

Progresszív fotoreceptor disztrófiák klinikai és genetikai vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Vámos Rita

Semmelweis Egyetem

.Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulensek: Dr. Somfai Gábor Márk Ph.D, med.habil., főorvos
Dr. Varsányi Balázs Ph.D, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Imre László Ph.D, klinikai főorvos
Dr. Kerényi Ágnes Ph.D, c. egyetemi docens

Komplex vizsga Bizottság elnöke:

Dr. Arató András D.Sc, MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Szabó László med. habil., egyetemi tanár
Dr. Tory Kálmán Ph.D, med. habil., egyetemi docens
Dr. Varga Gábor Ph.D, D.Sc, egyetemi tanár

Budapest

2019

Tartalomjegyzék

Fogalomtár	6
Rövidítések jegyzéke	9
I. Bevezetés	11
I. 1. Klinikai kép, tünetek	13
I.1.1. Felnőttkorban fellépő RD (retinitis pigmentosa)	13
I.1.2. Veleszületett, illetve korai életkorban kezdődő RD-k (LCA, EORD) klinikai tünetei	16
I.1.2.1. Klasszikus, 1-es típusú LCA (csap-pálcika típusú betegség).....	16
I.1.2.2. 2-es típusú LCA vagy EORD (pálcika-csap típusú betegség)	17
I.2. Differenciál diagnózis	17
I.2.1. Retinitis pigmentosa.....	17
I.2.1.1. Szindrómás RP	17
I.2.1.2. Egyéb progresszív niktalópiával járó RD: chorioiderémia (CHM),	18
I.2.1.3. Nem progresszív, niktalópiával járó kórképek.....	21
I.2.2. LCA és EORD differenciál diagnosztikája	21
I.2.2.1. 1-es típusú LCA	21
I.2.2.2. EORD (2 –es típusú LCA)	21
I.3. Retina disztrófiák – genetikai vonatkozások.....	22
I.3.1. Retinitis pigmentosa.....	22
I.3.2. LCA - genetikai vonatkozások.....	22
I.3.2.1 Klasszikus LCA	22
I.3.2.2. EORD	23
I.4. Patomechanizmusok, az azonosított gének normál szerepe.....	24
I.4.1. Retinitis pigmentosa.....	24
I.4.2. LCA-EORD.....	24
I.5. A retina disztrófiák szövettani vonatkozásai.....	25
I.5.1. A retinitis pigmentosa szövettani jellemzői	25
I.5.2. Az LCA-EORD szövettani jellemzői.....	27
I.6. Állatmodellek, állatkísérletek, humán terápiás lehetőségek	27
I.6.1. Spontán lefolyás különböző géndefektusú állatmodellekben	28
I.6.1.1. AIPL1 knock-out egér.....	28

I.6.1.2. „rd8” (CRB1 deficiens) egér	29
I.6.1.3. „rd16” (CEP290 deficiens) egér.....	29
I.6.1.4. Macska model (CEP290 mutáns).....	31
I.6.1.5. Kutya (RPE65 mutáns).....	31
I.6.1.6. RPE65 knock out egér.....	31
I.6.2. Humán terápiás próbálkozások	31
I.6.2.1. Első humán klinikai kísérletek	31
I.6.2.2. Mutációspecifikus, biotechnológiai alapú terápia a CEP290 gén leggyakoribb mutációjában, in vitro	32
II. Célkitűzések	33
II.1. Retinitis pigmentosa (RP) betegek	33
II.2. Magyar LCA-EORD betegek	33
III. Betegek és módszerek.....	35
III.1. Betegek	35
III.1.1. Retinitis pigmentosa betegek.....	35
III.1.2. LCA-EORD betegek.....	36
III.2. Klinikai vizsgálatok.....	37
III.2.1. Látóélesség vizsgálat	37
III.2.1.1. Retinitis pigmentosa betegek.....	37
III.2.1.2. LCA-EORD betegek	37
III.2.2. Réslámpával történő vizsgálat.....	38
III.2.3. Szemfenék vizsgálat és szemfenéki fotodokumentáció.....	38
III.2.4. Ganzfeld elektroretinográfia (Gf-ERG).....	38
III.2.5. Multifokális elektroretinográfia (mf-ERG)	39
III.2.6. Optikai koherencia tomográfia (OCT)	42
III.2.6.1. Az OCTRIMA szoftver, az intraretinális rétegek szegmentálása.....	43
III.2.6.2. Heidelberg Spectralis SD-OCT	45
III.2.7. Szerkezet-funkció összefüggés vizsgálata a retinitis pigmentosában szenvedő betegek centrális retinájának megítélésére	45
III.2.8. Statisztikai számítások.....	47
III.3. Genetikai vizsgálatok	48
III.3.1. DNS izolálás	48
III.3.2. DNS amplifikálás polimeráz láncreakcióval (PCR) és fragmentálás	48
III.3.3. LCA-DNS microarray vizsgálat	49

III.3.4. Direkt (Sanger) szekvenálás	52
III.3.5. Célzott újgenerációs szekvenálás (new generation sequencing, NGS)	53
IV. Eredmények.....	56
IV.1. Retinitis pigmentosa betegek.....	56
IV.1.1. Látóélesség	56
IV.1.2. Funkcionális (multifokális ERG) változások	56
IV.1.3. Szerkezeti változások	57
IV.1.3.1. Centrális makula régió (fovea, 1 mm).....	59
IV.1.3.2. Pericentrális makula régió (perifovea, 1-3 mm).....	59
IV.1.3.3. Perifériás makularégió (3-5 mm)	61
IV.2. LCA-EORD betegek vizsgálatának eredményei.....	64
IV.2.1. Klinikai vizsgálatok.....	64
IV.2.1.1. Ganzfeld -ERG vizsgálat.....	67
IV.2.1.2. Látóélesség, látási teljesítmény	68
IV.2.1.3. A retinális fenotípus	68
IV.2.1.4. Optikai koherencia tomográfia.....	72
IV.2.2. A genetikai vizsgálatok eredményei.....	73
IV.2.3. A genetikai eredmények bioinformatikai feldolgozása, a talált mutációk patogenitásának megítélése, illetve vizsgálata	80
V. Megbeszélés	82
V.1. Retinitis pigmentosa betegek.....	82
V.1.1. A külső nukleáris réteg (ONL) változása	82
V.1.2. Az INL+OPL komplexum változása	83
V.1.3. A GCL+IPL komplexum változása	84
V.1.4. Az RNFL réteg változása	84
V.1.5. A teljes retina vastagság változása	85
V.2. LCA-EORD betegek.....	86
V.2.1. A látási teljesítmény és a genetikai szubtípus összefüggése	87
V.2.2. Funkcionális eltérések, Ganzfeld-ERG	87
V.2.3. Morfológiai eltérések: a retinális fenotípus és a genetikai szubtípus összefüggése	87
V.2.3.1. Az AIPL1 génhez kötött szubtípus	88
V.2.3.2. A CRB1 génhez kötött szubtípus.....	88
V.2.3.3. A CEP290 génhez kötött szubtípus	89

V.2.3.4. A nem azonosított genotípusú beteg morfológiai jellemzői.....	90
V.2.4. Genetikai vizsgálatok: az azonosított gének szerepe és a talált mutációk analízise	90
V.2.4.1. AIPL1 gén.....	90
V.2.4.2. A CRB1 gén.....	92
V.2.4.3. A CEP290 gén	94
VI. Következtetések.....	97
VII. Összefoglalás	100
VIII. Summary	101
IX. Irodalomjegyzék.....	102
X. Az értekezés témájában megjelent saját közlemények jegyzéke ..	121
XI. Egyéb közlemények jegyzéke.....	122
XII. Köszönetnyilvánítás	125

Fogalomtár

Allél: Egy gén vagy DNS szakasz egy vagy több alternatív formája egy adott lókuszon.

Amplifikáció: Egy adott DNS szakasz (kópiaszámának) megsokszorozása.

cDNS: Kódoló DNS, mely mRNS-ről reverz transzkriptáz enzim segítségével szintetizálódik. A genomikus DNS-től különbözik, mert intronokat nem tartalmaz.

Delécio: A mutációk egy típusa, mely esetén egy adott hosszúságú DNS szakasz kitörlődik a DNS-szálból.

Denaturálás (egyszálusítás): A kétszálú DNS szálainak különválasztása, hő vagy kémiai reakció hatására, így két darab egyszálú DNS keletkezik.

De novo / novel mutáció: Újonnan keletkezett mutáció.

Dezoxinukleotidok: A DNS építő elemei, d-nukleotid trifoszfát (TP) forma. A négy bázisnak megfelelően négy féle létezik: dezoxiATP, dezoxiCTP, dezoxiGTP és dezoxiTTP.

DNS microarray (diagnosztikus chip): Genetikai diagnosztikus eszköz, melyen solid (pl.: üveg) felszínen multiplex DNS szakaszok vannak rögzítve, melyek mintaként szolgálnak rövid DNS szakaszok in situ szintetizálásához, illetve szekvencia meghatározásához. A direkt szekvenálással szemben nagy előnye a nagyszámú minta párhuzamos analizálásának lehetősége.

DNS polimeráz enzim: A DNS szál szintézisét katalizáló enzim.

DNS replikáció: Új DNS szál szintézise egy adott DNS szakasz, mint minta alapján.

Direkt DNS-szekvenálás: A génen található kóroki mutációk kimutatása fluoreszcens alapú automata kapilláris szekvenátor használatával.

Domén: A fehérje funkcionálisan aktív kötőhelye.

Elektroforézis: DNS vagy fehérjefragmentumok agaróz vagy poliakrilamid gélben történő méret szerinti szétválasztása.

Elektoretinogram: Az elektoretinográfia során regisztrált görbe.

Exon: A több darabban kódolt gének egy-egy kifejeződő szakasza, melyeket egymástól közbeékelte DNS szakaszok, intronok választanak el.

Fenotípus: Egy sejt vagy élő szervezet megfigyelhető tulajdonságainak összessége.

Folding (hajlítgatás): A fehérje translációtól a végső globuláris állapotig bekövetkező jelentős konformációváltozás, a térbeli szerkezet kialakulásának folyamata.

Forward: 5'-3' irány, mely irányban a nukleinsavak és fehérjék szintetizálódnak

Fragmentálás: Feldarabolás, kisebb szakaszokra bontás.

Frame shift (kereteltolódásos mutáció): Egy vagy több bázis beépülése (inzerció), vagy elvesztése (delécio) a leolvasási keret eltolódásához, a láncvég irányába új aminosav sorrendhez vezet.

Genomikus DNS: A DNS exonokat és intronokat is tartalmazó formája.

Genotípus: Egy egyed vagy egy génlókuszt jellemző genetikai összetétele.

Heterozigóta: Egy génlókuszon két különböző allélt hordozó sejt/egyed.

Hibridizáció: Az egyszálú DNS vagy RNS szekvencia szakasz kötődése a komplementer NS szakaszhoz.

Homozigóta: Egy génlókuszon két azonos allélt hordozó sejt/egyed.

Intron: Olyan DNS-szekvenciák, amelyek az RNS-re átíródnak, de az érés során kivágásra kerülnek, így aminosavat nem határoznak meg.

Inzerció: Egy bizonyos hosszúságú nukleotid szakasz beültetése a DNS-láncba.

Kodon: Az mRNS bázishármasa, mely egy aminosavat határoz meg.

Konszanguinitás (vérrokonság): Közös elődökkel rendelkezés, így módon genetikailag kapcsolatban lévő állapot.

Lókuszt: Egy adott gén vagy DNS szekvencia helye a genetikai térképen/kromoszómán. Allélikus szekvenciák identikus lókusztokon helyezkednek el a homológ kromoszómákon (kromoszómális pozíció).

Misfolding, aberráns folding: A fehérjék nem megfelelő feltekeredése, gombolyodása, térszerkezetük kialakulása során.

Misszensz mutáció: A DNS nukleotidsorrendjének aminosavcserét eredményező változása.

mRNS: Messenger (hírvivő) RNS, mely a fehérjeszintézis során a mag-DNS-től szállítja a fehérje aminosavszekvenciáját meghatározó genetikai információt.

Nonsense mediated decay: A „nonszensz mediálta lebontás” egy olyan, a természetben működő védekező, illetve kontroll mechanizmus, amely eliminálja a korai terminációs kodonokat (PTC) tartalmazó RNS-eket.

Nonszensz mutáció: Stop kodonhoz, így a DNS szál korai végződéséhez vezető mutáció.

Nukleotid: A nukleinsav láncot alkotó szerkezeti egység, mely egy heterociklusos bázisból, egy pentóz cukorból és egy foszfát csoportból áll.

Primer: 20-30 bázisból álló oligonukleotid, mely a célszekvenciával komplementer, (szekvenciáját előre megtervezzük ún. genomikus bronzerek segítségével). A célszekvenciához kapcsolódva lehetségessé válik, hogy a DNS polimeráz elkészítse a komplementer DNS szálát.

Polimorfizmus: Egy adott populációban kettő vagy több különböző variáns, melyekből a legritkább előfordulási gyakorisága legalább 1%. Egy genetikai lokusz polymorfnek tekintett, ha legalább két különböző formában létezik a népességben.

Pontmutáció: Mutáció típus, mely során egy darab bázis helyettesítődik egy másikkal (single base substitution).

Retinogramtérkép: A multifokális ERG során regisztrált görbék topografikus megjelenítése.

Reverz transzkripció: cDNS készítése RNS-ről reverz transzkriptáz enzimmel.

SNP (single nukleotid polimorfizmus): Kettő vagy több különböző variáns egy adott bázis lókuszában.

Splicing: Az intronok kivágása a nukleinsavból az mRNS érés során.

Válaszsűrűség: Multifokális ERG vizsgálattal mért egységnyi területre jutó elektromos aktivitás (mértékegysége: nV/fok²).

Rövidítések jegyzéke

AD: autoszomális domináns

AIP1: aryl-hydrocarbon receptor interacting protein like 1

ANOVA: analysis of variance

APEX: arrayed primer extension

AR: autoszómális recesszív

AAV: adeno-asszociált vírus

ACHM: achromatopsia

BCVA: best corrected visual acuity, legjobb korrigált látóélesség

bp: bázispár

cDNS: komplementer dezoxiribonukleinsav

CEP290: centroszomális protein, 290 Dalton súlyú

CHM: chorioiderémia

CRB1: crumbs homologue 1

CSNB: congenital stationary night blindness (veleszületett stacioner sötétadaptációs zavar)

dNTP: deoxyribonukleotid-trifoszfát

DNS: dezoxiribonukleinsav

DTL: elektróda Dawson-Trick-Litzkow féle „szál” (fiber) elektróda

EORD: early onset retinal dystrophy

ERG: elektoretinográfia

ERM: epiretinal membrane

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study

GCL: ganglion cell layer

GfERG: Ganzfeld elektoretinográfia

ILM: internal limiting membrane (belső határhártya)

INL: inner nuclear layer (belső magvas réteg)

IPL: inner plexiform layer (belső rostos réteg)

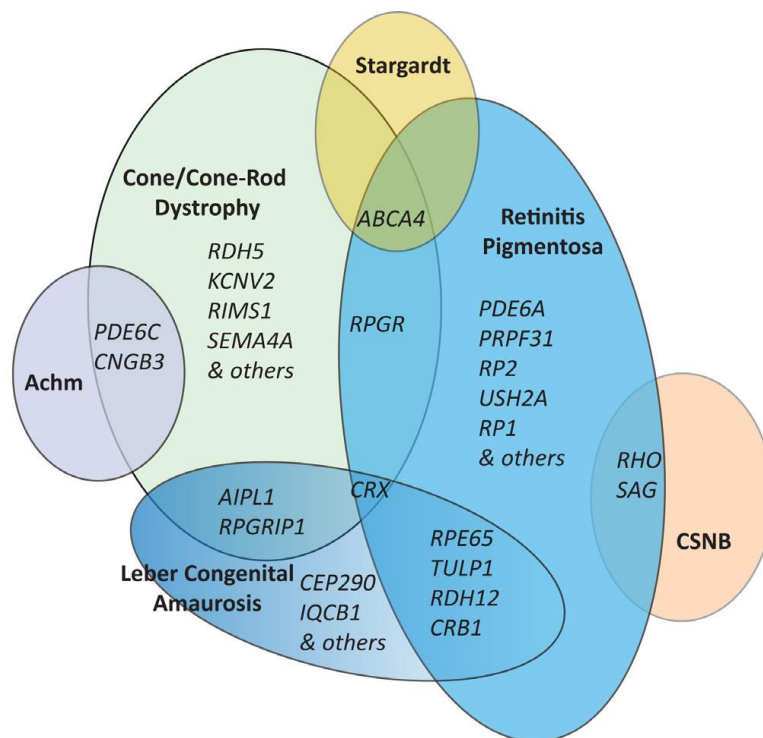
ISCEV: International Society for Clinical Electrophysiology of Vision

LCA: Leber Congenital Amaurosis

logMAR: logarithm of the Minimum Angle of Resolution
mfERG: multifokális elektroretinográfia
mRNS: messenger RNS (hírvivő ribonukleinsav)
NGS: next generation sequencing
OCTRIMA: OCT retinal image analyzer
OMIM: online mendelian inheritance in man
OCT: optical coherence tomography (optikai koherencia tomográfia)
OPL: outer plexiform layer (külső szemcsés réteg)
ONL: outer nuclear layer (külső magvas réteg)
PCR: polimerase chain reaction
RD: retina disztrófia
ROS: rod outer segment
RNFL: nerve fiber layer (idegrostréteg)
RP: retinitis pigmentosa
RPE: retinal pigment epithelium (a retina pigmenthámja)
SD: standard deviáció - szórás
SNP: single nucleotide polymorphism (egyponos nukleotid polimorfizmus)
XL-RP: X kromoszómához kötött retinitis pigmentosa

I. Bevezetés

A retina disztrófiák (RD) ritka, progresszív, genetikai hibán alapuló, degeneratív betegségek csoportja, melyek elsődlegesen a fotoreceptorok morfológiai vagy funkcionális károsodását okozzák. Előrehaladott stádiumban a retina összes rétege érintett, a neuroretina generalizált strukturális változása figyelhető meg, következményes súlyos funkciómúlással, esetenként vaksággal. (1, 2, 3) Fellépésük időpontját, genetikai hátterüket, patomechanizmusukat, öröklésmenetüket és klinikai megjelenésüket tekintve egyaránt jellemző rájuk a nagyfokú heterogenitás. (1. ábra)



1. ábra. A retina disztrófiák genetikai és fenotípusos heterogenitása: ugyanazon kórkép pl: retinitis pigmentosa vagy Leber-féle kongenitális amaurozis hátterében számos gén defektusa állhat (genetikai heterogenitás) ugyanakkor egy adott gén (pl. CRB1-) defektusa mindkettőt okozhatja (fenotípusos heterogenitás). (4)

A fotoreceptorok felépítésüket és működésüket tekintve egyaránt nagyfokban specializálódott sejtek, a pálcikák száma kb. 130 millió, a csapoké 6-7 millió egy

szemben. (1) A RD-k esetében a klinikai képet leggyakrabban a pálcikák működési zavara uralja, előrehaladott stadiumban azonban mindig a csapok is érintettek (pálcika-csap disztrófia, másnéven „retinitis pigmentosa”, (RP, OMIM: 268000). A „retinitis pigmentosa” elnevezés a szemfenéki kép alapján született, a jellegzetes szemfenéki elváltozásokat (csontsejtszerű / intraretinális pigmentáció) először szemtükörrel van Trigt 1853-ban látta és írta le. A „retinitis pigmentosa” elnevezés Donderstól származik: 1857-ben vak betegek szemfenekén sötétebb, csontsejtszerű pigmentációt figyelt meg (5, 6). Ma már ismert, hogy a RP nem gyulladáisos eredetű, azonban ez a terminus technicus annyira elterjedt a szakirodalomban, hogy jelenleg is ezt használjuk. (5) A pálcika-csap mintázatú RD-k másik szinonimája a „degeneratio pigmentosa retinae”. A legtöbb beteg ún. sporadikus eset, kb. az összes RP 50-60 %-a, ezen izolált esetek valószínűen autoszomális recesszív (AR) módon öröklődnek, ezzel szemben autoszomális domináns (AD) öröklést mutat kb. 25%, és a fennmaradó kb. 10-15%-ban az X kromoszómához kötött öröklődés a jellemző. (2, 5)

A legsúlyosabb retina disztrófiák első leírójukról Theodor Leberrel kapták a Leber-féle kongenitális amaurozis (LCA, OMIM 204000) elnevezést, aki a jellemző klinikai tüneteket 1869-ben írta le. (7) A tünetek klasszikus esetben már 1 éves kor előtt fellépnek, máskor a pontos kezdet nehezen állapítható meg, gyakran egy külső szemlélő veszi észre a sötétben való bizonytalanságot. Ez gyakran 1 éves kor után, de még kisgyermekkorban kezdődik. A legsúlyosabb, veleszületett formáktól elkülönítendő, ezeket a disztrófiákat korai életkorban kezdődő retina disztrófiának (early-onset severe retinal dystrophy, EORD) nevezi a szakirodalom. Az LCA és az EORD között az átmenet folyamatos, ami számos esetben diagnosztikus pontatlansághoz vezet. (3, 8, 9)

A RP világszerte előfordul, gyakorisága 1: 4000 (2, 3), Magyarországon az érintettek száma 2500 körülre tehető, míg az LCA-EORD gyakorisága világszerte kb. 1: 50-80 000. (10) A magyar betegek száma hozzávetőleg 125-200 közé tehető. A veleszületett és gyermekkori RD-k az összes RD esetek kb 5-7 %-át teszik ki. (9)

I. 1. Klinikai kép, tünetek

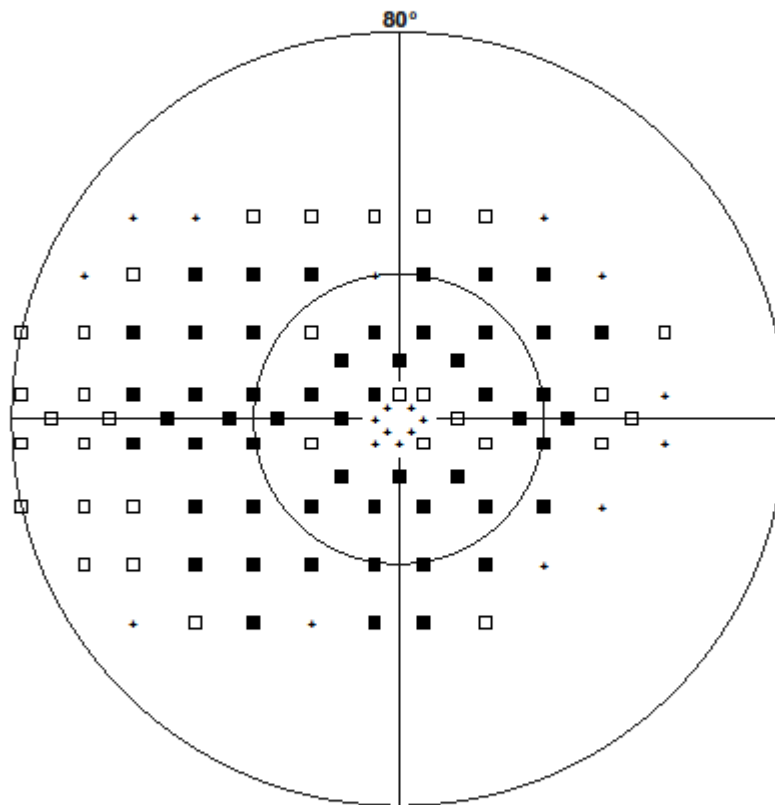
I.1.1. Felnőttkorban fellépő RD (retinitis pigmentosa)

A diagnózis már a klinikai kép és a szubjektív tünetek alapján felállítható, a végleges diagnózishoz azonban a Ganzfeld-elektroretinográfia (Gf-ERG) alapvető.

Az RP betegek tünetei lassan, észrevétlenül kezdődnek és több évtized alatt jutnak el a végállapotig. A *korai stádiumra* a niktalópia jellemző, mely az első vagy a második életévtizedben kezdődik. (2, 3) Az érintett személynek nincs betegségtudata, így sem a tünetek sem a fotoreceptor pusztulás kezdetének pontos ideje nem meghatározható. A beteg ebben a stádiumban jellegzetesen nem kerül szemorvoshoz, így diagnózis sem születik, főleg ha a családban nincs másik érintett személy. A látóélesség általában nem érintett. A szemfenék a korai stádiumban általában nem mutat eltérést, pigmentdepozitumok nincsenek. A retinális arteriolák nem, vagy csak alig szűkebbek, a látóidegfő morfológiailag ép. A látótérben kóros eltérés először csak szkotopikus körülmények között mutatható ki, a látótér vizsgálat viszont általában mezopikus körülmények között történik. A *középső stádiumban* a niktalópia a mindennapi életben is korlátozza a beteget (pl: autóvezetés este). A perifériás látótér szűkülését nappal is észleli a beteg, például gyalogátjárón közlekedés vagy kézfogás esetén. Az *előrehaladott stádiumban* csőlátótér alakul ki. A betegségre a diszkromatopszia is jellemző, ami a kék és sárga színt érinti. A csapok másodlagos érintettsége miatt fénykerülés alakul ki, így a beteg számára csak egy igen szűk intervallumban optimálisak a fényviszonyok: túl kevés fényben a niktalópia, túl erős fényben a fotoaverzió zavarja. A centrális látás gyakran csökkent, ennek hátterében makula oedema vagy atrófia állhat. A papilla már egyértelműen halványabb, az erek attenuáltak. A *Ganzfeld elektroretinogram (Gf-ERG)-n* a középső stádiumban a szkotopikus ERG kioltott, a fotopikus ERG nagyfokban csökkent vagy kioltott lehet. (3, 5)

A *látótérben* középperiférikus gyűrű alakú szkotóma alakul ki, mely idővel mind a periféria, mind a centrum felé terjed. (2.

ábra)



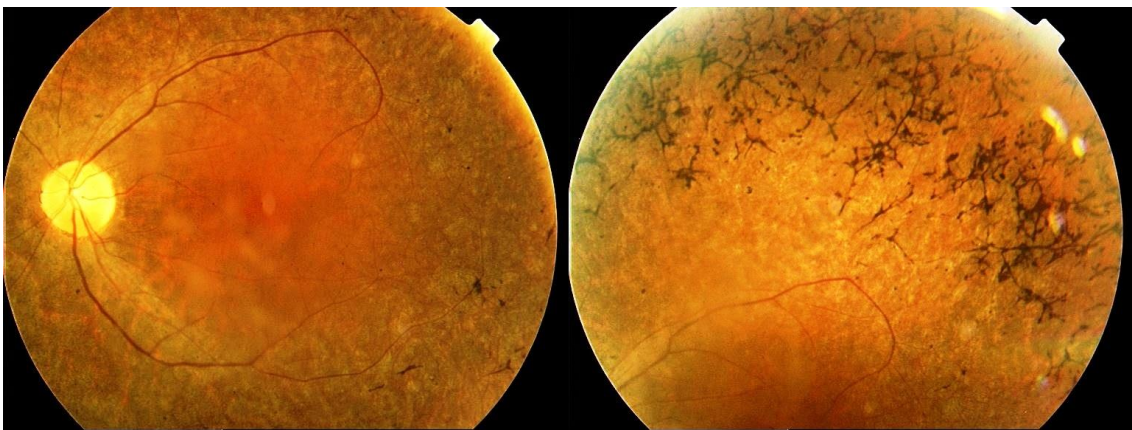
2. ábra. 80 fokos látótér, bal szem. Gyűrű alakú szkotóma, a látóélesség 1.0. 37 éves nőbeteg a szerző saját beteganyagából.

A retinitis pigmentosában szenvedő beteg jellegzetes szemfenéki képén a legelső elváltozás az intraretinális (csontsejtszerű) pigmentáció megjelenése a középperiférián, mely az RPE sejteknek az elpusztult fotoreceptorok helyére, a neuroretinába történő migrálásának a következménye.(5) Később a pigmentáció mind a centrum, mind a periféria felé kiszélesedik, egyidejűleg a papilla fokozott decolorációja (ascendáló atrófia, gliózis) és a retinális erek szűkülete alakul ki. (1, 2, 3, 5) (3. ábra)



3. ábra. Középső stádiumú RP-s beteg szemfenéki képe. Jobb szem. A látóidegfő nem dekolorált, az erek alig szűkebbek, a középperiférián körben hiperpigmentáció. A kép a szerző saját beteganyagából származik.

Az előrehaladott stádiumban a szemfenéken kiterjedt, a makulát is többnyire érintő pigmentdepozitumok, kiterjedt chorioretinális atrófia, szűk erek és halvány látóidegfő figyelhető meg. Egyes betegekben 10-20 év alatt a centrális látás is elvész, más esetekben nem. A betegek többsége szórészleteket még évekig tud olvasni. A centrális látás elvesztésének jellemző ideje a 60 éves kor, ilyenkor a retina elektromos válasza kioltott. (2)



4. ábra. Előrehaladott stádiumú RP beteg szemfenéki képe, bal szem. Decolorált papilla, szűk erek, a középperiférián ún. csontsejt szerű hiperpigmentáció, szemcsés-atrófiás retina mintázat jellemzi a szemfenéki képet. A látási teljesítmény fényérzés - szemelőtti ujjolvasás. A kép a szerző saját beteganyagából származik.

I.1.2. Veleszületett, illetve korai életkorban kezdődő RD-k (LCA, EORD) klinikai tünetei

A betegeket alapvetően két csoportba (LCA/ EORD) oszthatjuk, melyek között a határ gyakran elmosódik, számos intermedier fenotípus létezik. (8, 9)

I.1.2.1. Klasszikus, 1-es típusú LCA (csap-pálcika típusú betegség)

(Leber által leírt eredeti klinikai kép) esetén az első tünetek általában 1 éves kor előtt mutatkoznak. A vizuális teljesítmény nagyon gyenge, többnyire csak fényérzés-ujjolvasás- kézmozgás látás már a korai kisdéd korban. (11) Első tünetként, jellemzően pár hónapos korban, finom vagy durva hullámú, kereső szemmozgás (sensoros nystagmus) látható, a gyermek fixálási reflexe nem alakul ki. A pupilla renyhe, fényre nem vagy lassan reagál. (7, 10) A gyermek, saját rossz funkciójú szemének „extra inger” biztosítandó, gyakran nyomogatja vagy dörzsöli azt, ez az úgynevezett okulo-digitális jel. A látás legjobb esetben 2-3 mou, az évek előrehaladtával általában tovább romlik, sok esetben a fényérzékelésig illetve a fényérzékelés nélküli állapotig, ugyanakkor gyakori a fotoaverzió is. (11, 12)

A szemfenék általában az első élethónapokban nem mutat lényeges eltérést, néha finoman márványozott rajzolatú. Az életkor előrehaladtával bizonyos geno-fenotípusos összefüggések kimutathatóvá válnak (pl. makuláris érintettség, vagy sárgás depozitumok megjelenése). (12) Előrehaladott stádiumban a szemfenéken egyre inkább az intraretinális, másnéven csontsejtszerű pigmentáció lesz a jellemző, ennek oka a fotoreceptor sejtek progresszív pusztulása.

A diagnózisban alapvető a Gf-ERG, mely 1 éves korban már típusosan kioltott. Az ideghártya elektromos csendje (sem szkotópikus, sem fotópikus, sem maximális válasz nincs) valamint az igen rossz látásfunkció alapján a klasszikus (1-típusú) LCA *veleszületett, stationer csap-pálcika disztrófiának* felel meg. Ezt erősíti meg az az elsőre talán furcsa tény is, hogy a szinte teljes látáshiány ellenére, a gyermek mégis fényérzékeny, mint ahogy a csapfunkció hiányára ez jellemző. A „stationer” jelző nem a folyamat benignus jellegére utal, hanem arra, hogy az igen gyenge látásteljesítmény tovább nem tud romlani.

A retina elektromos tevékenységének hiányát először Francescetti és Dieterlé írta le és ismerte fel fontosságát a diagnózis felállításában. (13)

I.1.2.2. 2-es típusú LCA vagy EORD (pálcika-csap típusú betegség)

Az első tünet a niktalópia, mely lassan kezdődik, többnyire a sötétben való rossz tájékozódás tűnik fel a szülőknél, általában az első 2-3 életévben, néha az első évtizedben.

A centrális látás általában még hosszú ideig relatív jó (1.0 -1.3 Log_{MAR} / BCVA 0.05-0.1), azonban idővel ez is progresszív romlik (14). A kereső nystagmus nem jellemző. A szemfenéki kép általában nem jellegzetes, később szintén a pigmentdepozitumok progressziója a tipikus. A Gf-ERG szkotopikus válasza csökkent, de még felismerhető, később kioltottá válik. Ez alapján a pontos diagnózis *korai életkorban kezdődő, progresszív* (súlyos.”severe”) *pálcika-csap disztrófia*. A szakirodalomban elfogadott egyik elnevezés ennek angol nyelvű rövidítése: early onset severe retinal dystrophy, EORD.

A magyar nyelvű szakirodalmat áttekintve, RP-val kapcsolatos közlemény a „Szemészet”-ben 1992-ben jelent meg Szücs és Janáki szerzőktől, mely a dél-alföldi betegek szocioepidemiológiai helyzetét elemzi. (15) Kusnyerik az Orvosi Hetilapban az előrehaladott RP betegek terápiás vonatkozásáról közölt közleményt valamint PhD értekezésének témája is ez. (16, 17)

Molnár Kálmán a retina disztrófiák esetleges immunpatomechanizmusáról jelentetett meg közleményt a „Szemészet”-ben. (18)

Saját vizsgálataink előtt magyar LCA illetve EORD betegekről nem történt vizsgálat illetve nem jelent meg közlemény.

I.2. Differenciál diagnózis

I.2.1. Retinitis pigmentosa

I.2.1.1. Szindrómás RP

Szindrómás RP-ban a szemén kívül valamely más szerv(rendszer) is érintett, ez az összes RP eset kb. 20-30 %-a. A leggyakoribb az Usher szindróma és a Bardet-Biedl szindróma.

