

УДК 617.735-007.23

## ЧАСТЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ АУТОСОМНО-РЕЦЕССИВНЫХ НЕСИНДРОМАЛЬНЫХ ФОРМ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СЕТЧАТКИ У ЖИТЕЛЕЙ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

© 2024 г. Н. Ю. Огородова<sup>1,\*</sup>, А. А. Степанова<sup>1</sup>, О. А. Щагина<sup>1</sup>, В. В. Кадышев<sup>1</sup>,  
А. В. Поляков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

\*e-mail: ogorodova@med-gen.ru

Поступила в редакцию 25.09.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 29.11.2023 г.

Наследственные заболевания сетчатки (НЗС) представляют собой клинически гетерогенную группу патологий сетчатки, сопровождающихся потерей зрения вследствие дисфункции или дегенерации фоторецепторных клеток и клеток пигментного эпителия сетчатки. На долю аутосомно-рецессивных форм НЗС в среднем в мире приходится более 55% всех заболеваний этой группы. В настоящем исследовании представлены частые патогенные и вероятно патогенные варианты в генах, ответственных за аутосомно-рецессивные НЗС, полученные на основе ретроспективного анализа данных высокопроизводительного секвенирования большой российской когорты пациентов с подозрением на наследственную несиндромальную патологию сетчатки. Были проанализированы данные 1470 неродственных пациентов. У 643 (43,74%) были выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты в зиготности, необходимой для развития заболевания. Установлено, что на долю девяти генов (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) приходится 73.3% всех молекулярно-подтвержденных случаев НЗС у российских пациентов. Был проведен анализ спектров нуклеотидных вариантов данных генов и выявлено 17 вариантов, встречающихся с аллельной частотой более 1% для каждого из генов. На основании полученных данных были разработаны диагностические системы на основе аллель-специфичной мультиплексной проба-зависимой лигазной реакции (MLPA). Информативность двух систем для диагностики аутосомно-рецессивных несиндромальных форм наследственных заболеваний сетчатки составляет 16.4%, информативность для всех форм несиндромальных заболеваний сетчатки превышает 7%. Для группы пациентов с ахроматоopsией исследование с использованием одной из систем позволит установить диагноз в 62.5% случаев.

**Ключевые слова:** наследственные заболевания сетчатки, частые рецессивные варианты, ахроматоopsия, врожденный амавроз Лебера, болезнь Штаргардта.

DOI: 10.31857/S0016675824040065 EDN: CREOVS

Наследственные заболевания сетчатки (НЗС) — гетерогенная группа заболеваний органов зрения. НЗС являются основной причиной потери зрения у детей и взрослых трудоспособного возраста из-за прогрессирующих дегенеративных изменений в сетчатке. Распространенность НЗС различается в разных странах и составляет в среднем 1 на 1380 человек [1].

На сегодняшний день известно более 280 ядерных и митохондриальных генов, патогенные варианты в которых могут приводить к различным формам НЗС (<https://sph.uth.edu/Retnet/>). На долю аутосомно-рецессивных форм НЗС (АР НЗС) приходится более 55% [2–4]. Было показано, что один из трех человек во всем мире является гетерозиготным носителем по крайней

мере одного рецессивного патогенного варианта в гене, вызывающем НЗС [1, 5].

Применение методов высокопроизводительного секвенирования (ВПС) в диагностике НЗС значительно расширило представление о молекулярно-генетических причинах патологий сетчатки в различных популяциях мира.

Наиболее распространенными генами АРНЗС во всем мире являются *ABCA4* (30% всех случаев НЗС), *USH2A* (12%) и *EYS* (8%) [1]. Однако частоты встречаемости различных генетических вариантов и спектры мутаций отдельных генов имеют существенные различия в разных странах и выборках. В испанской когорте пациентов значительная доля случаев НЗС приходится на гены

*USH2A* (21.2%), *CRB1* и *ABCA4* (по 7%), *CERKL* и *EYS* (по 4%) [6]. В большой китайской когорте пациентов с пигментным ретинитом ген *CYP4V2* (15%) был вторым частым геном после *USH2A* (18%) [7]. Варианты в гене *EYS* (44.9%) были более частой причиной заболевания, чем варианты *USH2A* (18.8%), у японских пациентов [8]. Патогенные варианты в гене *FAM161A* составляют значительную долю случаев (6%) в большой израильской когорте пациентов [3]. А в финской популяции самым частым геном, ответственным за амавроз Лебера, был *GUCY2D* (9.4%) [9]. В немецкой выборке пациентов на долю мутаций в гене *ABCA4* приходится 10.4% всех мутантных аллелей, за ним следует ген *USH2A* (8.4%) [4, 10]. На долю *RPE65*-зависимых форм НЗС в России приходится 5.8% случаев среди всех пациентов с направляющим диагнозом “пигментная дегенерация сетчатки” или “врожденный амавроз Лебера” (ВАЛ) [11]. Случаи ВАЛ, обусловленные патогенными вариантами в гене *RPE65*, чаще регистрируются в европейских и американских семьях, редко — у китайских пациентов [12].

Однако, несмотря на имеющиеся на сегодняшний день данные о спектре мутаций в генах, ответственных за конкретные нозологические формы патологий сетчатки у российских пациентов с клиническими диагнозами “болезнь Штаргардта”, “*RPE65*-ассоциированные дистрофии сетчатки”, “синдром Ашера”, исследования по определению частых рецессивных вариантов среди различных генов НЗС на большой российской когорте пациентов не проводились.

Накопление частых аутосомно-рецессивных вариантов в различных популяциях и знание об особенностях генетической этиологии патологий сетчатки у российских пациентов позволяют повысить эффективность и скорость диагностики за счет разработки систем поиска частых патогенных вариантов [13, 14].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для поиска частых вариантов в генах АР НЗС у российских пациентов был проведен ретроспективный анализ данных высокопроизводительного секвенирования 1470 образцов крови. В исследование были включены пациенты с подозрением на наследственную патологию сетчатки со следующими входящими диагнозами: “пигментная дегенерация сетчатки”, “болезнь Штаргардта”, “ахроматопсия”, “врожденный амавроз Лебера”, “колбочковая/колбочко-па-

лочковая дистрофия сетчатки”. Среди пациентов были 699 женского (47.6%) и 771 (52.4%) мужского пола. От пациентов получено информированное добровольное согласие на исследование и обработку персональных данных.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли с помощью набора реактивов для выделения QIAamp DNA MiniKit, Qiagen по протоколу производителя.

Всем пациентам проведен анализ генной панели “Ophthalmology” на основе метода ВПС, включающей 211 генов. Панель “Ophthalmology” протяженностью 822786 пн включает 4423 ампликона размером от 125 до 275 пн. Расчетное покрытие кодирующих областей по данным программы Ion AmpliSeq Designer составляет 97.73%. Обработка результатов секвенирования проведена с использованием программного обеспечения “NGS-Data” (<http://www.ngs-data.ru> (Бескорвайный Н.С.) (дата обращения: 31.07.2023)).

Название выявленных изменений в генах присваивалось в соответствии с международной номенклатурой HGVS (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Клиническую значимость ранее не описанных вариантов нуклеотидной последовательности оценивали на основании российских рекомендаций для интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования [15].

Для разработки диагностических систем детекции наиболее частых патогенных и вероятно патогенных вариантов в восьми генах, ответственных за наследственную несиндромальную дистрофию сетчатки, использовалась аллель-специфичная мультиплексная проба-зависимая лигазная реакция с последующей амплификацией (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA). Последовательность проб, входящих в реакции, подобрана согласно базе GeneBank (табл.1). Длина амплифицированных фрагментов составляет от 94 до 145 пн.

