

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ИМЕНИ М.М. КРАСНОВА»

На правах рукописи

Шмелькова Мария Сергеевна

**Клинико-генетические и биохимические аспекты наследственных
оптических нейропатий**

3.1.5. Офтальмология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Шеремет Наталия Леонидовна

Москва, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ.

Список сокращений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Молекулярно-генетические особенности ОН.....	16
1.1.1 Клеточное дыхание.....	16
1.1.2 Нарушение работы I комплекса дыхательной цепи митохондрий.....	17
1.1.3 Митохондриальный биогенез.....	18
1.1.4 Молекулярно-генетические методы оценки митохондриального биогенеза.....	24
1.1.4.1. Определение количества митохондрий в клетке.....	24
1.1.4.2. Определение биомаркеров.....	25
1.2. Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика наследственных оптических нейропатий	26
1.2.1. Наследственная оптическая нейропатия Лебера.....	26
1.2.2. Аутомно-доминантная оптическая нейропатия.....	28
1.2.3. Аутомно-рецессивная оптическая нейропатия.....	29
1.2.3.1. АРОН, ассоциированная с мутациями в ядерном гене DNAJC30.....	30
1.3 Дополнительные клинические методы исследования наследственных оптических нейропатий.....	32
1.3.1 Оптическая когерентная томография с функцией ангиографии	32
1.3.2. Фотопический негативный ответ.....	34

1.4. Метаболические нарушения у пациентов с наследственными оптическим инейропатиями	38
1.4.1. Витамин В9(фолиевая кислота).....	39
1.4.2. Витамин В12 (цианкобаламин).....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Клинические исследования	45
2.1.1. Характеристика выборки пациентов.....	45
2.1.2. Офтальмологические методы обследования пациентов.....	46
2.2. Молекулярно-генетические исследования	53
2.2.1. Материал для исследования.....	53
2.2.2 Методы молекулярно-генетического исследования.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	58
3.1. Результаты молекулярно-генетический исследований.....	58
3.1.1. Результаты определения митохондриального биогенеза.....	58
3.1.2. Результаты определения боимаркеров	60
3.1.3. Результаты определения уровня фолиевой кислоты.....	61
3.1.4. Результаты дополнительного поиска мутаций с.152>G в ядерном гене <i>DNAJC30</i>	63
3.2. Результаты клинических исследований.....	68
3.2.1. Результаты исследований ОКТА.....	68
3.2.2. Результаты анализа амплитуды ФНО.....	82
КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	98
ВЫВОДЫ.....	104
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	105

СПИСОК

ЛИТЕРАТУРЫ.....107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДОН – аутосомно-доминантная оптическая нейропатия

АДФ – аденозиндифосфорная кислота

АЗН – атрофия зрительного нерва

АМФК - 5'АМФ-активируемая протеинкиназа

АРОН – аутосомно-рецессивная оптическая нейропатия

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АФК – активные формы кислорода

ацетил-СоА – ацетил коэнзим А

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГКС – ганглиозные клетки сетчатки

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДЗН – диск зрительного нерва

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗВП – зрительно вызванные потенциалы

вЗВП – зрительно вызванные потенциалы на вспышку

пЗВП – зрительно вызванные потенциалы на паттерн

КГК – комплекс ганглиозных клеток

КЧСМ – критическая частота слияния мельканий

ЛЗА – лабильность зрительного анализатора

МАРК - митогенактивируемая протеинкиназа

МРТ – магнитно-резонансная томография

мтДНК – митохондриальная ДНК

НИОТ - нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

НОН – наследственные оптические нейропатии

НОНЛ – наследственная оптическая нейропатия Лебера

ОКТ – оптическая когерентная томография

ОН – оптическая нейропатия

ПССС - поверхностное сосудистое сплетение сетчатки

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭРГ – паттерн ЭРГ

ПЭЧ – порог электрической чувствительности

СНВС – слой нервных волокон сетчатки

ТГФК – тетрагидрофолиевая кислота

УФ – ультрафиолет б

ФНО – фотопический негативный ответ

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭРГ - электроретинография

ядНК – ядерная ДНК

FD - Foveal Density (суммарная относительная плотность капилляров поверхностного и глубокого сосудистого комплексов в области фовеа)

FGF-21 – Fibroblast Growth Factor (фактор роста фибробластов)

FLV – уровень фокальных потерь

GCC – Ganglion Cell Complex (комплекс ганглиозных клеток сетчатки)

GDF-15 – Growth Differentiation Factor (фактора дифференцировки роста)

GLV – уровень глобальных потерь

MD – Mean defect (средний дефект световой чувствительности)

MELAS – синдром - митохондриальная миопатия, энцефалопатия, лактатацидоз и инсультоподобные эпизоды

MLPA - Multiple ligase-dependent probe amplification (мультиплексная амплификация лигаз-зависимых проб)

MnSOD – фермент марганец-супероксид дисмутаза

MS – Mean sensitivity (средний показатель световой чувствительности)

MTHFR – метилентетрагидрофолатредуктазой

MTR – метионинсинтаза

MTRR - метионинсинтазаредуктазой

NAD(H) – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)

ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 — гены, кодирующие полипептиды I комплекса дыхательной цепи (субъединицы НАДН дегидрогеназы)

NRF-1 – Nuclear respiratory factor-1(ядерный фактор роста)

OPA1, OPA3/ OPA4, OPA6 – гены/локусы ядерной ДНК

OXPPOS – oxidative phosphorylation (окислительное фосфорилирование)

RF – Reliability factor

RPC - радиальные перипапиллярные капилляры

sLV – Loss variance

TFAM1,2 – транскрипционный фактор А митохондрий 1,2

TMEM126A – ген трансмембранного белка

TMRM – метиловый эфир тетраметилродамина

VD – vessel density (относительная плотность сосудистого русла)

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность темы и степень ее разработанности.

Наследственные оптические нейропатии (НОН) представляют собой группу заболеваний, приводящих к двустороннему и, зачастую, необратимому нарушению зрения, обусловленному мутациями в ядерной или митохондриальной ДНК (ядНК, мтДНК). В офтальмологической практике НОН встречаются относительно часто (1 на 15 000 – 50 000 населения). Выраженное снижение зрительных функций существенно ограничивает социальную и трудовую активность пациентов с НОН.

В основе патогенеза лежит повреждение ганглиозных клеток сетчатки (ГКС), аксоны которых формируют зрительный нерв, что приводит к его атрофии. Клинически НОН характеризуются внезапным или постепенным, моно- или билатеральным снижением остроты зрения, а также нарушением цветовосприятия. У пациентов наблюдается появление центральной или центроцекальной скотомы, что в дальнейшем ведет к практически полной потере центрального зрения.

Наиболее часто встречаемыми формами НОН считаются наследственная оптическая нейропатия Лебера (НОНЛ) и аутосомно-доминантная оптическая нейропатия (АДОН) [V. Carelli, 2018], реже наблюдается аутосомно-рецессивная оптическая нейропатия (АРОН). Все формы относятся к митохондриальным цитопатиям [A. Shemesh, 2022], однако, АДОН и АРОН возникают в результате мутаций в ядерной ДНК (ядНК), в то время как НОНЛ связана с мутациями в митохондриальной ДНК (мтДНК). Таким образом, первичные мутации, ассоциированные с НОНЛ, АДОН и АРОН различны, но, несмотря на это, патогенез, характеризующийся нарушением функциональных процессов в митохондриях у этих заболеваний схож.

В большинстве случаев (~90%) причиной развития клинической симптоматики у пациентов с НОНЛ являются три наиболее частые первичные

мутации мтДНК (m.3460G>A, m.11778G>A, m.14484T>C). Еще 5% приходится на более редкие мутации, характерные для НОН [А. Sadun, 2013], к которым также относятся мутации, ассоциированные с MELAS – синдромом (митохондриальная миопатия, энцефалопатия, лактат-ацидоз и инсультоподобные эпизоды). Однако приблизительно в 5% случаев тестирование пациентов с клинической симптоматикой НОН не приносит результатов, и при поиске частых мутаций мтДНК, яДНК, а также редких патогенных вариантов патологии не обнаруживают. В связи с этим исследование новых генетических вариантов и локусов, ассоциированных с НОН, является актуальным.

При повреждении митохондрий запускается процесс митофагии – для клетки это способ контроля количества и качества возобновляемой популяции митохондрий. Дисфункциональные митохондрии, например, с высоким уровнем мутаций мтДНК, подвергаются митофагии в первую очередь. Однако, при нарушении этих процессов дефектные митохондрии в клетки накапливаются, вызывая увеличение таких же дефектных популяций. Чтобы сбалансировать количество нормальной мтДНК в клетке активируются процессы митохондриального биогенеза [К. Palikaras, 2014].

При исследовании различных тканей, в которых функционально обусловлена повышенная метаболическая активность, в некоторых исследованиях у бессимптомных носителей НОН обнаруживалось более высокое количество митохондриальных копий по сравнению с заболевшими пациентами. Эти данные позволяют предположить, что повышение митохондриального патогенеза может быть одним из факторов, определяющих конверсию бессимптомного носителя в пациента с клиническими проявлениями НОН.

На сегодняшний день универсального, высокочувствительного и высокоспецифического биохимического теста для диагностики НОН не существует. В виду этого, актуальным представляется поиск и исследование

биомаркеров, которые могут быть использованы и были изучены при других митохондриальных заболеваниях [R.Filograna, 2021].

Известно, что дефицит фолиевой кислоты в организме может приводить к нарушению переноса электронов по электронтранспортной цепи митохондрий, снижению продукции АТФ и накоплению активных форм кислорода [R. Raman, 2017]. Важным участником обмена фолатов выступает витамин В12 (цианкобаламин). При его недостатке работа фолатного цикла нарушается, а фолиевая кислота в неактивной форме не усваивается организмом. Известно, что у многих пациентов с митохондриальными заболеваниями наблюдается вторичное снижение фолиевой кислоты в крови, что необходимо корректировать назначением препаратов фолиевой кислоты [A.Ormazabal, 2015]. Поэтому, актуальным представляется оценка уровня фолиевой кислоты и витамина В12 в сыворотке крови пациентов с НОН.

В последнее время данные, полученные при дополнительных методах исследования, таких, как оптическая когерентная томография с функцией ангиографии (ОКТА), а также фотопического негативного ответа (ФНО) – одного из элементов общей ЭРГ вносят все более весомый вклад в постановку диагноза НОН.

Микроангиопатические изменения при НОН являются характерными признаками заболевания [V. Carelli, 2004]. Исследование особенностей кровотока сетчатки и зрительного нерва с помощью оптической когерентной томографии с функцией ангиографии (ОКТА) в комплексе с другими диагностическими методами могут способствовать более глубокому пониманию пусковых патогенетических процессов, происходящих при НОН.

Первыми при манифестации НОН поражаются ганглиозные клетки сетчатки (ГКС). Оценка амплитуды и латентности фотопического негативного ответа (ФНО) может помочь определению степени вовлеченности в процесс ГКС и прогноз дальнейшего течения НОН.

Необходимость проведения исследований, направленных на изучение индивидуальных генетических и фенотипических особенностей пациентов с НОН, определяет актуальность настоящей работы, ее цель и задачи.

Целью настоящей работы является изучение клинико-генетических и биохимических аспектов наследственных оптических нейропатий.

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

1. Определить количество копий мтДНК в клетках крови и фибробластах у пациентов с НОНЛ и их здоровых родственников, оценить их протективное значение для развития заболевания.
2. Определить концентрацию и оценить диагностическую значимость биомаркеров FGF-21 и GDF-15 в плазме крови у пациентов с НОНЛ.
3. Оценить уровень витамина B12 и фолиевой кислоты в крови у пациентов с НОН.
4. Провести поиск мутаций в ядерном гене *DNAJC30* у пациентов с клинической симптоматикой НОН, определить долю пациентов с патогенными вариантами в данном гене среди всех пациентов с клинической картиной НОНЛ.
5. Изучить особенности кровотока в сосудах ДЗН, перипапиллярной и макулярной зон с помощью ОКТ-ангиографии у пациентов с НОН.
6. Изучить функциональные особенности ганглиозных клеток сетчатки с помощью оценки ФНО у пациентов с НОН.

Научная новизна

Впервые в российской популяции пациентов была проведена оценка количества копий мтДНК в клетках крови и фибробластах пациентов с НОНЛ и их родственников.

У пациентов с НОНЛ выявлено статистически достоверное повышение концентрации плазменного маркера FGF-21 по сравнению с контролем

($p < 0,05$). Статистически значимых различий для маркера GDF-15 в данных группах не обнаружено.

У пациентов с НОН выявлено снижение уровня фолиевой кислоты ниже или на границе нижней цифры референсных значений, а также по сравнению с пациентами с оптической нейропатией иного генеза и группой здоровых добровольцев.

Впервые в российской популяции у пациентов с клинической симптоматикой НОНЛ, но без лабораторно подтвержденных мутаций в мтДНК был проведен анализ ядерного гена *DNAJC30*, в результате которого в 22% случаев была обнаружена гомозиготная мутация с.152A>G. Впервые дана клиническая характеристика АРОН, ассоциированной с мутацией с.152A>G в гене *DNAJC30*.

Отмечено частичное или полное восстановление зрительных функций в 62% случаев у пациентов с мутациями в гене *DNAJC30* по сравнению с 26% пациентов с мутациями мтДНК.

Содержание витамина В12 в сыворотке крови у большинства пациентов с НОН находится в пределах референсных значений, однако значительно отличается от группы здоровых добровольцев.

С помощью метода ОКТ-ангиографии впервые в РФ была проведена оценка сосудистых изменений у пациентов с НОН.

Впервые в РФ была проведена оценка ФНО при регистрации фотопической ЭРГ, что позволило оценить функциональные способности ГКС у пациентов с НОН.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования показали высокую теоретическую и практическую информативность комплексной клиническо-генетической и биохимической диагностики НОН.

Проведена оценка количества копий мтДНК, а также оценка активности митохондриального биогенеза у пациентов с НОН и бессимптомных носителей.

Выявлены метаболические нарушения у пациентов с НОН, связанные с снижением уровня фолиевой кислоты и витамина В12 в сыворотке крови.

Описана новая мутация в ядерном гене *DNAJC30* у пациентов с ранее не обнаруженными мутациями мтДНК, ассоциированными с НОН. Это расширяет спектр генетического поиска у пациентов с клиническими проявлениями НОНЛ, а также дает возможность постановки диагноза и выбора тактики ведения и лечения пациентов.

Описаны изменения в сосудах микроциркуляторного русла ДЗН и сетчатки у пациентов на разных стадиях НОН, определены корреляции с особенностями течения заболевания, которые могут помочь практикующим врачам повысить точность диагностики и определить прогноз заболевания.

Методология и методы диссертационного исследования

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

Положения, выносимые на защиту

1. Копийности мтДНК в клетках периферической крови и фибробластах у пациентов с НОНЛ не отличалось от группы здорового контроля.
2. Диагностическая значимость определения концентрации биомаркеров FGF-21 и GDF-15 в крови у пациентов с НОНЛ не выявлена.
3. У пациентов с НОН выявлено снижение уровня фолиевой кислоты по сравнению с пациентами с оптической нейропатией иного генеза и группой здоровых добровольцев, а также снижение содержания витамина В12 в сыворотке крови по сравнению с группой здоровых добровольцев.
4. У 22% пациентов с клиническим диагнозом НОНЛ была обнаружена мутация с.152А>G в ядерном гене *DNAJC30*.

5. У пациентов с мутацией с.152A>G гена *DNAJC30* в 62 % случаев отмечалось частичное или полное восстановление зрительных функций.
6. С помощью метода ОКТ-ангиографии впервые в РФ была проведена оценка сосудистых изменений у пациентов с НОН.
7. Анализ показателей ОКТА выявил нарушение сосудистой плотности сетчатки и ДЗН, а также более высокие показатели толщины СНВС и сосудистой плотности ДЗН в височном сегменте у пациентов после 1 года заболевания с остротой зрения 0,5-1,0 по сравнению с пациентами с более низкой остротой зрения.
8. Амплитуда ФНО позволяет оценить функциональное состояние ГКС у пациентов с НОН.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов исследования определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок, использованием современных методов исследования и подтверждена в процессе статистической обработки материала. Анализ результатов исследования и статистическая обработка выполнены с применением современных методов сбора и обработки научных данных. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов клинических и лабораторных исследований.

Основные положения диссертации доложены на XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения 2018», XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Федоровские чтения 2019», «Mitochondria in human disease», Stockholm, 2019, XX Научно-практической нейроофтальмологической конференции «Актуальные вопросы нейроофтальмологии», 2020, XXVI Международном Офтальмологическом Конгрессе «Белые Ночи», 2020, XII Съезде офтальмологов России, 2020.

Личный вклад автора в проведенное исследование

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

Внедрение результатов работы в практику

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

Публикации по теме исследования

По теме работы опубликовано 14 печатных работ, из них 12 - в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, патент на изобретение «Способ коррекции окислительного стресса при наследственной оптической нейропатии Лебера» № 2704013.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 158 источников, из них 11 отечественных и 149 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 16 таблицами и 28 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Митохондриальные заболевания – гетерогенная группа заболеваний, основной особенностью которых является дисфункция работы электронтранспортной цепи митохондрий, приводящая к снижению митохондриального мембранного потенциала, росту продукции активных форм кислорода (АФК), снижению выработки клеточной энергии – АТФ и др. Это группа редких метаболических заболеваний, однако, суммарная частота в популяции по различным данным доходит до 1:500 случаев. Клинически митохондриальные болезни могут проявляться нарушением работы различных органов и систем с преимущественным поражением тканей с высокой метаболической активностью (нервной системы, мышечной системы, печени) [123].

К одной из самых частых митохондриальных патологий относятся наследственные оптические нейропатии (НОН). Наиболее распространены наследственная оптическая нейропатия Лебера (НОНЛ), причиной которой являются мутации в митохондриальной ДНК (мтДНК), а также аутосомно-доминантная оптическая нейропатия (АДОН) и аутосомно-рецессивная оптическая нейропатия (АРОН), обусловленные мутациями в ядерной ДНК (ядДНК)[24].

В связи с общими патофизиологическими особенностями для всех наследственных оптических нейропатий характерен ряд идентичных клинических симптомов: двустороннее симметричное снижение остроты зрения с образованием центральной или центроцекальной скотомы, дисхроматопсией, атрофией зрительного нерва (АЗН) с преимущественным истончением волокон папилломакулярного пучка. Несмотря на это, заболевания различаются по некоторым аспектам: степени потери зрения, выраженности атрофии зрительного нерва, течению заболевания, а также обратимости зрительных нарушений [94].

1.1. Молекулярно-генетические особенности НОН

Митохондрии - независимые двумембранные органеллы, находящиеся в цитозоле всех эукариотических клеток, за исключение эритроцитов. Их основной функцией является выработка АТФ путем окислительного фосфорилирования [40]. Однако в митохондриях также происходит множество не менее важных для клетки процессов, таких как бета-окисление жирных кислот, метаболизм аминокислот, цикл трикарбоновых кислот, метаболизм биотина, синтез гема, цикл мочевины, синтез пуринов и пиримидинов и др. В клетках млекопитающих содержится различное число митохондрий от нескольких сотен до многих тысяч, в зависимости от метаболической потребности ткани, подверженности окислительному стрессу и другим патологическим условиям. Каждая митохондрия содержит, в среднем, от 2 до 8 копий кольцевой мтДНК, которая представляет собой короткую двуцепочечную молекулу, состоящую из 16569 пар нуклеотидов и содержащую гены, кодирующие субъединицы дыхательной цепи митохондрий, транспортные РНК митохондрий, митохондриальные рибосомальные субъединицы, субъединицы цитохрома b [51,107].

Возможности репарации мтДНК изучены не до конца, однако, пока они признаются меньшими по сравнению с репаративной системой в ядре клеток. Отсутствие классических гистонов, полицистронность а также близкая расположенность к источникам активных форм кислорода (АФК) делает мтДНК особенно подверженной мутациям [12].

1.1.1. Клеточное дыхание.

Одной из функций митохондрий является клеточное дыхание [12]. Дыхательная (или электронтранспортная) цепь митохондрий состоит из пяти ферментативных комплексов. В I комплексе (*NADH дегидрогеназа*) происходит окисление NAD-H, два электрона переносятся на убихинон (коэнзим Q), а 4 иона H^+ - из матрикса в наружное пространство внутренней митохондриальной мембраны [102]. Комплекс II (*Сукцинатдегидрогеназа*) не осуществляет переноса

протонов, но, благодаря этому комплексу, в дыхательную цепь входят дополнительные электроны за счет окисления сукцината. *Комплекс III (Цитохром С редуктаза)* переносит электроны с коэнзима Q на цитохром С, а 2 иона H^+ на наружную поверхность внутренней митохондриальной мембраны. *Комплекс IV (Цитохром с оксидаза)* принимает 4 электрона с 4 молекул цитохрома С и переносит их на кислород, осуществляя также транспорт 4 ионов H^+ на наружную поверхность внутренней митохондриальной мембраны. *Комплекс V* – это фермент АТФ-синтаза, состоящий из большого количества белковых цепей, образующих две группы: группу F_0 , имеющую каналобразующую функцию и обеспечивающую переход протонов H^+ в матрикс, и группу F_1 , имеющую каталитическую функцию. Именно данная группа, используя энергию протонов, синтезирует АТФ [59].

1.1.2. Нарушение работы I комплекса дыхательной цепи митохондрий

Большинство мутаций, характерных для НОНЛ нарушают работу I комплекса электронтранспортной цепи митохондрий [105]. В результате накапливающиеся электроны покидают дыхательную цепь и вступают в реакцию с кислородом, образуя высокоактивные радикалы - активные формы кислорода, такие как супероксид анион (O_2^-), который затем, под действием митохондриального фермента марганец-супероксид дисмутазы (MnSOD) переходит в перекись водорода (H_2O_2). А перекись водорода, в свою очередь, может образовывать гидроксил радикал (ОН). В норме в митохондриях также происходит продукция АФК, а их накопление регулируется антиоксидантными механизмами. Более того, есть предположения, что свободные радикалы участвуют в некоторых процессах жизненного цикла клетки, таких, например, как апоптоз. Однако при избыточном накоплении АФК способны оказывать негативное влияние на клетки организма. Так, они могут повреждать железосерные центры дыхательных ферментов в комплексах I, II и III, а также ферментов цикла Кребса, таких как цис-аконитаза, что приводит к нарушению продукции и дефициту АТФ. Вследствие особенностей строения, мтДНК сама

по себе особо уязвима при избыточном взаимодействии с АФК, что приводит к накоплению крупных нуклеотидных делеций, а перекисное окисление липидов может повреждать мембраны митохондрий [103].

Ткань сетчатки обладает огромной метаболической активностью, поэтому особо уязвима к данным изменениям [66]. Описанные процессы окислительного стресса приводят к характерному для НОН повреждению и истончению слоя ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) и клинической манифестации оптических нейропатий [85].

1.1.3. Митохондриальный биогенез.

Основным компенсаторным механизмом при поражении ГКС вследствие митохондриальных дефектов является митохондриальный биогенез [63]. Впервые термин «митохондриальный биогенез» был использован в 1961 американским ученым J. Holloszy, описавшим процесс увеличения количества митохондриальных копий в клетках скелетных мышц с целью выработки большего объема АТФ в условиях повышенной потребности тканей в энергии при спортивных нагрузках [54]. Процесс поддержания количества митохондриальных копий в клетке контролируется механизмами биогенеза и деградации митохондрий. Форма митохондрий может меняться в результате процессов фузии (слияния) и разобщения (деления), которые являются частью их жизненного цикла. [99]. Если митохондрия повреждается, она делится, а затем уничтожается в результате митофагии. В здоровой клетке функционирование этих процессов помогает поддерживать постоянное необходимое для энергетического обеспечения ткани количество митохондриальных копий, а также избирательно уничтожать поврежденные органеллы. Однако, в условиях окислительного стресса процессы удаления мутировавших копий могут нарушаться [114].

Основными триггерами активации митохондриального биогенеза на сегодняшний день считаются физические упражнения, воздействие холода, а

также повреждение митохондрий, как правило, в результате окислительного стресса[7].

В ответ на эти изменения клетка отвечает усиленной активацией биогенеза - компенсаторным увеличением количества копий мтДНК [63].

В условиях дефицита энергии и окислительного стресса в клетке активируется ряд сигнальных агентов (киназ)[112], таких как *5'АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФК)*, *кальций/кальмодулинзависимая протеинкиназа (СаМК)*, *p38 MAPK (митогенактивируемая протеинкиназа)*, и *NAD-зависимая деацетилаза*, запускающие транскрипционный каскад. *АМРК* - клеточная протеинкиназа, регулирующая внутриклеточный энергетический метаболизм, в особенности, в условиях острого энергетического дефицита. В результате активации *АМРК* при усиленном потреблении энергии в клетках блокируется синтез жирных кислот и активируется их окисление. Активация сигнальных киназ в свою очередь, активирует уже имеющийся в клетке *белок-коактиватор PGC-1 α* , которому принадлежит наиболее значимая роль в регуляции процессов митохондриального биогенеза. Активированный *PGC-1 α* переносится в ядро, где коактивирует ряд транскрипционных факторов, таких как *NRF-1 (ядерный респираторный фактор -1)*, *NRF-2 (ядерный респираторный фактор -2)*, *ERR α (эстроген-связанный рецептор)*, *PPAR α и γ (рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом)*, которые, в свою очередь, способствуют экспрессии *Tfam (транскрипционного фактора А митохондрий)* [38]. *Tfam* инициирует процессы транскрипции и репликации мтДНК. Помимо этого, предполагается, что *PGC-1 α* может образовывать комплексы с митохондриальными транскрипционными факторами (*TFAM1,2*), что также инициирует экспрессию мтДНК [76,77]. Другими словами, результатом сложного каскада реакций, включающего в себя скоординированную активность митохондриального и ядерного геномов, является репликация молекулы мтДНК (Рис.1).