- *Usher szindrómában* a RD neurosensoros hallászavarral jár együtt, az autoszomális recesszív RP-k kb. 20-40%-ában, az összes RP eset kb. 10-20%-ában áll fenn. A hallászavar általában megelőzi a szemészeti tünetek kezdetét. (2, 3, 5)

- *Bardet-Biedl szindróma*: ritka, obesitással, kognitív zavarral, polydactyliával, hipogonadizmussal és veseérintettséggel jár, az összes RP kb. 5-6%-a. (2, 3)

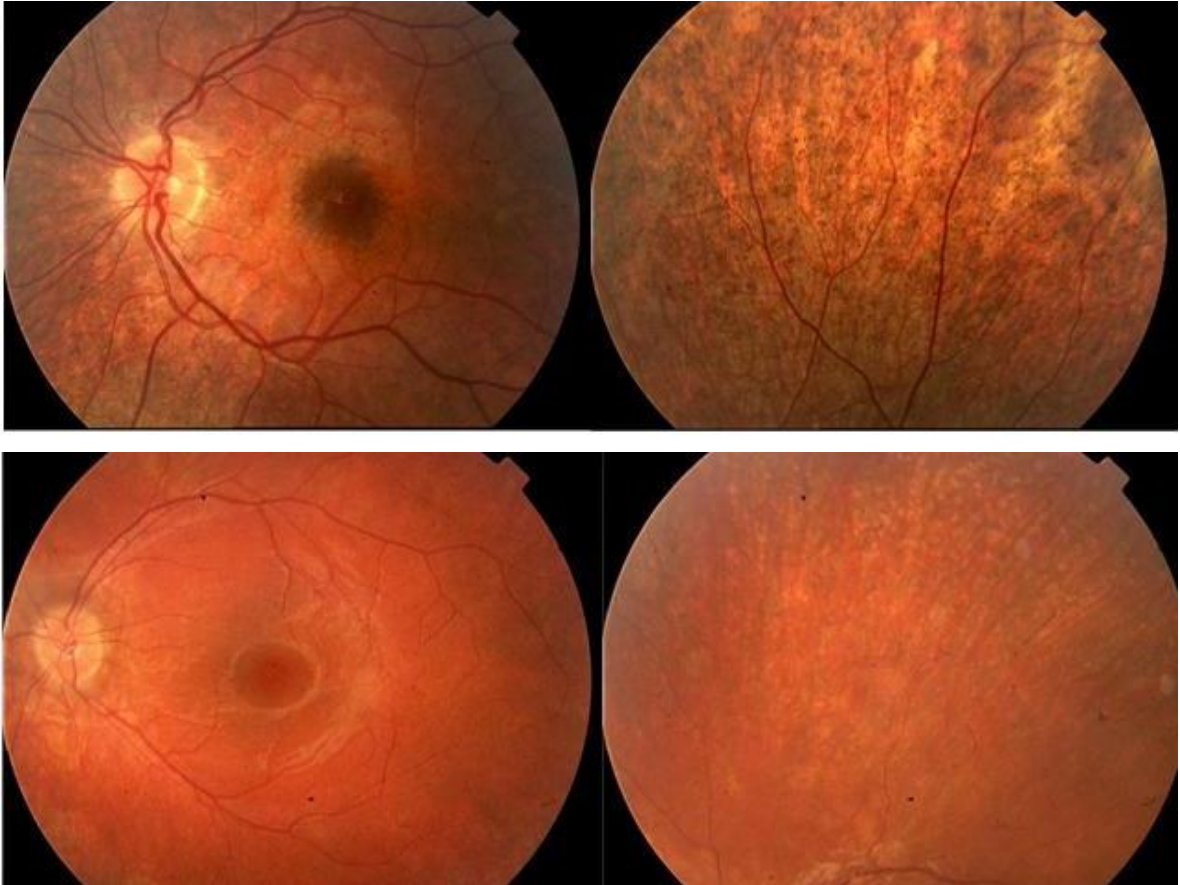
Az abétalipoproteinémia és a Refsum betegségek háttérében anyagcserezavar áll, a korai felismerés jelentőségét az adja, hogy megfelelő diétával a látásromlás megelőzhető ill. lassítható. (2, 3, 5)

- *Bassen-Kronzweig betegség, (abétalipoproteinémia)*: progresszív ataxia, steatorrhea, csökkent plazma lipid szint és RP. (2, 3, 5)

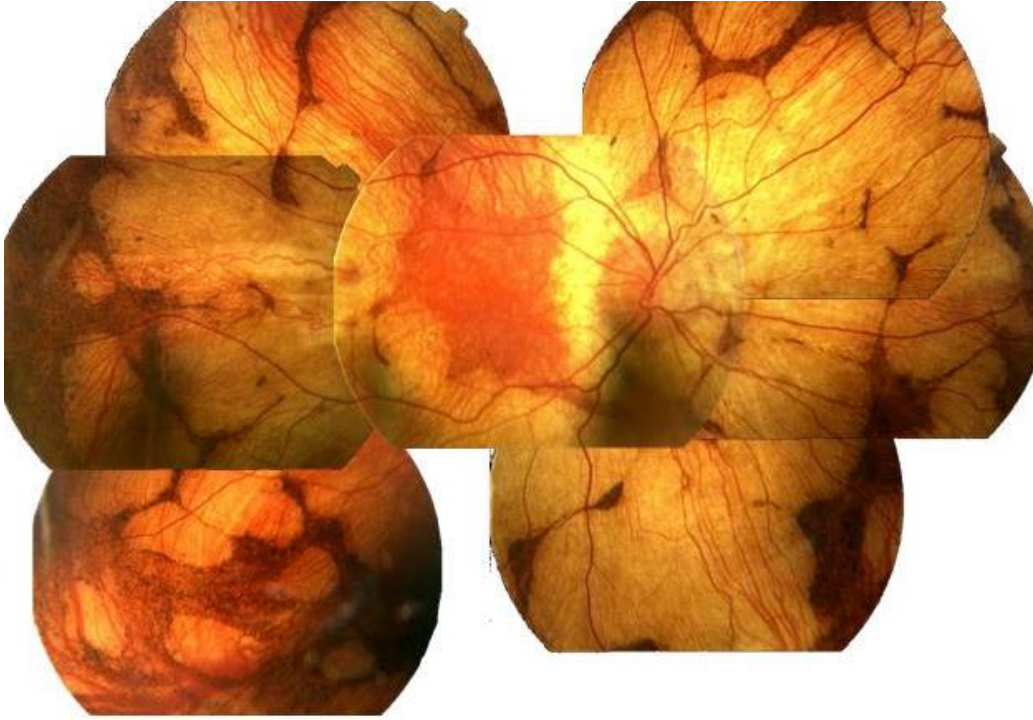
- *Refsum-betegség*: fitánsav-oxidáz enzim deficiencia, tünetei: emelkedett fitánsav szint, anosmia, sükettség, RP. (2, 3, 5)

I.2.1.2. Egyéb progresszív niktalópiával járó RD: chorioiderémia (CHM),

A CHM (**OMIM 303100**) X- kromoszómához kötötten öröklődik, így elsősorban az X kromoszómához kötötten öröklődő RP-től (XL-RP) kell megkülönböztetni. Ez gyakorlati szempontból is fontos, mert az XL-RP hosszútávon az életminőséget sokkal inkább befolyásolja, mint a CHM: CHM-ben a centrális reziduális látótér szigeten belül a látóélesség előrehaladott (60 éves) kor körül is megmarad, addig XL-RP-ben a centrális látás már fiatal korban romlik. (19, 20) Kezdeti stádiumban, 10 éves kor körül még nem lehet a két kórképet elkülöníteni, sem a Gf.-ERG, sem a szemfenék alapján. (5. ábra) Segítséget nyújthat a család hordozó nőtagjainak szemfenék vizsgálata, mely CHM-ban általában finom diffúz szemcsézett pigmentációt és enyhe pigmentkikopásokat mutathat, hasonlóan a manifeszt betegség korai stádiumához. (7. ábra) Fiatal felnőtt korban már jellegzetes a CHM-ben szenvedő beteg szemfenéki képe.



5. ábra. *Felső sor:* Choroideremiás beteg bal szemének a szemfenéki képe. A 8 éves betegben ép látóidegfő, normális tágasságú erek, a retinán diffúzan molyrágásszerű szemcsés pigmenteltérés figyelhető meg, mely utóbbi az első manifest retinális elváltozás. *Alsó sor:* X-hez kötött Retinitis pigmentosa képe. A 10 éves betegben a papilla élesszélű, a periférián szemcsés mintázat, pigmentkikopás, illetve –zavar látható. A képek a szerző saját anyagából származnak.



6. ábra. CHM-ben szenvedő fiatal férfi szemfenéki képe. Az érintett területen diffúz, teljes chorioideális atrófia, ívelt éles széllel. A kép a szerző saját beteganyagából származik.



7. ábra. 46 éves CHM hordozó nő bal szemének szemfenéki képe, aki a 6. ábrán látható beteg édesanyja. A hátsó pólus (balra) és perifériás retina (jobbra). Diffúz, szabálytalan elrendeződésű hiperpigmentált területek, némi granuláris jelleggel. A hátsó póluson világosabb foltozottság.

I.2.1.3. Nem progresszív, niktalópiával járó kórképek

Veleszületett stationer éjszakai vakság, (Congenital Stationary Night Blindness, **CSNB**): általában gyermekkorban kezdődik, több öröklésmenete lehet. A szemfenéki kép nem jellegzetes, az elkülönítésben a Gf-ERG fontos, ugyanis egyes formákban az ún. negatív típusú ERG (normális nagyságú szkotopikus „a” hullám mellett csökkent szkotopikus „b” hullám) jellemző. (21)

I.2.2. LCA és EORD differenciál diagnosztikája

I.2.2.1. 1-es típusú LCA

Az 1-es típusú LCA-t a „vizuális viselkedés hiánya” jellemzi, ezért a klinikai tünetek alapján tapasztalt szemorvos számára, megfelelő irányultság esetén a diagnózis felmerül. (6, 9, 11, 12) Elsősorban az *achromatopsiától* (OMIM:216900) kell elkülöníteni, mivel mindkettő veleszületett állapot és jellegzetes klinikai tünete a fotoaverzió. A látóélesség ugyancsak csökkent, az öröklésmenet szintén AR. A differenciál diagnosztikában alapvető a Gf-ERG: achromatopsiában a szkotopikus válasz elvezethető, fotopikus válasz nagyfokban csökkent vagy hiányzik.

I.2.2.2. EORD (2-es típusú LCA)

Az EORD (2-es típusú LCA) elkülönítésében minden gyermekkorban kezdődő niktalópiával járó kórkép (CSNB, CHM, XL-RP) szóba jön. A gyakori nystagmus-micronystagmus EORD-ben jellemző, a többi kórképben nem. A családfa elemzés az X kromoszómához kötött kórképektől (CSNB egyes típusai, XLRP, CHM) való elkülönítést megkönnyíti, mert az EORD-hoz tartozó kórképek AR módon öröklődnek. Az első szemfenéki elváltozás jellemzően a perifériás retina só-bors jellegű fokozott szemcsézett mintázata CHM és XLRP-ben, de előfordulhat EORD-ban is. A Gf-ERG jellemzően 7-8 éves korban már kioltott mind CHM-ban, mind XL-RP-ben, hasonlóan az EORD-hoz. A CSNB egyes formáitól, azok jellegzetes Gf-ERG eltérései alapján a korai életkorban kezdődő retina disztrófiák biztonsággal eldifferenciálhatóak.

I.3. Retina disztrófiák – genetikai vonatkozások

I.3.1. Retinitis pigmentosa

Régóta ismert, hogy egyes RD-k családi halmozódást mutatnak, más esetek sporadikusak.

Az első direkt összefüggést egy adott RD-fenotípus és egy adott genetikai elváltozás között 1984-ben Bhattacharya és munkacsoportja közölte, akik az XLRP és az X kromoszóma rövid karján egy adott polimorfizmus között szoros összefüggést találtak. (22) 1990-ben Dryja és munkatársai a 3-as kromoszóma hosszú karján egy pontmutációt írtak le AD-RP-ban. (23)

Ezt követően a RD-k genetikai diagnosztikájában óriási fejlődés következett: az identifikált RD gének száma 2006-ban már 120-nál, 2013-ban már 300-nál is több volt. (24, 25). A klinikai gyakorlatban a sporadikus formák genetikai hátterének tisztázása a legnagyobb kihívás, ami az összes nem szindrómás RP esetek kb. 50%-a.

I.3.2. LCA - genetikai vonatkozások

A veleszületett vagy korai életkorban kezdődő formákban a klinikai diagnózishoz alapvető a Gf-ERG, azonban ma már a definitív diagnózishoz hozzátartozik a kóroki mutáció azonosítása is. Ennek jelentősége a genetikai alapú terápiás lehetőségek bővülésével egyre növekedni fog.

Az LCA-EORD általában AR módon öröklődnek, típusosan két tünetmentes, jó látású szülőnek születik egy érintett gyermeke. A klinikai tünetek első leírásától kb. 130 év telt el, míg LCA-s betegekben az első asszociált gént azonosította egy francia munkacsoport 1996-ban: ez a *retinális guanyl cikláz 2D*, (*GUCY2D*). (26) 2017-ig 20 különböző gént identifikáltak, melyek génhibája vagy mutációja felelős az LCA fenotípus kialakulásáért. (27, 28)

I.3.2.1 Klasszikus LCA

A **klasszikus LCA-ban** azonosított gyakoribb, így korábban identifikált felelős gének a következők: *aryl-hydrocarbon receptor interacting protein like 1 (AIPL1)* (29) (első közlés: Sohocki 2000), *GUCY2D* (24) (első közlés:Perrault 1996), a *retinitis*

pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 (RPGRIP1) (30) (első közlés: Dryja, 2001) és a *centrosomal protein 290 (CEP290)* (31) (első közlés: den Hollander 2006). Ezt követte még 7 további kóroki gén azonosítása, jellemzően mindegyik az összes LCA esetek kb.1-2%-ában és többnyire olyan családokban, ahol a szülők között vérrokonság áll fenn. Ezen ritkább gének a következők: *cone-rod homeobox (CRX)*, az I. típusú LCA esetek kb. 1-3%-ában találták (RETNET, 6).

A *retinal degeneration 3 (RD3)*-at egy indiai testvérpárnál azonosították először, a leírás szerint látásuk születéstől kezdve nagyon gyenge volt. (32)

A *calcium binding protein 4 (CABP4)* gén mutációját egy vérrokon beduin család 4 tagjában azonosították, akiknél LCA szerű fenotípust írtak le. (33) Az *IQ motif containing B1 (IQCB1)* gén, másik neve: NPHP5, itt az első 11 közölt esetből 4-nél klasszikus 1-es típusú LCA alakult ki, míg 7-nél veseelégtelenség is társult a szemészeti tünetekhez (Senior-Loken syndrome). (34)

A *Kalium channel inwardly rectifying subunit (KCNJ13)* gént, mint kóroki tényezőt összesen három betegben mutatták ki, egy testvérpárban egy vérrokon közel-keleti családban és egy nem rokonházasságból született simplex esetben. Az LCA tünetei nem sokkal a születés után már láthatóak voltak. 32-34 éves korukra a vizuális teljesítmény 1,5-2,0 LogMAR volt. (BCVA: 0.01 -0.04). (35)

A *Lebercillin (LCA5)* a fotoreceptor ún „connecting cilium”-ában található fehérje, melynek mutációját összesen 18, súlyos LCA fenotípusú betegben találták, legtöbbször a fehérjét csonkoló mutációval. (36, 37) A *Nicotinamide nucleotide adenyltransferase 1 (NMNAT1)* enzim defektusát szintén kevés, de súlyos, a centrális retina korai atrófiájával járó LCA fenotípusú betegben írták le. (38)

I.3.2.2. EORD

EORD-ban a korábban azonosított gének a következők: *Crumbs homologue 1 (CRB1)*, (első közlés den Hollander, 2001, Lotery 2001) (39, 40), *retinal pigment epithelium-specific 65 kD protein (RPE65)*, (első közlés: Marlhens 1997, (41), *retinol-dehydrogenase -12 (RDH12)* (első közlés: Janecke 2004) (42), valamint a *tubby-like protein 1 (TULP1)* (43). A későbbiekben még legalább 4 további olyan gént fedeztek fel, mely EORD kialakulásáért felelős, ezek a következők: *lecithin retinol acetyl transferáz (LRAT)* (első közlés: Thompson, 2001) (44), *MERTK*: (első közlés: Issa P.

Ch, 2009) egy vérrokon marokkói család 5 érintett gyermekében írták le, 5 éves kor körül még „némi használható látással”. A tünetek kezdete az első életév volt, a családban egy homozigóta mutációt azonosítottak. (45). A *Spermatogenesis associated protein 7 (SPATA7)*-hez asszociált EORD-t 2010-ben közölte Perrault és munkacsoportja. (46)

A várható genotípus megítélésében a klinikai kép sokat segíthet, ismerve a látási teljesítményt, szemfenéki képet, OCT leletet és az esetleges progresszió fennállását vagy hiányát: a 20/50-nél jobb látóélesség leginkább CRB1, LRAT, RPE65 géndefektusra utal, hasonlóan az átmeneti szubjektív javulás, majd csak ezt követő romlás jelenségéhez. A látásfunkció a klasszikus LCA csoportban az AIPL1 és RPGRIP1 génhez kötött kórképekben a kezdetihez képest tovább romlik, esetenként a fénysejtés vagy fényérzés nélküli állapotig, míg a CEP290- és GUCY2D-asszociált LCA-ra a súlyos, de stabil látásdefektus a jellemző.

I.4. Patomechanizmusok, az azonosított gének normál szerepe

I.4.1. Retinitis pigmentosa

Legalább három, egymástól független, a retina működésének szempontjából fontos mechanizmus lehet érintett: 1./ pálcikák külső tagjának (ROS) korongjainak megújulása illetve leválása 2./ a fototranszdukciós kaszkád 3./ az A-vitamin/ retinol anyagcsere (vizuális ciklus). (1)

I.4.2. LCA-EORD

Az eddig azonosított kauzatív gének illetve fehérjék mindegyike alapvetően szükséges a retina normális működéséhez, hibás működésük hét különböző retinális folyamatot érinthet. (28)

1./ Fototranszdukciós kaszkád: enzimatisz láncreakció, melyet a retinát érő foton indít be. A fototranszdukciót érintő LCA gének a *GUCY2D*, az *AIPL1* és az *RD3*. „Hiba” esetén a fotoreceptor ioncsatornája záródik és az folyamatos hiperpolarizált állapotba kerül és elpusztul.

2./ A Retinoid ciklus: (A vitamin anyagcsere) folyamata során az all-transz-retinal – 11-cisz retinallá alakul át, azt ezt követő reakciók sorozata a rodopszin regenerálódását teszi lehetővé. A retinoid ciklust érintő LCA gének a *RPE65*, a *LRAT* és az *RDH12*.

3./ Retinális transzkripciós faktor(ok): *CRX*

4./ Interflagelláris transzport folyamatot érintő RD-k (ciliopathiák, melyekben a fotoreceptor belső (IS) és külső (OS) tagja közötti fehérje szállítás érintett. (*SPATA7*, *LCA5*, *RPGRIP1*, *CEP290*, *TULP1*, *stb*)

5./ Fotoreceptor morfogenezis (*CRB1*, *PRPH2*, utóbbi neve korábban *RDS/periferin*)

6. / Metabolikus enzimek, sejtűléés: (*IMPDH1*, *NMNAT1*)

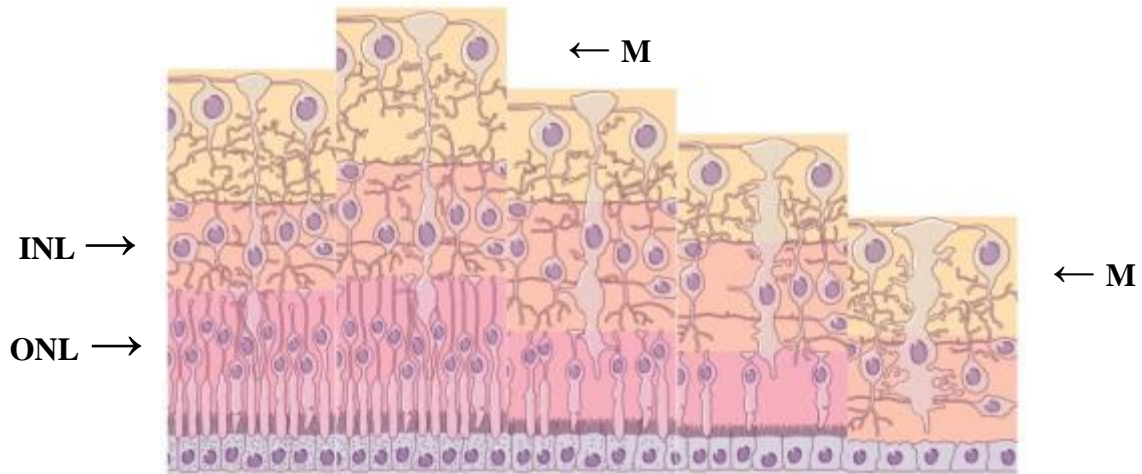
7./ Fotoreceptor ioncsatornák érintettsége , pl. mint *KCNJ13* esetében a K ioncsatornáké.

I.5. A retina disztrófiák szövettani vonatkozásai

Ezen betegség csoportban érhetően kevés szövettani vizsgálatra van lehetőség, ha igen, akkor is általában előrehaladott állapotú szemeken. További nehézségek a retina postmortem autolízise és a metszetkészítés során keletkező artefaktumok. (47)

I.5.1. A retinitis pigmentosa szövettani jellemzői

A retina külső magvas rétege (ONL) a pálcikák és csapok sejtmagvaiból áll. A legelső szövettani elváltozás egybehangozóan a fotoreceptor réteg (pálcikák) külső szegmentjének (rod outer segment, ROS) megrövidülése, öröklésmentől függetlenül, minden típusú retina disztrófiában. Szintén korai jel a külső magvas réteg elvékonyodása, benne a sejtmagok számának jelentős csökkenésével az egészséges szemekhez képest. (47, 48) A belső magvas réteg (inner nuclear layer, INL), mely amakrin, bipoláris és horizontális sejtekből áll, valamint a ggl-sejt réteg is, általában jobban megtartott: Santos és mtsai 21 postmortem vizsgált szem maculájának metszeteit elemezték és súlyos RP-ben az INL sejteinek 78%-át intaktnak találták.(48) A betegség késői stádiumában ezek is degenerálódhatnak.



8. ábra. A retinitis pigmentosa stádiumai. A kórfolyamat előrehaladtával az ONL (fotoreceptor réteg) elvékonyodik, majd végleg eltűnik. A retina teljes vastagsága is csökken, egyidejűleg a Müller sejtek (M), (sejtmag a belső magvas rétegben, INL) hipertrofiája is megfigyelhető. (49)

A retina 3 féle glia sejtípust is tartalmaz, melyek sejtteste szintén az INL-ben van. Ezek a Müller sejtek, a microglia és az astrocyták. A Müller sejtek vertikális nyúlványai alkotják a külső (OLM) és belső (ILM) határhártyát, míg az astrocyták a retinális idegrost rétegre korlátozódnak. Hisztológiai szempontból a belső magvas réteg relatív morfológiai megőrzöttségéhez a gliasejtek megléte illetve reaktív változása is hozzájárulhat. (47, 48)

A perifériás pálcikák axon szerű nyúlványokat növesztenek a belső retina irányába és az ILM körül végződnek ahol a Müller sejtekkel képeznek kapcsolatot, nem pedig a belső magvas rétegben található horizontális és bipoláris sejtekkel képeznek szinapszist. Elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint ez a kapcsolat nem valódi szinapszis. (47,50) A Müller sejtek a fotoreceptorok apoptózisa után hipertrofizálnak és esetenként a szomszédos sejtek nagyobb vertikális glia oszloppá olvadnak össze. (47, 50, 51) Előrehaladott esetben a perifériás retinában mind a pálcikák, mind a csapok eltűnnek, a maculában csak egy csap monolayer van. (48, 50) A fotoreceptorok helyét megvastagodott Müller sejt nyúlványok veszik át. A ganglion sejtek nagy része elpusztult, míg az INL magjai elsősorban a hiperpláziás astrocytáktól származnak. A

proliferált astrocyták jellemzően a papilla elülső-felső részén és a peripapilláris retinán epiretinális membránképződéshez vezethetnek.

I.5.2. Az LCA-EORD szövettani jellemzői

Az irodalomban összesen 13 LCA szerű fenotípusú esetet közöltek, melyben a szemgolyó postmortem szövettani vizsgálaton esett át. Az esetek, egy kivételével már felnőtt korban kerületek vizsgálatra, így nagyrészt szekunder változások figyelhetők meg. A betegek nagy részének nem ismert a genotípusa. A leggyakoribb elváltozások a fotoreceptor réteg, a belső retina és a pigmenthám atrófiája és gliózisa volt. (11) Három esetben ismeretlen genotípusú betegekben a retina a fotoreceptorok teljes hiányát mutatta, primitív köb-jellegű sejtekkel, egy esetben a fotoreceptor réteg megrövidülését találták. (11)

I.6. Állatmodellek, állatkísérletek, humán terápiás lehetőségek

A molekuláris szintű patomechanizmusok megismerésével elméletileg új terápiás lehetőségek nyíltak, melynek célja a „hibás genetikai folyamat kijavítása”, ezt nevezzük génterápiának. (52)

Számos LCA-EORD- fenotípusú állatfaj ismert, mind természetes variánsok, mind mesterségesen „előállított” állattörzsek formájában. Ismert a spontán RPE65 mutációt hordozó Briard kutya és egy spontán CEP290 mutációt hordozó macska törzs is. (53, 54) Jelen munkámban említésre méltó három mesterséges egértörzs, az ún. „rd8”, mely CRB1 géndeficienciát hordoz, az „rd16” egér, melyben egy CEP290 mutáció található és egy AIPL1-deficiens egértörzs is, mivel saját humán LCA-EORD beteganyagunkban ennek a három génnek a mutációit azonosítottuk és humán szövettani vizsgálati eredmény ez idáig az ilyen betegekben nem ismeretes. (56, 57, 58) Az állatkísérletes megfigyelések és emberben a genetikai szubtypusok identifikálása fontos a hosszú távú spontán lefolyás megismeréséhez, mely a jövőben esetleg segíthet a legjobb terápia ideális idejének meghatározásában is.

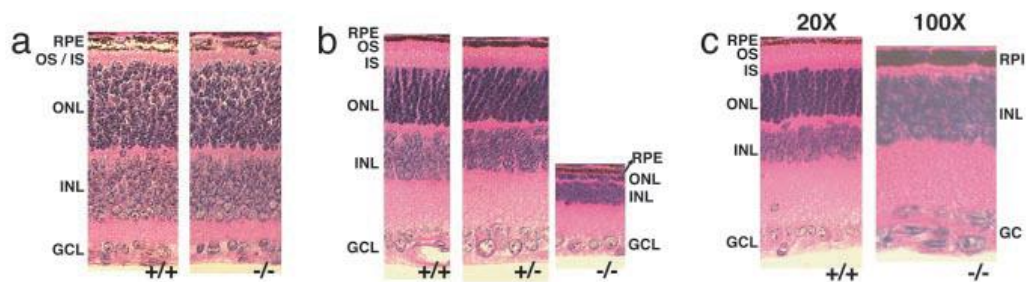
Az eddig ismert terápiás lehetőségek: 1. **farmakoterápia** (RPE65, 9-cisz retinoid **szubsztitúció**). A hibás / hiányzó termék pótlása csak a vizuális ciklust érintő RD-kban

jön szóba, de ismerete ezen kevés beteg számára fontos. (58) A 2. terápia típus a **gén „replacement”** (ha a retina/ makula szerkezete megtartott), a 3. az **őssejt terápia**: a./ ha a retina (fotoreceptor) fejlődési zavara áll fenn (AIPL1, CRX) vagy b./ ha a terápia kezdete előtt a fotoreceptor réteg tönkrement. (59)

I.6.1. Spontán lefolyás különböző géndefektusú állatmodellekben

I.6.1.1. AIPL1 knock-out egér

Az **AIPL1 knock-out** egérben gyors és teljes pálcika és csap degeneráció következik be már a 4 hetes állatokban (57) A szövettani képeken (HE festés) látható, hogy a kontroll (vad típus) egérben (9/a. ábra, +/+) és az érintett (-/-) egérben a retina rétegeinek vastagsága születéskor nem különbözik. A postnatalis 18 napon (9/b. ábra) a (-/-) retinában az ONL csak egy vékony monolayerként ábrázolódik a gyors degeneráció eredményeként. A 30 napon (9/c. ábra, 100x nagyítás) az ONL eltűnt, míg 20x nagyítással a kontrollban jól elkülönül a INL és az ONL



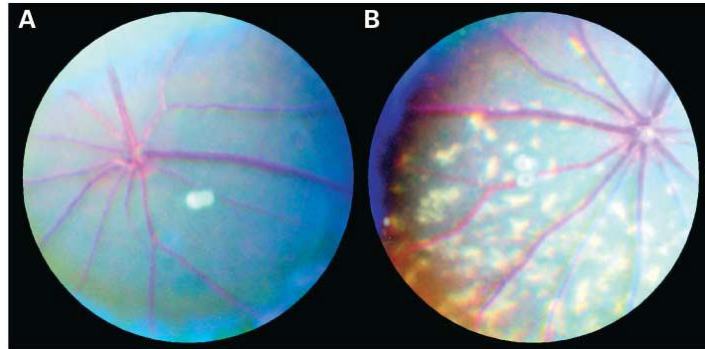
9. ábra. AIPL1 gén deficiens egér retinájának szövettani képe, hematoxylin-eosin (HE) festéssel. a. kezdeti állapot, b: 18. életnap, c: 30 életnap

+/+ : vad típus +/- : heterozigóta -/- : homozigóta knock-out (57)

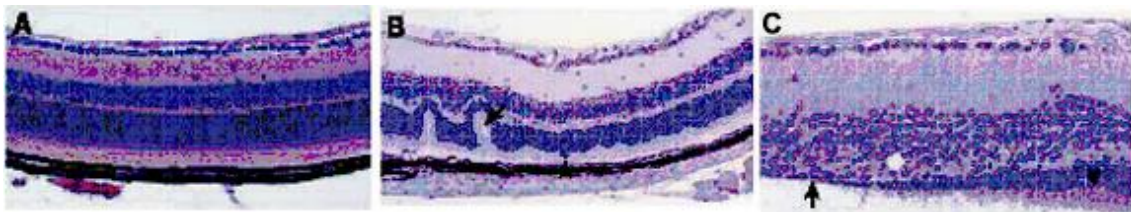
Adeno-asszociált vírus vektor mediált gén suppletációval az *AIPL1-knock-out* egérben, a terápiát újszülött korban elkezdve a retina szerkezetének átalakulását szignifikáns módon meg lehetett akadályozni. (60, 61)

I.6.1.2. „rd8” (CRB1 deficiens) egér

Az **rd8 (CRB1 deficiens) egér** szemfenekén diffúzan, szabálytalan elrendezésben fehér pöttyök láthatóak, ez hasonló a humán fenotípushoz.



10. ábra. CRB1 gén deficiens egér szemfenéki képe. A: egészséges kontroll. B: érintett egér: diffúz multiplex sárga depozitumok. (55)



11. ábra. CRB1 gén deficiens egér és egészséges kontroll egér retinája, szövettani kép, HE-festés.

A. *Egészséges kontroll egér* retina szövettani képe, jól elkülöníthető retina rétegek

B. *rd8 egér* retina szövettani képe. Fokálisan dezorganizálódó retinális rétegek figyelhetők meg redőképződéssel a külső és belső magvas réteg határán (nyíl). A nyílfej a fotoreceptor réteg külső szegmentjében fokális elvékonyodást mutat.

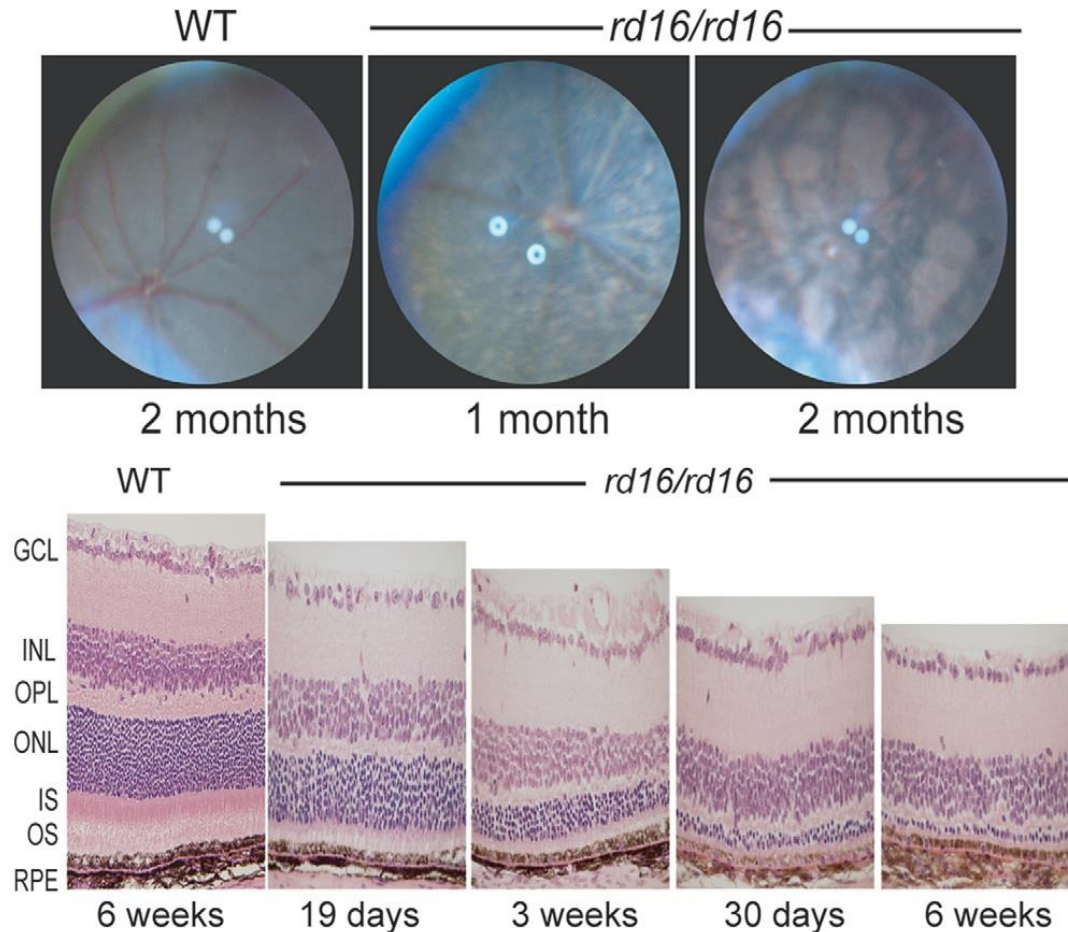
C. *rd8 idős egér* retina szövettani képe, nagyobb nagyítással készült kép, melyen jól látható a fotoreceptor pusztulás, a fotoreceptor réteg elvékonyodik.(55)

I.6.1.3. „rd16” (CEP290 deficiens) egér

Az „**rd16**” (CEP290 deficiens) egér 2006-ban került közlésre egy CEP290 géndeficiens egértörzs, melyben mind a szemfenéki kép, mind a szövettani vizsgálat a

retina gyorsan progrediáló degenerációját mutatja. (56) Ellentétben a rd8 (CRB1 mutáns) egerrel, ahol multiplex világos kerek pöttyök (depozitumok) vannak, az rd16 mutáns retináján nagyobb, összefolyó relatív élesszélű degeneratív területek láthatók.

(12. ábra)



12. ábra. CEP290 deficiens (Rd16) egér retina (*felső sor:*) Fundus fotó, baloldalon a kontroll, „vad típusú” egér, 2 hónapos kor. Középen: homozygóta mutáns egér retinája, 1 hónapos, korban. Jobb oldalon: homozygóta mutáns egér, 2 hónapos korban. Látható a retina degeneratív elváltozásainak progressziója.

