
Клинически в 50% глаз наблюдалось сохранение радужной ткани в виде радужного полумесяца, небольшой гипоплазии или колобомоподобного дефекта. Выраженность кератопатии также варьировала от полного отсутствия признака до стромальных помутнений и формирования васкуляризированного паннуса (III–IV стадии АК). У двух из семи обследованных пробандов была выявлена 3-я степень гипоплазии фовеа по данным ОКТ, в остальных случаях – 4-я степень недоразвития центральной ямки сетчатки.

Таблица 5.6 – Оценка взаимосвязей между клиническими проявлениями PAX6-BA и мутациями, изменяющими сплайсинг

Клинические признаки		Критерий Фишера	Отношение правдоподобия
Аниридия	полная	0,03182	0,6843
	частичная	0,03182	2,24026
Нистагм		0,32401	1,00812
Кератопатия		0,31471	1,0815
Катаракта		0,1548	0,76497
Глаукома		0,25987	1,09091
Гипоплазии макулы		0,02513	1,17978
Гипоплазия фовеа	4-й степени	0,13807	0,74675
Микрокорнеа		0,7046	0
Микрофтальм		0,33764	0
Косоглазие		0,2282	1,25455
Птоз		0,30616	0,83636
Степень тяжести фенотипа	средняя	0,25669	1,0172

У пациентов с мутациями, изменяющими сплайсинг, была отмечена значительная фенотипическая гетерогенность прежде всего на уровне внутрисемейной вариабельности признаков. Под наблюдением находилось 3 семейных случая PAX6-BA с мутациями с.142-5T>G, с.1032+6T>G и с.1032+1G>T, расположенными в 5-м и 11-м интронах соответственно.

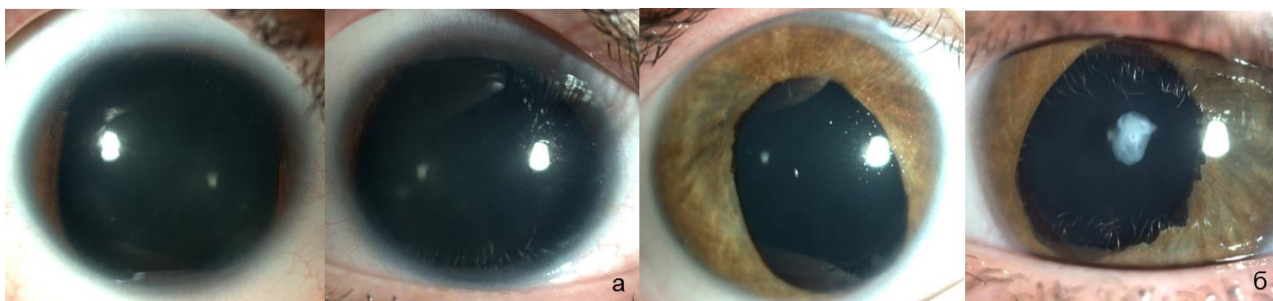
В семье с ранее неописанным вариантом нуклеотидной последовательности с.142-5T>G фенотипические различия были ассоциированы с объемом сохранной радужной ткани. У дочери пробанда радужная оболочка была представлена полностью, с наличием сформированного зрачка, пигментной зрачковой каймы и признаками секторальной атрофии стромы (Рисунок 5.5а). Фенотип ребенка был дополнен билатеральной передней полярной катарактой и отсутствием нистагма. В то же время у пробанда наблюдались частичная аниридия, передняя полярная катаракта с элементами помутнений в задних кортикальных слоях хрусталика, АК, прогрессирующая с возрастом и после перенесенных хирургических вмешательств, гипоплазия фовеа соответствовала 3-й степени по данным ОКТ (Рисунок 5.5б).



а – дочь пробанда (4 года); б – пробанд (33 года).

Рисунок 5.5 – Различная фенотипическая экспрессивность мутации с.142-5Т>G внутри одной семьи

В другой семье также с ранее неописанным вариантом нуклеотидной последовательности с.1032+6Т>G, помимо отсутствия сходства в объеме сохраненной радужной ткани, фенотипические различия были представлены разными видами катарактальных помутнений. У отца они носили характер пылевидных помутнений в ядерных слоях хрусталика, у дочери были представлены передней полярной катарактой. В обоих случаях были выявлены начальные признаки АК и гипоплазия фовеа (Рисунок 5.6).



а – пробанд (34 года), б – дочь пробанда (6 лет).

Рисунок 5.6 – Различная фенотипическая экспрессивность мутации с.1032+6Т>G внутри одной семьи

5.4.4 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с крупными делециями *PAX6*

В анализ вошли 14 пациентов с крупными делециями региона 11p13, не включая пробандов с делециями 3'-*цис*-регуляторного региона гена *PAX6* (7 человек). Фенотипическая картина крупных делеций *PAX6* складывалась из

«классических» аниридийных проявлений, включая полную аниридию ($p=0,028$), нистагм ($p=0,037$), АК ($p=0,049$), гипоплазию макулы ($p=0,037$) и 4-ю степень фовеальной гипоплазии по данным ОКТ ($p=0,004$). (Таблица 5.7).

Таблица 5.7 – Оценка взаимосвязей между клиническими проявлениями *РАХ6*-ВА и крупными делециями *РАХ6*

Клинические признаки		Критерий Фишера	Отношение правдоподобия
Аниридия	полная	0,02816	1,25455
	частичная	0,02816	0
Нистагм		0,03755	1,23214
Кератопатия		0,04994	1,18966
Катаракта		0,09039	0,72125
Глаукома		0,17037	1,28571
Гипоплазия макулы		0,03783	1,17978
Гипоплазия фовеа	4-й степени	0,00446	1,52551
Микрокорнеа		0,63299	0
Микрофтальм		0,2589	1,64286
Косоглазие		0,25753	0,98571
Птоз		0,1033	1,64286
Степень тяжести фенотипа	средняя	0,2263	1,06564

5.4.5 Фенотипическая картина врожденной аниридии, ассоциированной с делециями 3'-*цис*-регуляторного региона *РАХ6*

Частота данного типа делеций в нашей когорте пациентов составила 10,1% (7/69 пробандов). Важной отличительной особенностью делеций 3'-*цис*-регуляторного региона гена *РАХ6* стало отсутствие характерных для *РАХ6*-ВА признаков, таких как нистагм ($p=0,000$), АК ($p=0,000$) и гипоплазия макулы ($p=0,000$). Гипоплазия фовеа достоверно чаще отсутствовала или была представлена 1-й и 2-й степенями недоразвития центральной ямки ($p=0,008$). Тяжесть фенотипа делеций 3'-*цис*-регуляторной области *РАХ6* соответствовала легкой степени ($p=0,000$) (Таблица 5.8).

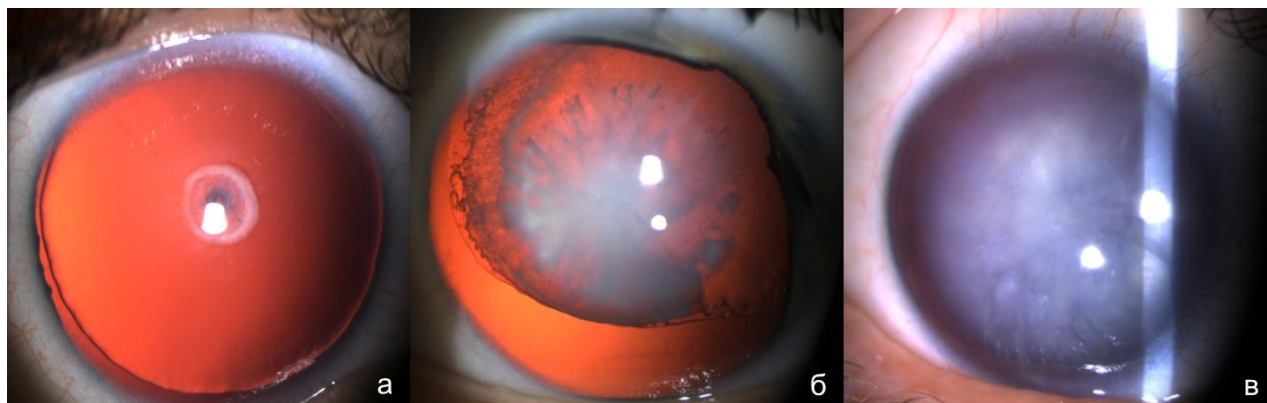
Таблица 5.8 – Оценка взаимосвязей между клиническими проявлениями *РАХ6*-ВА и делециями 3'-*цис*-регуляторного региона *РАХ6*

Клинические признаки		Критерий Фишера	Отношение правдоподобия
Аниридия	полная	0,29342	0,8961
	частичная	0,29342	1,40816
Нистагм		0,0000	0
Отсутствие кератопатии		0,0000	6,27273
Катаракта		0,3075	0,96167
Глаукома		0,1251	0,6
Отсутствие гипоплазии макулы		0,0000	9,85714
Гипоплазия фовеа	0-й степени	0,00895	9,85714
	1-й степени	0,00895	9,85714
	2-й степени	0,00895	9,85714
Микрокорнеа		0,80605	0
Микрофтальм		0,51281	0
Косоглазие		0,07962	0
Птоз		0,16415	0
Степень тяжести фенотипа	легкая	0,000	9,85714

Отсутствие признаков АК подтверждалось не только клинически определяемой прозрачностью глазной поверхности, отсутствием периферического помутнения роговицы, но и данными морфологических исследований *in vivo*, представленными в разделе 4.1. У всех семи пациентов с делецией 3'-*цис*-регуляторного региона гена *РАХ6*, обследованных с помощью ЛСКМ, были обнаружены сохранные или частично деформированные ЛПФ (см. Рисунки 4.1, 4.2). Катарактальные изменения на фоне изучаемой мутации были отмечены в 85,7% глаз, их характер варьировал от полярных помутнений в детском возрасте до полной осложненной катаракты с элементами набухания у взрослых пациентов. У трех пациентов наблюдалось перерастяжение нижних цинновых связок со смещением хрусталика кверху (Рисунок 5.7).

Результаты офтальмоскопии были сопоставимы с данными спектральной ОКТ, которые подтверждали наличие фовеального углубления и сохранность макулярного интерфейса. Из 13 пациентов у 5 – была выявлена 1-

я степень гипоплазии фовеа, у 2 – 2-я степень гипоплазии, у 4 пациентов был обнаружен нормальный ретинальный интерфейс. В двух случаях фовеальную область по данным ОКТ оценить не удалось в связи с трудностями визуализации глазного дна (деструкция стекловидного тела, вторичная катаракта) и малым возрастом обследуемого пациента.



а – передняя полярная катаракта; б – эктопия хрусталика кверху; в – полная осложненная катаракта.

Рисунок 5.7 – Различная степень помутнения хрусталика и аномалии его положения у пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторного региона гена *PAX6*

У 10 пациентов было отмечено полное отсутствие радужной ткани, сочетающееся с изменениями в дренажной системе глаза. В трех случаях наблюдалась остаточная радужная ткань в верхненосовом квадранте с частичным сохранением зрачковой каймы. По данным гониоскопии у детей в проекции УПК обнаруживалась мезенхимальная ткань, структуры УПК не прослеживались, у взрослых локально или на всем протяжении УПК был прикрыт корнем радужки.

5.4.6 Сравнительный анализ фенотипических проявлений *PAX6*-ВА

Был выполнен сравнительный анализ клинических проявлений *Lof* мутаций с крупными делециями *PAX6* в сопоставимых по возрасту группах пробандов ($p=0,65$), который подтвердил отсутствие различий между этими категориями пациентов, фенотипически характеризующимися одинаковой картиной «классической» *PAX6*-ВА (Таблица 5.9).

Таблица 5.9 – Сравнительный анализ фенотипа крупных делеций *PAX6* и Lof мутаций

Клинические признаки	Делеции <i>PAX6</i>	Lof мутации	p
Острота зрения	0,076±0,06	0,081±0,06	0,95*
АК, % встречаемости	100	100	1,0**
Полная аниридия, % встречаемости	100	90,6	0,54**
Нистагм, % встречаемости	100	93,7	1,0**
ЛПФ/палисадоподобные структуры, % встречаемости	7,1	3,1	0,52**
Катаракта, % встречаемости	85,7	84,4	1,0**
Подвывих хрусталика, % встречаемости	35,7	32,2	1,0**
Глаукома, % встречаемости	42,8	34,3	0,74**
Гипоплазия фовеа, 4-я степень, % встречаемости	100	95,6	1,0**

Сравнительный анализ клинических проявлений *PAX6*-ВА у пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* и Lof мутациями в сопоставимых по возрасту группах (p=0,97) (Таблица 5.10).

Таблица 5.10 – Сравнительный анализ фенотипа делеций 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* и Lof мутаций

Клинические признаки	Делеции 3'- <i>цис</i> -регуляторной области <i>PAX6</i>	Lof мутации	p
Острота зрения	0,45±0,23	0,081±0,06	0,000*
АК, стадия	0	I–IV	0,000**
Полная аниридия, % встречаемости	71,4	90,6	0,21**
Нистагм, % встречаемости	0	93,7	0,000**
ЛПФ/палисадоподобные структуры, % встречаемости	100	3,1	0,000**
Катаракта, % встречаемости	85,7	84,4	1,0**
Подвывих хрусталика, % встречаемости	42,8	32,2	0,67**
Глаукома, % встречаемости	14,3	34,3	0,40**
Гипоплазия фовеа, степень	0–2-я	3–4-я	0,000**

* По Манну – Уитни.

** Двухсторонний точный критерий Фишера.

Отличительные признаки пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторного региона гена *PAX6* были представлены высокой остротой зрения ($p=0,000$), отсутствием нистагма ($p=0,000$), АК ($p=0,000$), наличием лимбальных прогениторных структур ($p=0,000$), структурной сохранностью макулярной области ($p=0,000$), которые во многом определяли легкую степень тяжести глазного фенотипа. Различия в частоте развития катаракты, глаукомы и эктопии хрусталика в обеих группах были статистически незначимы ($p=1,0$; $p=0,40$; $p=0,67$ соответственно).

Таким образом, анализ гено-фенотипических взаимосвязей позволил нам выявить сходства и различия аниридийных фенотипов с потенциально отличающимися механизмами. Механизм гаплонедостаточности, лежащий в основе инактивирующих мутаций и делеций гена *PAX6* (без учета делеций 3'-*цис*-регуляторного региона *PAX6*), приводил к формированию классического фенотипа *PAX6*-ВА с одинаковой частотой клинических проявлений в обеих группах ($p>0,05$). Полная аниридия, нистагм, АК, катаракта, гипоплазии макулы, *fovea plana*, небольшая доля глаз с сохранными прогениторными структурами лимба, низкая острота зрения во многом определяли плохой зрительный прогноз и тяжесть течения заболевания.

От клинической картины пациентов с мутациями в кодирующей области гена *PAX6* значительно отличались фенотипические проявления делеций 3'-*цис*-регуляторного региона *PAX6*. Результаты оценки значений по критерию Фишера и отношения правдоподобия подтвердили наличие взаимосвязей между данным типом мутаций и отсутствием нистагма, гипоплазии фовеа и АК. Полученные ОКТ-изображения ретинального интерфейса впервые позволили оценить структурную сохранность фовеальной области и степень ее гипоплазии, данные ЛСКМ подтвердили наличие прогениторных лимбальных структур и явились в целом предикторами благоприятного зрительного прогноза и хорошей переносимости оперативных вмешательств у данной категории пациентов.

Фенотипическая изменчивость и вариабельность клинической картины *РАХ6*-ВА в большей мере были характерны для миссенс-мутаций и мутаций, изменяющих сплайсинг. Аниридийные проявления, ассоциированные с этими типами мутаций, отличались большей сохранностью радужной ткани в виде корэктопии, колобомоподобных и эллиптических дефектов радужной оболочки ($p < 0,05$). Мутации, нарушающие нормальный сплайсинг, характеризовались наличием гипоплазии макулы ($p = 0,025$), но в то же время не сопровождалась только тяжелой степенью гипоплазии фовеа, определяемой по ОКТ. Ни в одном случае не было выявлено взаимосвязей между типами мутаций в *РАХ6* и видами клинической рефракции, птозом, развитием глаукомы. В целом, не было выявлено значимых взаимосвязей между степенью тяжести окулярного фенотипа и типом мутационных изменений, за исключением делеций 3'-*цис*-регуляторного региона гена *РАХ6*, которые характеризовались легким течением глазных проявлений.

5.5 Влияние результатов молекулярно-генетического анализа на фенотипические проявления аниридийной кератопатии

С целью оценки влияния результатов молекулярной диагностики на фенотипические проявления АК были изучены ее особенности в зависимости от возраста и типа мутационных изменений в *РАХ6*.

У всех пациентов с 0-й стадией АК, обследованных с помощью ЛСКМ, генетическая причина *РАХ6*-ВА была связана с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *РАХ6*. Обнаружение лимбальных прогениторных структур у этой группы пациентов обеспечивало неосложненное течение АК и могло влиять на характеристику общей популяции пациентов с ВА. Так, анализ общей популяции пациентов без учета данных молекулярной диагностики выявил наличие положительной связи между возрастом субъекта и стадией АК ($r_s = 0,344$, $p < 0,05$). Дальнейшее рассмотрение этой зависимости в подгруппе пациентов без учета делеций 3'-*цис*-регуляторного региона гена *РАХ6* показало усиление корреляционной связи ($r_s = 0,512$, $p < 0,05$). Детальный

анализ зависимости тяжести АК от возраста пациента отдельно для каждого подтипа мутационных изменений выявил наличие следующих взаимосвязей (Таблица 5.11).

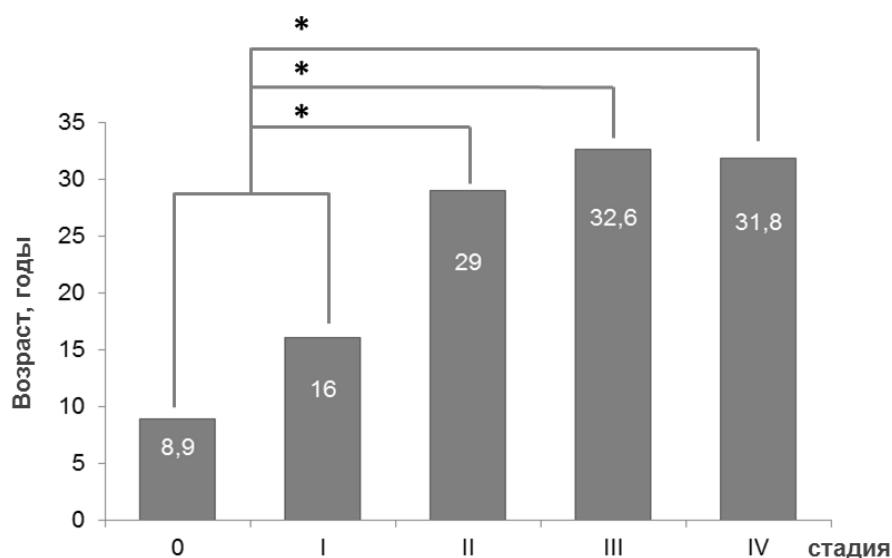
Таблица 5.11 – Взаимосвязь между возрастом пациента и тяжестью АК в зависимости от типа мутационных изменений в *PAX6*

Тип мутаций	Тяжесть АК	Тяжесть фенотипа
Миссенс-мутации	-0,258	-
Инактивирующие мутации	0,495*	0,377*
Мутации, изменяющие сплайсинг	0,543*	0,597*
Делеций 3'- <i>цис</i> -регуляторной области гена <i>PAX6</i>	0,433	0,272
Крупные делеции, затрагивающие ген <i>PAX6</i>	0,614*	0,273

* Взаимосвязь статистически значима, $p < 0,05$.

Состояние роговицы у пациентов с миссенс-мутациями не имело тенденции к ухудшению, что подкреплялось обнаружением ФСП по данным ОКТ. Однако в связи с небольшой частотой несинонимичных замен ($n=3$ пробанда) и неизвестным функциональным исходом малых мутаций в исследуемой выборке следует продолжить накопление знаний для точной интерпретации полученных результатов. Прогрессирование АК с возрастом было отмечено у субъектов с инактивирующими (Lof) мутациями, мутациями, изменяющими нормальный сплайсинг, и крупными делециями. Ранее выполненный анализ результатов ЛСКМ в группе пациентов с аналогичным спектром генетических изменений выявил деформированные палисадоподобные лимбальные структуры только в 10,3% случаев, что объясняет тенденцию к утяжелению стадии АК с возрастом (Приложение Б).