Реакция лигирования проводилась в 5 мкл реакционной смеси, содержащей 1× реакционный буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Igepal, 0.01 mM rATP, 0.1 mM DTT), 26/24 специфичных проб, 0.04 ед. активности термофильной ДНК-лигазы, 0.1–1 мкг геномной ДНК. Условия лигирования были следующими: первоначальная денатурация при 95°C — 5 мин, затем лигирование при 64°C —

**Таблица 1.** Олигонуклеотиды, входящие в MLPA-системы детекции частых вариантов в восьми генах (*ABCA4*, *CNGB3*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*)

| Ген            | Детектируемый вариант   | Последовательность олигонуклеотидов (5'→3')                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Первая система |                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <i>ABCA4</i>   | p.Leu541Pro             | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACCAACCAACGTGCCCTCTCTCT<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACCAACCAACGTGCCCTCTCTCC<br>R:ACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                                                                                                                                                  |
|                | p.Ala1038Val            | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCTTATTGGCTTCCATCTCCAGCTG-<br>GG<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCTTTATTTCATGGCTTCCATCTC-<br>CAGCTGGA<br>R:CCTCCTCCTGGGACTTTCCTTTCTTATTTATTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                                                                                                     |
|                | p.Arg653Cys             | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACCAACCATGAAGATAGGGAAACAGCG<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTGCACCATGAAGATAGGGAAACAGCA<br>R:GTTCAGGATGATCATGAAACTAAAGCAAAAGTTTTCGATGCGATCCGATG-<br>CCTTCATG                                                                                                                                           |
|                | p.Cys1490Tyr            | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTCCTTCACCATCCTGCAGGTG<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTCCCTTCACCATCCTGCAGGTA<br>R:CAGCACCAGGGAGAAGCTCACTTTGTTTATTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                                                                                                                                          |
|                | p.Gly1961Glu            | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACACCTCTCCAGGGCGAACTC<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTCCACCTCTCCAGGGCGAACTT<br>R:CGACACACAGCCTGTCCACTGGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                                                                                                                                                         |
| <i>RPE65</i>   | p.Arg124*               | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTCTTTATTGCATTGTCAGTAACCTC-<br>TACTCCTCG<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTCTTTATTTTGGCATTGTCAGTA-<br>ACCTCTACTCCTCA<br>R:AAAGTAAGAAAAAACCTGTAGAAACAAATGAATTTTCTTTTCGATGCGATC-<br>CGATGCCTTCATG                                                                                          |
|                | p.Arg91Gln<br>p.Glu102* | 91FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTCCGCACTGATGCTTACGTACG<br>91FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTTCATCCGCACTGATGCTTACG-<br>TACA<br>91/102L:GGCAATGACTGAGAAAAGGATCGTCATAACA<br>102RN:GAATTTGGCACCTGTGCTTTCCTTTGTTTATTTCGATGCGATCCGATG-<br>CCTTCATG<br>102RM:TAATTTGGCACCTGTGCTTTCCTTTATTTTGTATTTCGATGCGATCCGAT-<br>GCCTTCATG |
|                | c.11+5G>A               | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTGAAGGTGTTTTAAAAAAGTCTCCCA-<br>GAGATAC<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCATGAAGGTGTTTTAAAAAAGTCTC-<br>CCAGAGATAT<br>R:TACTGGATAGACATTTTCTTCAGTTTCAGGTTTGTTTATTTCGATGCGATCCGAT-<br>GCCTTCATG                                                                                              |
| Вторая система |                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <i>CEP290</i>  | c.2991+1655A>G          | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTCTGGCCCCAGTTGTAATTGTGAA<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTGGCCCCAGTTGTAATTGTGAG<br>R:TATCTCATACCTATCCCTATTGGCAGTGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                                                                                                                                              |

1.5 ч. Постановка реакции проводилась на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по следующей схеме: к 15 мкл реакционной смеси, содержащей 1× реакционный буфер

(67 mM TrisHCl (pH 8.8), 16.5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Twin-20); 0.25 мкМ каждого олигопрайма, 250 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1.5 ед. активности термофильной ДНК-полимеразы, добавляли 5 мкл лигата. ПЦР-реакцию проводили на программируемом термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) с использо-

Таблица 1. Окончание

| Ген    | Детектируемый вариант | Последовательность олигонуклеотидов (5'→3')                                                                                                                                                                                           |
|--------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CNGB3  | p.Thr383Ilefs*13      | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATCTTCTTCCCCATCATACACCCATCTAG<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTCTTATCCTTCCCCATCATACAC-<br>CCATCTA<br>R:TAGTGCCAATTCCTTCATAGTTTGAAGCTATTTATTCGATGCGATCCGATG-<br>CCTTCATG                             |
|        | p.Arg274Valfs*13      | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATCTTGATATGCTATTTATCCAGC-<br>CCAGACTCC<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTCATCTACCTTTATGATATGC-<br>TATTTATCCAGCC<br>R:AGTTTGTAAGAGGAGGAGACATAATAGTAAGTGGTTTTTCGATGCGATCCGATG-<br>CCTTCATG              |
| CNGA3  | p.Phe547Leu           | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTCTCAGCGATGGCAGCTACTTC<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTTGTCTCAGCGATGGCAGCTACTTA<br>R:GGGGAGATCAGCATTCTGAACATCTTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                                              |
| CRB1   | p.Gly827Val           | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTTGGCCACCAATGTAGATGACATCTC<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATTGGTAGGCCACCAATGTAGATGA-<br>CATCTA<br>R:CCTTTTCGATTTTCCACGTAGAAGCTTTTTCGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                           |
|        | p.Cys948Tyr           | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTGATTTAATAAAGTTATTGATTATTAT-<br>CACCTTCTCTCATTAGG<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTATAGATTTAATAAAGTTATTGATTATTAT-<br>CACCTTCTCTCATAGA<br>R:TATTGCAAATGCTGTTTTTAATGGACAAAGCTATTTATTCGATGCGATCCGATG-<br>CCTTCATG |
| GUCY2D | c.2944+1del           | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGCATAGGCCTGCACTCGG<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACTCCGCATAGGCCTGCACTCG<br>R:GTAACCTCCCGGGTCTTCCCAGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                                                                       |
| PDE6H  | p.Ser12*              | FN:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGGGTGGTAGGACCCTGGTTTG<br>FM:GTTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTGGGTGGTAGGACCCTGGTTTC<br>R:AAGCTGGAGCAGGCAGAGTAGTGATGCGATCCGATGCCTTCATG                                                                               |

Таблица 2. Универсальные праймеры и условия, применяемые на этапе ПЦР

| Последовательность праймеров (5'→3')                     | Температура отжига |
|----------------------------------------------------------|--------------------|
| F*: GTTTCGTACGTGAATCGCGGTAC<br>R: CATGAAGGCATCGGATCGCATC | 66°C               |

ванием ДНК-полимеразы Biotaq (БиоМастер) и пары универсальных праймеров, где прямой мечен флуоресцентной меткой (табл. 2), в следующем режиме: первоначальная денатурация при 94°C – 1 мин, затем 30 циклов смены температур: 94°C – 2 с, температуры отжига праймеров 66°C – 2 с, элонгация цепи 72°C – 2 с, заключительная элонгация 72°C – 1 мин.

Детекцию продуктов реакции осуществляли методом капиллярного-гель электрофореза на генетическом анализаторе Hono 1616 (Nanjing Superyears Gene Technology, Китай). Определение длин аллелей проводили в программе Gene

Mapper v3.7. Информативность систем была рассчитана исходя из частот встречаемости вариантов, входящих в диагностические системы, у пациентов с наследственными заболеваниями сетчатки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами были проанализированы данные ВПС 1470 неродственных пациентов с подозрением на наследственную несиндромальную патологию сетчатки. Из них у 643 (43.7%) пациентов были выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты в генах НЗС. Среди них у 72%

**Таблица 3.** Варианты, встреченные с частотой более 1% среди всех причинных вариантов данного гена у пациентов с аутосомно-рецессивной несиндромальной патологией сетчатки

| Ген                                   | Вариант                                                                                                                                              | Число пациентов с вариантами в данном гене (в скобках указан % от всех AP НЗС) | Число хромосом с данным вариантом | Аллельная частота варианта среди больных с данным геном (%) |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <i>ABCA4</i><br>( <i>NM_000350</i> )  | c.[1622T>C;3113C>T]<br>(p.[Leu541Pro;Ala1038Val]/<br>p.Leu541Pro)<br>c.5882G>A (p.Gly1961Glu)<br>c.4469G>A (p.Cys1490Tyr)<br>c.1957C>T (p.Arg653Cys) | 168<br>(36.1)                                                                  | 133<br>29<br>13<br>7              | 39.6<br>8.6<br>3.9<br>2.1                                   |
| <i>CNGB3</i><br>( <i>NM_019098</i> )  | c.1148del (p.Thr383Ilefs*13)<br>c.819_826del (p.Arg274Valfs*13)                                                                                      | 52<br>(11.2%)                                                                  | 76<br>14                          | 73.1<br>13.5                                                |
| <i>USH2A</i><br>( <i>NM_206933</i> )  | c.11864G>A (p.Trp3955*)<br>c.13335_13347delinsCTTG (p.Glu4445_<br>Ser4449delinsAspLeu)                                                               | 27<br>(5.8)                                                                    | 12<br>6                           | 22.2<br>11.1                                                |
| <i>RPE65</i><br>( <i>NM_000329</i> )  | c.304G>T (p.Glu102*)<br>c.370C>T (p.Arg124*)<br>c.272G>A (p.Arg91Gln)<br>c.11+5G>A                                                                   | 26<br>(5.6)                                                                    | 13<br>7<br>4<br>2                 | 25.0<br>13.5<br>7.7<br>3.8                                  |
| <i>CRB1</i><br>( <i>NM_201253</i> )   | c.2480G>T (p.Gly827Val)<br>c.2843G>A (p.Cys948Tyr)                                                                                                   | 25<br>(5.4)                                                                    | 14<br>10                          | 28.0<br>20.0                                                |
| <i>CNGA3</i><br>( <i>NM_001298</i> )  | c.1641C>A (p.Phe547Leu)                                                                                                                              | 16<br>(3.4)                                                                    | 8                                 | 25.0                                                        |
| <i>CEP290</i><br>( <i>NM_025114</i> ) | c.2991+1655A>G                                                                                                                                       | 12<br>(2.6)                                                                    | 6                                 | 25.0                                                        |
| <i>GUCY2D</i><br>( <i>NM_000180</i> ) | c.2944+1del                                                                                                                                          | 11<br>(2.4%)                                                                   | 14                                | 63.6                                                        |
| <i>PDE6H</i><br>( <i>NM_006205</i> )  | c.35C>G (p.Ser12*)                                                                                                                                   | 4<br>(0.9)                                                                     | 8                                 | 100.0                                                       |

(465 пациентов) были молекулярно-генетически подтверждены болезни сетчатки с аутосомно-рецессивным наследованием. Варианты нуклеотидной последовательности, выявленные у пациентов этой группы с аллельной частотой более 1% для конкретного гена, представлены в табл. 3.