Alsó sor: Szöveti kép, vad típus (WT) és rd16 egér retina: 19 napos korban az rd16 egér fotoreceptor IS/OS rétegének vastagsága nagyfokban csökkent. A külső magvas réteg (ONL) réteg vastagsága nem csökkent, de benne a sejtek denzitása igen. 3 hetes korban az OINL vastagsága már jelentősen csökkent. 30 napos mutáns egérben az IS/OS csak vékony sávként látható és a ONL vastagsága tovább csökkent. 6 hetesen az egész retina jelentősen vékonyabb, és a külső retina rétegek csak keskeny sávként ábrázolódnak. (56)

I.6.1.4. Macska model (CEP290 mutáns)

Spontán génmutációt hordozó egy abesszin macska törzs, melynek retinájában a pálcikák külső tagjának megrövidülését találták. (54)

I.6.1.5. Kutya (RPE65 mutáns)

A szakirodalomban kétféle **RPE65 mutáns** kutya ismert: a természetes mutáns „Briard kutya” és a RPE65 „knock out” kutya. A két különböző mutáns kutyatörzsben két különböző terápiát kísérletek meg, az egyikben intravitreális injekcióként AAV-ba ültetett kijavított RPE65 génszakasz, a másikban szubsztitúciós terápiaként ugyancsak intravitreális injekció formájában 9-cisz-retinalt juttattak az üvegtesti térbe. (58, 59) A javulást a pupilla reakció javulásában, a közlekedés biztonságában illetve az ERG válaszok változásában mérték le. Bár az esetszám mindkét kísérletben kicsi, az eredmények a szubsztitúciós terápia rövidebb ideig tartó hatását sejtetik. (58)

I.6.1.6. RPE65 knock out egér

RPE65 knock out egérben orális adminisztráció esetén hasonló eredményt tapasztaltak. (62)

I.6.2. Humán terápiás próbálkozások**I.6.2.1. Első humán klinikai kísérletek**

Az első humán klinikai kísérletek 2007-2008-ban történtek, egy pennsylvaniai, egy londoni és egy floridai munkacsoport közreműködésével, RPE65 deficiens, fiatal felnőttek esetében, 3-3-3, összesen 9 betegben. (59, 63 64) Az RPE65 génhez asszociált EORD-ra azért esett a választás, mert ebben az altípusban a retina rétegezettsége és sejtjei relatív megtartottak. A humán kísérleteket RPE65 deficiens kutyában és két egértörzsben végzett kísérletek előzték meg, jó eredménnyel. (59, 62) A terápia feltétele hogy a retinában a AAV-vektor „célsejtjei” jelen legyenek, ennek megfelelően előrehaladott degeneráció és aplasia esetén nem várható hatás a gén-„replacement”-tól. A kezelés célja a biokémiai defektus kijavítása, azáltal, hogy a vad-típusú RPE65 gént beültetjük, a génszakaszt helyettesítjük (gén-replacement) az érintett személy RPE sejtjeibe. A vektor rekombináns adeno-asszociált vírus (AAV), a beültetés standard vitreoretinális technikával, a szubretinális térbe adott injekcióval történt. Postoperatív

immunválaszról, egyéb adverz reakcióról nem számoltak be. Mindhárom csoport „bizonyos fokú” látásjavulásról és a pupilla reakció javulásáról számolt be. (59)

I.6.2.2. Mutációspezifikus, biotechnológiai alapú terápia a CEP290 gén leggyakoribb mutációjában, in vitro

Ezt az in vitro génterápiás lehetőséget két okból tartjuk említésre érdemesnek, az egyik ok, hogy ezen mutációt hordozza egyik saját LCA betegünk, a másik ok, hogy mutatja egy merőben új terápiás korszak kezdetét. A mutációt az Eredmények fejezetben részletesen leírjuk, melynek következtében egy aberráns exon épül be a CEP290 mRNSébe. A géntechnológiai módszer során rövid RNS molekulák, ún. antioligonukleotidok, (AON-ek) segítségével képesek a megváltozott exon-intron határt, így módon a mutáció okozta hibát kijavítani. A módszert in vitro, CEP290 mutációt hordozó betegek limfocita tenyészetében próbálták ki, azokat olyan AON-kal fertőzték, melyek ún. „cél nukleotid szakasza” az inzertálódott aberráns exon szakasz a mutáns CEP290 mRNS-be. Ezt követő PCR analízis bizonyította, hogy az AON-ok nagy számban beépültek és képesek voltak csaknem teljesen helyreállítani a normális splicing-ot. Fenti módszer mutatja, hogy az AON-ok potenciálisan képesek splice site defektusokat korrigálni azáltal, hogy blokkolják az aberráns splice site-ok felismerését, ezáltal elérhető velük a fehérje rövidülését okozó mutációkat tartalmazó exonok eliminálása.

Az AON alapú terápia pl. Duchanne féle izomatórófiában már humán Phasis I / II kísérletben van. Humán RD-ban intraokuláris injekcióként való alkalmazása jönne szóba, (ekkor ismételni kellene), vagy egyszeri szubretinális injekcióként vírusvektorba ültetve. (65)

A magyar nyelvű szakirodalmat áttekintve, RP-val kapcsolatos témájú közlemény 1992-ben jelent meg Szűcs és Janáky szerzőktől, a Szemészet folyóiratban, az RP szocioepidemiológiájáról, Kusnyerik számolt be előrehaladott stádiumú magyar RP betegek szemébe szubretinális implantatum beültetéséről valamint Molnár Kálmán közölt cikket a retinitis pigmentosa esetleges immunpatológiai eredetéről. (15, 16, 17, 18).

Saját vizsgálataink előtt magyar LCA illetve EORD betegekről nem történt vizsgálat illetve nem jelent meg közlemény.

II. Célkitűzések

A retina disztrófiás betegek életminőségét nagyfokban befolyásolja, hogy előrehaladott stádiumban a centrális látás megmarad-e illetve a makula morfológiája és működése mennyire romlik. A centrális retina finomszerkezetét az excentricitás függvényében előttünk nem tanulmányozták in vivo.

II.1. Retinitis pigmentosa (RP) betegek

Az RP betegekben elsődlegesen a külső retina rétegek érintettek és a RP dominálón a perifériás retina betegsége, ennek megfelelően várhatóan a makuláris régióban is a perifériás terület érintett kifejezettebben.

Arra kerestük a választ, hogy az OCT képek szegmentációs analízise alkalmas-e az intraretinális szerkezeti változások topografikus, excentricitástól függő kimutatására.

Céljaink a következők voltak:

1. Az előrehaladott retinitis pigmentosás betegek esetében vizsgálni a makula szerkezetét, az egyes intraretinális rétegek vastagságbeli változását az excentricitás és a funkció függvényében. A betegek eredményeit egészséges kontrollok eredményeivel hasonlítottuk össze;
2. Megvizsgálni, hogy a makula rétegeinek vastagsági változásai hogyan függenek össze a funkcióval, vagyis van-e különbség a még elektromos aktivitást mutató és már kioltott centrális retinogrammú makulák intraretinális szerkezetében;
3. Arra is kerestük a választ, hogy a perifériás makuláris rétegek vastagságbeli változása nagyobb mértékű-e, mint a centrálisabb rétegeké;
4. Megfigyelni, hogy a makula külső rétegeinek vastagságbeli változása kifejezettebb-e, mint a belső retina rétegeké.

II.2. Magyar LCA-EORD betegek

Tudomásunk szerint előttünk még nem vizsgálták a magyar LCA-EORD betegeket, ezért célul tűztük ki ezen betegek felkeresését és modern klinikai eszközökkel és genetikai módszerekkel történő vizsgálatát.

Célkitűzéseink az alábbiak voltak:

1. Az LCA-EORD betegek modern klinikai és genetikai módszerekkel történő vizsgálata;
2. A fenotípus pontos leírása;
3. A genotípus meghatározása, patogén mutációk kimutatása;
4. Az azonosított mutációk hatásának analízise: ismert mutációk esetén annak gyakoriságának leírása az adott szubtypusú LCA-ban;
5. Új mutációk keresése és azok hatásának „in silico” vizsgálata;
6. Saját betegeink genotípus-fenotípus összefüggésének összehasonlítása irodalmi adatokkal;
7. Saját LCA-ban szenvedő betegeink SD-OCT vizsgálata.

Stone egy nagyobb összefoglaló munkájában 600 feletti, nem csak a kaukázusi származású LCA beteg adatait analizálta és vizsgálata szerint az LCA-EORD betegekben azonosított mutációk illetve azok kombinációja (összetett heterozygóta) kb. 70%-ban egyedi. (66)

III. Betegek és módszerek

III.1. Betegek

Mind a felnőttkori, mind az LCA/EORD-ban szenvedő betegek klinikai vizsgálatai a Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinikáján történtek, a vizsgálati alanyok a Klinikán évek óta gondozott felnőtt retinitis pigmentosában szenvedő betegek és a Klinikára kivizsgálásra irányított vagy ott jelentkező retina disztrófiás gyermekek közül kerültek ki.

III.1.1. Retinitis pigmentosa betegek

2006. november és 2010. március között vizsgált RP betegek adatait retrospektíve vizsgáltuk. A retinitis pigmentosa diagnózis kritériumai a következők voltak: progresszív szürkületi látási nehezítettség, kétoldali szemfenéki érintettség, progresszív koncentrikus jellegű látótér szűkület, pálcika-csap mintázatú gf-ERG eltérés, atrófiás papilla és intraretinális csontsejt jellegű pigment kicsapódások. Olyan betegeket válogattunk be, akiknek ugyanazon vizit során történt OCT és mf-ERG vizsgálat is. Kizárási kritériumok voltak: bármely egyéb szemészeti betegség, glaucoma, látóideg betegség, egyéb általános betegség, kivéve a kezelt hipertóniát. Az OCT kép alapján a kizárási kritériumok voltak: 1. cisztoid makula ödéma (CMO), 2. epiretinális membrán (ERM) 3.. alacsony szignál erősség. 4. foveális decentráció. Utóbbi feltételeknek az 57 betegből 22 beteg 29 szeme felelt meg, ezeket vettük be a vizsgálatokba. A betegek közül 16 férfi és 6 nő volt, átlagéletkoruk 32 év (14-63).

A 22 betegből 10 sporadikus eset volt, egy AR, kettő autoszomális AD és egy X-kromoszómához kötött RP-ban szenvedett. Nyolc beteg családjában fordult már elő RP beteg, de definitív öröklésmentet nem lehetett megállapítani, megfelelő információ hiánya vagy a családtagok kevés száma miatt.

Kontroll csoportként a Szemészeti Klinika OCT laboratórium adatbázisából 17 egészséges egyén 17 véletlenszerűen választott szeme szolgált az OCT laboratórium adatbázisából. a kontrollok átlagéletkora 31 év (21-59 év) volt. A kontrollok

beválasztási kritériuma közé tartozott az 1,0 korrigált látóélesség, minden szemészeti, neurológiai és szisztémás betegségtől való mentesség,

Minden betegről írásbeli beleegyező nyilatkozatot kaptunk, a vizsgálatok a Helsinki Deklarációnak megfelelően történtek. A retrospektív vizsgálathoz nem volt szükség etikai engedélyre, Intézményi Beleegyező Nyilatkozatra.

III.1.2. LCA-EORD betegek

A Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinikáján 2005 óta összesen 14 LCA-EORD-ban szenvedő beteget (8 férfi, 6 nőnemű) vizsgáltunk, akik részben a gyermek ambulancián jelentkeztek, részben más szemészeti intézményből, részben magánrendelőből utaltak klinikánkra. A más intézményből érkező gyermekek egy részénél a diagnózis felállítására még kísérlet sem történt, egy részénél lezajlott szemfenéki gyulladást (inveterált chorioretinitist) feltételeztek vagy már komplex neurológiai kivizsgálás is történt, „ismeretlen eredetű” látászavar miatt. A klinikánkon való első vizsgálatkor a betegek életkora 6 hónap - 25 év között volt.

A látási teljesítmény minden betegben nagyfokban, de különböző mértékben (kml-0.3) csökkent volt. Minden betegre jellemző a különböző fokú, akarattól független szemmozgás (kereső nystagmus-mikronystagmus, fixálási képtelenség), a szemfenék azonban jelentősen eltérő képet mutatott. Az elvégzett Gf-ERG egy eset kivételével kioltott választ talált, mely az LCA-EORD diagnózisának megfelel. A nem kioltott Gf-ERG-jű betegben a maximális válasz kiefokban még kimutatható volt. Genetikai vizsgálat összesen 10 esetben történt, ebből három esetben egyik allélon sem sikerült mutációt azonosítani DNS microarray módszerével. Teljes klinikai és genetikai vizsgálat, pozitív eredménnyel (egy adott génben mindkét allélen kóros mutáció detektálása) összesen hat esetben történt, ezek ismertetése az értekezés LCA/EORD-vel foglalkozó fejezetének alapja.

A többi esetben vagy a beteg nem jelentkezett többet az első vizsgálat után, vagy nem egyezett bele a genetikai vizsgálatba vagy nem kérte, mivel jelenleg terápiás megoldást nem tudunk ígérni . A vizsgálatokhoz előzetesen etikai engedélyt kértünk, melynek száma 2605-3/2012/ EHR).

III.2. Klinikai vizsgálatok

III.2.1. Látóélesség vizsgálat

Minden betegnél elvégeztük az automata refraktometriás vizsgálatot, (Tomey RT-6000, Tomey Corporation, Nagoya, Japan), meghatároztuk a nyers és legjobb korrigált látóélességet.

III.2.1.1. Retinitis pigmentosa betegek

Retinitis pigmentosa betegek vizsgálatkor a legjobb korrigált látóélességét Schnellenn táblával vizsgáltuk, majd a kapott értéket \log_{MAR} értékre konvertáltuk.

III.2.1.2. LCA-EORD betegek

LCA-EORD betegek esetében a látási teljesítménye sokkal rosszabb volt, mint a felnőtt betegeké, 0,1-nél jobb BCVA-ja csak egy betegnek volt. A 0,1-nél rosszabb látóélességű gyermekek esetében 1 méterenként csökkenő távolságban vizsgáltuk az ujjolvasást, amennyiben a látási teljesítmény ennél is rosszabb volt, 50 cm-ről, 30 cm-ről majd 20 cm-ről nagy optotípust ábrázoló táblát mutattunk, jó megvilágítás mellett. Ennél is rosszabb látási teljesítmény esetén a beteg szeme előtti kézmozgást vagy nagyobb, színes tárgy (pl. játékmackó) felismerését vizsgáltuk. Az eredményeket \log_{MAR} értékben is meghatároztuk. (1. táblázat)

1. táblázat. A különböző módon meghatározott, egymással equivalens csökkent látóélesség értékek az alábbi táblázat szerint konvertálhatók. (68, 69)

\log_{MAR}	tört	decimális
1,4	20/500	0.04
1,6	20/800	0.025
1,8	20/1250	0.016
2,0	20/2000	0.01
2,3	20/4000	0.005
2,6	20/8000	0.0025
1,98 (szeou)	-	0.001
2,28 (kml)	-	0.005

III.2.2. Réslámpával történő vizsgálat

Pupillatágítást megelőzően minden beteg elülső szegmentjét biomikroszkóppal vizsgáltuk meg.

III.2.3. Szemfenék vizsgálat és szemfenéki fotodokumentáció

A pupillatágítást követően (0,5%-os cyclopentolát) a retinát 90 D-ás SuperField® Volk® lencsével néztük és a szemfenéki kép rögzítésére, nagy felbontású digitális fundus-kamerát használunk. A kamera a felvétel készítésekor 2-3 cm-re van a retinától, Az általunk használt készülék: Topcon TRC 5IX digitális retina Camera, IMAGEnet 2000 system softver (Tokyo, Japan).

III.2.4. Ganzfeld elektroretinográfia (Gf-ERG)

Mind a felnőttkori, mind az LCA-EORD betegeknél alapvető diagnosztikus módszer, mely a retina fényingerre adott válaszát objektív módon detektálja. A klasszikus Ganzfeld (Gf)- ERG /angol nyelvű irodalomban full-field (ff)-ERG/ a fotoreceptor réteg és a belső retina rétegeinek szummált működését vizsgálja, a retina egész területéről ad információt. Az elvezetett válaszok mértékegysége a mikrovolt (μV). A Gf-ERG alkalmas annak eldöntésére, hogy melyik fotoreceptor típus érintett ill. érintett dominálón. Gyermekben a kioltott Gf-ERG Leber-féle kongenitális amaurozist igazol.

Betegeink Gf-ERG vizsgálatát a SE Szemészeti Klinikájának Elektrofiziológiai Laboratóriumában végeztük, szóbeli és írásbeli felvilágosítás valamint beleegyező nyilatkozat aláírása után (gyermek esetében a nyilatkozatot a Szülő írta alá).

A pupillák tágítása Cyclopent (cyclopentolát) szemcseppel történt. Az inaktív (referens) elektródát a külső szemzug közelében a bőrre, a földelő elektródát a homlokbőrre helyeztük. Aktív (differens) elektródként felnőtteknél „ERG-jet” kontaktlencse elektródákat, gyermekeknél. DTL/ gold-foil elektródákat használtunk A vizsgálat elkezdése előtt a kötőhártyaszákba Humacain (oxybuprocain) szemcseppet cseppentettünk

Az alkalmazott ERG-készülék felnőttekben a Roland Consult cég (Brandenburg, Wiesbaden, Németország) Retiport készüléke, gyermekekben a Thomey cég hordozható ERG készüléke volt. A készülék beállításai az ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) által meghatározott standardok szerint történtek. (70)

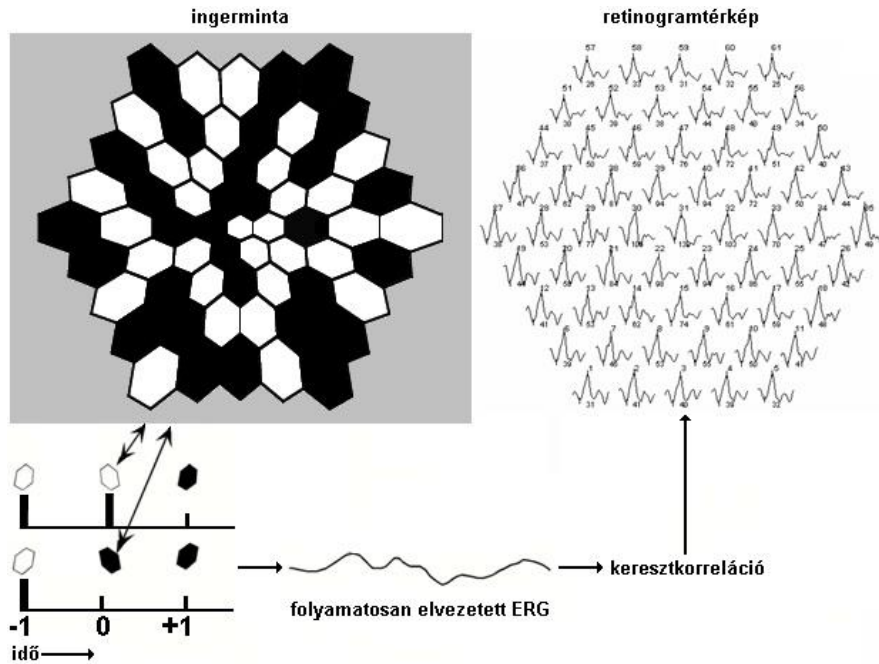
Szkotopikus körülmények között, 30 perc sötétadaptáció után a pálcikaműködés vizsgálható, ez az ún. szkotopikus válasz. Ingerként három gyenge (0.01 cd-s/m² vagy: -2,5 log units) majd három erős (3.0 cd-s/ m² vagy: +0,6 log units) fehér fényvillanás szolgál, az első kizárólag a pálcikákat, utóbbiak (korábban ún. maximális válasz, mai nomenklátúra szerint „standard combined” válasz”) a csapokat is ingerlik. Legvégül ismét három villanás (3.0 cd-s/m²) következik, mely az un. „oscillatórikus potenciálok”-at detektálja, melyek a maximális válasz „b” hullámának felszálló ágán látható számos hullám. Az oscillatórikus potenciálok a retina belső rétegeinek állapotát reprezentálják.

Fotopikus körülmények között, 10 perc világos adaptáció után a csapok szummált működését vizsgálja (ún. „fotopikus válasz”). Ingerként egyszeri diffúz fehér fényvillanás, majd 30 Hz frekvenciájú „flicker” fényingerlést alkalmazunk. A pálcikák refrakter ideje kb. 50 msec, ennek megfelelően az adott válasz csak a csapoktól származik.

III.2.5. Multifokális elektroretinográfia (mf-ERG)

A mf-ERG fotopikus körülmények között a centrális retina funkciójának topográfiai megítélésére alkalmas, noninvazív, objektív vizsgáló módszer. (71) Segítségével kisebb működő retina terület (pl: előrehaladott RP esetében a reziduális centrális funkció), vagy fokális területen funkcióromlás (pl: X kromoszómához kötött retina disztrófia hordozó állapota) mutatható ki illetve a centrális 30 fokos retina terület funkcióváltozása követhető. A vizsgálatokat a Roland Consult cég (Brandenburg, Wiesbaden, Németország) RetiScan készülékével végeztük.

A vizsgálat 15 perces fényadaptáció (stabil, közepes erősségű szobamegvilágítás) után történik. A betegek pupilláját 0, 5%-os cyclopentoláttal tágítottuk, a szemfelszint 1 csepp 0,45%-os oxybuprocaine cseppel érzéstelenítettük. Az elektródok felszerelése a Gf-ERG-hez való előkészítésnél leírtak szerint történt.

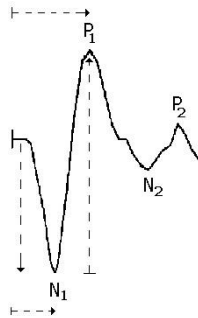


13. ábra. a mf-ERG vizsgálat során alkalmazott pszeudorandom ingerminta (baloldalon) és a retinogram térkép (trace array) (jobbra.), utóbbi topografikusan jeleníti meg az egyes ingermintáknak megfelelő retinaterület fokális válaszát.

Az ISCEV guideline ajánlásának megfelelően stimulációnak 21"-os katódsugárcsöves monitoron (75-Hz frame rate, cutoffs:10–100 Hz) megjelenített, 61 fekete-fehér hexagonból álló ingermintát használtunk, melyen speciális pszeudorandom szekvencia szerint változik az egyes hexagonok megvilágítása (fekete vagy fehér volta). Az ingert a fehér hexagon jelenti. (13. ábra) A fixáláshoz egy vékony X-et (keresztet) használtunk, hogy a centális stimulusból a „kitakarás” a minimális legyen.

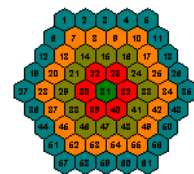
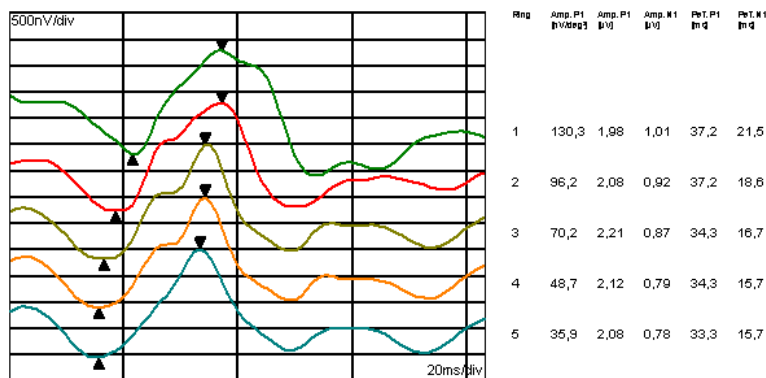
Az ingermintát alkotó hexagonok nagysága a centrumtól a periféria felé haladva növekszik, a retinális csapsűrűséggel fordított arányban. A készülék szoftvere keresztkorrelációval kiszámítja az egyes ingerelt retinaterületek lokális válaszát és az ingermintával megegyező számú kis retinogramot jelenít meg. A vizsgálatot monokulárisan végeztük, a monitor-szem távolság 28 cm volt, a betegek fénytörési hibáját erre a távolságra korrigáltuk. Az ingerminta méretét figyelembe véve a retina centális 60° átmérőjű, (a foveától mindkét irányban 30°) területét ingereltük. (72) A retina lineáris funkciójára jellemző ún. első rendű választ (first order kernel) vizsgáltuk.

Az eredmény megjelenítésére ajánlott parameter az ún. válaszsűrűség (nV/fok²) vagyis egységnyi területre jutó elektromos aktivitás és nem a hullámok amplitúdójának mikrovoltban kifejezett értéke. Mértük a túlnyomóan csap eredetű N1- (a) és bipoláris sejt eredetű P1- (b) hullámának válaszsűrűségét.



14. ábra. A mf-ERG fő komponensei. N1= a-hullám, P1= b-hullám. Az N1 és P1 hullámkomponensek és a fotopikus gf-ERG hullámának komponensei (a és b) irodalmi adatok szerint nagyrészt azonos retinasejtekben generálódnak. (72)

Az excentricitásnak megfelelően a válaszok gyűrűszerűen és háromdimenziós, színekódolt formában is ábrázolhatók. Jelen munkánkban a gyűrűszerű ábrázolást alkalmaztuk.



15. ábra. Az excentricitás (gyűrűk) szerinti ábrázolás: a centrumtól a periféria felé 5 koncentrikus gyűrűnek megfelelően elhelyezkedő fokális elektroretinogramok válaszsűrűség értékeinek átlagát mutatja. Ily módon egyértelműen megjeleníthető pl. a makuláris funkciócsökkenés.

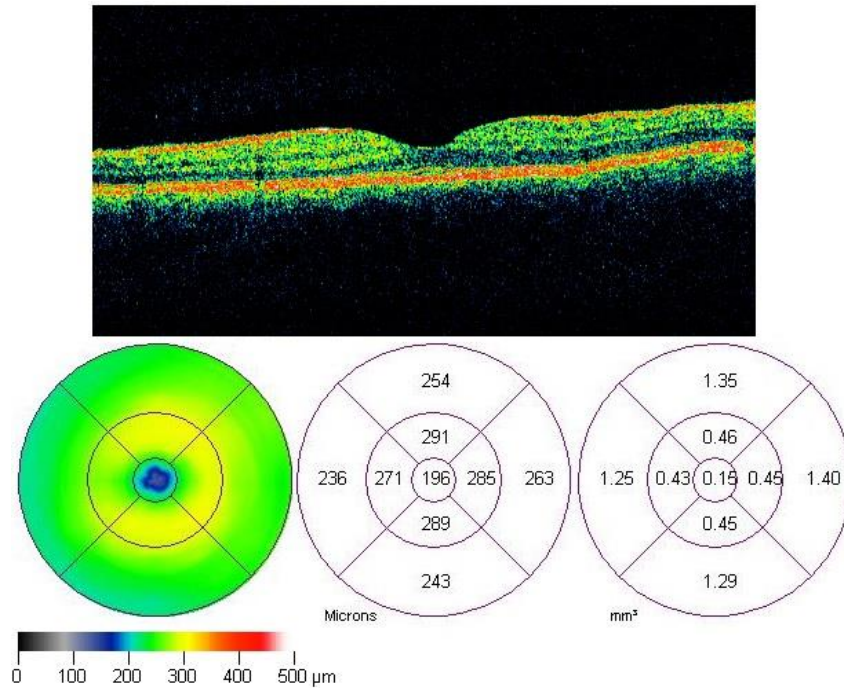
A mfERG vizsgálatot a felnőtt RD-s (RP-s) betegeken végeztük. Előrehaladott retinitis pigmentosában a mf-ERG válaszok a reziduális csap aktivitást reprezentálják, ennek megfelelően a válaszsűrűség (egységnyi területen detektálható elektromos aktivitás) mind a centrális gyűrűkben, mind az excentricitással egyenes arányban csökken.

III.2.6. Optikai koherencia tomográfia (OCT)

Az optikai koherencia tomográfia a szemészeti diagnosztikában az első módszer, mely „in vivo” képes vizsgálni a retina vastagságát és belső szerkezetét. Az első generációs, ún. *time domain OCT* készülékek működése az alacsony koherenciájú lézer interferometria elvén alapul, mely a retina felszínéről és az egyes, különböző optikai denzitású intraretinális (magvas és rostos) rétegek határáról reflektálódó infravörös jel (kb. 820 nm) visszaverődésének időbeli és intenzitásbeli különbségét méri és a mért adatokból keresztmetszeti képeket generál. (73, 74)

Saját felnőtt RP betegeink OCT vizsgálatát time-domain elven működő, Stratus OCT (Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA) berendezéssel végeztük, melynek axiális felbontása 9-10 μm . A berendezés a különböző denzitású retina rétegeket színekkel jeleníti meg, a magas reflektivitású, rostos rétegeket meleg (vörös) színnel ábrázolja (RNFL, IPL, OPL), míg a hyporeflektív, magvas rétegek hidegebb (zöld/kék) színűek (GCL, INL, ONL). Segítségével elkülöníthető a RPE-chorioidea komplexum, (RPE+Ch), a külső magvas réteg (ONL), a külső rostos réteg (OPL), a belső magvas réteg (INL), a belső rostos+ganglionsejt réteg (IPL+GCL) és az idegrost réteg (RNFL). (75)

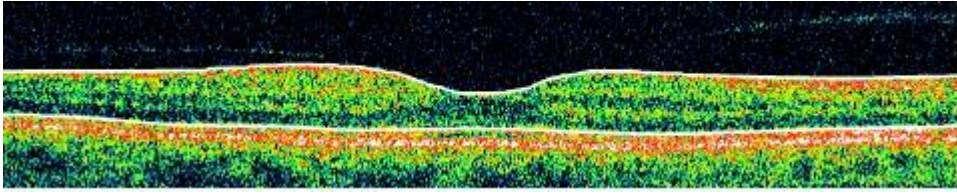
A betegek pupilláját cyclopentolát cseppel tágítottuk ki, a vizsgálat során a készülék fixáló pontjára néztük őket. Az ún. „Macular thickness map” protokoll szerint minden szemről hat darab, egyenként 6 mm hosszúságú, a fovea centrálison keresztül menő leképzés történt, így módon 6 radier metszet (B módú kép) készült a makuláról. A metszetek síkja 30°-ban tér el egymástól. A protokollal kiszámítható a retina átlagos vastagsága a foveolában (foveal thickness, FT), két koncentrikusan elhelyezkedő (a belső 3,5 mm-es, a külső 6 mm-es átmérőjű) körben, illetve a felső, a temporális, az alsó és a nasalis területeken, az ETDRS régióknak megfelelően. (16. ábra, 76)



16. ábra. Stratus 3 OCT felvétel, ép retina színekódolt keresztmetszeti képe (felül), a centrális retina színekódolt vastagsági térképe (alul balra), átlagos vastagsága (alul középen) és átlagos térfogata (alul jobbra) a 9 ETDRS régióknak megfelelően.

III.2.6.1. Az OCTRIMA szoftver, az intraretinális rétegek szegmentálása

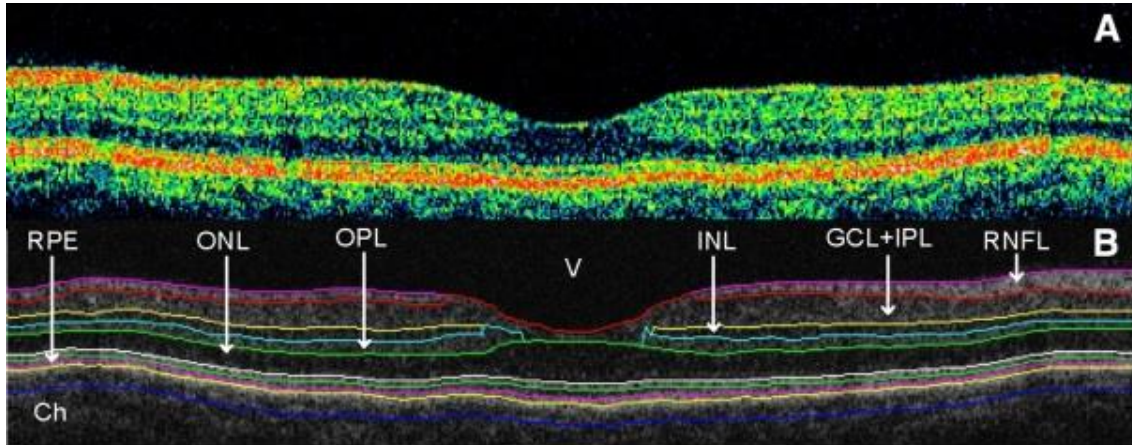
A Stratus OCT nyers képeit a berendezésből kimentve az ún. OCTRIMA (OCT-Retinal-Image-Analizer) szoftverrel elemeztük tovább, melyet speciálisan a time-domain OCT-re, az intraretinális szerkezet vizsgálatára fejlesztettek ki. (77) Segítségével az egyes retina rétegek közti határvonalak kijelölhetők és köztük lévő távolság megmérhető, utóbbi adja az egyes intraretinális rétegek vastagságát. Ily módon a retina 6 rétege különíthető el egymástól.



17. ábra. Stratus3 OCT kép, egészséges makula. A fehér vonalak a szoftver által kijelölt határokat jelzik: a felső vonal a vitreoretinális határfelszín, az alsó vonal a pigmenthám belső határa. A két vonal távolsága a retina vastagsága a RPE nélkül. (Dr. Tátrai Erika saját anyagából) (78)

Megjegyzendő, hogy az OCTRIMA a teljes retina vastagságot a vitreoretinális határ (ILM) és a második, külső hiperreflektív csík belső határa között méri, mely a fotoreceptorok külső és belső szegmentumának a határa, vagyis a külső szegment/ RPE határnak felel meg. (79, 80, 81) Ily módon a teljes retina vastagsági mérés nem tartalmazza a pigmenthám vastagságát.

Minden szemről minden egyes ETDRS régióban mértük a teljes retina vastagságot, a külső magvas réteg (ONL), a külső rostos réteg + belső magvas réteg (OPL+ INL) komplexum, a ganglion sejt + belső rostos réteg (GCL+IPL) komplexum és a retinális idegrost réteg (RNFL) vastagságát. (18. ábra) A rostos rétegeket (IPL és OPL) azért vizsgáltuk komplexum részeként GCL-lel illetve az INL-lel, mert a szomszédos rétegektől való elkülönítésük nehezen reprodukálható. (82)



18. ábra. Stratus OCT vizsgálat, egészséges makula képe (A). Az alsó képen (B) látható, hogy az ONL-ként jelzett réteg a külső határhártyát és a fotoreceptor belső szegmentjét (IS) foglalja magába, ami a standard 10 μm -es felbotással nem elkülöníthető. A GCL és IPL rétegek közötti határ is nehezen eldifferenciálható, mivel nincs egyértelmű világos zóna köztük, a GCL külső határát nehéz meghatározni. Ezért a két réteg összevonása célszerű a pontos mérés érdekében.

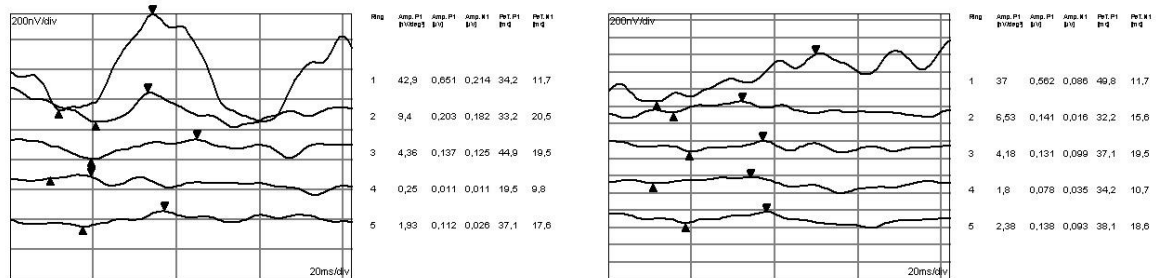
III.2.6.2. Heidelberg Spectralis SD-OCT

Az LCA-EORD betegek egy részénél spectral-domain-OCT (SD-OCT)-vel (Spectralis OCT, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Németország) vizsgáltuk a retinát. Az SD-OCT leképzési sebessége gyorsabb, leképzési ideje rövidebb (az A-scan leképzéseinek száma 25-50.000/sec, szemben a TD-OCT 400/sec leképzési sebességével) és zajszűréssel ellátott. A mélységbeli felbontás 3-5 μm körüli, a készülékben beépített ún. „eye tracking” található, ezért a vizsgálatot a szemmozgások kevésbé zavarják, aminek eredményeként jobb minőségű OCT-kép készíthető vele, mint a TD-OCT-vel. (83)

III.2.7. Szerkezet-funkció összefüggés vizsgálata a retinitis pigmentosában szenvedő betegek centrális retinájának megítélésére

A kórfolyamat előrehaladtával a centrális funkció egyre csökken, ezt objektív módon a mf-ERG csökkenő válaszsűrűségével mérhetjük. Szintén ismert, hogy a külső magvas réteg (ONL) vastagsága RD betegekben csökkent.