Полученные результаты дополнительно подтверждаются анализом общей популяции пациентов без деления на возрастные категории и без включения в оценку субъектов с делециями 3'-*цис*-регуляторного региона гена *PAX6*. Анализ показал достоверную разницу в возрасте пациентов с начальными (0–I) и более продвинутыми (II–IV) стадиями АК ($p_H=0,000$) (Рисунок 5.8).



* Разница статистически достоверна.

Рисунок 5.8 – Возраст пациентов в разных стадиях АК без учета пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторного региона гена *PAX6*

Таким образом, оценка результатов клинко-морфологической диагностики роговицы в сочетании с мутационным анализом позволила выделить благоприятный клинко-генетический вариант АК, ассоциированный с делециями 3'-*цис*-регуляторной области и характеризующийся 0-й стадией АК, сохранными ЛПФ и стабильностью корнеального статуса вне зависимости от возраста и хирургических вмешательств в анамнезе. Другой клинко-генетический вариант АК был ассоциирован с мутациями, затрагивающими кодирующую часть гена *PAX6*, и характеризовался отсутствием полноценных лимбальных герминативных структур, неоднородной тяжестью АК и склонностью к ее прогрессированию с течением времени и после хирургических вмешательств.

При рутинном анализе выборки пациентов с *PAX6*-ВА или выполнении кросс-когортных сравнений следует учитывать частоту встречаемости делеций 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6*, которые могут сглаживать тяжесть проявлений АК и влиять на характеристику офтальмологического статуса исследуемой группы в целом.

5.6 Разработка клинико-диагностического алгоритма исследований для прогнозирования течения *РАХ6*-ассоциированной врожденной аниридии

На основе комплексной оценки офтальмологических проявлений *РАХ6*-ВА, с учетом прогрессирующего характера глазных изменений, результатов клинико-морфологических исследований роговицы с выявлением сохранных прогениторных структур лимба и признаков НЛСК, анализа генотипических зависимостей между типом мутационных изменений и поражением структур глаза был разработан клинико-диагностический алгоритм прогнозирования течения *РАХ6*-ВА (Рисунок 5.9).

Первый этап прогнозирования течения *РАХ6*-ВА складывается из комплексного клинико-функционального обследования, включающего детальную оценку изменений переднего и заднего отрезков глаза. Офтальмологический статус пациентов с ВА более чем в 70% случаев состоит из полной аниридии, нистагма, кератопатии, помутнений хрусталика, гипоплазии фовеа и рефракционных нарушений, которые в совокупности могут быть рассмотрены в качестве «классического» фенотипа *РАХ6*-ВА. В то же время характеристика общей популяции пациентов без возрастных градаций нивелирует разницу в частоте прогрессирующих глазных проявлений между субъектами разных возрастных групп. Следует учитывать, что начальные стадии АК (0–I стадии) с заметным преобладанием наблюдаются у детей и подростков до 18 лет по сравнению со взрослыми пациентами (81,3 и 43,1% соответственно, $p=0,000$). Более тяжелые стадии АК (III–IV), приводящие к снижению центрального зрения, чаще встречаются у субъектов старше 20 лет, чем у детей от 0 до 10 лет включительно ($p<0,008$). Кроме этого, обнаружено отрицательное прогностическое влияние двух и более хирургических манипуляций в области лимба на сохранение исходной стадии АК. Прогрессирующее влияние временного фактора также отмечено в отношении увеличения случаев опущения верхнего века ($p=0,032$) и усиления выраженности птоза у пациентов старшей возрастной группы ($r_s=0,4$, $p<0,05$).

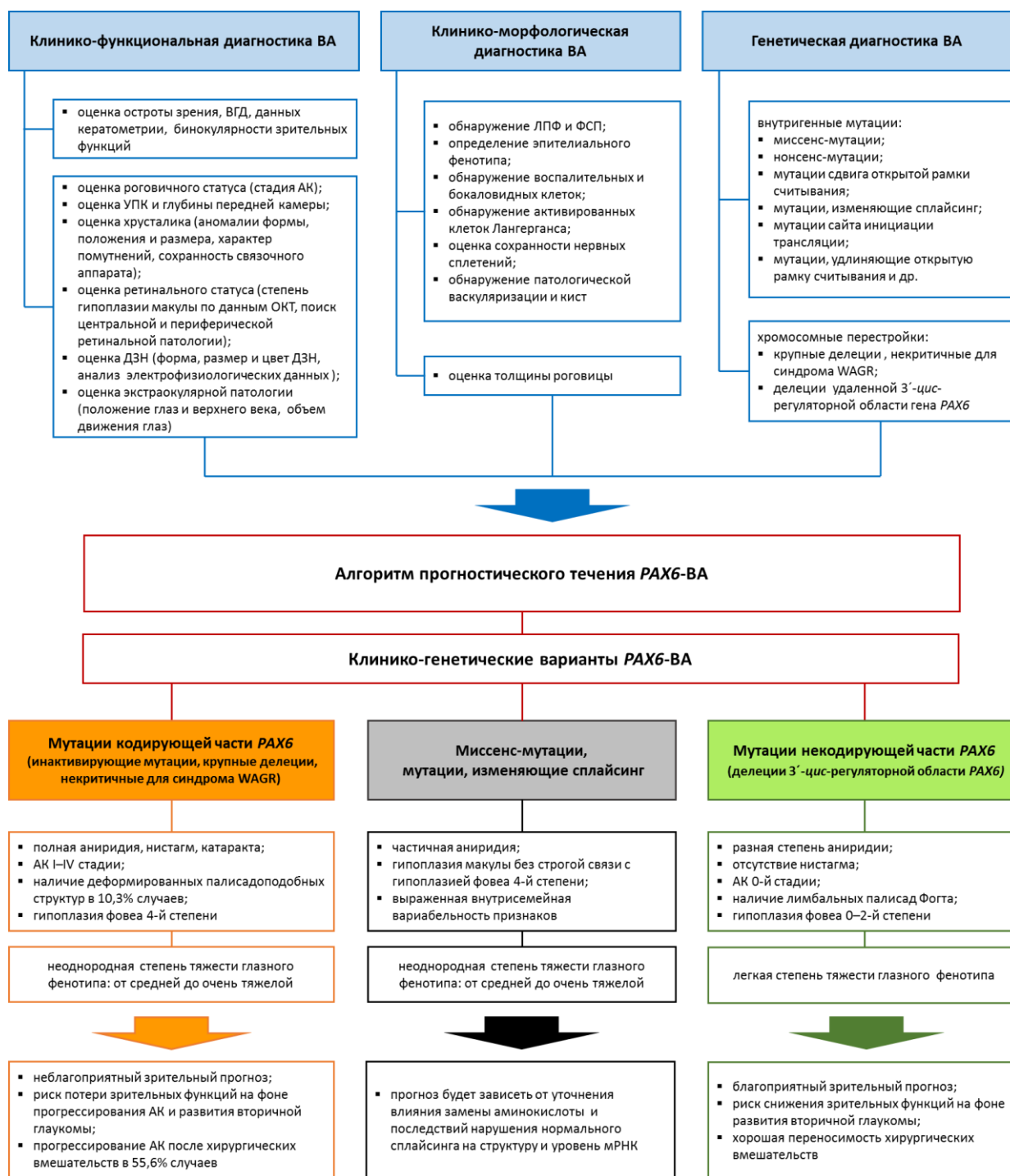


Рисунок 5.9 – Клинико-диагностический алгоритм исследований для прогнозирования течения PAX6-BA

Несмотря на то, что степень презентации радужной ткани с возрастом не меняется, ее объем важен в вопросах прогнозирования структурной сохранности дренажной системы глаза. В ходе исследования обнаружена корреляционная связь между объемом радужной ткани и сохранностью структур УПК ($r_s=0,311$, $p=0,01$), а также отмечена слабая зависимость между

степенью презентации радужной оболочки и развитием глаукомы ($r_s = -0,26$, $p < 0,05$). В глазах с гипоплазией радужной оболочки или эффектом псевдополикории визуализируются все структуры УПК без признаков гониодисгенеза в отличие от глаз с полной аниридией, в которых аномалии развития УПК включают иридокорнеальные сращения, отсутствие шлеммова канала, высокое прикрепление корня радужки и пр. Факт наличия взаимосвязи между объемом радужной ткани и зрелостью дренажной системы может рассматриваться в качестве прогностического, учитывая трудность выполнения гониоскопии в глазах с выраженным нистагмом и поздними стадиями АК. В то же время наблюдаемые явления гониодисгенеза у пациентов с *РАХ6*-ВА не приводят к превалированию случаев врожденной глаукомы и не влияют на частоту развития вторичной глаукомы у пациентов младшей и старшей возрастных групп (32,6 и 31,3% соответственно, $p = 1,0$), так же как и хирургические вмешательства не влияют на время дебюта декомпенсации ВГД в интактных и уже прооперированных глазах ($p_{M-U} = 0,82$).

В ходе изучения влияния временного фактора на течение катарактального процесса было показано увеличение встречаемости катаракты ($p = 0,000$), подвывиха хрусталика ($p = 0,046$) и изменения типа хрусталиковых помутнений с возрастом. У пациентов младшей возрастной группы в 51,7% случаев превалируют врожденные полярные помутнения, частота которых у взрослых пациентов не превышает 13%. Отсутствие достоверной разницы в остроте зрения у пациентов с дискретными полярными помутнениями хрусталика и без них ($p = 0,83$) свидетельствует о недоказанности депривирующего влияния подобных помутнений на зрительные функции и объясняет неоправданность ранней хирургии катаракты в педиатрической практике.

Функциональный анализ подтверждает отсутствие достоверной разницы в средних значениях МКОЗ после устранения катарактальных помутнений и средних показателях астигматизма между пациентами младшей и старшей возрастных групп ($p = 0,062$ и $p = 0,07$ соответственно). В то же время различия в количестве пациентов с остротой зрения, соответствующей слепоте по критериям ВОЗ, являются значимыми и составляют 13% педиатрических

пациентов и 37,5% субъектов старшего возраста ($p=0,026$, χ^2). В ходе исследований выявлена отрицательная корреляционная связь умеренной силы между структурной сохранностью макулярной области, оцененной по данным ОКТ, и остротой зрения ($r_s=-0,47$, $p<0,05$). В связи с этим степень гипоплазии фовеа у пациентов с *РАХ6*-ВА может быть рассмотрена в качестве относительного предиктора максимальной остроты зрения.

Второй этап диагностического алгоритма включает изучение морфологических изменений периферических и центральных отделов роговицы по данным ЛСКМ, которое позволяет выделить пациентов с благоприятным и неблагоприятным прогнозами течения АК. В первую группу входят пациенты с 0 стадией АК, роговичным фенотипом эпителиальной поверхности, наличием ЛПФ и отсутствием признаков иммунной активации. Вторую группу независимо от возраста составляют пациенты с разными стадиями АК от I до IV, у которых по данным ЛСКМ не определяются или с трудом визуализируются деформированные палисадоподобные лимбальные структуры, наблюдается инвазия воспалительных и бокаловидных клеток, конъюнктивальная трансформация роговичного эпителия и активация МНС II-позитивных (Major Histocompatibility Complex) дендритных клеток. Прогностически благоприятная роль герминативных структур лимба подтверждается поддержанием прозрачности роговицы и отсутствием признаков прогрессирования АК в отдаленные сроки после интраокулярных хирургических вмешательств.

Третий этап. Учитывая тот факт, что *РАХ6*-ВА является генетически детерминированным ВПР органа зрения, выполнение генетического анализа с целью верификации причинной мутации является обязательным условием подтверждения клинического диагноза и исключения жизнеугрожающего синдрома WAGR. В ходе молекулярной диагностики выявляют малые внутригенные мутации (несинонимичные замены, нонсенс-мутации, мутации сдвига открытой рамки считывания, мутации, нарушающие нормальный сплайсинг, мутации сайта инициации трансляции, СТЕ мутации и др.) и

крупные хромосомные перестройки с захватом региона 11p13 (делеции удаленных 3'-*цис*-регуляторных областей гена *PAX6*, делеции WAGR-области и пр.). Верификация каузативного варианта нуклеотидной последовательности вместе с информацией о клинических и морфологических проявлениях данного ВПР у конкретного индивидуума позволяет клиницисту прогнозировать дальнейшее течение *PAX6*-ВА.

Четвертый этап клинико-диагностического алгоритма складывается из оценки гено-фенотипических зависимостей между разными типами мутационных изменений и клиническими признаками *PAX6*-ВА. На этом этапе проведенный анализ мутационных взаимосвязей позволил выявить значительную разницу в фенотипических проявлениях *PAX6*-ВА в группах пациентов с делециями удаленной 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* и субъектов с мутациями, захватывающими кодирующую часть гена *PAX6* (инактивирующие мутации, делеции региона 11p13). Отдельную группу составляют пациенты с несинонимичными заменами, интронными вариантами и изменениями последовательностей сайта сплайсинга с неизвестным клиническим значением. Дальнейшая оценка прогностической роли данных мутаций требует функционального анализа их патогенного влияния на структуру мРНК и функцию белка.

Реализация представленного алгоритма позволила выделить два клинико-генетических варианта течения *PAX6*-ВА. Благоприятный зрительный прогноз связан с хромосомными перестройками, не затрагивающими кодирующие участки гена *PAX6* (делеции удаленной 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6*), которые характеризуются отсутствием нистагма, 0 стадией АК, структурной сохранностью фовеальной области и легкой степенью тяжести глазного фенотипа. Начальные степени гипоплазии фовеа, отсутствие нистагма объясняют относительно высокую остроту зрения в этой группе пациентов, а наличие лимбальных прогениторных структур с отсутствием признаков НЛСК, подтвержденных результатами обследования *in vivo*, является гарантом сохранения прозрачности роговицы независимо от возраста и хирургических вмешательств. Опасность снижения зрительных функций при этом клинико-

генетическом варианте заключается в развитии вторичной глаукомы, частота которой не зависит от типа мутационных изменений.

Несмотря на генетическую неоднородность мутаций кодирующей части *PAX6* (инактивирующие мутации и крупные делеции региона 11p13), их объединяет единый механизм формирования классического аниридийного фенотипа, основанный на реализации эффекта гаплонедостаточности. Пациенты с данным клинико-генетическим вариантом течения *PAX6*-ВА характеризуются более низкой остротой зрения, связанной с тяжелыми степенями гипоплазии фовеа и нистагмом. Отсутствие пролиферативного потенциала лимбальной области по данным ЛСКМ приводит к прогрессированию АК, увеличению ее тяжести с возрастом и после хирургических вмешательств в 55,6% случаев. Высокая частота АК и гипоплазии фовеа во многом определяет неоднородную тяжесть глазного фенотипа (от средней до очень тяжелой). Риск потери зрительных функций в этой группе чаще всего ассоциирован со случаями декомпенсации ВГД и снижения прозрачности роговицы.

Практическое применение разработанного прогностического алгоритма течения *PAX6*-ВА представлено следующими клиническими примерами.

Клинический пример № 1

Пациентка Ч., 55 лет, обратилась с жалобами на низкую остроту зрения обоих глаз в течение последнего года. Диагноз OU: Врожденная аниридия. Кератопатия 0 стадии. Полная осложненная катаракта.

Генетический анализ выявил делецию 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* без захвата кодирующей части *PAX6* (*DCDC1-ELP4*). При биомикроскопии была обнаружена полностью прозрачная роговица без признаков НЛСК. Анализ данных ЛСКМ выявил роговичный эпителиальный фенотип и сохранные ЛПФ верхнего и нижнего лимба. Обследование глазного дна было невозможным из-за выраженности катарактальных помутнений. Тяжесть глазного фенотипа соответствовала легкой степени. Острота зрения правого глаза была равна правильной светопроекции, левого глаза – 0,01 с невозможностью коррекции.

Согласно разработанному клинико-диагностическому алгоритму, основываясь на данных офтальмологического осмотра (отсутствие нистагма, 0 стадия АК), учитывая данные генетической экспертизы (мутация, не затрагивающая кодирующую часть *PAX6*) и сохранность лимбальных прогениторных структур по данным ЛСКМ, следует отнести этот случай к клинико-генетическому варианту *PAX6*-ВА с благоприятным прогнозом течения и возможностью получения более высокой послеоперационной остроты зрения.

Пациентке на правом глазу была выполнена ФЭК с имплантацией ИОЛ. В послеоперационном периоде острота зрения на правом глазу составила 0,6. ОКТ центральной зоны сетчатки подтвердила структурную сохранность фовеальной области (отсутствие гипоплазии фовеа). Пациентке был рекомендован мониторинг ВГД один раз в 6–8 месяцев, учитывая независимый от типа мутации риск развития вторичной глаукомы. Пациентка была полностью удовлетворена результатами операции. Двухлетний срок наблюдения не выявил потерю прозрачности роговицы на правом глазу, уровень ВГД не превысил нормальных значений.

Клинический пример № 2

Пациентка Б., 33 года. Диагноз OU: Врожденная аниридия. Нистагм. Кератопатия II стадии. Полная осложненная катаракта. Подвывих хрусталика. Гипоплазия фовеа 4-й степени.

Проведенный генетический анализ выявил делецию одного нуклеотида в экзоне 7 гена *PAX6* (с.491delC), которая привела к сдвигу открытой рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона. Данная инактивирующая мутация стала причиной формирования классического аниридийного фенотипа за счет реализации эффекта гаплонедостаточности. II стадия АК характеризовалась периферическим помутнением роговицы с вращением новообразованных сосудов. По данным ЛСКМ прогениторные структуры в лимбальной зоне не были выявлены. На периферии роговицы наблюдалось внедрение конъюнктивальной ткани в виде конъюнктивальных островков, разрушение лимбального барьера сопровождалось появлением в

роговице единичных клеток воспаления и бокаловидных клеток. Исходная острота зрения с коррекцией составила 0,1.

Учитывая II стадию АК, нистагм, значимый подвывих хрусталика, гипоплазию фовеа 4-й степени, отсутствие ЛПФ и инактивирующий характер мутационных изменений, согласно разработанному клинко-диагностическому алгоритму пациентка была отнесена к неблагоприятному клинко-генетическому варианту *РАХ6-ВА*. В послеоперационном периоде отсутствие значимого улучшения остроты зрения могло сочетаться с высоким риском прогрессирования АК.

Пациентке была выполнена интракапсулярная экстракция катаракты без имплантации ИОЛ, учитывая выраженный подвывих хрусталика. Ранний послеоперационный период протекал без особенностей, острота зрения с коррекцией сохранялась на прежнем уровне (0,1). Однако через 3 месяца были отмечены признаки прогрессирования АК по всей окружности роговицы. Биомикроскопически определялось изменение характера роговичного эпителия, потеря его прозрачности, зона эпителиопатии продвигалась в центральные отделы роговицы, в области послеоперационного разреза по верхнему лимбу появились локальные субэпителиальные помутнения, усугубились жалобы пациентки на чувство дискомфорта и усиление светобоязни. Через год после оперативного вмешательства было отмечено снижение корригированной остроты зрения до 0,05 на фоне потери прозрачности центральных отделов роговицы. Уровень ВГД в течение всего периода наблюдения соответствовал нормативным показателям.

Таким образом, разработанный клинко-диагностический алгоритм обследований пациентов с ВА позволяет учитывать различные генетические механизмы формирования аниридийного фенотипа, проводить комплексную оценку особенностей офтальмологического статуса и анализ клинко-морфологических изменений роговицы с целью прогнозирования течения *РАХ6-ВА*, предсказания послеоперационных результатов и возможных послеоперационных осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Врожденная аниридия является редким врожденным пороком, характеризующимся аномальным развитием почти всех внутриглазных структур. Клинические проявления ВА в 90% случаев обусловлены гетерозиготными аутосомно-доминантными мутациями в гене *PAX6*, хромосомными перестройками, захватывающими локус 11p13 или делециями удаленной 3'-*цис*-регуляторной области [33; 99; 143; 185]. Плейотропность действия *PAX6* вызывает комплексное поражение глазных и экстраокулярных структур, включая роговицу, хрусталик, радужную оболочку, структуры УПК, сетчатку, ДЗН, а также многочисленные системные нарушения, затрагивающие ЦНС, желудочно-кишечный тракт и мочеполовую систему.

Многие клинические проявления *PAX6*-ВА (дефекты радужной оболочки, нистагм, гипоплазия фовеа и ДЗН) диагностируются при рождении, другие – возникают с возрастом (АК, помутнение хрусталика, вторичная глаукома) [131], приводя к дополнительному снижению зрительных функций [223]. Прогрессирующий характер окулярных изменений требует от врачей постоянного медикаментозного и хирургического сопровождения. Однако многие лечебные стратегии, существующие на сегодняшний день, не имеют достаточного терапевтического и хирургического эффекта. Успех СКП нивелируется через 1–3 года после операции в связи с прогрессированием признаков АК на поверхности донорского материала [234], не более 50% глаукомных пациентов достигают нормотонуса даже после нескольких АГО [8], а оптико-реконструктивная реабилитация пациентов несет в себе риск декомпенсации ВГД [15; 84; 156; 171; 174; 189; 193; 227], прогрессирования АК [15; 156; 189; 193] и развития АФС в 5% случаев [239]. Таким образом, недостаточные успехи терапевтического и хирургического сопровождения требуют определения клинических признаков, имеющих прогностическое значение для течения заболевания в будущем.