Значительная доля (36.1%) выявленных вариантов приходится на ген *ABCA4*, биаллельные варианты в котором встретились у 168 пациентов нашей выборки. Наиболее частыми в гене *ABCA4* были ранее описанные как патогенные миссенс-варианты: c.1622T>C (p.Leu541Pro) (133 хромосомы), c.3113C>T (p.Ala1038Val) (132 хромосомы), c.5882G>A (p.Gly1961Glu) (29 хромосом), c.4469G>A (p.Cys1490Tyr) (13 хромосом), c.1957C>T (p.Arg653Cys) (7 хромосом). Варианты p.Leu541Pro и p.Ala1038Val у российских пациентов встречались в составе гаплотипа, представляющего из себя комплексный аллель p.[Leu541Pro;Ala1038Val], частота которого составила 39.3%. Лишь на одной из хро-

мосом патогенный вариант p.Leu541Pro встретился отдельно в компаунд-гетерозиготном состоянии с патогенным вариантом p.Arg653Cys. Вариант p.[Leu541Pro;Ala1038Val] встретился в гомозиготном состоянии у 37 пациентов, в компаунд-гетерозиготном состоянии с вариантом p.Gly1961Glu встретился у 10 человек, с вариантом p.Cys1490Tyr – у пяти и с вариантом p.Arg653Cys – у трех.

На долю биаллельных вариантов в генах ахроматопсии – *CNGA3*, *CNGB3*, *PDE6H* у российских пациентов приходится 15.5% (72 пробанда). Самая частая причина ахроматопсий – патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *CNGB3* (72.2%). В гене *CNGB3* были выявлены частые патогенные варианты, ранее описанные в литературе у пациентов из Европы, приводящие к делеции со сдвигом рамки считывания: c.1148del (p.Thr383Ilefs\*13) (76 хромосом) и c.819\_826del (p.Arg274Valfs\*13) (14 хромосом). Вместе оба варианта были выявлены в компа-

унд-гетерозиготном состоянии у 10 пробандов. Что интересно, вариант с.1148del выявлен в гомозиготном состоянии у 26 пациентов, а вариант с.819\_826del лишь у одного. Вторым по частоте выявленных каузативных вариантов среди случаев ахроматопсий является ген *CNGA3* (22.2%). Наиболее частым вариантом в гене *CNGA3* был описанный как патогенный вариант с.1641C>A (p.Phe547Leu) (8 хромосом), выявленный у двух пациентов в гомозиготном состоянии. Незначительная доля случаев приходится на ген *PDE6H*, где у четырех человек был выявлен нонсенс-вариант с.35C>G (p.Ser12\*) в гомозиготном состоянии. Все пациенты с данным вариантом были разного этнического происхождения.

Другими генами, патогенные варианты в которых — частая причина НЗС у российских пациентов, являются *RPE65*, *CEP290*, *CRB1*, *GUCY2D*. Данные гены ответственны за развитие врожденного амавроза Лебера — наиболее тяжелой формы наследственных дистрофий сетчатки, связанной с чрезвычайно ранним началом и приводящей к потере зрения в детском возрасте. В исследовании у 26 пациентов были выявлены биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *RPE65*. Обнаружены следующие частые ранее описанные патогенные варианты в этом гене: с.304G>T (p.Glu102\*) (13 хромосом), с.370C>T (p.Arg124\*) (7 хромосом), с.272G>A (p.Arg91Gln) (4 хромосомы), с.11+5G>A (2 хромосомы). Первые два варианта выявлены в гомозиготном состоянии у четырех и двух пациентов соответственно, в компаунд-гетерозиготном состоянии оба варианта были обнаружены у одного пробанда.

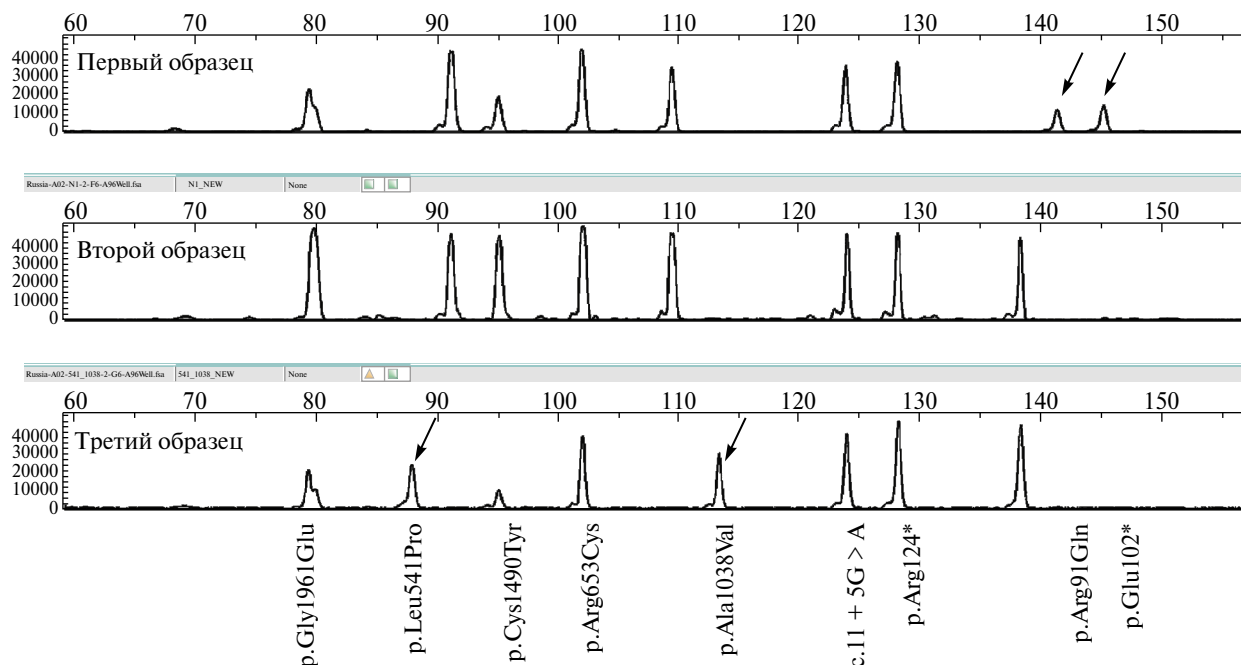
Патогенные варианты в гене *USH2A* являются причиной синдрома Ашера (OMIM:276901) и пигментной дегенерации сетчатки 39-го типа (OMIM:613809). В исследовании у 27 пациентов (5.8% среди всех случаев АР НЗС) были выявлены патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *USH2A*. На 12 хромосомах был выявлен патогенный вариант с.11864G>A (p.Trp3955\*) и на 6 хромосомах — с.13335\_13347delinsCTTG (p.Glu4445\_Ser4449delinsAspLeu) (у одного человека в гомозиготном состоянии). Оба патогенных варианта описаны у пациентов с пигментной дегенерацией сетчатки или синдромом Ашера [16]. Ген *USH2A* ответственен за проявление как синдромальной, так и несиндромальной наследственной патологии сетчатки, а также находки в этом гене по данным предыдущих исследований встречаются при изолированной потере

слуха [17], где вариант с.11864G>A (p.Trp3955\*) также является частым. Так как у пациентов настоящего исследования предполагается изолированная форма патологии сетчатки, варианты в гене *USH2A* не были включены в системы для диагностики рецессивной патологии сетчатки.