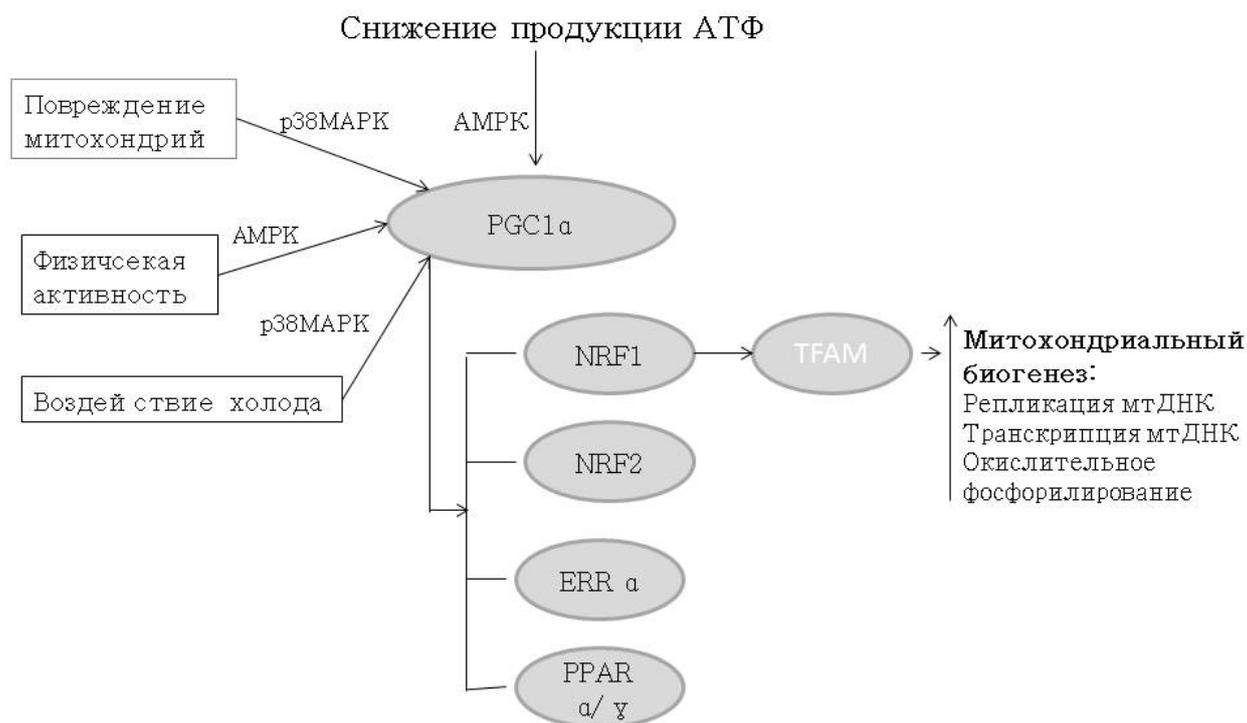


Рис 1. Схема сигнального пути, приводящего к активации митохондриального биогенеза.

Успешную активацию митохондриального биогенеза частично пытаются связать с феноменом неполной пенетрантности, характерной для НОНЛ [23]. Известно, что только у части обследуемых, связанных родством по материнской линии, с лабораторно подтверждёнными мутациями в мтДНК, развивается клиническая симптоматика заболевания [42]. Таким образом, наличие мутаций митохондриальной ДНК является важным аспектом, но, однако, не достаточным для развития НОНЛ, а пенетрантность заболевания может различаться в разных семьях с одной и той же мутацией или даже в пределах одной семьи, где некоторые могут всю жизнь оставаться носителями, а у других, наоборот, развивается клиническая симптоматика [70].

При исследовании различных тканей с высокой метаболической активностью, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом НОНЛ

(скелетная мышца, периферическая кровь, посмертные образцы ткани зрительного нерва) обращало на себя внимание существенное увеличение количества митохондриальных копий у носителей НОНЛ, пациентов с лабораторно-подтвержденными мутациями, но без клинических симптомов по сравнению с заболевшими пациентами и пациентами из контрольной группы. Предположительно, способность к успешной компенсаторной активации митохондриального биогенеза и увеличения количества митохондриальных копий определяет пожизненное носительство или, наоборот, предрасположенность к развитию в дальнейшем заболевания [86]. В своем исследовании A. Bianco et al. создали модель для наблюдения за количеством мтДНК. Данная модель учитывала три группы индивидуумов с приблизительным уровнем митохондриальных копий в клетке периферической крови 155 ± 24 , 612 ± 63 и 301 ± 14 . Эти популяции были разделены на контрольную группу, носителей и пораженных с приблизительным порогом ~ 500 копий мтДНК, отделяющим носителей от пораженных. Также был проведен логистический регрессивный анализ, согласно которому, вероятность носительства без дальнейшего развития клинической симптоматики при количестве копий мтДНК >600 равнялась 100%, в то время как при количестве копий <300 такая вероятность, практически, стремилась к нулю. У женщин кривая вероятности несколько отличалась от мужчин: при определенном количестве копий мтДНК вероятность носительства у них была значительно выше в сравнении с мужчинами. ($P < 0,01$), что коррелировало с данными о значительно более низком риске развития заболевания у женщин [18].

Стоит отметить, что в исследовании L. Iommarini et al, оценивающим митохондриальную копийность как у пациентов с НОНЛ, так и у пациентов с АДОН в образцах крови и тканей с высокой метаболической активностью отмечались более высокие показатели митохондриальной копийности в сравнении с контрольной группой. Исследователи высказывают предположение, что это может быть связано с активацией компенсаторных механизмов у пациентов с выявленными мутациями [57].

В настоящее время предложена теория о благоприятной роли женских половых гормонов эстрогенов в развитии клинической симптоматики наследственных оптических нейропатий. Эстрогены известны своим мощным антиоксидантным действием [16]. При серии лабораторных исследований посмертных образцов тканей зрительного нерва было обнаружено, что β -субъединицы рецепторов к эстрогенам находятся в митохондриях ГКС. При воздействии на клетки-гибриды с помощью антагониста рецепторов к эстрогенам ICI 182780, отмечалась повышенная продукция АФК, что вело к снижению мембранного потенциала митохондрий, высокому проценту апоптоза, снижению жизнеспособности клеток в сравнении с клетками-гибридами контрольной группы. При применении 17β -эстрадиола описанные выше негативные эффекты в значительной мере снижались, а также отмечалось повышение активности антиоксидантного фермента супероксид дисмутаза II [41,113].

Аналогичные результаты были получены при использовании фитоэстрогенов в комбинации с 17β - эстрадиолом. Фитоэстрогены (генестиен, даидзеин и др.) обладают высоко селективным действием на β - субъединицы рецепторов к эстрогенам, что является немаловажным, т.к. при воздействии на α - субъединицы отмечался ряд нежелательных побочных эффектов: гинекомастия и снижение либидо у мужчин, и высокий риск развития рака молочной железы и рака шейки матки у женщин. При селективном блокировании β -субъединиц рецепторов к эстрогенам компенсаторные эффекты в виде снижения количества АФК и активации митохондриального биогенеза исчезали, в то время как при блокировании α -субъединиц рецепторов к эстрогенам описанные эффекты сохранялись. Исследования проводились на трансмитохондриальных клеточных гибридах (цибридах) [157].

Кроме указанных изменений, при применении 17β - эстрадиола и фитоэстрогенов отмечалась активация собственного митохондриального биогенеза, а также небольшое, но значимое увеличение энергетической мощности клетки.

В настоящее время широко обсуждается роль внешних факторов в развитии клинической симптоматики НОНЛ. В частности, помимо митохондриальных мутаций, наиболее явными триггерами развития НОНЛ считаются курение и употребление алкоголя [92]. Кроме прямого токсического действия на нервные волокна посредством угнетения I комплекса дыхательной цепи митохондрий, никотин блокирует активацию митохондриального биогенеза, снижая компенсаторные возможности клеток и провоцируя развитие окислительного стресса [43]. Схожий патогенез обнаруживается при употреблении алкоголя и других наркотических веществ, а также некоторых лекарственных препаратов. По данным ряда исследований, наибольшей токсичностью обладают антиретровирусные препараты, а также противотуберкулезные препараты [84, 129].

Наибольшей активностью среди препаратов антиретровирусной терапии обладают нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) - Зидовудин, Фосфазид, Ламивудин; Абакавир, принцип действия которых заключается в ингибировании обратной транскриптазы – ключевого фермента ВИЧ. Однако, помимо воздействия на обратную транскриптазу, НИОТ специфично угнетают активность содержащейся в митохондриях ДНК-полимеразы- γ (POLG), фермента необходимого для репликации мтДНК, ингибируя таким образом процессы митохондриального биогенеза [32,145].

Наиболее высокой активностью в отношении микобактерий туберкулеза обладают препараты гидразида изоникотиновой кислоты (ГИНК): изониазид, рифампицин и этамбутол [156]. Согласно исследованиям, этамбутол является металлохелатором [136], который может нарушать функции металлсодержащих ферментов митохондрий, таких как медьсодержащая цитохром С оксидаза IV комплекса дыхательной цепи митохондрий, и железосодержащая НАДН-оксидоредуктаза I комплекса, что негативно сказывается на процессах окислительного фосфорилирования [71, 89].

Однако стоит отметить, что при регулярном приеме нейротоксичностью обладают и многие другие группы широко распространенных лекарственных

препаратов, например, некоторые антибиотики, противоэпилептические препараты, а также аспирин [87]. Важным также является контакт с пестицидами или цианидами в анамнезе [48].

1.1.4.Молекулярно-генетические методы оценки митохондриального биогенеза.

1.1.4.1.Определение количества митохондрий в клетке

На сегодняшний день существует несколько способов определения количества митохондрий в клетке. Так, используют метод окрашивания специфичными красителями, например *MitoTracker* с последующим анализом полученных образцов с помощью трансмиссионно-электронной и флуоресцентной микроскопии. Метод используется для визуализации митохондрий в клетках [146]. Новым способом оценки жизненного цикла митохондрий является специфический генетически кодируемый белок *MitoTimer* - это мутантная форма красного флуоресцентного белка, который по мере созревания изменяет свой цвет с зеленого на красный [74]. Еще один способ представляет собой определение активности митохондриальных ферментов, например, цитратсинтазы в лизатах клеток. Дыхательная функция митохондрий оценивается с помощью метода респиromетрии, а также измерением активности отдельных комплексов дыхательной цепи митохондрий методом флуориметрии. С помощью данных методик можно выявить не только снижение работы комплексов, например, комплекса I при НОНЛ и АДОН, но и компенсаторную активацию комплекса II, часто обнаруживаемую в условиях гипоксии, а также при дефектах I комплекса[80].

Для оценки митохондриального биогенеза используются методы количественной оценки мтРНК и уровня митохондриальных белков, а также митохондриальных транскрипционных факторов [47]. Однако для большинства из вышеописанных методов требуется либо рост клеточных культур *in vitro* или большое количество тканей или клеток, сохраняемых в определенных условиях

для достоверных результатов при анализе РНК, белков или энзимов, что не всегда представляется возможным в ходе исследования. В последнее время особое внимание уделяется методу количественной оценки мтДНК. Для этого оценивается соотношения копий митохондриального генома к ядерному геному [39]. В проводимых ранее исследованиях применялся метод саузенблоттинга, однако, на сегодняшний день наиболее широко применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. В основе метода лежит количественный анализ продуктов ПЦР путем определения их во флуоресцентном свете в ходе процесса амплификации. Анализ проводится в закрытой реакционной среде [47].

1.1.4.2. Определение биомаркеров

Помимо измерения копийности мтДНК в качестве теоретической оценки резистентности к развитию заболевания, предложено определять биомаркеры *FGF21* (фактор роста фибробластов - 21) и *GDF-15* (ростовой фактор дифференцировки - 15) для подтверждения наличия митохондриальной патологии и установления степени выраженности процесса. Оба фактора являются сывороточными биомаркерами повреждения митохондрий. *FGF21* – гормоноподобный цитокин, секретируемый в основном в печени, адипоцитах и поджелудочной железе, участвует в процессах липидного и углеводного обменов [117, 134]. По данным ряда исследований, концентрация *FGF21* повышается в сыворотке крови у пациентов с дисфункцией I комплекса дыхательной цепи митохондрий; повышение концентрации прямо пропорционально выраженности патологического процесса [28,147]. Отмечается специфичность *FGF21* для митохондриальных патологий с преимущественной вовлеченностью скелетных мышц [32]. *GDF-15* является цитокином семейства *TGF-β* (трансформирующего фактора роста-β). Он, подобно *FGF21* секретируется печенью, поджелудочной железой, а также легкими, плацентой и предстательной железой. Участвует в клеточном ответе на процессы острого воспаления и опухолевого роста. Повышение его уровня в сыворотке определяется у

пациентов с сердечно-сосудистыми поражениями, при которых этот цитокин вырабатывается в кардиомиоцитах в ответ на ишемию, нитроактивный или окислительный стресс[4]. По данным исследования у пациентов с подтвержденными митохондриальными заболеваниями с преимущественным поражением нервно-мышечного аппарата сывороточная концентрация *GDF-15* была в 11 раз выше в сравнении со здоровыми пациентами, а также с пациентами, имеющими патологию тех же органов и систем, но без митохондриального генеза [125]. Сравнительный анализ специфичности и чувствительности двух биомаркеров выявил, что эти показатели выше у *GDF-15*, что обусловлено специфичностью *FGF21* для митохондриальных заболеваний с преимущественным поражением скелетных мышц, в то время как концентрация *GDF-15* повышается при любых митохондриальных патологиях, вне зависимости от клинического фенотипа [98].

1.2. Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика наследственных ОН

1.2.1. Наследственная оптическая нейропатия Лебера.

Наследственная оптическая нейропатия Лебера, впервые описанная в 1871 году немецким офтальмологом Теодором Лебером, стала первым наследственным заболеванием с подтвержденной митохондриальной природой, благодаря группе исследователей под руководством D.C. Wallace, которые в 1988 году обнаружили точковую мутацию мтДНК у пациента с НОНЛ [104].

Заболевание встречается с частотой 1:31000 – 1:50000 населения.

У 90% пациентов с подтвержденным диагнозом НОНЛ встречается одна из трех наиболее частых мутаций m.11778G>A в гене ND4, m.3460 G>A в гене ND1 и m.14484T>C в гене ND6. На сегодняшний день, согласно списку из международной базы данных митохондриального генома человека MITOMAP еще 15 мутаций (m.14568C>T, m.14502T>C, m.14495A>G, m.14482C>G, m.14482C>A, m.14459G>A, m.13051G>A, m.10663T>C, m.10197G>A, m.4171C>A, m.3733G>A, m.3700G>A, m.3697G>A, m.3635G>A, m.3376G>A)

признаны первичными для НОНЛ. Это точковые мутации мтДНК, нарушающие работу I комплекса дыхательной цепи митохондрий. Кроме того, в базу внесены 19 кандидатных мутаций m.3472T>C, m.4025C>T, m.5244G>A, m.4640C>A, m.10237T>C, m.11253T>C, m.11696A>G, m.14596G>A, m.12811T>C, m.12848C>T, m.13637A>G, m.13730G>A, m.14279G>A, m.14325G>C, m.14498T>C, m.9101T>C, m.9804G>A, m.14831G>A, список которых регулярно расширяется [55]. Статус первичной получает кандидатная мутация, подтверждённая минимум у двоих не связанных родством по материнской линии пациентов [3].

Клинически НОНЛ характеризуется резким или постепенным безболезненным снижением остроты зрения чаще на одном глазу, с последующим вовлечением в процесс второго глаза. Средний возраст дебюта клинической симптоматики составляет 18-30 лет. Однако, в литературе встречается описание впервые возникших клинических проявлений НОНЛ в возрастном диапазоне от 3 до 80 лет [13, 120].

В связи с избирательным поражением при НОНЛ ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) характерным диагностическим признаком является формирование у пациентов центральной или центрорекальной скотомы при исследовании поля зрения [155].

Также, одним из клинических проявлений НОНЛ являются нарушения цветового зрения. У пациентов с НОНЛ зачастую определяется генерализованная дисхроматопсия [56], однако, нередко заболевание проявляется нарушением цветового восприятия лишь в определенных частях спектра: чаще – протаномалией – отсутствием цветовых ощущений в красно-зеленой части спектра, и, значительно реже, тританоопией – нарушением восприятия в сине-фиолетовой части спектра [124].

1.2.2 Аутосомно – доминантная оптическая нейропатия

АДОН (болезнь Кьера, ювенильная атрофия зрительного нерва) – на сегодняшний день считается наиболее часто встречаемой из всех

наследственных оптических нейропатий. У мужчин и у женщин АДОН диагностируется с одинаковой частотой 1:30000 - 1:50000 [153]. Впервые АДОН была описана датским офтальмологом Poul Kjer в 1959 году на примере 19 семей из Дании [68]. Однако, мутации гена *OPA1* яДНК, ассоциированные с АДОН, были идентифицированы только в 2000 году [143]. Первым обнаруженным геном, ассоциированным с АДОН, был ген *OPA1*, расположенный в длинном плече хромосомы 3 (3q28-3q29). Приблизительно, у 60% пациентов с АДОН обнаруживается мутация в гене *OPA1*, однако эта цифра может быть различной в разных странах. На сегодняшний день описано 280 мутаций в гене *OPA1*, а также открыты новые, ассоциированные с АДОН мутации в генах *OPA3* (19q13.2-13.3), регулирующих образование белков внутренней мембраны митохондрий, а также локусов *OPA4* (8q12.2-q12.3), *OPA5* (22q12.1-q13.1), *OPA8* (16q21-q22) [78].

Клинически АДОН проявляется двусторонним симметричным постепенным безболезненным снижением остроты зрения. Дебют клинических проявлений приходится в большинстве случаев на первые два десятилетия жизни, в среднем в 6-10 лет [62]. По сравнению с НОНЛ при АДОН отмечают менее выраженные показатели снижения зрения, и около 25% пациентов сохраняют высокие зрительные функции [69].

Как и при НОНЛ, при АДОН у пациентов при компьютерной периметрии определяется расширение слепого пятна и формирование центроцекальной скотомы, а реже парацентральных скотом с сохранением периферических границ поля зрения [58].

Также аналогично НОНЛ при АДОН характерно нарушение цветового зрения в виде генерализованной дисхроматопсии разной степени выраженности с дефектами в некоторых случаях в отдельных частях спектра [17].

1.2.3. Аутосомно-рецессивная оптическая нейропатия.

Редкая форма НОН, которая характеризуется ранней билатеральной безболезненной атрофией зрительного нерва.

В литературе также встречается термин аутосомно-рецессивная атрофия зрительного нерва.

По данным литературы, АРОН очень редко встречается изолировано. Как правило, заболевание проявляется в рамках мультисистемных патологий с поражением нервной и сердечно-сосудистой систем, а также других органов. АРОН входит в симптомокомплекс многих аутосомно-рецессивных синдромов (синдром Бера, оптикокохлеарный синдром, инфантильная АЗН Вента, оптикоакустическая атрофия с деменцией Йенсена и т.д.) [138].

Несмотря на это, в литературе все же встречаются описания изолированных случаев АРОН.

Angebault С. с соавторами 2015 году описали четыре семьи с ранним дебютом проявлений АРОН. Авторы обнаружили мутацию в гене *RTN4IP1*, который кодирует активность митохондриального фермента убихинон-оксидоредуктазы. При анализе культуры фибробластов, полученных от пациентов с мутацией *RTN4IP1*, было обнаружено снижение активности I и IV комплексов дыхательной цепи митохондрий, а также повышенная чувствительность к УФ-излучению [10].

Группа японских исследователей Okamoto N. и соавторы в 2017 году опубликовали исследование, в котором также сообщалось об обнаружении мутации в гене *RTN4IP1* у двух sibсов с клиникой АРОН. По сообщению авторов, у детей отмечались также сочетанные признаки митохондриальной энцефалопатии [108].

В 2014 году Metodiev M.D. и соавторы описали двух французских sibсов с изолированной АРОН. Мутация в гене *ACO2* была обнаружена с помощью секвенирования генома и подтверждена секвенированием по Сангеру. У пациентов была обнаружена сниженная активность митохондриальной аконитазы 2 – митохондриального белка, кодируемого геном *ACO2*. Аконитаза-2 катализирует реакцию изомеризации цитрата в изоцитрат, посредством образования цис-аконитата в цикле Кребса [91].

1.2.3.1 АРОН, ассоциированная с мутациями в ядерном гене *DNAJC30*

В 2020 году группа ученых под руководством Prokisch Н. провела исследование, целью которого был поиск гена, мутации в котором ассоциированы с развитием клинической симптоматики НОН, но не описаны ранее [76]. Как известно, мутации митохондриальной ДНК нарушают работу I комплекса дыхательной цепи митохондрий, первого и самого крупного из электронтранспортных комплексов, кодируемого белками как ядерной, так и митохондриальной ДНК. I комплекс состоит из нескольких субединиц и в результате этого, нарушается процесс переноса электронов между комплексами и, как следствие, выработка молекулы АТФ [77].

Известно, что функционально I комплекс разделяется на три модуля(Рис.2):

дегидрогеназный (N) модуль– модуль ввода электронов в дыхательную цепь. Он принимает электроны НАДН⁺;

гидрогеназный (Q) модуль – модуль вывода электронов. Его функция состоит в переносе электронов на убихинон;

модуль транслокации протонов (P) – перекачивает протоны через внешнюю мембрану митохондрий [81].

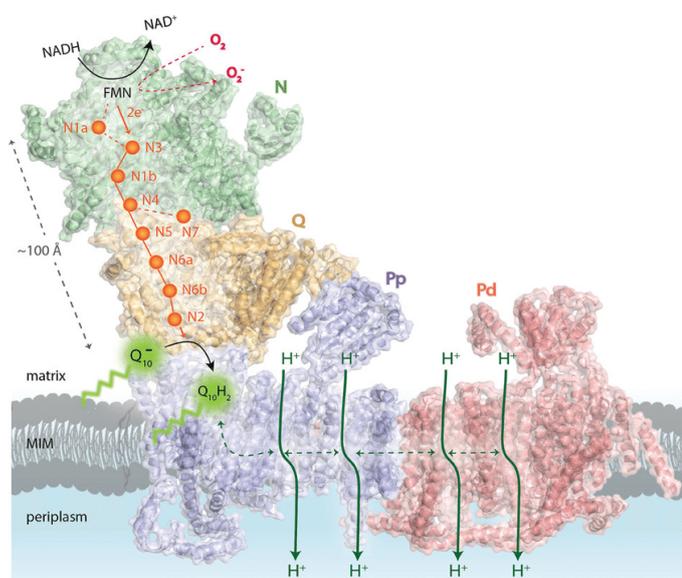


Рис 2. Функциональное подразделение I комплекса дыхательной цепи митохондрий. В модуле N (окрашен зеленым) в результате окисления НАДН с помощью флавин-моноклеотида (ФМН) высвобождается 2 электрона ($2e^-$), которые переносятся на железо-серные центры (Fe-S) (оранжевые сферы). Последний железо-серный центр N2 отдает 2 электрона на молекулу убихинона (Q10-), расположенную в модуле Q (окрашен золотым). При восстановлении убихинона происходят соответствующие изменения в спиральных протон-транспортирующем модуля (проксимальная часть (Pp) окрашена фиолетовым, дистальная часть (Pd) – коралловым). (Vinothkumar et al., 2014; PDB 4UQ8).

По результатам исследования Prokisch H. с соавторами, особую роль в патогенезе АРОН, ассоциированной с мутацией с.152A>G в гене *DNAJC30* также играет нарушение работы I комплекса дыхательной цепи митохондрий. У пациентов наблюдается дефект активности N- модуля I комплекса, который обеспечивает первый этап транспорта электронов и является наиболее уязвимым при повреждениях.

1.3.Дополнительные клинические методы исследования наследственных ОН

1.3.1. Оптическая когерентная томография с функцией ангиографии

Микроангиопатические изменения при НОН являются характерными признаками заболевания. У пациентов с подтвержденными мутациями мтДНК, но без клинических проявлений заболевания типичной находкой являются расширенные и извитые капилляры в перипапиллярной области. Зачастую, этому феномену сопутствует отек слоя нервных волокон сетчатки (СНВС), преимущественно в нижних и височных квадрантах. С появлением

клинической симптоматики микроангиопатические изменения нарастают, сопровождаясь атрофией волокон папилломакулярного пучка [119].

Однако роль кровотока сетчатки и зрительного нерва в патогенезе развития клинической симптоматики нейропатий мало изучена.

Исследование особенностей кровотока сетчатки и зрительного нерва в комплексе с другими диагностическими методами, могут способствовать более глубокому пониманию пусковых патогенетических процессов, происходящих при НОН.

На сегодняшний день предложен новый неинвазивный метод визуализации сосудов сетчатки – оптическая когерентная томография с функцией ангиографии (ОКТА). ОКТА позволяет получить информацию о кровотоке сетчатки и зрительного нерва и оценить анатомические особенности микроциркуляторного русла, его функциональность, наличие перфузии, неоангиогенез; визуализировать циркуляцию в сосудах сетчатки и хориоидеи, получить трехмерное изображение сосудов сетчатки, из которого с помощью наличествующих в ПО томографа алгоритмов возможно выделить для изучения находящиеся на различной глубине отдельные сосудистые комплексы[2]. Процедура выполнения ОКТА достаточно быстрая и безопасная. Получение изображений при условии правильной фиксации требует несколько секунд и не предполагает использования контрастных веществ, что позволяет избежать осложнений, связанных с этим[52, 61].

Первоначально наибольшее внимание обратили на себя структурные сосудистые изменения у пациентов с НОНЛ. Две группы исследователей Gaier et al. и De Rojas et al. с помощью прибора Carl Zeiss, Inc (Carl Zeiss Mesitec, Dublin, CA) описали структурные сосудистые изменения у двух пациентов с мутацией мтДНК m.11778G>A в острую фазу заболевания, обнаруженные с помощью ОКТА. Примечательно, что сосудистые изменения присутствовали и на парных глазах, на которых пока не отмечалось развития клинической симптоматики [33, 41]. Ghasemi et al. в

своем исследовании проанализировали ОКТА данные 12 пациентов с различными оптическими нейропатиями (передняя ишемическая оптическая нейропатия, аутосомно-доминантная оптическая нейропатия, ГОН, НОНЛ). Практически во всех случаях перипапиллярно отмечалось снижение сосудистой плотности. При НОНЛ исследователи также описали микроангиопатии: расширенные и извитые капилляры [42].

Перипапиллярные сосудистые нарушения рассматриваются как отличительный клинический признак острой стадии НОНЛ. S. Asanad et al., (Topcon DRI OCT; Triton) количественно оценили микроваскулярные изменения зрительного нерва и сетчатки, включая макулярную зону у пациентов в хронической стадии НОНЛ [11]. Согласно их наблюдениям, нарушения ретинального кровотока были наиболее выражены в макулярной зоне, что соответствует восходящей порции папилломакулярного пучка. В исследовании оценивались такие показатели как сосудистая плотность в поверхностных и глубоких сосудах сетчатки в конкретных ее зонах, а также корреляция этих показателей с остротой зрения и данными компьютерной периметрии. По результатам исследования была выявлена четкая взаимосвязь между снижением сосудистой плотности в поверхностном капиллярном сплетении и остротой зрения. Схожие изменения: были обнаружены этими же исследователями у пациента в острой стадии НОНЛ [118]. Наиболее заметными они были в назальном и нижнем квадрантах, что соответствует проксимальным порциям папилломакулярного пучка. Волокна в этой части представлены наименьшими по размеру ганглиозными клетками сетчатки, которые наиболее чувствительны к проявлениям митохондриальных нарушений [25]. Эти данные коррелируют с более ранним исследованием *Balducci et al.* о раннем поражении ГКС в соответствии с областью митохондриальных нарушений [14].

1.3.2 Фотопический негативный ответ

ГКС являются наиболее уязвимыми при НОН и, как правило, они первыми вовлекаются в процесс поражения вначале заболевания [148]. Изменения в ГКС определяются еще на доклинической стадии и считаются также одним из признаков конверсии заболевания – перехода из бессимптомной формы в форму с клиническими проявлениями [142].