Отсутствие сведений о глазных проявлениях *РАХ6*-ВА у пациентов Российской Федерации и особенностях манифестации ВА в детском возрасте послужило причиной изучения клинических и генетических аспектов данного порока развития. В то же время широкий спектр клинических фенотипов, варьирующих по степени тяжести глазных проявлений, отсутствие понимания гено-фенотипического взаимодействия, разнообразность клинических последствий различных типов мутаций требуют внимания к проблеме прогнозирования течения *РАХ6*-ВА с целью выработки алгоритма ведения и реабилитации данной категории пациентов.

Целью настоящей работы стала разработка клинико-диагностического алгоритма прогнозирования течения *РАХ6*-ВА на основе комплекса клинико-функциональных, морфологических и генетических исследований.

Первоначальной задачей исследовательской работы стала оценка клинико-функциональных особенностей аниридийного глаза в разных возрастных категориях с целью обнаружения критически значимых проявлений *РАХ6*-ВА. Далее на основе результатов ЛСКМ был изучен характер морфологических изменений центральных и периферических отделов роговицы на разных стадиях АК и оценена прогностическая роль лимбальных прогениторных структур в сохранении прозрачности роговицы после хирургических вмешательств. Последующий мутационный анализ гена *РАХ6* позволил разработать алгоритм выявления и оценки гено-фенотипических зависимостей на основе вероятностной модели с использованием критерия Фишера и отношения правдоподобия. Это дало возможность изучить гено-фенотипическую взаимосвязь между типом мутаций в гене *РАХ6* и регионе 11p13 с клиническими проявлениями ВА и на их основе разработать клинико-диагностический алгоритм прогнозирования течения *РАХ6*-ВА и индивидуализировать подходы к ведению пациентов с данной офтальмопатологией.

В рамках исследовательской работы было обследовано 110 пациентов (220 глаз) из 79 неродственных семей с генетически подтвержденным

диагнозом *РАХ6-ВА*. Средний период наблюдения за больными составил 3 года (от 6 месяцев до 14 лет). Средний возраст пациентов на момент первоначального визита был равен $22,6 \pm 16,6$ лет (от 2 месяцев до 67 лет). Соотношение мужчин и женщин составило 1:1,3.

С целью выявления возрастных особенностей течения заболевания все пациенты были разделены на две группы: дети и подростки до 18 лет (46 человек), средний возраст которых составил $6,2 \pm 5$ лет (Me – 4,8 года), и пациенты старшей возрастной категории (64 человека) в возрасте $34,7 \pm 10$ лет (Me – 33 года). Влияние временного фактора на прогрессирование глазных проявлений *РАХ6-ВА* было характерно для катаракты ($p=0,000$), подвывиха хрусталика ($p=0,046$) и птоза ($p=0,032$). Частота развития АК, глаукомы, косоглазия и аномалий рефракции не зависела от возраста ($p>0,05$). Перманентный и непрогрессирующий характер течения был отмечен для нистагма, гипоплазии ДЗН и фовеа, признаков, присутствующих с рождения и не приводящих к снижению зрения в течение жизни.

Частота встречаемости различных глазных проявлений в популяции российских пациентов с *РАХ6-ВА* была сопоставима с данными других литературных источников (Таблица 6.1). Значительная разнородность представленных выборок в связи с отсутствием данных мутационного анализа, различные способы получения информации (ретроспективный анализ, анкетирование пациентов) делали прямые кросс-когортные сравнения невозможными, однако свидетельствовали о паночулярном характере глазных проявлений *РАХ6-ВА*.

Наиболее частыми признаками, сопутствующими *РАХ6-ВА*, стали полная аниридия, нистагм, катаракта, гипоплазия фовеа, аномалии рефракции, которые встречались более чем в 70% глаз. В то же время некоторые авторы не включали в общую картину *РАХ6-ВА* кератопатию и катаракту, описывая лишь 50%-ную частоту данных симптомов в исследуемой выборке [68].

Таблица 6.1 – Клиническая характеристика аниридийных выборок по данным различных литературных источников

Клинически е признаки	Литературные данные, n – количество пациентов в исследовании, %						Собствен- ные данные, n=110
	Mayer et al., [153], n=80	Singh et al., [217], n=131	Chang et al., [39] n=60	Park et al., [174] n=31	Netland et al., [164] n=83	Hingorani et al., [100] n=43	
Полная аниридия	-	85,6	-	-	-	38	73
Нистагм	80	55,8	68	-	83	95	85
Кератопатия	78	45,4	69	71,6	45	37	79
Катаракта	83	38,5	53	82,5	71	70	84,5
Подвывих хрусталика	-	22,3	-	12,5	-	-	18
Глаукома	52	36,3	20	51,6	46	11,6	31
Гипоплазия фовеа	-	87,7	91	81,8	41	86	85
Гипоплазия ДЗН	-	2,7	-	-	-	23	17,5
Отслойка сетчатки	-	1,1	-	-	1	2,3	1,8
Аномалии рефракции	-	-	-	-	-	49	93,6
Птоз	-	2,3	-	-	-	9,3	20
Микрокорнеа	-	2,7	-	-	-	-	3,7
Микрофтальм	-	2,3	1,7	-	-	-	9,3

По результатам работы, АК встречалась у 75,5% пациентов и представляла собой процесс постепенной фенотипической трансформации роговичного эпителия. Распространённость АК в российской популяции детей и подростков до 18 лет (69,5%) была сопоставима с данными других наблюдательных исследований, акцентированных на изучении роговицы [153]. В то же время в части клинических работ встречаемость патологии роговицы в детском возрасте была значительно недооценена [204]. Проблема обнаружения признаков кератопатии в педиатрической практике обусловлена особенностями осмотра детей и характером течения заболевания в этом периоде. Так, в обследованной группе детей и подростков в 81,3% случаев АК

была представлена I стадией и не сопровождалась жалобами пациентов на светобоязнь и зрительный дискомфорт. Подобное бессимптомное течение в сочетании с диагностическими трудностями обнаружения ранних изменений роговицы объясняет основные причины недооценки АК и искусственного занижения ее распространённости в детском возрасте. Случаи ранней агрессивной кератопатии у детей, угрожающей развитием амблиопии, единичны [73] и чаще всего представлены отеком роговицы на фоне декомпенсированной врожденной глаукомы или корнеолентикулярными сращениями на фоне аномалии Петерса, ассоциированной с мутацией в *PAXB*.

Частота случаев АК у пациентов старше 18 лет составила 79,6%. В 43,1% глаз она была представлена 0–I стадиями АК, что значительно отличается от данных младшей возрастной группы ($p=0,000$). В части работ, не посвященных детальному изучению роговичного статуса, количество случаев АК у взрослых пациентов не превысило 50% [68; 100; 164; 223]. В других работах, с акцентом на проявлениях АК, распространённость клинического признака составила 70–90% [153; 167].

Средние значения возраста пациентов с 0, I, II, III и IV стадиями АК значимо не отличались в обеих возрастных группах ($p>0,05$). В то же время оптически значимые помутнения роговицы (III–IV стадии АК) были выявлены в 9,3 и 21,6% глаз пациентов младшей и старшей возрастных групп соответственно ($p<0,008$). Увеличение случаев потери прозрачности центральных отделов роговицы с возрастом (к 32,4 годам) было связано как с естественным течением АК, так и с выполнением хирургических вмешательств, затрагивающих прогениторную зону и ускоряющих прогрессирование лимбальной недостаточности. Влияние хирургических манипуляций на прогрессирование АК подтверждалось асимметричной скоростью течения АК в парных глазах без/с оперативными вмешательствами в анамнезе. В 100% случаев утяжеление роговичного статуса на 2–3 стадии было обусловлено историей многократных антиглаукомных вмешательств, множественных транссклеральных лазерных циклодеструктивных воздействий, экстракцией катаракты и операциями по поводу отслойки сетчатки.

Учитывая частоту вовлеченности роговицы у пациентов обеих возрастных групп, следует считать АК таким же маркером *РАХ6*-ВА, как отсутствие радужной оболочки, нистагм и гипоплазия фовеа. Даже при минимальных изменениях радужной оболочки на фоне мутаций *РАХ6* признаки декомпенсации роговичного процесса могут выходить на первый план, имитируя картину аутосомно-доминантного наследственного кератита [219].

Другим частым клиническим проявлением *РАХ6*-ВА явилась катаракта, частота которой в исследовании составила 79,1%, что соответствует ее распространённости в выборках пациентов из других стран (82,5–90%) [72; 174]. У российских детей помутнения хрусталика были обнаружены в 63% случаев, в работе норвежских коллег – в 44% [72]. Наблюдаемые в детском возрасте дискретные полярные помутнения хрусталика долгое время оставались стабильными, не приводя к значительному снижению зрительных функций. Сравнение данных визометрии у детей с прозрачными хрусталиками и полярными катарактами не выявило достоверной разницы между группами ($p=0,83$). В дальнейшем ускоренный катарактогенез приводил к появлению легких помутнений на средней периферии хрусталика, преимущественно в задних субкапсулярных слоях. Изменения имели радиальную направленность и постепенно приводили к снижению зрительных функций за счет увеличения их размеров и оптической плотности. Следует отметить, что информация о локализации помутнений хрусталика и сценарий их дальнейшего прогрессирования очень ценны с точки зрения прогнозирования потери прозрачности оптических сред в будущем [39; 72].

Снижение остроты зрения на фоне прогрессирования катарактальных помутнений привело к формированию двух пиков хирургической активности. Первый пик катарактальной хирургии пришелся на возраст 14 лет. В этом временном отрезке врождённые полярные катаракты осложнялись кортикальными помутнениями. Второй пик соответствовал 34 годам и чаще всего характеризовался полной потерей прозрачности хрусталика. Вместе с прогрессированием катарактальных помутнений ($p=0,000$) было отмечено двукратное увеличение случаев эктопий хрусталика с возрастом ($p=0,046$). Количество тяжелых сублюксий со смещением хрусталика в верхнюю

половину возросло с 3,6% у лиц младшей группы до 10% у взрослых пациентов. Изменения связочного аппарата не носили характер инволюционных, а напоминали клиническую картину врожденных эктопий (с. Марфана, с. Вейля – Маркезани). Во всех случаях подвывих хрусталика в детском возрасте наблюдался в глазах после проникающей хирургии врожденной и инфантильной глаукомы. Схожие случаи ассоциации детской глаукомы с эктопией хрусталика были опубликованы J. Dowler с соавторами в 1995 году [66]. В то же время случаи дислокации хрусталика в глазах с нормотонусом в педиатрической практике представлены единичными публикациями [125].

Помимо катаракты и аномалий расположения хрусталика (эктопия) наблюдались аномалии формы (лентиконус, деформации края, колобом хрусталика) и размеров хрусталика (микросферофакия у пациента с сочетанием ВА и с. Марфана). Кроме этого, первое изучение динамических процессов изменения толщины аниридийного хрусталика показало сходный характер временных изменений, описанный ранее для здоровых глаз и включающий процессы его ремоделирования и последующего роста [17]. Несмотря на то, что в младенческом, детском и ювенильном возрасте размеры аниридийного хрусталика соответствовали возрастным нормам группы контроля, в дальнейшем скорость роста значительно отличалась от течения естественного процесса. Так, толщина хрусталика в возрасте 40–50 лет в глазах с РАХ6-ВА составила $3,74 \pm 0,34$ мм, в группе контроля – $4,24 \pm 0,32$ мм ($p_{M-U}=0,022$). По данным ОКТ [196], ультразвуковой биометрии [16; 109], магнитно-резонансной томографии, выполненных *in vivo* [16], сагиттальный размер хрусталика у здоровых пациентов в этом возрасте колебался в пределах 4,0–4,24 мм. Скорость увеличения толщины хрусталика в естественных условиях (0,019 мм/год) значительно превысила полученные нами данные в глазах с РАХ6-ВА (0,008 мм/год). Можно предположить, что отставание в скорости роста хрусталика и достоверное уменьшение его толщины у пациентов старше 30 лет ($p < 0,05$) были обусловлены нарушением и/или прекращением развития вторичных хрусталиковых волокон в аниридийном глазу с возрастом. В то же время данные биометрии

человеческого хрусталика значительно отличались от размеров абортивного хрусталика в мышинных моделях ВА. Полученные в работе результаты повышают вероятность того, что регуляция и/или функция *РАХ6* в хрусталиковых прогениторных клетках мыши и человека различны. Возможно, что хрусталиковые клетки-предшественники сохраняют более «высокие» уровни *РАХ6* в клетках человека по сравнению с клетками грызунов и/или критические мишени *РАХ6*, контролирующие пролиферацию клеток, сохраняют свою активность, несмотря на гаплонедостаточность *РАХ6*.

Наряду с редукцией размеров хрусталика картина дисгенеза переднего отрезка была дополнена уменьшением глубины передней камеры глаза по сравнению с показателями контрольной группы начиная с возраста 4–5 месяцев ($p < 0,05$). Результаты измерений удаленного во время операции хрусталика с выраженной сублюксацией показали значительное уменьшение его вертикального диаметра по сравнению с горизонтальным размером (5,9 и 8,8 мм соответственно). Наблюдаемое смещение хрусталика кверху было обусловлено не только перерастяжением цинновых связок, но в большей степени асимметричным уменьшением истинных размеров самого хрусталика. Можно предположить, что подобный механизм, имитирующий смещение хрусталика кверху, наблюдается и в других глазах с *РАХ6*-ВА и значимым подвывихом хрусталика.

Развитие глаукомы является еще одним фактором, негативно влияющим на зрительный прогноз [39; 230]. Частота ее встречаемости в детском и подростковом возрасте, а также у пациентов старшей возрастной группы была равна 32,6 и 31,3% соответственно. Несмотря на изначально существующее сопротивление оттоку внутриглазной жидкости через измененные структуры УПК, врожденная глаукома у пациентов с *РАХ6*-ВА встречалась довольно редко [45; 69; 163; 174]. В нашем исследовании она составила всего 8,6%.

Полная или частичная аниридии, коррелирующие со степенью сохранности структур УПК ($r_s = 0,311$, $p = 0,01$), в меньшей степени были ассоциированы с развитием глаукомного процесса ($r_s = -0,26$, $p < 0,05$). Несмотря на роль хирургических вмешательств в возникновении новых [47; 163; 174] или декомпенсации старых случаев глаукомы [5; 171], статистически

достоверной разницы между временем дебюта глаукомы в интактных и уже прооперированных глазах взрослых пациентов выявлено не было ($p=0,82$). На предрасположенность к развитию глаукомного процесса указывают и первично возникшее повышение ВГД в глазах без хирургических вмешательств в анамнезе (у пациентов младшей возрастной группы – в 93,3% случаев, у взрослых пациентов – в 47,6% глаз), и двусторонний характер заболевания (80 и 60% пациентов младшей и старшей возрастных групп соответственно), и наблюдаемая при гониоскопии незрелость структур УПК (92%). Плохой зрительный прогноз аниридийной глаукомы был ассоциирован с развитием слепоты у пациентов старшей возрастной группы в 38% случаев, что в 2 раза превышает встречаемость слепоты в сопоставимой выборке пациентов с первичной глаукомой [79; 243].

Кроме того, наблюдение за взрослыми пациентами с длительным стажем неконтролируемого глаукомного процесса позволило выявить случаи формирования интеркалярных стафилом, которые сочетались с удлинением передне-задней оси глаза. Существование подобного компенсаторного механизма у пациентов старше 20 лет можно сравнить с появлением экскавации ДЗН или предположить существование коллагенопатии, возможно, опосредованной мутациями в гене *PAX6* и требующей дальнейшего изучения. Подобные тенденции к истончению передней склеры у пациентов с глаукомным анамнезом были также отмечены К. Gregory-Evans по данным ОКТ переднего отрезка [88].

Несмотря на высокую вероятность развития глаукомы, иногда требуются годы для ее манифестации. Потенциальные опасности вторичной глаукомы для зрения многочисленны и зависят от своевременной постановки диагноза, качества динамического наблюдения и лечения. Сложной является оценка прогноза заболевания, так как течение глаукомы носит прогрессирующий характер. В связи с этим, учитывая риск развития глаукомы в любом возрасте, требуется регулярный диспансерный контроль аниридийных пациентов.

Анализ ретинального статуса выявил особенности центральной и периферической областей сетчатки, возникающие на фоне различных мутаций

в *РАХБ*. Наиболее частым проявлением *РАХБ-ВА* стала картина гипоплазии макулярной области, которая была обнаружена в 89,7% глаз. В 78,7% структурная незрелость центральной ямки сетчатки была представлена 4-й степенью гипоплазии фовеа, что объясняло низкие зрительные функции большинства пациентов с *РАХБ-ВА* и исключало диагноз амблиопии, возникающий у большинства офтальмологов на амбулаторном приеме. В то же время у 5,3% пациентов была отмечена высокая острота зрения (до 0,8), которая сочеталась с нормальным ретинальным профилем центральной зоны сетчатки ($r_s = -0,47$, $p < 0,05$). Дополнительные ретинальные находки предполагали небольшие друзоподобные белесоватые включения в центральной и периферической областях сетчатки, признаки эпиретинального фиброза, отслойку сетчатки, инеевидную дистрофию на фоне высокой степени близорукости. Изменения ДЗН были представлены его гипоплазией в 17,3% случаев, а также нейрооптикопатиями глаукомного и сосудистого генеза.

Данные визометрии показали сопоставимые значения МКОЗ у пациентов младшей и старшей возрастных групп ($0,13 \pm 0,11$ и $0,099 \pm 0,1$ соответственно, $p = 0,062$). Однако, несмотря на одинаковую долю пациентов с остротой зрения менее 0,1 (33 и 53% соответственно, $p = 0,11$), количество случаев слепоты, по критериям ВОЗ [231], значительно увеличивалось с возрастом ($p = 0,026$). Прогрессирующая потеря зрительных функций с 13% в педиатрической группе до 37,5% у взрослых субъектов позволила объективизировать проблему инвалидизации пациентов с *РАХБ-ВА* и подтвердить социальную и медицинскую значимость разработки системы их реабилитации. Исследование рефракции у пациентов с *РАХБ-ВА* выявило тотальное преобладание аметропии в 96,2% случаев в сочетании с иррегулярностью роговицы в 86% глаз. Средние значения астигматизма у пациентов младшей и старшей возрастных групп значимо не отличались друг от друга ($-1,44$ и $-1,06$ дптр соответственно, $p = 0,07$), однако они должны быть учтены при подборе очковой коррекции аметропии и интраокулярной коррекции афакии у данной категории пациентов.

Проблема экстраокулярной патологии у пациентов с *РАХБ-ВА* является наименее разработанным вопросом. Частота косоглазия в изучаемой

популяции пациентов составила 49,1%. На фоне страбизма и некорригированной аметропии стереопсис отсутствовал в 98,2% случаев. Встречаемость птоза имела тенденцию к нарастанию ($p=0,032$), степень опущения верхнего века также была ассоциирована с возрастом ($r_s=0,4$, $p<0,05$). Для пациентов с ВА было характерно появление реактивного «защитного» опущения верхнего века для нивелирования фотофобии и зрительного дискомфорта на фоне тяжелых стадий АК.

Случаи описания микрофтальма и микрокорнеа у пациентов с *PAX6*-ВА встречаются в единичных публикациях [217]. В популяции российских пациентов микрофтальм был обнаружен в 10,3% случаев, микрокорнеа – в 3,7% глаз и никогда изолированно от микрофтальмии. Не было случаев значительного уменьшения длины глаза, микрофтальм соответствовал легкой степени тяжести $20,4\pm 0,43$ мм (от 19,15 до 20,93 мм). Учитывая тот факт, что частота микрофтальма у пациентов с *PAX6*-ВА минимальна в отличие от мышинных моделей, интересно предположить, что раннее развитие глаза человека и мыши проявляет различную чувствительность к дозозависимым эффектам гена *PAX6/Pax6*. Дальнейшее изучение вопроса с целью сравнения экспериментальных данных, полученных на животных с ортологичными процессами, протекающими у человека, позволит уточнить функции генов в процессе глазного эмбриогенеза.