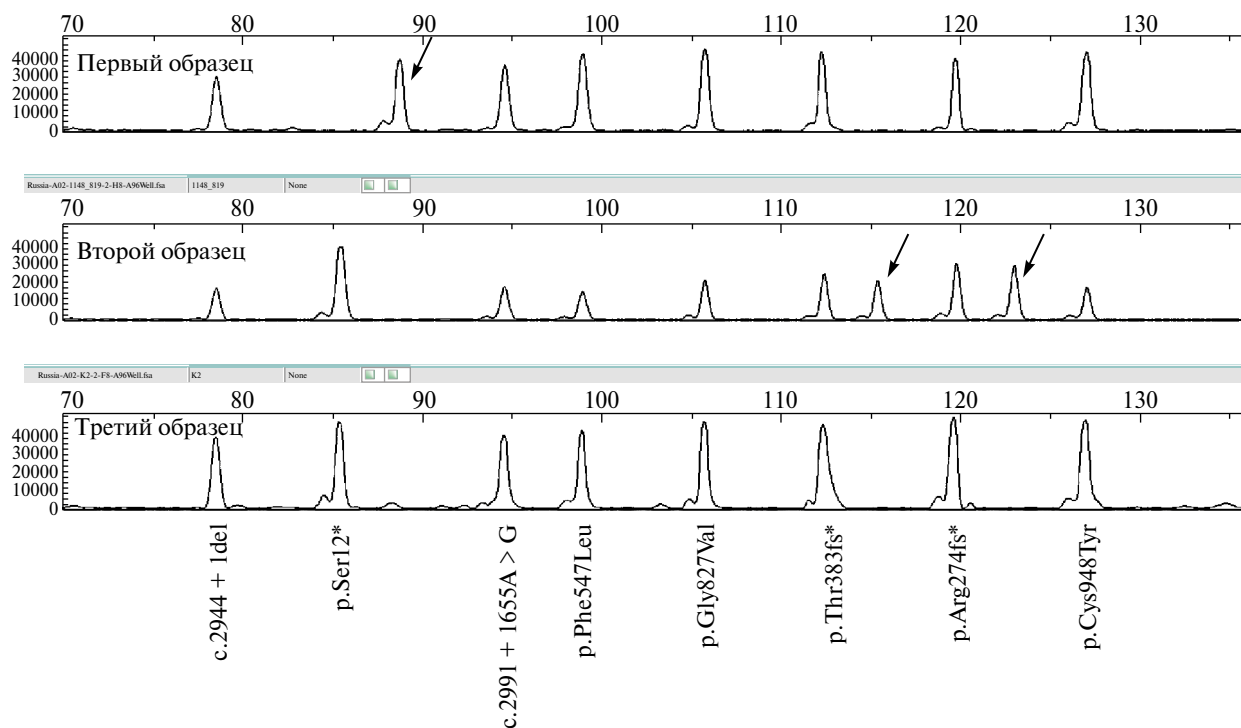
В гене *CEP290*, варианты в котором встретились у 12 пациентов, самым частым вариантом был вариант, расположенный в глубокой интронной области с.2991+1655A>G, неоднократно описанный в литературе как патогенный, приводящий к нарушению механизма сплайсинга [18]. Данный вариант встретился на шести хромосомах в компаунд-гетерозиготном состоянии с LOF-вариантами с.289G>T (p.Glu97\*), с.6119\_6123delinsTATGTA (p.Thr2040Ilefs\*4), с.2641G>T (p.Glu881\*), с.7341\_7344dup (p.Ser2449Thrfs\*8), с.4405G>T (p.Glu1469\*) и вариантом с.4661\_4663del (p.Glu1554del). В гене *CRB1* биаллельные варианты были выявлены в 5.4% случаев, частыми вариантами были с.2480G>T (p.Gly827Val) (ранее не описанный в литературе) и с.2843G>A (p.Cys948Tyr), встретившиеся на 14 и 10 хромосомах соответственно. Вариант p.Gly827Val был выявлен в гомозиготном состоянии у четырех пациентов, вариант p.Cys948Tyr — у одного. У двух человек оба варианта встретились в компаунд-гетерозиготном состоянии. В гене *GUCY2D* патогенные варианты были выявлены у 11 пробандов, где один из них — с.2944+1del, описанный неоднократно как патогенный, встретился на 14 хромосомах (у четырех пациентов вариант выявлен в гомозиготном состоянии).

Таким образом, у российских пациентов с подозрением на наследственную патологию сетчатки с помощью панельного секвенирования удалось выявить частые гены, ответственные за аутомно-рецессивные формы дистрофий сетчатки, а также частые генетические варианты. Среди пациентов с АР НЗС (465 пациентов) на долю девяти генов (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) приходится 73.3% всех молекулярно подтвержденных случаев патологий сетчатки. Мы выявили 17 частых патогенных и вероятно патогенных вариантов в генах *ABCA4*, *CNGB3*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*, которые обнаруживаются на 38.5% хромосом с мутациями.

Для оптимизации первого этапа диагностики НЗС и проведения популяционных исследова-



**Рис. 1.** Визуализация результатов фрагментарного анализа ПЦР-продуктов MLPA-систем детекции частых вариантов в генах *ABCA4* и *RPE65*. Первый образец: в гене *RPE65* обнаружены варианты p.Arg91Gln и p.Glu102\* в гетерозиготном состоянии; второй образец – норма; третий образец: в гене *ABCA4* обнаружен комплексный аллель p.[Leu541Pro;Ala1038Val] в гомо-/гемизиготном состоянии.



**Рис. 2.** Визуализация результатов фрагментарного анализа ПЦР-продуктов MLPA-систем детекции частых вариантов в генах *CNGB3*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D* и *PDE6H*. Первый образец: в гене *PDE6H* обнаружен вариант p.Ser12\* в гомо-/гемизиготном состоянии; второй образец: в гене *CNGB3* обнаружены варианты p.Thr383Ilefs\*13 и p.Arg274Valfs\*13 в гетерозиготном состоянии; третий образец – норма.

ний были разработаны системы поиска данных вариантов на основе метода аллель-специфичной мультиплексной лигазной реакции с последующей амплификацией.

В первую молекулярно-генетическую систему вошли частые варианты в генах *ABCA4* (p.Leu541Pro, p.Ala1038Val, p.Gly1961Glu, p.Cys1490Tyr, p.Arg653Cys) и *RPE65* (p.Glu102\*, p.Arg124\*, p.Arg91Gln, c.11+5G>A) (рис. 1). Ретроспективный анализ показал, что для пациентов с подозрением на пигментную дегенерацию сетчатки/болезнь Штаргардта или ВАЛ данная система позволит установить причину болезни (выявить оба причинных варианта) у 34% пациентов с НЗС, обусловленной патогенными вариантами гена *ABCA4*, и у 34.6% пациентов с НЗС, обусловленной патогенными вариантами гена *RPE65*, т.е. у 14.2% пациентов с рецессивной патологией сетчатки причина болезни будет установлена на данном этапе обследования.

Так как на клиническом этапе исследования, как правило, удается дифференцировать ахроматопию как отдельную форму патологии сетчатки — частые варианты в генах ахроматопсии были объединены во вторую молекулярно-генетическую систему. В систему вошли варианты: p.Thr383Ilefs\*13 и p.Arg274Valfs\*13 гена *CNGB3*, p.Phe547Leu гена *CNGA3* и p.Ser12\* гена *PDE6H* (рис. 2). Также в систему включены частые варианты в генах, ответственных за амавроз Лебера/пигментную дегенерацию сетчатки: *CRB1* (p.Gly827Val, p.Cys948Tyr), *CEP290* (c.2991+1655A>G) и *GUCY2D* (c.2944+1del). Ретроспективный анализ показал, что для пациентов с подозрением на ахроматопию данные системы позволят установить причину болезни (выявить оба причинных варианта в одном из трех генов) в 62.5% случаев. Для пациентов с подозрением на пигментную дегенерацию сетчатки или ВАЛ данные системы позволят установить причину болезни (выявить оба причинных варианта) у 36.4% пациентов с НЗС, обусловленным патогенными вариантами гена *GUCY2D* и у 28% пациентов с НЗС, связанным с геном *CRB1*, т.е. у 2.4% пациентов с АР НЗС причина болезни будет установлена на данном этапе обследования.

Согласно полученным данным информативность двух систем для диагностики аутосомно-рецессивных несиндромальных форм наследственных заболеваний сетчатки составляет 16.6%, информативность для всех форм несиндромальных заболеваний сетчатки превышает

7%. Для группы пациентов с ахроматопсией исследование с использованием одной из систем позволит установить диагноз в 62.5% случаев. Таким образом, для каждого 14-го пациента с НЗС и половины пациентов с ахроматопсией диагностика будет завершена уже на данном этапе обследования, что позволяет существенно сократить время и трудоемкость исследования.