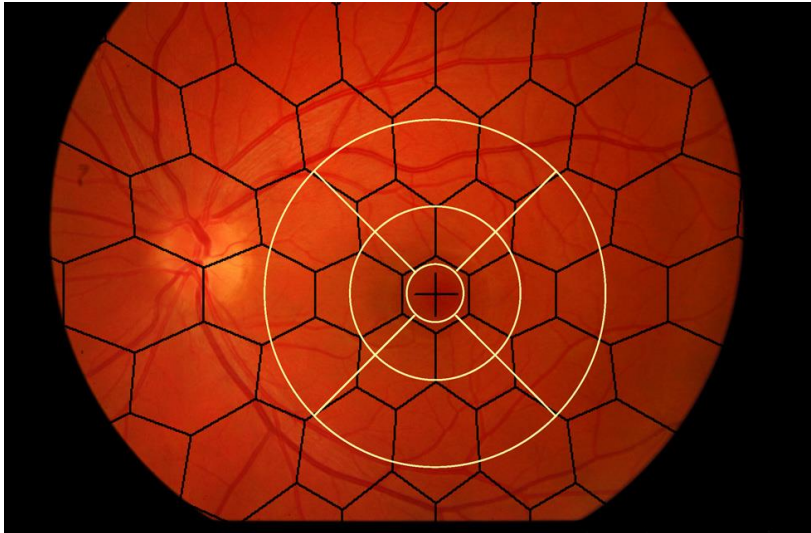
Arra kerestük a választ, hogy a felnőtt RP betegek esetében in vivo kimutatható-e eltérés a makula finom felépítésében az egészséges szemekhez képest, illetve a funkcionálisan különböző (elektromos aktivitást mutató és már kioltott/ nem elvezethető retinogramú) szemekben. A betegek szemeit két csoportra osztottuk, aszerint, hogy van-e detektálható válasz a mf-ERG-n. A válaszokat akkor tekintettük kioltottnak, ha nem volt jelen centrális csúcs a retinogram térképen vagy ha a normális latencia időn kívül csupán 2 vagy 3 alacsony amplitúdójú hullám jelent meg a gyűrű-ábrázolásban.



19. ábra. a két betegcsoport (detektálható és kioltott centrális retinális válaszok) jellemző mf-ERG képe

Az OCTRIMA által megmért intraretinális rétegvastagságokat a foveától az excentricitás függvényében úgy tudtuk megjeleníteni, hogy az ETDRS R1 régiójának adatait külön néztük, a R2-R5 régiók adatait átlagoltuk, ez a pericentrális makula régió, a R6-R9 régiók átlagolt adatai pedig a perifériás makula régió felel meg.

A 20. ábrán a szemfenék, a mf-ERG ingermintájának és a 6 mm hosszú OCT ábrázolásnak az egymáshoz való viszonya látható. A centrális hexagon által ingerelt retina terület $0-2.5^\circ$, a 2. gyűrű alakú ingerminta által stimulált terület $2.5-8^\circ$ és a 3. gyűrű által ingerelt terület $8-15^\circ$ között volt a foveától mindkét oldalon. (84) Ennek megfelelően a centrális ETDRS régió megfeleltethető a mf-ERG centrális hexagonjának, a pericentrális ETDRS régió a 2. inergyűrűnek és a perifériás ETDRS régió a mfERG 3. gyűrűjének felel meg. (84, 85) Az így vizsgált terület a retina hozzávetőleg 30° -os átmérőjű centrális területét reprezentálja, az átfedés a hexagon alakú ingerminta és az ETDRS régiók illetve körök alakbeli különbsége miatt természetesen nem lehet teljes.



20. ábra. A képen a szemfenék, a multifokális ERG ingermintázata és a centrális ETDRS régiók egymáshoz való viszonya ábrázolódik. A 6 mm hosszú OCT leképzés által lefedett terület és a mfERG 3 centrális gyűrűje egymásnak hozzávetőleg megfeleltethető. Az átfedés a kör és hexagon alakzat különbözősége miatt nem lehet teljes.

III.2.8. Statisztikai számítások

A retinitis pigmentosa betegek esetében a \log_{MAR} értékekben kifejezett látóélességet és a makula területében mért intraretinális rétegvastagságokat a három (2 beteg és a kontroll) csoport között mixed model ANOVA és Newman-Keuls post hoc tesztet alkalmazva hasonlítottuk össze. Lineális korrelációt végeztünk annak megállapítására, hogy van-e összefüggés a \log_{MAR} egységekben kifejezett látóélesség, az életkor és a vizsgált retina rétegek vastagsága között. A statisztikai analízist az SPSS 15.0; SPSS Inc. , Chicago, IL; és a Statistica 8.0 Szoftver; Statsoft InC ., Tulsa, OK) szoftverek segítségével végeztük. Mivel az összehasonlított paraméterek száma nagy ($n=14$) Bonferroni korrekciót alkalmaztunk, mely alapján a statisztikai szignifikancia szintjét $p < 0.0036$ -ban határoztuk meg.

III.3. Genetikai vizsgálatok

A felnőttkorban manifesztálódó retina disztrófiákban kóroki szerepet játszó ismert gének száma már több száz, ennek megfelelően saját felnőtt betegeink genetikai vizsgálata nem volt célunk.

Az ismert LCA-EORD gének száma jelenleg több mint 20. A genetikai vizsgálatok korábbi „arany standard”-jának számító direkt (SANGER) szekvenálás a genetikailag nagyfokban heterogén kórképek esetében nem effektív, ezért más módszerek kifejlesztésére volt szükség.

Saját LCA-EORD betegeink vizsgálata során *három különböző genetikai módszert* alkalmaztunk, elsőként a **DNS microarray-t (APEX-módszer)** végeztük el minden betegben. Azon két esetben, ahol ily módon csak egy allélon sikerült mutációt azonosítani, függően a fenotípus jellegzetességétől (CRB1 gén, 5. beteg) illetve az érintett gén nagyságától (CEP290 gén, 55. exon, 6. beteg), a második allél detektálására *direkt (Sanger) szekvenálást* illetve *célzott újgenerációs szekvenálást (NGS)* alkalmaztunk. A *direkt szekvenálást* mindkét másik módszerrel nyert eredmény validálására is elvégeztük.

III.3.1. DNS izolálás

Az LCA betegek (n = 7) DNS-ének izolálása a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérletes Rákkutató Intézetében és az Országos Hematológiai és Immunológiai Intézetben történtek perifériás vénás vérből történt, a vért 10 ml-es K3-EDTA kémcsövekbe vettük le. Az EDTA stabilizált mintákból az extrakció a leukocytákból Gentra Puragene Blood Kit vagy Qi amp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden Németország) használatával történt.

A további vizsgálatok (DNS microarray, Sanger szekvenálás, célzott NGS) az Asper Ophthalmics Biotechnológiai Cégnél (Tartu, Észtország) történtek.

III.3.2. DNS amplifikálás polimeráz láncreakcióval (PCR) és fragmentálás

Ezen folyamat célja a beteg DNS-ének előkészítése a microarray vizsgálathoz.

A polimeráz láncreakcióval (PCR) a betegek genomikus DNS-ének azon szakaszait amplifikálták, amelyek a klinikai diagnózis felállításához illetve a feltételezett betegség szempontjából fontos mutációt vagy polimorfizmust tartalmaznak.

A PCR primerek a Genorama™ Chip Design Software segítségével lettek megtervezve. A dTTP bizonyos hányadát dUTP-vel helyettesítették a PCR reakcióban, lehetővé téve a későbbi fragmentációt uracil N-glikozidázzal (UNG). A termékeket összegyűjtötték, koncentrálták és enzimátikus úton, alkalikus foszfatáz segítségével megtisztították a szabad, be nem épült dNTP-től. Az alkalikus foszfatáz és uracil N-glikoziláz kezelés után a mintákat melegítették az enzim deaktiválása és a DNS-láncon az uracil helyének megfelelő hasítása céljából. A hosszú PCR termékek fragmentálása elősegíti a megfelelő hibridizációt az üveghez kötött oligonukleotidokhoz, mely a microarray vizsgálat során történik.

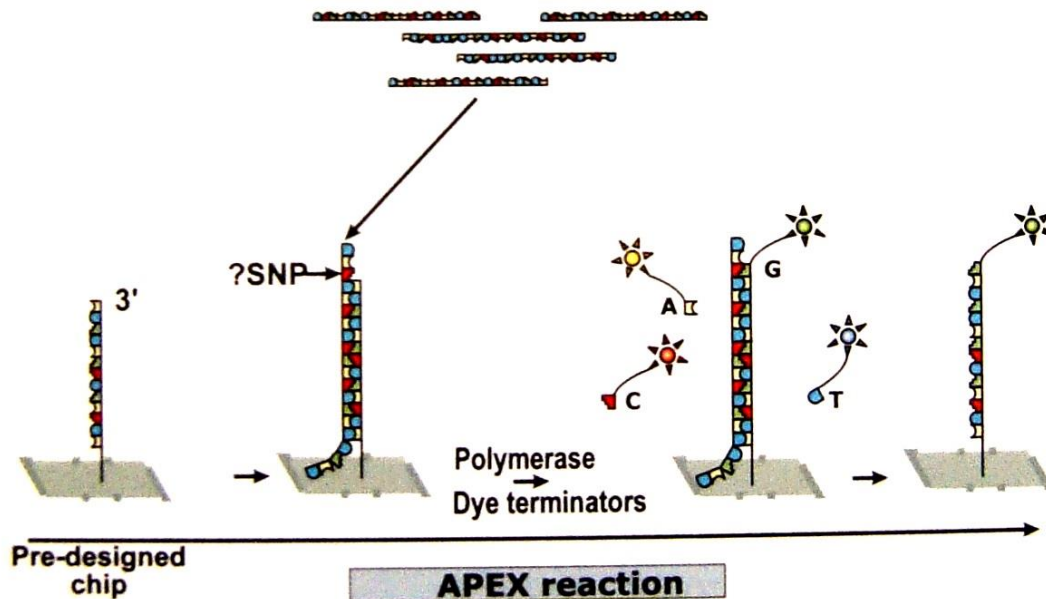
III.3.3. LCA-DNS microarray vizsgálat

A tisztított derivátumok további vizsgálata a célzottan az LCA-EORD betegekre kifejlesztett genotipizáló microarray-vel történt, mely a direkt szekvenálásnál gyorsabb, hatékonyabb és jóval olcsóbb. (86, 87) A DNS microarray elméletileg csak a már ismert mutációkat (single nukleotid polimorfizmusok /SNP/, deléciók, inserciók) képes azonosítani, az identifikálás a vizsgált esetek kb. 60 - 70% ban sikeres. (88, 89) A módszer az ún. *APEX (arrayed primer extension)* reakció.

(i) A betegekből származó fragmentált PCR termékeket a reakció előtt közvetlenül egyszálúsították (denaturálták) és *transzferálták* egy előzetesen megtervezett chip-re, mely egy oligonukleotidokból álló array üveglemezre applikálva. Az array korábban már identifikált és a szakirodalomban közölt, betegséggel asszociált kóros szekvencia variánsokat, vagy mutációkat tartalmaz, melyek nagyrészt europoid/kaukázusi népességre vonatkoznak.

(ii) A *pufferolt reakció keverék egyszálú DNS-t, DNS polimeráz* enzimet és 4 különböző terminátor *nukleotidot* tartalmaz, utóbbiak mindegyike más-más színű fluorescens festékkel jelzett. A templát dependens DNS polimeráz reakció magasabb hőfokon van kivitelezve, ennek célja, hogy megakadályozza az oligonukleotidokban a nem kívánatos szekunder szerkezetváltozást, ugyanakkor lehetséges legyen a hatékony hibridizáció a

cél-DNS-sel és ne károsítsa a polimeráz aktivitást. Megfelelő ideig tartó inkubáció után a nem hibridizált és kovalens módon nem kötődött anyag kimosásra kerül.



21. ábra. Az APEX reakció.

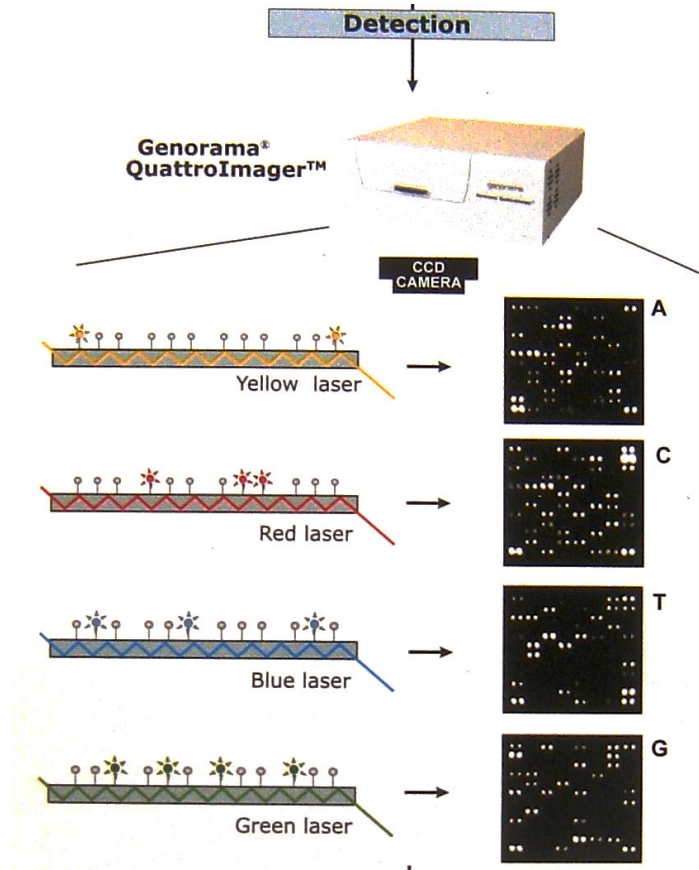
Bal oldalon: üvegfelületen rögzített oligonukleotid minták (rövid DNS szakaszok) A microarray több száz ilyen DNS markert tartalmaz, melyek így egyidejűleg vizsgálhatók. *Balra középen:* PCR módszerrel amplifikált, betegből származó denaturált (egyszálú) DNS-t adunk az arrayhez. A komplementer szakaszok egymáshoz kapcsolódni fognak.

Jobbra középen: az 5' végével az array-hez rögzített primer a 3' végén szekvencia specifikusan egy új, fluorescein festékkel jelzett ddNTP nukleotid beépülésével (zöld szín, G) növekszik. A folyamatot DNS polimeráz enzim mediálja.

Jobbra: kimosás után a be nem épült, felesleges ddNTP-k és a betegtől származó minta eltávolításra kerül, maga után hagyva a megnövekedett primert.

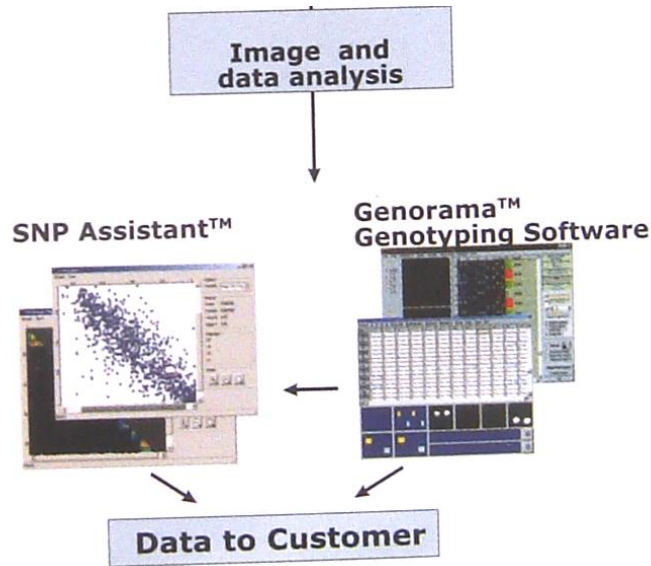
(iii) **Detektálás:** a reakció után az üveglemezeken az eredmények megjelenítése egy ún microarray detektorral (Genorama® Quattro Imager™ Detektor 003/ Genorama Ltd., Tartu, Észtország) történt. Négy különböző laser segítségével excitálták a négy különböző színű fluorescens festéket. A fluorescens festékek által emittált fényt egy charged-coupled device (CCD) kamera detektálta. Mivel reakciónként négy különböző festéket használt a módszer, a kibocsátott színeknek megfelelően az array-n négy

különböző szín és topográfiai mintázat fog ábrázolódni, mely az egyes nukleotidok elrendeződésének felel meg. (22. ábra)



22. ábra. Mikroarray detektor: a kibocsátott színeknek megfelelően az array-n négy különböző szín és topográfiai mintázat ábrázolódik, mely az egyes nukleotidok elrendeződésének felel meg.

(iv) Képfeldolgozás és az adatok elemzése: az analízis a Genorama™ Genotyping szoftver (Asper Biotech, Tartu, Észtország) felhasználásával történt, mely a fluoreszcens információt szekvencia sorrenddé alakította.



23. ábra. A mikroarray detektorral nyert adatok feldolgozása Genorama Genotipizáló szoftver segítségével

A DNS mikroarray vizsgálatot 7 beteg esetében végeztünk, 4 betegnél – egy fiú testvérpár, egy simplex 25 éves férfi beteg, és egy simplex 5 éves kislány – az LCA mikroarray 6-os verziójával (435 mutáció /10 gén). Egy 5 éves fiúnál a mikroarray 7-es verziójával (451 mutáció/ 12 gén), és további két betegnél, egy 5 éves fiú és egy 8 éves kislány) a mikroarray 8-as verziójával (641 mutáció 13 gén). Ennek oka, hogy a betegek, betegségük ritkaságánál fogva nem egy időben kerültek Klinikánkra, így a klinikai diagnózis is különböző időpontban lett felállítva.

III.3.4. Direkt (Sanger) szekvenálás

A módszert Frederick Sanger fejlesztette ki 1977-ben, melynek lényege az ún. „kapilláris gélelektroforézis szekvenálás”, mely során „in vitro” a DNS polimeráz enzim közreműködésével történik a DNS replikáció. (90) Az enzim didezoxinukleotidokat (ddNTP) szelektív választ ki és építi fel belőlük a komplementer nukleotid szálát. A módszer a PCR reakcióval fragmentált DNS szakaszok nukleotid szekvenciáját ún. láncterminációs módszerrel határozza meg, a BigDye terminator v3.1 cycle (>500 base pairs) szekvenáló kittel. (ABI, Foster City, California, USA)

A ddNTP-k fluorescein festékekkel jelzettek, a 4 féle nukleozid szerint más-más színnel. A reakció során különböző hosszúságú fragmentumok keletkeznek, melyeket elektroforetikusan szeparálnak, viszkózus polimerrel töltött szűk üveg kapillárisokban. A DNS szekvencia leolvasása laserexcitáció segítségével történik, hasonlóan a mikroarray technikánál leírtakhoz.

Saját betegeink mikroarray-vel és NGS-sel azonosított eredményeinek ellenőrzése (a talált patogén mutációk validálása) Sanger szekvenálással történt standard protokoll szerint. A fragmentumok nukleotid szekvenciáját automata szekvenáló készülékkel (ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) határozták meg.

III.3.5. Célzott újgenerációs szekvenálás (new generation sequencing, NGS)

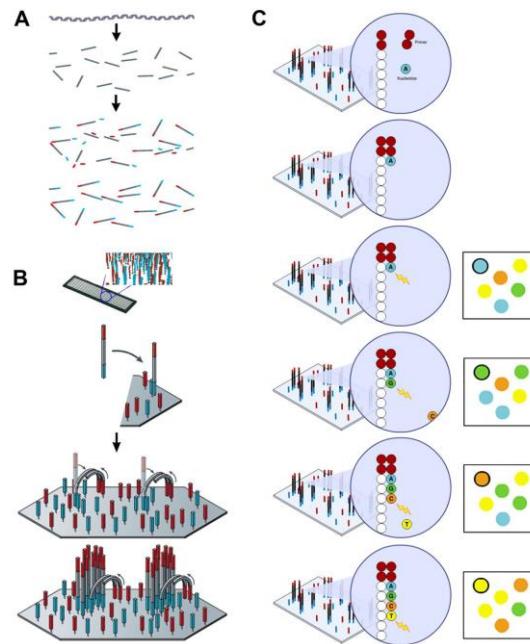
A 2000-es évek elejétől a genetikai vizsgáló módszerek között a nagy kapacitású, szimultán sok gén illetve nagy mennyiségű DNS minta vizsgálatára képes, ún. újgenerációs szekvenáló módszerek kerültek előtérbe, melyek a retina disztrófiák genetikai diagnosztikájában nagy előrelépést jelentettek, mind a szekvenálás költsége mind a vizsgálat elvégzéséhez szükséges idő jelentősen csökkent. (91, 92) Az ún. célzott módszerekkel („target-enrichment methods”) lehetőség van specifikus genetikai régiók, például egy betegséghez kapcsolható gének csoportjának célzott vizsgálatára. (93)

A célzott NGS módszert a 6. beteg (CEP290 gén) második mutációjának azonosítására alkalmaztuk.

Az ASPER Ophthalmics Biotech cég által megtervezett LCA panel összesen 20, korábban azonosított és az irodalomban közölt LCA-EORD gén (*AIPL1*, *CABP4*, *CEP290*, *CRB1*, *GDF6*, *GUCY2D*, *IMPDH1*, *IQCB1*, *KCNJ13*, *LCA5*, *LRAT*, *NMNAT1*, *OTX2*, *RD3*, *RDH12*, *RPE65*, *RPGRIP1*, *SPATA7* és *TULP1*) mutációinak vizsgálatát teszi lehetővé, összesen 780 SNP-t vizsgál egyidejűleg. A panel, a mikroarrayhez hasonlóan egy adott gén „hot spot” régióit vizsgálja, ezen kívül az ún. átfedő (flanking) régiókat is: ezek a DNS szakasz 5' végéhez közeli régiók, melyek a promoter és enhancer szakaszokat és más fehérje kötőhelyeket is tartalmaznak.

Az NGS szakaszai:

- 1. Könyvtárkészítés:** A genomot 100 bp-os darabokra fragmentálják. A dupla szálú DNS két végén a ragadós végeket eltüntetik, majd először egy adeninnel töldják meg az 3' végeket, majd egy timin túlnyúló véggel rendelkező adapter DNS-t kötnek hozzá. A ligált DNS-darabokat ezt követően kiválogatják és egyszálúsítják. A mintát egy szekvenáló üveglemezre viszik fel, ahova az adapter DNS láncsal komplementer oligonukleotidokat horgonyoznak ki. Ezekhez hibridizáltatják a DNS fragmentumokat.
- 2. Klonális amplifikáció,** mely során 1 fragmentból kb 1 millió kópia szintetizálódik 60°C-on megfelelő puffer és denaturálószer jelenlétében. Az Illumina készülék hídképzéssel amplifikál, majd klasztereket képeznek az egyes szálak között és felszaporítják a meghatározni kívánt DNS-szakaszt.
- 3. Szekvenálás:** szintézissel történik, melynek során a templáthoz egy primert kötnek, a reakcióhoz egyszerre adják hozzá a 4 terminátor nukleotidot, melyeket különböző fluoreszcens jelöléssel látnak el. A fluoreszcens jel detektálása CCD kamerával történik (Illumina Kit, TrueSight one panel on a MiSeq Platform, MiSeq, Illumina San Diego, CA, USA)
- 4. Bioinformatikai kiértékelés**



24. ábra. Az új-generációs szekvenálás vázlatos menete: A: a genomikus DNS fragmentálása és a 3' végén ligálás: Adenin és egy Timin adapter DNS hozzá kötése.

B: a ligált DNS szakaszokat egyszerűsítés után üveglemezre rögzítése.

Az NGS módszerek számos előnye van mind a Sanger szekvenálással, mind a microarrayvel összehasonlítva: magasabb lefedési szint, mély szekvenálás, nagyobb szenzitivitás: ritka, új variánsok is felfedezhetőek vele. A Sanger szekvenálásnál nagyobb megíízhatóság ritka allélek megtalálására egy adott régióban.

Bioinformatikai kiértékelés

Az NGS vizsgálat kiértékelése csak számítógépes szoftverek segítségével lehetséges. Az új variánsok (mutációk) patogenitásának megítélése a MUTATION TASTER predikciós szoftver használatával történt. (94, 95) A szoftver számos biomedikai adatbázis (pl. Ensembl, UniProt, ClinVar, ExAC, 1000 Genomes Project, phyloP) adatait integrálva analizálja az adott DNS szekvenciát, figyelembe veszi a evolúciós konzerváltságot, a hasítási helyek ill. a fehérjeláncok funkcionális doménjeinek megváltozását, a szabályozó elemek (transzkripciós kötőhelyek) érintettségét. Összegezi az adott nukleotidváltozás okozta eltéréseket, besorolja, hogy betegséget okozó ismert vagy új mutációról van-e szó, illetve polimorfizmus-e az adott eltérés.

IV. Eredmények

IV.1. Retinitis pigmentosa betegek

Retrospektív vizsgálatunkba a beválasztási kritériumoknak megfelelő 22 beteg 29 szemét, annak megfelelően, hogy a mf-ERG vizsgálat eredménye mutatott-e retinális elektromos választ, további két csoportra osztottuk, egy *DRF csoportra (detektálható retina funkció)* (n=15, életkor medián 34 év, 15-63 év) és *NCRF csoportra (nincs centrális retina funkció)* (n=14, életkor medián 32,5 év, 14-47 év).

A két csoportban (DRF és NCRF) vizsgáltuk a látóélességet, a DRF csoportban a centrális mfERG gyűrűben a retinális válaszsűrűséget és a három (centrális, pericentrális és paracentrális) maculáris régióban az egyes retina rétegek vastagságát és ezeket a kontroll csoport azonos paramétereivel hasonlítottuk össze.

IV.1.1. Látóélesség

A DRF csoportban a látóélesség Log_{MAR} 0.1 [BCVA 0.82 (SD: 0.26)], a 15-ből 10 beteg legjobb korrigált látóélessége 1.0 volt. A NCRF csoportban a látóélesség Log_{MAR} 0.4 [BCVA 0.44 (SD:0.21)] volt és egyetlen betegnek sem volt 1.0 a látóélessége. Az NCRF csoport Log_{MAR} értékben kifejezett értékei szignifikánsan rosszabbak a DRF és a kontroll csoport értékeihez viszonyítva.

IV.1.2. Funkcionális (multifokális ERG) változások

A mf -ERG válaszsűrűség értékei minden betegben vagy csökkentek vagy kioltottak voltak. A 2.-3. gyűrű-ben a csökkenés kifejezettebb volt, mint a centrális gyűrűben. A NCRF, előrehaladottabb stádiumú csoportban, értelemszerűen, egyik gyűrűben sem, a DRF csoportban a 3.-5. gyűrűben nem volt elvezethető válasz. A DRF csoportba tartozó 15 szemből 13-ban (88%) csak a centrális (foveális) hexagonban, 2 szem (12%) esetében a 2.. gyűrűben is (centrális 7 hexagon) detektáltunk mf-ERG válaszokat. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat. Saját betegeink multifokális ERG (válaszsűrűség) értékeinek összehasonlítása a korcsoporti normál értékekkel.

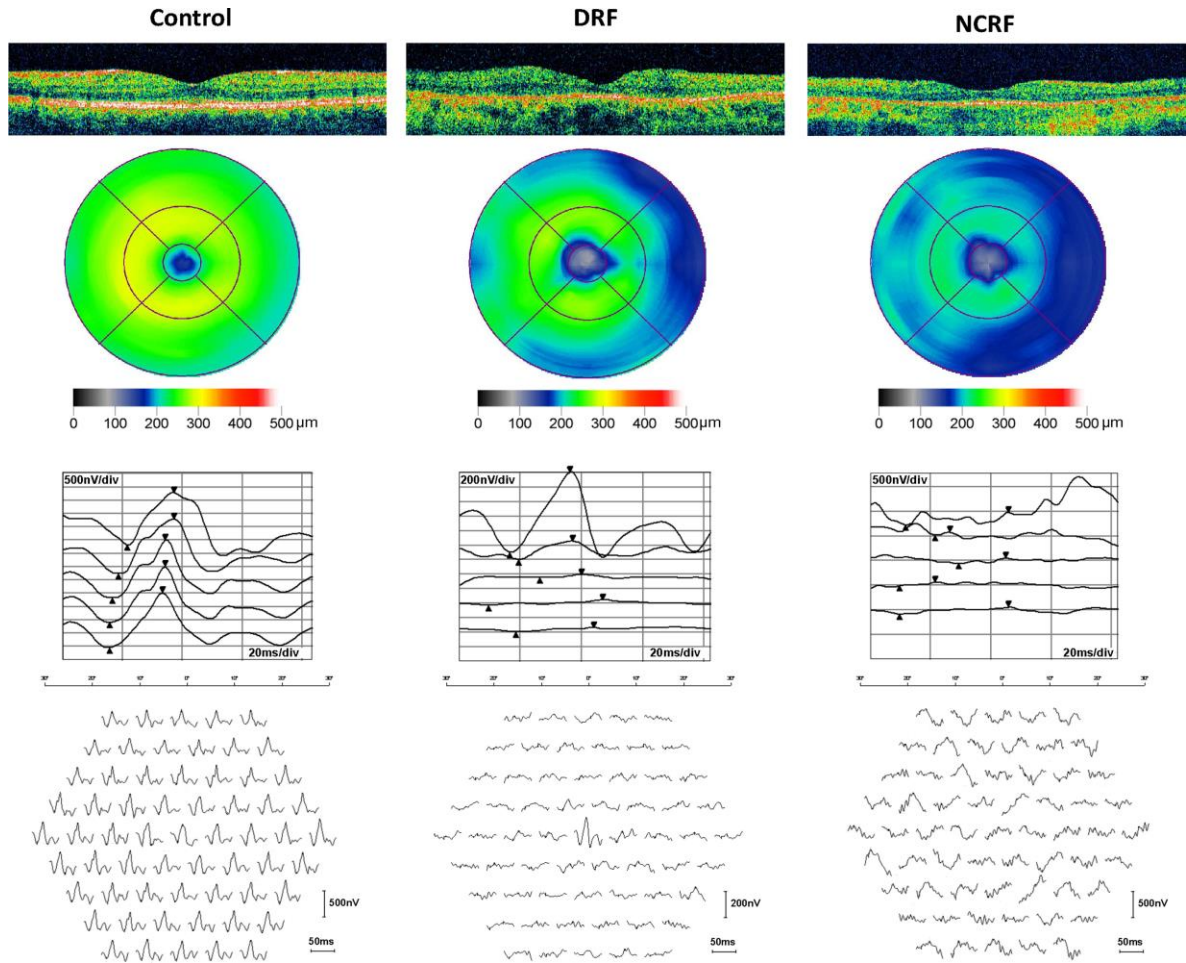
Excentricitás	Kontroll (n= 50) nV/deg ²	DRF (n=17) nV/deg ²	NCRF (n = 12) nV/deg ²
1. gyűrű	129 (+/-24.02)	26.6 (+/-9.60)	ND
2. gyűrű	84.6 (+/-12.05)	8.82 (+/-3.32)	ND
3. gyűrű	59.3 (+/-9.90)	ND	ND

(átlag+/-SD), ND = nem detektálható.

A DRF csoportban az 1. gyűrű átlagos válaszsűrűsége a normál kontroll csoportban mért érték 20%-a, a 2. gyűrű átlagos válaszsűrűsége a normál kontroll csoport értékének kb. 10 %-a. A 4.-5. gyűrűben egyik betegcsoportban sem volt detektálható válasz, ezért ezeket a táblázatban nem tüntettük fel. A korcsoporti normál értékek (kontroll csoport) a Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinika Elektrofiziológiai Laboratóriumának adatbázisa alapján kerültek meghatározásra.

IV.1.3. Szerkezeti változások

A 25. ábrán jól látható, mind a vastagsági térképen szinkódolt formában, mind a keresztmetszeti képeken a rétegvastagság változása a kontroll csoport és a betegek, valamint a két betegcsoport között is. A funkcióbeli csökkenést a gyűrűk szerinti mfERG válaszok egyértelműen megjelenítik.

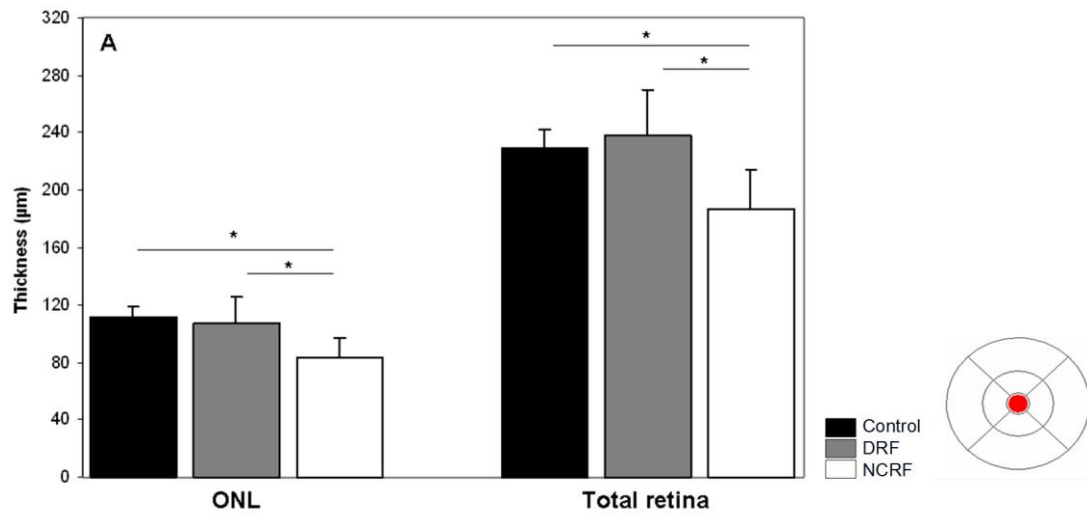


25. ábra. Összefoglaló ábra az egészséges kontroll szem (*bal oldal*), egy DRF csoportba tartozó szem (*középen*) és egy NCRF csoportba tartozó szem (*jobb oldal*) jellemző OCT és mf-ERG adataival. *Felső sor:* keresztmetszeti OCT képek a maculáról. *Második sor:* vastagsági topografikus térkép. *Harmadik sor:* mf-ERG gyűrűk szerinti ábrázolás (az azonos excentricitású fokális retinogramok átlaga) *Negyedik sor:* retinogram térkép (az elektromos aktivitás topografikus ábrázolása)

Megfigyelhető, hogy a DRF csoportban a retina vastagsága a pericentrális és perifériás régiókban is csökkent az egészségeshez képest. Ugyancsak látható, hogy az NCRF csoportban a centrális és pericentrális régiókban a retina vastagsága csökkent a DRF csoporthoz képest.