Таким образом, в настоящей работе впервые была дана полная характеристика офтальмологических проявлений *PAX6*-ВА в большой популяции российских пациентов (110 человек). Впервые была выполнена сравнительная оценка частоты встречаемости глазных признаков в группе пациентов до 18 лет и взрослых субъектов. Была разработана балльная системы оценки глазного фенотипа; выделены клинические маркеры, влияющие на тяжесть офтальмологического статуса: стадия АК ($r_s=0,836$, $p<0,05$), глаукома ($r_s=0,413$, $p<0,05$) и гипоплазия макулы ($r_s=0,478$, $p<0,05$). Впервые была изучена динамика изменений морфометрических показателей хрусталика и передней камеры, расширяющая знания о биометрических характеристиках аниридийного глаза.

Следующий этап работы был связан с изучением морфологических изменений, происходящих в центральных и периферических отделах роговицы на разных стадиях АК. С этой целью были обследованы 36 пациентов (68 глаз) с РАХ6-ВА. На основании данных ЛСКМ была проведена оценка состояния ЛПФ как клинических маркеров присутствия ЛСК, проанализирована возможность визуализации лимбальных прогениторных структур с помощью альтернативных способов диагностического обследования (ОКТ), а также впервые определена прогностическая роль ЛПФ в сохранении прозрачности роговицы после хирургических вмешательств.

В результате визуализации морфологических изменений роговицы *in vivo* была выявлена отрицательная взаимосвязь между сохранностью прогениторных структур лимба и стадией АК ($r_s = -0,63$, $p < 0,05$). Оценка морфологических параметров роговицы по данным ЛСКМ показала неоднородность тяжести проявлений АК и позволила выделить две группы пациентов, отличающихся особенностями протекания патологических процессов. В первую группу вошли пациенты (7 из 36 субъектов, 19,4%) в возрасте от 15 до 55 лет с клинически определяемой 0 стадией АК, которая на морфологическом уровне проявлялась отсутствием признаков НЛСК. У всех пациентов в той или иной степени были сохранены лимбальные прогениторные структуры, хорошо визуализируемые по данным ЛСКМ и ОКТ, качественные и количественные характеристики эпителиального и эндотелиального слоев роговицы были сопоставимы с группой контроля. Оценка иммунологического статуса роговицы не выявила преобладания антиген-презентирующих клеток в центральной зоне роговицы, их активация в периферических отделах роговицы наблюдалась лишь у одного пациента с частично деформированными ЛПФ. Анализ роговичного статуса после хирургических манипуляций в этой группе пациентов не выявил признаки прогрессирования АК в 100% случаев на протяжении длительного послеоперационного наблюдения ($4,8 \pm 2,6$ года).

Во второй группе пациентов в возрастном диапазоне от 4 до 56 лет тяжесть АК биомикроскопически соответствовала I–IV стадиям. Морфологические признаки разрушения лимбального барьера с миграцией

конъюнктивальных клеток в центральные зоны роговицы наблюдались в 4% глаз на I стадии, в 69% – на II и в 100% – на III–IV стадиях АК. По данным ЛСКМ прогрессирование АК сопровождалось фенотипической трансформацией эпителия роговицы по конъюнктивальному типу, увеличением количества воспалительных клеток ($p=0,03$), нарастанием патологической васкуляризации ($p=0,006$) и уменьшением количества антиген-презентирующих дендритных клеток ($p=0,005$). В этой группе пациентов деформированные палисадоподобные структуры были обнаружены лишь в 10,3% случаев. Было отмечено значительное усиление иммунного надзора в виде увеличения количества активированных клеток Лангерганса и их значительное преобладание над незрелыми дендритными клетками в центральных и прелимбальных зонах роговицы, начиная с I стадии АК. Подобная активация антиген-презентирующих клеток МНС класса II [126; 152] говорит об иммунной компрометированности роговицы, которая наряду с хроническим воспалительным процессом может служить индикатором разрушения лимбального барьера.

Анализ течения АК в послеоперационном периоде в данной категории пациентов показал утяжеление фенотипа кератопатии более чем в половине случаев (55,6%). Несмотря на начальные признаки НЛСК и отсутствие явных прогениторных структур в зоне лимба, в детском возрасте состояние роговицы долгое время оставалось компенсированным и стабильным. Механизм сдерживающего воздействия, который препятствовал распространению циркулярного периферического помутнения в центральные отделы роговицы при АК и поддерживал прозрачность оптического центра на протяжении многих лет, в настоящее время до конца не ясен. Остаются неясными не только отсутствие прогрессирования АК в детском и подростковом возрасте, но и сохранность центральной зоны роговицы у взрослых пациентов. Так, в работе М. Nubile отмечалось полное отсутствие ЛПФ у 50% пациентов с клиническими признаками частичной НЛСК. Несмотря на видимое отсутствие лимбальных прогениторных структур, у данных пациентов в центральных и парацентральных зонах роговицы наблюдалось сохранение эпителия роговичного типа [168]. Кроме того, в недавних исследованиях было показано

длительное существование островков нормального роговичного эпителия в центральной зоне роговицы на фоне лимбальной недостаточности протяженностью в 360° [67]. Авторы предполагают существование небольшого количества ЛСК, которые, несмотря на разрушение лимбальных «ниш», способны выживать и давать начало эпителиальным клеткам роговичного фенотипа. В ходе своего исследования мы наблюдали двух пациентов в возрасте 43 лет и 51 года без признаков присутствия ЛПФ по данным ЛСКМ, но с I стадией АК, определяемой клинически.

В данной работе впервые была проведена оценка информативности и согласованности результатов диагностики лимбальных палисад, выполненных методами ЛСКМ и ОКТ в режиме En Face, у пациентов с РАХ6-ВА. Был выявлен высокий уровень корреляции ($r_s=0,88$, $p<0,05$) в оценке согласованности результатов визуализации ЛПФ нижнего лимба. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена для верхней гемисферы роговицы был несколько меньшим ($r_s=0,81$, $p<0,05$). Преимущества диагностики лимбальных палисад методом ОКТ в описанном режиме сводятся к бесконтактности методики, возможности получения в одной снимке изображения всей гемисферы роговицы, повторяемости результатов исследования, быстроте процедуры и возможности ее применения у детей.

В работе впервые была применена ОКТ для измерения толщины роговицы и ее эпителия у пациентов разных возрастных групп с разными стадиями АК. ЦТР во всех стадиях АК отличалась от возрастной нормы с достоверной разницей ($p<0,005$). Несмотря на отсутствие клинических признаков НЛСК у пациентов с 0 стадией АК, толщина роговицы также превышала норму ($p=0,009$), а толщина эпителиального слоя в центральной зоне была снижена на 6,6% по сравнению с группой контроля ($p=0,0006$). Причины увеличения объема стромы роговицы не объясняются дисфункцией эндотелиальных клеток, так как их плотность в глазах с РАХ6-ВА статистически не отличается от таковой у здоровых пациентов ($p>0,05$). Существует предположение, что увеличение толщины роговицы наряду с избыточной иммунной активацией центрально расположенных дендритных клеток может рассматриваться в качестве маркера морфологической

незрелости, напоминающей роговицу в период ее пренатального развития [64]. Обследование роговицы здоровых недоношенных детей со сроком гестации более 31 недели показало сочетание увеличенных пахиметрических размеров роговицы с уменьшением ее диаметра [117]. Микрокорнеа является редким клиническим проявлением *PAX6*-ВА (3,7%), которое встречается вместе с микрофтальмом, и поэтому не может быть рассмотрено только как пренатальное нарушение процессов эвапорации и ремоделирования роговицы. Не следует исключать, что утолщение роговичной стромы может быть связано с недостаточной экспрессией гена *PAX6*, приводящей к нарушению запрограммированного апоптоза кератоцитов, персистенции кератоцитов и связанного с ними внеклеточного матрикса [254].

Впервые выполненный анализ измерений плотности базальных и крыловидных клеток в центре роговицы в зависимости от стадии АК показал ее значимое уменьшение, начиная с I стадии ($p < 0,05$). Уменьшение количества клеток роговицы говорит о низкой скорости их самообновления, что приводит к уменьшению толщины эпителиального слоя и является следствием недостаточной функции герминативных клеток [38]. Роль снижения плотности базальных эпителиальных клеток и суббазальных нервных сплетений в качестве маркера развития НЛСК была также подтверждена в предшествующих работах [62; 127].

Таким образом, диагноз *PAX6*-ВА не исключает у небольшой доли пациентов наличие лимбальных структур с сохранной прогениторной функцией, которые обеспечивают регенерацию и самообновление роговицы, а также позволяют длительно поддерживать прозрачность глазной поверхности даже после перенесенных хирургических вмешательств. Учитывая существующие расхождения между данными биомикроскопического осмотра роговицы и результатами ЛСКМ, следует рекомендовать выявление субклинических воспалительных процессов, признаков эпителиальной трансформации, оценку степени сохранности лимбальных прогениторных структур и иммунного статуса с помощью морфологических исследований *in vivo* для стандартизации диагностических средств оценки эпителиального

статуса и прогнозирования течения АК, особенно перед хирургическими вмешательствами.

Роль генетических факторов в рамках изучения моногенного ВПР является неоспоримой. С целью оценки влияния различные мутационных изменений в гене *PAX6* на клиническую картину ВА был разработан метод выявления гено-фенотипических зависимостей на основе вероятностной модели с совместным использованием критерия Фишера и отношения правдоподобия. Использование нескольких методов статистической обработки позволило выделить характерные черты фенотипических проявлений *PAX6*-ВА, которые могут быть применены в дальнейшем для прогнозирования течения клинического процесса. Были проанализированы результаты офтальмологического осмотра 68 пробандов, разделенных в зависимости от типа мутационных дефектов на пять групп (миссенс-мутации, инактивирующие мутации, мутации, изменяющие нормальный сплайсинг, делеции 3'-*цис*-регуляторных областей гена *PAX6* и крупные хромосомные перестройки), сопоставимых по возрасту ($p_H=0,8413$).

Анализ миссенс-мутаций имел ряд ограничений, связанных с отсутствием информации о нарушениях функций белка, приводящих к формированию того или иного фенотипа. Наряду с неаниридийными фенотипами клинические проявления несинонимичных замен могли соответствовать «классической» картине ВА за счет полной потери функции синтезированного белка или нарушения сплайсинга с последующим разрушением аберантной мРНК (NMD). В нашем исследовании ранее обнаруженная миссенс-мутация с.140A>G была связана с нарушением сплайсинга [76] и характеризовалась классической картиной аниридийных проявлений. Молекулярные исходы остальных мутаций (с. 19G>C, с.164A>C) до настоящего времени не изучены, однако именно в них нами были выделены признаки неаниридийного фенотипа ВА, а именно микрофтальм, микрокорнеа, гипоплазия радужки и минимальная вовлеченность роговицы в патологический процесс. В проведенном анализе миссенс-варианты были ассоциированы с лучшей остротой зрения, чем инактивирующие мутации (0,22 и 0,081 соответственно, $p=0,036$), что можно объяснить минимальными

проявлениями АК, подтвержденными данными ОКТ переднего отрезка глаза. Более сохранные зрительные функции у пациентов на фоне несинонимичных замен были также описаны в работе М. Hingorani [100], отсутствие биомикроскопически определяемой гипоплазии фовеа было отмечено у 19 членов южноафриканской семьи с мутацией с.622G>A [85].

В связи с неясными последствиями нарушения нормального сплайсинга и необходимости функционального анализа структуры мРНК и функции белка [185] данный тип внутригенных нарушений был рассмотрен отдельно от инактивирующих мутаций. Анализ гено-фенотипических зависимостей в этой группе показал преобладание частичной аниридии в виде гипоплазии радужки, колобомоподобных дефектов, остатков радужной ткани ($p=0,031$) и гипоплазии макулы ($p=0,025$), которая в то же время не была строго ассоциирована с 4-й степенью гипоплазии фовеа. Факты об атипичных формах аниридии и мягких проявлениях макулярной гипоплазии были отмечены ранее в единичных публикациях [142]. Пациенты с мутациями, влияющими на сплайсинг, характеризовались меж- и внутрисемейной вариабельностью аниридийного фенотипа, также подтвержденной в других работах [68; 179]. С целью повышения точности корреляционных взаимосвязей в будущем необходимо постоянное накопление знаний о нарушении функции белка и уточнение молекулярных исходов несинонимичных замен и вариантов интронных последовательностей [185].

Группа пациентов с инактивирующими мутациями (нонсенс-мутации и мутации сдвига открытой рамки считывания) были представлены классическими проявлениями ВА: полной аниридией, нистагмом, кератопатией, катарактой и гипоплазией макулы. Фенотипическое сопоставление внутригенных транкрирующих мутаций с крупными делециями региона 11p13 показало отсутствие различий в частоте и выраженности глазных проявлений ВА и подтвердило действие единого механизма гаплонедостаточности в данных группах. Изучение лимбальной зоны по данным ЛСКМ показало снижение пролиферативного потенциала лимбальных герминативных клеток и нарастание признаков НЛСК по мере прогрессирования АК на фоне практически полной дегградации ЛПФ.

В настоящей работе был впервые проведен детальный сравнительный анализ офтальмологических проявлений ВА между делециями 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* и инактивирующими мутациями. В настоящее время скудные сведения литературных источников сводятся к констатации факта схожести клинических проявлений делеций 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* с «классической» картиной ВА в результате возникновения преждевременного стоп-кодона (LoF мутации) [53; 61; 133]. Подобные хромосомные перестройки нарушают нормальную экспрессию гена *PAX6* [53; 191] и приводят к формированию аниридийного фенотипа. Однако, по нашим наблюдениям, фенотип, ассоциированный с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6*, отличается от «классического». У всех обследованных нами пациентов с микроделецией *ELP4-DCDC1* отсутствовали признаки АК, нистагма, в большинстве случаев гипоплазия фовеа по данным ОКТ не превышала II степени, что объясняло наличие высоких зрительных функций. Формирование мягкого аниридийного фенотипа без признаков кератопатии и нистагма было также отмечено в ряде предыдущих работ [1; 201; 250; 266].

У всех пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6*, обследованных в ходе работы (в возрасте от 3 месяцев до 76 лет), биомикроскопически определялась интактная роговичная поверхность без признаков помутнений и роста периферического паннуса (0 стадия АК). Полученные данные ЛСКМ на морфологическом уровне показали присутствие у этих пациентов герминативных структур в лимбальной ростковой зоне. Несмотря на индивидуальные различия в сохранности и выраженности ЛПФ, их наличие объясняло прозрачность роговицы, а также отсутствие признаков АК в течение многих лет после проведенных оперативных вмешательств. В отличие от них у пациентов с LoF мутациями *PAX6* герминативные структуры лимба были выявлены лишь в 3,1% случаев ($p=0,000$), что клинически проявлялось различными стадиями АК (I–IV стадии).

Экспрессия *PAX6* является необходимым условием поддержания целостности и гомеостаза эпителиального слоя не только на этапе эмбрионального развития глаза, но и во взрослом состоянии [121; 136].

Снижение экспрессии до 60–70% нормального уровня белка в роговичном эпителии является причиной развития серьезной кератопатии у гетерозиготных *Pax6*^{+/-} мышей [140]. Однако описанные факты сохранности прогениторных структур лимба [127] и прозрачности роговицы у пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* [46; 61; 201; 251; 266] позволяют все же предположить наличие достаточной экспрессии *PAX6* в эпителии глазной поверхности у этой категории больных.

В отличие от роговицы, частота катарактальных помутнений у пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* (85,7%) и *Lof* мутациями (84,4%) была сопоставимой между группами ($p=1,0$). Эктопия хрусталика, полная аниридия и вторичная глаукома также с одинаковой частотой встречались на фоне обоих патогенных вариантов ВА ($p=0,67$, $p=0,21$ и $p=0,40$ соответственно).

Среднее значение визометрии взрослых пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* было равным $0,45 \pm 0,23$ (от 0,2 до 0,8), что выше значений остроты зрения в группе пациентов с *Lof* мутациями ($0,081 \pm 0,06$) ($p=0,000$). Результаты офтальмоскопии были сопоставимы с данными спектральной ОКТ, которые подтвердили наличие фовеального углубления. Ни в одном из обследованных глаз пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* *fovea plana* не была обнаружена. Работы других авторов также демонстрировали высокую остроту зрения у пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* [46; 201; 228; 250; 266], отсутствие нистагма [61; 201; 250; 266] и гипоплазии фовеа по данным офтальмоскопии [228; 266].

ОКТ пациентов с *Lof* мутациями в *PAX6* показала превалирование продвинутых степеней гипоплазии фовеа в 100% случаев. В отличие от них делеции 3'-*цис*-регуляторной области были ассоциированы с интактным макулярным интерфейсом в 31% глаз, в остальных случаях гипоплазия центральной ямки не превышала 2-й степени. Несмотря на существующую фенотипическую изменчивость фовеальной архитектуры, отмеченную нами и другими авторами [228; 201], относительно высокие зрительные функции пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6*, по-видимому,

были ассоциированы с морфологической зрелостью нейросенсорной сетчатки, проявляющейся расширением наружного ядерного слоя и центральным удлинением наружных сегментов фоторецепторов по данным ОКТ. Несмотря на исключительную доминирующую роль локуса DRR в регуляции ретинальной экспрессии *Rax6*, полученные нами данные свидетельствуют о возможности формирования фовеа даже в условиях отсутствия превалирующего влияния удаленного ретинального энхансера [119]. На фоне делеции сверхконсервативной 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* данные спектральной ОКТ и визометрии подтверждают возможность полной структурной сохранности и достаточной функциональной зрелости сетчатки. Это позволяет предполагать наличие других молекулярных механизмов регуляции экспрессии *PAX6* в тканях глаза при подобных цитогенетических перестройках.

Наряду с отсутствием классических признаков АК и гипоплазии фовеа клиническая картина пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* дополняется полной или субтотальной аниридией, выраженным гониодисгенезом и утолщением роговичной стромы. В данных структурах, имеющих мезенхимальное происхождение (УПК, радужная оболочка и кератоциты роговицы), доказана низкая и непостоянная экспрессия *Rax6*, в отличие от его высокой и длительной экспрессии в клетках, происходящих из поверхностной эктодермы и глазного бокала (эпителий роговицы, хрусталик, сетчатая оболочка) [29; 51]. Заманчиво предположить, что дозозависимый эффект *Rax6* и вероятность большой уязвимости клеток нервного гребня в случае уменьшения количества доступного белка, отмеченные в экспериментальных работах [56], будут иметь свое подтверждение на примере фенотипа пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6*.

Перечисленные выше данные позволяют говорить о том, что возникающие в результате делеции 3'-*цис*-регуляторной области *PAX6* фенотипические проявления отличаются от клинической картины *Lof* мутаций. Несмотря на некоторую вариабельность фенотипов, разные границы и протяженность хромосомных перестроек, прослеживаются определенные клинические характеристики, общие для большинства пациентов [228].

Особенности фенотипа пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *РАХ6* затрагивают как передний, так и задний сегменты глаза и в большинстве случаев характеризуются полной аниридией, отсутствием нистагма, АК и низкой частотой фовеальной гипоплазии. Определенная уникальность клинической картины пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *РАХ6*, повторяющаяся в различных популяциях и отличающаяся от «классического» аниридийного фенотипа, позволяет выделить ее в отдельный гено-фенотипический вариант, обладающий благоприятным зрительным прогнозом. Мягкий вариант глазных проявлений *РАХ6*-ВА, хорошая переносимость оперативных вмешательств (отсутствие прогресирования АК) являются важными прогностическими критериями дальнейшего течения заболевания и социальной реабилитации пациентов в целом.

Таким образом, опираясь на данные клинической диагностики, результаты морфологического исследования роговицы *in vivo*, сведения генетической экспертизы, впервые были обнаружены гено-фенотипические взаимосвязи между типом мутационных изменений и глазными проявлениями, позволяющие прогнозировать дальнейшее течение *РАХ6*-ВА и индивидуализировать подходы к ведению пациентов с данной офтальмопатологией.

Первый этап разработанного клинко-диагностического алгоритма складывается из детального осмотра всех структур глаза и оценки их вовлеченности в патологический процесс. Формирование полного офтальмологического портрета позволяет правильно поставить предположительный клинический диагноз *РАХ6*-ВА и выявить окулярные признаки, имеющие прогностическое значение. Так, в исследовательской работе впервые было показано влияние временного фактора на увеличение частоты тяжелых стадий АК ($p < 0,008$), катарактальных помутнений ($p = 0,000$), подвывиха хрусталика ($p = 0,046$), птоза ($p = 0,032$), усиление выраженности опущения верхнего века ($r_s = 0,4$, $p < 0,05$), а также возрастанием количества пациентов с необратимой слепотой ($p = 0,026$). Структурная сохранность макулярной области, оцененная по данным ОКТ, помогает прогнозировать возможную остроту зрения ($r_s = -0,47$, $p < 0,05$). Степень презентации радужной

ткани с умеренной силой коррелирует с сохранностью структур УПК ($r_s=0,311$, $p=0,01$). Достоверное влияние на общую тяжесть глазного фенотипа оказывают выраженность АК ($r_s=0,836$, $p<0,05$), наличие вторичной глаукомы ($r_s=0,413$, $p<0,05$) и гипоплазии макулярной области ($r_s=0,478$, $p<0,05$).