Для комплексной оценки функциональной активности сетчатки и зрительного нерва применяются электрофизиологические методы исследования, например, метод электроретинографии (ЭРГ), в частности паттерн-ЭРГ (ПЭРГ) или зрительных вызванных потенциалов (ЗВП). Однако оба эти метода требуют определенных условий проведения исследования или не дают полной возможности для оценки функции ГКС. Регистрируемые при методе ЗВП потенциалы генерируются зрительной корой, что не позволяет напрямую судить о функции ГКС [135].

ПЭРГ в свою очередь отражает активность ГКС, но при ее регистрации часто обнаруживаются артефакты, если у пациентов наблюдаются повреждения в средних или наружных слоях сетчатки. Более того, пациент должен обладать достаточной остротой зрения или иметь необходимую коррекцию. В случае с пациентами с НОН это зачастую мало осуществимо из-за наличия центральных или центроцекальных скотом [67, 90].

Не так давно было обнаружено, что ГКС генерируют медленный негативный потенциал, который фиксируется на фотопической ганцфельд ЭРГ на вспышку сразу после b-волны, отражающей колбочковую активность. Этот компонент получил название фотопического негативного ответа (ФНО) (Рис.3) [82].

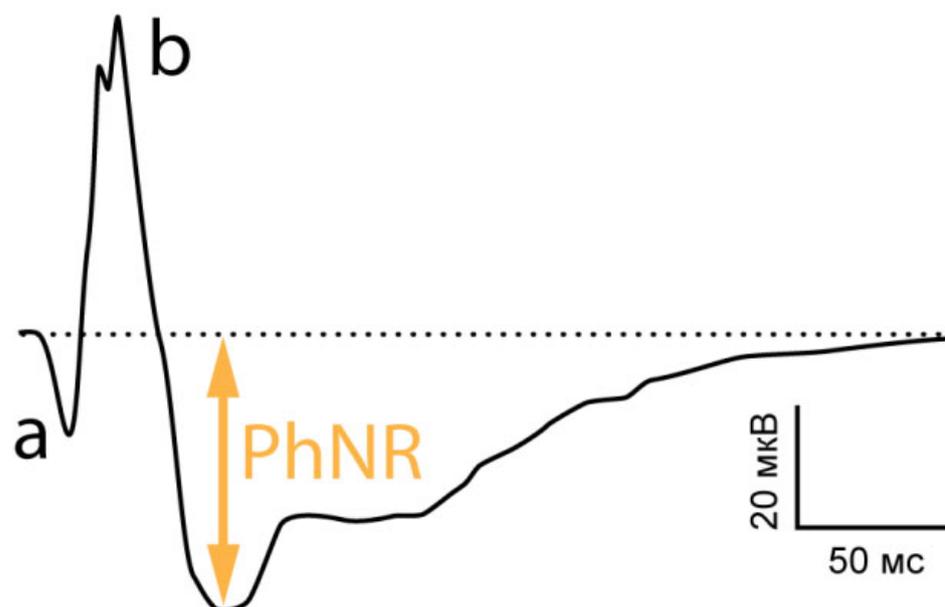


Рис 3. Фотопическая (колбочковая) ЭРГ здорового пациента на красный стимул на синем фоне; PhNR - ФНО

В ряде исследований была установлена корреляция между амплитудой ФНО и поражением ГКС, при таких патологиях как глаукома, идиопатическая внутричерепная гипертензия, диабетическая атрофия зрительного нерва, неврит зрительного нерва, а также сосудистые заболевания сетчатки [30, 46].

На сегодняшний день ФНО обладает рядом преимуществ перед остальными методами электрофизиологических исследований [149], в числе которых то, что являясь частью фотопической (колбочковой) ЭРГ, ФНО дает возможность одновременной регистрации а- и b-волн, что позволяет одновременно оценить функциональное состояние средних и наружных слоев сетчатки. При исследовании ФНО рефракционной коррекции для пациентов не требуется [116].

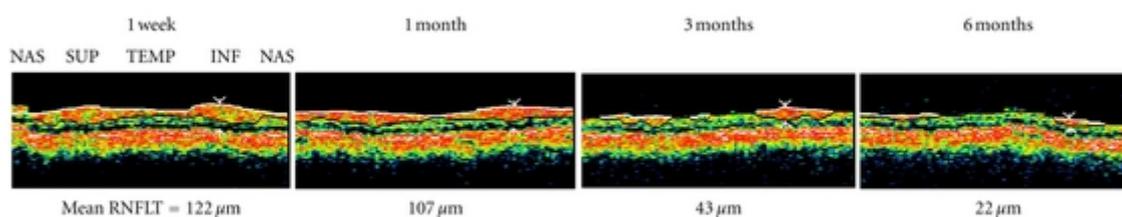
Впервые ФНО был описан в 1999 году Viswanathan S. с соавторами [126].

В исследовании они обнаружили негативный потенциал на фотопической ЭРГ у макак, следующий за b-волной и исчезающий после интравитриального введения тетродотоксина (ТТХ), который блокирует потенциалзависимые натриевые каналы и, следовательно, блокирует потенциал действия, генерируемый ГКС и амакриновыми клетками. Исследователи описали снижение амплитуды ФНО при глаукоме у обезьян с лазер-индуцированной внутриглазной гипертензией. В результате эксперимента было определено, что ФНО генерируется ГКС и их аксонами.

Эти данные были подтверждены в последующих исследованиях [37,65], описывающих снижение амплитуды ФНО у пациентов с глаукомой.

В исследовании 2004 года Machida S. с соавторами исследовали амплитуду ФНО у пациентов с посттравматической атрофией зрительного нерва и сравнивали ее с толщиной СНВС. По результатам исследования снижение амплитуды ФНО у пациентов отмечалось раньше, чем удавалось фиксировать истончение СНВС. Другими словам и, снижение функциональной активности ГКС опережает морфологические изменения (Рис.4)[82,83].

A



В.

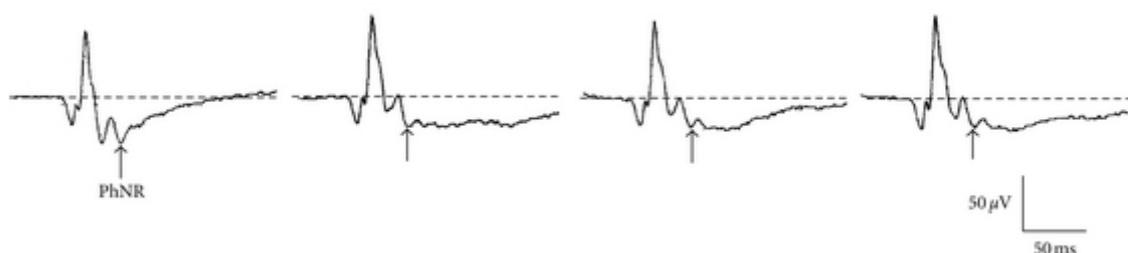


Рис 4. А - СНВС у пациента с посттравматической ОН по данным ОКТ через 1, 3 и 6 месяцев после травмы. В – колбочковая ЭРГ того же пациента, зарегистрированная в то же время; PhNR – фотопический негативный ответ

Группа исследователей под руководством Miyata К. исследовали различные методы электрофизиологических исследований у пациентов с АДОН с мутациями в гене *OPA1*. В исследование были включены 8 японских пациентов из 6 семей с мутациями в гене *OPA1* и клинической картиной, характерной для АДОН. У 5 из 8 пациентов отмечалось выраженное снижение амплитуды ФНО ($21.0 \pm 2.4 \mu\text{V}$) по сравнению с контролем ($34.3 \pm 9.0 \mu\text{V}$). У трех пациентов амплитуда ФНО была несущественно снижена или соответствовала нижней границе референсных значений [96].

В 2017 году Karanjia R. с соавторами описали бразильскую семью с мутацией mt.11778/ND4. В исследовании принимали участие 6 пациентов, 17 носителей и 11 контрольных пациентов, не состоящих в родственных связях с семьей. По данным авторов, все пациенты имели выраженные нарушения зрительных функций. Примечательно, что помимо значительного снижения амплитуды ФНО у пациентов с клинической симптоматикой (74.4%), авторы также отмечали ее снижение у некоторых бессимптомных носителей (26.1%) по сравнению с группой контроля. В некоторых случаях у носителей отмечались также начальные изменения толщины СНВС по данным ОКТ. Это может свидетельствовать о начальной дисфункции ГКС и возможной

конверсии заболевания из бессимптомной формы в форму с клиническими проявлениями. Исследование ограничено рамками одной семьи и небольшим количеством клинических пациентов, таким образом, полученные результаты должны быть подтверждены на более широкой и гетерогенной выборке [65].

1.4 Метаболические нарушения у пациентов с наследственными оптическими нейропатиями.

Хотя основной причиной, провоцирующей заболевание являются мутации мтДНК, в настоящее время предполагается, что целый ряд вторичных генетических и эпигенетических факторов может выступать в роли триггеров при НОН [154].

Так, немаловажную роль в развитии клинической симптоматики играет алиментарный дефицит у бессимптомных носителей мутаций мтДНК.

Оптические нейропатии, вызванные нехваткой витаминов и микроэлементов в организме человека относятся к группе метаболических нейропатий, в которую входят наследственные дегенеративные, токсические и алиментарные нейропатии[127]. Все они характеризуются нарушением митохондриального метаболизма, который может быть врожденным или приобретенным[109]. Некоторые нутриенты, такие как фолиевая кислота и витамин В12 играют важную роль в поддержании жизненно важных процессов клетки. Их дефицит может сам по себе обуславливать развитие симптомов нейропатии, а может выступать в качестве триггерного фактора при наличии мутаций, характерных для НОНЛ[48].

Стоит отметить, что до недавнего времени недостаточность фолиевой кислоты и витамина В12 была более характерна для жителей развивающихся стран с выраженными алиментарными дефицитами, а в развитых странах была казуистической находкой. Однако, в последнее время ситуация стала меняться в связи с нарастающей популярностью бариатрической хирургии[110] и широким распространением веганства[93, 121].

1.4.1. Витамин В9 (Фолиевая кислота)

Важную роль в жизненном цикле клетки играет обмен фолиевой кислоты, и нарушения баланса в этой системе вызывают ряд негативных последствий для организма, которые могут приводить к развитию многих заболеваний.

Фолиевая кислота относится к водорастворимым витаминам группы В и состоит из трёх структурных единиц: остатка птеридина, парааминобензойной и глутаминовой кислот. Впервые была выделена в 1941 году из зеленых листьев шпината, в связи с чем и получила свое название (от лат. *folium* — «лист») [36]. Чаще всего встречается в зеленых листовых овощах, фруктах и зелени, печени, арахисе, дрожжах бобах. Фолаты, синтезируемые кишечными бактериями, не вносят существенного вклада в обеспечение организма этим витамином, поскольку бактериальный синтез фолатов обычно ограничен толстой кишкой (ободочная кишка), тогда как абсорбция происходит главным образом в верхнем отделе тонкой кишки [53]. Основная форма производных фолиевой кислоты в пище — это 5-метилтетрагидрофолат полиглутамат, но также присутствуют некоторое количество формилтетрагидрофолатов [79]. Пищевые добавки и обогащенные продукты содержат окисленную форму фолатов - птероилглутаминовую кислоту, имеющую один остаток глутаминовой кислоты и обладающую вследствие этого большей биодоступностью, чем фолаты в форме полиглутаматов [88]. Витамин, поступающий в организм из различных источников, может содержать от 3 до 6 остатков глутаминовой кислоты.

Всасываясь в тонкой кишке, витамин В9 затем восстанавливается в энтероцитах он до тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК) и N5-метил-ТГФК с участием фолатредуктазы и дигидрофолатредуктазы, коферментом которых служит НАДФН₂. Далее по системе воротной вены фолаты переносятся в печень, где депонируются, а затем из печени перемещаются обратно в

кровотоков. В крови фолаты присутствуют как в свободной форме, так и в связанной с белками преимущественно альбуминовой фракции [50, 75].

Непосредственной функцией ТГФК является перенос одноуглеродных групп: формила (в составе N5 -формил-ТГФК и N10-формилТГФК), метенила (N5 ,N10-метенил-ТГФК), метилена (N5 ,N10-метилен-ТГФК), метила (N5 -метил-ТГФК) и формимина (N5 -формимино-ТГФК). [64,158]

Производные фолиевой кислоты играют ведущую роль в широком спектре жизненно важных процессов: стимулируют эритропоэз, участвуют в синтезе аминокислот, нуклеиновых кислот, пуринов, пиримидинов, витаминов, участвуют в обмене холина, гистидина, в метилировании ДНК и РНК, способствуют регенерации мышечной ткани, развитию быстро растущих тканей (кожа, оболочки ЖКТ, костный мозг), выполняют защитную роль при беременности от тератогенных и повреждающих факторов на плод, способствуют созреванию и функционированию плаценты, оказывают эстрогеноподобное действие. Данные функции реализуются в процессе фолатного цикла – важнейшего звена метаболизма клетки, функция которого заключается в переносе одноуглеродных фрагментов от одних биологических соединений к другим. Каскад реакций фолатного цикла контролируется тремя ферментами: метилентетрагидрофолатредуктазой (MTHFR), метионинсинтазой (MTR) и метионинсинтазаредуктазой (MTRR) (Рис.5) [97].

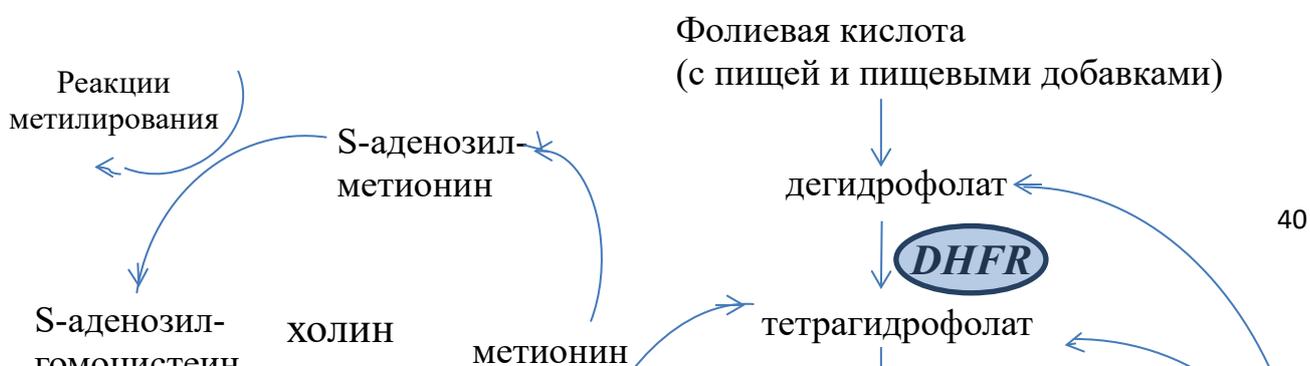


Рис 5. Фолатный цикл и цикл метионина

DHRF – дегидрофолатредуктаза; MTR – метионинсинтаза; MTRR – метионинсинтазаредуктаза; MTHFR - метилентетрагидрофолатредуктаза

Ключевым этапом в данном процессе является синтез метионина из гомоцистеина. Это происходит путем последовательных реакций превращения фолатов: восстановления 5,10-метилентетрагидрофолата до 5-метилтетрагидрофолата, несущего метильную группу, которая необходима для превращения гомоцистеина в метионин. Эта реакция катализируется ферментом метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR). Метильная группа переносится на витамин В12, который затем отдает ее гомоцистеину, образуя метионин с помощью фермента метионинсинтазы (MTR). Однако в некоторых случаях происходит окисление витамина В12, что подавляет активность метионинсинтазы. Нормальная активность фермента поддерживается с помощью процессов восстановительного метилирования с помощью фермента метионинсинтазаредуктазы (MTRR) [19].

Предполагается, что дефицит в организме может приводить к нарушению переноса электронов на молекулу кислорода, приводя к истощению запасов энергии (из-за снижения продукции АТФ) и накоплению

активных форм кислорода[8]. Недостаток фолиевой кислоты не только препятствует процессу переноса электронов, но и способствует повышению уровня токсичного формиата (соли муравьиной кислоты), который сам по себе блокирует перенос электронов на кислород, усугубляя условия окислительного стресса, а также делает клетку более чувствительной к нему [29].

Важная взаимосвязь описана между недостаточностью в организме фолиевой кислоты и развитием оптической нейропатии[15]. Предположительно в процессе развития симптомов оптической нейропатии при дефиците фолиевой кислоты принимают участие несколько патогенетических механизмов. Во-первых, фолатная недостаточность приводит к накоплению гомоцистеина, который вызывает гибель нервных клеток сетчатки, аксоны которых формируют зрительный нерв [34]. Во-вторых, фолаты участвуют в поддержании активности фермента тетрагидрофолатредуктазы (THFR), который, в свою очередь играет важную роль в процессах созревания олигодендроцитов. Недостаток фолиевой кислоты ведет к снижению активности фермента THFR и сбоем развития олигодендроцитов, что нарушает процесс миелинизации[131]. В-третьих, фолатная недостаточность вызывает нарушение митохондриального метаболизма из-за изменений фолатного цикла, влияет на работу электронтранспортной цепи и, таким образом, снижает выработку АТФ [144].

В своем исследовании A Aleyasin et al. определили взаимосвязь между развитием клинической симптоматики НОНЛ и наличием полиморфизма генов C677T MTHFR и A66G MTRR [9].

Взаимосвязь между развитием клинической симптоматики НОН и низким уровнем фолиевой кислоты подтвердили в своем исследовании U. Lachmund, DS Mojon. Они определили в сыворотке крови пациентки с мутацией м.11778, характерной для НОНЛ низкий уровень фолиевой

кислоты и витамина В12. Однако в анамнезе пациентки исследователи отмечают злоупотребление алкоголем, который сам по себе является триггерным фактором для развития клинической симптоматики НОНЛ [73].

1.4.2. Витамин В12(Кобаламин)

Витамин В12 (кобаламин), важнейший водорастворимый витамин группы В, который поступает в пищу вместе с продуктами животного происхождения. Выше всего его содержание в мясе, рыбе, яйцах, а также обогащенных злаковых. В желудке витамин В12 связывается и образует комплекс с внутренним фактором (фактором Касла)[49]. Это одноцепочечный гликопротеин, продуцируемый париетальными клетками слизистой оболочки желудка и играющий важную роль в абсорбции витамина кобаламина в подвздошной кишке. В кровотоке комплекс «внутренний фактор-кобаламин» связывается с транскобаламином II (ТСN2) – транспортным белком, отвечающим за доставку витамина В12 в клетки организма, а также в печень, где он депонируется [72].

Витамин В12 играет важную роль в метаболизме жиров, белков и углеводов, в процессах гемопоэза и многих других жизненно важных процессах[100].

Важно отметить, что витамин В12 необходим для наиболее эффективного усвоения фолиевой кислоты, так как он выступает в роли кофермента в заключительной реакции фолатного цикла и способствует трансформации фолиевой кислоты в ее активную форму - конверсии 5-метилтетрагидрофолата в тетрагидрофолат[128].

Основной причиной снижения уровня витамина В12 в сыворотке крови является алиментарная недостаточность (в основном, в развитых странах) и низкая биодоступность или нарушение всасывания или транспорта (преимущественно в развитых странах) ввиду пернициозной анемии[111, 130].

В недавних исследованиях[101, 133, 140] было показано, что кобаламин может выступать в роли внутриклеточного антиоксиданта, поглощая свободные радикалы в клетке. В исследовании Chan W.et al.[26] in vivo продемонстрировал, что дефицит витамина В12 вызывает супероксид-индуцированную гибель ганглиозных клеток сетчатки.

Важно отметить, что клиника оптической нейропатии может быть первым симптомом недостаточности витамина В12 и проявляться уже тогда, когда гематологические показатели еще в норме[95].

В исследовании J.F. Rizzo 3rd описал 27-летнего пациента с двусторонним снижением зрения и нарушениями цветовосприятия, у которого была выявлена мутация m.14484. При оценке показателей нутриентов и микроэлементов в крови было обнаружено снижение витамина В12. Пациенту были назначены инъекции витамина В12, и, по прошествии двух месяцев, было отмечено восстановление зрительных функций[122].

В 2006 году J. Pott с коллегами описали клинические случаи трех пациентов с мутациями мтДНК(14484 и 11778), характерными для НОНЛ. У всех пациентов при появлении клинической симптоматики оптической нейропатии был проведен анализ крови для оценки уровня витамина В12, и во всех трех случаях он был ниже нормы. Один из трех пациентов придерживался строгой веганской диеты[115].

Описан случай постепенной безболезненной билатеральной потери зрения у 11-летней девочки. В течение продолжительного времени пациентка придерживалась очень строгой диеты, с полным исключением всех продуктов животного происхождения. У девочки была обнаружена новая мутация мтДНК в гене *ND5*, а также существенно сниженный показатель витамина В12 в сыворотке крови[127].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа основана на анализе результатов клинических исследований, проведенных в ФГБНУ «НИИ глазных болезней» (директор – д.м.н. Юсеф Наим Юсеф), молекулярно-генетических исследований, выполненных в ФГБНУ «Медико-Генетический Научный Центр им. Академика И.П. Бочкова» (директор – член-корреспондент РАН, профессор, д.б.н. С.И.Куцев; руководитель лаборатории наследственных болезней обмена веществ д.б.н., Е.Ю. Захарова).

2.1 Клинические исследования

2.1.1. Характеристика выборки пациентов

Клиническое исследование основано на анализе данных обследования 95 пациентов (189 глаз) с бинокулярной оптической нейропатией. У пациента с травматической отслойкой сетчатки в анамнезе в исследование включены показатели только одного глаза.

Средний возраст на момент обследования $31,5 \pm 9,71$ лет (размах 17-42). Критерии для включения больных в исследование с подозрением на наследственную ОН были следующие:

1. Двустороннее одновременное или последовательное безболезненное снижение остроты зрения, острое или хроническое;
2. двусторонняя центральная или центрорекальная скотома;
3. двусторонняя дисхроматопсия;
4. в острой стадии заболевания гиперемия ДЗН, извитость ретинальных сосудов, отек перипапиллярного СНВС или нормальная неизменная картина глазного дна;
5. в хронической стадии заболевания частичная АЗН с диффузной или височной бледностью ДЗН, истончением перипапиллярного СНВС;
6. лабораторно подтвержденное наличие одной из мутаций, ассоциированных с НОН.

Критериями исключения в исследование являлись: другая установленная этиология бинокулярной ОН (воспалительная, ишемическая, инфильтративная, компрессионная, травматическая, токсическая).

Все пациенты получали энерготропную, митохондриально-направленную терапию, назначаемую при НОН.

Методом ОКТА были обследованы 29 больных с НОН, а также 15 здоровых добровольцев из группы контроля.

Анализ ФНО проводили у 14 пациентов (28 глаз) с подтвержденным диагнозом НОН, а также у 9 человек (18 глаз) группы контроля.

В исследование по измерению уровня фолиевой кислоты и витамина В12 были включены 28 пациентов с НОН. Средний возраст пациентов – $28,2 \pm 5,3$ лет. Группу сравнения составили 54 пациента с ОН воспалительного, травматического, компрессионного генеза (возраст $49,0 \pm 16,0$). В группу контроля вошло 15 здоровых добровольцев (возраст $33,2 \pm 5,4$).

Группы пациентов и группы контроля во всех исследованиях были однородны по возрасту (критерий Колмогорова-Смирнова, $p > 0,1$).

2.1.2. Офтальмологические методы обследования пациентов

В ходе проведения работы использовали традиционные офтальмологические методы обследования: визометрию с максимальной коррекцией аметропии, рефрактометрию, биомикроскопию, тонометрию.

Оценку цветовосприятия проводили по полихроматическим таблицам для исследования цветоощущения Е.Б.Рабкина[5].

Проверку осуществляли с очковой коррекцией для близости, отдельно для каждого глаза, предъявляя таблицы на расстоянии 33-35см. Результаты исследования оценивали по количеству прочитанных таблиц, всего для исследования использовали 27 таблиц.

При **обратной офтальмоскопии** на щелевой лампе с помощью диагностической линзы MaxField High Mag 78D (Ocular Instruments, США) оценивали состояние ДЗН, центральной и периферической зоны сетчатки; наличие и степень выраженности сосудистых изменений.

Компьютерную периметрию проводили на периметре Octopus 900 (Interzeag AG, Switzerland). Пациентов обследовали с помощью статической программы N1 (неврологической программы) и полуавтоматической кинетической программы с объектом III/4e, позволяющей определять площадь поля зрения, слепого пятна, скотом. Программа N1 – программа для исследования пороговой световой чувствительности центрального 30° и периферического 90° поля зрения. Оценивали индексы периметрии: MS – средний показатель световой чувствительности (Mean sensitivity), MD – средний дефект световой чувствительности (Mean defect), sLV – показатель, отражающий глубину скотом (Loss variance).

При низкой остроте зрения использовали программы LVC Low Vision для исследования центрального поля зрения. Оценивали индексы периметрии: MS – средний показатель световой чувствительности (Mean sensitivity), MD – средний дефект световой чувствительности (Mean defect), sLV – показатель, отражающий глубину скотом (Loss variance).

Исследование выполняли при стандартных условиях проведения статической периметрии:

- Яркость поверхности полусферы 10 cd/m² (31,4 asb).
- Цвет поверхности полусферы – белый.
- Размер стимула: 0,43° или 2,26мм (диаметр), соответствует размеру III по Гольдману для программы N1; 9,03 мм, соответствует размеру V по Гольдману для программы LVC.
- Экспозиция стимула: 100 мс – программа N1, 200мс – программа LVC.
- Яркость стимула – от 0 до 1000 asb, что соответствует световой чувствительности сетчатки от 0 до 40 dB. Достоверность периметрического

исследования оценивалась с помощью показателей ложноположительных и ложноотрицательных ответов и фактору достоверности, который не должен превышать 15%.

Результаты при использовании программы N1 считались аномальными, если индексы периметрии (программа N1) были: MD (Mean defect) - более 2 децибел и/или sLV (Loss variance) – более 2,5 децибел. Все результаты статической периметрии, включенные в данное исследование, были достоверны, так как индекс RF (Reliability factor), рассчитанный по ложноположительным и ложноотрицательным ответам пациентов, во всех случаях был менее 15%.

Всем пациентам была выполнена **ОКТ сетчатки и зрительного нерва** с помощью спектрального ретинотомографа RTVue-100 (США). ОКТ проводится в затемненном помещении в условиях мидриаза. Оптический когерентный томограф RTVue – 100 обладает высокой скоростью сканирования (26000 А-сканов в секунду) и высокой разрешающей способностью (5 микрон), а также специальным программным обеспечением для автоматической обработки получаемых сканов и карт. Каждому пациенту проводилось сканирование в режиме линейных сканов (cross line), карты толщины сетчатки в режиме MM5, сканирование ДЗН (протоколы ONH и 3D Disc) и карты толщины комплекса ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) (ганглиозные клетки сетчатки, нервные волокна и внутренний плексиформный слой) (протокол GCC – Ganglion Cell Complex). Картирование в режиме MM5 позволяет проводить оценку толщины сетчатки в центральной области по зональному стандарту ETDRS (фовеа, пара- и перифовеа) с индикацией как средних (по зонам и секторам) значений толщины сетчатки, так и степени отклонения от возрастной нормы значений толщины сетчатки в каждой точке.