С использованием данной системы проанализировано 40 образцов крови пациентов с входящими диагнозами “пигментная дегенерация сетчатки” и “болезнь Штаргардта”, которым ранее не проводилось исследование другими методами молекулярно-генетического анализа. У двух пациентов в гене *ABCA4* был выявлен патогенный вариант p.[Leu541Pro;Ala1038Val] в компаунд-гетерозиготном состоянии с вариантом p.Gly1961Glu или p.Arg653Cys. У пяти пациентов в гене *ABCA4* был выявлен вариант p.Gly1961Glu в гетерозиготном состоянии, варианты p.Arg653Cys и p.[Leu541Pro;Ala1038Val] в той же зиготности были выявлены по одному разу. Полученные данные подтверждают расчетную информативность разработанных диагностических систем.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании у 465 (72%) российских пациентов были выявлены биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в генах аутосомно-рецессивных НЗС, где мутации в девяти генах (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) являются наиболее частой причиной наследственных заболеваний сетчатки, таких как болезни Штаргардта, ахроматопсии, амавроза Лебера, пигментной дегенерации сетчатки.

У российских пациентов самой частой причиной наследственной патологии сетчатки являются биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *ABCA4* (36.1%), мутации в котором приводят к болезни Штаргардта (OMIM:248200), колбочко-палочковой дистрофии (OMIM:604116) и пигментной дегенерации сетчатки (OMIM:601718). Значительная доля молекулярно подтвержденных случаев приходится на гены ахроматопсии: *CNGB3* (11.2%), патогенные варианты в котором являются частой причиной ахроматопсии 3-го типа (OMIM:262300), *CNGA3* (3.4%) и *PDE6H* (0.9%), ответственные за ахроматогию 2-го (OMIM:216900) и 6-го (OMIM:610024) типа соответственно. На ген

*USH2A*, мутации в котором могут приводить как к изолированной патологии сетчатки, так и к синдромальной форме с нарушением слуха (синдром Ашера), приходится 5.8% случаев среди всех форм НЗС. Для других генов, мутации в которых могут приводить к амаврозу Лебера/пигментной дегенерации сетчатки, наблюдается следующее распределение частот: биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *RPE65* были выявлены в 5.6% случаев, в гене *CRB1* – 5.4%, в гене *CEP290* – 2.6%, в гене *GUCY2D* – 2.4%.

По литературным данным спектр генов, ответственных за АР НЗС, разнится в разных странах, как и спектры и аллельные частоты патогенных вариантов нуклеотидной последовательности. Так, в исследовании испанской когорты пациентов с подозрением на наследственную патологию сетчатки наибольшее число молекулярно подтвержденных случаев приходится на гены *USH2A* (21.2%), *CRB1* (7%), *ABCA4* (7%), *CERKL* (5.2%), *EYS* (5.2%) [6]. Наиболее частым патогенным вариантом в гене *CERKL* у испанских пациентов был нонсенс-вариант с.847C>T (p.Arg283\*) (91% мутантных аллелей гена). Вариант с.375C>G (p.Cys125Trp) встретился на 72% мутантных аллелей гена *CERKL* у пациентов из Финляндии, у которых патогенные варианты в гене *CERKL* (22%) являются самой частой причиной наследственной дистрофии сетчатки [19]. У российских пациентов биаллельные патогенные варианты в гене *CERKL* встретились лишь у пяти человек.

В литературе описаны патогенные “специфичные для дистрофии сетчатки” варианты в гене *USH2A* у пациентов без нарушения слуха в раннем детстве, однако в различных популяциях наблюдается свой спектр таких вариантов и не для каждого из них эта связь может быть точно установлена [20]. В исследовании у российских пациентов в гене *USH2A* были выявлены два частых варианта с.11864G>A (p.Trp3955\*) и с.13335\_13347delinsCTTG (p.Glu4445\_Ser4449delinsAspLeu), описанных в литературе как при пигментном ретините, так и при синдроме Ашера. На 12 хромосомах был выявлен патогенный вариант p.Trp3955\*, впервые описанный у нидерландских пациентов с синдромом Ашера [21]. По данным отечественных публикаций на долю данного варианта приходится половина мутантных аллелей гена *USH2A* у пациентов с подозрением на несиндромальную потерю слуха [17], тогда как у пациентов с подозрением на синдром Ашера данный вариант был выявлен на 30%

мутантных аллелей [22]. Вторым частый вариант в гене *USH2A* – p.Glu4445\_Ser4449delinsAspLeu встретился на шести хромосомах (у одного человека в гомозиготном состоянии). В гене *USH2A* у пациентов с наследственной ретинальной дистрофией из Италии частыми вариантами были с.2276G>T (p.Cys759Phe) (26%) [16], у пациентов из Восточной Азии частыми вариантами был с.8254G>A(p.Gly2752Arg) (14.1%) и с.2802T>G (p.Cys934Trp) (32.6%), где только последний встретился на трех хромосомах россиян.

У китайских пациентов самым частым геном, ответственным за АР НЗС, был также ген *USH2A* (18%), однако вторым наиболее распространенным геном был *CYP4V2* (15%) [7], ответственный за развитие кристаллической корнеоретинальной дистрофии Биетти (OMIM:210370). Пациенты с данным заболеванием были зарегистрированы по всему миру, однако в странах Восточной Азии, особенно в Китае, таких пациентов значительно больше [23]. У российских пациентов биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *CYP4V2* не были обнаружены.

Другими частыми генами НЗС у китайских пациентов были *EYS* (7%), *ABCA4* (3%) и *CRB1* (3%), тогда как у японских пациентов с подозрением на дистрофию сетчатки на ген *EYS* приходится наибольшая доля молекулярно подтвержденных случаев (44.9%), где варианты с.4957dup(p.Ser1653Lysfs\*2) (46.8%) и с.8805C>A (p.Tyr2935\*) (21.3%) являются мажорными [8]. У японских пациентов биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в генах *USH2A* (18.8%), *RPIL1* (6.9%) и *PDE6B* (6.1%) также являются частой причиной НЗС. В нашем исследовании биаллельные патогенные варианты в гене *PDE6B* были выявлены у одного пробанда, в гене *RPIL1* таких вариантов не было обнаружено.

В исследовании большой израильской когорты пациентов с подозрением на НЗС были также установлены частые гены АР НЗС: *ABCA4* (14%), *USH2A* (7%), *FAM161A* (6%), *CNGA3* (5%) и *EYS* (4%) [3]. У немецких пациентов с подозрением на НЗС наиболее распространенным геном был *ABCA4*, где патогенные варианты были обнаружены в 10.4% случаев, за ним следуют гены *USH2A* (8.4%), *EYS* (2.5%), *CNGB3* (2.3%) и *CRB1* (1.9%)[4].

Если сравнить спектр генетических вариантов в гене *ABCA4* у российских пациентов с мировыми выборками, то наблюдается схожая картина с европейскими данными по двум са-

мым частым вариантам p.[Leu541Pro;Ala1038Val] и p.Gly1961Glu пациентов из Германии [24]. У польских пациентов на долю комплексного аллеля p.[Leu541Pro;Ala1038Val] приходится 33.7% мутантных аллелей, у венгерских — 14% [25], у российских пациентов эта частота составила 3.,3%. Вариант в гене *ABCA4* с.5882G>A (p.Gly1961Glu) также был обнаружен у словенских, итальянских, голландских, испанских пациентов с частотой аллеля от 6.5 до 21%. У российских пациентов данный вариант встретился с аллельной частотой 8.6%. Вариант с.4469G>A (p.Cys1490Tyr), встретившийся на 3.9% мутантных аллелей в российской выборке, наиболее распространен был у южноафриканских пациентов (14.9%) [26]. Вариант с.1957C>T (p.Arg653Cys) ранее был описан у пациентов из Великобритании [27], где встретился на 0.71% хромосом с мутациями, и у пациентов из Германии (0.44%) (в российской выборке частота аллеля составила 2.1%). В испанской популяции мажорной мутацией в гене *ABCA4* является с.3386G>T (p.Arg1129Leu) (24%) [28], которая у российских пациентов в данном исследовании не встретилась.