Дальнейший этап диагностического алгоритма включает определение благоприятного и неблагоприятного течения АК, основанное на морфологической оценке эпителиального статуса и выявлении прогениторных лимбальных структур по данным ЛСКМ. Верификация причинной мутации в *PAX6* является обязательной для постановки генетического диагноза, ее необходимость особенно высока при встрече с аномальными фенотипами *PAX6*-ВА, ассоциированными с минимальными или нетипичными изменениями радужной оболочки глаза, характерными для миссенс-мутаций и мутаций, изменяющих сплайсинг ($p=0,031$). Результаты цитогенетической диагностики должны быть рассмотрены с точки зрения деления мутаций на затрагивающие (инактивирующие мутации, крупные делеции) и не затрагивающие кодирующие участки гена *PAX6* (делеции 3'-*цис*-регуляторной области). Отдельного изучения требуют несинонимичные замены и мутации, изменяющие нормальный сплайсинг, ввиду не всегда ясного патогенного влияния данных генетических нарушений на функции белка.

В последующем анализ полученных клинико-диагностических данных позволил выделить два клинико-генетических варианта течения *PAX6*-ВА. Первый вариант – делеции отдаленных 3'-*цис*-регуляторных областей *PAX6*, не затрагивающие кодирующую часть гена, которые приводят к формированию фенотипа ВА легкой степени тяжести, характеризующегося относительно высокой остротой зрения, морфологической зрелостью фовеальной области, отсутствием АК и нистагма. Морфологически прозрачность роговицы подтверждается обнаружением сохранных или частично деформированных лимбальных прогениторных структур в 100% обследованных глаз. АК не имеет тенденции к прогрессированию с возрастом ($r_s=0,433$, $p>0,05$) и после перенесенных хирургических вмешательств, в целом определяя благоприятный зрительный прогноз течения *PAX6*-ВА. Второй клинико-генетический вариант – пациенты с мутациями кодирующей части

РАХ6 (инактивирующие мутации и крупные делеции региона 11p13), которые приводят к формированию классического фенотипа *РАХ6-ВА*, включающего полную аниридию, нистагм, АК, помутнения хрусталика и гипоплазию макулярной области. Исследования роговицы *in vivo* выявляют у 10,3% пациентов этой группы значительно измененные палисадоподобные структуры с начальными признаками конъюнктивальной инвазии. Снижение пролиферативного потенциала лимбальной зоны у пациентов с инактивирующими мутациями и делециями региона 11p13 проявляется проградентным течением АК с возрастом ($r_s=0,495$ и $r_s=0,6114$ соответственно, $p<0,05$) и риском утяжеления роговичного статуса после интраокулярной хирургии. Отягощение глазного статуса может быть связано с декомпенсацией ВГД, которая в равной степени может встречаться у пациентов обоих вариантов *РАХ6-ВА*.

Таким образом, *РАХ6-ВА* является панокулярным заболеванием, которое характеризуется вовлечением в патологический процесс всех внутриглазных структур, требует комплексной оценки и обязательного генетического подтверждения. Проведенные исследования позволили выделить два варианта течения *РАХ6-ВА*, которые могут ориентировать клинициста в принятии решения о дальнейшем ведении пациента и прогнозировать течение данной офтальмопатологии. Данная работа показала важность изучения спектра и типа мутационных изменений, которые должны обязательно учитываться в каждом популяционном исследовании для правильной характеристики обследуемой группы и выполнения любых кросс-когортных сравнений.

ВЫВОДЫ

1. На основании ретроспективного анализа офтальмологической картины клинических проявлений *PAX6*-ВА у пациентов старшей возрастной группы в сравнении с группой детей и подростков до 18 лет было показано увеличение случаев слепоты (37,5/13%, $p=0,026$), катаракты (90,6/63%, $p=0,000$), подвывиха хрусталика (28/13%, $p=0,046$), птоза (29,7/13%, $p=0,032$) и тяжелых стадий АК (III–IV) ($p<0,008$). Частота глаукомы (31,3/32,6%), нистагма (86/84,8%), аномалий рефракции (95,7/96,9%), косоглазия (46,9/52,2%) и гипоплазии фовеа (80,7/90%) была сопоставима между группами ($p>0,05$).

2. Анализ данных ЛСКМ выявил постепенную фенотипическую трансформацию нормальной эпителиальной системы роговицы в патологическую, начиная с I стадии АК, с последующим прогрессированием и изменением типа эпителизации роговицы, увеличением инвазии воспалительных клеток ($p=0,03$), патологической васкуляризацией ($p=0,006$), уменьшением плотности эпителиальных клеток ($p<0,05$) и деградацией лимбальных прогениторных структур ($r_s=-0,63$, $p<0,05$); 0 стадия АК характеризовалась сохранением герминативных структур лимба и была сопоставима по качественным и количественным характеристикам эпителия со здоровыми субъектами. Была выявлена корреляционная связь между методами ЛСКМ и ОКТ при визуализации лимбальных прогениторных структур верхней ($r_s=0,81$, $p<0,05$) нижней ($r_s=0,88$, $p<0,05$) гемисфер роговицы.

3. Анализ данных молекулярно-генетической диагностики выявил внутригенные варианты нуклеотидной последовательности в гене *PAX6* у 69,6% изученных пробандов, из них миссенс-мутации были обнаружены в 6,25%; мутации, ведущие к потере функции белка, – в 66,7%; мутации, нарушающие нормальный сплайсинг, – в 25%; мутации, приводящие к удлинению белка, – в 2,1% случаев; крупные делеции региона 11p13 были верифицированы у 30,4% пробандов, в том числе делеции удаленной 3'-*цис*-регуляторной области гена *PAX6* были обнаружены в 10,1% случаев. Разработанный метод оценки гено-

фенотипических зависимостей на основе вероятностной модели с совместным использованием точного критерия Фишера и отношения правдоподобия позволил выявить влияние заданного типа мутационных изменений на заданный тип клинических проявлений *РАХ6*-ВА.

4. Анализ морфометрических характеристик переднего отрезка глаза у пациентов с *РАХ6*-ВА выявил более низкие темпы роста хрусталика, уменьшение его толщины у пациентов старше 30 лет по сравнению с группой здоровых субъектов ($p < 0,05$) и уменьшение глубины передней камеры глаза во всех возрастных группах, за исключением детей первых 4 месяцев жизни ($p < 0,05$).

5. Анализ клинических проявлений *РАХ6*-ВА у пациентов с инактивирующими мутациями и делециями региона 11p13, захватывающими ген *РАХ6*, выявил сопоставимые между ними значения остроты зрения ($p = 0,95$), отсутствие значимых различий в частоте развития нистагма ($p = 1,0$), аниридийной кератопатии ($p = 1,0$), катаракты ($p = 1,0$), подвывиха хрусталика ($p = 1,0$), глаукомы ($p = 0,74$), гипоплазии фовеа ($p = 1,0$), обнаружения полной аниридии ($p = 0,54$) и прогениторных лимбальных структур ($p = 0,52$). В отличие от них клинические признаки пациентов с делециями 3'-*цис*-регуляторной области *РАХ6* характеризовались высокой остротой зрения ($p = 0,000$), отсутствием нистагма ($p = 0,000$), аниридийной кератопатии ($p = 0,000$), наличием герминативных структур лимба ($p = 0,000$), структурной сохранностью фовеальной области ($p = 0,000$), которые определяли легкую степень тяжести глазного фенотипа.

6. Разработанный клинико-диагностический алгоритм обследования пациентов с *РАХ6*-ВА, основанный на анализе функциональных и структурных нарушений органа зрения, проявляющихся увеличением с возрастом количества случаев слепоты, катаракты, подвывиха хрусталика, тяжелых стадий АК и птоза, морфологических изменений в виде нарастания признаков НЛСК с утяжелением стадии АК, и данных ДНК-диагностики с выявлением мутаций, затрагивающих кодирующие и удаленные 3'-*цис*-регуляторные области *РАХ6*, позволил выделить два клинико-генетических варианта *РАХ6*-ВА, помогающих прогнозировать дальнейшее течение заболевания и индивидуализировать подходы к ведению пациентов с данной офтальмопатологией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью повышения эффективности диагностических мероприятий по выявлению и оценке клинических проявлений *РАХ6*-ВА, а также прогнозирования течения заболевания, следует использовать разработанный алгоритм ведения пациентов с данной офтальмопатологией.

2. Высокая согласованность результатов визуализации ЛПФ методом спектральной ОКТ в описанном режиме с данными ЛСКМ, в сочетании с неинвазивным характером обследования, возможностью получения в одном снимке изображения всей гемисферы роговицы, его быстротой и высокой информативностью позволяет рекомендовать использование ОКТ в педиатрической практике, в диагностике пациентов с патологией роговицы на фоне НЛСК, для которых приоритетным является бесконтактность диагностических процедур (АК, последствия химического ожога, синдром Стивена – Джонсена, глазной рубцовый пемфигоид и пр.), а также с целью обнаружения и прецизионного забора стволовых клеток в кадаверных глазах для культивирования и лимбальной трансплантации.

3. Для оптимизации техники хирургии катаракты, минимизации интраоперационных рисков и послеоперационных осложнений следует учитывать морфометрические особенности переднего отрезка глаза, связанные с увеличением толщины роговицы, уменьшением биометрических параметров хрусталика и передней камеры, а также наличием аномалий формы и положения хрусталика.

4. Разработанная балльная система оценки глазных проявлений *РАХ6*-ВА позволяет рассматривать совокупность индивидуальных характеристик с учетом выраженности функциональных и структурных изменений глаза для определения степени тяжести глазного фенотипа.

5. В зависимости от молекулярных механизмов повреждения гена *РАХ6*, результатов биомикроскопии роговицы, ОКТ и ЛСКМ зоны лимба

рекомендован дифференцированный подход к хирургическому лечению пациентов с *РАХ6-ВА*. В случае обнаружения делеций, захватывающих удаленную 3'-*цис*-регуляторную область гена *РАХ6*, биомикроскопического подтверждения 0 стадии АК, наличия прогениторных лимбальных структур по данным ЛСКМ и ОКТ проведение хирургических вмешательств в лимбальной зоне (формирование поверхностного и глубокого склеральных лоскутов, выполнение роговичных парацентезов и тоннелей) связано с минимальным риском декомпенсации роговицы и потери ее прозрачности. При обнаружении мутаций, ведущих к потере функции белка, биомикроскопической картины АК, альтерации лимбальных прогениторных структур по данным ЛСКМ и ОКТ проведение хирургических вмешательств сопряжено с высоким риском прогрессирования НЛСК, приводящей к формированию аномального репаративного ответа, конъюнктивизации роговицы, потере ее прозрачности и значительному снижению зрительных функций. Учитывая прогрессирование АК в связи с ятрогенным повреждением лимбальной ростковой зоны во время хирургических вмешательств по поводу катаракты, глаукомы или при использовании местных антимаболитов (5-фторурацила и др.), рекомендуется применение щадящей техники оперативных вмешательств с максимальным исключением лимбальной зоны из области операционной травмы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, АББРЕВИАТУР И АКРОНИМОВ

АК – аниридийная кератопатия

АГО – антиглаукомная операция

АФС – аниридийный фиброзный синдром

ВА – врожденная аниридия

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПР – врожденный порок развития

ВГД – внутриглазное давление

ДЗН – диск зрительного нерва

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИОЛ – интраокулярная линза

ИХД – искусственная иридохрусталиковая диафрагма

ЛПФ – лимбальные палисады Фогта

ЛСК – лимбальные стволовые клетки

ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

МКОЗ – максимально скорректированная острота зрения

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НЛСК – недостаточность лимбальных стволовых клеток

5'-НТО – 5'-нетранслируемая область

ОКТ – оптическая когерентная томография

РНК – рибонуклеиновая кислота

СКП – сквозная кератопластика

ССГ – синдром «сухого глаза»

тыс. п. н. – тысяча пар нуклеотидов

УБМ – ультразвуковая биомикроскопия

УЗИ – ультразвуковое исследование

УПК – угол передней камеры глаза

ФЭК – факоэмульсификация катаракты

ФСП – фокальные стромальные проекции

ЦНС – центральная нервная система

ЦТР – центральная толщина роговицы

ASDA (anterior segment developmental anomalies) – аномалии развития переднего отрезка глаза

- CTE (C-terminal extension mutation) – мутации, удлиняющие открытую рамку считывания за естественный стоп-кодон
- Del (deletion) – делеция
- DRR (downstream regulatory region) – удаленный регуляторный регион
- Em (emmetropia) – эмметропия
- Ex (exon) – экзон
- FISH (fluorescent in situ hybridization) – метод флуоресцентной гибридизации *in situ*
- Hm (hypermyopia) – гиперметропия
- HD (homeobox domain) – гомеобоксный домен
- Int (intron) – интрон
- Lof (loss-of-function) – мутации с потерей функции одного аллеля
- M (myopia) – миопия
- MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости
- MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) – мультиплексная реакция лигазозависимой амплификации зондов
- NCBI (National center for biotechnology information) – Национальный центр биотехнологической информации США
- NMD (nonsense mediated decay) – природный механизм разрушения aberrантных мРНК с преждевременным стоп-кодоном
- OMIM (online mendelian inheritance in man) – база данных менделирующих заболеваний человека
- PAX6* (PAired-boX 6) – ген-мастер регуляции эмбрионального развития глаза, член семейства генов парного бокса
- PAX6* – человеческий транскрипционный фактор
- PAX6*-ВА – *PAX6*-ассоциированная врожденная аниридия
- Pax6*/*Pax6* – гомологи *PAX6*/*PAX6* у двусторонне-симметричных животных
- PD (paired domain) – парный домен
- PST (proline-serine-threonine rich region) – домен богатый пролином, серином и треонином
- PTC (premature termination codon) – преждевременный стоп-кодон
- Sey (smalleye) – фенотип малых глаз
- WAGR синдром (Wilms tumor, aniridia, genitourinary anomalies, mental retardation) – синдром сочетания ВА с опухолью Вильмса, мочеполовыми аномалиями и задержкой психомоторного развития

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильева, Т. А. Генетические и фенотипические особенности врожденной аниридии в Российской Федерации : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.02.07 / Васильева Татьяна Алексеевна. – М., 2018. – 23 с.
2. Катаргина, Л. А. Опыт наблюдения и лечения детей с врожденной аниридией / Л. А. Катаргина, Е. В. Мазанова, А. О. Тарасенков // Практическая медицина. – 2015. – Т. 87, № 2. – С.79–80.
3. Паштаев, Н. П. Сравнительный анализ информативности исследования палисад Фогта методами оптической когерентной томографии и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии в норме / Н. П. Паштаев, Н. А. Поздеева, А. А. Воскресенская // Вестник офтальмологии. – 2017. – Т. 133, № 1. – С. 60–69.
4. Поздеева, Н. А. Система медицинской реабилитации пациентов с аниридией : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.01.07 / Поздеева Надежда Александровна. – М., 2014. – 50 с.
5. Сенченко, Н. Я. Оценка результатов лечения детей с врожденной аниридией с применением иридохрусталикового комплекса «МИОЛ-Радужка» / Н. Я. Сенченко // Практическая медицина. – 2015. – Т. 87, № 2. – С. 70–72.
6. Хлебникова, О. В. Наследственная патология органа зрения / О. В. Хлебникова, Е. В. Дадали. – М., 2014. – 250 с.
7. Aalfs, C. M. Tandem duplication of 11p12-p13 in a child with borderline development delay and eye abnormalities: dose effect of the PAX6 gene product? / C. M. Aalfs, J. A. Fantes, L. J. Wenniger-Prick et al. // Am. J. Med. Genet. – 1997. – Vol. 73, № 3. – P. 267–271.
8. Adachi, M. Clinical experience of trabeculectomy for the surgical treatment of aniridic glaucoma / M. Adachi, C. J. Dickens, J. Jr. Hetherington et al. // Ophthalmology. – 1997. – Vol. 104, № 12. – P. 2121–2125.
9. Aggarwal, S. Run-on mutation in the PAX6 gene and chorioretinal degeneration in autosomal dominant aniridia / S. Aggarwal, W. Jinda, C. Limwongse et al. // Mol. Vis. – 2011. – Vol. 17. – P. 1305–1309.
10. Allingham, R. R. Developmental glaucomas with associated anomalies / Allingham, R. R. Textbook of Glaucoma – 5th ed. / R. R. Allingham., K. Damji, S. Freedman et al. – Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. – P. 261–265.

11. Anderson, S. R. Aniridia, cataract and gonadoblastoma in a mentally retarded girl with deletion of chromosome 11 / S. R. Anderson, D. Geertinger, W. M. Larsen et al. // *Ophthalmologica*. – 1978. – Vol. 176, № 3. – P. 171–177.
12. Angmo, D. Congenital aniridia / D. Angmo, B. Jha, A. Panda // *J. Curr. Glaucoma Pract.* – 2011. – Vol. 5. – P. 1–13.
13. Ansari, M. Genetic analysis of 'PAX6-Negative' individuals with aniridia or Gillespie syndrome / M. Ansari, J. Rainger, I. Hanson et al. // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 4:e0153757.
14. Ashery-Padan, R. Pax6 lights-up the way for eye development / R. Ashery-Padan, P. Gruss // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 13, № 6. – P. 706–714.
15. Aslam, S. A. Implantation of the black diaphragm intraocular lens in congenital and traumatic aniridia / S. A. Aslam, S. C. Wong, L. A. Ficker, R. E. MacLaren // *Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 115, № 10. – P. 1705–1712.
16. Atchison, D. A. Age-related changes in optical and biometric characteristics of emmetropic eyes / D. A. Atchison, E. L. Markwell, S. Kasthurirangan // *J. Vis.* – 2008. – Vol. 8, № 4. – P. 1–20.
17. Augusteyn, R. C. On the growth and internal structure of the human // *Exp. Eye Res.* – 2010. – Vol. 90, № 6. – P. 643–654.
18. Augusteyn, R. C. Human ocular biometry / R. C. Augusteyn, D. Nankivil, A. Mohamed et al. // *Exp. Eye Res.* – 2012. – Vol. 102. – P. 70–75.
19. Azuma, N. PAX6 missense mutation in isolated foveal hypoplasia / N. Azuma, S. Nishina, H. Yanagisawa et al. // *Nat. Genet.* – 1996. – Vol. 13. – P. 141–142.
20. Azuma, N. Missense mutation at the C terminus of the PAX6 gene in ocular anterior segment anomalies / N. Azuma, M. Yamada // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1998. – Vol. 39, № 5. – P. 828–830.
21. Azuma, N. Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic-nerve malformations / N. Azuma, Y. Yamaguchi, H. Handa et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 72, № 6. – P. 1565–1570.
22. Baumer, N. Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle / N. Baumer, T. Marquardt, A. Stoykova et al. // *Development*. – 2002. – Vol. 129, № 19. – P. 4535–4545.

23. Baumer, N. Retinal pigmented epithelium determination requires the redundant activities of Pax2 and Pax6 / N. Baumer, T. Marquardt, A. Stoykova et al. // *Development*. – 2003. – Vol. 130, № 13. – P. 2903–2915.
24. Bausili, M. Histopathology findings of corneal buttons in congenital aniridia patients / M. Bausili, J. Alvarez de Toledo, R. Barraquer et al. // *Ophthalmic Res*. – 2016. – Vol. 56, № 4. – P. 202–206.
25. Bermejo, E. Congenital eye malformations: clinical-epidemiological analysis of 1,124,654 consecutive births in Spain / E. Bermejo, M. Martinez-Frias // *Am. J. Med. Genet*. – 1998. – Vol. 75, № 5. – P. 497–504.
26. Bermejo, E. Defectos congénitos oculares: algunos aspectos clínicos y epidemiológicos / E. Bermejo, M. L. Martínez-Frías // *Bol ECEMC: Rev. Dismor. Epidemiol*. – 2002. – Vol. 1. – P. 43–48.
27. Bhatia, S. Disruption of autoregulatory feedback by a mutation in a remote, ultraconserved PAX6 enhancer causes Aniridia / S. Bhatia, H. Bengani, M. Fish et al. // *Am. J. Hum. Genet*. – 2013. – Vol. 93, № 6. – P. 1126–1134.
28. Biswas, J. Rare association of familial aniridia, microcornea with myopia and aphakia / J. Biswas, A. Chakrabarti, D. Das // *Middle East Afr. J. Ophthalmol*. – 2014. – Vol. 21, № 3. – P. 268–270.
29. Blaumann, D. PAX6 heterozygous eyes show defects in chamber angle differentiation that are associated with a wide spectrum of other anterior eye segment abnormalities / D. Blaumann, A. Oplmann, C. Flugel-Koch et al. // *Mech. Dev*. – 2002. – Vol. 118, № 1–2. – P. 3–17.
30. Bobilev, A. M. Assessment of PAX6 alleles in 66 families with aniridia / A. M. Bobilev, M. E. McDougal, W. L. Taylor et al. // *Clin. Genet*. – 2016. – Vol. 89, № 6. – P. 669–677.
31. Bohnsack, B. L. Development of extraocular muscles requires early signals from periocular neural crest and the developing eye / B. L. Bohnsack, D. Gallina, H. Thompson et al. // *Arch. Ophthalmol*. – 2011. – Vol. 129, № 8. – P. 1030–1041.
32. Brandt, J. D. Markedly increased central corneal thickness: an undiagnosed finding in congenital aniridia / J. D. Brandt, L. A. Casuso, D. L. Budenz et al. // *Am. J. Ophthalmol*. – 2004. – Vol. 137, № 2. – P. 348–350.
33. Brauner, S. C. Aniridia / S. C. Brauner, D. S. Walton, T. C. Chen // *Int. Ophthalmol. Clin*. – 2008. – Vol. 48, № 2. – P. 79–85.