IV.1.3.1. Centrális makula régió (fovea, 1 mm)

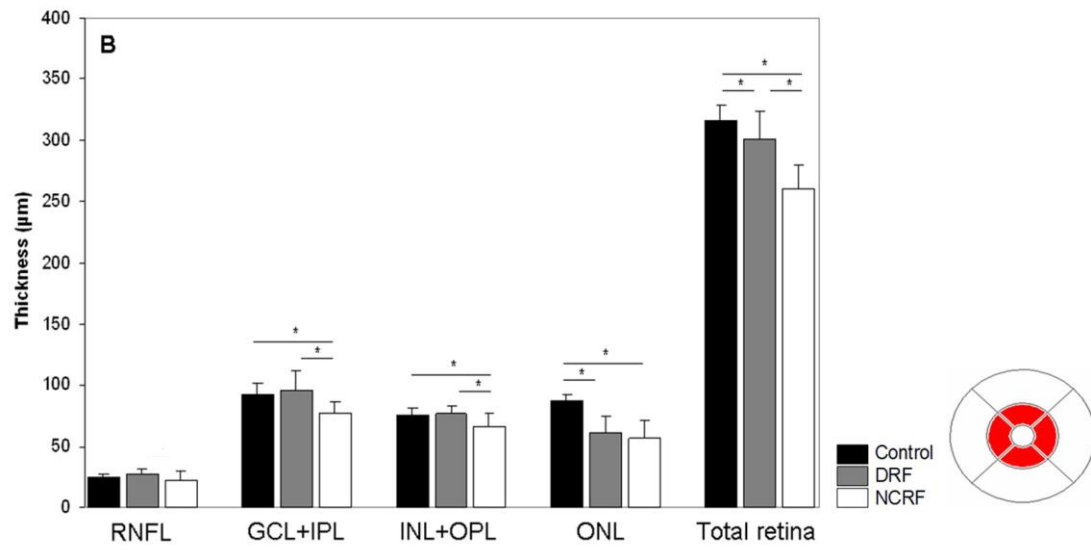
A teljes retina vastagság és az ONL nem különbözött szignifikánsan a DRF és a kontroll csoport között. A NCRF csoportban mindkét paraméter szignifikánsan csökkent volt mind a kontrollhoz, mind a DRF csoporthoz képest. (3. táblázat és 26. ábra)



26. ábra. Centrális makula: a NCRF csoportban mind a ONL, mind a teljes retina vastagság szignifikánsan kisebb, mint a DRF és az egészséges kontroll csoportban. Utóbbi kettő értékei egymástól nem különböztek szignifikánsan.

IV.1.3.2. Pericentrális makula régió (perifovea, 1-3 mm)

Az ONL szignifikánsan vékonyabb volt mindkét beteg csoportban a kontrollhoz képest. A két beteg csoport vastagsági értékei között nem volt szignifikáns különbség. Az INL + OPL és a GCL+IPL komplexumok vastagsága nem különbözött a DRF csoport és a kontrollok között, azonban a NCRF csoportban mindkét komplexum vastagsága szignifikánsan vékonyabb volt a DRF csoporthoz képest. Az RNFL réteg vastagsága nem különbözött egymástól a három csoportban. A retina teljes vastagsága szignifikánsan vékonyabb volt mindkét beteg csoportban a kontrollokhoz képest. A kioltott funkciójú (NCRF) csoportban a teljes retinavastagság szignifikánsan kisebb a DRF csoporthoz képest. (3. táblázat és 27. ábra)

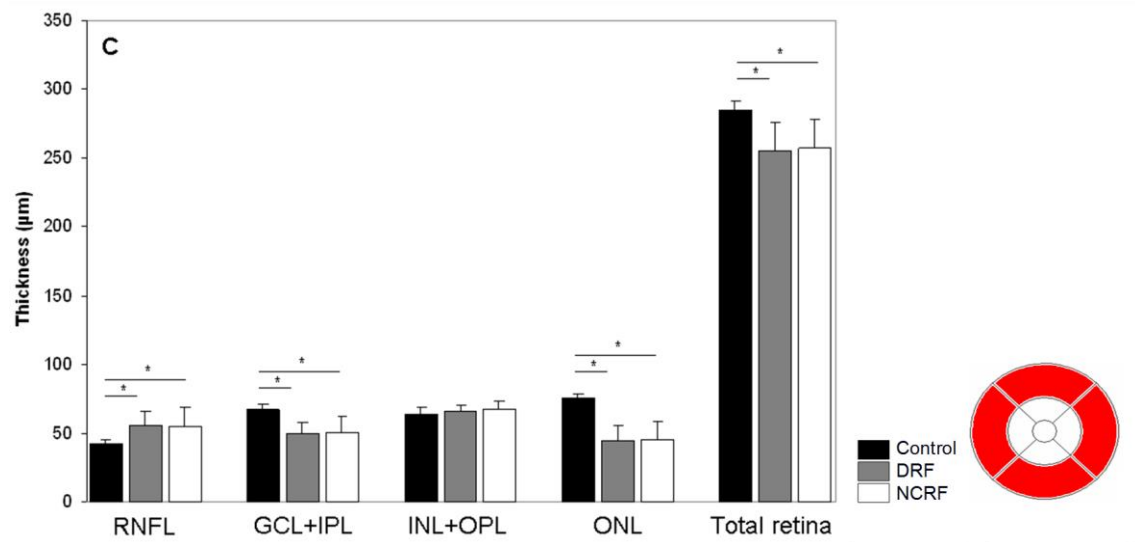


27. ábra. Pericentrális makula: Az ONL réteg vastagsága mindkét betegcsoportban szignifikánsan vékonyabb, mint az egészséges kontroll csoportban. Az INL(+OPL), a GCL(+IPL) rétegek valamint a teljes retina vastagsága csak a NCRF csoportban volt szignifikánsan vékonyabb, a DRF és kontroll csoportok közt nem volt különbség. Az RNFL réteg vastagsága a három csoportban nem mutatott különbséget.

IV.1.3.3. Perifériás makularégió (3-5 mm)

Az ONL, a GCL+IPL és a teljes retina vastagság egyaránt szignifikánsan vékonyabb volt a perifériás makula régióban mindkét betegcsoportban az egészségeshez képest, a két betegcsoport értékei között nem volt különbség. Az INL+OPL rétegek vastagsága a három csoportban nem különbözött egymástól. A pericentrális régióval ellentétben, az RNFL szignifikánsan vastagabb volt mindkét betegcsoportban a kontrollhoz képest, azonban egymástól nem mutattak szignifikáns különbséget.

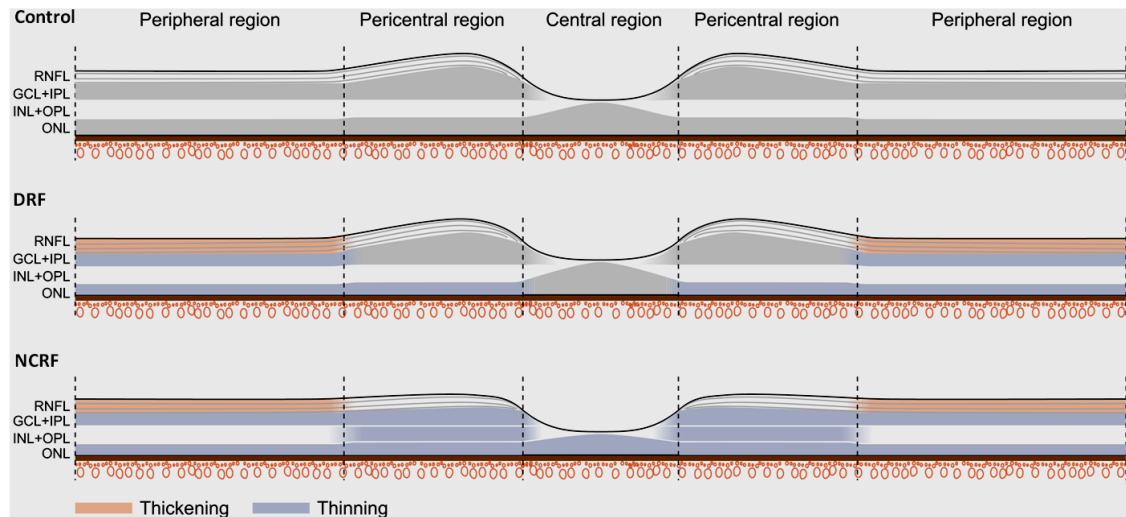
(3. táblázat, 28. ábra)



28. ábra. Perifériás makula: az ONL, a teljes retina vastagság és a GCL+IPL komplexum is mindkét betegcsoportban szignifikánsan vékonyabb volt, mint az egészségesekben. Az INL+OPL komplexum a három csoportban nem különbözött szignifikánsan, az RNFL réteg mindkét betegcsoportban szignifikánsan vastagabb volt, mint a kontrollokban.

3. táblázat. Összefoglaló táblázat: az egyes retina rétegek vastagsága az excentricitás függvényében, numerikus adatok. A pirossal jelzett értékek szignifikáns eltérést mutatnak ($p=0.0036$).

	Vastagság, μm , átlag (SD)			p érték		
	Kontrol	DRF	NCRF	DRF - Kontrol	NCRF - Kontrol	DRF - NCRF
Centrális régió						
ONL	112 (7)	111 (16)	83 (12)	0.946	<0.001	<0.001
Teljes retina	229 (13)	245 (26)	186 (25)	0.036	<0.001	<0.001
Pericentrális régió						
RNFL	25 (3)	28 (4)	22 (6)	0.050	0.233	0.006
GCL+IPL	93 (8)	99 (14)	77 (8)	0.041	0.001	<0.001
INL+OPL	75 (6)	78 (6)	66 (10)	0.275	0.003	<0.001
ONL	87 (5)	60 (11)	58 (16)	<0.001	<0.001	0.371
Teljes retina	317 (12)	305 (20)	262 (19)	0.205	<0.001	<0.001
Perifériás régió						
RNFL	43 (2)	57 (9)	54 (14)	<0.001	0.002	0.396
GCL+IPL	67 (4)	50 (9)	49 (11)	<0.001	<0.001	0.839
INL+OPL	64 (4)	66 (4)	66 (6)	0.344	0.385	0.978
ONL	75 (3)	44 (10)	46 (14)	<0.001	<0.001	0.667
Teljes Retina	285 (7)	265 (22)	255 (20)	<0.001	<0.001	0.640



29. ábra. Sematikus ábra, amely a disztrófiás retina kóros szerkezeti változásait mutatja: az egyes retinarétegek vastagsága az excentricitás függvényében, az egészséges kontroll csoporttal (*felső sor*) összehasonlítva. *Középső sor:* DRF (detektálható retina funkció) csoport keresztmetszeti kép. *Alsó sor:* NCRF (nincs centrális retina funkció) csoport keresztmetszeti kép. A kék színvékonyodást, a rózsaszín vastagodást jelöl.

A fenti ábra reprezentálja, hogy a leginkább érintett a külső magvas réteg (ONL), mely a DRF (még nem kioltott funkciójú) csoportban a pericentrális és perifériás régióban is elvékonyodott, a NCRF (kioltott funkciójú) csoportban a makula teljes kiterjedésében, a foveális területen is vékonyabb. A belső magvas réteg (INL+OPL) a DRF csoportban sem a pericentrális, sem a perifériás régióban nem változott a kontrollhoz képest, az NCRF csoportban a pericentrális régióban vékonyabb, a perifériás régióban változatlan. A GCL(+IPL) réteg a kevésbé előrehaladott csoportban csak a perifériás makula régióban, az előrehaladottabb csoportban a pericentrális régióban is vékonyabb. Az RNFL réteg mindkét betegcsoportban csak a perifériás régióban változott, a kontrollhoz képest szignifikánsan vastagabb. A folyamat előrehaladtával az egyre centrálisabb és egyre belsőbb rétegek (először a fotoreceptorok, később a ganglionsejtek) változása is kimutatható.

Az ONL és a teljes retina vastagság a centrális régióban szignifikáns lineáris korrelációt mutatott a Log_{MAR} értékben kifejezett látóélességgel: ($r = -0.56$ és $r = -0.59$, $p=0.003$ és $p=0.002$) mindkét beteg csoportban, vagyis a jobb látóélesség a vastagabb ONL illetve teljes retina vastagsággal járt együtt. A többi réteg vastagsága illetve a pericentrális és paracentrális makula régiók és a látóélesség értékek között nem volt korreláció.

IV.2. LCA-EORD betegek vizsgálatának eredményei

IV.2.1. Klinikai vizsgálatok

A gyerekkori RD-s betegek fenotípusa 4 betegnél (1., 2., 6. és 7. beteg) a klasszikus, 1-es típusú LCA-nak, 3 beteg (3., 4. és 5. beteg) fenotípusa a 2-es típusú LCA-nak/EORD-nek felelt meg. Az 1. és 2. beteg testvérek, a szülők pár hónapos korukban vették észre a furcsa, szabálytalan szemmozgást mindkettőjükénél, ezért szemorvoshoz vitték őket. Több alkalommal történt vizsgálat más intézményben, a nystagmus miatt csak rossz minőségű elektrofiziológiai vizsgálat sikerült, a feltételezett diagnózisok „veleszületett látóideg rendellenesség ill. tapetoretinális betegség” voltak. A 6. beteget fél éves korban vizsgáltuk először klinikánkon, kereső szemmozgások és enophthalmus miatt.



30. ábra. A 6. beteg a követéses vizsgálatok kezdetén, enophthalmus

Ezt megelőzően, neurológiai eredetet feltételezve, intracraniális patológia kizárására koponya MR vizsgálat történt negatív eredménnyel. A 7. betegnek szintén pár hónaposan már sensoros nystagmusa volt, később vált egyértelművé enophthalmusa. Gf-ERG vizsgálat klinikánkon igazolta a kioltott retinális válaszokat, ily módon az LCA diagnózisát. A 3. beteg szülei a gyermek 1.5-2 éves kora körül észlelték, hogy sötétben bizonytalanul közlekedik, máskor azonban nem. Klinikánkon először 25 éves korában vizsgáltuk, előtte 7 szemorvos látta, definitív diagnózisa nem volt. A 4. beteget, bár fixálási képtelensége és nystagmusa már egyéves kora körül kiderült, szemészeti vizsgálaton a szemfenéken „régí hegeket” találtak, így korábban a disztrófia lehetősége nem merült fel. Az 5. beteget magán szemorvos utalta klinikánkra, 4 hónapos korától kishullámú szemtekerezgést és kancsalságot észleltek. Más intézményben flash-VEP vizsgálatot végeztek, a szülők elmondása szerint „eltérést nem találtak”. A retina disztrófia diagnózisa csak klinikánkon merült fel.

A hét beteg klinikai tüneteit és genetikai szubtypusát a 4. táblázatban foglaljuk össze.

4. táblázat. A magyar LCA-EORD betegek klinikai jellemzőit összefoglaló táblázat.

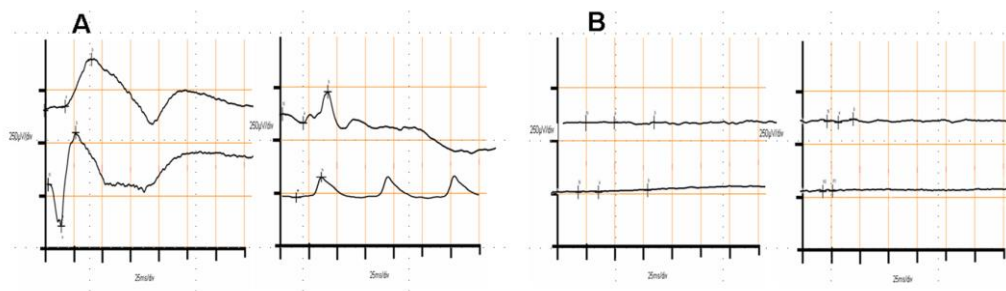
Az 1. és 2. betegek testvérek. kml = kézmozgás látás, szeou = szem előtti ujjolvasás, NM = nem említett, nyc = niktalópia, „?” = ismeretlen (nem azonosított) genetikai szubtípus.

A magyar Leber Congenitalis Amaurozisban szenvedő betegek klinikai jellemzői											
beteg	életkor	nem	subtípus	életkor a tünetek kezdetkor	életkor (év) (első / utolsó) vizsgálat idején	látóélesség	fotooverzió	nyc	maculopátia	hyper-pigmentáció	sárga-fehér depozitum
1	6	F	AIPL1	3 -4 hó	5 / 6	OU: kml	+	-	+	középperiféria	-
2	2,5	F	AIPL1	3 -4 hó	2,5 / 3,5	OD: kml OS: szeou	+	-	+	középperiféria	-
3	28	F	CRB1	1,5-2 éves kor	25 / 29	OD: 0, 2 > 0, 1 OS: 0, 1 > 0, 08	-	+	disztrófia	kevés, nummuláris	diffúz
4	7	F	CRB1	1 éves kor előtt	5 / 7	OD: 0, 04 OS: 0, 025	-	NM	atrófia	kevés, nummuláris	diffúz
5	8	N	CRB1	4 hó	7 / 8	OD: 0, 04 OS: 0, 04	-	+	enyhe	kevés, nummuláris	kevés
6	6	N	CEP290	6 hó kor előtt	1,1 / 5	OU: kml-szeou	NM	NM	-	kevés, nummuláris	részben konfluáló, makulát kíméli
7	7	F	?	?	7 / 8	OU: kml-szeou	NM	NM	-	só-bors eltérés	?

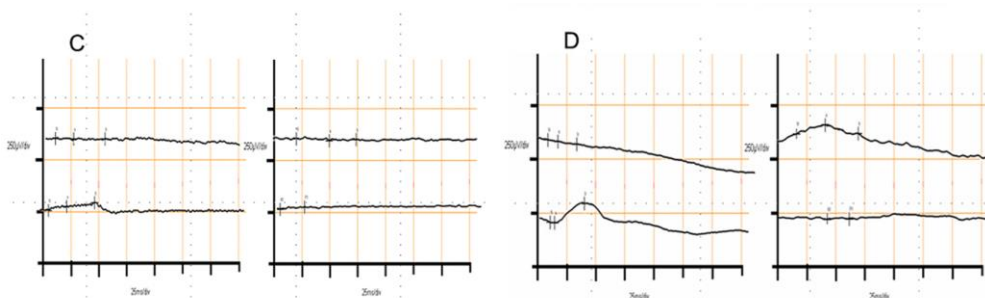
IV.2.1.1. Ganzfeld -ERG vizsgálat

A klinikai diagnózist mind a hét beteg esetében Gf-ERG vizsgálat alapján állítottuk fel. 5 beteg esetében mind a szkotópikus, mind a maximális, mind a fotópikus válaszok kioltottak voltak. A 4. beteg (7 éves, fiú) és az 5. beteg (8 éves, lány) egy-egy szemén csökkent amplitudójú maximális válasz kiváltható volt, a másikon a válaszok kioltottak voltak.

A 31. ábra egy egészséges korcsoportú kontroll (A. ábra) és egy LCA-ban szenvedő beteg kioltott Gf-ERG-jét (B. ábra), a 32. ábra a 4. beteg (C. ábra) és az 5. beteg (D. ábra) még kiváltható maximális válaszu Gf-ERG-jét mutatjuk be. A klinikai vizsgálatokat összefoglaló táblázatból kitűnik, hogy a 4. és 5. beteg egyaránt CRB1-szubsztípusú LCA/EORD-ben szenved, mely, legalábbis a korai életkorban, enyhébb lefolyású és még némi használható látás és retina funkció detektálható. Saját betegeink adatai az irodalmi adatokkal egybehangzanak.



31. ábra. Egészséges kontroll (A) és LCA-s beteg (B) kioltott Gf-ERGje. A bal felső negyed a szkotópikus, a bal alsó negyed a maximális válaszokat mutatja. Jobb oldalon felül a fotópikus választ, alul a fotópikus flicker válaszok ábrázolódnak.



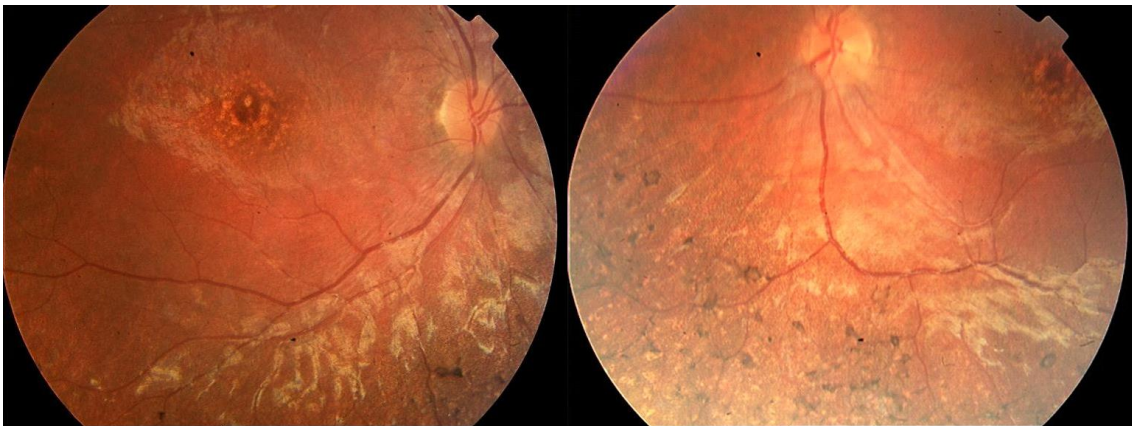
32. ábra. A 4. és 5. beteg Gf-ERG-je (mindkettő CRB1 szubsztípusú EORD, fiatal betegek). A maximális válasz (baloldalon, alul) mindkét betegben bár csökkent, de elvezethető, a szkotópikus (baloldalon, felül), fotópikus és fotópikus flicker válaszok (jobb oldalon) kioltottak.

IV.2.1.2. Látóélesség, látási teljesítmény

Az 1., 2., 6. és 7. beteg látási teljesítménye kml-szeou (\log_{MAR} 2.0-3.0), mely a klasszikus LCA-ban tapasztaltnak megfelel. A 3. beteg legjobb korrigált látási teljesítménye az összes beteg közül a legjobb: BCVA: 0.2/0.2, \log_{MAR} : 0.7/0.7), a 4. és 5. betegek látása (BCVA) 0.025-0.04, (\log_{MAR} 1.5-1.4) amely kismértékben, de egyértelműen jobb, mint a klasszikus LCA-ban és megfelel a 2-es típusú LCA/EORD fenotípusának. Minden beteg refrakciója hipermetróp volt (+2.0D -+7,5 D szférikus komponens).

IV.2.1.3. A retinális fenotípus

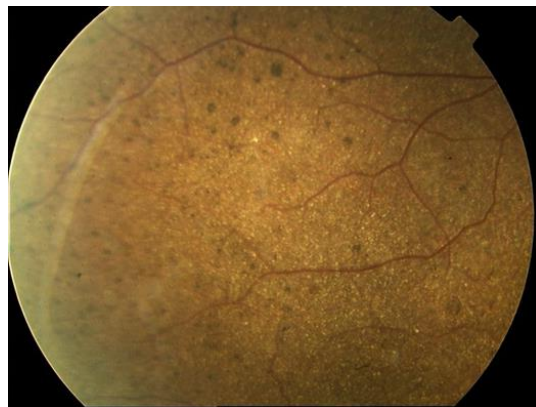
1. és 2. beteg: a két fiú testvérpár, a szemfenéki képük hasonló, de az idősebb dokumentációja a nagyfokú fotoaverzió és a fixáció hiánya miatt csak gyenge minőségben volt lehetséges, ezért annak bemutatásától eltekintünk. A látóidegfő széle éles, nem decolorált, az erek nem szűkek, lefutásuk szabályos. A maculában kifejezett RPE diszrupció látható, depigmentált foltokkal, mely körkörös jellegű mintázatot mutat. A középperiférián összefüggő, kiterjedt, nagyobb szemcsés (nem csontsejt jellegű) hiperpigmentáció látható.



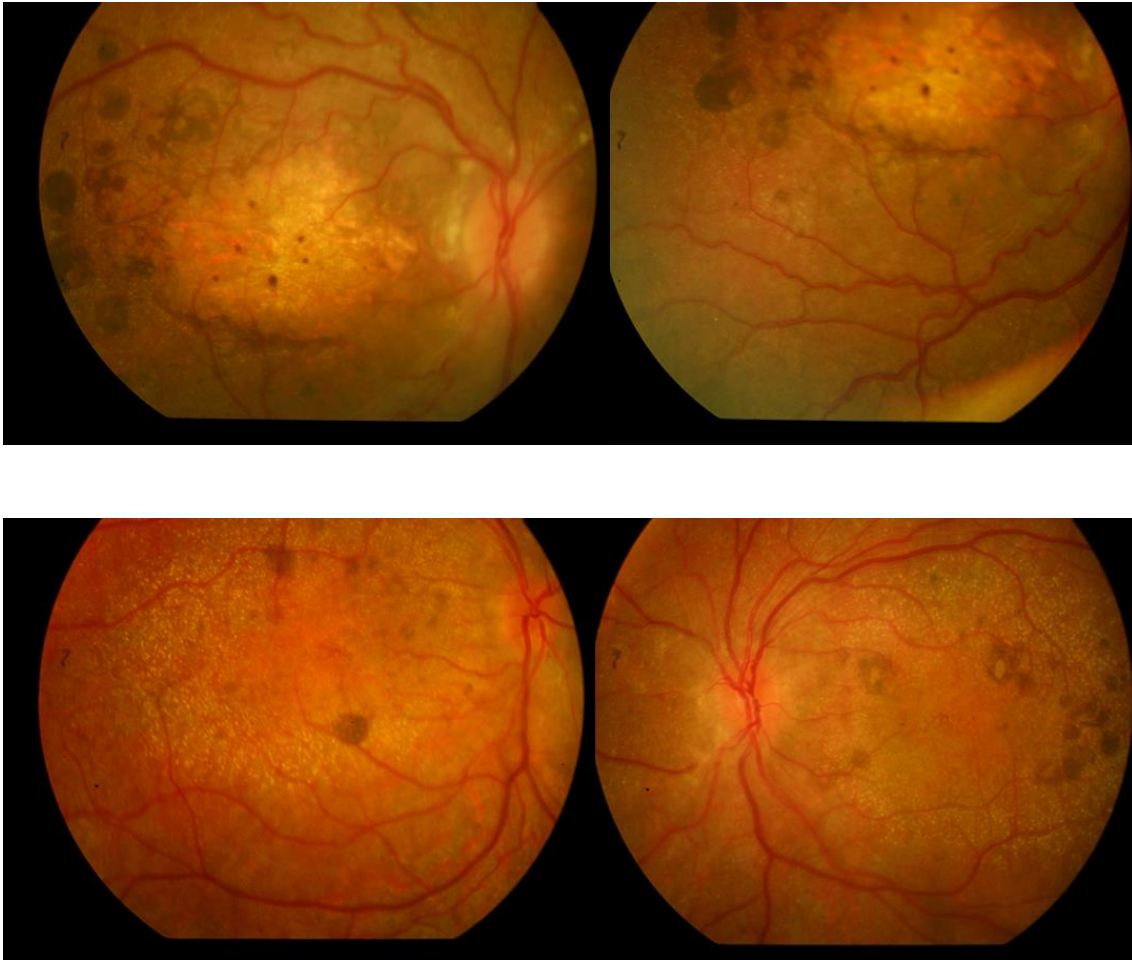
33. ábra. A 2. beteg szemfenéki képe, 3 éves fiú, klasszikus LCA, AIPL1 szubtypus. Jellemző pigmentáció a makulában és a középperiférián. Látási teljesítmény kézmozgás látás.

3., 4. és 5. számú beteg:

A 3. beteg bal szemén a papilla nasalis részén drusenoid elváltozás látható, a másik papilla eltérés nélkül. A 4. és 5. beteg papillája élesszélű, nem decolorált, ép. Mindhárom beteg szemfenéki erei normál tágasságúak, lefutásuk szabályos, a szemfenéken elszórtan különböző mennyiségű és elhelyezkedésű sárgás-fehér pöttyök, valamint 1-1 kisebb-nagyobb, nummuláris hiperpigmentált folt látható. Mindhárom betegben különböző mértékű makulopátia mutatkozott, hiperpigmentáció nélkül, mely a 4. betegben volt a legsúlyosabb és az 5. betegben a legenyhébb.



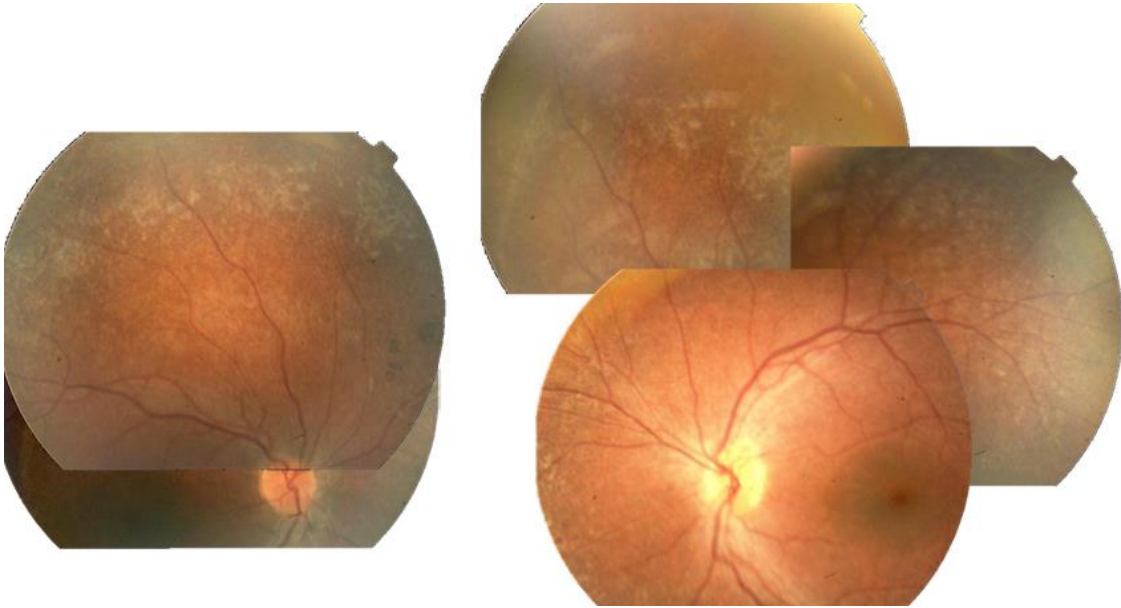
34. ábra. 3. beteg, 28 éves férfi. EORD, CRB1 szubtypus: *Felső sor:* mindkét szem: bal papillán drusenoid elváltozás, fundusszerte sárgás apró foltozottság, 1-1 kisebb nummuláris pigmentfolt, makulopátia, hiperpigmentáció nélkül. Látóélesség 0.1-0.2 *Alsó kép:* jobb szem, perifériás retina. Diffúz apró sárga depozitumok illetve elszórtan kerek nummuláris hiperpigmentáció látható.



35. ábra. 4. és 5. beteg, EORD, CRB1 szubttípus *Felső sor:* 5 éves fiú, jobb szem: ép papilla, körülötte és a kerek pigmentfoltoktól temporálisan sárga pontszerű foltok, súlyos atrófiás makulopathia. A jobb oldali képen látható az erek kifejezett kanyargóssága és a középperiférián a sárgás szemcsés depozitumok. Látási teljesítmény excentrikusan 2-3 mou. *Alsó sor:* 6 éves leány: ép papillák és erek, a hátsó póluson számos kerek pigmentfolt, a bal papilla mellett és a makulák körül sárgás pöttyök, enyhe maculopathia, hiperpigmentáció nélkül. Látási teljesítmény: 3 -4 mou.

6. beteg:

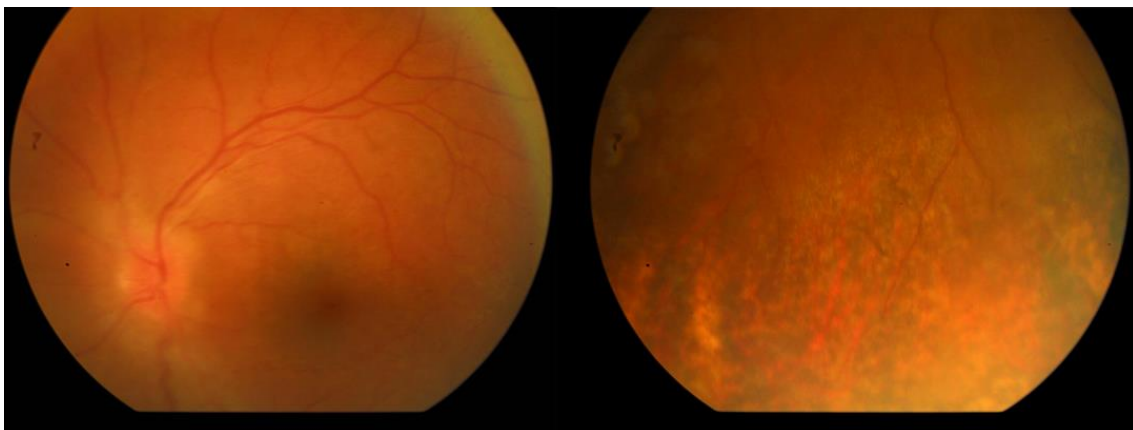
A papillák épek, makulopathia nem látható, erek lefutása és tágassága szabályos, a középperiférián kiterjedten, konfluáló fehéres foltok, a jobb papilla felett nasalisán néhány kerek hiperpigmentált folt látható. (36. ábra)



36. ábra. 6. beteg, 5 éves lány, klasszikus LCA, CEP290 szubtypus. Mindkét oldalon ép papillák és makula látható. Az erek lefutása szabályos, a középperiférián részben konfluáló fehéres foltozottság látható. A látási teljesítmény kézmozgáslátás-fényérzés.