Проводили оценку общей толщины сетчатки, толщины внутренних и наружных слоев сетчатки в макулярной зоне: фовеа – окружность, диаметром 1 мм, а также в 4 секторах внутренней и наружной кольцевидных зон

макулярной области (пара- и перифовеа) диаметром 3 мм и 5 мм соответственно. Согласно EMM5 протоколу исследования толщины сетчатки ОКТ RTVue-100, толщина внутренних слоев сетчатки измеряется как расстояние между внутренней пограничной мембраной и наружной границей внутреннего плексиформного слоя, что соответствует морфологическим границам КГК. Таким образом, карта толщины внутренних слоев сетчатки протокола EMM5 отражает пространственные особенности структуры КГК макулярной зоны.

Преимуществом данного томографа является наличие уникального протокола анализа комплекса ГКС, который успешно используется в ранней диагностике таких нейродегенеративных заболеваний, как глаукомная оптическая нейропатия, рассеянный склероз и многие другие. В этом протоколе для центральных зон сетчатки за 0,58 секунды производится особый набор оптических сканов (15 параллельных вертикальных и 1 горизонтальный - в сумме 14994 локальных измерений) в зоне размером 7x7 мм, центрированной на расстоянии 1 мм темпорально от фовеолы (т.е. в области максимальной концентрации ганглиозных клеток).

Эти сканы автоматически обрабатываются для получения карты толщины комплекса ГКС. Карта отображает состояние комплекса ГКС в зоне диаметром 6 мм, что соответствует 20° поля зрения. Толщина комплекса ГКС – т.е. расстояние между внутренней пограничной мембраной и наружной границей внутреннего плексиформного слоя и её усредненное значение (GCC Average), а так же значение для верхнего и нижнего сегмента, рассчитывалась автоматически.

Помимо этого определяли показатели уровня фокальных и глобальных потерь (FLV и GLV соответственно).

Параметр FLV (уровень фокальных потерь) определяется как интегральное (среднее) значение отклонения от нормативных значений для областей с существенными значениями потерь. Под существенными потерями подразумеваются потери, превышающие на 65% величину стандартного

отклонения (стандартное отклонение – 5% от нормативного значения для данной точки). Уровень фокальных потерь измеряется в процентах и отражает амплитуду (глубину) потерь КГК. Параметр FLV применим для детектирования фокальных потерь комплекса ГКС.

Параметр GLV (уровень глобальных потерь) определяется как сумма всех относительных дефектов, нормализованная к общей площади карты измерений – т.е. усредненный по площади процент потерь КГК и применим при диагностике диффузных потерь КГК.

Помимо этого, оценивали среднюю толщину СНВС в перипапиллярной зоне и отдельно по секторам.

Электрофизиологические методы обследования выполнены к.м.н. И.А. Ронзиной.

Исследование порога электрической чувствительности сетчатки (ПЭЧ) и проводимости зрительного нерва (ЛЗА), а также определение критической частоты мельканий (КЧСМ) проводили по стандартной методике на электроофтальмометре «Lametesk» (Россия). Регистрация зрительных вызванных корковых потенциалов на вспышку (вЗВП) и паттерн (пЗВП) с угловыми размерами стимула 1.0° и 0.3° осуществлялась на универсальной электрофизиологической установке «Tomey EP-1000, Multifocal» (Германия) (программы "ЗВП вспышка" и "ЗВП стандарт"). Все исследования проводились монокулярно. При анализе результатов оценивали наличие и степень отклонения всех исследуемых параметров в сравнении с группой контроля.

ФНО оценивали в фотопической ЭРГ, регистрируемой на белом фоне на белые вспышки четырех интенсивностей (0,375; 0,75; 1,5; 3,0 кд·с/м²) по протоколам, рекомендуемым международными стандартами ISCEV [124]. Интервал между вспышками составлял 1 с. Предварительно проводили световую адаптацию к фоновому белому свету в течение 10 минут. Для регистрации фотопической ЭРГ в качестве активного применяли роговичный хлорсеребряный электрод типа «петля» (НК-Loop, Словения), в качестве

референтных и заземляющего электродов использовали стандартные хлорсеребряные чашечки. Роговичный электрод устанавливали в нижнем конъюнктивальном своде, референтные — фиксировали на висках, заземляющий — на мочке уха. На референтный и заземляющий электроды накладывали электропроводящую пасту. Кожу в местах наложения электродов предварительно обезжировали. Анестезию роговицы проводили инстилляцией раствора алкаина 0,5 %.

Оптическую когерентную томографию с функцией ангиографии (ОКТА) проводили с помощью томографа xR Avanti, Optovue Inc., Fremont, CA, USA с ПО AngioVue с программным обеспечением AngioAnalytics Phase 7.0, основанного на алгоритме устранения проекционных артефактов 3D PAR, и обеспечивающего достоверное аналитическое определение плотности капиллярной сети. Для повышения качества ОКТ ангиограмм прибор использует режим Dual Track с функциями компенсации микродвижений глаз во время так называемого перекрёстного сканирования и последующей 3D коррекции полученных ангиограмм с помощью специального ПО.

С помощью режима En Face проводилась автоматическая сегментация ОКТА ангиограмм, что позволило *in vivo* исследовать по отдельности ретинальные сосудистые комплексы, как поверхностный, включающий радиальное перипапиллярное капиллярное сплетение (плексус), состоящее из капилляров параллельных аксонам слоя нервных волокон, и поверхностное сосудистое сплетение, снабжаемое центральной артерией сетчатки и состоящее из больших артерий, артериол, капилляров, венул и вен расположенное по большей части в слое ганглиозных клеток сетчатки, так и глубокий сосудистый комплекс, состоящий из промежуточного сосудистого сплетения и глубокого сосудистого сплетения и локализованный в основном во внутреннем ядерном и наружном плексиформном слоях [1]. В режиме EnFace томографа xR AVANTI, используя соответствующие слои выделения, можно вычленил для анализа по отдельности, соответственно, поверхностный (Superficial) или глубокий (Deep) сосудистый комплекс.

Верхняя граница слоя для Superficial проходит по внутренней пограничной мембране, нижняя – на 10 мкм ниже внутреннего плексиформного слоя (ВПС). Верхняя граница слоя для Deep находится на 10 мкм ниже ВПС, нижняя - на 10 мкм ниже наружного плексиформного слоя (НПС). Пациентам выполняли сканы сетчатки Angio Retina и HD Angio Retina размерами 3x3 мм и 6x6 мм с разрешением 320x320 и 400x400 пикселей соответственно и автоматической сегментацией на поверхностный и глубокий сосудистые комплексы -Superficial и Deep.

В макулярной области измерялась относительная плотность сосудистого русла сетчатки (Vessel Density, VD %) - отношение площади, занимаемой сосудами в исследуемой зоне, к общей площади этой зоны. Измерения проводились в фовеальной зоне (в окружности диаметром 1мм), в парафовеа – в зоне между границей фовеа и окружностью диаметром 3 мм вокруг центра, а также перифовеа – от границы парафовеа до окружности диаметром 6 мм. Зоны парафовеа и перифовеа подразделялись для анализа дополнительно на 4 квадранта: темпоральный, назальный, верхний и нижний. Измерялись относительная плотность сосудистого русла (VD) по указанным квадрантам, по верхней и нижней гемисфере и средняя по зонам (Whole Image VD).

Скан HD Angio Disc размером 4,5x4,5мм выполнялся в зоне ДЗН и перипапиллярной области с разрешением 400x400 пикселей. В режиме EnFace выделялся слой нервных волокон и анализировались расположенные в нём радиальные перипапиллярные капилляры (RPC) – радиальное перипапиллярное сплетение, Данный протокол позволяет оценить плотность сосудов в пределах ДЗН – в зоне, ограниченной кругом диаметром 2 мм центрированным по центру ДЗН, а также перипапиллярной области, которая определялась в виде кольца, ограниченного кругами с диаметрами 2 и 4мм. Перипапиллярная область разбивалась для анализа на 8 сегментов и 4 сектора. Проводилось измерение относительной плотности сосудов (RPC density %) в зоне ДЗН (Inside Disc), в указанной перипапиллярной зоне по

сегментам и среднее по перипапиллярной зоне (Peripapillary), а так же среднее по обеим этим зонам (Whole Image), Программное обеспечение Angio Analytics позволяло учитывать при измерении как все сосуды в зоне ДЗН, так и отдельно относительную плотность капилляров, за вычетом крупных сосудов – Small Vessels Density, которая изучалась в данном исследовании.

В исследование включались сканы, выполненные с качеством не менее 7/10 без наличия существенных артефактов от микродвижений глаза. Ошибки автоматической сегментации слоев сетчатки при их наличии, исправлялись в ручном режиме.

2.2. Молекулярно-генетические исследования

Молекулярно-генетические исследования проведены в лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ “Медико-генетического научного центра им. академика Н.П.Бочкова” совместно с сотрудниками к.б.н. П.Г. Цыганковой, Ю.С. Иткис, Т.Д. Крыловой.

Секвенирование экзона проведено совместно с к.б.н. М.Д. Логачевой, в Лаборатории эволюционной геномики факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова.

2.2.1 Материал для исследования

Для исследований использовались образцы венозной крови 95 пациентов и их родственников, собранной в пробирку с ЭДТА.

Для выявления активации биогенеза митохондрий (т.е. увеличения их количества) использовался метод оценки количества мтДНК в клетках крови и фибробластах 17 пациентов, 16 родственников, носителей мутаций без клинических проявлений, и 9 здоровых добровольцев.

Имуноферментный анализ (ИФА) для измерения концентрации биомаркеров FGF – 21 и GDF – 15 проводился 23 пациентам с НОНЛ и 30 здоровым добровольцам группы контроля.

Секвенирование полного экзона проведено 10 пациентам.

Секвенирование по Сенгеру для выявления патогенных мутаций в гене *DNAJC30* проведено 21 пациенту.

2.2.2 Методы молекулярно-генетического исследования

MLPA-тест на 3 частые точковые мутации в мтДНК при НОНЛ.

Анализ на 3 частые мутации мтДНК m.11778 G>A, m.3460 G>A, m.14484 T>C (выявляемые по данным литературы у более, чем 90% пациентов) проводили методом мультиплексной амплификации лигаз-зависимых проб (Multiple ligase-dependent probe amplification, MLPA). Дизайн проб проводили самостоятельно в лаборатории. Синтез олигонуклеотидов проведен в компании Евроген (Россия). Результаты анализа визуализировали на полиакриламидном геле. Образцы ДНК с установленными ранее другими методами мутациями использовали для контроля в каждой постановке. Образцы с изменениями при MLPA анализе далее исследовали методом прямого автоматического секвенирования по Сенгеру для подтверждения выявленной мутации.

Секвенирование по Сенгеру для выявления 19 точковых мутаций мтДНК при НОНЛ. При негативном тесте на 3 частых мутации пациентам проводили более расширенное исследования для поиска 19 точковых мутаций мтДНК, которые описаны в базе MITOMAP, как патогенные, вызывающие развитие НОНЛ и описанные исследователями более, чем в 2 семьях с НОНЛ. Исследовались следующие нуклеотидные замены в мтДНК: m.11778 G>A, m.3460 G>A, m.14484 T>C, m.3376 G>A, m.3635 G>A, m.3697 G>A, m.3700 G>A, m.3733 G>A, m.4171 C>A, m.10197 G>A, m.10663 T>C, m.13051 G>A, m.14459 G>A, m.14482 C>A/G, m.14495 A>G, m.14502 T>C, m.14568 C>T, m.3472 T>C. Анализ проводился методом секвенирования по

Сенгеру. Подбор олигонуклеотидных праймеров проведен в лаборатории. Синтез олигонуклеотидов проведен в компании Евроген (Россия). Секвенирование по Сенгеру проведено в лаборатории на приборе ABI3500-XL фирмы Thermo Fisher (США) с использованием реактивов производителя.

Полный анализ мтДНК методом массового параллельного секвенирования. При негативном тесте на 19 частых мутаций мтДНК пациентам проводили анализ всей последовательности мтДНК для поиска редких патогенных вариантов. Исследование проводилось методом массового параллельного секвенирования. мтДНК предварительно амплифицировалась в 2 фрагмента со специфическими праймерами (дизайн проводился в лаборатории) для получения ПЦР-продуктов в 8 тыс п.н. Далее проводилась ферментативная фрагментация, баркодирование и секвенирование на приборе IonTorrent S5 (Thermo Fisher, США) по протоколу, адаптированному из Kraytsberg Y, Guo X, Tao S, Kuznetsov A, MacLean C, Ehrlich D, Feldman E, Dombrovsky I, Yang D, Cloutier GJ, Castaneda-Sceppa C, Khrapko K. Quantitation of Mitochondrial DNA Deletions Via Restriction Digestion/Long-Range Single-Molecule PCR. *Methods Mol Biol.* 2016;1351:33-46. Анализ данных проводился с использованием баз данных MITOMAP, MITIMPACT.

Секвенирование по Сенгеру для гена *DNAJC30* для выявления патогенных мутаций проведено пациентам и их родителям с использованием оригинальных праймеров. Синтез олигонуклеотидов проведен в компании Евроген (Россия). Секвенирование по Сенгеру проведено на приборе ABI3500-XL фирмы Thermo Fisher (США) с использованием реактивов производителя.

Секвенирование полного экзона проведено 10 пациентам на платформе Illumina с длиной прочтения 150 нуклеотидов с обоих концов фрагмента. Данные переводили в формат fastq с помощью программы bcl2fastq и удаляли низкокачественные прочтения и адаптерную последовательность с помощью программы 59 Trimmomatic. Затем

проводили картирование на референсную последовательность генома человека (hg19), постпроцессинг выравнивания, выявление вариантов и фильтрацию вариантов по качеству, а также аннотацию выявленных вариантов по всем известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда методов предсказания патогенности замен (SIFT, PolyPhen2-HDIV, PolyPhen2-HVAR, MutationTaster, LRT), а также методов расчета эволюционной консервативности позиций (PhyloP, PhastCons). Для оценки популяционных частот выявленных однонуклеотидных мутаций, коротких инсерций и делеций, и вариаций копийности ДНК использовали выборки проектов «1000 геномов», ESP6500 и Exome Aggregation Consortium

Метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для определения копийности мтДНК в клетках крови и фибробластах кожи.

Измерение количества мтДНК проводилось методикой ПЦР в реальном времени по протоколу, описанному ранее [6]. Обработка сырых данных проводилась в программе Design and Analysis Software v1.5.1, QuantStudio 3 and 5 systems. В каждой постановке присутствовал контрольный образец, относительно которого высчитывается параметр ddCq для исследуемых образцов. Далее рассчитано среднее ddCq для группы образцов здоровых контролей и ddCq всех образцов разделено на данное значение (чтобы на графике среднее было единицей).

Для выявления активации биогенеза митохондрий использовался метод оценки количества мтДНК в клетках крови и фибробластах пациентов. Копийность оценивалась с помощью ПЦР в реальном времени. Оценивалось соотношение количества мтДНК мишеней к ядерным генам известной копийности у пациентов и в контрольной группе, совпадающей по возрасту. Праймеры для 3 митохондриальных ампликонов (ND1; ND4; D-loop) и ядерного (B2M) подобраны в лаборатории ДНК – диагностики ФГБНУ «МГНЦ», Москва. Синтез олигонуклеотидов проведен в компании Евроген (Россия). Эффективность ПЦР-РВ оценивалась по стандартной кривой в

диапазоне количества ДНК от 50 до 0.8 нг / реакцию. В качестве матрицы использовались серийные разведения ДНК.

Уровень FGF-21 определялся количественно **иммуноферментным методом (ИФА)** в образцах сыворотки при помощи тестсистемы Human fibroblast growth factor 21 (fgf-21) ELISA KIT (BCM Diagnostics, Германия). Учет результатов осуществлялся на микропланшетном ридере Luminometer Photometer LMA01 фирмы Beckman Coulter(450 нм). Обработка данных проводилась с помощью алгоритма 4PL на сайте elisaanalysis.com.

Уровень GDF-15 определялся в сыворотке крови с помощью тестсистемы (Biovendor, Czech Republic) по протоколу производителя.

Для определения уровня фолиевой кислоты в сыворотке крови применяли микробиологический тест с использованием микропланшета, покрытого *Lactobacillus rhamnosus*. Рекомендованные референсные значения представлены в диапазоне 3,1-17,5 нг/мл.

Уровень витамина В12 в сыворотке крови определяли с помощью хемилюминесцентного иммуноанализа на микрочастицах (анализатор Architect i2000 (Abbott)). Рекомендованные референсные значения для витамина В12 представлены в диапазоне 187-883 пг/мл.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

3.1. Результаты молекулярно-генетических исследований

3.1.1. Результаты определения митохондриального биогенеза

Измерение содержания мтДНК проведено в клетках крови и фибробластах пациентов с НОНЛ и их родственников по материнской линии. Исследовались образцы ДНК из периферической крови: 17 пациентов с генетически подтвержденным диагнозом НОНЛ (15 мужчин, 2 женщины в возрасте от 15 до 41 года), 16 родственников - носителей мутаций (без

клинических проявлений) и 9 человек из группы сравнения (группа здоровых индивидуумов, схожая по возрасту с группой пациентов). Сравнение двух выборок пациентов (здоровых носителей и пациентов с НОНЛ) не показало различий между ними в копийности мтДНК в клетках крови (Рис.6), также не было выявлено отличия этих групп с контролем.

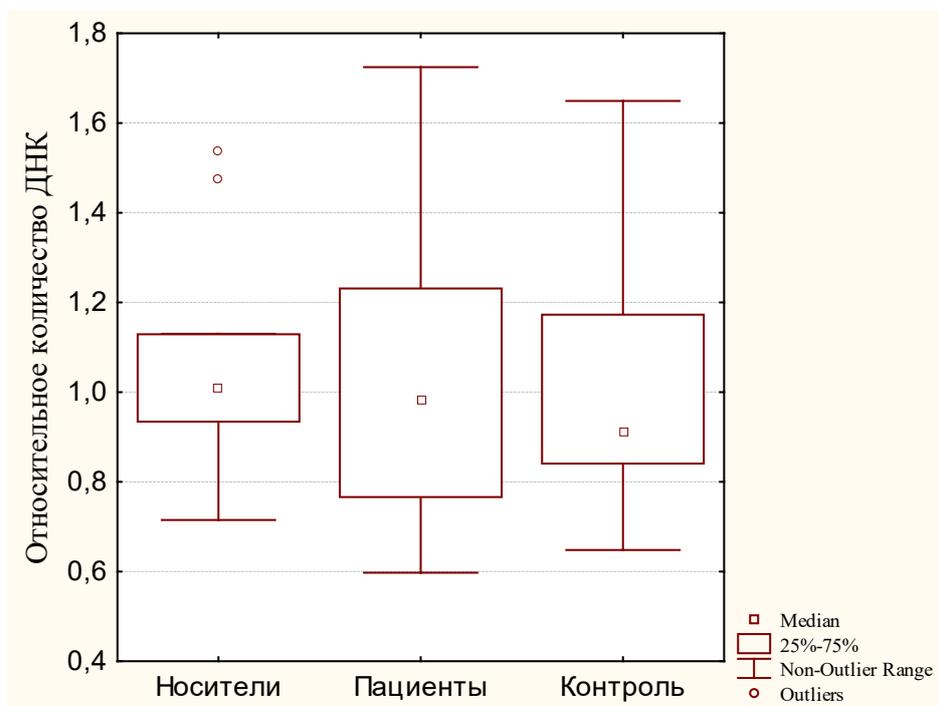


Рис.6. Относительная копийность мтДНК в клетках крови пациентов с НОНЛ (N=17), носителей мутации (N=16) и контрольной выборке здоровых индивидуумов.

Результаты исследования не совпадают с данными работы Giordano C. et al., 2013, в которой представлены результаты измерения копийности мтДНК в 3 больших родословных и 39 отдельно отобранных семей с НОНЛ. Исследователи выявили значительное повышение количества мтДНК у носителей заболевания по сравнению с больными и контролем. Можно предположить, что подобное расхождение в результатах может быть связано с разными способами выделения клеток крови, использовавшимися в работе. Следует отметить, что в работах других исследователей Nishioka et al. [106], Yen et al. [150], также было обнаружено лишь незначительное

повышение количества мтДНК у носителей по сравнению с пациентами и контролем.

Для получения дополнительных данных было проведено измерение копийности мтДНК в клетках фибробластов. Эта методика снижает вариабельность данных за счет отсутствия контаминации тромбоцитами. Кроме того, хорошо известно, что в клетках фибробластов пациентов с НОНЛ также виден и биохимический дефект митохондрий [21], значит, эта ткань может быть подходящим объектом исследования. Отличий в копийности мтДНК у пациентов с НОНЛ (N=7) по сравнению с контролем (N=2) в клетках фибробластов также не обнаружено (Рис.7)

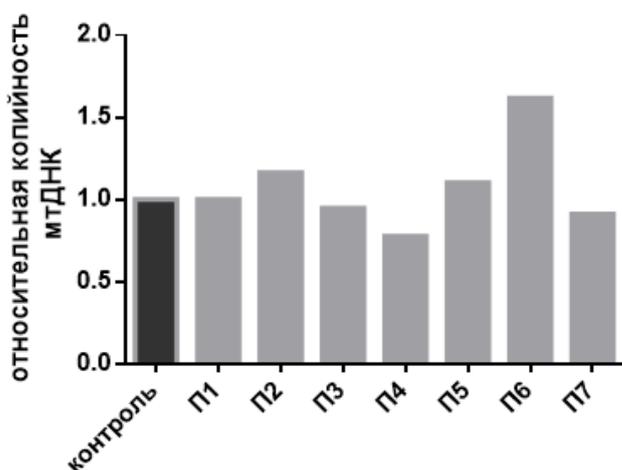


Рис. 7. Относительная копийность митохондриальной ДНК в клетках фибробластов пациентов с НОНЛ (N=7) и контрольных фибробластов здоровых индивидуумов (N=2).

3.1.2. Результаты определения биомаркеров

Определение уровня биомаркеров FGF-21 и GDF-15 было проведено у 23 пациентов с НОНЛ с целью изучения диагностической значимости указанных биомаркеров при диагностике митохондриальных заболеваний.

При сравнении по FGF-21 групп пациентов с НОНЛ $266,70 \pm 387,08$ (размах 0,000-1738,00) и контроля $124,86 \pm 158,77$ (размах 30,00-664,00) получена статистически значимая разница $p < 0,05$. Принятые референсные значения (95% перцентилей) 0-440 пг/мл. Однако разброс показателей FGF-

21 у пациентов с НОНЛ и группы контроля не позволяет однозначно оценить этот показатель как маркер заболевания (Рис.8).

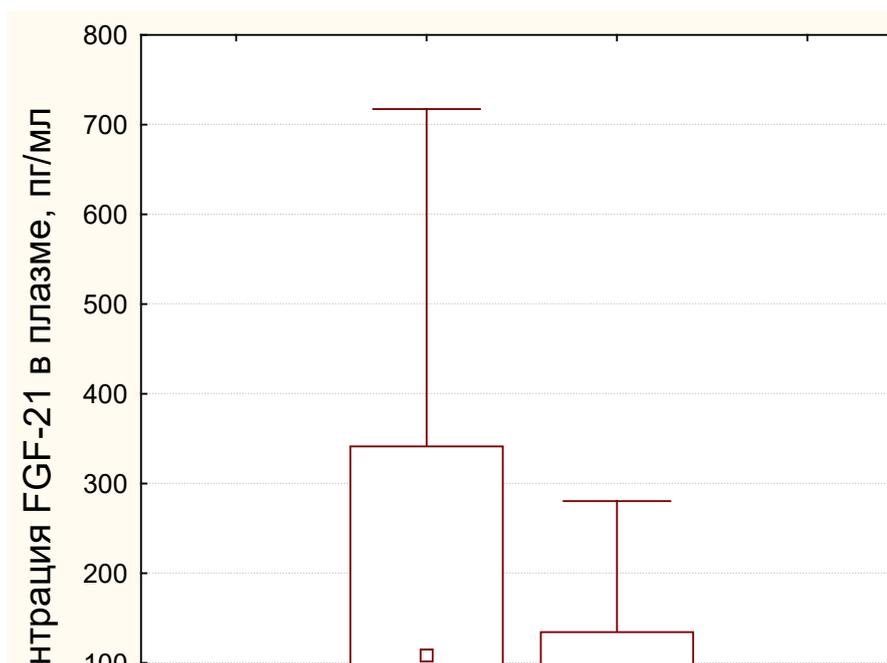


Рис 8. Концентрация биомаркера FGF-21 в сыворотке крови у пациентов с НОНЛ (n=23) и группы контроля (n=59). Значения концентраций на оси Y представлены в логарифмической шкале

При сравнении по маркеру GDF-15 групп пациентов с НОНЛ $1823,91 \pm 705,13$ (размах 665,000-3300,00) и контроля $1978,81 \pm 705,13$ (размах 70,00-1521,34) разницы получено не было (Рис.9).

Таким образом, диагностическая значимость биомаркеров FGF-21 и GDF-15 в диагностике НОН остается спорной.

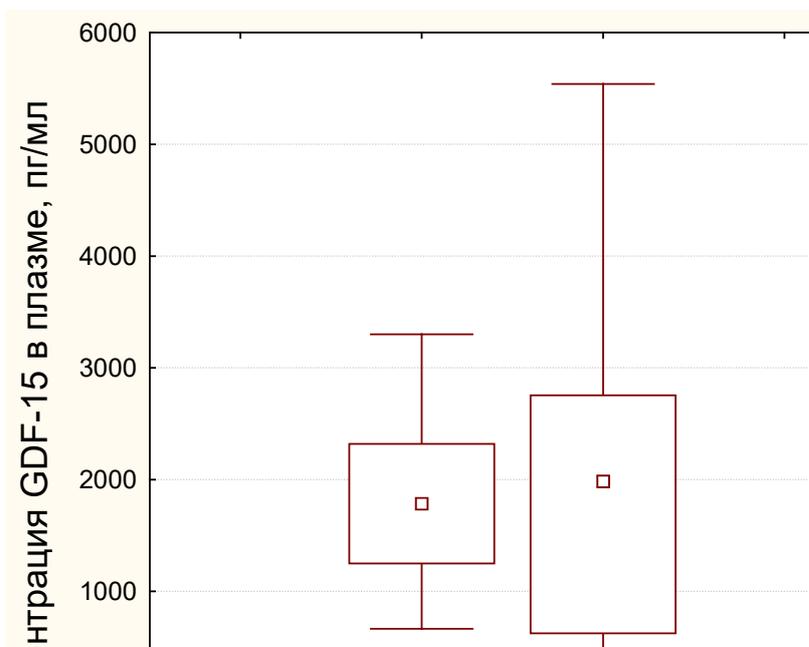


Рис 9. Концентрация биомаркера GDF-15 в сыворотке крови у пациентов с НОНЛ (n=23) и группы контроля (n=59). Значения концентраций на оси Y представлены в логарифмической шкале

3.1.3. Результаты определения уровня фолиевой кислоты и витамина В12

В исследование были включены 28 пациентов с НОН с мутациями мтДНК: m.11778G>A, m.3460 G>A, m.14484T>C, 3635G>A, m.3472T>C и мутацией яДНК с.152A>G в гене *DNAJC30*. Средний возраст пациентов – $28,2 \pm 5,3$ лет. В сыворотке крови пациентов с НОНЛ было выявлено снижение фолиевой кислоты ниже или по нижней границе референсных значений (3,1-17,5 нг/мл), в среднем $4,2 \pm 1,6$ нг/мл. В контрольной группе, которую составили пациенты с заболеванием зрительного нерва иного генеза, содержание фолиевой кислоты составило $10,8 \pm 4,5$ нг/мл, а в группе сравнения здоровых людей соответствующего пациентам с НОНЛ возраста – $15,1 \pm 2,3$ нг/мл (Рис.10). При сравнении показателей фолиевой кислоты в этих трех группах пациентов (критерий Краскела-Уоллиса) были получены значимые различия $p < 0,000000$ (рис.10).