34. Bredrup, C. Clinical manifestation of a novel PAX6 mutation Arg128Pro / C. Bredrup, P. M. Knappskog, E. Rødahl et al. // *Arch. Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 126, № 3. – P. 428–430.
35. Bremond-Gignac D. Clinical and surgical management of cataract in congenital aniridia / D. Bremond-Gignac // Parekh M., Poli B., Ferrari S. et al. *Aniridia.* – Switzerland, 2015. – P. 39–44.
36. Bumsted, K. M. Dorsal retinal pigment epithelium differentiates as neural retina in the microphthalmia (mi/mi) mouse / K. M. Bumsted, C. J. Barnstable // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2000. – Vol. 41, № 3. – P. 903–908.
37. Callaerts, P. PAX-6 in development and evolution / P. Callaerts, G. Halder, W. J. Gehring // *Annu. Rev. Neurosci.* – 1997. – Vol. 20. – P. 483–532.
38. Chan, E. H. Epithelial thinning in limbal stem cell deficiency / E. H. Chan, L. Chen, F. Yu et al. // *Am. J. Ophthalmol.* - 2015. – Vol. 160, № 4. – P. 666–677.
39. Chang, J. W. Congenital aniridia: long-term clinical course, visual outcome, and prognostic factors / J. W. Chang, J. H. Kim, S. Kim, Y. S. Yu // *Korean. J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 28. № 6. – P. 479–485.
40. Chassaing, N. Molecular findings and clinical data in a cohort of 150 patients with anophthalmia/microphthalmia / N. Chassaing, A. Causse, A. Vigouroux et al. // *Clin. Genet.* – 2014. – Vol. 86, № 4. – P. 326–334.
41. Chauhan, B. K. Case series: Pyramidal cataracts, intact irides and nystagmus from three novel PAX6 mutations / B. K. Chauhan, A. Medsinge, M. P. Baumgartner et al. // *Am. J. Ophthalmol. Case. Rep.* – 2018. – Vol. 28, № 10. – P. 172–179.
42. Chauhan, B. K. Functional interactions between alternatively spliced forms of Pax6 in crystallin gene regulation and in haploinsufficiency / B. K. Chauhan, Y. Yang, K. Cveklova, A. Cvekl // *Nucleic. Acids. Res.* – 2004. – Vol. 32, № 5. – P. 1696–1709.
43. Chen, Z. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia / Z. Chen, C. S. de Paiva, L. Luo et al. // *Stem. Cells.* – 2004. – Vol. 22, № 3. – P. 355–366.
44. Chen, P. Mutation analysis of paired box 6 gene in inherited aniridia in northern China / P. Chen, X. Zang, D. Sun et al. // *Mol. Vis.* – 2013. – Vol. 19. – P. 1169–1177.

45. Chen, T. Goniosurgery for prevention of aniridic glaucoma / T. Chen, D. Walton // *Arch. Ophthalmol.* – 1999. – Vol. 117, № 9. – P. 1144–1148.
46. Cheng, F. 556 kb deletion in the downstream region of the PAX6 gene causes familial aniridia and other eye anomalies in a Chinese family / F. Cheng, W. Song, Y. Kang // *Mol. Vis.* – 2011. – Vol. 17. – P. 448–455.
47. Chew, H. F. Boston keratoprosthesis outcomes and complications / H. F. Chew, B. D. Ayres, K. M. Hammersmith et al. // *Cornea.* – 2009. – Vol. 28, № 9. – P. 989–996.
48. Chiambaretta, F. Regulation of corneal keratin-12 gene expression by the human Kruppel-like transcription factor 6 / F. Chiambaretta, L. Blanchon, B. Rabier et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2002. – Vol. 43, № 11. – P. 3422–3429.
49. Cohen, S. M. Aniridia with congenital ptosis and glaucoma: a family study / S. M. Cohen, L. B. Nelson // *Ann. Ophthalmol.* – 1988. – Vol. 20, № 2. – P. 53–57.
50. Collinson, J. Corneal development, limbal stem cell function and corneal epithelial cell migration in the Pax6^{+/-} mouse / J. Collinson, S. Chanas, R. Hill et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2004. – Vol. 45, № 4. – P. 1101–1108.
51. Collinson, J. The roles of Pax6 in the cornea, retina, and olfactory epithelium of the developing mouse embryo / J. Collinson, J. Quinn, R. Hill // *Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 255, № 2. – P. 303–312.
52. Cooling, R. J. Retinal detachment in congenital glaucoma / R. J. Cooling, N. S. Rice, D. McLeod // *Br. J. Ophthalmol.* – 1980. – Vol. 64, № 6. – P. 417–421.
53. Crolla, J. A. Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia / J. A. Crolla, V. van Heyningen // *Am. J. Hum. Genet.* – 2002. – Vol. 71, № 5. – P. 1138–1149.
54. Cvekl, A. Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development / A. Cvekl, M. K. Duncan // *Prog. Retin. Eye. Res.* – 2007. – V. 26, № 6. – P. 555–597.
55. Cvekl, A. Epigenetic regulatory mechanisms in vertebrate eye development and disease / A. Cvekl, K. P. Mitton // *Heredity (Edinb).* – 2010. – V. 105, № 1. – P. 135–151.
56. Cvekl, A. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases / A. Cvekl, E. R. Tamm // *Bioessays.* – 2004. – Vol. 26, № 4. – P. 374–386.

57. Czerny, T. DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5) / T. Czerny, M. Busslinger // *Mol. Cell. Biol.* – 1995. – Vol. 15, № 5. – P. 2858–2871.
58. Daniel, R. Retinal detachments in children / R. Daniel, J. J. Kanski, M. G. Glasspool // *Trans. Ophthalmol. Soc. UK.* – 1974. – Vol. 94. – P. 325–334.
59. Dansault, A. Three new PAX6 mutations including one causing an unusual ophthalmic phenotype associated with neurodevelopmental abnormalities / A. Dansault, G. David, C. Schwartz et al. // *Mol. Vis.* – 2007. – Vol. 13. – P. 511–523.
60. Davis, J. Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion / J. Davis, M. Duncan, W. Robison et al. // *J. Cell. Sci.* – 2003. – Vol. 116, № 11. – P. 2157–2167.
61. D’Elia, A. V. A deletion 3’ to the PAX6 gene in familial aniridia cases / A. V. D’Elia, L. Pellizzari, D. Fabbro et al // *Mol. Vis.* – 2007. – Vol. 13. – P. 1245–1250.
62. Deng, S. X. Characterization of limbal stem cell deficiency by in vivo laser scanning confocal microscopy: a microstructural approach / S. X. Deng, K. D. Sejpal, Q. Tang et al. // *Arch. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 130, № 4. – P. 440–445.
63. D’Ewart, J. The problem of aniridia / J. D’Ewart // *Br. Med. J.* – 1931. – Vol. 1, № 3658. – P. 284.
64. Diaz-Araya, C. M. Immunohistochemical and topographic studies of dendritic cells and macrophages in human fetal cornea / C. M. Diaz-Araya, M. C. Madigan, J. M. Provis, P. L. Penfold // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1995. – Vol. 36. – P. 644–656.
65. Dohrmann, C. Pax genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas / C. Dohrmann, P. Gruss, L. Lemaire // *Mech. Dev.* – 2000. – Vol. 92, № 1. – P. 47–54.
66. Dowler, J. G. Retinal detachment and giant retinal tears in aniridia / J. G. Dowler, C. J. Lyons, R. J. Cooling // *Eye.* – 1995. – Vol. 9. – P. 268–270.
67. Dua, H. S. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance. Testing the dogma / H. S. Dua, A. Miri, T. Alomar et al. // *Ophthalmology.* – 2009. – Vol. 116, № 5. – P. 856–863.
68. Dubey, S. K. Mutational analysis and genotype-phenotype correlations in southern Indian patients with sporadic and familial aniridia / S. K. Dubey, N. Mahalaxmi, P. Vijayalakshmi et al. // *Mol. Vis.* – 2015. – Vol. 21. – P. 88–97.

69. Eden, U. Aniridia among children and teenagers in Sweden and Norway / U. Eden, C. Beijar, R. Riise et al. // *Acta. Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 86, № 7. – P. 730–734.
70. Edén, U. Pathologic epithelial and anterior corneal nerve morphology in early-stage congenital aniridic keratopathy / U. Edén, P. Fagerholm, R. Danyali et al. // *Ophthalmology.* – 2012. – Vol. 119, № 9. – P. 1803–1810.
71. Eden, U. Epidemiology of aniridia in Sweden and Norway / U. Eden, D. Iggman, R. Riise, K. Tornqvist // *Acta. Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 86, № 7. – P. 727–729.
72. Eden, U. Cataract development in Norwegian patients with congenital aniridia / U. Eden, N. Lagali, A. Dellby et al. // *Acta. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 92, № 2. – P. 165–167.
73. Edén, U. Corneal involvement in aniridia / U. Edén, R. Riise, K. Tornqvist // *Cornea.* – 2010. – Vol. 29, № 10. – P. 1096–1102.
74. Fantes, J. Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype / J. Fantes, B. Redeker, M. Breen et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 1995. – Vol. 4, № 3. – P. 415–422.
75. Favor, J. Relationship of Pax6 activity levels to the extent of eye development in the mouse, *Mus musculus* / J. Favor, C. J. Gloeckner, A. Neuhauser-Klaus et al. // *Genetics.* – 2008. – Vol. 179, № 3. – P. 1345–1355.
76. Filatova, A. Y. Functional reassessment of PAX6 single nucleotide variants by in vitro splicing assay / A. Y. Filatova, T. A. Vasilyeva, A. V. Marakhonov et al. // *Eur J Hum Genet.* – 2019. – Vol. 27, № 3. – P. 488–493.
77. Filous, A. Results of treatment of glaucoma associated with aniridia / A. Filous, M. Odehnal, B. Brůnová et al. // *Cesk. Slov. Oftalmol.* – 1998. – Vol. 54, № 1. – P. 18–21.
78. Fuchsluger, T. New possibilities for ocular surface reconstruction: collagen membranes and biocompatible elastomer nanofibers / T. Fuchsluger, S. Salehi, C. Petsch et al. // *Ophthalmologe.* – 2014. – Vol. 111, № 11. – P. 1019–1026.
79. Garudadri, C. Prevalence and risk factors for primary glaucomas in adult urban and rural populations in the Andhra Pradesh Eye Disease Study / C. Garudadri, S. Senthil, R. C. Khanna et al. // *Ophthalmology.* – 2010. – Vol. 117, № 7. – P. 1352–1359.

80. Gilbert, C. Childhood blindness in the context of VISION 2020-the right to sight / C. Gilbert, A. Foster // *Bull. World Health. Org.* – 2001. – Vol. 79, № 3. – P. 227–232.
81. Glaser, T. PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects / T. Glaser, L. Jepeal, J. G. Edwards et al. // *Nat. Genet.* – 1994. – Vol. 7, № 4. – P. 463–471.
82. Glaser, T. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene / T. Glaser, D. S. Walton, R. L. Maas // *Nat. Genet.* – 1992. – Vol. 2, № 3. – P. 232–239.
83. Gomes, J. A. Recurrent keratopathy after penetrating keratoplasty for aniridia / A. Gomes, R. C. Eagle, A. K. Gomes et al. // *Cornea.* – 1996. – Vol. 15, № 5. – P.457–462.
84. Gonzalez-Salinas, R. Combined cataract phacoemulsification and aniridia endocapsular rings implantation in a patient with bilateral congenital aniridia and cataract: A case report / R. Gonzalez-Salinas, Pena- F. Guani // *Saudi. J. Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 30, № 1. – P. 64–67.
85. Goolam, S. Familial congenital cataract, coloboma, and nystagmus phenotype with variable expression caused by mutation in PAX6 in a South African family / S. Goolam, N. Carstens, M. Ross et al. // *Mol. Vis.* – 2018. – Vol. 24. – P. 407–413.
86. Gramer, E. Glaucoma and frequency of ocular and general diseases in 30 patients with aniridia: a clinical study / E. Gramer, C. Reiter, G. Gramer // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 22, № 1. – P. 104–110.
87. Grant, W. M. Progressive changes in the angle in congenital aniridia, with development of glaucoma / W. M. Grant, D. S. Walton // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 1974. – Vol. 72. – P. 207–228.
88. Gregory-Evans, K. Non-invasive anterior segment and posterior segment optical coherence tomography and phenotypic characterization of aniridia / K. Gregory-Evans, R. Cheong-Leen, S. M. George et al. // *Can. J. Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 46, № 4. – P. 337–44.
89. Gregory-Evans, C. Postnatal manipulation of Pax6 dosage reverses congenital tissue malformation defects / C. Gregory-Evans, X. Wang, K. Wasan et al. // *J. Clin. Invest.* – 2014. – Vol. 124, № 1. – P. 111–116.

90. Grindley, J. C. The role of Pax-6 in eye and nasal development / J. C. Grindley, D. R. Davidson, R. E. Hill // *Development*. – 1995. – Vol. 121, № 5. – P. 1433–1442.
91. Grindley, J. C. Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6^{Sey-1}Neu mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon / J. C. Grindley, L. K. Hargett, R. E. Hill et al. // *Mech. Dev.* – 1997. – Vol. 64, № 1-2. – P. 111–126.
92. Grønskov, K. Population-based risk estimates of Wilms tumor in sporadic aniridia. A comprehensive mutation screening procedure of PAX6 identifies 80% of mutations in aniridia / K. Grønskov, J. Olsen, A. Sand et al. // *Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 109, № 1. – P. 11–18.
93. Guo, H. A large novel deletion downstream of PAX6 gene in a Chinese family with ocular coloboma / H. Guo, L. Dai, Y. Huang et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 12, № 12. – P. e83073.
94. Halder, G. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila* / G. Halder, P. Callaerts, W. J. Gehring // *Science*. – 1995. – Vol. 267. – P. 1788–1792.
95. Hanson, I. Missense mutations in the most ancient residues of the PAX6 paired domain underlie a spectrum of human congenital eye malformations / I. Hanson, A. Churchill, J. Love et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 1999. – Vol. 8, № 2. – P. 165–172.
96. Hanson, I. M. Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly / I. M. Hanson, J. M. Fletcher, T. Jordan et al. // *Nat. Genet.* - 1994. – Vol. 6. – P. 168–173.
97. Haubst, N. Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development / N. Haubst, J. Berger, V. Radjendirane et al. // *Development*. – 2004. – Vol. 131, № 24. – P. 6131–6140.
98. Hill, R. E. Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene / R. E. Hill, J. Favor, B. L. Hogan et al. // *Nature*. – 1991. – Vol. 354. – P. 522–525.
99. Hingorani, M. Aniridia / M. Hingorani, I. Hanson, V. van Heyningen // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 20, № 10. – P. 1011–1017.
100. Hingorani, M. Detailed ophthalmologic evaluation of 43 individuals / M. Hingorani, K. A. Williamson, A. T. Moore et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – Vol. 50, № 6. – P. 2581–2590.

101. Holland, E. Management of aniridic keratopathy with keratolimbic allograft: a limbal stem cell transplantation technique / E. Holland, A. Djalilian, G. Schwartz // *Ophthalmology*. – 2003. – Vol. 110, № 1. – P. 125–130.
102. Hood, M. P. Abnormal cone ERGs in a family with congenital nystagmus and photophobia harboring a p.X423Lfs mutation in the PAX6 gene / M. P. Hood, N. C. Kerr, N. Smaoui et al. // *Doc. Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 130, № 2. – P. 157–164.
103. Hu, P. A novel 11p13 microdeletion encompassing PAX6 in a Chinese Han family with aniridia, ptosis and mental retardation / P. Hu, L. Meng, D. Ma et al. // *Mol. Cytogenet.* – 2015. – Vol. 8, № 1. – P. 3.
104. Ihnatko, R. Congenital aniridia and the ocular surface / R. Ihnatko, U. Eden, Fagerholm et al. // *Ocul. Surf.* – 2016. – Vol. 14, № 2. – P. 196–206.
105. Ishida, K. Glaucoma drainage implants in pediatric patients / K. Ishida, A. K. Mandal, P. A. Netland et al. // *Ophthalmol. Clin. North. Am.* – 2005. – Vol. 18, № 3. – P. 431–442.
106. Ito, Y. A. Severe molecular defects of a novel FOXC1 W152G mutation result in aniridia / Y.A. Ito, T.K. Footz, F.B. Berry et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – Vol. 50, № 8. – P. 3573–3579.
107. Jastaneiah, S. Association of aniridia and dry eyes / S. Jastaneiah, A. Al-Rajhi // *Ophthalmology*. – 2005. – Vol. 112, № 5. – P. 1535–1540.
108. Jesburg, D. O. Aniridia with retinal lipid deposits / D. O. Jesburg, S. Kinoshita, W. Adachi et al. // *Arch. Ophthalmol.* – 1962. – Vol. 68. – P. 331–336.
109. Jonas, J. Lens thickness and associated factors / J. Jonas, V. Nangia, C. Gupta // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 40, № 6. – P. 583–90.
110. Jordan, T. The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia / T. Jordan, I. Hanson, D. Zaletayev et al. // *Nat. Genet.* – 1992. – Vol. 1, № 5. – P. 328–332.
111. Kammandel, B. Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity / B. Kammandel, K. Chowdhury, A. Stoykova et al. // *Dev. Biol.* – 1999. – Vol. 205, № 1. – P. 79–97.
112. Käsmann-Kellner, B. Congenital aniridia or PAX6 syndrome / B. Käsmann-Kellner, B. Seitz // *Ophthalmologe*. – 2014. – Vol. 111, № 12. – P. 1144.
113. Khajavi, M. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease / M. Khajavi, K. Inoue, J.R. Lupski et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 14, № 10. – P. 1074–1081.

114. Kim, J. Analysis of Pax6 expression using a BAC transgene reveals the presence of a paired-less isoform of Pax6 in the eye and olfactory bulb / J. Kim, D. Lauderdale // *Dev. Biol.* – 2006. – Vol. 292, № 2. – P. 486–505.
115. Kim, J. Overexpression of pairedless Pax6 in the retina disrupts corneal development and affects lens cell survival / J. Kim, J. D. Lauderdale // *Dev. Biol.* – 2008. – Vol. 313, № 1. – P. 434–454.
116. Kinoshita, S. Characteristics of the human ocular surface epithelium / S. Kinoshita, W. Adachi, C. Sotozono et al. // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2001. – Vol. 20, № 5. – P. 639–673.
117. Kirwan, C. Central corneal thickness and corneal diameter in premature infants / C. Kirwan, M. O'Keefe, S. Fitzsimon // *Acta. Ophthalmol. Scand.* – 2005. – Vol. 83, № 6. – P. 751–753.
118. Kleinjan, D. A. Conserved elements in Pax6 intron 7 involved in (auto) regulation and alternative transcription / D. A. Kleinjan, A. Seawright, A. J. Childs et al. // *Dev. Biol.* – 2004. – Vol. 265, № 2. – P. 462–477.
119. Kleinjan, D. A. Long range downstream enhancers are essential for Pax6 expression / D. A. Kleinjan, A. Seawright, S. Mella et al. // *Dev. Biol.* – 2006. – Vol. 299, № 2. – P. 563–581.
120. Kleinjan, D. A. Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6 / D. A. Kleinjan, A. Seawright, A. Schedl et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – Vol. 10, № 19. – P. 2049–2059.
121. Kokotas, H. Clinical and molecular aspects of aniridia / H. Kokotas, M. B. Petersen // *Clin. Genet.* – 2010. – Vol. 77, № 5. – P. 409–420.
122. Koroma, B. The Pax-6 homeobox gene is expressed throughout the corneal and conjunctival epithelia / B. Koroma, J. Yang, O. Sundin et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1997. – Vol. 38, № 1. – P. 108–120.
123. Kremer, I. Results of penetrating keratoplasty in aniridia / I. Kremer, R. K. Rajpal, C. J. Rapuano et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 1993. – Vol. 115, № 3. – P. 317–320.
124. Kucerova, R. Cell surface glycol-conjugate abnormalities and corneal epithelial wound healing in the Pax6^{+/-} mouse model of aniridia-related keratopathy / R. Kucerova, J. Ou, D. Lawson et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47, № 12. – P. 5276–5282.
125. Kusumesh, R. Congenital aniridia with ectopia lentis / R. Kusumesh, A. Ambastha // *J. Clin. Diagn. Res.* [serial online]. – 2016. – Vol. 10, № 7.