Патогенные и вероятно патогенные варианты в генах *CNGA3*, *CNGB3*, *GNAT2*, *PDE6C*, *PDE6H* описаны у пациентов с ахроматоopsией и колбочковой дистрофией [29]. Около 90% случаев ахроматоopsий связаны с мутациями в двух генах *CNGA3* и *CNGB3*, которые кодируют альфа- и бета-субъединицы гетеротетрамernого циклического нуклеотид-управляемого (cyclic nucleotide-gated channels, CNG) канала, участие которого необходимо в процессах фототрансдукции. Варианты в гене *CNGB3* являются более распространенной причиной ахроматоopsий в Европе и США (на долю *CNGB3* приходится более 50%) [30], тогда как мутации в гене *CNGA3* наиболее распространены на Ближнем Востоке и в Китае (более 80%) [31]. По данным европейских исследований на долю вариантов с.1148del и с.819\_826del в гене *CNGB3* приходится около 70 и 4.5% всех мутантных аллелей гена соответственно, причем первый вариант встретился в половине случаев в гомозиготном состоянии [32]. У российских пациентов гомозиготный вариант с.1148del также встретился в 50% случаях, а на долю второго варианта с.819\_826del приходится 13.5% мутантных аллелей гена. В гене *CNGA3* патогенный вариант с.1641C>A (p.Phe547Leu) встречается на 10% мутантных европейских аллелей [33], тогда как в российской выборке данный вариант встретился на 25%

аллелях. Описано, что миссенс-варианты гена *CNGA3*, влияющие на аминокислотные остатки p.Arg277 и p.Arg283, были распространены среди европейцев, тогда как варианты, влияющие на p.Val529, были распространены среди азиатов [31]. У российских пациентов в гене *CNGA3* вариант с.829C>T (p.Arg277Cys) был выявлен на двух хромосомах, как и вариант с.847C>T (p.Arg283Trp), тогда как варианты с.830G>A (p.Arg277His), с.848G>A (p.Arg283Gln) затрагивали по одной хромосоме. Перечисленные варианты описаны неоднократно как патогенные у пациентов с ахроматоopsией. Следует отметить, что большинство патогенных вариантов в гене *CNGB3* приходится на нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания или мутации сайта-сплайсинга. Напротив, большинство патогенных вариантов в гене *CNGA3* представляют собой миссенс-замены, затрагивающие только отдельные аминокислотные остатки белка [29].

Незначительная доля молекулярно подтвержденных случаев приходится на ген *PDE6H* (0.9%). На сегодняшний день в гене *PDE6H*, ссылаясь на базу данных The Human Gene Mutation Database (HGMD®2022.1), описан лишь один патогенный вариант с.35C>G (p.Ser12\*), выявленный у четырех человек данного исследования в гомозиготном состоянии. В своей публикации S. Kohl с соавт. подтвердили гипотезу о том, что данная нонсенс-замена является результатом общего наследственного мутационного события в голландской и бельгийской семьях [34]. Вариант p.Ser12\* также встречался у пациентов из Норвегии [35] и Пакистана [36]. В других генах ахроматоopsии (*GNAT2*, *PDE6C*) у российских пациентов биаллельные патогенные варианты не были выявлены.

Врожденный амавроз Лебера представляет собой генетически гетерогенную группу НЗС преимущественно с аутосомно-рецессивным типом наследования, причина которого обусловлена мутациями более чем в 20 генах. Патогенные варианты в четырех генах — *RPE65* (5.6%), *CRB1* (5.4%), *CEP290* (2.6%) и *GUCY2D* (2.4%) являются частой причиной ВАЛ у российских пациентов.

Мутации в гене *RPE65* приводят к развитию врожденного амавроза Лебера 2-го типа (OMIM:204100) и тяжелой дистрофии сетчатки с ранним началом (OMIM:613794). По литературным данным доля *RPE65*-ретинопатий среди пациентов с НЗС в регионах Европы и

Америки составляла от 3% в США и Испании до 9.98% в Нидерландах [37, 38], что согласуется с полученными данными в российской когорте пациентов (5.6%). У российских пациентов в гене *RPE65* выявлены частые патогенные варианты p.Glu102\* (25%), p.Arg124\* (13.5%), p.Arg91Gln (7.7%) и c.11+5G>A (3.8%). Если сравнить спектр мутаций в гене *RPE65* с другими странами, то у итальянцев самым частым вариантом был c.292\_311del (p.Ile98Hisfs\*26) (частота аллеля 11%), не встретившийся ни разу в российской выборке, тогда как на варианты p.Arg91Gln, p.Arg124\* и c.11+5G>A приходится по 4% мутантных аллелей [37]. В немецкой когорте пациентов частым вариантом в гене *RPE65* был c.1451G>Tp.Gly484Val (33.3%) [39], обнаруженный всего лишь на одной хромосоме россиян. Стоит отметить, что в российской выборке вариант c.304G>T (p.Glu102\*) встретился на 25% мутантных аллелей, и ни в одной популяционной когорте пациентов не зафиксирована столь высокая частота данного патогенного аллеля. Впервые вариант описан S.R. Dharmaraj с соавт. в 2000 г. у американских пациентов с ВАЛ [40].

Другими частыми генами, ответственными за проявление ВАЛ, являются гены *GUCY2D*, *CRB1*, *CEP290*. Так, в китайской когорте пациентов с подозрением на ВАЛ на долю мутаций в этих генах приходится 10, 7, 4% всех молекулярно подтвержденных случаев соответственно [41]. В немецкой же выборке пациентов на долю мутаций в генах *CEP290* и *CRB1* приходится по 21% [39], а у польских пациентов 37 и 16% соответственно [42]. *CRB1* является основным геном, ответственным за ВАЛ в испанской популяции (70% мутантных аллелей), за ним следуют гены *RPGRIP1* (20%), *AIPL1* (5%), *RPE65* (5%) [43]. У австралийских пациентов патогенные варианты в генах *CEP290* (19.2%), *GUCY2D* (19.2%), *RPE65* (7.7%), *TULP1* (7.7%), *CRB1* (7.7%) являются частой причиной ВАЛ [44].

В гене *CEP290*, ответственном за развитие врожденного амавроза Лебера 10-го типа (OMIM:611755) и заболеваний из группы цилиопатий, патогенный вариант c.2991+1655A>G, который вызывает вставку дополнительного псевдоэкзона в мРНК *CEP290* из-за активации сильного донорного сайта сплайсинга, что приводит к образованию преждевременного стоп-кодона (p.Cys998\*), является частым в российской популяции (частота аллеля 25%), а также в популяции Северной Европы (49%) [45], тогда как значительно менее распространен в

Южной Европе (6%) [46] и отсутствовал у корейских и индийских пациентов [47, 48]. Остальные варианты в гене *CEP290* встретились по одному разу в исследуемой выборке.

Мутации в гене *CRB1* в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии описаны у пациентов с амаврозом Лебера 8-го типа (OMIM:613835) и пигментной дегенерацией сетчатки 12-го типа (OMIM:600105). В исследовании на большой немецкой когорте пациентов наиболее частым патогенным вариантом в гене *CRB1* был c.2843G>A (p.Cys948Tyr), который составлял 22% патогенных аллелей, приводящий к тяжелому фенотипу пациентов [39]. Этот же вариант также является частым у пациентов с ВАЛ из Испании (31%) [49] и у российских пациентов (20%). Вариант c.2480G>T (p.Gly827Val) (частота аллеля 28%), ранее не описанный в литературе, встретился в гомозиготном состоянии у четырех пациентов российской выборки. Данная нуклеотидная замена расположена в “горячем” экзоне гена *CRB1*. Экзон 7 кодирует второй G-подобный домен ламинина А, являющийся особенно важным для функционирования белка CRB1 [50]. В этом же положении белка также описан как патогенный вариант c.2480G>A, приводящий к замене на другую аминокислоту p.(Gly827Glu)[51]. Таким образом, данный вариант был расценен нами как вероятно патогенный.

В гене *GUCY2D* патогенный вариант c.2944+1del, находящийся в области донорного сайта сплайсинга, впервые упоминается в публикации S. Hanein с соавт. в 2002 г., где авторы установили финское происхождение выявленного варианта [52]. Данный вариант был выявлен в компаунд-гетерозиготом состоянии у шести человек российской выборки, в гомозиготом — у четырех пациентов (суммарная частота аллеля составила 63.6%). Наиболее распространенным вариантом в гене *GUCY2D* у пациентов с ВАЛ из Великобритании был c.307G>A (p.Glu103Lys), встретившийся на 11.9% мутантных аллелей [53], отсутствующий на хромосомах российских пациентов, тогда как финский вариант сплайсинга встретился у британцев лишь на одной хромосоме. У польских пациентов на долю мутаций в гене *GUCY2D* приходится 14% молекулярно подтвержденных случаев ВАЛ, где вариант c.2302C>T (p.Arg768Trp) был частым, встретившимся в трех из семи неродственных семей [42], только у одного пациента из России данный вариант встретился в гомозиготном состо-

янии. Биаллельные патогенные варианты в гене *GUCY2D* описаны у пациентов с врожденным амаврозом Лебера 1-го типа (OMIM:204000), врожденной стационарной ночной слепотой типа II (OMIM:618555) и колбочко-палочковой дистрофией 6-го типа (OMIM:601777).

Таким образом, настоящее исследование впервые дает подробную генетическую характеристику российской когорты пациентов с подозрением на наследственную патологию сетчатки. На аутомно-рецессивные формы НЗС приходится значительная доля молекулярно подтвержденных случаев дистрофий сетчатки (72%), где на биаллельные патогенные и вероятно патогенные варианты в девяти генах (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) приходится 73.3% всех подтвержденных случаев. Результаты исследования показали, что спектр наиболее частых форм НЗС у российских пациентов схож с европейским. Однако стоит отметить, что частые варианты с.304G>T (p.Glu102\*) в гене *RPE65* и с.2480G>T (p.Gly827Val) в гене *CRB1* (ранее не описанный в литературе), а также комплексный аллель в гене *ABCA4* p.[Leu541Pro;Ala1038Val] были зафиксированы у российских пациентов с наибольшей частотой по сравнению с другими популяционными исследованиями, что свидетельствует в пользу этнического разнообразия частых патогенных вариантов в генах НЗС.