Содержание витамина В12 составляло $397,4 \pm 161,1$ пг/мл в группе пациентов с НОН, $434,6 \pm 141,7$ и $593,5 \pm 85,6$ соответственно в группе с ОН иного генеза и группе сравнения. И хотя только у одного пациента с НОНЛ было получено снижение витамина В12 ниже референсных значений, при сравнении трех групп была выявлена достоверная разница между 1-3 группой $p < 0,001$, между 2-3 группой $p < 0,01$ (критерий Краскела-Уоллиса). Патент на изобретение «Способ коррекции окислительного стресса при наследственной оптической нейропатии Лебера» № 2019111850 от 18.04.2019.

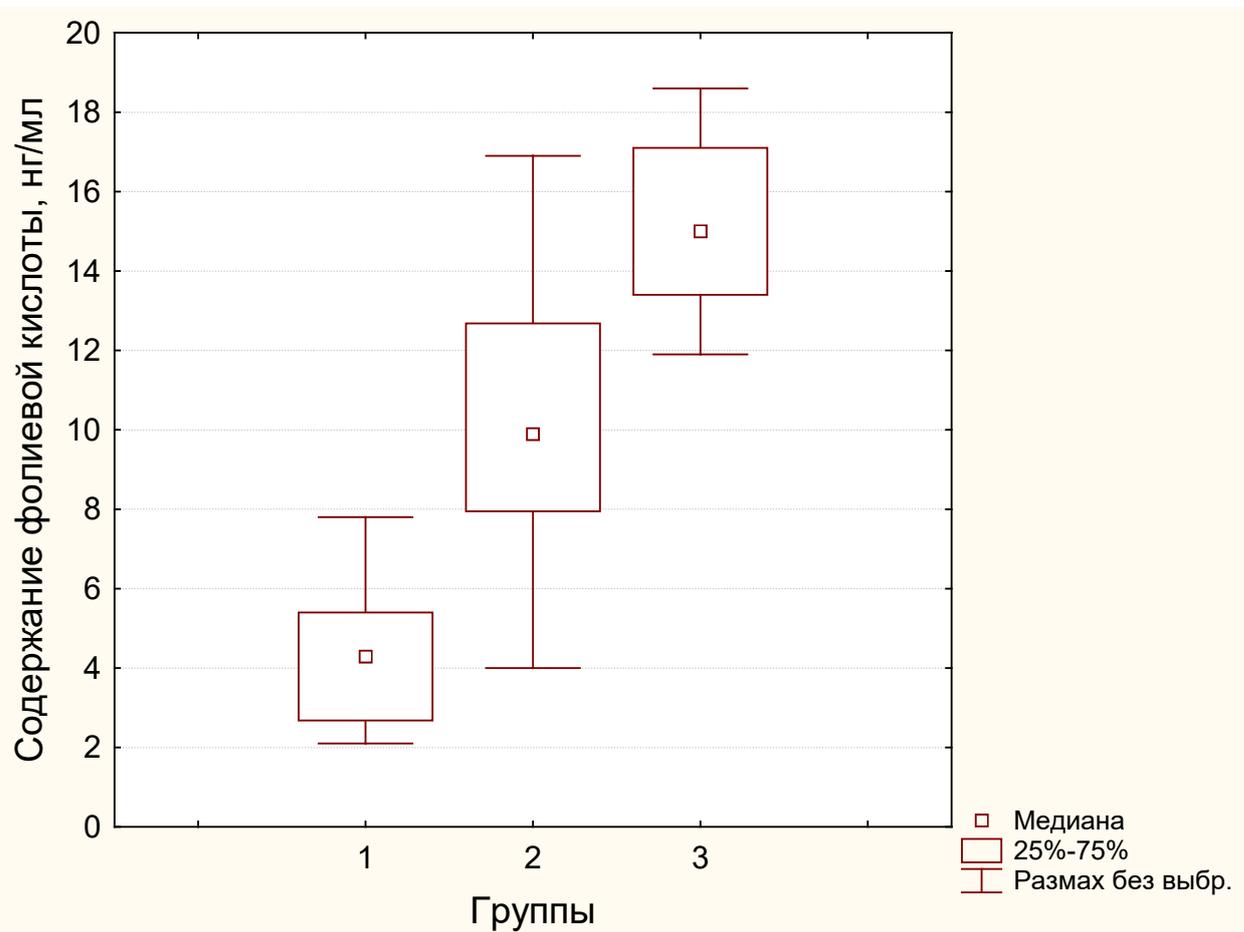


Рис 10. Содержание фолиевой кислоты в сыворотке крови у пациентов с НОН (1 группа), у пациентов с заболеванием зрительного нерва иного генеза (2 группа) и группе контроля (3 группа).

3.1.4. Результаты дополнительного поиска мутаций с.152A>G в ядерном гене *DNAJC30*

В исследование были включены 21 пациент (19 мужчин и 2 женщины) в возрасте $21,5 \pm 8,9$ лет (размах 9,1-40,5 лет) с клинической картиной НОНЛ в острой и хронической стадиях и выявленными мутациями гена *DNAJC30*, у одного пациента дополнительно была выявлена мутация мтДНК m.14484 T>G (пациент №19).

12 пациентов обратились в институт в период 2005-2017гг и наблюдались длительное время с клиническим диагнозом НОН и неverified мутациями ядерной и митохондриальной ДНК. В 2018г. этим пациентам был проведен дополнительный поиск мутаций с.152A>G (p.Tyr51Cys), с.232C>T (p.Pro78Ser) и с.302T>A (p.Leu101Gln) в гене *DNAJC30* в связи с установленной связью вышеуказанных нуклеотидных замен с аутосомно-рецессивной формой НОН. У всех 12 пациентов было подтверждено наличие мутации с.152A>G (p.Tyr51Cys) в гене *DNAJC30* в гомозиготном состоянии (на обеих хромосомах). В дальнейшем в выборку пациентов также были включены 9 человек, обратившихся в клинику в период 2018-2020гг. с клинической картиной НОН и выявленной при дальнейшем обследовании мутации с.152A>G (p.Tyr51Cys) в гене *DNAJC30*.

Пациенты осуществляли нерегулярные визиты к врачу в связи с причинами личного характера и эпидемическими условиями.

Возраст начала АРОН составил в возрасте $21,5 \pm 8,9$ лет (размах 9,1-40,5 лет), возраст первичного обращения в клинику $23,0 \pm 9,7$ лет (размах 10,3-50,3 лет).

Двое пациентов обратились на консультацию уже при длительном сроке заболевания, который составил соответственно на момент обращения 7,1; 9,9 лет, на момент последнего визита - 13,8; 17,8 лет.

У остальных пациентов длительность заболевания на момент обращения составила $3 \pm 1,7$ мес (размах 1/7 мес), на момент последнего визита – $59,8 \pm 60,52$ мес (диапазон 2,6 мес/266,3 мес).

Одна пациентка через 5 месяцев на фоне повышения зрения на ОУ отказалась от наблюдения, однако со слов родителей, зрение восстановилось.

Течение АРОН соответствовало НОНЛ, в 12 случаях сопровождалось одновременным безболезненным снижением зрения на обоих глазах, у остальных пациентов – последовательным снижением зрения с медианой разницы начала заболевания между двумя глазами – 4 недели (диапазон 1 неделя/1год).

Первичное обращение пациентов и повторные визиты осуществлялись в различное время по длительности заболевания. Для визуализации динамики остроты зрения показатели визометрии каждого глаза оценивали за 3-, 6-, 9-, 12-, 15-, 18-, 21-, 24-, 30-месячные периоды от начала заболевания, так как в дальнейшем функции зрения не менялись. Учитывая, что у части пациентов начало заболевания на втором глазу происходило отсроченно, количество глаз в 3-х месячные периоды наблюдения было неодинаковым. **В таблице 1** представлены показатели остроты зрения 19 пациентов (38 глаз). В данный анализ не вошли 2 пациента с поздним обращением (7,1; 9,9 лет от момента начала заболевания), 1 пациент с $VisOU=1,0$ на протяжении всего заболевания.

Оценка конечной остроты зрения была осуществлена у 13 пациентов (26 глаз) в случае раннего восстановления зрения или на момент не менее 30 мес наблюдения (**табл.2**). В 50% случаев (13 глаз) острота зрения восстановилась до 0,8-1,0, в 80,7% (21 глаз) – до 0,1-1,0, в 19,3% (5 глаз) острота зрения находилась в диапазоне 0,01-0,09.

Выявлена высокой силы корреляционная связь между остротой зрения и показателем световой чувствительности ($K=0,88$ $p<0,001$), цветового зрения ($K=0,69$ $p<0,05$).

Таблица 1. Показатели остроты зрения пациентов в период наблюдения.

Период времени наблюдения, мес	Длительность заболевания на момент визита, мес	Количество обследованных глаз на указанный период времени от начала заболевания	Острота зрения, М±SD	Минимальные/максимальные значения остроты зрения
0-3	2,3±0,63	31	0,05±0,03	0,01/0,13
3,1-6	4,8±0,99	22	0,12±0,14	0,01/0,5
6,1-9	7,8±0,88	19	0,22±0,24	0,01/0,8
9,1-12	10,8±0,79	17	0,51±0,34	0,04/1,0
12,1-15	13,8±0,94	13	0,64±0,25	0,03/1,0
15,1-18	16,8±0,77	10	0,57±0,40	0,015/1,0
18,1-21	20,1±0,86	14	0,66±0,42	0,02/1,0
21,1-24	23,4±0,76	9	0,46±0,42	0,02/1,0
24,1-30	28,9±1,14	24	0,48±0,42	0,02/1,0

Таблица 2. Распределение пациентов по конечной остроте зрения с АРОН и НОНЛ.

Острота зрения	Кол-во глаз (%)	
	НОНЛ	АРОН
0-0,009	8 (6,6)	0
0,01-0,04	40 (33)	3 (12)
0,05-0,09	26 (22)	2 (8)
0,1-0,3	15 (12)	5 (19)
0,4-0,7	16 (13)	3 (12)
0,8-1,0	16 (13)	13 (50)
	121 (100)	26 (100)

У всех пациентов отмечено выраженное уменьшение толщины перипапиллярного СНВС и комплекса ГКС (табл.3). Получена статистически значимая разницы по средней толщине СНВС, а также СНВС в носовом, нижнем, верхнем секторах при сравнении ОСТ структур у пациентов с восстановленной ($>0,3$) и низкой ОЗ.

Таблица 3. Сравнение показателей ОСТ у пациентов с высокой и низкой ОЗ

Группы пациентов	Высокая ОЗ	Низкая ОЗ	P>
Показатель ОСТ			
Средний показатель СНВС	59,65±3,41	78,96±19,63	P>0,03
Верхний квадрант	75,35±6,70	104,42±32,88	P>0,025
Носовой квадрант	39,90±18,46	95,25±19,74	P>0,02
Нижний квадрант	76,55±5,29	95,25±19,74	P>0,03

Учитывая нерегулярность визитов пациентов срок восстановления зрения можно описать диапазоном от 12 до 30 месяцев. Было отмечено, что у 7 пациентов острота зрения на ОУ восстановилась до 0,66-1,0, одинаково на двух глазах. У пациента С. острота зрения вдаль не снижалась, VisOU=1,0 была на протяжении всего периода наблюдения, однако при проведении статической периметрии были выявлены центральные скотомы с последующим их уменьшением и повышением световой чувствительности. У 3-х пациентов отмечали разную степень восстановления зрения: на одном глазу до 0,5-1,0, на другом – до 0,13-0,33.

Одна пациентка под наблюдением находилась короткий период времени, отказалась от повторных визитов, в связи с тем, что, с ее слов, зрение полностью восстановилось (в обсчет динамики остроты зрения ее данные не вошли).

Было отмечено восстановление зрительных функций $>0,3$ у 62% пациентов с мутациями в гене *DNAJC30*. Конечную остроту зрения пациентов с АРОН сравнили с остротой зрения пациентов с НОНЛ на момент не менее 30 мес наблюдения или в случае раннего восстановления зрения, Восстановление зрительных функций $>0,3$ у пациентов с НОНЛ было отмечено в 26% случаев (Табл.2).

3.1.4.1. Вклад патогенных вариантов в гене *DNAJC30* в развитие НОНЛ

Всего в исследованиях принимало участие 95 пациентов с клинической картиной НОНЛ. У 74 человек (78%, 147 глаз) обнаружены генетически подтвержденные мутацией мтДНК: 3 частые мутации мтДНК - 65%, редкие мутация мтДНК – 8%, кандидатные мутации мтДНК – 5%. У 21 человека (22%, 42 глаза) была определена гомозиготная мутация яДНК в гене *DNAJC30*, являющаяся причиной АРОН (Рис.11, Табл.4).

Соотношение мужчин и женщин при НОНЛ составило 1:7,2, при АРОН - 1:9,5. Различий в половом распределении обнаружено не было.

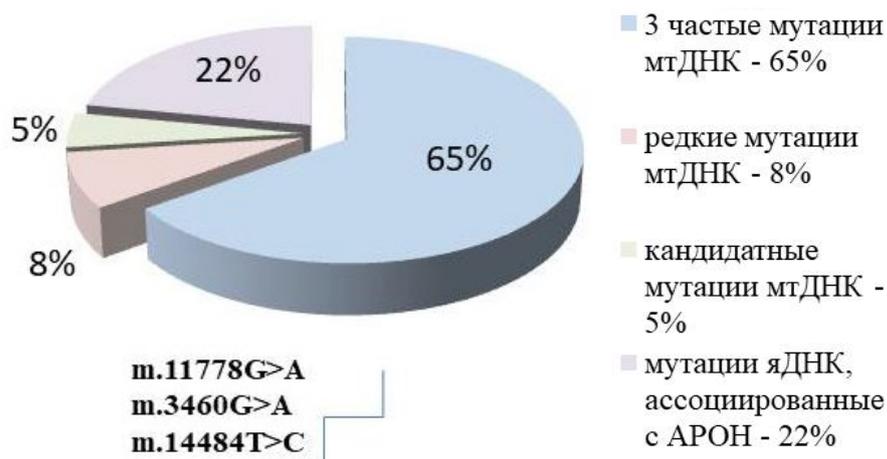


Рис. 11. Молекулярно-генетическая диагностика НОН. Представлены результаты для выборки из 95 пациентов.

Таблица 4. Распределение пациентов в зависимости от выявленного генетического дефекта.

Генетический дефект		Общее кол-во пациентов	Соотношение М/Ж
мтДНК	m.11778 G>A	40	34/6
	m.3460 G>A	15	15/0
	m.14484T>C	7	5/2
	m.4171C>A	2	2/0
	m.3472T>C	1	1/0
	m.13379 A>G	1	1/0
	m.13513 G>A	2	2/0
	m.14597 A>G	1	0/1
	m.3635G>A	5	5/0
ядНК	c.152 A>G p.(Y51C	21	19/2
Всего		95	84/11

3.2. Результаты клинических исследований.

3.2.1. Результаты исследований ОКТА.

Особенности микрососудистых изменений сетчатки и зрительного нерва у пациентов с наследственной оптической нейропатией по данным ОКТ-ангиографии.

В исследование было включено 27 пациентов (53 глаза). У пациента с травматической отслойкой сетчатки в анамнезе в исследование включены показатели только одного глаза.

Всех пациентов разделили на 3 группы (**Табл.5**) в зависимости от длительности заболевания: до 1 года включительно - 1гр. (6 пациентов, 12 глаз), более 1 года до 5 лет включительно - 2 гр. (12 пациентов, 24 глаза) и более 5 лет - 3 гр. (11 пациентов, 21 глаз).

Таблица 5. Характеристика пациентов и показатели функций зрения у пациентов с НОН.

Возраст пациента, лет*	Длительность НОН, лет	Кол-во пациентов/ Глаз	Острота зрения	MS, дБ	MD, дБ
22,7±4,2	0 - ≤до 1 год	7/14	0,18±0,2	12,5±8,1	20,7±8,4
33,6±8,7	> 1 года - ≤ 5 лет	11/22	0,3±0,4	19,7±7,3	12,7±8,2
37,6±8,9	> 5 лет	11/21	0,18±0,2	17,4±8,8	14,3±8,1

* M±SD

При сравнении показателей у пациентов с различной длительностью НОН выявлена разница только по указанным в Табл.6 показателям относительной сосудистой плотности (Vessel Density, VD) поверхностного сосудистого комплекса сетчатки: во всех секторах парафовеа и в темпоральном секторе перифовеа. При этом эти показатели у пациентов с длительно существующим заболеванием были наиболее низкие, статистически значимая разница между 1-й и 2-й гр. не была получена (дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса). Выявлена обратная корреляционная связь между вышеуказанными параметрами VD парафовеа и перифовеа, с длительностью заболевания, К Спирмана составляет от -0,51 до -0,76, $p < 0,001$.

Разницу в 3-х группах пациентов с НОН по показателям VD в глубоком сосудистом комплексе выявить не удалось.

Входящее в поверхностный сосудистый комплекс поверхностное сосудистое сплетение сетчатки (ПССС) получает кровоснабжение из центральной артерией сетчатки и состоит из артерий различного калибра, артериол, капилляров, венул, а также вен различного калибра, расположенных преимущественно в слое ГКС [22]. Принимая во внимание тот факт, что при НОН в первую очередь страдают ГКС, аксоны которых формируют папилломакулярный пучок, изменения, обнаруживаемые при ОКТА в ПССС можно считать закономерными [25].

При сравнении с контрольной группой во всех 3-х группах с НОН получена статистически значимая разница по показателям VD

Таблица 6. Сосудистая плотность поверхностного сосудистого комплекса сетчатки у пациентов с НОН при различной длительности заболевания, в %.

Показатели сосудистой плотности, % VD, %	Группы пациентов с различной длительности НОН				P<
	1 группа 0 - ≤до 1 год	2 группа > 1 года - ≤ 5 лет	3 группа > 5 лет	Контроль- ная группа	
Анализируемые показатели, скан Режим Angio Retina 3x3					
Средний показатель Whole Image VD Superficial	37,5± 5,5	34,0± 3,8	29,9± 2,2	48,3±4,5	1-3гр. 0,0005 2-3гр. 0,01
Верхняя гемисфера Superior Hemi VD Superficial	38,0 ±5,7	34,3± 3,7	30,0± 2,5	48,4±4,4	1-3гр. 0,0004 2-3гр. 0,008
Нижняя гемисфера Inferior Hemi VD Superficial	36,9 ±5,3	33,9± 4,2	29,8 ±2.1	48,2±4,7	1-3гр. 0,002 2-3гр. 0,02
Анализируемые показатели, скан Angio Retina 3x3, ПараФовеа					
Средний показатель Whole Image VD Superficial	40,5 ±5,7	36,5 ±4,5	32,0 ±2,7	51,4±4,1	1-3гр. 0,0006 2-3гр. 0,02
Верхняя гемисфера Superior Hemi VD Superficial ParaFovea	41,1± 5,6	37,0 ±4,7	32,3 ±3,1	51,1±5,3	1-3гр. 0,0005 2-3гр. 0,009
Нижняя гемисфера Inferior Hemi VD Superficial ParaFovea	40 ±5,9	39,5 ±16,3	31,7 ±2,6	50,3±6,9	1-3гр. 0,001 2-3гр. 0,03
Темпоральный сектор Tempo VD Superficial ParaFovea	39,4 ±6,0	35,7 ±3.9	31,1 ±2,7	51,4±4,4	1-3гр. 0,001 2-3гр. 0,007
Верхний сектор Superior VD Superficial ParaFovea	42,6± 5,4	37,8 ±5,0	32,0± 3,47	52,0±5,8	1-3гр. 0,0002 2-3гр. 0,009
Назальный сектор Nasal VD Superficial ParaFovea	40,6 ±5,5	36,5±5,7	30,5± 3,2	48,9±6,5	1-3гр. 0,01 2-3гр. 0,03
Нижний сектор Inferior VD Superficial ParaFovea	42,8±3,93	41,3 ±5,1	32,3±3,6	50,6±8,6	1-3гр. 0,02
Анализируемые показатели, скан Angio Retina 6x6, ПериФовеа					
Темпоральный сектор Tempo VD Superficial PeriFovea	39±3,1	36,8±3,7	34,5±3,3	46,3±2,9	1-3гр. 0,004

поверхностного сосудистого комплекса в фовеа, парафовеа (кроме пациентов до 1 года заболевания) и перифовеа на уровне $p < 0,04-0,000000$. Следует отметить, что показатель FD (Foveal Density), который определяется как

суммарная относительная плотность капилляров поверхностного и глубокого сосудистого комплексов в области фовеа шириной 300 мкм вокруг фовеальной аваскулярной зоны (FAZ), отличался от группы контроля только после 1 года заболевания (2-К гр. $p < 0,0002$, 3-К гр. $p < 0,00005$) (дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса). Однако при попарном сравнении групп пациентов (критерий Манна-Уитни) по показателю FD отмечена статистически значимая разница во всех группах, указанная в **Табл.7**, что свидетельствует о постепенном снижении VD и в этой зоне по мере развития атрофических изменений в слое ГКС.

Таблица 7. Показатели фовеальной плотности (FD) и площади аваскулярной зоны (FAZ) у пациентов с НОН при различной длительности заболевания.

Показатели	Группы пациентов с различной длительности НОН			Контрольная группа	Статистическая значимость различий между гр. пациентов $P < *$
	1 группа 0 - ≤до 1 год	2 группа > 1 года - ≤ 5 лет	3 группа > 5 лет		
FD, %	49,4 ±4,84	46,2 ±3,33	45,2 ±4,14	50,7 ±4,19	1-2 гр. 0,04 1-3 гр. 0,03
FAZ, мм ²	0,31±0,14	0,25±0,07	0,26±0,16	0,30±0,13	>0,05

*критерий Манна-Уитни

При этом разницы в показателях площади FAZ как в группах пациентов, так и в сравнении с контрольной группой не было получено. Тем не менее, было показано, что после года заболевания площадь аваскулярной зоны выражено зависит от VD поверхностного ($K = -0,63-0,72$, во 2 и 3-й гр. соответственно, $p < 0,01$) и глубокого сосудистого комплекса фовеа ($K = -0,8-0,86$, во 2 и 3-й гр. соответственно, $p < 0,001$) и коррелирует с толщиной поверхностных ($K = -0,71$, $p < 0,01$) и глубоких слоев фовеа у пациентов 3 гр. ($K = -0,68$, $p < 0,01$).

Во всех группах по длительности НОН показатели VD глубокого сосудистого комплекса сетчатки в макулярной зоне не отличались от

контрольной группы, кроме снижения показателя в фовеа ($p < 0,03$ К-2гр., $p < 0,01$ К-3гр.) и височном секторе парафовеа ($p < 0,02$ К-3гр.).

При исследовании связей между VD сосудистых комплексов и соответствующими структурными изменениями выявлена устойчивая корреляция между VD поверхностного и глубокого сосудистых комплексов фовеа и толщиной поверхностных ($K=0,76-0,8$, $p < 0,01$) и глубоких слоев фовеа ($K=0,72-0,81$, $p < 0,001$) после 5 лет заболевания.

Учитывая полученную закономерность, была исследована корреляция между VD поверхностного и глубокого сосудистых комплексов, что позволило выявить корреляционную связь между ними в фовеа во всех 3 группах по длительности: $K=0,94$, $p < 0,005$ (1гр.), $K=0,59$, $p < 0,005$ (2гр.) и $K=0,88$, $p < 0,001$ (3гр.). При длительности заболевания 5 лет и выше была дополнительно выявлена корреляционная связь между VD поверхностного сосудистого комплекса фовеа и показателями глубокого сосудистого комплекса во всех секторах $K=0,56-0,88$, $p < 0,05$. Известно, что в основе развития клинической симптоматики НОН в первую очередь лежат метаболические изменения, вызванные нарушениями митохондриальных функций ГКС в результате мутаций мтДНК или яДНК. Однако полученные данные позволяют предположить, что сосудистые изменения, которые присоединяются вторично, также играют значимую роль в развитии клинической картины заболевания. Выявить отчетливую, прослеживающуюся на протяжении всей длительности заболевания корреляционную взаимосвязь других показателей VD в макулярной зоне с соответствующими структурными и функциональными изменениями у пациентов с НОН не удалось.

При сравнении показателей VD поверхностного сосудистого комплекса пациентов с наиболее тяжелыми мутациями $m.11778G>A$ и $m.3460G>A$ в хронической стадии заболевания (от 1 года и более) статистически значимой разницы не было выявлено. Однако при сравнении тех же показателей у пациентов с мутациями $m.11778G>A$ и клинически

легкой мутацией с.152A>G была получена статистически значимая разница. Тем не менее, с учетом небольшого числа наблюдений с мутацией с.152A>G мы считаем, что пока следует говорить о тенденции к более высокой VD в поверхностном сосудистом комплексе у пациентов с с.152A>G в хронической стадии заболевания, что требует дальнейшего подтверждения на большем количестве пациентов.

Как известно, у пациентов с НОН может происходить восстановление остроты зрения после 1 года заболевания, что в основном связывают с тяжестью мутации [104]. Поэтому было проведено сравнение VD у пациентов с низкой остротой зрения (0,03 и ниже), с остротой зрения 0,04-0,4 и 0,5-1,0. Была выявлена значительная разница по показателям VD глубокого сосудистого комплекса в парафовеа в этих группах (**Табл.8**), при этом разница по показателям VD поверхностного сосудистого комплекса во всех секторах парафовеа и перифовеа не была получена. Пациенты всех трех групп не отличались по возрасту начала заболевания, длительности НОН, а также структурным изменениям в макулярной области (FLV и GLV), среднему показателю СНВС и показателям СНВС в отдельных квадрантах, кроме височного (1-3 гр. $p < 0,001$), что было показано и ранее [14].