7. beteg:

A papillák épek, makulopátia nem látszik, az erek lefutása szabályos, a periférián diffúz só-bors jellegű szemcsés pigment mintázattal. (37. ábra)

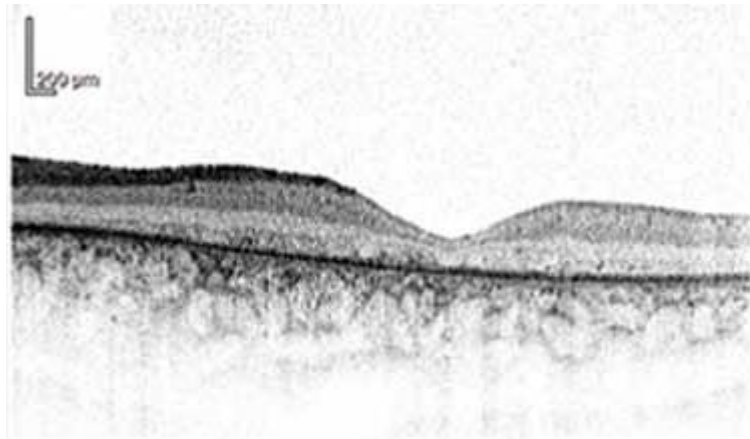


37. ábra. 8 éves fiú, bal szem. Klasszikus LCA, szubtypus ismeretlen. Látási teljesítmény: kézmozgás látás

IV.2.1.4. Optikai koherencia tomográfia

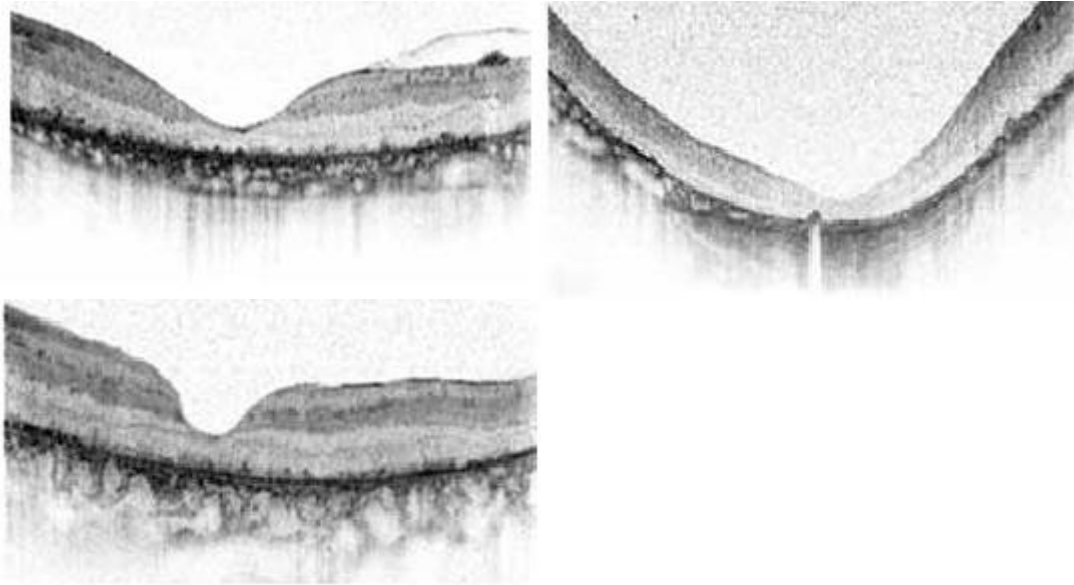
Az 1., 6. és 7. betegben (mindhárom 1-es típusú LCA) OCT vizsgálatot vagy egyáltalán nem vagy csak nagyon rossz, nem értékelhető minőségben tudtunk végezni, részben a fotoaverzió, részben a fixálási képtelenség és a kooperáció hiánya miatt.

A 2., 3., 4. és 5. beteg esetében Heidelberg Spectralis OCT-vel (Spectralis OCT, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Németország) történt vizsgálat. A 2. betegben mind a foveális vastagságot (90 μm), mind az extrafoveális retina teljes vastagságát, utóbbit különböző lokalizációkban mérve (180-200 μm) a normálisnál vékonyabbnak találtuk (norm:223 \pm 36 μm). (85) (38. ábra)



38. ábra. A 2. beteg (AIPL1 genotípus) Heidelberg Spectralis OCT képe.

A 3., 4. és 5. betegben egyhangúan az extrafoveális retina diffúz megvastagodása (337-420 μm) figyelhető meg. A 4. betegben a foveális régióban a retinarétegek nem különböztethetőek meg és az RPE és chorioidea is hiányzik, mely a diffúz makuláris atrófia képének felel meg. A teljes retina vastagsága a legvékonyabb helyen 72 μm volt. A 3. és 5. beteg foveális behúzotttsága megtartott volt, az idősebb betegben kiszélesedett. A foveális vastagság mindkét betegben csökkent, (102 és 134 μm). Az intraretinális rétegek megkülönböztethetősége a normális retinával összehasonlítva csökkent, az idősebb (3. számú) betegben kifejezettebben. Az RPE-fotoreceptor réteg nyomokban detektálható. (39.ábra)



39. ábra. A 3., 4. és 5. számú beteg Spectrális OCT képe. Felső sor: bal oldalon a 3. számú beteg, jobb oldalon a 4. számú beteg. Alsós sor: 5. számú beteg. Mindháromban megfigyelhető az extrafoveális retina diffúz megvastagodása és a pigmenthám+fotoreceptor réteg maradványai, egyenetlen volta.

IV.2.2. A genetikai vizsgálatok eredményei

A microarray vizsgálat az 1., 2., 3. és 4. betegben mindkét (anyai és apai) allélen talált kóros mutációt, az 1. és 2. beteg esetében az AIPL1 génben, a 3. és 4. beteg esetében a CRB1 génben, ugyanakkor az 5. és 6. betegben csak egy-egy egyszerű heterozigóta mutációt azonosított a CRB1- illetve a CEP290 génben. A 7. betegben a microarray egyik allélen sem talált eltérést. A CRB1 gén relatív rövid és az 5. beteg klinikai megjelenése megfelelt az irodalomban közölt CRB1 fenotípusnak, ezért a második mutáció azonosítása céljából a teljes CRB1 gén direkt (Sanger) szekvenálása történt. A CEP290 gén 55 exont tartalmaz, a gén nagysága miatt célzott NGS vizsgálat történt. Az identifikált patogén mutációk validálását direkt szekvenálással végeztük. Az eredményeket a 5. táblázatban foglaltuk össze.

5. táblázat. A magyar LCA-EORD betegek genetikai vizsgálatának eredményei

A magyar Leber Congenitalis Amaurózisban szenvedő betegek genetikai adatai				
Beteg	Érintett gén	exon	Mutáció	aminosav változás
1.	AIPL1	6	c.834 G>A / c.834 G>A	p.W278X / p.W278X
2.	AIPL1	6	c.834 G>A / c.834 G>A	p.W278X / p.W278X
3.	CRB1	9	c.2843 G>A / c.2843 G>A	p.C948Y / p.C948Y
4.	CRB1	7/9	c.2536G>T / c.2843G>A	p.G846X* / p.C948Y
5.	CRB1	7/9	c.2555T>C / c.2843G>A	p.Ile852Thr / p.C948Y
6.	CEP290	IVS25	c.2991+1655A>G	p.C998X
		37	c.4929delA	p.Lys1643fsX2*
7.	NI	ND	ND	-

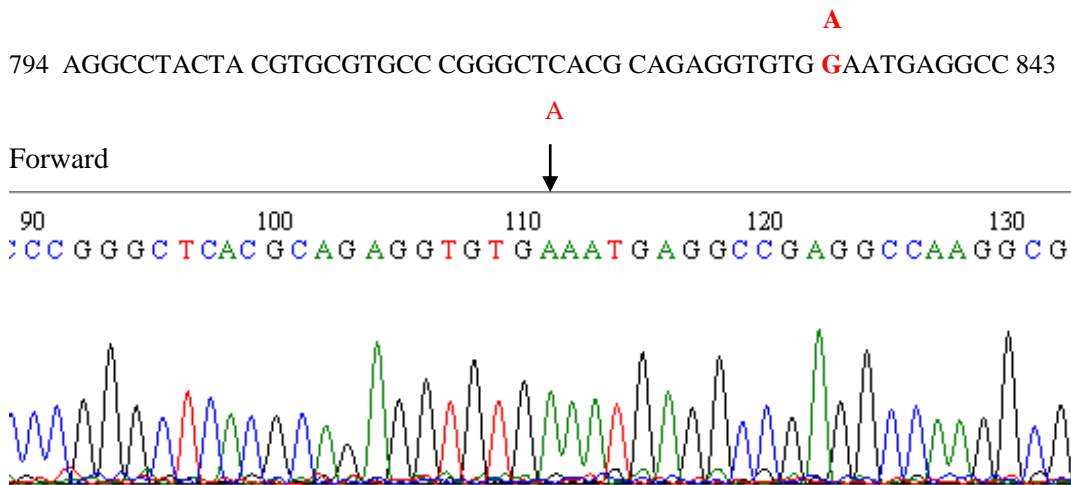
* új mutáció, irodalomban eddig nem közölt

NI = nem identifikált

ND = nem detektált

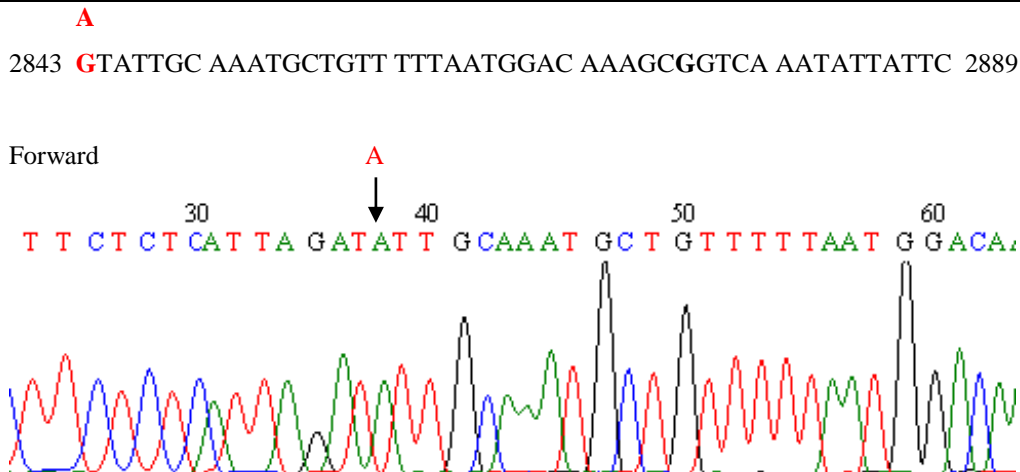
Az összefoglaló táblázatból kitűnik, hogy három különböző génben összesen hat különböző mutációt azonosítottunk a betegeinkben, az *AIPL1* génben a **c.834G>A (p.Thr278X)** mutációt homozygóta formában az 1. és 2. betegben, a *CRB1* génben a **c.2843G>A (p.C948Y)** mutációt homozygóta formában a 3. betegben és összetett heterozygóta formában a 4. és 5. betegben. A *CRB1* génben további két mutáció került detektálásra, ezek a **c.2536G>T (p.G846X)** mutáció a 4. betegben és a **c.2555T>C (p.Ile852Thr)** szubsztitúció az 5. betegben, utóbbi kettőt heterozygóta formában. A *CEP290* génben a 6. betegben a **c.2991+1655A>G (p.C998X)** és a **c.4929delA (p.Lys1643fsX2)** mutációkat azonosítottuk összetett heterozygóta formában.

AIPL1	exon	6	834G>A	W278X	A/T	HOM
--------------	-------------	---	--------	-------	-----	-----



40. ábra. 1. beteg. AIPL1 gén: A mikroarray eredményének validálása direkt szekvenálással. A 834 nukleotid **G**uanin helyett **A**deninnel helyettesítődik, mely ilyen módon a stop kodon (TG**A**) utolsó nukleotidja lesz. (TGG AAT helyett TGA AAT)

CRB1	exon	9	2843G>A	C948Y	A/T	HOM
-------------	-------------	---	---------	-------	-----	-----



41. ábra. 3. beteg, CRB1 gén: A mikroarray vizsgálat eredményének validálása direkt szekvenálással. A 2843. nukleotid **G**uanin helyett **A**deninnel helyettesítődik, melynek eredménye egy nukleotid csere (TG**T** helyett T**A**T), vagyis cisztein helyett tirozin kerül az aminosav láncba.

CRB1 exon 7 2536G>A, novel G>T G846R, novel G846X **G!T/C!A**
heterozygóta

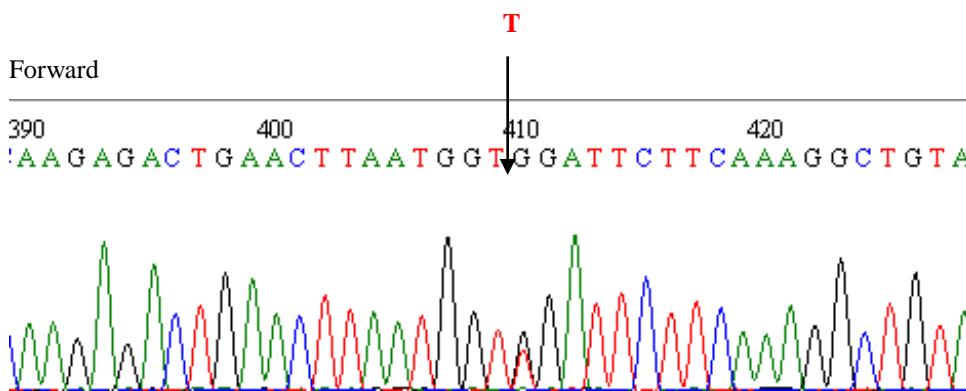
Referencia szekvencia:

(a referencia szekvencia alapján várt szekvencia: **2536G>A**)

A

2519 AGACTGAACT TAATGGT**G**GA TTCTTCAAAG GCTGTATCCA AGATGTAAGA 2568

A 4. beteg szekvenálási eredménye: 2536G>T



42. ábra. 4. beteg, CRB1 gén. A mikroarray vizsgálat eredményének validálása szekvenálással. A referencia szekvencián (vad típus, egészséges kontroll) a 2536 nukleotidnak megfelelően **G**uanin található, a várt, ismert mutáció **A**denin, melyet a mikroarray tartalmazott. A 4. betegben, ezen a lokuszon **T**imin található, mely egy stop codon első nukleotidja (**G**GA helyett **T**GA). A 4. beteg ezen mutációja egy eddig nem közölt nonszensz mutáció.

Megjegyzés:

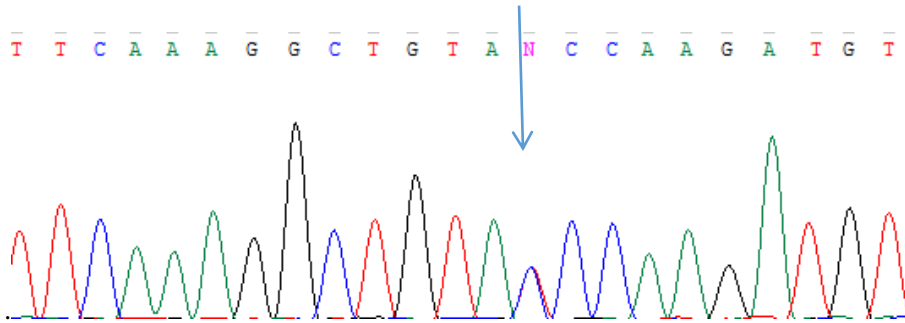
STOP codonok: TAG ,TAA, TGA triplettek

CRB1 exon 7 c.2555T>C p.Ile852Thr HET MUT

Referencia szekvencia:

C
↓

2519 AGACTGAACT TAATGGTGGA TTCTTCAAAG GCTGTATCCA AGATGTAAGA 2568

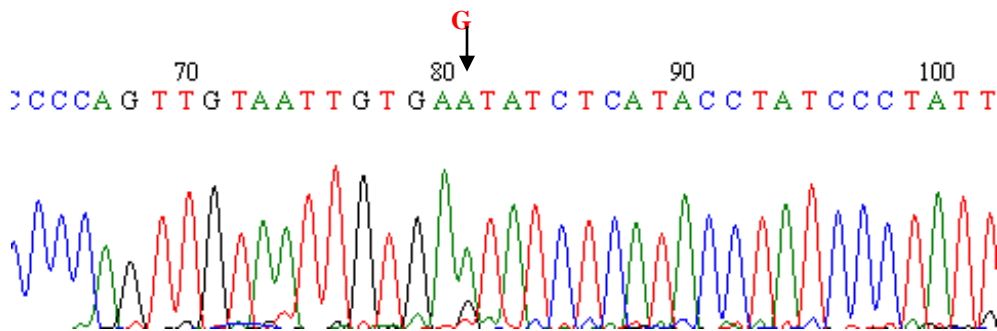
Szekvenálás eredménye:

43. ábra. 5. beteg. CRB1 gén: a beteg második mutációját a CRB1 gén teljes szekvenálásával azonosítottuk. A 2555 nukleotidnak megfelelően **T**imin helyett **C**itozin van, ennek következtében az eredeti isoleucin (**A****T****C**) helyett threonin (**A****C****C**) kerül az aminosav láncba.

CEP290	IVS25	2991+1655 A>G	C998X	AG/TC	HET
--------	-------	---------------	-------	-------	-----

G

CACCTGGCCC CAGTTGTAAT TGTGAATATC TCATACCTAT CCCTATTGGC AGTGTCTTAG



44. ábra. 6. beteg, CEP290 gén. A mikroarray eredményének validálása direkt szekvenálással. Az „A helyett G” csere a mRNS intron 26.-ban van, vagyis a nem kódoló szakaszban. Az „AT” helyett „GT” változás történik a szekveniában, ez pedig invariáns szekvencia az intronok végén, ami „intron-exon határt” jelez, és kóros helyen értelmezi az exon kezdetét (aberráns splicing). Következésképpen egy 128 bp nagyságú rejtett exon épül be a 26. és 27. exon közé, mely tartalmazza a „stop kodon”-t. Az ábra csak az intronikus mutációt ábrázolja, a stop kodon nem látható.

Szekvenálás eredménye

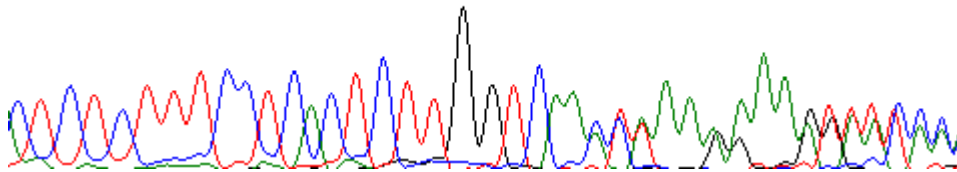
CEP290: c.4929delA /p.lys.1643fs*2 HET

Referencia szekvencia (wt)

wt-> CTCTCTTTCCTCACTCTTGGTCA¹⁶⁴³AAA CTA AAG AAA GTA TCACAAGATTTGGAGA
 mu-> CTCTCTTTCCTCACTCTTGGTCA AAC TAA AGAAAGTATCACA
¹⁶⁴³Asp stop

Referencia szekvencia:CTCTCTTTCCTCACTCTTGGTCAA^ACTAAAGAAAGTATCACAAGATTTGGAGA**Szekvenálás eredménye:**

CTCTCTTTCCTCACTCTTGGTCAACTAAAAAAAGTTACCA/



45. ábra. 6. beteg, CEP290 gén: a célzott újgenerációs szekvenálás eredményének validálása direkt szekvenálással. A c.4929delA /p.Lys1643fs2 mutációnál az **A**denin törlődése a leolvasási kereteltolódását okozza, így a 1643 aminosav lizin (AAA) helyett asparagin (AAC) lesz, melyet rögtön követ egy stop kodon (**TAA**) a 1644 Leucin (**CTA**) helyett.

IV.2.3. A genetikai eredmények bioinformatikai feldolgozása, a talált mutációk patogenitásának megítélése, illetve vizsgálata

Saját betegeinkben azonosított, az irodalomban korábban már ismert, az adott génben leggyakoribb mutációkat a „Megbeszélés fejezetben” tárgyaljuk ezek a következők: az AIPL1 génben a c.834G>A (p.W278X) mutáció, a CRB1 génben a c.2843G>A (p.C948Y) mutáció és a CEP 290 génben a c. 2991+1655 A>G (p.C998X) mutáció.

A másik három mutációból kettő új, eddig az irodalomban nem közölt, ezért „in silico” patogenitás predikciós szoftverrel (Mutation Taster) vizsgáltuk őket. Az 5. betegben talált c.2555T>C (p. Ile 852 Thr) már ismert patogén mutáció (Reference ID: rs62636271), azonban predilekciós vizsgálatát részben relatív ritkasága, részben „misszensz” volta miatt végeztük el. Korábban homozygóta formában egy vérrokon szíriai család négy gyermekéből háromban mutatták ki. (96)

A két új mutáció közül az egyik a CRB1 génben egy nonszensz mutáció, a másik a CEP290 génben egy, célzott NGS vizsgálattal azonosított, 1 nukleotidot érintő deléció.

Az NGS során összesen 780 vizsgált SNP-ből 28 variáns volt figyelemre méltó, ebből 4 variáns előfordulása volt 1 %-nál ritkább a normál kaukázusi népességben. Ezek közül a CEP290 gén 37 exonján talált (NM_025114: c4929delA / p.Lys1643fs*2, eredmény: GT/ T) egy bázis (A) deléciója, mely kereteltolódást (frameshift) okoz, melyet közvetlenül utána egy stopkodon követ. (lásd 45.ábra)

Ennek megfelelően a két új mutáció patogenitása nem kérdéses, az „in silico” értékelést összefoglalásként végeztük el. (6. táblázat, Mutation Taster eredménye)

6.táblázat. Az LCA-EORD betegeinkben azonosított kettő új és egy ritka misszensz mutáció Mutation Taster predikciós szoftverrel történt analízisének eredményei

Gén	SCORE	Kromoszóma lokalizáció	DNS változás	Hatás	Érintett domain
CRB1	6,0	1.kr.197396991 G>T	bp csere Gly846X	NMD	Laminin G szerű 2 Domain
CRB1	89	1.kr.197397010 T>C	bp csere Ile852 Thr	NMD	Laminin G szerű 2 Domain
CEP290	1,0	12.kr.88476891_8 8476891delT	deléció Lys1643Asn	NMD	7.α-hélix fehérjehurok Phosphoserine domain

NMD: Nonsense Mediated decay

V. Megbeszélés

Jelen vizsgálatunk a retina szerkezete és működése közti összefüggést vizsgálta előrehaladott RP betegekben a mf-ERG és az OCT képek szegmentációs elemzésével, az excentricitás és a funkcionális állapot függvényében.

Az értekezés másik része a magyar korai életkorban kezdődő RD-s betegek részletes klinikai és genetikai vizsgálatát foglalja össze és azokat hasonlítja össze az irodalmi adatokkal.

V.1. Retinitis pigmentosa betegek

A retina disztrófiás szemekről rendelkezésre álló kevés szövettani vizsgálat egybehangzóan a fotoreceptorok, elsősorban a külső szegment érintettségét, megrövidülését írja le kezdeti elváltozásnak, függetlenül az öröklésmenettől és a kezdeti tünetek fellépésének idejétől is. (11, 47, 48) A betegség progressziójával egyes esetekben a centrális látás hosszabb ideig megtartott, más esetekben elvész, mely a foveához közeli fotoreceptorok érintetté válásának a következménye. (47)

Számos közlemény számolt be arról, hogy a szövettani vizsgálatokhoz hasonlóan az ONL elvékonyodása in vivo (OCT-vel) is kimutatható. (97, 98)

Jelen tanulmányt megelőzően a makuláris régió intraretinális rétegvastagságait topografikusan, az excentricitás függvényében nem vizsgálták. A mf-ERG vizsgálattal a centrális retina funkció változása követhető, a fotoreceptor veszteséssel párhuzamosan a centrális válaszsűrűség értékek csökkennek esetleg kioltottá válnak.

V.1.1. A külső nukleáris réteg (ONL) változása

Saját vizsgálataink eredménye szerint az ONL vastagsága csak a centrális makula régióban volt megtartott és csak azokban a betegekben, akiknek volt detektálható retinális elektromos válasza, ezzel ellentétben szignifikánsan vékonyabb volt a kioltott mfERG-jű betegcsoportban. Ezen eredmény az OCT vizsgálatok és az elektrofiziológiai eredmények összhangjára, azok párhuzamos változására utal.

Másfelől, az ONL szignifikánsan vékonyabb volt mindkét betegcsoportban a kontrollhoz viszonyítva a pericentrális és perifériás régiókban egyaránt. Mindkét régióban a mfERG válasz kioltott volt. Az utóbbi két régióban az ONL vastagsága nem különbözött a betegcsoportok között, ez szintén a szerkezeti és funkcionális változások párhuzamos változására utal.

Vizsgálataink eredménye egybehangzó korábbi közleményekkel, melyek RP betegekben OCT-vel a fotoreceptor réteg elvékonyodását találták. Hood és munkatársai a fotoreceptor és RPE komplex vastagságbeli csökkenését írták le, Witkin és munkatársai high-resolution OCT-vel a makuláris fotoreceptor külső szegment és RPE komplex vékonyodását találta. (97, 98, 99, 100) Saját vizsgálati eredményeink valamint az irodalomban korábban közölt OCT vizsgálatok eredményei egybehangzanak a szövettani vizsgálatok eredményével, mely szerint a fotoreceptor külső szegmentjének rövidülése a legkorábbi morfológiai eltérés lehet retinitis pigmentosa betegségben.

V.1.2. Az INL+OPL komplexum változása

A fotoreceptor pusztulás következményes változásokat indukál a belső retina rétegekben, az RPE és a glia sejtekben is. (47) Az INL számos neuron magját tartalmazza, nevezetesen a bipoláris, a horizontális, az amakrin, valamint a Müller sejteket is. Irodalmi adat, hogy a betegség előrehaladtával a Müller sejtek hipertrófiáznak (47, 49)

A külső retina vastagság csökkenésével ellentétben az INL+ OPL rétegek változásait illetően az irodalmi adatok korántsem ilyen egyértelműek. (99, 101, 102)

Jelen tanulmányunkban az INL+OPL komplexum vastagsága a pericentrális makula régióban szignifikánsan vékonyabb volt a kioltott mfERG csoportban, de nem a még elektromosan aktív (DRF) betegcsoportban. A perifériás makula régióban ezzel ellentétben az egészséges kontrollok és a két betegcsoportban mért vastagsági értékek között nem volt különbség, A jelenség hátterében az állhat, hogy a fotoreceptor degeneráció maga után vonja a „második neuron” pusztulását, ezzel egyidőben a Müller glia hiperpláziája is megfigyelhető, mely az INL réteg vékonyodást, legalábbis morfológiai szempontból ellensúlyozhatja (47)

A korábbi szövettani és OCT vizsgálatok nem találtak szignifikáns változást az INL rétegben retinitis pigmentosa szemekben. (48, 97) Hood in vivo OCT vizsgálattal normál közelinek mérte az INL réteg vastagságát.

V.1.3. A GCL+IPL komplexum változása

A GCL+IPL komplexum vastagságát a pericentrális régióban változatlanul találtuk a DRF csoportban, míg a perifériás régióban vékonyodás volt megfigyelhető. A perifériás és pericentrális régiókban is vékonyabb volt a GCL+IPL komplex a kioltott elektromos válaszü betegcsoportban. Ez a kifejezettebb fotoreceptor pusztulást követően nagyobb mértékű transzneurális degenerációra, nevezetesen a második (INL) és harmadik neuronok (GCL) nagyobb fokú pusztulására utal az NCRF csoportban. Másik nézőpontból nézve, a centrális makulában a csapok aránya magasabb és a RP primeren a pálcikák betegsége, ílymódon a fotoreceptor pusztulás és a transzneurális degeneráció kisebb mértékű lehet a kevésbé előrehaladott betegség stádiumban a centrális és pericentrális régiókban, mint a perifériás területen. A DRF csoportban a pericentrális régióban a GCL+IPL komplex változatlan vastagságát ez magyarázhatja, az ezen régióban talált csökkent ONL vastagság mellett. Az NCRF csoport eredményei arra engednek következtetni, hogy a pericentrális ganglionsejtek a betegség előrehaladtával szintén degradálódnak. Postmortem vizsgálatok a ganglionsejtek számának szignifikáns csökkenését találták közepesen súlyos és súlyos RP betegek szemében. (47, 48) Ezen eredmények egybevágóak saját eredményekkel.

Aleman és munkatársai a fentekkel ellentétben az ONL réteg vékonyodásával párhuzamosan a belső retina vastagodását figyelték meg, míg Hood és munkatársai a GCL+IPL rétegek vastagságát a normálhoz közelinek találták OCT-vel. (97, 99)

V.1.4. Az RNFL réteg változása

Az RNFL réteg kifejezett megvastagodása volt megfigyelhető a perifériás régióban mindkét betegcsoportban. Ez a jelenség kezdődő epiretinális membrán képződésre utalhat, mely szövettani vizsgálatok alapján a látóidegfő felszínén lévő astrocyták proliferációjának az eredménye, amennyiben a folyamat tovább folytatódik a periféria

felé. (47) Mindezek ismeretében nem meglepő, hogy az általunk vizsgált RP betegek szemeiben az RNFL a látóidegfőhöz közelebbi (perifériás makula) régióban volt vastagabb, míg a pericentrális régióban csak enyhe vastagság csökkenés volt megfigyelhető az NCRF csoportban, feltehetően a ganglion sejtek és a belőlük induló axonok pusztulásának következményeként. Korábbi, OCT-vel végzett, a peripapilláris RNFL vastagságot mérő vizsgálatok egymással ellentétes eredményekre jutottak: kimutatták az RNFL réteg vastagodást és vékonyodását is RP betegek szemeiben. (99, 101, 102)

V.1.5. A teljes retina vastagság változása

Vizsgálati eredményeink is alátámasztják illetve igazolni látszanak, hogy a retina az elsődleges fotoreceptor pusztulás után fokozatosan degenerálódik, mely eléri a ganglion sejteket is. Ezt a *teljes retina vastagság* változása is reprezentálja: azokban a szemekben, ahol volt még detektálható mfERG válasz, a centrális makula régióban az ONL vastagsága nem csökkent, ez egyben a teljes retina vastagság is. A pericentrális régióban azonban a teljes retina vastagság szignifikánsan csökkent a kontrollokhoz képest, de egyúttal vastagabb, mint az NCRF csoportban. A perifériás makula régióban a teljes retina vastagság már mindkét betegcsoportban egyformán csökkent volt.

Jelen ismeretek szerint a retina disztrófiák nem gyógyíthatóak. A génterápiás kísérletek mellett figyelemre méltó a különböző retina implantatumok szerepe, mely előrehaladott esetben szinte az egyetlen látásjavító lehetőség. Az implantatum összetett mikroelektronikai berendezés, mely a retina megmaradt, még működőképes sejtjeit stimulálja, helyettesítve az elpusztult fotoreceptorokat. A szembe ültethető retina implantatumok kutatása és fejlesztése az 1990-es években kezdődött. Az optimális eredmény eléréséhez fontos a megfelelő beteg kiválasztása, vagyis egy adott betegben a retina egyes rétegvastagsági változásának topografikus ismerete.

Egy ausztrál munkacsoport, Olpie és munkatársai a személyre szabott epiretinális implantatum kifejlesztésén dolgozik, melyhez 88 RP beteg OCT által meghatározott vastagsági adatait elemzi. Az epiretinális implantatum penetráló elektródjának optimális hosszát a ganglionsejtek szelektív stimulációjához 30-100 μm -ben, az INL-ben lévő

interneuronok stimulációjához 100-200 μm -ben állapította meg (103) Közleményében hivatkozik a jelen dolgozat egyik alapját képező Investigative Ophthalmology and Visual Science-ben megjelent cikkünkre is. Magyar viszonylatban kiemelkedő Kusnyerik és azon magyar szemsebészeti csoport munkássága, aki a Tübingeni Egyetemi Szemklinikával együttműködve, magyar retina disztrófiás betegek szemébe elsőként ültetett be szubretinális retina implantatutumot.

V.2. LCA-EORD betegek

Értekezésem második fele a magyar korai életkorban kezdődő retina disztrófiás betegek klinikai és genetikai vizsgálatait foglalja össze. Ezen betegcsoport előfordulási gyakoriságát (1:50-80 000) figyelembe véve, Magyarországon számuk 125-200 közé tehető. Klinikánkon részletes klinikai és genetikai vizsgálat 7 esetben történt.

Mint ismeretes, a klinikai diagnózis alapja a Gf-ERG, a genetikai vizsgálat célja ezen betegcsoportban a genetikai szubtípus megállapítása és egyben a klinikai diagnózis megerősítése. A genetikai diagnózis prognosztizálja a várható hosszútávú látási teljesítményt (LCA vagy EORD), megkönnyíti a várható kórlefordulás megítélését és esetleges genetikai tanácsadás alapjául is szolgál. A génterápiás lehetőségek fejlődésével fontos lehet az optimális terápia meghatározásához, hogy egy adott egyénnek melyik génben, milyen típusú mutációja van.

Saját betegeink vizsgálata során az elvégzett genetikai vizsgálat 6 beteg esetében mindkét allélen talált kóros mutációt, melyek minden esetben megerősítették a klinikai diagnózist. Az azonosított gének az AIPL1, a CRB1 és a CEP290 voltak, mindhárom gén a nyugat-európai és egyesült államokbeli, alapvetően kaukázusi betegekben azonosított leggyakoribb LCA-EORD gének közé tartozik. (104, 105) Az AIPL1 szubtípus 4-7 %-ban, a CRB1 szubtípus 7-10%-ban, a CEP290 génhez köthető szubtípus 15-20%-ban fordul elő az ezidáig genetikailag azonosított LCA-EORD betegek között. A bevezetőben leírtak és irodalmi adatok szerint az AIPL1 és a CEP290 génhez kötött korai retina disztrófiák klasszikus 1-es típusú LCA-nak felelnek meg, míg a CRB1 szubtípus EORD, más nomenklatura szerint 2-es típusú „LCA”. (12, 14)

V.2.1. A látási teljesítmény és a genetikai szubtípus összefüggése

Saját betegek látási teljesítménye a három CRB1 szubtípusú betegben jelentősen jobb volt, mint az AIPL1 és CEP290 mutációt hordozó másik 3 betegé. (4. táblázat) Megjegyzendő, hogy betegek közül a legidősebb, 25 éves (CRB1 homozygóta mutációt hordozó) beteg volt az egyetlen, akinek látóélessége 0,1 nál jobb volt az első vizsgálat idejében. Ezen tény is mutatja, hogy az EORD relatív jobb funkcióval jár, legalábbis az első életévekben, évtizedben, mint a klasszikus LCA. Vizsgálati eredményeink a látásfunkciót illetően az irodalmi adatokkal megegyeznek. (12, 105, 106, 107, 108, 112)

V.2.2. Funkcionális eltérések, Ganzfeld-ERG

Betegek közül csak az EORD klinikai képnek megfelelő, 10 év alatti 2 gyerek Gf-ERG-je nem volt kioltott, (4 és 5 beteg), mindkettőnek reziduális, de egyértelműen detektálható maximális válasza volt. (32. ábra) A 25 éves EORD illetve klasszikus LCA betegek válasza kioltott volt, utóbbi az LCA diagnózisának alapja. A Gf-ERG válaszok szintén megfelelnek az irodalmi adatoknak: az EORD lényegét tekintve korai életkorban fellépő progresszív pálcika-csap disztrófia, gyermekkorban egyes esetekben még detektálható reziduális retinális válaszokkal.

V.2.3. Morfológiai eltérések: a retinális fenotípus és a genetikai szubtípus összefüggése

Az LCA-EORD betegek retinája születés után illetve pár hónapos korban nem feltétlenül mutat eltérést. Az idő előrehaladtával, a fotoreceptorok pusztulásával párhuzamosan egyre nagyobb a hiperpigmentált területek aránya és idős korban, csak a szemfenéki kép alapján, a kórelőzmény ismerete nélkül az RP-től nehezen különíthető el. Saját betegek közül a legfiatalabb életkorban, 1 éves kor előtt, a CEP290 génhez kötött beteget vizsgáltam, akinek szemfenekén az első vizsgálat alkalmával az egyetlen eltérés a perifériás retina igen finom márványszerű színe volt. Ezzel ellentétben, a második vizsgálat során, 18 hónaposan a perifériás retinán már konfluáló fehér foltok voltak láthatók, A maculában eltérés nem volt látható. (36. ábra).