17 патогенных и вероятно патогенных вариантов в восьми генах (*ABCA4*, *CNGB3*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) были включены в разработанные диагностические системы детекции частых вариантов АР НЗС, которые могут быть использованы для диагностики наследственных патологий сетчатки у российских пациентов на начальном этапе, где преимуществом данных систем являются дешевизна и относительно короткие сроки проведения анализа, не сопоставимые с массовым параллельным секвенированием.

Работа выполнена в рамках Государственного бюджетного финансирования.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ “Медико-генетический научный центр” (протокол № 2021-3 от 12.03.2021).

Письменное информированное согласие было получено от законных представителей всех пациентов в возрасте до 18 лет. Было получено письменное информированное согласие от пациентов старше 18 лет.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanany M., Rivolta C., Sharon D. Worldwide carrier frequency and genetic prevalence of autosomal recessive inherited retinal diseases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. № 5. P. 2710–2716. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913179117>
2. Jespersgaard C., Fang M., Bertelsen M. et al. Molecular genetic analysis using targeted NGS analysis of 677 individuals with retinal dystrophy // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1219. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38007-2>
3. Sharon D., Ben-Yosef T., Goldenberg-Cohen N. et al. A nationwide genetic analysis of inherited retinal diseases in Israel as assessed by the Israeli inherited retinal disease consortium (IIRDC) // Hum. Mutat. 2020. V. 41. № 1. P. 140–149. <https://doi.org/10.1002/humu.23903>
4. Weisschuh N., Obermaier C.D., Battke F. et al. Genetic architecture of inherited retinal degeneration in Germany: A large cohort study from a single diagnostic center over a 9-year period // Hum. Mutat. 2020. V. 41. № 9. P. 1514–1527. <https://doi.org/10.1002/humu.24064>
5. Rivolta C., Sharon D., DeAngelis M.M., Dryja T.P. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns // Hum. Mol. Genet. 2002. V. 11. № 10. P. 1219–1227. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.10.1219>
6. Martin-Merida I., Avila-Fernandez A., Del Pozo-Valero M. et al. Genomic landscape of sporadic retinitis pigmentosa: Findings from 877 Spanish cases // Ophthalmology. 2019. V. 126. № 8. P. 1181–1188. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.03.018>
7. Gao F.J., Li J.K., Chen H. et al. Genetic and clinical findings in a large cohort of Chinese patients with suspected retinitis pigmentosa // Ophthalmology. 2019. V. 126. № 11. P. 1549–1556. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.04.038>
8. Koyanagi Y., Akiyama M., Nishiguchi K.M. et al. Genetic characteristics of retinitis pigmentosa in 1204 Japanese patients // J. Med. Genet. 2019. V. 56. № 10. P. 662–670.

- <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105691>
9. Avela K., Salonen-Kajander R., Laitinen A. et al. The genetic aetiology of retinal degeneration in children in Finland – new founder mutations identified // *Acta Ophthalmol.* 2019. V. 97. № 8. P. 805–814. <https://doi.org/10.1111/aos.14128>
10. Jaakson K., Zernant J., Klm M. et al. Genotyping microarray (gene chip) for the *ABCR* (*ABCA4*) gene // *Hum. Mutat.* 2003. V. 22. № 5. P. 395–403. <https://doi.org/10.1002/humu.10263>
11. Степанова А.А., Кадышев В.В., Шагина О.А., Поляков А.В. Селективный скрининг больных наследственными дегенерациями сетчатки для выявления целевой группы для генотерапии воретигеном непарвовексом // *Медицинская генетика.* 2022. Т. 21. № 10. С. 51–55. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.10.51-55>.
12. Zhong Z., Rong F., Dai Y. et al. Seven novel variants expand the spectrum of *RPE65*-related Leber congenital amaurosis in the Chinese population // *Mol. Vis.* 2019. V. 25. P. 204–214.
13. Вассерман Н.Н., Шагина О.А., Поляков А.В. Результаты использования новой медицинской технологии “Система детекции наиболее частых мутаций гена *FGFR3*, ответственного за ахондроплазию и гипохондроплазию” в ДНК-диагностике // *Мед. генетика.* 2016. Т. 15. № 2. С. 37–41.
14. Гундорова П., Степанова А.А., Шагина О.А., Поляков А.В. Результаты использования новых медицинских технологий “Детекция основных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции” и “Детекция десяти дополнительных точковых мутаций гена *PAH* методом мультиплексной лигазной реакции” в ДНК-диагностике фенилкетонурии // *Мед. генетика.* 2016. Т. 15. № 2. С. 29–36.
15. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // *Мед. генетика.* 2019. Т. 18. № 2. С. 3–23. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
16. Colombo L., Maltese P.E., Castori M. et al. Molecular epidemiology in 591 Italian probands with nonsyndromic retinitis pigmentosa and Usher syndrome // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2021. V. 62. № 2. <https://doi.org/10.1167/iovs.62.2.13>
17. Shatokhina O., Galeeva N., Stepanova A. et al. Spectrum of genes for non-*GJB2*-related non-syndromic hearing loss in the Russian population revealed by a targeted deafness gene panel // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 24. P. 15748. <https://doi.org/10.3390/ijms232415748>
18. den Hollander A.I., Koenekoop R.K., Yzer S. et al. Mutations in the *CEP290* (*NPHP6*) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis // *Am. J. Hum. Genet.* 2006. V. 79. № 3. P. 556–561. <https://doi.org/10.1086/507318>
19. Avela K., Sankila E.M., Seitsonen S. et al. A founder mutation in *CERKL* is a major cause of retinal dystrophy in Finland // *Acta Ophthalmol.* 2018. V. 96. № 2. P. 183–191. <https://doi.org/10.1111/aos.13551>
20. Lenassi E., Vincent A., Li Z. et al. A detailed clinical and molecular survey of subjects with nonsyndromic *USH2A* retinopathy reveals an allelic hierarchy of disease-causing variants // *Eur. J. Hum. Genet.* 2015. V. 23. № 10. P. 1318–1327. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.283>
21. van Wijk E., Pennings R.J., teBrinke H. et al. Identification of 51 novel exons of the Usher syndrome type 2A (*USH2A*) gene that encode multiple conserved functional domains and that are mutated in patients with Usher syndrome type II // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. № 4. P. 738–744. <https://doi.org/10.1086/383096>
22. Ivanova M.E., Trubilin V.N., Atarshchikov D.S. et al. Genetic screening of Russian Usher syndrome patients toward selection for gene therapy // *Ophthalmic Genet.* 2018. V. 39. № 6. P. 706–713. <https://doi.org/10.1080/13816810.2018.1532527>
23. Nakamura M., Lin J., Nishiguchi K. et al. Bietti crystalline corneoretinal dystrophy associated with *CYP4V2* gene mutations // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006. V. 572. P. 49–53. [https://doi.org/10.1007/0-387-32442-9\\_8](https://doi.org/10.1007/0-387-32442-9_8)
24. Rivera A., White K., Sthr H. et al. A comprehensive survey of sequence variation in the *ABCA4* (*ABCR*) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration // *Am. J. Hum. Genet.* 2000. V. 67. № 4. P. 800–813. <https://doi.org/10.1086/303090>
25. cieyńska A., Oiebto D., Ambroziak A.M. et al. Next-generation sequencing of *ABCA4*: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe // *Exp. Eye Res.* 2016. V. 145. P. 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.11.011>
26. Roberts L.J., Nossek C.A., Greenberg L.J., Ramesar R.S. Stargardt macular dystrophy: Common *ABCA4* mutations in South Africa-establishment of a rapid genetic test and relating risk to patients // *Mol. Vis.* 2012. V. 18. P. 280–289.
27. Fujinami K., Sergouniotis P.I., Davidson A.E. et al. Clinical and molecular analysis of Stargardt disease with preserved foveal structure and function // *Am. J. Ophthalmol.* 2013. V. 156. № 3. P. 487–501. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2013.05.003>
28. Valverde D., Riveiro-Alvarez R., Bernal S. et al. Microarray-based mutation analysis of the *ABCA4* gene in Spanish patients with Stargardt disease: Evidence of a prevalent mutated allele // *Mol. Vis.* 2006. V. 12.