Таблица 8. Сравнение показателей пациентов с НОН с различным уровнем остроты зрения.

Показатели	Группы пациентов с НОН с остротой зрения			P<
	0,5-1,0	0,04-0,4	0,03 и ниже	
Показатели VD глубокого сосудистого комплекса, скан Angio Retina 3x3				
Средний показатель Whole ImageVD Deep	54,1 ±2,8	51,4 ±2,9	49,6 ±2,7	2-3 гр. 0,03
Верхняя гемисфера Superior Hemi VD Deep	54,4 ±2,4	51,4± 2,9	49,7 ±3,6	1-3гр. 0,04
Fovea Нижняя гемисфера Inferior Hemi VD Deep	53,9 ±3,4	51,3± 3,9	49,6± 2,7	1-3гр. 0,03
Показатели VD глубокого сосудистого комплекса, парафовеа, скан Angio Retina 3x3				
Средний показатель Whole ImageVD Deep Parafovea	56,8 ±2,6	54,5 ±3,1	52,0 ±3,8	1-3гр. 0,01

Верхняя гемисфера Superior Hemi VD Deep Parafovea	57,1± 2,3	54,4± 3,3	51,8 ±3,8	1-3гр. 0,01
Нижняя гемисфера Inferior Hemi VD Deep Parafovea	56,6± 3,2	54,5 ±3,2	52,2 ±2,7	1-3гр. 0,03
Темпоральный сектор Tempo VD Deep Parafovea	56,8 ±2,1	54,3± 2,7	52,7 ±2,6	1-3гр. =0,1
Верхний сектор Superior VD Deep Parafovea	57,6 ±2,2	55,1± 3,1	51,5 ±4,6	0,0009
Носовой сектор Nasal VD Deep Parafovea	56,4± 3,1	53,8± 5,6	51,8± 4,0	0,02
Нижний сектор Inferior VD Deep Parafovea	56,5± 4,3	54,6± 3,2	51,7 ±3,0	0,04
Зрительные функции				
Острота зрения	0,84± 0,23	0,11± 0,08	0,03± 0,01	1-2гр. 0,01 1-3гр. 0,00000 2-3гр. 0,0002
MS	21,7± 6,9	22,6 ±6,8	12,1 ±6,1	1-3гр. 0,006 2-3гр. 0,00006
MD	8,2 ±5,7	10,1± 5,5	21,5± 6,1	1-3гр. 0,00002 2-3гр. 0,0001

В группах пациентов с разной остротой зрения была выявлена корреляция между VD поверхностного и глубокого сосудистых комплексов только в зоне фовеа $K=0,75$, $p<0,005$ для больных с $Vis=0,5-1,0$, а также $K=0,69$, $p<0,01$ и $K=0,82$, $p<0,001$ для пациентов соответственно с $Vis=0,04-0,4$ и $Vis=0,03$ и ниже.

В верхней части внутреннего ядерного слоя расположено промежуточное капиллярное сплетение сетчатки, которое питается от вертикальных анастомозов поверхностного сосудистого сплетения сетчатки. Капилляры, средние и крупные сосуды, расположенные в наружной части внутреннего ядерного слоя и в зоне его границы с наружным плексиформным слоем формируют глубокое сосудистое сплетение. Промежуточное и глубокое капиллярные сплетения сетчатки вместе формируют глубокий сосудистый комплекс сетчатки [22,151].

По данным предыдущих исследований [1], именно глубокое сосудистое сплетение играет важную роль в выполнении метаболических функций фоторецепторов, а именно в обеспечении их кислородом. В

исследовании Usui Y. et al. [141] было обнаружено, что амакриновые и горизонтальные клетки формируют совместно с капиллярами в глубоком сосудистом сплетении нейроваскулярные образования. При потере этих образований вследствие ишемии или атрофии, функции фоторецепторов снижаются. Исследователи заключают, что снижение количества нейроваскулярных образований в глубоком сосудистом сплетении сетчатки ниже определенного уровня влечет за собой соответствующее снижение остроты зрения у пациента.

При сравнении VD ДЗН и в перипапиллярной зоне у пациентов с различной длительностью НОН наиболее выраженное снижение показателей выявлено в темпоральном сегменте, в темпоральных секторах верхнего и нижнего сегмента в перипапиллярной зоне у пациентов по мере увеличения длительности заболевания (**Табл.9**). Эта зона соответствует проекции папилломакулярного пучка, образованного аксонами ГКС, которые избирательно поражаются при НОН. Сектора и сегменты перипапиллярной области ДЗН обозначены на **Рис.12**

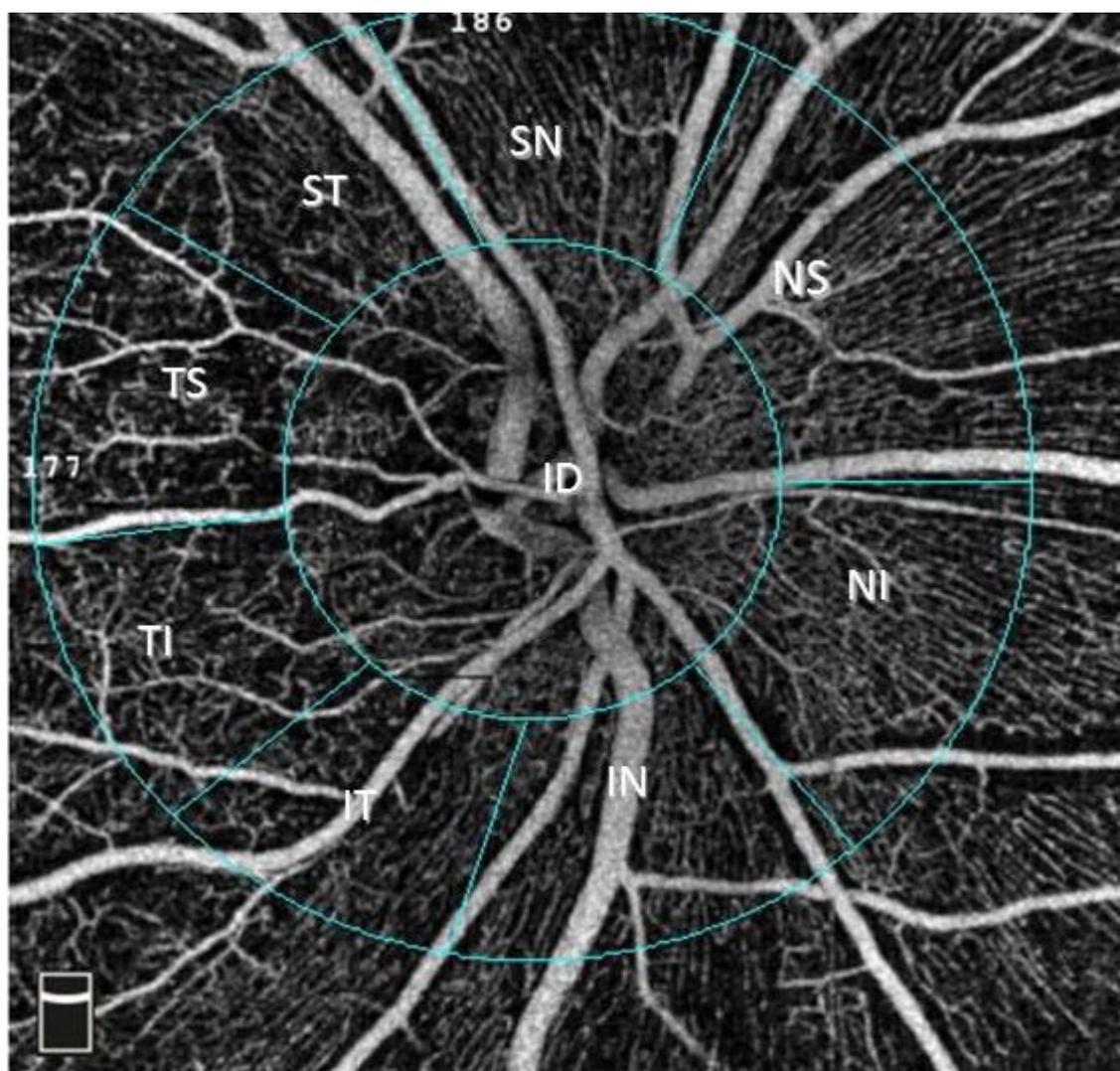


Рис.12. Сосуды ДЗН и перипапиллярной области в соответствии и регионарным делением на сегменты и сектора. На рисунке обозначены: NS-назальный сегмент, верхний сектор; NI – назальный сегмент, нижний сектор; IN – нижний сегмент, назальный сектор; IT – нижний сегмент, темпоральный сектор; TI – темпоральный сегмент, нижний сектор, TS – темпоральный сегмент, верхний сектор, ST – верхний сегмент, темпоральный сектор, SN – верхний сегмент, назальный сектор, ID - Inside Disk.

Таблица 9. Показатели относительной плотности сосудов перипапиллярной зоны у пациентов с различной длительностью НОН.

Показатели сосудистой плотности, % VD (%)	Группы пациентов с различной длительностью НОН			Контроль-ная группа	Статистическая значимость различий между гр. пациентов P <
	1 группа 0 - ≤до 1 год	2 группа > 1 года - ≤ 5 лет	3 группа > 5 лет		

Средний показатель Whole image	43,1 ±5,1	35,6 ±4,9	33,6±4,1	48,8±3,2	1-2гр. 0,03 1-3гр. 0,004
Перипапиллярная зона Periapillary	42,8 ±7,7	34,4 ±5,5	31,2±5,1	50,7±3,4	1-3гр. 0,006
Верхняя гемисфера Superior -Hemi	41,8± 7,3	34,5 ±5,1	31,3±4,9	51,1±3,3	1-3гр. 0,006
Нижняя гемисфера Inferior-Hemi	43,7 ±8,2	34,6 ± 6,2	31,1±5,6	50,3±4,2	1-3гр. 0,004
Перипапиллярная зона Periapillary					
Носовой сегмент нижний сектор Periapillary Nasal Inferior VD	43,1± 8,3	35,3±7,7	32,9±7,2	45,8±6,7	1-3гр. 0,04
Нижний сегмент носовой сектор Periapillary Inferior Nasal VD	45,2 ±14,3	32,6±10,4	30,4±9,3	48,8±5,8	1-3гр. 0,04
Нижний сегмент височный сектор Periapillary Inferior Tempo VD	46,5 ±9,0	31,8±7,9	28,3±4,8	56,6±4,0	1-2гр. 0,006 1-3гр. 0,0003
Темпоральный сегмент нижний сектор Periapillary Tempo Inferior VD	40,5± 4,0	36,7±3,5	32±3,5	52,2±4,6	1-3гр.0,0001 2-3гр. 0,002
Темпоральный сегмент верхний сектор Periapillary Tempo Superior VD	38,2± 5,5	37,8±3,4	33,3±3,9	53,8±4,3	1-3гр.=0,05 2-3гр. 0,005
Верхний сегмент височный сектор Periapillary Superior Tempo VD	45,8±10,2	32,3±7,4	26,9±6,0	55,5±4,0	1-2гр.0,04 1-3гр. 0,003
Верхний сегмент носовой сектор Periapillary Superior Nasal VD	42,3±11,5	32,3±7,4	29,2±7,5	48,6±4,1	1-3гр. 0,02

Все показатели VD в ДЗН и перипапиллярной зоне у пациентов с НОН значительно отличались от контрольной группы в диапазоне $p < 0,01 - 0,000000$, кроме показателей VD в нижнем секторе носового сегмента перипапиллярной зоны у пациентов в течение 1-го года НОН. Эти данные соотносятся с исследованиями, анализирующими структурные изменения в перипапиллярной зоне у пациентов с НОНЛ, согласно которым волокна

СНВС в носовом секторе истончаются позднее, чем волокна в трех других сегментах [35,151].

Полученные данные частично коррелируют с результатами, полученными в исследовании Balducci N. et al. В своей работе они отмечали, что по мере прогрессирования заболевания, показатели сосудистой плотности снижались, поэтапно распространяясь на все сегменты, за исключением назального. В группе с наименьшей длительностью заболевания самые низкие показатели VD определялись в височном, в то время, как в остальных сегментах VD оставалась неизменной по сравнению с группой контроля. Однако в группах пациентов с более длительным течением НОН, как отмечают авторы, VD была снижена также и в верхневисочном и нижневисочном секторах [14].

В нашем исследовании выявлена корреляционная связь между вышеуказанными параметрами VD ДЗН и перипапиллярной зоны и длительностью заболевания, К Спирмана составляет от -0,41 до -0,58, $p < 0,005$.

Мы сравнили показатели ОСТ и ОСТА ДЗН и перипапиллярной области у пациентов с заболеванием более 1 года в зависимости от остроты зрения. Выявили, что у пациентов с низкой остротой зрения (0,03 и ниже) толщина СНВС в височных секторах (нижнем и верхнем) перипапиллярной зоны ($p < 0,001$) и VD ДЗН (Inside Disk, $p < 0,004$) значительно отличается от пациентов с остротой зрения 0,5-1,0 (Табл.10). Была установлена наиболее высокая корреляционная зависимость между остротой зрения и структурными изменениями ($K=0,75$, $p < 0,001$) и VD в височном сегменте ($K=0,57-0,61$, $p < 0,001$). Вариаций показателей VD и остроты зрения в зависимости от диаметра ДЗН не было получено.

Таблица 10. Сравнение показателей толщины слоя нервных волокон ДЗН и перипапиллярной относительной плотности сосудов у пациентов с различной остротой зрения и длительностью заболевания от 1 года и выше.

Показатели	Группы пациентов с НОН с остротой зрения			P<
	0,5-1,0	0,04-0,4	0,03 и ниже	
Показатели толщины слоя нервных волокон ДЗН, μm				
Темпоральный сегмент, верхний сектор Peripapillary Tempo Superior	57,8 \pm 7,9	47,5 \pm 15,9	41,0 \pm 10,7	1-3 гр. 0,001
Темпоральный сегмент, нижний сектор Peripapillary Tempo Inferior	57,0 \pm 4,4	51,1 \pm 14,8	42,9 \pm 11,7	1-3гр. 0,001
Нижний сегмент, темпоральный сектор Peripapillary Inferior Tempo	82,1 \pm 21,4	77,3 \pm 25,0	58,2 \pm 21,7	1-3 гр. 0,03
Верхний сегмент, Назальный сектор Peripapillary Superior Nasal	35,4 \pm 12,0	37,7 \pm 11,5	26,9 \pm 8,1	2-3 гр. 0,02
Показатели относительной плотности сосудов, %				
ДЗН Inside Disk	45,8 \pm 7,5	42,7 \pm 5,7	38,3 \pm 6,9	1-3гр. 0,005
Нижний сегмент, назальный сектор Peripapillary Inferior Nasal VD	37,7 \pm 11,5	35,4 \pm 12,01	26,93 \pm 8,1	1-3 гр. 0,01
Верхний сегмент, назальный сектор Peripapillary Superior Nasal VD	34,5 \pm 9,7	35,5 \pm 10,1	27,2 \pm 6,4	2-3 гр. 0,04

Выделяют также четвертое сосудистое сплетение – радиальное перипапиллярное капиллярное сплетение/плексус (РПКП) – региональную сеть с собственной анатомической организацией, где в отличие от других сплетений капилляры идут параллельно аксонам ГКС, не образуя межкапиллярных анастомозов [141]. СНВС – область с повышенными метаболическими потребностями, и строение РПКП с высокой плотностью

расположения капилляров для интенсивного питания соответствует этим потребностям [137].

В целом по всем пациентам с НОН выявлена корреляция средней и высокой силы между структурными изменениями показателя средней толщины перипапиллярного СНВС, его отдельных сегментов (нижнего, носового и верхнего) и VD в перипапиллярной области и в ДЗН (Whole Disk) ($K=0,74-0,94$, $p<0,001$), однако корреляция отсутствует с показателями сосудистой плотности и толщиной височного сегмента. Данная закономерность объяснима: при развитии более выраженной частичной атрофии зрительного нерва сосудистый рисунок ДЗН обедняется, в то время как при меньшей степени потери нервных волокон бледность височной половины ДЗН всегда сохраняется, но сосудистый рисунок остается более сохранным (Рис.13).

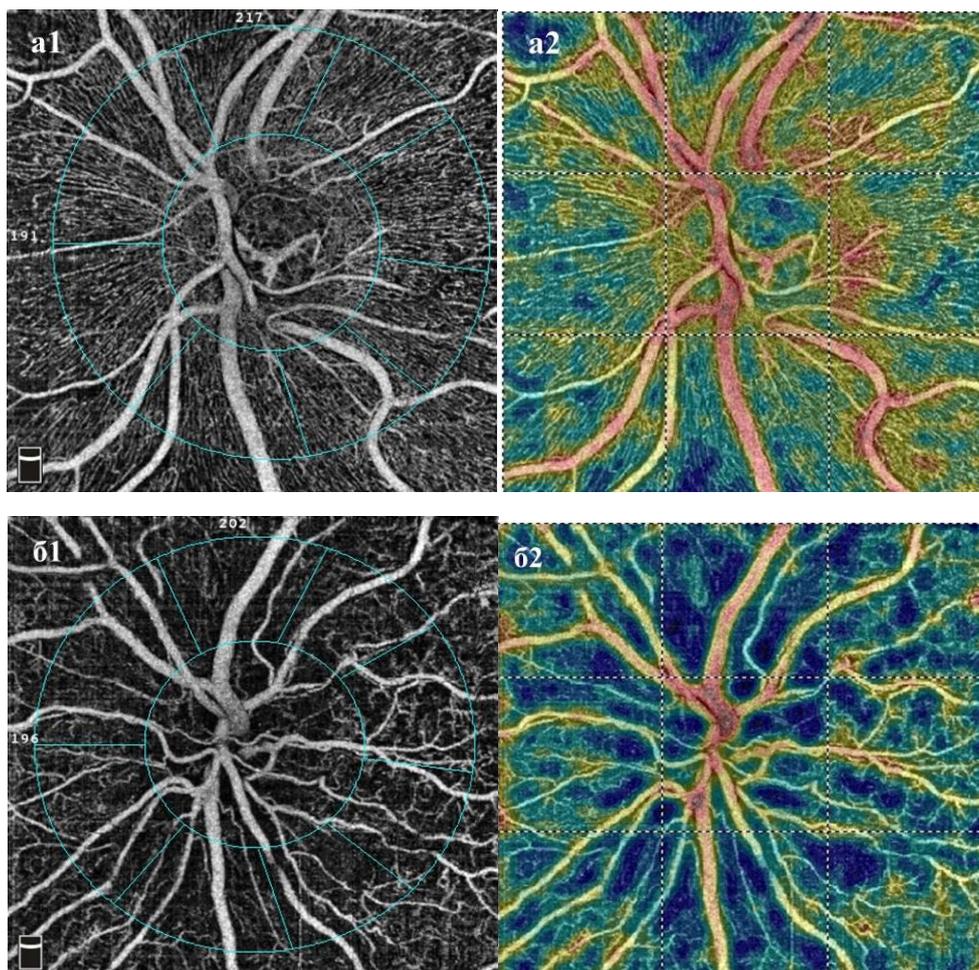


Рис.13 Сосуды ДЗН и перипапиллярной области в режиме HD Angio Disk у пациентов с длительностью заболевания больше 1 года и различной остротой

зрения: А – VisOS = 1,0; Б – VisOS= 0,02. У пациента Б отмечено снижение плотности капиллярного рисунка.

В заключение работы был проведен поиск взаимосвязи функциональных показателей и структурных и VD изменений макулярной области, ДЗН и перипапиллярной области у пациентов до 1 года заболевания. Была обнаружена высокой силы корреляции остроты зрения и VD глубокого сплетения фовеа ($K=0,82$, $p<0,05$) и очень высокой силы корреляция остроты зрения с площадью FAZ ($K=-0,94$, $p<0,005$).

Таким образом, НОН, в основе, которой лежит генетически обусловленное нарушение функций митохондрий ГКС и их аксонов, сопровождается нарушением микроциркуляторного кровотока сосудов сетчатки, ДЗН и перипапаллярной зоны по данным ОКТА[151]. Так, в данном исследовании при сравнении показателей 29 пациентов (57 глаз) с различной длительностью заболевания выявлено более выраженное снижение VD поверхностного сосудистого комплекса сетчатки во всех секторах парафовеа и в темпоральном секторе перифовеа у больных с длительно существующим заболеванием. Однако эти показатели не отличались у пациентов в зависимости от степени потери остроты зрения, в том числе после 1 года заболевания, когда у некоторых пациентов острота зрения частично восстанавливалась.

В глубоком сосудистом комплексе разницу по VD не удалось выявить у пациентов в зависимости от длительности НОН, в то время как в группах, разделенных по остроте зрения после 1 года заболевания, выявлены более высокие цифры VD в глубоком сосудистом комплексе в перифовеа и исследуемой зоне 3x3 у пациентов с высокой остротой зрения 0,5-1,0.

Была выявлена корреляция между VD поверхностного и глубокого сосудистых комплексов только в зоне фовеа во всех группах пациентов по длительности заболевания и остроте зрения. Данный факт требует дальнейшего изучения и попытки интерпретации.

При сравнении VD ДЗН и в перипапиллярной зоне выявлено наиболее выраженное снижение показателей VD в темпоральном сегменте, в темпоральных секторах верхнего и нижнего сегмента в перипапиллярной зоне у пациентов по мере увеличения длительности НОН, что можно объяснить преимущественной потерей волокон папилломакулярного пучка и вторичными микрососудистыми изменениями.

В то же время после 1 года заболевания, когда острота зрения у пациентов с НОН может частично восстанавливаться, было обнаружено, что у пациентов с остротой зрения (0,5-1,0) толщина СНВС и VD ДЗН в височном сегменте значимо выше по сравнению с пациентами с более низкой остротой зрения. Была установлена наиболее высокая корреляционная зависимость между остротой зрения и структурными изменениями ($K=0,75$, $p<0,001$) и VD в височном сегменте ($K=0,57-0,61$, $p<0,001$). При исследовании зависимости функциональных зрительных показателей была установлена наиболее высокая корреляционная зависимость между остротой зрения, структурными изменениями и VD в височном сегменте. Полученные данные позволяют предположить, что сосудистые изменения, которые присоединяются вторично, также играют значимую роль в развитии клинической картины заболевания. Можно предположить, что сосудистые изменения развиваются в качестве реакции на метаболические нарушения, возникающие в ГКС. В ответ на процессы, приводящие в дальнейшем к атрофии волокон зрительного нерва, выделяются сигнальные молекулы, способствующие, среди прочего, развитию сосудистых изменений.

3.2.2 Результаты анализа амплитуды ФНО

Острота зрения пациентов с НОНЛ на момент проведения фотопической ЭРГ и оценки ФНО составила $0,19\pm 0,27$ (диапазон 0,008-0,8) при длительности заболевания $57,8\pm 35,2$ (диапазон 20,9-162) месяцев от начала заболевания (**Табл.11**).

Таблица 11. Характеристика пациентов и показатели функций зрения, ФНО и ОКТ у пациентов с НОНЛ.

	Пациенты с НОНЛ	Пациенты с НОНЛ		Группа контроля
		Vis \leq 0,1	Vis \geq 0,13	
Возраст пациента	32,65 \pm 7,34*	33,08 \pm 7,05	31,6 \pm 8,76	29,0 \pm 2,96
Длительность заболевания, мес	57,75 \pm 35,2	61,30 \pm 38,08	48,00 \pm 25,36	
Острота зрения	0,19 \pm 0,27	0,04 \pm 0,03	0,55 \pm 0,26	
Латентность ФНО, мс	68,36 \pm 4,01	68,65 \pm 4,25	67,63 \pm 3,50	64,28 \pm 5,34
Амплитуда ФНО, мкВ	19,91 \pm 8,86	19,00 \pm 8,43	22,10 \pm 9,93	32,72 \pm 12,73
MS, дБ	17,06 \pm 8,21	16,42 \pm 8,57	18,59 \pm 7,46	
MD, дБ	15,60 \pm 8,39	17,28 \pm 8,56	11,59 \pm 6,73	
Average RNFL, средняя толщина перипапиллярного СНВС, мкм	64,46 \pm 8,05	63,45 \pm 9,10	66,91 \pm 4,05	110,58 \pm 8,09
Sup.Avg., верхняя гемисфера, мкм	65,31 \pm 8,74	64,45 \pm 9,85	67,39 \pm 5,03	110,72 \pm 9,71
Inf.Avg., нижняя гемисфера, мкм	63,38 \pm 7,64	62,11 \pm 8,50	66,43 \pm 3,85	110,43 \pm 8,38
S, верхний сектор, мкм	67,68 \pm 11,99	67,17 \pm 13,65	68,90 \pm 7,01	133,53 \pm 16,42
N, носовой сектор, мкм	65,84 \pm 12,91	65,04 \pm 14,67	67,75 \pm 7,46	80,78 \pm 5,00
I, нижний сектор, мкм	60,93 \pm 6,42	59,23 \pm 6,46	65,00 \pm 4,29	136,00 \pm 15,50
T, височный сектор, мкм	62,91 \pm 7,30	61,67 \pm 7,92	65,90 \pm 4,62	92,06 \pm 10,82
Avg.GCC, средняя толщина КГК, мкм	64,99 \pm 6,51	63,97 \pm 6,80	67,44 \pm 5,28	98,78 \pm 7,09
Sup.GCC, верхняя гемисфера, мкм	67,52 \pm 8,89	66,92 \pm 9,68	68,95 \pm 6,86	97,51 \pm 6,82
Inf.GCC, нижняя гемисфера, мкм	62,47 \pm 6,23	61,03 \pm 6,05	65,92 \pm 5,47	100,06 \pm 7,67
FLV, объем фокальных потерь, %	11,59 \pm 2,89	12,54 \pm 2,81	9,31 \pm 1,52	0,34 \pm 0,39
GLV, объем глобальных потерь, %	31,45 \pm 6,71	32,29 \pm 6,91	29,44 \pm 6,06	2,63 \pm 2,29
Латентность пика P100 вЗВП, мс	119,83 \pm 17,13	124,37 \pm 17,99	107,72 \pm 4,42	105,57 \pm 13,87
Амплитуда пика P100 вЗВП, мкВ	11,91 \pm 5,62	12,05 \pm 3,91	11,55 \pm 9,32	21,13 \pm 4,18
КЧСМ	28,02 \pm 6,96	26,47 \pm 7,26	32,17 \pm 4,12	45,61 \pm 1,82
ПЭЧ	104,09 \pm 81,10	117,94 \pm 91,23	67,17 \pm 20,15	42,11 \pm 4,28
ЛЗА	26,05 \pm 10,61	24,13 \pm 11,67	31,17 \pm 4,58	45,11 \pm 2,32

Известно, что в некоторых случаях через несколько месяцев или лет у пациентов с НОНЛ может происходить спонтанное восстановление зрения [152]. Так, в исследуемой группе пациентов на момент обследования острота зрения 0,1 и менее была отмечена в 20 глазах, 0,13-1,0 - в 12 глазах.