Bizonyos fenó-genotípus összefüggést leírt az irodalom, a jellegzetes szemfenéki képeket az alábbiakban ismertetjük.(12, 14)

V.2.3.1. Az AIPL1 génhez kötött szubtypus

A típusos beteg születéstől nagyon gyenge látású, látási teljesítménye kézmozgás látás-fényérzés tartományba esik, mely a későbbiekben gyakran fényérzés nélkülivé válik. Gyakori a fotoaverzió, a rossz látásfunkció ellenére. Saját AIPL1 szubtypusú testvérpárunk idősebb tagját az erős fénykerülés miatt nem tudtuk jó minőségben dokumentálni. Az AIPL1 génhez kötött LCA-ban általában jellemző a hipermetrop fénytörés. A szemfenéken már fiatal korban jellemző a hiperpigmentáció, mind a makulában, mind a középperiférián körkörös. Dharmaraj 26 AIPL1 szubtypusú LCA beteg 80%-ában talált pigmenteltéréssel járó makulopathiát. (12, 105, 107, 109) Jelen értekezés 2. betegét 3 éves korban vizsgáltuk először és akkor már mindkét szemén látható volt a hiperpigmentációval járó makulopathia és a középperiférián a diffúz, a RP betegekre jellemzőtől eltérő, hálózatos mintázatú hiperpigmentáció. Saját betegeink szemészeti eltérései és szemfenéki képe és funkcionális eltérései az irodalomban leírtakhoz hasonló. (33. ábra)

AIPL1-hez köthető LCA betegek OCT vizsgálatáról Pasadhika valamint Jacobson számolt be, mindkét szerző az Investigative Ophthalmology and Vision Science folyóiratban, a betegek életkora 9-40 év közötti, és saját vizsgálatunkhoz hasonlóan a retina vastagság csökkenését találták. Jacobson a foveális behúzottságot minden betegben megtartottnak találta, de a fovea vastagsága 40 -120 µm volt. A foveában nem volt mérhető ONL, töle excentrikusan mérhető, de csökkent FT-ot talált. (104,107).

V.2.3.2. A CRB1 génhez kötött szubtypus

A CRB1 gén bizonyos mutációi EORD-t okoznak, mely jelentősen jobb látóélességgel jár, mint a klasszikus LCA. A betegnek akár 0.1-0.2 látóélessége is lehet, azonban az évek során ez minden esetben romlik. A szenzoros nystagmus nem jellemző, esetenként ún mikronystagmus igen. A retina jellegzetes képet mutat, gyakori az apró fehéres sárgás depozitumok jelenléte, néha csak a papilla körül, máskor diffúzan, a periférián is. Az átlagosnál gyakoribb a látóidegfőn a drusen képződés. A makula különböző fok-

ban, de érintett, de soha nem hiperpigmentált. Jellemző a makula körül a nagyobb, úgynevezett nummuláris pigmentfolt. (40, 105)

Henderson és munkatársai megfigyelése szerint atrófiás makula elváltozás relatív gyakran fordult elő (7/15, 46%) saját CRB1 asszociált betegekben, és köztük jelentős arányban fordul elő a fehérje csonkolásával járó (nonszensz és kereteltolódásos) mutáció. Saját 4. betegünkben, aki esetében egy új mutációt (c.G846X) azonosítottunk, súlyos atrófiás makulopátiát találtunk, mely Henderson megfigyelését megerősíti. (110) A CRB1 szubtípusú EORD betegek OCT képe nagyon jellemző, melyet Jacobson és munkatársai írtak le 2003-ban, és a retina diffúz megvastagodását találták a normális rétegezethez viszonyított elmosódásával. (110, 111) Pashadika csökkent foveális ONL vastagságot és extracentrálisan limitált ONL-t írt le. (104) Saját három CRB1-asszociált betegünk mindegyikében megvastagodott retinát és megváltozott rétegezethez viszonyított elmosódást találtunk.

V.2.3.3. A CEP290 génhez kötött szubtípus

A CEP290 gén számos szindróma hátterében állhat, másik neve NPHP6 (nephronophthisin 6) gén, mely mutatja hogy egyes esetekben vese érintettséget is okoz. (112)

Az LCA betegek genetikai vizsgálata azért is fontos, mert amennyiben ismert egy adott génhez asszociált más szervrendszeri érintettség, azt az érintett gyermekben célszerű lehet vizsgálni, így jó eséllyel ideje korán felismerni, szükség esetén kezelni. (pl: juvenilis nephronophthisis)

A nem szindrómás, csak okuláris érintettségű CEP290 génhez asszociált LCA-ban a korai gyerekkorban a retina általában nem mutat eltérést, esetenként a periférián finom, márványozott rajzolat látható. Később, de még a gyerekkorban progresszív retina atrófia alakul ki. A makula morfológiai eltérése ritka, a nagyfokú hipermetrópia és az enophthalmus gyakori. (105) Az évek múlásával a hiperpigmentáció illetve RP-szerű kép kerül előtérbe.

Számos betegben leírtak az érárkádok mentén multiplex, konfluáló fehér pontszerű elváltozásokat, hasonlóan mint azt a saját 6. betegünkben találtuk. (105, 113) Egy fiúgyermek szemfenéki képének időbeli változása hasonló volt, mint amilyen a saját 6. betegünkénél, nevezetesen 7 hónaposan retinája még nem mutatott eltérést, azonban két éves korban már konfluáló fehér pöttyök voltak láthatóak. (105, 113)

V.2.3.4. A nem azonosított genotípusú beteg morfológiai jellemzői

A microarray vizsgálat a 7. betegben nem azonosított mutációt, a fenotípusa nem hasonlított a másik 6 betegéhez. A beteg látási teljesítménye fényérzés-kézmozgás látás volt egész kisgyermek korától, nagyhullámú, irányát változtató kereső szemmozgásokkal. Fenti tünetei és a kioltott gf-ERG alapján klasszikus LCA volt a klinikai diagnózis, mely alapján a két leggyakoribb EORD (pálcika-csap típusú retina disztrófia) gén, a CRB1 és RPE65 szerepe nem volt valószínűsíthető. A makulopátia hiánya az AIPL1 gént is kizárta mint szóbajövő felelős gént. A retina perifériás részén diffúz só-bors jellegű szemcsézettségén kívül 8 éves korban mást nem találtunk, ezért a CEP290 gént sem tartjuk valószínűnek. Az irodalmi adatokkal összevetve úgy gondoljuk, hogy a 7. beteg genotípusa a másik 6 vizsgált betegtől különböző.

V.2.4. Genetikai vizsgálatok: az azonosított gének szerepe és a talált mutációk analízise

V.2.4.1. AIPL1 gén

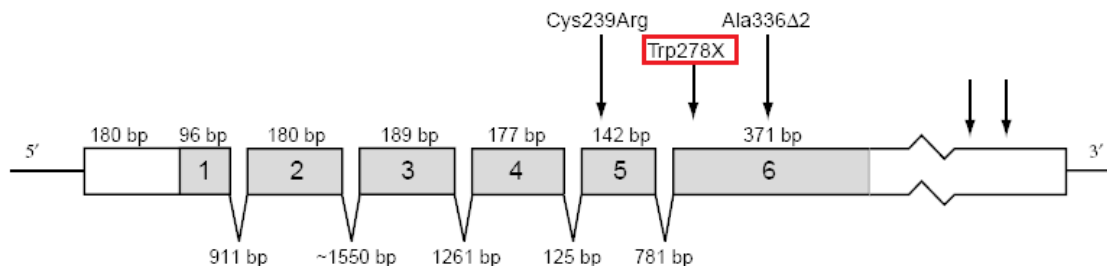
A gén a 17 kromoszómán található, a retinában és a tobozmirigyben expresszálódik. Nevét onnan kapta, hogy 49%-ban identikus az aryl-hydrocarbon interacting proteinnel (AIP), mely fehérje az ún. FK-506 kötő fehérje szuper-család (super family) tagja. (109, 116) Ennek alapján feltételezték, hogy a retinális fehérjék illetve makromolekulák „folding”-ban, térbeli szerkezetének kialakításában és stabilitásában valamint azok szállításban vehet részt. (109,116) Az AIPL1 gén szerepe szerepét LCA-ban először Sohocki és munkatársai közölték 2000-ben, amikor egy LCA-ban szenvedő vérrokon pakisztáni család minden érintett tagjában egy homozygóta nonszensz (p.W278X) mutációt azonosítottak. (116)

Mai ismeretek szerint az AIPL1 génnek és fehérjének a fototranszdukcióban van indirekt szerepe, mivel a foszfodieszteráz 6 (PDE6) enzim normál működéséhez szükséges, annak térbeli stabilitását illetve aktivitását befolyásolja. A PDE6 a fototranszdukció alapvető enzime, ép viszonyok között a ciklikus GMP fényinger hatására történő hidrolízisét katalizálja. Az AIPL1 fehérje a PDE6 stabilitását csak egy

ún. heat shock proteinnel (HSP90) együtt tudja biztosítani, ílymódon mindkettőnek fontos szerepe van a makromolekula térbeli szerkezetének stabilitásában és aktivitásában. AIPL1 knock-out egérben a PDE6 szerkezete dezorganizálódik és működése sérül, majd a fotoreceptor degenerálódik. (114)

A gén 6 exonból, a fehérje 384 aminosavból áll, 3 db tetratricopeptid (TRP) domén elemmel. Mindhárom TPR elem 1-1 pár anti-parallel alfa hélixből áll, a TRP domének diszrupciója, vagy megrövidülése a HSP90-nel történő interakciót megakadályozza (109, 114). A p.W278X mutáció az utolsó, 6. exonban, egy evolúciósan konzervált szakaszon van és hatására a fehérje 107 aminosavval lesz rövidebb az eredeti vad-típusnál (116). A mutáció a harmadik TRP domén részleges elvesztését és az AIPL1 fehérje funkcióvesztését okozza. (Van der Spuy 2004)

A humán retina fejlődése során az AIPL1 fehérje mind a csapok, mind a pálcikák prekursor sejtjeiben jelen van. Az AIPL1-assziciált LCA-ban megfigyelhető igen korai nagyfokú csökkentlátás feltételezi, hogy az AIPL1 funkció mindkét fotoreceptor korai fejlődési szakaszában alapvető fontosságú. (115)



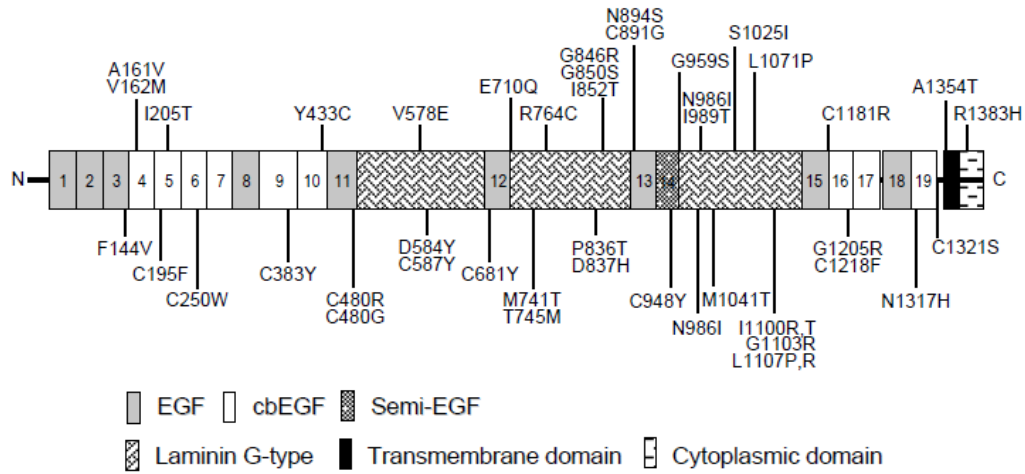
46. ábra. Az AIPL1 gén vázlatos felépítése. A sötét színű számozott egységek a gén exonjait reprezentálják. A saját betegeinkben is azonosított pW278X (más nomenklatura szerint Trp278X) mutáció a 6. exonban található. (29)

Dharmaraj 2004-ben számolt be 26 AIPL1 génhez kötött LCA betegről, akikben 48%-ban az eredetileg közölt p.W278X mutációt találták. (109, 116) Jacobson 2011-ben szintén a leggyakoribb AIPL1 mutációnak a p.W278X-et találta. (107) Aboshiba összesen 42, különböző kontinensekről származó AIPL1-asszociált LCA beteg adatait dolgozta fel és a p.W278X mutáció 62%-ukban legalább az egyik allélen megtalálható volt. (117) Saját 1. és 2. betegünkben is a p.W278X mutációt találtuk.

V.2.4.2. A CRB1 gén

A CRB1 gén (OMIM: 604210) az 1 kromoszómán helyezkedik el, a fehérje az íriszben, a retinában és az agyban is expresszálódik. A “Crumbs homologue 1” (CRB1) elnevezés a Drosophylliában azonosított Crumbs gén és fehérje humán megfelelőjére utal. A CRB1 fehérje egy, a retina külső határhártyáját (outer limiting membrane, OLM) alkotó fehérjekomplex része, a fotoreceptorok és Müller sejtek közti adherens junciók fenntartásához szükséges. (55, 118, 119) A fehérje komplex funkcionális megváltozása vagy elvesztése a sejtek közti kapcsolatok gyengülését okozza a fotoreceptorok következményes károsodásával. (110, 120, 121) A CRB1 gén szerepét LCA-EORD-ben 2001-ben igazolta egy holland munkacsoport A. den Hollander vezetésével. (39)

A CRB1 gén 12 exonból áll, 3 Laminine A G-szerű domént és 19 Epidermal Growth Faktor (EGF)-szerű domént tartalmaz. Mind a 2. Laminin-A G-szerű, mind a 14. (EGF)-szerű domén evolúciósan nagyfokban konzervált, ami funkcionális fontosságukat mutatja. (118) A CRB1 fehérje 1406 aminosavból álló, ún. transzmembrán fehérje, nagyobb része extracellulárisan helyezkedik el, mely tartalmazza a fehérje interakciós kötőhelyeit. A Laminine A G-szerű domének és EGF-szerű domének ilyen kötőhelyek, sok cisztein oldalláncot tartalmaznak, melyek diszulfid hidak képzésében vesznek részt. (118) A 2. Laminine-A G-szerű domén kettő cisztein kötőhelyet tartalmaz, míg a 14. EGF-szerű domain szintén tartalmaz cisztein kötőhelyet. Ha mutáció következtében egy új szekvencia variáns cisztein szubsztitúcióval jár (pl: p.C948Y), akkor diszulfid-kötés nem alakulhat ki és a fehérje másodlagos illetve térbeli szerkezete megváltozik (aberráns folding), esetéenként súlyosan. (118)



47. ábra. A CRB1 gén vázlatos felépítése, az egyes funkcionális domének és az eddig közölt mutációk feltüntetésével (118) Látható, hogy a három Laminin G-szerű doménből a 2-ban ábrázolódik a G846R és az I852T mutáció, az előbbi lokuszán identifikáltuk a G846X novel mutációt saját 4. betegünkben. A második mutációt saját 5. betegünkben is azonosítottuk.

A saját betegeinkben azonosított három mutációból kettő a 7. exonban, egy a 9. exonban van. (lásd “Eredmények” fejezet). Ez egybehangzik az irodalmi adatokkal, mely szerint a CRB1 génben eddig azonosított szekvencia változások kétharmada a 7. és 9. exonban található. (110). A 7. exon a második Laminin A G-szerű domént, a 9. exon a 14. EGF-szerű domént érinti.

A p.C948Y variáns a CRB1-hez kötött LCA-EORD-ben az egyik leggyakoribb mutáció. (14, 105, 110, 118) Érdekes, hogy bár misszensz mutációról van szó, d.Hollander 35 LCA betegből 5-nél ezt a mutációt találta homozygóta formában, mely mutatja, hogy ez a fehérje funkciót súlyosan érintő mutáció. (14, 105, 110, 118) Saját betegeinkben is ezt találtuk a leggyakoribbnak.

A 4. betegünkben azonosított p.G846X mutáció (7. exon) allélikus variációja a korábban azonosított p.G846R misszensz mutációnak (lásd fenti ábra), melyet

homozygóta formában már leírtak egy pakisztáni RP12-ben szenvedő család érintett tagjaiban. (122)

A p.G846X mutáció a fehérje csonkoláshoz vezet, mely 460 aminosavval lesz rövidebb a „vad típus”-nál, és a 2. Laminine-G A-szerű domén is elveésh.

A saját 5. betegünkben azonosított p.Ile852T mutáció (7. exon) szintén a 2 Laminine-A G-szerű domén elvesztésével jár (lásd eredmények, mut-taster). Egy LCA betegben, összetett heterozygóta formában azonosították, valamint, homozygóta formában egy sziriai vérrokon család négy gyermeke közül háromban. (14, 96)

Megjegyzendő, hogy LCA betegekben a 7. exonban még további kettő nonszensz mutációt (p.G827X és p.K801X) közöltek az irodalomban, homozygóta vagy összetett heterozygóta formában. (14, 39, 106) Kisfokban enyhébb, LCA-szerű vagy EORD fenotípusú betegben pedig kettő misszensz mutációt (p. Ser740Phe és p.Pro836Thr) azonosítottak homozygóta formában. (123).

Összefoglalva megállapítható, hogy a legtöbb CRB1 mutáció a fehérje szerkezet súlyos (másodlagos) diszrupciójához vezet. Az LCA súlyos fenotípust okozó szekvencia variánsok jellemzően teljes funkcióvesztést okoznak.

V.2.4.3. A CEP290 gén

A CEP290 gén szerepét LCA-ban először 2006-ban igazolták, másik neve nephrocystin 6 (NPHP6), mely elnevezés mutatja, hogy nem csak szemészeti eltérést okozhat.(112) Elsőként egy vérrokon francia-kanadai család négy érintett tagjában találtak CEP290 génmutációt, minden érintett családtag látása csak fényérzés volt, mindegyik beteg esetében enophthalmust és nagyfokú hipermetrop fénytörési hibát is leírtak.(112)

A CEP290 fehérje 2480 aminosavból áll. súlya 290 KDalton, nevét is innen kapta, miszerint a fotoreceptor centroszómájában elhelyezkedő, 290 KD súlyú protein. A fehérje a fotoreceptorok ún. „connecting cilium”ához kötött illetve annak közelében található, a génnek feltehetően az összekötő cilium kifejlődésében, ily módon az intracelluláris transport folyamatokban van szerepe. (112, 108, 124, 125, 126)

A CEP290 gén a 12. kromoszómán található, 55 exonból áll és sok, nagyrészt evolúciósan konzervált doménből épül fel, ezek szerepe azonban nagyrészt nem ismert. (124)

A fotoreceptorokban a külső (OS) és belső szegmentet (IS) összekötő ciliumon keresztül történik az IS-ben termelt és a OS-ben végbemenő, nagy anyagcsere aktivitású folyamatokban, például a fototranszdukcióban fontos szerepet játszó fehérjék szállítása. Az összekötő cilium fontosságát mutatja, hogy jelenleg hét olyan LCA gén ismert, mely a cilium működészavara által okozza a súlyos klinikai képet. (lásd Bevezetés)

A saját 6. betegünkben először azonosított CEP290 mutáció (c.2991+1665A>G /p.C998X) megegyezik azzal, amit elsőként leírtak az eredeti francia kanadai vérrokon családban. Az Eredmények fejezetben a mutációt részletesen leírtuk (44. ábra). (112) A kereteltolódás és az azt követő, intronban létrejövő stopcodon a fehérje megrövidüléséhez vezet.

A kaukázusi származású népességben jelenleg is ez a leggyakoribb CEP290-mutáció. Saját 6. betegünkben a második allél mutációját a CEP290 gén 37. exonján azonosítottuk. A mutáció korábban nem közölt, új szekvencia variáns: c4929delA/p. Lys 1643fsX2, egy nukleotid (adenin) deletiója, mely kereteltolódást okoz, közvetlenül utána egy stop codon keletkezik, ily módon a mutáns fehérje 836 aminosavval rövidebb a vad típusnál (1644/2480). Az új mutáció a fehérjének egy fontos részét, a Rab8a enzimnek a kötőhelyét (1208-1695 aminosavak) érinti. A Rab8a egy kisméretű GTPáz, melynek fontos szerepe van a ciliáris membrán elongációjában, kifejlődésében. (126, 127). Saját 6. betegünkben tehát a CEP290 fehérjét érintő, kettő, különböző módon patogén, fehérjét csonkoló mutációt azonosítottunk.

A CEP290 adatbázis (cep290base.cmgg.be/overview.php) szerint az ezidáig azonosított két leggyakoribb mutáció a 26 intronban lokalizálódó és a 36. exonban található c4723A T/ Lys 1575x.

Saját 6. betegünkhöz hasonló, a 37. exont érintő mutációt ezidáig kilenc betegben közöltek, melyek közül hét esetben nonszensz mutáció, kettő esetben kereteltolódást okozó változás keletkezett. Mindegyik mutáció jellemzően az 1628. és 1656. közötti aminosavakat érinti, ennek megfelelően, a saját betegünkben találthoz hasonlóan szintén a Rab8a enzim kötőhelyén vannak. A betegek klinikai tünetei a másik mutáció helyétől és típusától is függenek, egyes esetekben renális érintettséget is leírtak, másokban azonban nem.

Tudomásuk szerint saját értekezésünk elsőként vizsgált és azonosított magyar LCA/EORD betegeket, valamint ez az első közlés a közép-európai régióból is. Betegeink fenotípusa megfelel az eddig közölteknek, így meg tudtuk erősíteni a korábbi genotípus-fenotípus összefüggéseket. Kettő új mutációt azonosítottunk, mindkettő a transzláció korai befejezésével és a fehérje rövidülésével jár. Továbbá megerősítettük azt a korábbi állítást, mely szerint CRB1 asszociált EORD-ben súlyos makula atrófia gyakran jár együtt fehérjét csonkoló mutációval. (110)

VI. Következtetések

Elsőként vizsgáltuk előrehaladott RP betegek makulájában az egyes intraretinális rétegek vastagsági változásait az OCT képek szegmentációs analízisével az excentricitás és a funkció függvényében.

1. Szignifikáns rétegvastagság változásokat mutattunk ki, melyek a már kioltott elektromos aktivitású (NCRF) csoportban kifejezettebbek voltak, mint a még funkcionális aktivitást mutató (DRF) csoportban.

a./ A foveális régióban az ONL vastagsága csak a kioltott funkciójú csoportban volt szignifikánsan vékonyabb a kontroll csoporthoz képest, a DRF csoportban nem.

b./ Hasonló összefüggést találtunk a pericentrális régióban a belső retina rétegek (INL+OPL) és (GCL+IPL) esetében, miszerint ezek vastagsága csak a NCRF csoportban volt szignifikánsan vékonyabb, mint a kontroll csoporté, a DRF csoportban nem.

2. Megállapítottuk, hogy a pericentrális és perifériás makula régiókban egy adott réteg változása kifejezettebb, mint a tőle centrálisabb régióban, illetve a rétegvastagság csökkenése már a DRF csoportban is kimutatható. Ez azt erősíti meg, hogy az egyes makuláris rétegvastagságok az excentricitással is szignifikánsan változnak előrehaladott RP esetén:

a./ Az ONL réteg vastagsága a pericentrális régióban a DRF csoportban is szignifikánsan vékonyabb volt a kontroll csoporthoz képest, ellentétben a foveális régióval.

b./ Hasonlóképpen, a GCL+IPL réteg vastagsága a perifériás régióban a DRF csoportban is szignifikánsan vékonyabb volt a kontroll csoporthoz képest, ellentétben a pericentrális régióval.

3. Megállapítottuk, hogy külső retina rétegek változása kifejezettebb mint a belső rétegeké.

a./ a pericentrális régióban az ONL vastagsága már a DRF csoportban is szignifikáns csökkenést mutat a kontrollhoz képest, ezzel ellentétben az INL+OPL valamint a

GCL+IPL rétegek vastagsága a DRF csoportban nem csökkent, csak a NCRF csoportban.

Ezen vizsgálati eredmény az irodalomban közölt szövettani vizsgálati eredményekkel összhangban van.

b./ A perifériás régióban az ONL vastagsága, hasonlóan a pericentrális régióhoz, mindkét betegcsoportban szignifikáns vékonyodást mutatott, ezzel ellentétben az „INL +OPL” rétegek vastagsága a kontroll csoporthoz képest nem mutatott eltérést, ami leginkább azzal magyarázható, hogy az INL rétegben található az előrehaladott RP-ben hipertrofizáló Müller sejtek magja is.

c./ A GCL+IPL rétegek a perifériás makulában mindkét betegcsoportban szignifikáns vastagság csökkenést mutatott, hasonlóan az ONL-hez, melytől látszik bizonyítani, hogy a külső retina változása maga után vonja a belső retina rétegek vékonyodását is.

Értekezésem másik témája a magyar LA-EORD betegek vizsgálata volt.

4. Elsőként vizsgáltunk genetikai módszerekkel magyar LCA-EORD betegeket.

a./ Elsőként mutattunk ki pathogen mutációkat magyar, klinikailag LCA-EORD-nak megfelelő betegekben, az elvégzett genetikai vizsgálat a hét esetből hat esetben talált mindkét allélen mutációt, mely minden esetben alátámasztotta a klinikai diagnózist.

b./ A genetikailag azonosított betegek fenotípusát részletesen leírtuk és összehasonlítottuk az irodalmi adatokkal. Megállapítottuk, hogy mind a hat beteg fenotípusa az irodalomban közölt jellemzőket mutatta.

c./ A magyar LCA betegekben azonosított gének az AIPL1, a CRB1 és a CEP290, melyek a kaukázusi népességben korábban azonosított leggyakoribb gének közé tartoznak.

d./ Két betegben egy-egy új mutációt azonosítottunk, a CRB1 génben a c.G846X (p.2536GT) és a CEP290 génben a c.4929delA (p.Lys1643fsX2) variánst.

e./ A magyar LCA-EORD betegekben azonosított, korábban már ismert mutációk az adott gén mutációs spektrumában a leggyakoribbak közé tartoznak, melyek az *AIPL1*

génben a c.834G>A (p.Thr278X) mutáció, a *CRB1 génben* a c.2843G>A (p.C948Y) és a *CEP290 génben* a c.2991+1655A>G (p.C998X).

A két új mutáció patogenitását az ún. "Mutation taster" szoftverrel analizáltuk és megállapítottuk, hogy mindkettő az érintett fehérje rövidüléséhez vezet.

SD OCT-vel vizsgálva három beteg esetében az extrafoveális makula diffúz megvastagodását találtuk, mindhárom betegben *CRB1* asszociált géndefektust azonosítottunk, mely az irodalmi adatokat megerősíti.

VII. Összefoglalás

A retina disztrófiák genetikai hibán alapuló, ritka, progresszív lefolyású betegségek csoportja, melyekre a nagyfokú heterogenitás jellemző. Leggyakoribb forma a "retinitis pigmentosa" (RP), melyet a pálcikák progresszív funkciózavara, niktalópija és a fotoreceptorok pusztulását követően a retina szerkezetének átalakulása jellemez, előrehaladott állapotban súlyos funkcióromlással vagy vaksággal.

Jelen értekezésben a Semmelweis Egyetemen gondozott RP betegek közül retrospektív vizsgálat keretében, huszonkét beteg huszonkilenc szemének intraretinális szerkezeti változásait vizsgáltuk a makulában, time-domain OCT képek szegmentációs vizsgálatával és a multifokális ERG-vel meghatározott funkcionális állapot függvényében a makula három különböző excentricitású régiójában. Eredményeink egybehangzanak a irodalomban közölt szövettani vizsgálatokkal, miszerint a legkifejezettebb vastagságcsökkenés a fotoreceptor rétegben történik, előrehaladott RP esetén az ONL vastagsága csak a foveális régióban megtartott és ott is csak a még nem kioltott elektromos aktivitású szemekben. A rétegvastagság csökkenés az ONL, és a GCL+IPL esetében az excentricitással fokozódott, az INL+OPL esetében nem, ami a retina glia sejtjeinek hipertrófiájával magyarázható. A perifériás makula régióban az RNFL réteg vastagodása feltehetően a papilla felől induló epiretinális vagy intraretinális gliózissal magyarázható. Előrehaladott RP betegekben az intraretinális rétegek vastagságának pontos, topográfikus ismerete segítséget nyújthat személyre szabott retina protézis (therápiás chip) ideális helyének meghatározásához.

Az értekezés másik része az ezidáig nem vizsgált magyar LCA-EORD betegek klinikai és genetikai vizsgálatát célozta. Hét beteg részletes klinikai és genetikai vizsgálatát végeztük el, hat betegben sikerült a beteg mindkét alléljén patogén mutációt kimutatni. A genetikai vizsgálat minden esetben alátámasztotta a klinikai diagnózist. A patogén mutációkat az AIPL1, CRB1 és a CEP290 génekben azonosítottuk, melyek a kaukázusi népességben előforduló leggyakoribb LCA-EORD gének közé tartoznak. Az identifikált mutációk közül kettő új mutáció, melyek bioinformatikai analízise az ún. "mutation taster" szoftverrel történt és mindkét esetben az érintett fehérje csonkolásával járó mutációt igazolt. A betegek klinikai tünetei, a funkciócsökkenés súlyossága és a szemfenéki eltérések az irodalomban korábban leírt eltérésekhez hasonló.

VIII. Summary

Retinal dystrophies are a rare group of genetic diseases with progressive nature and high degree of heterogeneity. The most common form is "retinitis pigmentosa" (RP), characterized by progressive rod dysfunction, nyctalopia and remodelling of the retinal structure after fotoreceptor death in advanced stages with consecutive functional deterioration or blindness.

In the present study twenty-nine eyes of twenty-two RP patients were retrospectively examined at the Department of Ophthalmology, Semmelweis University. The intraretinal structural alterations of the macula were analyzed using segmentation analysis of the OCT images according to the functional status determined by mf-ERG recording in three macular regions with different excentricity. Our results are in concordance with that of the earlier published hystopathological examinations, as the most striking reduction was detected in the thickness of the photoreceptor layer. In advanced RP the thickness of the ONL remained normal only in the foveal region and only in patients with remained retinal electrical activity.

The reduction of the thickness in the ONL and GCL+IPL complexum increased with excentricity, but not in the INL+OPL layers, probably due to the hypertrophy of the retinal Müller glia cells. The increased thickness of the RNFL layer in the periferal macular region may be the result of epiretinal and intraretinal gliosis starting from the optic nerve head. The exact topographic determination of the thickness of all intraretinal layers in advanced RP may help in the optimal planning of personalized retinal prothesis in the future.

The other aim of this work was to detect Hungarian LCA-EORD patients and perform clinical and genetic examinations. Seven LCA-EORD patients underwent detailed clinical and genetic examinations and biallelic pathogen mutations were detected in six of them. The result of the genetic test confirmed the clinical diagnosis in all six patients.

Six diifferent pathogen mutations were identified in the AIPL1-, CRB1 and CEP290 genes, two of them were novel, not published earlier. Bioinformatic analysis of the novel mutations using the "mutation taster" softver confirmed that both new mutations causes the truncation of the affected protein. The clinical symptoms, severity of dysfunction and retinal fenotype were similar as reported earlier in the literature.

IX. Irodalomjegyzék

1. Bird A. (1995) Retinal Photoreceptor Dystrophies: LI Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol.* 119 (5): 543-562.
2. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. (2006) Retinitis Pigmentosa. *The Lancet.* 368: 1795-1809.
3. Hamel Ch. (2006) Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 1: 40.
4. Nash BM, Wright DC, Grigg RJ, Bennetts B, Jamieson RV. (2015) Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Transl Pediatrics.* 4 (2): 139-163.
5. Birch DG. Retinitis Pigmentosa. in: Heckenlively JR, Arden GB.(eds) *Principals and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision.* 2nd ed. The MIT Press, Cambridge, 2006:781-794.
6. Donders FC. (1857) Beitrage zur pathologischen anatomie des auges: 2.) Pigmentbildung in der netzhaut. *Graefes Arch Ophthalmol.* 3: 139-150.
7. Leber T. (1869) Ueber Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose. *Graefes Arch Clin Exp Ophthal.* 15:1-25.
8. Traboulsi EI. (2010) The Marshall M. Parks memorial lecture: making sense of early onset childhood retinal dystrophies – the clinical phenotype of Leber congenital amaurosis. *Br J Ophthalmol.* 94: 1281-1287.
9. Booij JC, Florijn RJ, ten Brink JB, Loves W, Meier F, van Schooneveld MJ, de Jong PTVM, Bergen AAV.(2005) Identification of mutations in the AIPL1, CRB, GUCY2D and RPGRIP1 genes in patients with juvenile retinitis pigmentosa. *Online Mutation Report. J. Med. Genet.* 42 (11): e67

10. Koenekoop RK. Leber Congenital Amaurosis. in: Heckenlively JR, Arden GB (eds), *Principals and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision*. 2nd ed. The MIT Press, Cambridge, 2006: 745-755.
11. Koenekoop RK. (2004) An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Surv Ophthalmol*. 49: 379-398.
12. Galvin JA, Fishman GA, Stone EM, Koenekoop RK. (2005) Evaluation of genotype-phenotype associations in Leber congenital amaurosis. *Retina*. 25: 919-929.
13. Franceschetti A, Dieterlé P. (1956) Die differentialdiagnostische Bedeutung des ERG's bei tapetoretinalen Degenerationen: Elektoretinographie. *Bibl Ophth*. 48: 161.
14. Hanein S, Perrault I, Gerber S, Tanguy G, Barbet F, Ducroq D, Calvas P, Dollfus H, Hamel Ch, Lopponen T, Munier F, Santos L, Shalev S, Zafeiriou D, Dufier JL, Munnich A, Rozet JM, Kaplan J. (2004) Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum Mutat*. 23: 306-317.
15. Szűcs F, Janáky M. (1992) A retinitis pigmentosa dél-magyarországi előfordulásának szocioepidemiológiája. *Szemészet*. 129 (4): 131-133.
16. Kusnyerik Á, Resh M, Roska T, Karacs K, Gekeler F, Wilke R, Benav H, Zrenner E, Süveges I. (2011) Látásjavító implantátumok látóhártya degenerációkban. *Orvosi Hetilap*. 152 (14): 537-545.
17. Kusnyerik Á. (2013) A szubretinális implantátumok helyének tervezése retinitis pigmentosás betegek esetében. PhD értekezés.
18. Molnár K. (2009) Autoimmunitás retinitis pigmentosában. *Szemészet*. 146 (3): 112-119.

19. McDonald IM, Seabra MC. Chorioideremia. in: Heckenlively JR, Arden GB (eds.) *Principals and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision*, 2nd ed. The MIT Press, Cambridge, 2006: 777-780.
20. Roberts MF, Fishman GA, Roberts DK, Heckenlively JR, Welber RG, Anderson RJ, Grover S. (2002) Retrospective, longitudinal and cross sectional study of visual acuity impairment in chorioideraemia *Br J Ophthalmol.* 86 (6): 658-662.
21. Dryja TP. (2000) Molecular Genetics of Oguchi Disease, Fundus Albipunctatus, and Other Forms of Stationary Night Blindness: LVII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol.* 130 (5): 547-563.
22. Bhattacharya SS, Wright AF, Clayton JF, Price WH, Phipps CI, Mckeown CME, Jay M, Bird AC, Pearson PL, Southern EM, Evans HJ. (1984) Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and a restriction fragment length polymorphism identified by recombinant DNA probe L1.28. *Nature.* 309: 253-255.
23. Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, Sandberg MA, Berson EL. (1990) A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature.* 343: 364-366.
24. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. (2007) Perspective on Genes and Mutations Causing Retinitis Pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 125: 151-158.
25. Khan KN, Chana R, Ali N, Wright G, Webster A, Moore AT, Michaelides M. (2017) Advanced diagnostic genetic testing in inherited retinal disease: experience from a single tertiary referral centre in the UK National Health Service. *Clin. Genet.* 91: 38-45.

26. Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Chatelin S, Souied E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Le Paslier D, Frézal J, Dufier JL, Pittler S, Munnich A, Kaplan J. (1996) Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's Congenital Amaurosis. *Nat Genet.* 14: 461-464.
27. Wang X, Wang H, Sun V, Tuan HF, Keser V, Wang K, Ren H, Lopez I, Zaneveld JE, Siddiqui S, Bowles S, Khan A, Salvo J, Jacobson SG, Iannaccone A, Wang F, Birch D, Heckenlively JR, Fishman GA, Traboulsi EI, Li Y, Wheaton D, Koenekoop RK, Chen R. (2013) Comprehensive molecular diagnosis of 179 Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa patients by targeted next generation sequencing. *J Med Genet.* 50 (10): 674-688.
28. Coussa RG, Lopez Solache I, Koenekoop RK. (2017) Leber congenital amaurosis: from darkness to light: an ode to Irene Maumenee, *Ophthalm Genet.* 38 (1): 7-15.
29. Sohocki MM, Bowne SJ, Sullivan LS, Blackshaw S, Cepko CL, Payne AM, Bhattacharya SS, Khaliq S, Qasim MS, Birch DG, Harrison WR, Elder FF, Heckenlively JR, Daiger SP. (2000) Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 24: 79-83.
30. Dryja TP, Adams SM, Grimsby JL, Mcgee TL, Hong DH, Li T, Andreasson S, Berson EL. (2001) Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet.* 68: 1295-1298.
31. den Hollander A, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KE, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van den Born LI, Rohrschneider K, Cremers FP. (2006) Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet.* 79: 556-561.

32. Friedman JS, Chang B, Kannabiran Ch, Chakarova Ch, Singh HP, Jalali S, Hawes NL, Branham K, Othman M, Filippova E, Thompson DA, Webster AR, Andréasson S, Jacobson SG, Bhattacharya SS, Heckenlively JR, Swaroop A. (2006) Premature truncation of a novel protein, RD3, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. *Am J Hum Genet.* 79 (6): 1059-1070.
33. Aldahmesh MA, Al-Owain M, Alqahtani F, Hazzaa S, Alkuraya FS. (2010) A null mutation in CABP4 causes Leber's Congenital Amaurosis-like phenotype. *Mol. Vis.* 16: 207-212.
34. Estrada-Cuzcano A, Koenekoop RK, Coppieters F, Kohl S, Lopez I, Collin RW, De Baere EB, Roeveveld D, Marek J, Bernd A, Rohrschneider K, van den Born LI, Meire F, Maumenee IH, Jacobson SG, Hoyng CB, Zrenner E, Cremers FP, den Hollander AI. (2011) IQCB1 Mutations in Leber Congenital Amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52 (2): 834-839.
35. Sergouniotis PI, Davidson, AE, Mackay DS, Li Z, Yang X, Plagnol V, Moore AT, Webster AR. (2011) Recessive mutations in KCNJ13, encoding an inwardly rectifying potassium channel subunit, cause leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet.* 89: 183-190.
36. den.Hollander AI, Koenekoop RK, Mohamed MD, Arts HH, Boldt K, Towns KV, Sedmak T, M. Beer, Nagel-Wolfrum K, McKibbin M, Dharmaraj S, Lopez I, Ivings L, Williams GA, Springell K, Woods CG, Jafri H, Rashid J, Strom TM, v den Zwaag B, Gosens I, Kersten FFJ, v Wijk E, Weltman JA, Zonneveld MN, v Beersum SEC, Maumenee IH, Wolfrum U, Cheetham ME, Ueffing M, Cremers FPM, Inglehearn CF, Roepman R. (2007) Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercillin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat Genet.* 39 (7): 889-895.

37. Mackay DS, Borman AD, Sui R, van den Born LI, Berson EL, Ocaka LA, Davidson AE, Heckenlively JR, Branham K, Ren H, Lopez I, Maria M, Azam M, Henkes A, Blokland E, Qamar R, Webster AR, Cremers FPM, Moore AT, Koenekoop RK, LCA5 Study Group (see acknowledgements for Universities), Andreasson S, de Baere E, Bennett J, Chader GJ, Berger W, Golovleva I, Greenberg J, den Hollander AI, Klaver CCW, Klevering BJ, Lorent B, Preising MN, Ramsear R, Roberts L, Roepman R, Rohrschneider K, Wissinger B. (2013) Screening of a large cohort of leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa patients identifies novel LCA5 mutations and new genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat.* 34 (11): 1537-1546.

38. Perrault I, Hanein S, Zanlonghi X, Serre V, Nicouleau M, Defoort-Delhemmes S, Delphin N, Fares-Taie L, Gerber S, Xerri O, Ederson C, Goldenberg A, Duncombe A, Le Meur G, Harnel C, Silva E, Nitschke P, Calvas P, Munnich A, Roche O, Dolfus H, Kaplan J, Rozet LM. (2012) Mutations in NMNAT1 cause Leber Congenital Amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nat Genet.* 44 (9): 975-977.

39. den Hollander AI, Heckenlively JR, van d Brown LI, de Kok YJ, van der Velde-Visser SD, Kellner U, Jurklies B, van Schooneveld MJ, Blankenagel A, Rohrschneider K, Wissinger B, Cruysberg JR, Deutman AF, Brunner HG, Apfelstedt-Sylla E, Hoyng CB, Cremers FP. (2001) Leber Congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the Crombs homologue 1 (CRB1) gene. *Am J Hum Genet.* 69: 198-203.

40. Lotery A J, Jacobson SG, Fishman GA, Weleber RG, Fulton AB, Namperumalsamy P, Heon E, Levin AV, Grover S, Rosenow JR, Kopp KK, Sheffield VC, Stone EM. (2001) Mutations of the CRB1 gene cause Leber Congenital Amaurosis. *Arch. Ophthalmol.* 119 (3): 415-420.

41. Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, Liu SY, Harris E, Redmond TM, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP. (1997) Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet.* 17: 139–141.

42. Janecke AR, Thompson DA, Utermann G, Becker C, Hubner CA, Schmid E, McHenry CL, Nair AR, Ruschendorf F, Heckenlively J, Wissinger B, Nurnberg P, Gal A. (2004) Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet.* 36(8): 850-854.
43. Lewis CA, Batlle IR, Batlle KGR, Banerjee P, Cideciyan AV, Huang J, Aleman TS, Hung Y, Ott J, Gilliam TC, Knowles JA, Jacobson SG. (1999) Tubby-like protein 1 Homozygous Splice-Site Mutation Causes Early-Onset Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40 (9): 2106- 2114.
44. Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA, Apfelstedt-Sylla E, Gal A. (2001) Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet.* 28 (2): 123-124.
45. Issa PCh, Bolz HJ, Ebermann I, Domeier, Holz FG, Scholl HPN. (2009) Characterisation of severe rod-cone dystrophy in a consanguineous family with a splice site mutation in the MERTK gene. *Br. J. Ophthalmol.* 93: 920-925.
46. Perrault I, Hanein S, Gerard X, Delphin N, Fares-Taie L, Gerber S, Pelletier V, Mercé E, Dollfus H, Puech B, Defort- Dhellemmes S, Petersen MD, Zafeiriou D, Munnich A, Kaplan J, Roche O, Rozet JM. (2010) Spectrum of SPATA7 Mutations in Leber Congenital Amaurosis and Delineation of the Associated Phenotype. *Hum Mutat. Mutation in Brief* 31: E1241-E1250
47. Milam AH, Li ZY, Fariss RN. (1998) Hystopathology of the Human Retina in Retinitis Pigmentosa. *Progr Retin Eye Res.* 17: 175-205.
48. Santos A, Humayun MS, de Juan E. Jr, Greenburg RJ, Marsh MJ, Klock IB, Milam A. (1997) Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis. *Arch Ophthalmol.* 115: 511-515.

49. Jacobson SG, Cideciyan A. (2010) Treatment possibilities for Retinitis Pigmentosa. *N Engl J Med.* 363 (17): 1669-1671.
50. Li ZY, Kljavin IJ, Milam AH. (1995) Rod Photoreceptor Neurite Sprouting in Retinitis Pigmentosa. *J Neurosci.* 75 (8): 5429-5438.
51. Jones BW, Pfeiffer RL, Ferrell WD, Watt CB, Marmor M, Marc RE. (2016) Retinal Remodeling in Human Retinitis Pigmentosa. *Exp Eye Res.*150: 149–165.
52. Yzer, S, Wolpert K, Arundhati F, Bowman D, Tsang S.T: (2011) Gene-specific Phenotypes and Mechanism-based Treatments in Early-onset Retinal Dystrophies in: www.retinalphysician.com, 2011 July.
53. Veske A, Nilsson SE, Narfstrom K, Gal A. (1999) Retinal dystrophy of Swedish Briard/Briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. *Genomics.* 57: 57–61.
54. Menotti-Raymond M, David VA, Schaffer AA, Stephens R, Wells D, Kumar-Singh R, O'Brien SJ, Narfström K. (2007) Mutation in CEP290 Discovered for Cat Model of Human Retinal Degeneration. *J Hered.* 98 (3): 211-220.
55. Mehalow AK, Kameya S, Smith RS, Hawes NL, Danegre JM, Young JA, Bechtold L, Haider NB, Tepass U, Heckenlively JR, Chang B, Naggert JK, Nishina PM. (2003) CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina, *Hum Mol Genet.* 12 (17): 2179–2189.
56. Chang B, Khanna H, Hawes N, Jimeno D, He Sh, Lillo C, Parapuram SK, Cheng H, Scott A, Hurd RE, Sayer JA, Otto EA, Attanasio M, O'Toole JF, Jin G, Shou C, Hildebrandt F, Williams DS, Heckenlively JR, Swaroop A. (2006) In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/ NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse. *Hum Mol Genet.* 15 (11): 1847-1857.

57. Ramamurthy V, Niemi GA, Reh Th, A Hurley JB. (2004) Leber congenital amaurosis linked to AIPL1: a mouse model reveals destabilization of cGMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci.* 101: 13897-13902.
58. Gearhart PM, Gearhart Ch, Thompson DA, Petersen-Jones SM. (2010) Improvement of Visual Performance with intravitreal administration of 9-cis-Retinal in RPE65-Mutant Dogs. *Arch. Ophthalmol.* 128 (11): 1442-1448.
59. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zeleniaia O, Shindler KE, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Aurichio A, High KA, Bennett J. (2008) Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis. *N Engl J Med.* 358: 2240-2248.
60. Tan MH, Smith AJ, Pawlyk B, Xu X, Liu X, Bainbridge JB, Baschke M, McIntosh J, Viet Tran H, Nathwani A, Li T, Ali RR. (2009) Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete AIPL1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Hum Mol Genet.* 18: 2099-2114.
61. Testa F, Surace EM, Rossi S, Marocco E, Gargiulo A, Di Iorio V, Ziviello C, Nesti A, Fecarotta S, Bacci ML, Giunti M, Della Corte M, Banfi S, Aurichio A, Simonelli F. (2011) Evaluation of Italian patients with Leber Congenital Amaurosis due to AIPL1 mutations Highlights the Potential Applicability of Gene Therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52 (8): 5618-5624.
62. Van Hooser JP, Aleman TS, Yu-Guang He, Cideciyan AV, Kuksa V, Pittler SJ, Stone EM, Jacobson SG, Palczewski K. (2000) Rapid restoration of visual pigment and function with oral retinoid in a mouse model of childhood blindness. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 8623-8628.

63. Koenekoop RK. (2008) Successful RPE65 Gene Replacement and Improved Visual Function in Humans. *Ophthalmic Genet.* 29: 89-91.
64. Chung DC, Traboulsi EI. (2009) Leber Congenital Amaurosis: Clinical correlations with genotypes, gene therapy trials update and future directions. *J AAPOS.* 13: 587-592.
65. Collin RWJ, den Hollander AI, van der Velde-Visser S, Bennicelli J, Bennett J, Cremers FPM. (2012) Antisense Oligonucleotid (AON)-based Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by a Frequent Mutation in CEP290. *Mol Ther Nucleic Acids.* 1 (3): e14.
66. Stone E. (2007) Leber congenital amaurosis – a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol.* 144 (6): 791-811.
67. Jacobson SG, Cideciyan AV, Huang WCh, Sumaroka A, Nam HJ, Sheplock R, Schwartz SB. (2016) Leber Congenital Amaurosis: Genotypes and Retinal Structure Phenotypes. *Adv Exp Med Biol.* 854: 169-175.
68. Bailey IL, Jackson AJ, Minto H, Greer RB, Chu MA. (2012) The Berkeley Rudimentary Vision Test. *Optom Vis Sci.* 89 (9): 1257-1264.
69. Lange C Feltgen N, Junker B, Schulze-Bonsel K, Bach M. (2009) Resolving the clinical acuity categories „hand motion” and „counting fingers” using the Freiburg Visual Acuity Test (FrACT) *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 247 (1): 137-142.
70. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M. (2009) International Society for Clinical Electrophysiology of Vision. ISCEV Standard for full-field Electroretinography (2008) *Doc. Ophthalmol.* 118: 69-77.

71. Sutter EE, Tran D. (1992) The field topography of ERG components in man: The photopic luminance response. *Vision Res.* 32: 433-446.
72. Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo D, Lyons JS, Marmor MF, McCulloch DL, Palmowsky-Wolfe AM. (2012) International Society For Clinical Electrophysiology of Vision: ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (2011 Edition) *Doc. Ophthalmol.* 124 (1): 1-13.
73. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA. (1991) Optical coherence tomography. *Science.* 254: 1178-1181.
74. Ishikawa H, Stein DM, Wollstein G, Beaton S, Fujimoto JG, Schuman JS. (2005) Macular segmentation with optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: 2012-2017.
75. Hee MR, Fujimoto JG, Ko T, Lee JE, Schumann JS, Duker J, Puliafito CA. Interpretation of the Optical Coherence Image. In: Schuman JS, Puliafito CA, Fujimoto JG (eds). *Optical Coherence Tomography of Ocular Diseases.* SLACK Incorporated, Thorofare, 2004: 21-53.
76. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. (1991) Classification of diabetic retinopathy from fluorescein angiograms. ETDRS Report Number 11. *Ophthalmology.* 98: 807-822.
77. Cabrera Fernandez D, Salinas HM, Puliafito CA. (2005) Automated detection of retinal layer structures on optical coherence tomography images. *Opt Express.* 13: 10200-10216.

78. Tátrai E, Ranganathan S, Ferencz M, Cabrera DeBuc D, Somfai GM. (2011) Comparison of retinal thickness by Fourier-domain optical coherence tomography and OCT retinal image analysis software segmentation analysis derived from Stratus optical coherence tomography images. *J Biomed Opt.* 16 (5): 056004.
79. Cabrera DeBuc D, Somfai GM, Ranganathan S, Tátrai E, Ferencz M, Puliafito CA. (2009) Reliability and reproducibility of macular segmentation using a custom-built optical coherence tomography retinal image analysis software. *J Biomed Opt.* 14: 064023.
80. Massin P, Vicaut E, Haouchine B, Erginay A, Paques M, Gaudric A. (2001) Reproducibility of retinal mapping using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol.* 119: 1135–1142.
81. Massin P, Erginay A, Haouchine B, Mehidi AB, Paques M, Gaudric A. (2002) Retinal thickness in healthy and diabetic subjects measured using optical coherence tomography mapping software. *Eur J Ophthalmol.* 12: 102–108.
82. Bagci AM, Shahidi M, Ansari R, Blair M, Blair NP, Zelkha R. (2008) Thickness profiles of retinal layers by optical coherence tomography image segmentation. *Am J Ophthalmol.* 146: 679-687.
83. Menke MN, Dabov S, Knecht P, Sturm V. (2009) Reproducibility of retinal thickness measurements in healthy subjects using spectralis optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol.* 147: 467-72.
84. Popovic P, Jarc-Vidmar M, Hawlina M. (2005) Abnormal fundus autofluorescence in relation to retinal function in patients with retinitis pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 243:1018–1027.

85. Robson AG, Saihan Z, Jenkins SA, Fitzke FW, Bird AC, Webster AR, Holder GE. (2006) Functional characterisation and serial imaging of abnormal fundus auto-fluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Br J Ophthalmol.* 90: 472–479.
86. Zernant J, Klm M, Dharmaraj S, den Hollander AI, Perrault I, Preising MN, Lorenz B, Kaplan J., Cremers FPM, Maumenee I, Koenekoop RK, Allikmets R. (2005) Genotyping Microarray (Disease Chip) for Leber Congenital Amaurosis: Detection of Modifier Allels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46 (9): 3052-3059.
87. Kurg A, Shumaker J, Tnnison N, Georgiu I., Tollet J, Metspalu A. Arrayed Primer Extension: Solid-Phase Four-Color DNA Resequencing and Mutation Detection Technology. <http://doi.org/10.1089/109065700316408>.
88. Koenekoop RK, Lopez I, den Hollander AI, Allikmets R, Cremers FP. (2007) Genetic testing for retinal dystrophies and dysfunctions: benefits, dilemmas and solutions. *Clin Exp Ophthalmol.* 35: 473-485.
89. den Hollander AI, Roepman R, Koenekoop RK, Cremers FP. (2008) Leber Congenital Amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res.* 27: 391-419.
90. Sanger F, Nicklen, S, Coulson, AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 74: 5463-5467.
91. Metzker ML. (2010) Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet.* 11: 31-46.
92. Shendure J. (2011) Next generation human genetics. *Genome Biol.* 12: 408.

93. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Tumer EH, Kumar A, Howard E, Shendure J, Turner DJ. (2010) Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods*. 7 (2): 111-118.
94. Schwarz, J M; Rödelberger, Ch, Schuelke M, Seelow D. (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 7(8): 575–576.
95. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 11 (4): 361-362.
96. Hasan SM, Azmeh A, Mostafa O, Megarbene A. (2016) Coats’s like vasculopathy in leber congenital amaurosis secondary to homozygous mutations in CRB1: a case report and discussion of the managemnt options. *BMC Res Notes*. 9: 91.
97. Hood DC, Lin CE, Lazow MA, Locke KG, Zhang X, Birch DG. (2009) Thickness of receptor and post-receptor retinal layers in patients with retinitis pigmentosa measured with frequency-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50: 2328-2336.
98. Witkin AJ, Ko TH, Fujimoto JG, Chan A, Drexler W, Schuman JS, Reichel E, Duker JS. (2006) Ultra-high resolution optical coherence tomography assessment of photoreceptors in retinitis pigmentosa and related diseases. *Am J Ophthalmol*. 142: 945-952.
99. Aleman TS, Cideciyan AV, Sumaroka A, Schwartz SB, Roman AJ, Windsor EA, Steinberg JD, Branham K, Othman M, Swaroop A, Jacobson SG. (2007) Inner retinal abnormalities in X-linked retinitis pigmentosa with RPGR mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48 (10): 4759-4765.
100. Lim JI, Tan O, Fawzi AA, Hopkins JJ, Gil-Flamer JH, Huang D. (2008) A pilot study of Furier-domain optical coherence tomography of retinal dystrophy patients. *Am J Ophthalmol*. 146: 417-426.

101. Oishi A, Otani A, Sasahara M, Kurimoto M, Nakamura H, Kojima H, Yoshimura N. (2009) Retinal nerve fiber layer thickness in patients with retinitis pigmentosa. *Eye*. 23: 561-566.

102. Walia S, Fishman GA, Edward DP, Lindeman M. (2007) Retinal nerve fiber layer defects in RP patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48: 4748-4752.

103. Opie NI, Ayton LN, Apollo NV, Ganeasn K, Guymer RH, Luu Ch.D. (2014) Optical Coherence Tomography-Guided Retinal Prosthesis Design: Model of Degenerated Retinal Curvature and Thickness for Patient-Specific Devices. *Artif Organs*. 38 (6): E82-E94.

104. Pasadhika S, Fishman GA, Stone EM, Lindeman M, Zelkha R, Lopez I, Koenekoop RK, Shahidi M. (2010) Differential Macular Morphology in Patients with RPE65-, CEP290-, GUCY2D-, and AIPL1-related Leber Congenital Amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 51: 2608-2614.

105. Coppetiers F, Casteels I, Meire F, De Jaegere S, Hooghe S, van Regemorter N, Van Esch H, Matuleviciene A, Nunes L, Meersschaut V, Walraedt S, Standaert L, Coucke P, Hoeben H, Kroes HY, Vande Walle J, de Ravel T, Leroy BP, De Baere E. (2010) Genetic screening of LCA in Belgium: predominance of CEP290 and identification of potential modifier alleles in AHI1 of CEP290-related phenotypes. *Hum Mutat*. 31: E1709-66.

106. Simonelli F, Ziviello C, Testa F, Rossi S, Fazzi E, Bianchi PE, Fossarello M, Signorini S, Bertone Ch, Galantuomo S, Brancati F, Valente EM, Ciccodicola A, Rinaldi E, Auricchio A, Banfi S. (2007) Clinical and Molecular Genetics of Leber's Congenital Amaurosis: a multicenter study of Italian patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48: 4284-4290.

107. Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, Sumaroka A, Roman AJ, Swider M, Schwartz SB, Banin E, Stone EM. (2011) Human Retinal Disease from AIPL1 Gene

Mutations: Foveal Cone Loss with Minimal Macular Photoreceptors and Rod Function Remaining. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52: 70-79.

108. Walia S, Fishman GA, Jacobson SG, Aleman TS, Koenekoop RK, Traboulsi EI, Weleber RG, Pennesi ME, Heon E, Drack E, Lam BL, Alliklets R, Stone EM. (2010) Visual acuity in patients with Leber's congenital amaurosis and early childhood-onset retinitis pigmentosa. *Ophthalmology.* 117: 1190-1198.

109. Dharmaraj S, Leroy BP, Sohocki MM, Koenekoop RK, Perrault I, Anwar Kh, Khaliq S, Devi S, Birch DG, De Pool E, Izquierdo N, Maldergem L, Ismail M, Payne AM, Holder GE, Bhattacharya SS, Bird AC, Kaplan J, Maumenee I. (2004) The phenotype of Leber Congenital Amaurosis in Patients with AIPL1 Mutations. *Arch. Ophthalmol.* 22: 1029-1037.

110. Henderson RH, Mackay DS, Li Z, Moradi Ph, Sergouniotis P, Russel-Egitt I, Thompson DA, Robson AG, Holder GE, Webster AR, Moore AT. (2011) Phenotypic variability in patients with retinal dystrophies due to mutations in CRB1. *Br J Ophthalmol.* 95: 811-817.

111. Jacobson SG, Cideciyan AV, Aleman TS, Pianta MJ, Sumaroka A, Schwartz SB, Smilko EE, Milam AH, Sheffield VC, Stone EM. (2003) Crumbs homologue 1 (CRB1) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination. *Hum Mol Genet.* 12: 1073-1078.

112. den Hollander AI, Koenekoop RK, Yzer S, Lopez I, Arends ML, Voesenek KE, Zonneveld MN, Strom TM, Meitinger T, Brunner HG, Hoyng CB, van der Born LI, Rohrschneider K, Cremers FP. (2006) Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are frequent cause of Leber Congenital Amaurosis. *Am J Hum Genet.* 79: 556-561.

113. Perrault I, Delphin N, Hanein S, Gerber S, Dufier JL, Roche O, Defoort-Dhellemmes S, Dollfus H, Fazzi E, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. (2007) Spectrum

of NPHP6/CEP290 Mutations in Leber Congenital Amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat.* 28: 416-425.

114. Sacristan-Reviriego A, Bellingham J, Prodromou J, Boehm AN, Aichem A, Kumaran N, Bainbridge J, Michaelides M, van der Spuy J. (2017) The integrity and organization of the human AIPL1 functional domains is critical for its role as a HSP90-dependent co-chaperone for rod PDE6. *Hum Mol Genet.* 26 (22): 4465-4480.

115. van der Spuy J, Kim JH, Yu YS, Szél A, Luthert PhJ, Clark BJ, Cheetham ME. (2003) The expression of the Leber Congenital Amaurosis protein AIPL1 Coincides with Rod and Cone Photoreceptor Development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44 (12): 5396-5404.

116. Sohocki MM, Perrault I, Leroy BP, Payne AM, Dharmaraj S, Bhattacharya SS, Kaplan J, Maumenee IH, Koenekoop R, Meire FM, Birch DG, Heckenlively JR, Daiger SP. (2000) Prevalence of AIPL1 mutations in inherited retinal degenerative disease . *Mol Gen Metab.* 70 (2): 142-150.

117. Aboshiba J, Dubis AM, van der Spuy J, Nishiguchi KM, Cheeseman EW, Ayuso C, Ehrenberg M, Simonelli F, Bainbridge JW, Michaelides M. (2015) Preserved Outer Retina in AIPL1 Leber's Congenital Amaurosis: Implications for Gene Therapy. *Ophthalmology.* 122: 862-864.

118. den Hollander AI, Davis J, Velde-Visser SD, Zonneveld MN, Pierrottet CO, Koenekoop RK, Kellner U, van den Born I, Heckenlively JR, Hoyng CB, Handford PA, Roepman R, Cremers FPM. (2004) CRB1 mutation Spectrum in Inherited Retinal Dystrophies. *Hum Mutat.* 24: 355-369.

119. Richard M, Roepman R, Aarsten WM, v Rossum AGSH, d. Hollander A, Knust E, Wijnholds J, Cremers FPM. (2006) Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies. *Hum Mol Genet.* 15: Review Issue No.2, R 235-R243.

120. Van de Pavert SA, Sanz SA, Aarsten WM, Vos RM, Versteeg I, Beck SC, Klooster J, Seeliger MW, Wijnholgs J. (2007) CRB1 is a determinant of Retinal Apical Müller glia cell features *GLIA*. 55: 1486-1497.

121. Yzer S, Fishman GA, Racine J, Al-Zuhaibi S, Chaker H, Dorfman A, Szlyk J, La chapelle P, van den Born I, Allikmets R, Lopez I, Cremers FPM, Koenekoop RK. (2006) CRB1 Heterozygotes with Regional Retinal Dysfunction: Implications for Genetic Testing of Leber Congenital Amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 47: 3736-3744.

122. Khaliq S, Abid A, Hameed A, Anwar Kh, Mohyuddin A, Azmat Z, Shami SA, Ismail M, Mehdi SQ. (2003) Mutation screening of Pakistani families with congenital eye disorders. *Exp Eye Res*. 76: 343-348.

123. Bujakowska K, Audo I, Mohand Said S, Lancelot ME, Antonio A, Germain A, Lévielland Th, Letexier M, Saraiva JP, Lonjou Ch, Carpentier W, Sahel JA, Bhattacharya SS, Zeitz Ch. (2012) CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies. *Hum Mutat*. 33: 306-315.

124. Moradi P, Davies WL, Mackay DS, Cheetham ME, Moore AT. (2011) Focus on molecules: centrosomal protein 290 (CEP290). *Exp Eye Res*. 92 (5): 316-317.

125. Cideciyan AV, Aleman TS, Jacobson SG, Khann H, Sumaroka A, Aguirre GK, Schwartz SB, Windsor EA, He S, Chang B, Stone EM, Swaroop A. (2007) Centrosomal ciliary gene CEP290/NPHP6 mutations result in blindness with unexpected sparing of photoreceptors and visual brain: implications for therapy of Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat*. 28 (11): 1074-83.

126. Perrault I, Delphin N, Hanein S, Gerber S, Dufier JL, Roche O, Defoort – Dhellemmes S, Dollfus H, Fazzi E, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. (2007) Spectrum of NPHP6/ CEP290 mutations in Leber Congenital Amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat*. 28 (11): 416-425.

127. Coppieters F, Lefever S, Leroy BP, De Baere E.(2010) CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. Hum Mutat. 31: 1097-1108.

X. Az értekezés témájában megjelent saját közlemények jegyzéke

1. **Vámos R**, Szigeti A, Lesch B, Varsányi B, Farkas Á. (2010) Az X-kromoszómához kötött, gyermekkorban kezdődő, niktalópiával járó retina disztrófiák differenciáldiagnosztikája. Szemészet, 147: 97-103.

:

2. **Vámos R**, Tatrai E, Nemeth J, Holder GE, Debuc DC, Somfai GM. (2011) The structure and function of the macula in patients with advanced retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci. 52 (11): 8425-8432.

IF 3.597

3. **Vámos R**, Kulm M, Szabo V, Ahman A, Lesch B, Schneider M, Varsanyi B, Nagy ZZ, Nemeth J, Farkas A. (2015) Leber congenital amaurosis: first genotyped Hungarian patients and report of 2 novel mutations in the CRB1 and CEP290 genes. Eur. J Ophthalmol. 26 (1): 78-84.

IF 1.381

4. **Vámos R**, Schneider M, Varsányi B, Szabó V. (2018) A CRB1 (Crumbs homologue 1) gén asszociált retinopáthiák jellemzői. Szemészet, 155 (4): 188-193.

XI. Egyéb közlemények jegyzéke

1. Weisschuh N, Mayer AK, Strom TM, Kohl S, Glockle N, Schubach M, Andreasson S, Bernd A, Birch DG, Hamel CP, Heckenlively JR, Jacobson SG, Kamme C, Kellner U, Kunstmann E, Maffei P, Reiff CM, Rohrschneider K, Rosenberg T, Rudolph G, **Vámos R**, Varsanyi B, Weleber RG, Wissinger B. (2016) Mutation Detection in Patients with Retinal Dystrophies Using Targeted Next Generation Sequencing.

Plos One. 11 (1): e0145951.

IF 2.806

2. Görbe E, **Vámos R**, Joó JG, Jeager J, Molvarec A, Berecz B, Horváth A, Sulya B, Rigó J Jr. (2010) Perioperative analgesia of infants during the therapy for retinopathy of prematurity. Med Sci Monit. 16 (4): CR186-189.

IF 1.699

3. Tuzson R, Varsanyi B, Nagy B V, Lesch B, **Vámos R**, Németh J, Farkas A, Ferencz M. (2010) Role of multifocal electroretinography in the diagnosis of idiopathic macular hole. Invest Ophthalmol Vis Sci. 51(3): 1666-1670.

IF 3.466

4. Dunai Gy, **Vámos R**, Treszl A, Kovács I, Szabó M, Szabó Éva, Vásárhelyi B. (2008) Norrie gén polimorfizmusok és koraszülöttek retinopathiája. Gyermekgyógyászat. 59: 323-326.

5. Görbe É, **Vámos R**, Rudas G, Tóth J, Jeager J, Harmath Á, Csaba Á, Csabay L. (2008) Neuronal migration disorders, agenesis of corpus callosum, preauricular skin tag and bilateral morning glory syndrome in a term newborn infant. Clin. Dysmorphol.

17: 123-125.

IF 0.521

6. Lesch B, Szabó V, Kánya M, Somfai G M, **Vámos R**, Varsányi B, Pámer Zs, Knézy K, Salacz Gy, Janáky M, Ferencz M, Hargitai J, Papp A, Farkas Á. (2008) Clinical and genetic findings in Hungarian patients with Xlinked juvenile retinoschisis. Mol Vis. 14: 2321-2332.

IF 2.464

7. Lesch B, Szabó V, Kánya M, Varsányi B, Somfai GM, Hargitai J, **Vámos R**, Fiedler O, Farkas Á. (2008) Truncation of retinoschisin protein associated with a novel splice site mutation in the RS1 gene. *Mol Vis*. 14: 1549-1558.

IF 2.464

8. Varsányi B, Somfai GM, Lesch B, **Vámos R**, Farkas A. (2007) Optical coherence tomography of the macula in congenital achromatopsia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48 (5): 2249-2253.

IF: 3,528

9. Hargitai J, Zernant J, Somfai GM, **Vámos R**, Farkas Á, Salacz Gy, Allikmets R. (2005) Correalation of Clinical and genetic findings in Stargardt disease patients from Hungary. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46 (12): 4402-4408.

IF 3,643

10. Récsán Z, Szamosi A, Karkó C, **Vámos R**, Sebestyén M, Fodor M, Salacz G. (2004) Refraktion und visus nach laserbehandlung bei retinopathia praematurorum (ROP) im stadium 3+. *Ophthalmologie*. 101 (1): 45-49.

IF 0.466

11. Récsán Z, **Vámos R**, Salacz G. (2003) Laser treatment of zone I prethreshold and stage 3 threshold retinopathy of prematurity. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 40 (4): 204-207.

IF 0.323

12. Farkas A, **Vámos R**, Bajor T, Mullner N, Lazar A, Hrabá A. (2003) Utilization of lacrimal urea assay in the monitoring of hemodialysis: conditions, limitations and lacrimal arginase characterization. *Exp Eye Res*. 76 (2): 183-192.

IF 2.611

13. Szabo A, Farkas A, **Vámos R**, Bajor T, Hrabak A. (2004) The inhibition of retinal inducible nitric oxide synthase overexpression and the attenuation of experimental uveitis by antiinflammatory drugs in rats. *Inflamm Res*. 6: 262-267.

IF 1.450

14. Hargitai J, Somfai GM, **Vámos R**, Farkas A, Allikmets R. (2004) A foveális vastagság és a maculatérfogat változásai Stargardt- macula dystrophiában. Szemészet 141 (1): 35-39.

15. Vannay Á, Dunai GY, Bányász I, Szabó M, **Vámos R**, Treszl A, Hajdú J, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2005) Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity. *Pediatr Res.* 57(3): 396-398. **IF 2.875**

16. Szigeti A, Hargitai Zs, Hargitai J, Szepessy Zs, Szamosi A, **Vámos R**, Németh J. (2010) Chronic progressive external ophthalmoplegia without ptosis. *Acta Ophthalmol.* 88: S246 **IF 2.8096**

XII. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani *Szüleimnek*, akik példamutatásukkal, szerető törődésükkel lehetőséget adtak arra, hogy idáig eljussak.

Hálásan köszönöm *Dr. Somfai Gábor Márk*, PhD med. habil. konzulensemnek a munkám során végig tanúsított önzetlen támogatását és precíz igényességét, mely mindig példaértékű számomra.

Szeretném megköszönni továbbá *Dr. Varsányi Balázs* PhD egyetemi adjunktus társkonzulensem értékes segítségét a genetikai vizsgálatok értékelésében.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Nagy Zoltán Zsolt*, *Prof. Dr. Németh János* valamint *Prof. Dr. Salacz György* és *Prof. Dr. Imre György* Professzor Uraknak a szakmai előrehaladásomban és dolgozatom megírásához nyújtott segítségükért.

Szeretném kifejezni köszönetemet *Prof. Dr. Süveges Ildikó* Professzor Emeritának, a Doktori Iskola Szemészeti Program vezetőjének értekezésem támogatásáért.

Köszönöm *Dr. Tátrai Erikának* (PhD) kitartó munkáját és sok segítségét a retina szegmentációs analízis területén.

Ezúton szeretném megköszönni *Dr. Szabó Viktóriának* (PhD) a genetikai vizsgálatok értékelésében nyújtott konstruktív szakmai segítségét és az egész munkám során nyújtott felbecsülhetetlen értékű baráti támogatását.

Hálával tartozom a *Semmelweis Egyetem elektrofiziológiai munkacsoportja* minden egyes tagjának a közös munkáért, különös tekintettel *Dr. Farkas Ágnesnek* (PhD egyetemi docens), hogy érdeklődésemet a ritka retinabetegségek iránt felkeltetten.

Köszönöm *Weiszer Ildikónak* az elektrofiziológiai vizsgálatok elvégzésében, valamint disszertációm képanyagának szerkesztésében nyújtott segítségét.

És végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom mindazoknak, akik gyógyító és tudományos munkámat segítették, akiktől pályám során tanultam.