- P. 902–908.
29. Hirji N., Aboshiha J., Georgiou M. et al. Achromatopsia: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options // *Ophthalmic Genet.* 2018. V. 39. № 2. P. 149–157.  
<https://doi.org/10.1080/13816810.2017.1418389>
  30. Kohl S., Varsanyi B., Antunes G.A. et al. *CNGB3* mutations account for 50% of all cases with autosomal recessive achromatopsia // *Eur. J. Hum. Genet.* 2005. V. 13. № 3. P. 302–308.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201269>
  31. Sun W., Li S., Xiao X., et al. Genotypes and phenotypes of genes associated with achromatopsia: A reference for clinical genetic testing // *Mol. Vis.* 2020. V. 26. P. 588–602.
  32. Mayer A.K., Van Cauwenbergh C., Rother C. et al. *CNGB3* mutation spectrum including copy number variations in 552 achromatopsia patients // *Hum. Mutat.* 2017. V. 38. № 11. P. 1579–1591.  
<https://doi.org/10.1002/humu.23311>
  33. Wissinger B., Gamer D., Jägle H. et al. *CNGA3* mutations in hereditary cone photoreceptor disorders // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 69. № 4. P. 722–737.  
<https://doi.org/10.1086/323613>
  34. Kohl S., Coppieters F., Meire F. et al. A nonsense mutation in *PDE6H* causes autosomal-recessive incomplete achromatopsia // *Am. J. Hum. Genet.* 2012. V. 91. № 3. P. 527–532.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.07.006>
  35. Holtan J.P., Selmer K.K., Heimdal K.R., Bragadóttir R. Inherited retinal disease in Norway – a characterization of current clinical and genetic knowledge // *Acta Ophthalmol.* 2020. V. 98. № 3. P. 286–295.  
<https://doi.org/10.1111/aos.14218>
  36. Pedurupillay C.R., Landsend E.C., Vigeland M.D. et al. Segregation of incomplete achromatopsia and alopecia due to *PDE6H* and *LPAR6* variants in a consanguineous family from Pakistan // *Genes (Basel)*. 2016. V. 7. № 8. <https://doi.org/10.3390/genes7080041>
  37. Lopez-Rodriguez R., Lantero E., Blanco-Kelly F. et al. *RPE65*-related retinal dystrophy: Mutational and phenotypic spectrum in 45 affected patients // *Exp. Eye Res.* 2021. V. 212.  
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108761>
  38. Sallum J.M.F., Kaur V.P., Shaikh J. et al. Epidemiology of Mutations in the 65-kDa Retinal Pigment Epithelium (*RPE65*) Gene-Mediated Inherited Retinal Dystrophies: A Systematic Literature Review // *Adv. Ther.* 2022. V. 39. № 3. P. 1179–1198.  
<https://doi.org/10.1007/s12325-021-02036-7>
  39. Zobor D., Brühwiler B., Zrenner E. et al. Genetic and clinical profile of retinopathies due to disease-causing variants in Leber congenital amaurosis (LCA)-associated genes in a large German cohort // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 10.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24108915>
  40. Dharmaraj S.R., Silva E.R., Pina A.L. et al. Mutation-al analysis and clinical correlation in Leber congenital amaurosis // *Ophthalmic Genet.* 2000. V. 21. № 3 P. 135–150.  
[https://doi.org/10.1076/1381-6810\(200009\)2131-ZFT135](https://doi.org/10.1076/1381-6810(200009)2131-ZFT135)
  41. Chen Y., Zhang Q., Shen T. et al. Comprehensive mutation analysis by whole-exome sequencing in 41 Chinese families with Leber congenital amaurosis // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2013. V. 54. № 6. P. 4351–4357.  
<https://doi.org/10.1167/iov.13-11606>
  42. Skorzcyk-Werner A., Sowińska-Seidler A., Wawrocka A. et al. Molecular background of Leber congenital amaurosis in a Polish cohort of patients-novel variants discovered by NGS // *J. Appl. Genet.* 2023. V. 64. № 1. P. 89–104.  
<https://doi.org/10.1007/s13353-022-00733-9>
  43. Vallespin E., Cantalapiedra D., Riveiro-Alvarez R. et al. Mutation screening of 299 Spanish families with retinal dystrophies by Leber congenital amaurosis genotyping microarray // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. № 12. P. 5653–5661.  
<https://doi.org/10.1167/iov.07-0007>
  44. Thompson J.A., De Roach J.N., McLaren T.L. et al. The genetic profile of Leber congenital amaurosis in an Australian cohort // *Mol. Genet. Genomic Med.* 2017. V. 5. № 6. P. 652–667.  
<https://doi.org/10.1002/mgg3.321>
  45. Coppieters F., Casteels I., Meire F. et al. Genetic screening of LCA in Belgium: Predominance of *CEP290* and identification of potential modifier alleles in *AH11* of *CEP290*-related phenotypes // *Hum. Mutat.* 2010. V. 31. № 10. P. E1709–1766.  
<https://doi.org/10.1002/humu.21336>
  46. Vallespin E., Lopez-Martinez M.A., Cantalapiedra D. et al. Frequency of *CEP290* c.2991\_1655A>G mutation in 175 Spanish families affected with Leber congenital amaurosis and early-onset retinitis pigmentosa // *Mol. Vis.* 2007. V. 13. P. 2160–2162.
  47. Sundaresan P., Vijayalakshmi P., Thompson S. et al. Mutations that are a common cause of Leber congenital amaurosis in northern America are rare in southern India // *Mol. Vis.* 2009. V. 15. P. 1781–1787.
  48. Seong M.W., Kim S.Y., Yu Y.S. et al. Molecular characterization of Leber congenital amaurosis in Koreans // *Mol. Vis.* 2008. V. 14. P. 1429–1436.
  49. Corton M., Tatu S.D., Avila-Fernandez A. et al. High frequency of *CRB1* mutations as cause of Early-Onset Retinal Dystrophies in the Spanish population // *Orphanet J. Rare Dis.* 2013. V. 8.  
<https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-20>
  50. Bujakowska K., Audo I., Mohand-Saïd S. et al. *CRB1* mutations in inherited retinal dystrophies // *Hum. Mutat.* 2012. V. 33. № 2. P. 306–315.  
<https://doi.org/10.1002/humu.21653>
  51. Huang X.F., Huang F., Wu K.C. et al. Genotype–phe-

- notype correlation and mutation spectrum in a large cohort of patients with inherited retinal dystrophy revealed by next-generation sequencing // *Genet. Med.* 2015. V. 17. № 4. P. 271–278.  
<https://doi.org/10.1038/gim.2014.138>
52. Hanein S., Perrault I., Olsen P. et al. Evidence of a founder effect for the *RETGC1* (*GUCY2D*) 2943DelG mutation in Leber congenital amaurosis pedigrees of Finnish origin // *Hum. Mutat.* 2002. V. 20. № 4. P. 322–323. <https://doi.org/10.1002/humu.9067>
53. Bouzia Z., Georgiou M., Hull S. et al. *GUCY2D*-associated Leber congenital amaurosis: A retrospective natural history study in preparation for trials of novel therapies // *Am. J. Ophthalmol.* 2020. V. 210. P. 59–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2019.10.019>

## Frequent Genetic Variants of Autosomal Recessive Non-Syndromic Forms of Inherited Retinal Diseases in the Russian Federation

N. Yu. Ogorodova<sup>1,\*</sup>, A. A. Stepanova<sup>1</sup>, O. A. Shchagina<sup>1</sup>, V. V. Kadyshev<sup>1</sup>, A. V. Polyakov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

\*e-mail: ogorodova@med-gen.ru

Inherited retinal diseases (IRDs) are a clinically heterogeneous group of retinal pathologies associated with vision loss due to dysfunction or degeneration of photoreceptor and retinal pigment epithelium. Autosomal recessive forms of IRDs account for more than 55% of all diseases in this group on average worldwide. This study presents data on frequent pathogenic and likely pathogenic variants in recessive IRDs genes obtained from a retrospective analysis of high-throughput sequencing data from a large Russian cohort of patients with suspected hereditary non-syndromic retinal pathology. Data from 1470 unrelated patients were analyzed. Pathogenic and likely pathogenic variants were identified in the zygosity required for the development of the disease in 643 patients (43.74%). It was found that 9 genes (*ABCA4*, *CNGB3*, *USH2A*, *RPE65*, *CRB1*, *CNGA3*, *CEP290*, *GUCY2D*, *PDE6H*) account for 73.3% of all molecularly confirmed cases of IRDs in Russian patients. An analysis of the spectrum of nucleotide variants of these genes was carried out, and 17 variants were identified that occur with an allelic frequency of more than 1% for each gene. In light of obtained data, the diagnostic systems based on the multiplex ligation-dependent probe amplification reaction (MLPA) were developed. The informativity of the two systems for diagnosing autosomal recessive non-syndromic forms of inherited retinal diseases is 16.4%, the informativity for all forms of non-syndromic retinal diseases exceeds 7%. For a group of patients with achromatopsia, a study using one of the systems will make it possible to establish a diagnosis in 62.5% of cases.

**Keywords:** inherited retinal diseases, frequent recessive variants, achromatopsia, Leber congenital amaurosis, Stargardt disease.