При сравнительном анализе показателей ФНО пациентов и группы контроля были выявлены статистически значимые различия латентности (68,4 \pm 4,01/64,28 \pm 5,37, p <0,009) и амплитуды (19,91 \pm 8,86/32,72 \pm 12,73, p <0,0002).

Выявлена корреляционная связь между амплитудой ФНО и остротой зрения ($K=0,33$, $p<0,05$), показателем средней световой чувствительности MS ($K=0,55$, $p<0,005$), лабильностью зрительного анализатора ($K=0,56$, $p<0,005$), амплитудой пика P100 вЗВП ($K=0,48$, $p<0,005$), КЧСМ ($K=0,5$, $p<0,005$), а также толщиной перипапиллярного СНВС в верхнем ($K=0,5$, $p<0,005$) и темпоральном секторах ($K=0,45$, $p<0,05$). Также была выявлена отрицательная корреляция между латентностью ФНО и остротой зрения ($K=-0,41$, $p<0,05$), показателями КЧСМ ($K=-0,38$, $p<0,05$) и ЛЗА ($K=-0,37$, $p<0,05$).

При сравнении показателей амплитуды и латентности ФНО пациентов с НОНЛ с $O3 \leq 0,1$ ($19,91 \pm 8,86 / 68,65 \pm 3,5$), $O3 \geq 0,13$ ($20,75 \pm 10,7 / 67,63 \pm 3,5$) и группой контроля ($32,72 \pm 12,73 / 64,28 \pm 5,37$) получены статистически значимые различия между латентностью ($p<0,006$), амплитудой ФНО ($p<0,0001$) пациентов с $O3 \leq 0,1$ и группой контроля, а также амплитудой ($p<0,05$) ФНО пациентов с $O3 \geq 0,13$ и группой контроля.

У пациентов с $O3 \geq 0,13$ выявлена прямая корреляционная связь высокой силы между показателями амплитуды ФНО и лабильностью зрительного анализатора ($K=0,88$, $p<0,05$), средней толщиной ГКС ($K=0,71$, $p<0,05$), толщиной ГКС в верхнем секторе ($K=0,71$, $p<0,05$). А также выявлена корреляционная связь между латентностью ФНО и толщиной ГКС в верхнем секторе ($K=-0,74$, $p<0,05$). У пациентов с $O3 \leq 0,1$ и ниже таких корреляций получено не было. Таким образом, по показателям ФНО можно судить о функциональных возможностях ГКС.

Следует отметить, что при сравнении структурных изменений в группах, разделенных по остроте зрения, выявлена разница по показателям средней толщины слоя ГКС в нижней половине ($61,06 \pm 6,05 / 65,9 \pm 5,5$, $p=0,02$), и по объему фокальных потерь ($12,5 \pm 2,8 / 9,3 \pm 1,5$, $p=0,002$). А также отмечена разница по латентности пика P100 вЗВП ($124,4 \pm 18,0 / 107,7 \pm 4,4$, $p=0,03$) и КЧСМ ($26,5 \pm 9,3 / 32,2 \pm 4,12$, $p=0,05$).

С помощью такого диагностического метода, как ЭРГ можно визуализировать электрические потенциалы клеток сетчатки, возникающие

на световой стимул, исследовать их функции, а оценка ФНО при регистрации фотопической (колбочковой) ЭРГ позволяет оценить функциональные способности ГКС у пациентов с НОНЛ.

В 2017 году группа английских исследователей под руководством А. Majander описала снижение амплитуды ФНО у 13 пациентов с подтвержденным диагнозом НОНЛ [37]. В том же году в исследовании Karanjia R с соавторами было описано снижение амплитуды ФНО у 6 пациентов с мутацией mt.11778/ND4, а также у 17 носителей этой мутации без клинических проявлений, все пациенты в этом исследовании были из одной семьи. ФНО регистрировали с использованием красного (640нм) стимула с 5 уровнями мощности стимула на синем (450нм) фоне [65]. В 2021 году Karanjia R с соавторами повторили исследование на более широкой выборке пациентов, не состоящих в родственных связях с различными мутациями, ассоциированными с развитием НОНЛ, с целью оценки функции ГКС с помощью регистрации ФНО. Была выполнена общая ЭРГ с регистрацией ФНО с использованием красного (640нм) стимула на синем (470нм) фоне. Амплитуда ФНО была измерена от базовой линии до нижней точки потенциала. В ходе исследования также была выявлена связь между амплитудой ФНО и общей толщиной КГК макулярной области. В том числе, полученные результаты исследования показали, что амплитуда ФНО снижена и у носителей мутаций с нормальным зрением, в то время как при проведении ОСТ структурных изменений КГК выявлено не было [20].

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ.

Пациент Б.

Пациент Б., 38 лет, обратился с жалобами на резкое двустороннее безболезненное снижение зрения, которое возникло за 3 месяца до обращения. Со слов пациента, у родственников похожих заболеваний не было (Рис. 14), также он отрицал наличие острых и хронических заболеваний, возможность токсического воздействия лекарственных средств.

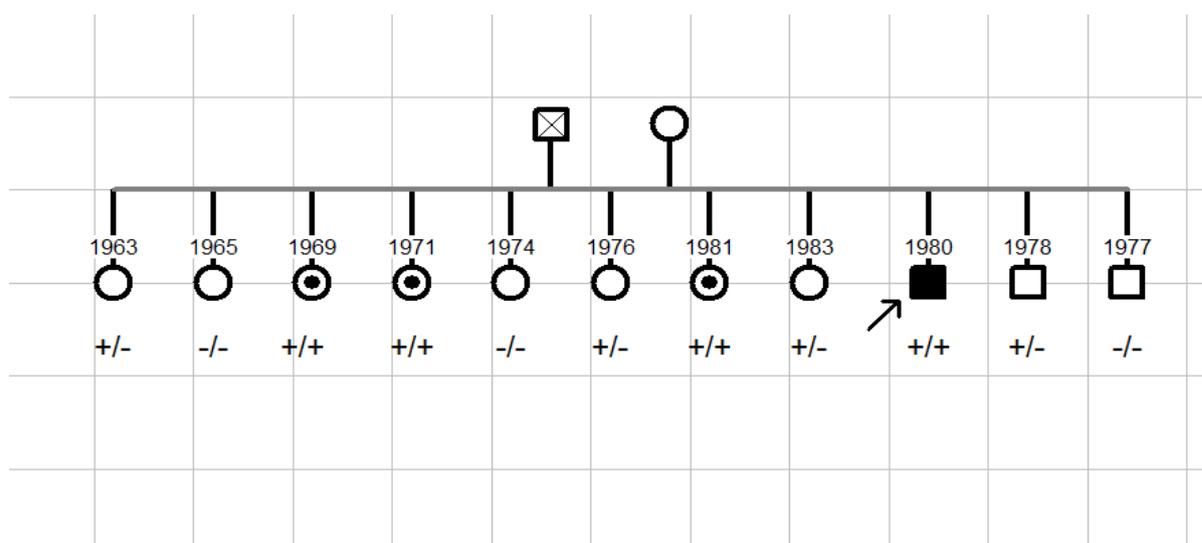


Рис.14. Родословная пациента Б. с АРОН: ■ - пациент с заболеванием, ● - носитель гомозиготной мутации (+/+), +/- - гетерозиготная мутация, -/- - отсутствие мутаций. Указаны года рождения родственников.

На момент осмотра ОЗ составила OD 0,1, OS 0,1; на глазном дне OU: выявлено выраженное нарушение цветовосприятия, центроцекальная скотома по данным компьютерной периметрии, программа LVC (Рис. 15). По данным ОКТ имело место увеличение толщины перипапиллярного СНВС в верхне-височном квадранте и истончение комплекса ГКС макулярной зоны, что характерно для ранней стадии НОНЛ.

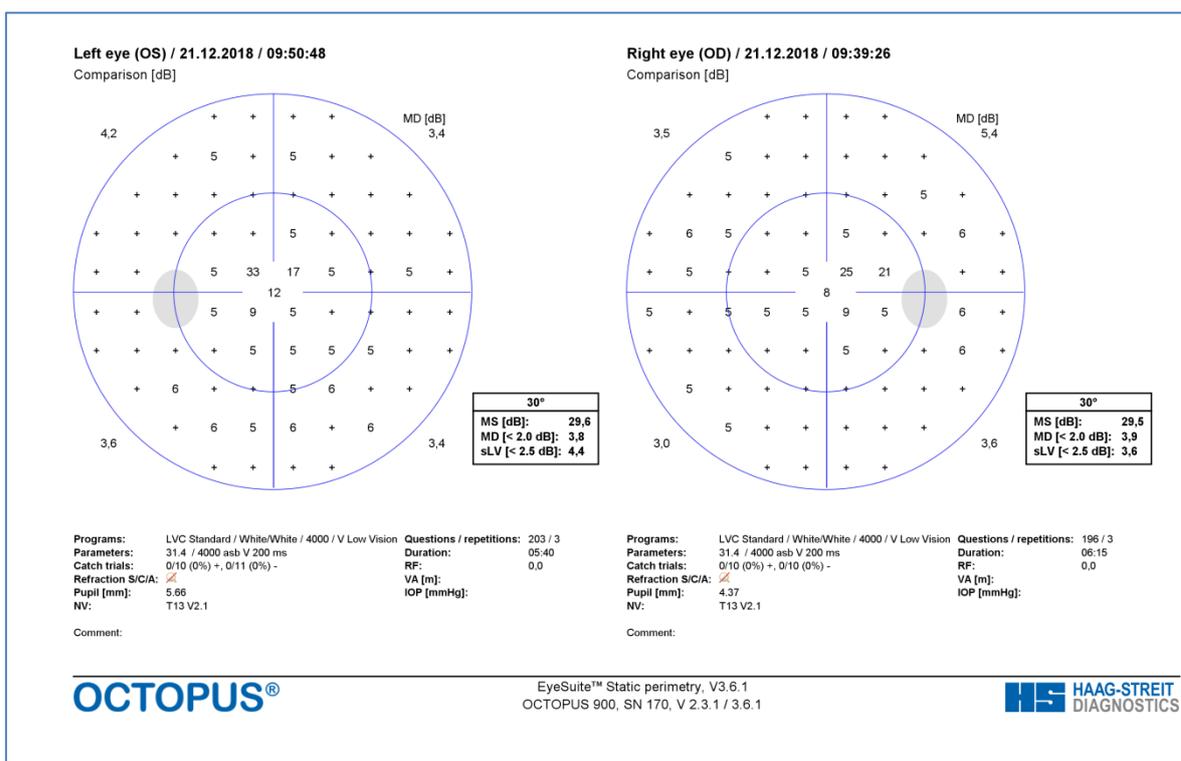


Рис. 15. Данные компьютерной периметрии пациента Б. на 3-м месяце от начала заболевания.

Клиническая картина в сочетании с результатами дополнительных методов исследования, несмотря на отсутствие 19 мутаций мтДНК, указывала на наследственную природу ОН.

Было проведено полное секвенирование экзома, по итогам которого была обнаружена гомозиготная мутация с.152A>G в ядерном гене *DNAJC30*, соответствующая АРОН. Аналогичная гомозиготная мутация была обнаружена у трех сестер пациента без клинической симптоматики.

Получено снижение содержания фолиевой кислоты в плазме крови - 2,68 нг/мл 293 пг/мл. Пациенту была назначена стандартная энерготропная терапии, назначаемая при диагнозе НОН, витамины группы В,

Спустя три месяца в ходе контрольного визита у пациента было обнаружено существенное улучшение зрения (VisOU=0,5), а на последующем визите через три месяца зрительные показатели улучшились до VisOU=0,8. На визите через 17 месяцев от начала заболевания VisOU=1,0,

показатели периметрии по программе LVC в пределах нормы, выявлены единичные относительные скоомы с небольшой депрессией световой чувствительности (5-6 дБ) (Рис.16, Табл. 12).

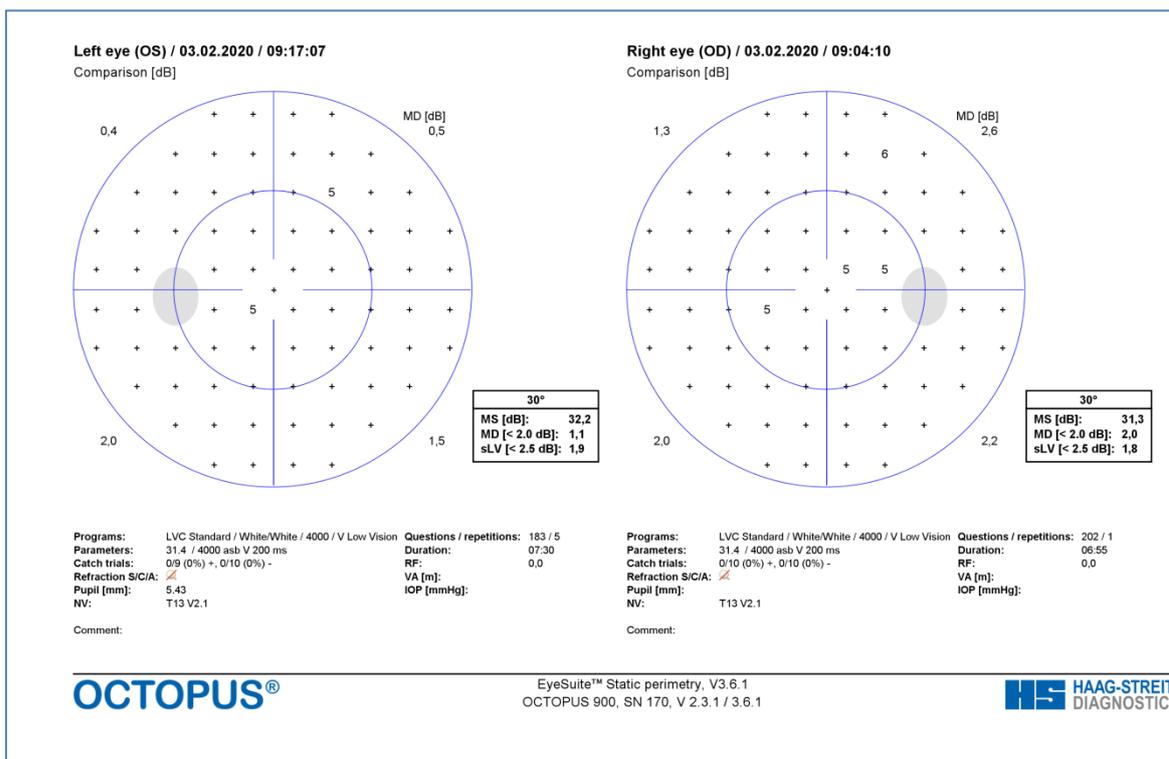


Рис. 16. Данные компьютерной периметрии пациента Б. на 3-м месяце от начала заболевания.

Таблица 12. Динамика показателей зрительных функций пациента Б.

Показатели зрительных функций		Период от начала заболевания, мес			
		3	6	9	17
Острота зрения, OD/OS		0,1/0,1	0,5/0,5	0,8/0,8	1,0/1,0
Показатели периметрии	MS, OD/OS	29,5/29,6		31,1/31,1	31,3/32,2
	MD, OD/OS	3,9/3,8		2,3/2,2	2,0/1,1
Количество прочитанных полихроматических таблиц, OD/OS		3,5/4,5		7/6	8/9,5

Таким образом, у пациента с частичной АЗН по данным ОСТ отмечены высокие зрительные функции уже через 9 мес от начала заболевания (Рис.17,18).

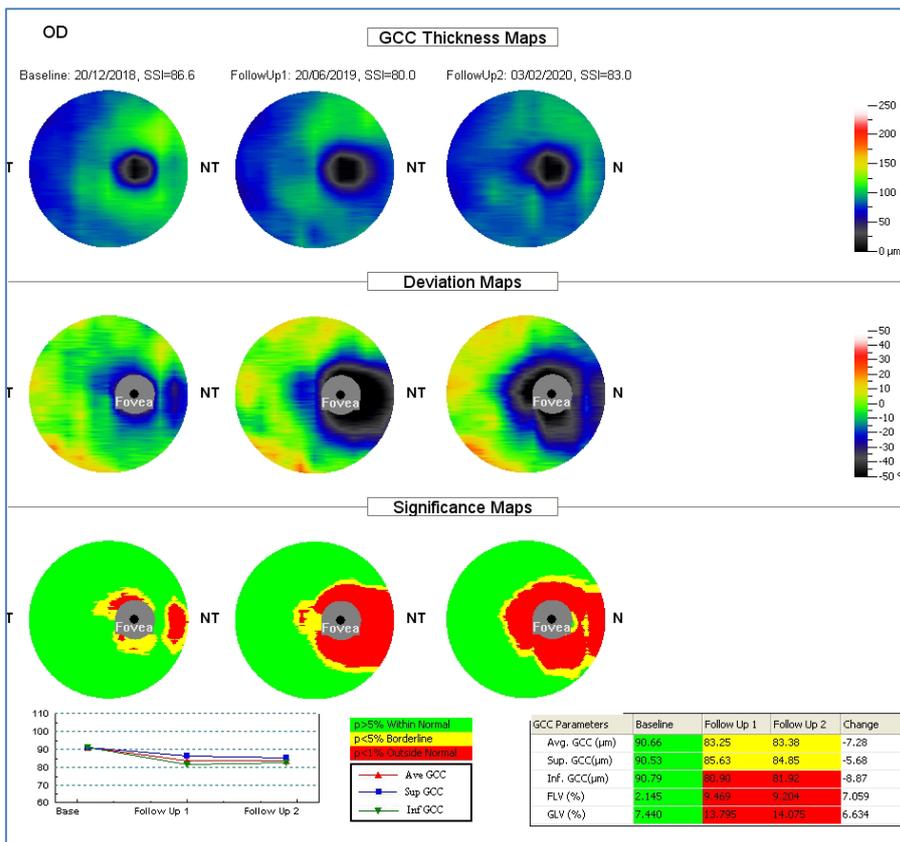


Рис. 17. Карты толщины комплекса ГКС пациента Б. в динамике: последовательное развитие атрофических изменений внутренних слоев сетчатки в центральной зоне.

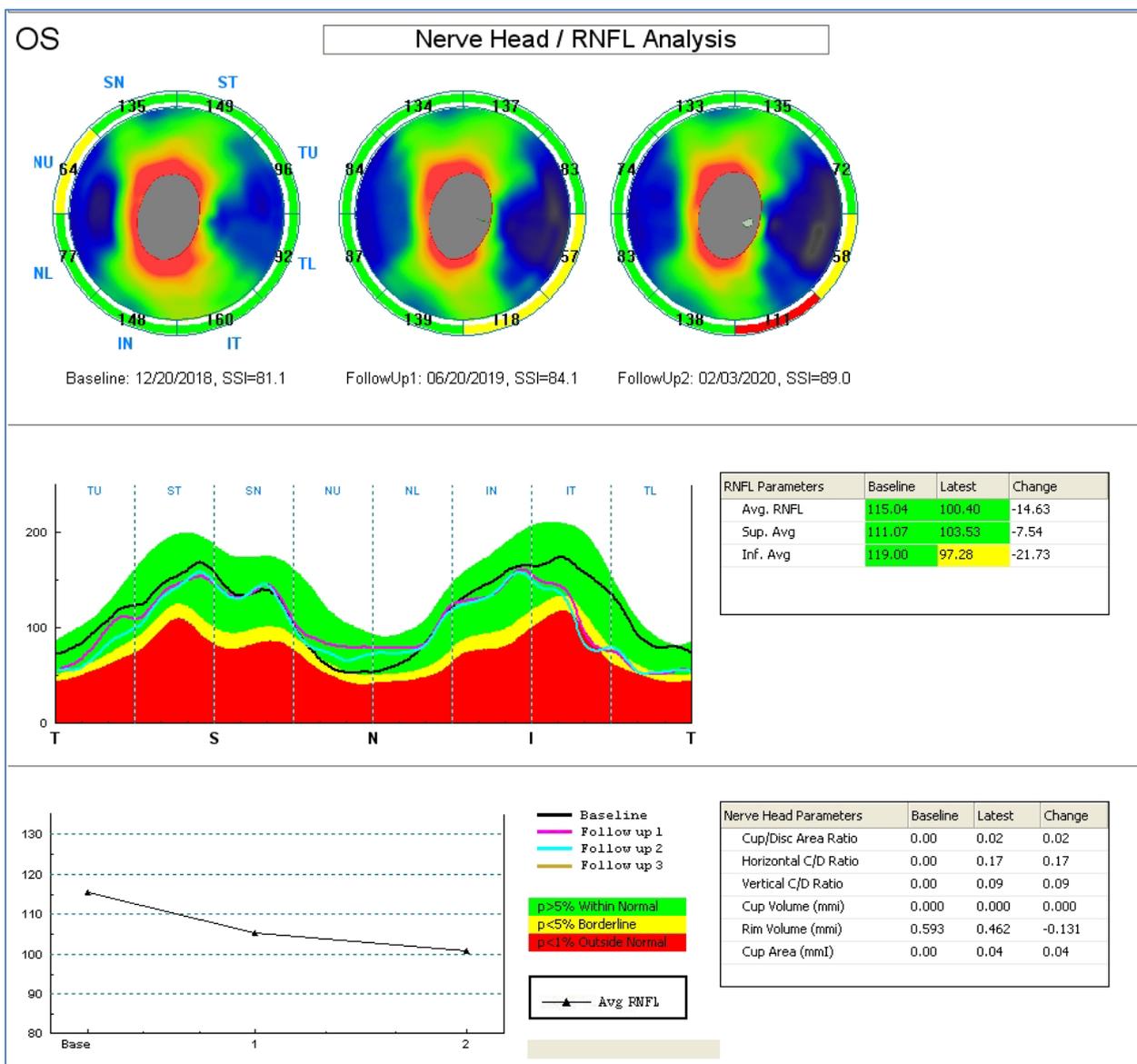


Рис. 18. Карты толщины СНВС левого глаза пациента Б. в динамике: последовательное умеренное развитие атрофических изменений СНВС в перипапиллярной зоне.

Пациент Д.

Пациент Д, 15 лет, без отягощенного семейного анализа, впервые отметил безболезненное снижение зрения на левом в глазу в 13 лет. Затем, спустя 3 месяца зрение снизилось на правом глазу. При офтальмологическом осмотре: VIS OU = 0,08. Выявлена выраженная двусторонняя дисхроматопсия, отмечена живая реакция зрачков на свет. Проведенная компьютерная

периметрия выявила центральную относительную скотому на обоих глазах (рис. 19, Табл. 13).

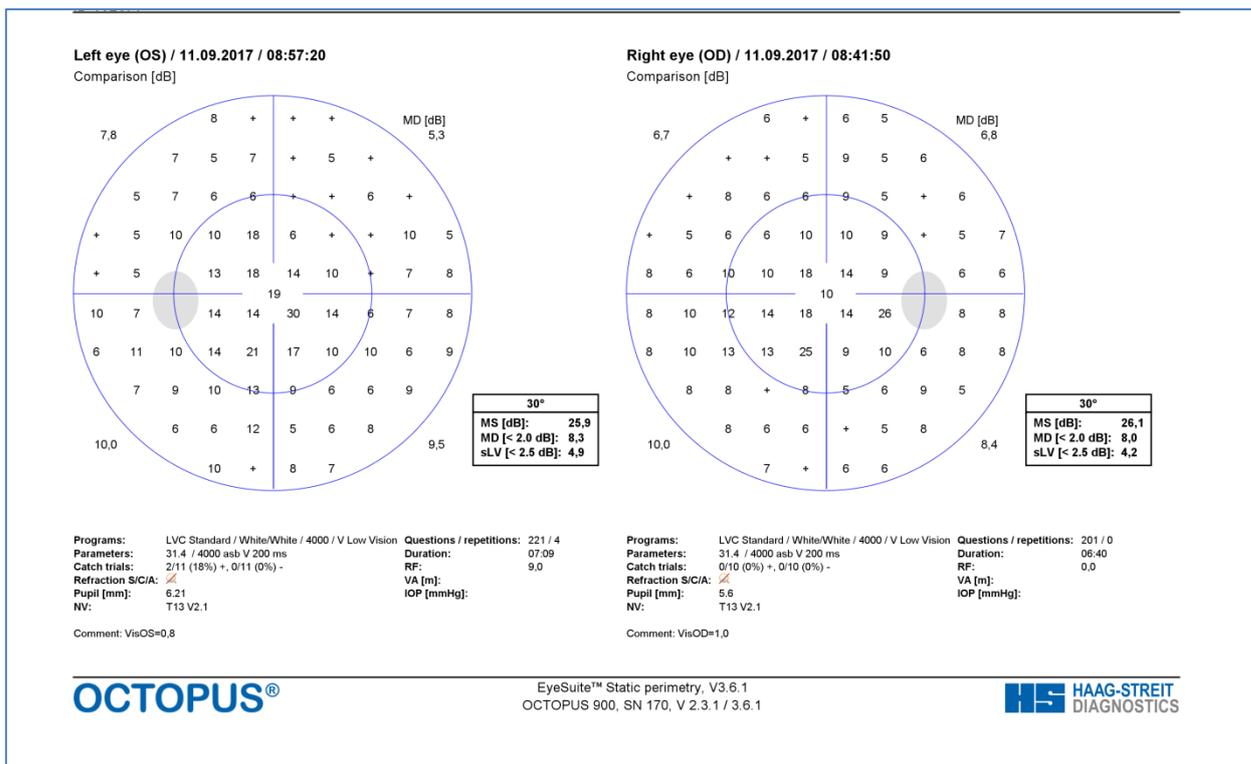


Рис. 19. Данные компьютерной периметрии пациента Д.

Таблица 13. Динамика показателей зрительных функций пациента Д.