126. Lagali, N. Dendritic cell maturation in the corneal epithelium with onset of type 2 diabetes is associated with tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 / N. Lagali, R.A. Badian, X. Liu et al. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 14248.

127. Lagali, N. In vivo morphology of the limbal palisades of fogt correlates with progressive stem cell deficiency in aniridic-related keratopathy / N. Lagali, U. Eden, T.P. Utheim et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2013. – Vol. 54, № 8. – P. 5333–5342.

128. Lagali, N. Stage-related central corneal epithelial transformation in congenital aniridia-associated keratopathy / N. Lagali, B. Wowra, D. Dobrowolski et al. // *Ocul. Surf.* – 2018. – Vol. 16, № 1. – P. 163–172.

129. Lagali, N. Early phenotypic features of aniridia-associated keratopathy and association with *PAX6* coding mutations / N. Lagali, B. Wowra, F.N. Fries et al. // *Ocul. Surf.* – 2019. – pii: S1542-0124(19)30253–30258 [Epub ahead of print].

130. Landsend, E. S. Meibomian gland dysfunction and keratopathy are associated with dry eye disease in aniridia / E. S. Landsend, H. R. Pedersen, Ø. A. Utheim et al. // *Br. J. Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 103, № 1. – P. 119–124.

131. Landsend, E. S. The genetics of congenital aniridia – a guide for the ophthalmologist / E. S. Landsend, Ø. A. Utheim, H. R. Pedersen et al. // *Surv. Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 63, № 1. – P. 105–113.

132. Landsend, E. S. The level of inflammatory tear cytokines is elevated in congenital aniridia and associated with meibomian gland dysfunction / E. S. Landsend, Ø. A. Utheim, H. R. Pedersen et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2018. – Vol. 59. – P. 2197–204.

133. Lauderdale, J. D. 3' deletions cause aniridia by preventing *PAX6* gene expression / J. D. Lauderdale, J. S. Wilensky, E. R. Oliver et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* – 2000. – Vol. 97, № 25. – P. 13755–13759.

134. Layman, P. R. Frequent occurrence of hypoplastic optic disks in patients with aniridia / P. R. Layman, D. R. Anderson, J. T. Flynn // *Am. J. Ophthalmol.* – 1974. – Vol. 77, № 4. – P. 513–516.

135. Lee, B. A family with a mild form of congenital nystagmus and optic disc coloboma caused by a novel *PAX6* mutation / B. Lee, D. G. Choi, B. Y. Chun et al. // *Gene.* – 2019. – Vol. 705. – P. 177–180.

136. Lee, H. J. A review of the clinical and genetic aspects of aniridia / H. J. Lee, A. Colby // *Semin. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 28, № 5-6. – P. 306–312.

137. Lee, H. Aniridia: Current pathology and management / H. Lee, R. Khan, M. O'Keefe // *Acta. Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 86, № 7. – P. 708–715.
138. Lee, N. Y. Three cases with unusual ophthalmic phenotypes of congenital aniridia / N. Y. Lee, Y. E. Lee, J. Mok et al. // *Can. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 48, № 4. – P. 340–342.
139. Lee, H. Complications and visual prognosis in children with aniridia / H. Lee, K. Meyers, B. Lanigan, M. O'Keefe // *J. Pediatric. Ophthalmol. Strabismus.* – 2010. – Vol. 47, № 4. – P. 205–210.
140. Leiper, L. The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6^{+/-} mouse model of epithelial wound-healing delay / L. Leiper, P. Walczysko, R. Kucerova et al. // *BMC Biol.* – 2006. – Vol. 4. – P. 27.
141. Levis, H. Rapid tissue engineering of biomimetic human corneal limbal crypts with 3D niche architecture / H. Levis, I. Massie, M. Dziasko et al. // *Biomaterials.* – 2013. – Vol. 34, № 35. – P. 8860–8868.
142. Lim, H. T. Comparison between aniridia with and without PAX6 mutations: clinical and molecular analysis in 14 Korean patients with aniridia / H. T. Lim, E. J. Seo, G. H. Kim et al. // *Ophthalmology.* – 2012. – Vol. 119, № 6. – P. 1258–1264.
143. Lima Cunha, D. The spectrum of PAX6 mutations and genotype-phenotype correlations in the eye / D. Lima Cunha, G. Arno, M. Corton, M. Moosajee // *Genes (Basel).* – 2019. – doi: 10.3390/genes10121050 [Epub ahead of print].
144. Liu, C. Cornea-specific expression of K12 keratin during mouse development / C. Liu, G. Zhu, A. Westerhausen-Larson et al. // *Curr. Eye Res.* – 1993. – Vol. 12, № 11. – P. 963–974.
145. Lopez-Garcia, J. Congenital aniridia keratopathy treatment / J. Lopez-Garcia, I. Garcia-Lozano, L. Rivas et al. // *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* – 2006. – Vol. 81, № 8. – P. 435–444.
146. López-García, J. Autologous serum eye drops diluted with sodium hyaluronate: clinical and experimental comparative study / J. López-García, I. García-Lozano, L. Rivas et al. // *Acta. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 92, № 1. – P. 22–29.
147. Lopez-Garcia, J. Moderate limbal deficiency in patients with congenital aniridia treated with amniotic membrane transplantation / J. Lopez-Garcia, L. Rivas, I. Garcia-Lozano et al. // *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* – 2005. – Vol. 80, № 9. – P. 517–523.
148. Mackman, G. Corneal changes in aniridia / G. Mackman, F.S. Brightbill, J.M. Opitz et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 1979. – Vol. 87, № 4. – P. 497–502.

149. Malandrini, A. PAX6 mutation in a family with aniridia, congenital ptosis and mental retardation / A. Malandrini, F. Mari, S. Palmari et al. // *Clin. Genet.* – 2001. – Vol. 60, № 2. – P. 151–154.
150. Margo, C. E. Congenital aniridia: a histopathologic study of the anterior segment in children / C. E. Margo // *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus.* – 1983. – Vol. 20, № 5. – P. 192–198.
151. Marquardt, T. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells / T. Marquardt, R. Ashery-Padan, N. Andrejewski et al. // *Cell.* – 2001. – Vol. 105, № 1. – P. 43–55.
152. Mastropasqua, L. Epithelial dendritic cell distribution in normal and inflamed human cornea: in vivo confocal microscopy study / L. Mastropasqua, M. Nubile, M. Lanzini et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 142, № 5. – P. 736–744.
153. Mayer, K. L. Keratopathy in congenital aniridia / K. L. Mayer, M. L. Nordlund, G. S. Schwartz et al. // *Ocul. Surf.* – 2003. – Vol. 1, № 2. – P. 74–79.
154. McCulley, T. J. Aniridia and optic nerve hypoplasia / T. J. McCulley, K. Mayer, S. S. Dahr et al. // *Eye (Lond).* – 2005. – Vol. 19, № 7. – P. 762–764.
155. McEntagart, M. A restricted repertoire of de novo mutations in ITPR1 cause Gillespie syndrome with evidence for dominant-negative effect / M. McEntagart, K. A. Williamson, J. K. Rainger et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2016. – Vol. 98, № 5. – P. 981–992.
156. Menezo, J. L. Implantation of iris devices in congenital and traumatic aniridias: surgery solutions and complications / J. L. Menezo, R. Martinez-Costa, A. Cisneros et al. // *Eur. J. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 15, № 4. – P. 451–457.
157. Miri, A. In vivo confocal microscopic findings in patients with limbal stem cell deficiency / A. Miri, T. Alomar, M. Nubile et al. // *Br. J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 96, № 4. – P. 523–529.
158. Moosajee, M. PAX6-Related Aniridia / M. Moosajee, M. Hingorani, A.T. Moore // Adam M. P., Ardinger H. H., Pagon R. A. et al. *GeneReviews*. Eds.; University of Washington: Seattle, DC, USA, 2018.
159. Morison, A. Observation sur un enfant dont les yeux n'avaient point d'iris / A. Morison // *Nouveau Journal de Médecine, Chirurgie, Pharmacie.* – 1819. – Vol. 6. – P. 105–107.
160. Nallathambi, J. PAX6 missense mutations associated in patients with optic nerve malformation / J. Nallathambi, G. Neethirajan, S. Shashikant et al. // *Mol. Vis.* – 2006. – Vol. 12. – P. 236–242.

161. Nanjo, Y. A novel mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in a patient with Peters' anomaly / Y. Nanjo, S. Kawasaki, K. Mori et al. // *Br. J. Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 88, № 5. – P. 720–721.
162. Nascimento, S. R. Glaucoma management in patients with aniridia and Boston type 1 keratoprosthesis / S. R. Nascimento, L. Q. Shen, C. A. Chiou et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 2019. – Vol. 48, № 3. – P. 228–233.
163. Nelson, L. Aniridia: A review / L. Nelson, G. Spaeth, T. Nowinski et al. // *Surv. Ophthalmol.* – 1984. – Vol. 28, № 6. – P. 621–42.
164. Netland, P. A. Ocular and systemic findings in a survey of aniridia subjects / P. A. Netland, M. L. Scott, J. Wt. Boyle et al. // *J. AAPOS.* – 2011. – Vol. 15, № 6. – P. 562–566.
165. Ninkovic, J. The transcription factor Pax6 regulates survival of dopaminergic olfactory bulb neurons via crystallin alphaA. / J. Ninkovic, L. Pinto, S. Petricca et al. // *Neuron.* – 2010. – Vol. 68, № 4. – P. 682–694.
166. Nischal, K. K. Genetics of congenital corneal opacification - impact on diagnosis and treatment / K. K. Nischal // *Cornea.* – 2015. – Vol. 34, suppl. 10. – S. 24–34.
167. Nishida, K. Ocular surface abnormalities in aniridia / K. Nishida, S. Kinoshita, Y. Ohashi et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 1995. – Vol. 120, № 3. – P. 368–375.
168. Nubile, M. In vivo confocal microscopy in diagnosis of limbal stem cell deficiency / M. Nubile, M. Lanzini, A. Miri et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 155, № 2. – P. 220–232.
169. Ohsawa, R. Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors / R. Ohsawa, R. Kageyama // *Brain Res.* – 2008. – V. 1192. – P. 90–98.
170. Okamoto, F. Ultrasound biomicroscopic findings in aniridia / F. Okamoto, S. Nakano, C. Okamoto et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 137, № 5. – 858–862.
171. Osher, R. H. Cataract surgery combined with implantation of an artificial iris / R. H. Osher, S. E. Burk // *J. Cataract. Refract. Surg.* – 1999. – Vol. 25, № 11. – P. 1540–1547.
172. Otulana, T. O. Buphthalmos with aniridia in a Nigerian child. A Case Report / T. O. Otulana, H. A. Ajibode // *Niger. Med. Pract.* – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 61–63.
173. Ouyang, H. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis / H. Ouyang, Y. Xue, Y. Lin et al. // *Nature.* – 2014. – Vol. 511, № 7509. – P. 358–361.

174. Park, S. H. Clinical features of Korean patients with congenital aniridia / S. H. Park, Y. G. Park, M. Y. Lee et al. // *Korean. J. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 24, № 5. – P. 291–296.
175. Pauklin, M. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency / M. Pauklin, T. Fuchsluger, H. Westekemper et al. // *Dev. Ophthalmol.* – 2010. – Vol. 45. – P. 57–70.
176. Paz, M. F. Long-term visual prognosis of corneal and ocular surface surgery in patients with congenital aniridia / M. F. Paz, T. J. Alvarez, R. I. Barraquer et al. // *Acta. Ophthalmol.* – 2008. – Vol. 86, № 7. – P. 735–740.
177. Pearce, W. Variability of iris defects in autosomal dominant aniridia / W. Pearce // *Can. J. Ophthalmol.* – 1994. – Vol. 29, № 1. – P. 25–29.
178. Pearton, D. Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of multistep signals / D. Pearton, Y. Yang, D. Dhouailly // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102, № 10. – P. 3714–3719.
179. Pedersen, H. R. The cone photoreceptor mosaic in aniridia: within-family phenotype-genotype discordance / H. R. Pedersen, M. Neitz, S. J. Gilson et al. // *Ophthalmol. Retin.* – 2019. – Vol. 3. – P. 523–534.
180. Peral, A. Diadenosine polyphosphates in the tears of aniridia patients / A. Peral, G. Carracedo, J. Pintor // *Acta. Ophthalmol.* – 2015. – Vol 93, №5. – P. 337–342.
181. Peralta, R. J. The Clinical characterization and surgical correction of blepharoptosis associated with congenital aniridia / R J. Peralta, R. C. Kersten, E. J. Holland et al. // *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.* – 2015. – Vol. 31. – P. 38–42.
182. Perveen, R. Phenotypic variability and asymmetry of Rieger syndrome associated with PITX2 mutations / R. Perveen, I. C. Lloyd, J. Clayton-Smith et al. // *Invest. Ophthalmol. Visl Sci.* – 2000. – Vol. 41, № 9. – P. 2456–2460.
183. Peter, N. M. PAX6 mutation in association with ptosis, cataract, iris hypoplasia, corneal opacification and diabetes: a new variant of familial aniridia? / N. M. Peter, M. Leyland, H. S. Mudhar et al. // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 41, № 9. – P. 835–841.
184. Philips, G. T. Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type / G. T. Philips, C. N. Stair, L. Young et al. // *Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 279, № 2. – P. 308–321.
185. Plaisancié, J. Implication of non-coding PAX6 mutations in aniridia / J. Plaisancié, M. Tarilonte, P. Ramos et al. // *Hum. Genet.* – 2018. – Vol. 137, № 10. – P. 831–846.

186. Plaza, S. Identification and characterization of a neuroretina-specific enhancer element in the quail Pax-6 (Pax-QNR) gene / S. Plaza, C. Dozier, M. C. Langlois et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1995. – Vol. 15, № 2. – P. 892–903.
187. Prokudin, I. Exome sequencing in developmental eye disease leads to identification of causal variants in GJA8, CRYGC, PAX6 and CYP1B1 / I. Prokudin, C. Simons, J.R. Grigg et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2014. – Vol. 22, № 7. – P. 907–915.
188. Quinn, J. C. Multiple functions for Pax6 in mouse eye and nasal development / J. C. Quinn, J. D. West, R. E. Hill // *Genes. Dev.* – 1996. – Vol. 10, № 4. – P. 435–446.
189. Qiu, X. The efficacy and complications of black diaphragmintra-ocular lens implantation in patients with congenital aniridia / X. Qiu, Y. Ji, T. Zheng, Y. Lu // *Acta. Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 94, № 5. – P. 340–344.
190. Ramaesh, K. Evolving concepts on the pathogenic mechanisms of aniridia related keratopathy / K. Ramaesh, T. Ramaesh, G. Dutton et al. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 37, № 3. – P. 547–557.
191. Redeker, E. J. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) enhances the molecular diagnosis of aniridia and related disorders / E. J. Redeker, A. S. de Visser, A. A. Bergen et al. // *Mol. Vis.* – 2008. – Vol. 14. – P. 836–840.
192. Regalado, E. S. Clinical history and management recommendations of the smooth muscle dysfunction syndrome due to ACTA2 arginine 179 alterations / E. S. Regalad, L. Mellor-Crummey, J. De Backer et al. // *Genet. Med.* – 2018. – Vol. 20, № 10. – P. 1206–1215.
193. Reinhard, T. Black diaphragm aniridia intraocular lens for congenital aniridia: long-term follow-up / T. Reinhard, S. Engelhardt, R. Sundmacher // *J. Cataract. Refract. Surg.* – 2000. – Vol. 26, № 3. – P. 375–381.
194. Reis, L. M. Genetics of anterior segment dysgenesis disorders / L. M. Reis, E. V. Semina et al. // *Curr. Opin. Ophthalmol.* – 2011. – Vol. 22, № 5. – P. 314–324.
195. Remez, L. A. Pax6 is essential for the generation of late-born retinal neurons and for inhibition of photoreceptor-fate during late stages of retinogenesis / L. A. Remez, A. Onishi, Y. Menuchin-Lasowski et al. // *Dev. Biol.* – 2017. – Vol. 432, № 1. – P. 140–150.
196. Richdale, K. Lens thickness with age and accommodation by optical coherence tomography / K. Richdale, M. Bullimore, K. Zadnik // *Ophthalm. Physiol. Optics.* – 2008. – Vol. 28, № 5. – P. 441–447.

197. Rivas, L. Impression cytology study of dry eyes in patients with congenital aniridia / L. Rivas, J. Murube, A. Rivas et al. // *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* – 2003. – Vol. 78, № 11. – P. 615–622.
198. Robinson, D. O. Genetic analysis of chromosome 11p13 and the PAX6 gene in a series of 125 cases referred with aniridia / D. O. Robinson, R. J. Howarth, K. A. Williamson et al. // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2008. – Vol. 146A, № 5. – P. 558–569.
199. Roulez, F. M. Congenital fixed dilated pupils due to ACTA22 multisystemic smooth muscle dysfunction syndrome / F. M. Roulez, F. Fran, D. Patricia et al. // *J. Neuroophthalmol.* – 2014. – Vol. 34, № 2. – P. 137–143.
200. Sadagopan, K. A. Anirdia-like phenotype caused by 6p25 dosage aberrations / K. A. Sadagopan, G. T. Liu, J. E. Capasso et al. // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2015. – Vol. 167A, № 3. – P. 524–528.
201. Sannan, N. S. Correlation of novel PAX6 gene abnormalities in aniridia and clinical presentation / N. S. Sannan, C. Y. Gregory-Evans, C. J. Lyons et al. // *Can. J. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 52, № 6. – P. 570–577.
202. Satake, Y. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency / Y. Satake, K. Higa, K. Tsubota et al. // *Ophthalmology.* – 2011. – Vol. 118, № 8. – P. 1524–1530.
203. Sawada, M. A case of aniridia with unilateral Peters anomaly / M. Sawada, M. Sato, A. Hikoya et al. // *J. AAPOS.* – 2011. – Vol. 15, № 1. – P. 104–106.
204. Schanilec, P. Aniridia: a comparative overview / P. Schanilec, R. Biernacki // *Am. Orthopt. J.* – 2014. – Vol. 64. – P. 98–104.
205. Schedl, A. Influence of Pax6 gene dosage on development – overexpression causes severe eye abnormalities / A. Schedl, A. Ross, M. Lee et al. // *Cell.* – 1996. – Vol. 86, № 1. – P. 71–82.
206. Schilter, K. F. Whole-genome copy number variation analysis in anophthalmia and microphthalmia / K.F. Schilter, L.M. Reis, A. Schneider et al. // *Clin. Genet.* – 2013. – Vol. 84, № 5. – P. 473–481.
207. Schmidt-Sidor, B. Malformations of the brain in two fetuses with a compound heterozygosity for two PAX6 mutations / B. Schmidt-Sidor, K. Szymanska, K. Williamson et al. // *Folia. Neuropathol.* – 2009. – Vol. 47, № 4. – P. 372–382.
208. Seefelder, R. Die aniridie als eine entwicklungshemmung der retina / R. Seefelder // *Albrecht von Graæes Archiv für Ophthalmologie.* – 1909. – Vol. 70, № 1. – P. 65–87.

209. Shaham, O. Pax6: a multi-level regulator of ocular development / O. Shaham, Y. Menuchin, C. Farhy, R. Ashery-Padan // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2012. – Vol. 31, № 5. – P. 351–376.

210. Sharan, S. Elliptical anterior iris stromal defects associated with PAX6 gene sequence changes / S. Sharan, F. Mirzayans, T. Footz et al. // *J. AAPOS.* – 2008. – Vol. 12, № 4. – P. 340–343.

211. Shields, M. B. Aniridia and congenital ptosis / M. B. Shields, J. W. Reed // *Ann. Ophthalmol.* – 1975. – Vol. 7, № 2. – P. 203–205.

212. Shiple, D. Keratopathy, cataract, and dry eye in a survey of aniridia subjects / D. Shiple, B. Finklea, J. Lauderdale et al. // *Clin. Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 9. – P. 291–295.

213. Shortt, A. Three-year outcomes of cultured limbal epithelial allografts in aniridia and Stevens – Johnson syndrome evaluated using the clinical outcome assessment in surgical trials assessment tool / A. Shortt, C. Bunce, H. Levis et al. // *Stem. Cells. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 3, № 2. – P. 265–75.

214. Shortt, A. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells / A. Shortt, G. Secker, P. Munro et al. // *Stem. Cells.* – 2007. – Vol. 25, № 6. – P. 1402–1409.

215. Simpson, T. I. Pax6; a pleiotropic player in development / T. I. Simpson, D. J. Price // *Bioessays.* – 2002. – Vol. 24, № 11. – P. 1041–1051.

216. Singh, S. Missense mutation at the C-terminus of PAX6 negatively modulates homeodomain function / S. Singh, L. Y. Chao, R. Mishra et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2001. – Vol. 10, № 9. – P. 911–918.

217. Singh, B. Clinical manifestations of congenital aniridia. / B. Singh, A. Mohamed, S. Chaurasia et al. // *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus.* – 2014. – Vol. 51, № 1. – P. 59–62.

218. Sivak, J. Pax-6 expression and activity are induced in the reepithelializing cornea and control activity of the transcriptional promoter for matrix metalloproteinase gelatinase / J. Sivak, R. Mohan, W. Rinehart et al. // *Dev. Biol.* – 2000. – Vol. 222, № 1. – P. 41–54.

219. Skeens, H. M. Congenital aniridia variant: minimally abnormal irides with severe limbal stem cell deficiency / H. M. Skeens, B. P. Brooks, E. J. Holland et al. // *Ophthalmology.* – 2011. – Vol. 118, № 7. – P. 1260–1264.

220. Solebo, A. L. Epidemiology of blindness in children / A. L. Solebo, L. Teoh, J. Rahi // *Arch. Dis. Child.* – 2017. – Vol. 102, № 9. – P. 853–857.
221. Solomon, B. D. Compound heterozygosity for mutations in PAX6 in a patient with complex brain anomaly, neonatal diabetes mellitus, and microphthalmia / B. D. Solomon, D. E. Pineda-Alvarez, J. Z. Balog et al. // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2009. – Vol. 149A, № 11. – P. 2543–2546.
222. Sonoda, S. A novel PAX6 gene mutation (P118R) in a family with congenital nystagmus associated with a variant form of aniridia / S. Sonoda, Y. Isashiki, Y. Tabata et al. // *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2000. – Vol. 238, № 7. – P. 552–558.
223. Souzeau, E. PAX6 molecular analysis and genotype–phenotype correlations in families with aniridia from Australasia and Southeast Asia / E. Souzeau, A. K. Rudkin, A. Dubowsky et al. // *Mol. Vis.* – 2018. – Vol. 24. – P. 261–273.
224. Srinivasan, S. Prosthetic iris devices / S. Srinivasan, D. S. Ting, M. E. Snyder et al. // *Can. J. Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 49, № 1. – P. 6–17.
225. Stoykova, A. Forebrain patterning defects in small eye mutant mice / A. Stoykova, R. Fritsch, C. Walther // *Development.* – 1996. – Vol. 122, № 11. – P. 3453–3465.
226. Stoykova, A. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns / A. Stoykova, P. Gruss // *J. Neurosci.* – 1994. – Vol. 14, № 3. – P. 1395–1412.
227. Sundmacher, R. Black diaphragm intraocular lens in congenital aniridia / R. Sundmacher, T. Reinhard, C. Althaus // *Ger. J. Ophthalmol.* – 1994. – Vol. 3, № 4-5. – P. 197–201.
228. Syrimis, A. Aniridia due to a novel microdeletion affecting PAX6 regulatory enhancers: case report and review of the literature / A. Syrimis, N. Nicolaou, A. Alexandrou et al. // *J. Genet.* – 2018. – Vol. 97, № 2. – P. 555–562.
229. Tang, H. K. Dissection of the transactivation function of the transcription factor encoded by the eye developmental gene PAX6 / H. K. Tang, S. Singh, G. F. Saunders // *J. Biol. Chem.* – 1998 – Vol. 273, № 13. – P. 7210–7221.
230. Taylor, R. H. The epidemiology of pediatric glaucoma: the Toronto experience / R. H. Taylor, J. R. Ainsworth, A. R. Evans et al. // *J. AAPOS.* – 1999. – Vol. 3, № 3. – P. 308–315.
231. The prevention of blindness. Report of a WHO Study Group // *World Health. Organ. Tech. Rep. Ser.* – 1973. – Vol. 518. – P. 1–18.

232. Thomas, M. G. Structural grading of foveal hypoplasia using spectral-domain optical coherence tomography a predictor of visual acuity? / M. G. Thomas, A. Kumar, S. Mohammad et al. // *Ophthalmology*. – 2011. – Vol. 118, № 8. – P.1653–1660.
233. Thomas, M. G. Is high-resolution spectral domain optical coherence tomography reliable in nystagmus? / M. G. Thomas, A. Kumar, J. R. Thompson et al. // *Br. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 97, № 4. – P. 534–536.
234. Tiller, A. The influence of keratoplasty on visual prognosis in aniridia: a historical review of one large family / A. Tiller, M. Odenthal, F. Verbraak et al. // *Cornea*. – 2003. – Vol. 22, № 2. – P. 105–110.
235. Ton, C. C. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region / C. C. Ton, H. Hirvonen, Miwa et al. // *Cell*. – 1991. – Vol. 67, № 6. – P. 1059–1074.
236. Ton, C. G. Small eye (SEY); cloning and characterization on the murine homolog of the human aniridia gene / C. Ton, H. Miwa, G. Saunders et al. // *Genomics*. – 1992. – № 13, № 2. – P. 251–256.
237. Traboulsi, E. I. Ocular malformations and developmental genes / E. I. Traboulsi // *J. AAPOS*. – 1998. – Vol. 2, № 6. – P. 317–323.
238. Tremblay, F. Effects of PAX6 mutations on retinal function: an electroretinographic study / F. Tremblay, S. K. Gupta, I. De Becker et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 1998. – Vol. 126, № 2. – P. 211–218.
239. Tsai, J. H. A progressive anterior fibrosis syndrome in patients with postsurgical congenital aniridia / J. H. Tsai, J. M. Freeman, C. C. Chan et al. // *Am. J. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 140, № 6. – P. 1075–1079.
240. Tzoulaki, I. PAX6 mutations: genotype-phenotype correlations / I. Tzoulaki, I. M. White, I. M. Hanson // *BMC Genet.* – 2005. – Vol. 6. – P. 27.
241. van Heyningen, V. PAX6 in sensory development / V. van Heyningen, K. A. Williamson // *Hum. Mol. Genet.* – 2002. – Vol. 11, № 10. – P. 1161–1167.
242. Viestenz, A. Clinical anatomy of the anterior chamber angle in congenital aniridia – and consequences for trabeculotomy/cyclophotocoagulation / A. Viestenz, B. Seitz, E. Deland et al. // *Clin. Anat.* – 2018. – Vol. 31, № 1. – P. 64–67.
243. Vijaya, L. Prevalence of primary open-angle glaucoma in an urban south Indian population and comparison with a rural population. The Chennai Glaucoma Study / L. Vijaya, R. George, M. Baskaran et al. // *Ophthalmology*. – 2008. – Vol. 115, № 4. – P. 648–654.

244. Vincent, M. C. Screening for PAX6 gene mutations is consistent with haploinsufficiency as the main mechanism leading to various ocular defects / M. C. Vincent, A. L. Pujo, D. Olivier et al. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 11, № 2. – P. 163–169.
245. Walkden, A. Iridocorneal endothelial syndrome: clinical perspectives / A. Walkden, L. Au et al. // *Clin. Ophthalmol.* – 2018. – Vol. 12. – P. 657–664.
246. Wammanda, R. D. Aniridia associated with ptosis in three generations of the same family / R. D. Wammanda, H. W. Idris // *Ann. Trop. Paediatr.* – 2005. – Vol. 25, № 1. – P. 59–62.
247. Wang, G. M. Phenotypic variation in a four-generation family with aniridia carrying a novel PAX6 mutation / G. M. Wang, L. Prasov, H. Al-Hasani et al. // *J. Ophthalmol.* – 2018: 5978293.
248. Wang, X. Efficacy of postnatal in vivo nonsense suppression therapy in a Pax6 mouse model of aniridia / X. Wang, K. Gregory-Evans, K. M. Wasan et al. // *Mol. Ther. Nucleic. Acids.* – 2017. – Vol. 16, № 7. – P. 417–428.
249. Warren, N. The transcription factor, Pax6, is required for cell proliferation and differentiation in the developing cerebral cortex / N. Warren // *Cereb. Cortex.* – 1999. – Vol. 9, № 6. – P. 627–635.
250. Wawrocka, A. PAX6 3' deletion in a family with aniridia / A. Wawrocka, B. Budny, S. Debicki et al. // *Ophthalmic. Genet.* – 2012. – Vol. 33, № 1. – P. 44–48.
251. Wawrocka, A. The genetics of aniridia – simple things become complicated / A. Wawrocka, M. R. Krawczynski // *J. Appl. Genet.* – 2018. – Vol. 59, № 2. – P. 151–159.
252. Wawrocka, A. 11p13 deletions can be more frequent than the PAX6 gene point mutations in Polish patients with aniridia / A. Wawrocka, A. Sikora, L. Kuszel, M. R. Krawczynski // *J. Appl. Genet.* – 2013. – Vol. 54, № 3. – P. 345–351.
253. Weh, E. Whole exome sequence analysis of Peters anomaly / E. Weh, L. Reis, H. C. Happ // *Human. Genet.* – 2014. – Vol. 133, № 12. – P. 1497–1511.
254. Whitson, J. Central corneal thickness in patients with congenital aniridia / J. Whitson, C. Liang, D. Godfrey et al. // *Eye Contact. Lens.* – 2005. – Vol. 31, № 5. – P. 221–224.
255. Wiggins, R. E. The results of glaucoma surgery in aniridia / R. E. Wiggins, K. F. Tomey // *Arch. Ophthalmol.* – 1992. – Vol. 110, № 4. – P. 503–505.

256. Willcock, C. Congenital iris ectropion as an indicator of variant aniridia / C. Willcock, J. Grigg, M. Wilson et al. // *Br. J. Ophthalmol.* – 2006. – Vol. 90, № 5. – P. 569–658.
257. Williams, S. C. A highly conserved lens transcriptional control element from the Pax-6 gene / S. C. Williams, C. R. Altmann, R. L. Chow et al. // *Mech. Dev.* – 1998. – Vol. 73, № 2. – P. 225–229.
258. Williamson, K. A. Recurrent heterozygous *PAX6* missense variants cause severe bilateral microphthalmia via predictable effects on DNA-protein interaction / K. A. Williamson, H. N. Hall, L. J. Owen et al. // *Genet. Med.* – 2019. – doi: 10.1038/s41436-019-0685-9 [Epub ahead of print].
259. Williamson, K. A. The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma / K. A. Williamson, D. R. FitzPatrick // *Eur. J. Med. Genet.* – 2014. – Vol. 57, № 8. – P. 369–380.
260. Wolf, L. V. Identification of pax6-dependent gene regulatory networks in the mouse lens / L. V. Wolf, Y. Yang, J. Wang et al. // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4, № 1. – P. e4159.
261. Wu, L. Abnormalities of ERG in congenital aniridia / L. Wu, Q. Ma, Y. Chen et al. // *Yan Ke Xue Bao.* – 1991. – Vol. 7, № 3. – P. 151–152.
262. Xu, P. X. Regulation of Pax6 expression is conserved between mice and flies / P. X. Xu, X. Zhang, S. Heaney et al. // *Development.* – 1999. – Vol. 126, № 2. – P. 383–395.
263. Yamamoto, T. Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4 / T. Yamamoto, M. Togawa, S. Shimada et al. // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2014. – Vol. 164A, № 3. – P. 634–638.
264. Yokoi, T. Genotype–phenotype correlation of PAX6 gene mutations in aniridia / T. Yokoi, S. Nishina, M. Fukami et al. // *Human. Genome. Var.* – 2016. – Vol. 3. – P. 150–152.
265. Zhang, X. Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant / X. Zhang, C. T. Huang, J. Chen et al. // *Cell. Stem. Cell.* – 2010. – Vol. 7, № 1. – P. 90–100.
266. Zhang, X. Large novel deletions detected in Chinese families with aniridia: correlation between genotype and phenotype / X. Zhang, Q. Zhang, Y. Tong et al. // *Mol. Vis.* – 2011. – Vol. 17. – P. 548–557.
267. Zhang, X. Mutation spectrum of PAX6 in Chinese patients with aniridia / X. Zhang, P. Wang, S. Li et al. // *Mol. Vis.* – 2011. – Vol. 17. – P. 2139–2147.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Длина глаза у пациентов с *РАХ6*-ВА и здоровыми пациентами

Возраст	Контрольная группа			Группа пациентов с <i>РАХ6</i> -ВА			p*
	Количество глаз, n	Длина глаза, мм (M ± σ)	Диапазон данных, мм	Количество глаз, n	Длина глаза, мм (M ± σ)	Диапазон данных, мм	
2–4 месяца	22	18,67 ± 0,5	18,9–19,07	4	18,41 ± 0,27	18,16–18,72	0,59
6–8 месяцев	32	20,14 ± 0,52	19,49–20,90	7	19,26 ± 0,80	18,12–20,20	0,21
1–3 лет	30	20,48 ± 1,0	19,03–21,73	6	20,40 ± 0,84	19,01–21,90	0,80
4–7 лет	30	21,86 ± 0,8	20,61–23,24	7	21,56 ± 1,60	20,10–24,94	0,27
8–10 лет	31	22,88 ± 0,53	21,88–23,65	9	22,73 ± 1,75	20,70–25,93	0,30
11–13 лет	29	23,50 ± 1,0	21,75–25,08	10	23,34 ± 1,60	21,54–25,89	0,79
14–20 лет	31	24,01 ± 1,41	20,80–27,34	8	24,29 ± 2,50	21,56–28,67	0,96
21–30 лет	30	24,0 ± 1,54	20,02–26,70	14	24,23 ± 2,18	20,27–28,51	1,00
31–40 лет	32	24,14 ± 1,17	22,30–26,98	10	24,52 ± 2,30	21,60–29,41	0,84
41–50 лет	36	23,79 ± 1,96	20,94–28,80	7	23,67 ± 1,45	23,14–25,94	0,92
51–60 лет	32	23,69 ± 1,16	21,59–25,54	6	23,44 ± 1,18	21,69–25,26	0,66

*критерий Манна – Уитни.

Приложение Б. Результаты ЛСКМ и ОКТ лимбальной зоны у пациентов с *PAX6*-ВА

ID	Возраст (лет)/пол	<i>PAX6</i> мутации/ 11p13 делеции	Глаз	Стадия АК	Верхний лимб		Нижний лимб		Характеристики ЛСКМ		
					ЛСКМ	ОКТ	ЛСКМ	ОКТ	конъюнктивная инвазия	БК	зона «ручейков»*
1А	55/ж	гетерозиготная делеция: <i>DCDC1-ELP4ex9</i> hg18;;chr11:31 285 887-31 628 232	OD	0	2	2	2	2	-	-	+
			OS	0	2	2	1	1	-	-	+
1Б	26/ж		OD	0	2	2	2	2	-	-	+
			OS	0	2	2	2	2	-	-	+
1В	30/ж		OD	0	1	-	2	2	-	-	+
			OS	0	1	-	2	2	-	-	+
2А	35/ж		OD	0	1	1	2	2	-	-	+
			OS	0	1	1	2	2	-	-	+
2Б	15/ж		OD	0	2	2	2	2	-	-	+
			OS	0	2	2	2	2	-	-	+
3	31/ж		OD	0	-	-	1	-	-	-	+
			OS	0	-	-	1	-	-	-	+
4	29/м		OD	0	2	2	2	2	-	-	+
			OS	0	2	2	2	2	-	-	+
5А	29/м	с.829C>T ex10	OD	1	1	нгм	1	нгм	+	-	+
			OS	2	-	нгм	-	нгм	+	+	-
5Б	56/ж		OD	2	-	-	-	-	в центре роговицы	+	-
6	49/м	с.-129dupG ex3	OD	1	-	-	-	-	+	+	-
			OS	1	-	-	-	-	+	+	-
7А	4/м	с.491delC ex7	OD	1	-	-	-	-	+	-	-
			OS	1	-	-	-	-	+	-	-
7Б	27/ж		OD	2	-	-	-	-	+	-	-
			OD	2	-	-	-	-	+	-	-

8А	10/ж	с.1183G>Т ex12	OD	1	-	-	-	-	+	-	-
			OS	1	-	-	-	-	+	-	-
8Б	35/ж		OD	3	-	-	-	-	васкуляризация	++	-
			OS	4	-	-	-	-	васкуляризация	++	-
9	14/ж	с.1268А>Т ex13	OD	1	-	-	-	-	+	+	-
			OS	1	-	-	-	-	+	+	-
10	12/ж	гетерозиготная делеция: <i>DCDC1ex1-ELP4-PAX6int1</i> hg18;;chr11:31 347 785-31 794 631	OD	1	обследование зоны лимба невозможно из-за выраженного нистагма						
			OS	1							
11А	17/м	с.794G>А ex10	OD	1	-	-	-	-	-	-	-
			OS	1	-	-	-	-	-	-	-
11Б	25/м		OD	2	-	-	-	-	+	-	-
			OS	1	-	-	-	-	-	-	-
11В	51/ж		OD	1	-	-	-	-	+	+	-
			OS	1	-	-	-	-	+	+	-
12	28/м	с.78delG ex5	OD	1	-	-	-	-	+	+	-
			OS	2	НГМ	НГМ	НГМ	НГМ	+	+	-
13	29/м	анализ не сделан	OD	1	-	-	-	-	-	-	-
			OS	1	-	-	-	-	-	-	-
14	33/м	с.1032+6Т>G int11	OD	1	-	-	-	-	+	-	-
15	26/м	гетерозиготная делеция: <i>PAX6ex5-PAX6ex7</i> hg18;;chr11:31 778 912-31 780 904	OD	1	-	-	-	-	+	-	-
			OS	4	-	-	-	-	васкуляризация	+	-
16	43/м	с.114_117dup ex5	OD	1	-	-	-	-	+	+	-
			OS	1	-	-	-	-	+	+	-
17	37/ж	с.121_141+16dup ex5	OD	1	-	-	-	-	+	-	-
			OS	1	-	-	-	-	+	-	-
18	40/ж	с.244G>Т ex 6	OD	1	-	-	-	-	-	-	-
			OS	1	-	-	-	-	-	-	-

19	25/ж	с.718C>T ex9	OD	2	-	нгм	-	нгм	в центре роговицы	+	-
			OS	2	-	нгм	-	-	+	+	-
20	35/ж	с.411delG	OD	2	-	-	-	-	+	-	-
			OS	2	-	-	-	-	+	-	-
21	30/ж	с.142-5T>G int5	OD	3	-	-	-	-	васкуляризация	-	-
			OS	2	-	-	-	-	+	+	-
22А	37/м	гетерозиготная делеция: <i>PAX6ex3</i>	OD	2	-	-	2	2	+	-	нет данных
22Б	53/м	hg18;;chr11:31 784 748–31 787 957	OS	2	нгм	нгм	1	-	+	-	+
23А	51/м	с.141+4A>G int5	OD	3	-	-	-	-	+	++	-
			OS	3	-	-	-	-	+	++	-
23Б	56/м	с.141+4A>G int5	OD	3	-	-	-	-	в центре роговицы	++	-
			OS	3	-	-	-	-	в центре роговицы	++	-
24	26/ж	с.265C>T ex6	OD	2	-	-	-	-	+	+	-
			OS	3	-	-	-	-	васкуляризация	+	-
25	42/ж	гетерозиготная делеция: <i>ELP4ex9–PAX6–RCN1– WT1ex1</i> hg18;;chr11:31 628 232–32 413 841	OD	3	-	-	-	-	васкуляризация	-	-
			OS	3	обследование зоны лимба невозможно из-за выраженного нистагма						
26	27/м	с.766-2A>C ex10	OD	3	-	-	-	-	васкуляризация	-	-
			OS	4	-	-	-	-	васкуляризация	-	-

Координаты PAX6: 31 762 916–31 789 477 (hg18)

*зона чередующихся участков гипер- и гипорефлективного базального эпителия в области лимба

АК – аниридная кератопатия; ЛСКМ – лазерная сканирующая конфокальная микроскопия; ОКТ – оптическая когерентная томография; БК – бокаловидные клетки; ж – женщина; м - мужчина; 1 – наличие измененных палисад или палисадоподобных структур; 2 – наличие полноценных лимбальных палисад Фогта; «-» - признак отсутствует, «+» - признак присутствует; нгм – нистагм.