Показатели зрительных функций		Период от начала заболевания на OD/OS, мес				
		3/6	6/9	11/14	21/24	26/29
Острота зрения, OD/OS		0,08/0,08	0,1/0,2	0,8/0,8	1,0/1,0	1,0/1,0
Показатели периметрии	MS, OD/OS	23,5/25,2	26,1/25,9	28,1/27,7	28,5/29,2	29,1/28,4
	MD, OD/OS	10,6/9	8/8,3	7,3/7	6/6,4	5,6/5
Количество прочитанных полихроматических таблиц, OD/OS		6/5,5	15,5/14,5	17/18	16/18,5	15,5/17

По данным ОКТ у пациента отмечалось истончение СНВС и комплекса ГКС. (рис.20, 21)

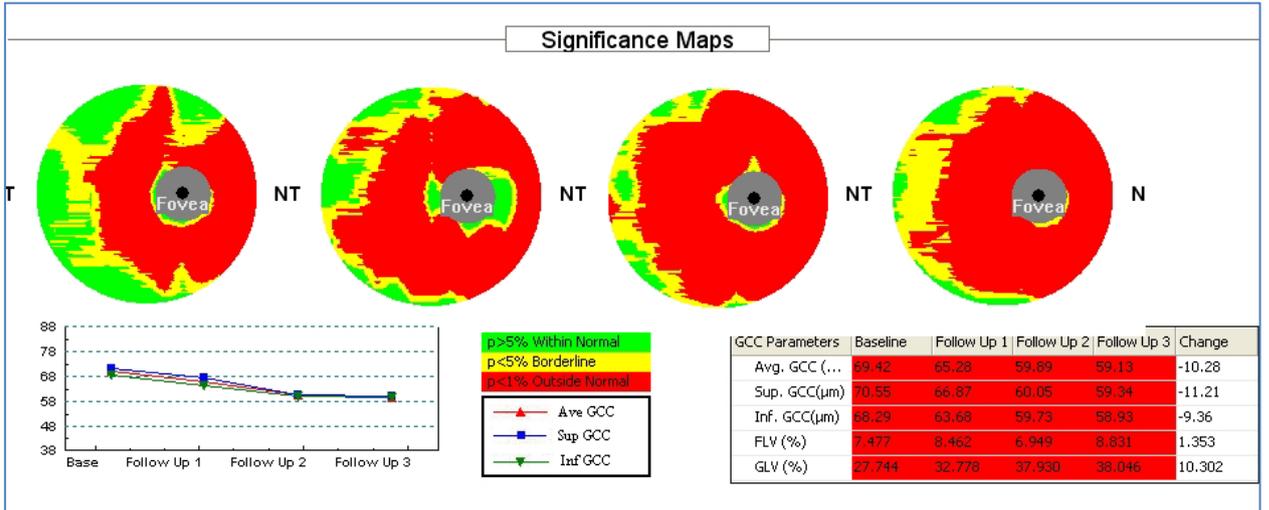


Рис. 20. Снижение толщины слоя ГКС у пациента Д.

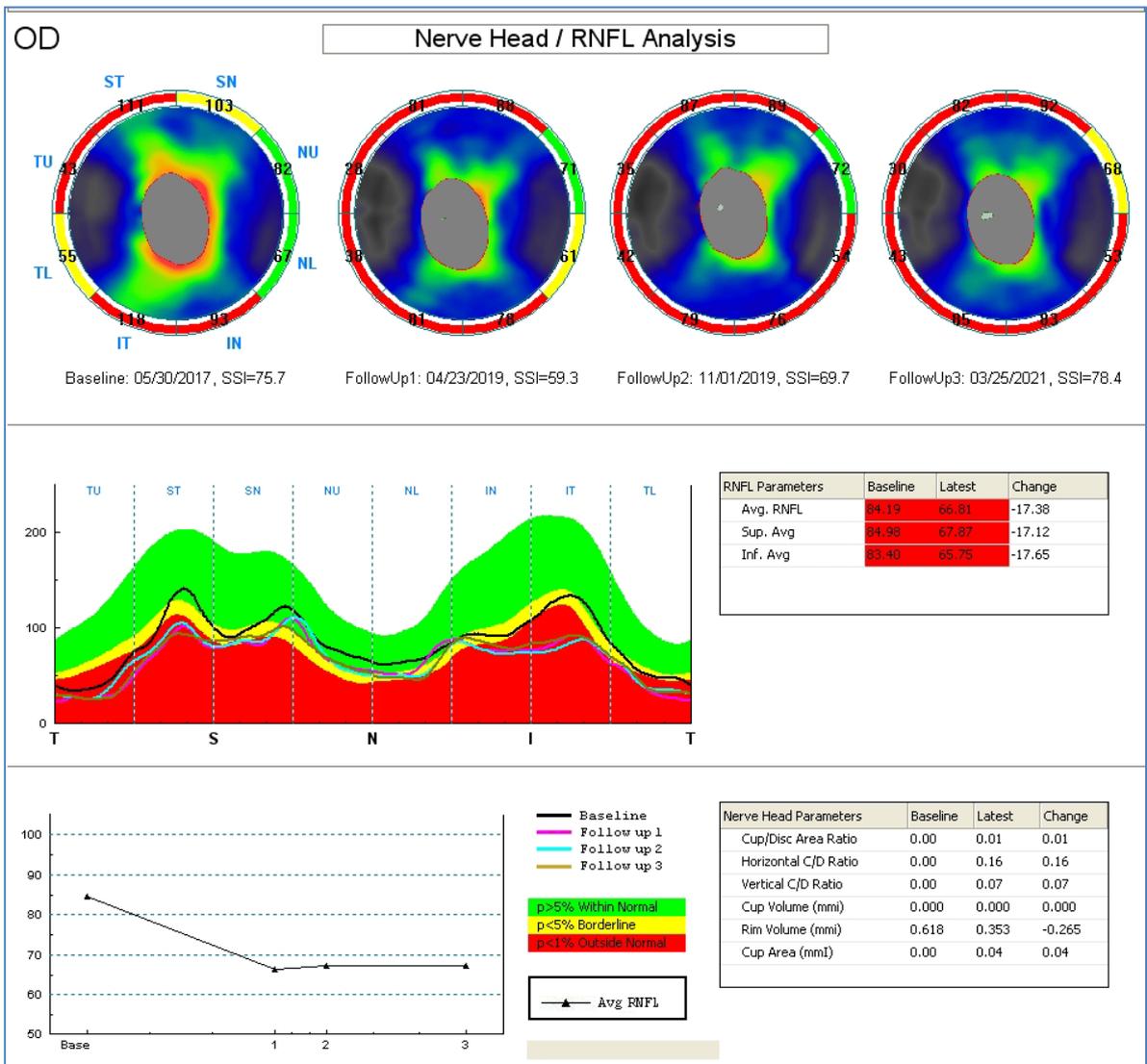


Рис. 21. Карты толщины СНВС в динамике. Снижение толщины СНВС у пациента Д.

Было выявлено снижение сосудистой плотности в макулярной и перипапиллярной зонах, а также в области диска зрительного нерва по данным ОКТА (рис. 22).

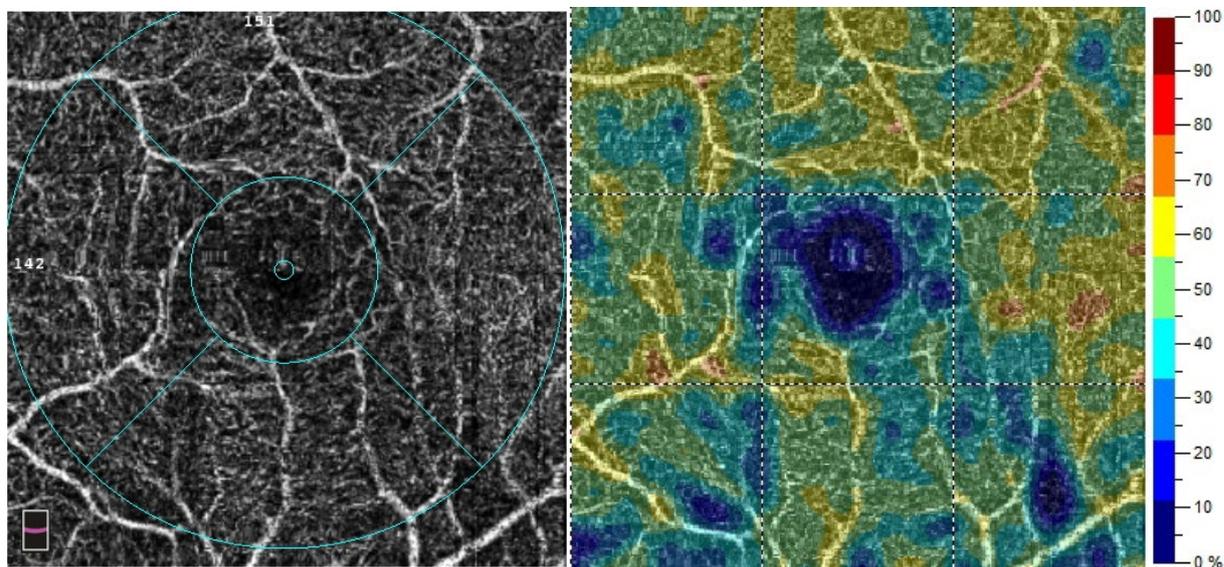


Рис.22. Карты сосудистой плотности (ОКТА). Снижение сосудистой плотности у пациента Д.

У пациента была заподозрена НОНЛ, он был направлен на генетическое обследование. Поиск трех наиболее частых мутаций мтДНК, характерных для НОНЛ (m.11778G>A, m.3460G>A, m.14484T>C), не выявил их наличия. Некоторое время генетически верифицировать диагноз пациента не представлялось возможности, из-за ограничений в диагностике НОН на момент проведения поиска мутаций. Спустя 1,5 года от начала заболевания был проведен дополнительный поиск мутаций в гене *DNAJC30* яДНК в связи с установленной ассоциацией вышеуказанных нуклеотидных замен с АРОН в результате которого был обнаружен генетический вариант с.152A>G.

Начиная со следующего визита у пациента наметилась тенденция к постепенному восстановлению зрения. Спустя год после первого визита острота зрения повысилась до VisOU=0,8/0,8 и остается стабильной до настоящего времени VisOU=1,0/1,0. Количество читаемых полихроматических таблиц и показатели периметрии также улучшились (Табл.14, Рис. 23).

Таблица 14. Динамика показателей зрительных функций пациента Д.

Показатели зрительных функций		Период от начала заболевания на OD/OS, мес				
		3/6	6/9	11/14	21/24	26/29
Острота зрения, OD/OS		0,08/0,08	0,1/0,2	0,8/0,8	1,0/1,0	1,0/1,0
Показатели периметрии	MS, OD/OS	23,5/25,2	26,1/25,9	28,1/27,7	28,5/29,2	29,1/28,4
	MD, OD/OS	10,6/9	8/8,3	7,3/7	6/6,4	5,6/5
Количество прочитанных полихроматических таблиц, OD/OS		6/5,5	15,5/14,5	17/18	16/18,5	15,5/17

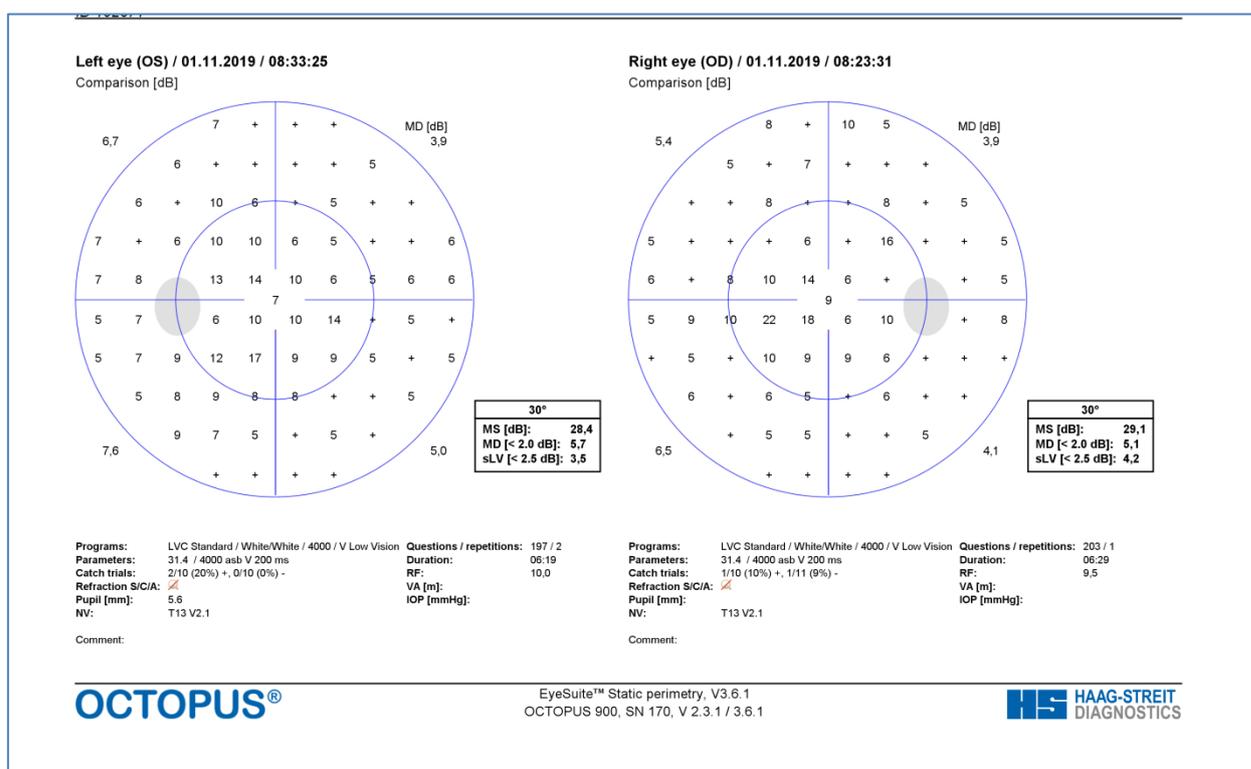


Рис. 23. Данные компьютерной периметрии пациента Д. во время последнего визита у пациента Д.

Пациент М.

Пациент М, 34 года, обратился в клинику с жалобами на безболезненное одновременное нарушение зрения на обоих глазах 2 недели назад. По данным МРТ исследования без патологических изменений. Со слов пациента, он курил на протяжении 7 лет, но бросил за несколько месяцев до снижения зрения. Также пациент сообщил о том, что за день до появления симптомов употреблял алкоголь. При офтальмологическом осмотре было выявлено снижение зрения ($VisOD=0,05$ $Vis OS=0,08$), а также выраженное нарушение цветовосприятия, центральные скотомы по данным компьютерной периметрии (рис. 24, табл.15). Толщина СНВС достаточно длительное время оставалась выше или в пределах нормальных показателей, и только спустя 10 месяцев от дебюта клинической симптоматики было выявлено снижение толщины СНВС, в особенности в темпоральном сегменте ДЗН (рис. 25- 26). Уменьшение толщины комплекса ГКС с носовой стороны было отмечено через 3 недели от начала заболевания на OS, затем на OD, с последующим прогрессированием.

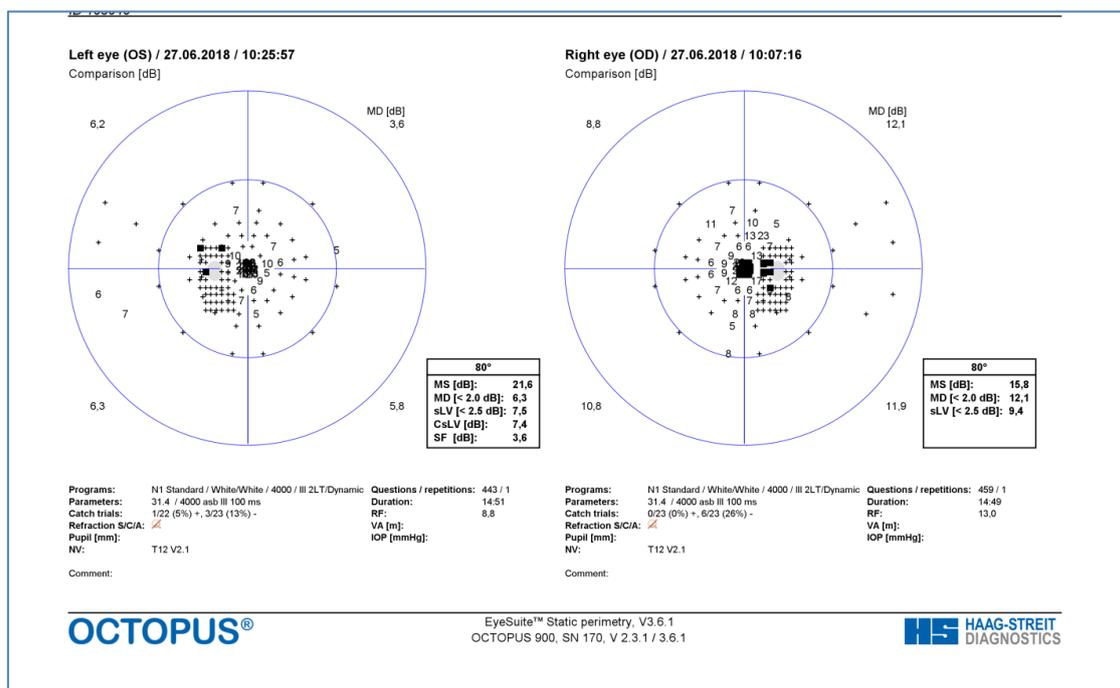


Рис. 24. Данные компьютерной периметрии пациента М. в первый месяц от начала заболевания.

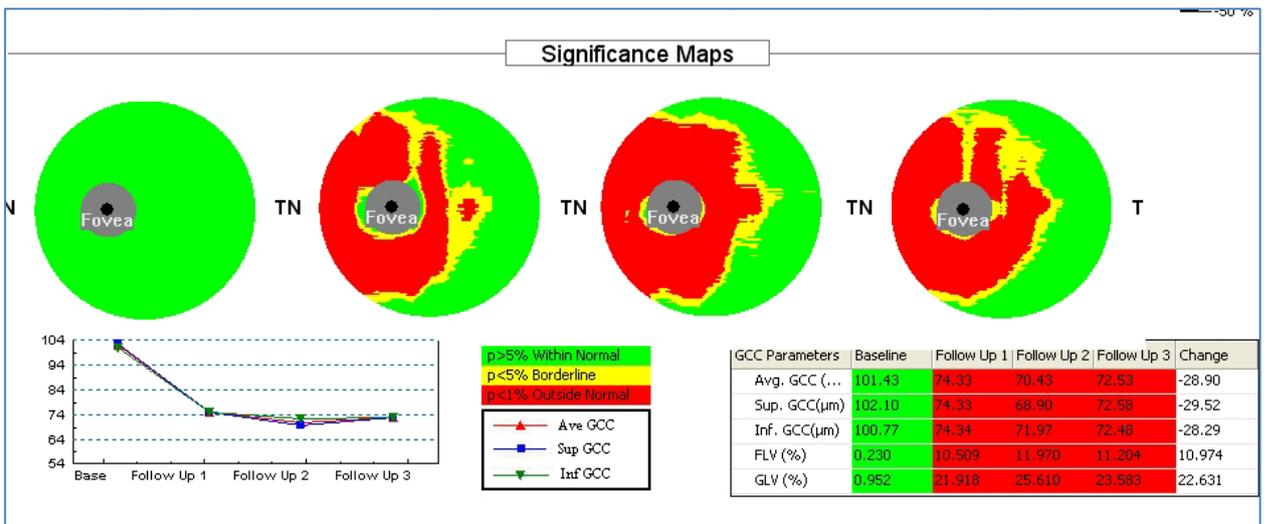


Рис. 25. Карты толщины слоя ГКС у пациента М. в динамике.

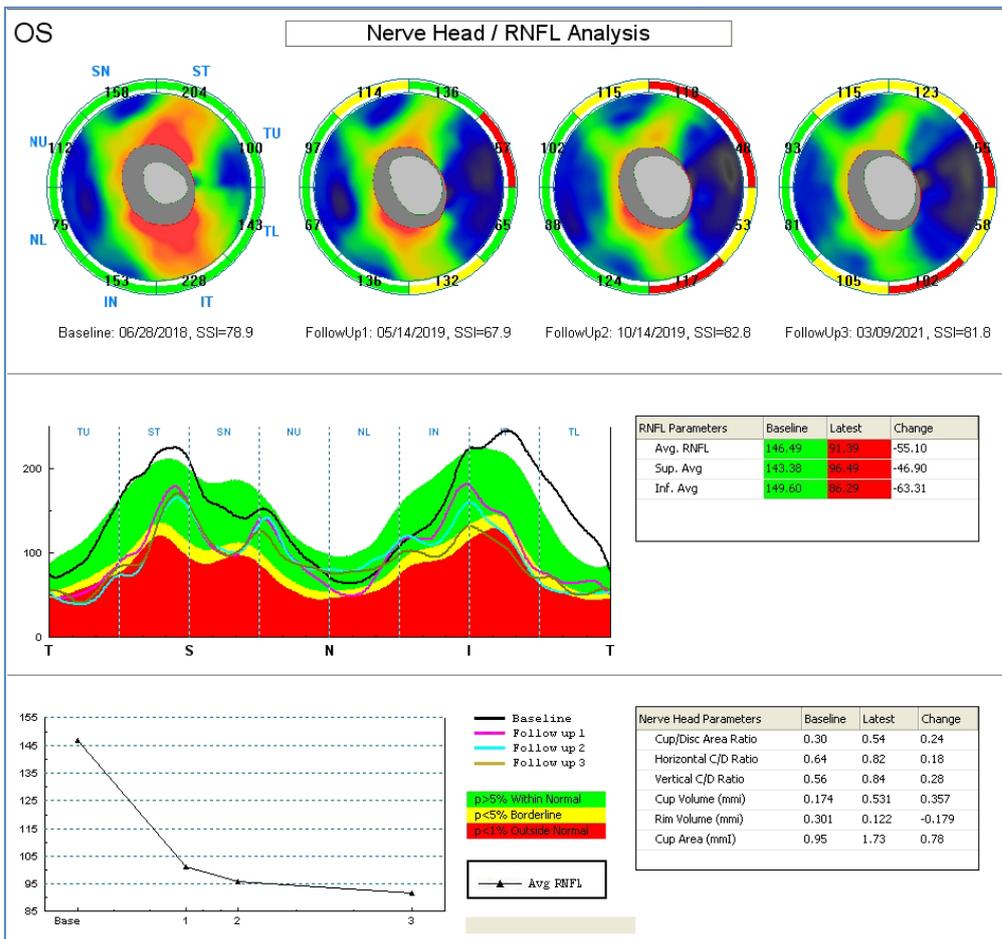


Рис. 26. Карты толщины СНВС у пациента М. в динамике

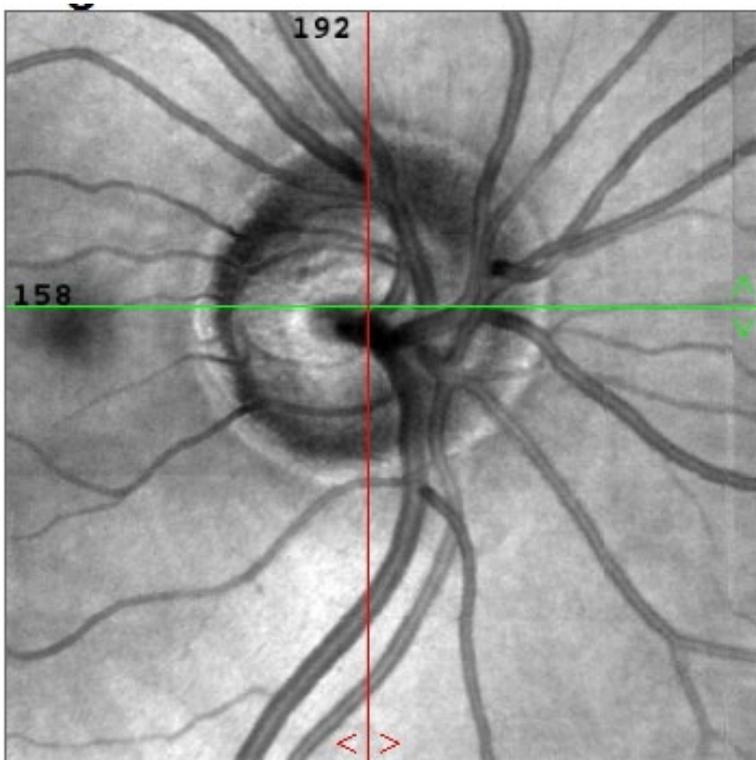


Рис. 27. ДЗН у пациента М.

По результатам исследования ОКТА у пациента было обнаружено снижение сосудистой плотности в макулярной и перипапиллярной зонах.

Для подтверждения наследственной природы заболевания пациенту был рекомендован генетический анализ крови. Однако на момент исследования в практической медицине диагностика НОНЛ была ограничена 19 наиболее часто встречающимися первичными мутациями, которые у пациента не были выявлены. Спустя месяц после первого визита, он обратился в клинику с жалобами на снижение зрения. В рамках исследования ему было проведено секвенирование по Сенгеру для ядерного гена *DNAJC30* для выявления патогенных мутаций, по итогам которого у пациента была обнаружена гомозиготная мутация с.152A>G.

Спустя 12 месяцев после первого визита острота зрения у пациента составляла VisOD=1,0 Vis OS=0,8, через 17 мес - VisOU=1,0. Цветовое зрение полностью восстановилось, центральная скотома уменьшилась в размерах и степени потери световой чувствительности (Рис.28, Табл. 16).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Принимая во внимание тяжесть поражения зрительного анализатора при НОН, представляется актуальным поиск и изучение новых аспектов, способов диагностики и терапевтических возможностей при данном заболевании.

Целью настоящего исследования было изучение клинико-генетических и биохимических аспектов НОН.

По мнению некоторых авторов [18] одним из факторов определяющих конверсию бессимптомного носительства в заболевание с клиническими проявлениями при НОН является количество копий мтДНК в клетках и способность успешно восполнять эти копии.

В данной работе мы определяли копийность мтДНК в клетках крови и фибробластах у 17 пациентов с генетически верифицированными мутациями, ассоциированными с НОН. Однако сравнение двух выборок пациентов с НОНЛ и здоровых носителей мутаций не показало различий между ними в копийности мтДНК в клетках крови. Также не было выявлено отличия этих групп с контролем (N=6). Можно предположить, что подобное расхождение при сравнении результатов с исследованием Giordano С. обусловлено несовершенством методологии выделения клеток крови Giordano С. и соавт. Кроме того, для подтверждения результатов нами были использованы также фибробласты кожи, которые также демонстрируют митохондриальные дефекты при их наличии, но не могут быть контаминированы тромбоцитами, что влияет на достоверность результатов исследования. Отличий в копийности мтДНК в клетках фибробластов у пациентов с НОНЛ по сравнению с контролем не обнаружено. Также не было выявлено корреляции между выраженностью клинической симптоматики и количеством копий мтДНК у пациентов с НОНЛ. Аналогичные результаты были получены в исследовании Nishioka et al., Yen et al. [106,150], по данным которых отмечалось лишь незначительное повышение количества мтДНК у

носителей по сравнению с пациентами и контролем. Таким образом, копийность мтДНК не может быть рассмотрена в качестве протективного фактора при НОНЛ.

На сегодняшний день не существует универсального, высокоспецифического биохимического теста для диагностики НОН. Поэтому высокую значимость приобретают исследования биомаркеров, изменение концентрации которых описано при ряде других митохондриальных заболеваний. В данном исследовании были изучены концентрации двух биомаркеров FGF- 21 и GDF-15, специфически повышающихся у пациентов из некоторых подгрупп митохондриальных заболеваний с вовлечением мышечной системы и печени [249]. При определении биомаркера FGF-21 у пациентов с НОНЛ было зафиксировано статистически значимое различие повышение его концентрации по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). Однако разброс показателей у пациентов не позволяет однозначно оценить FGF-21 как маркер заболевания.

При сравнении концентрации GDF-15 у пациентов с НОНЛ и контрольной группы статистически значимых различий получено не было. Таким образом, концентрации биомаркеров FGF-21 и GDF – 15 в пределах нормальных значений у пациентов с клинической симптоматикой НОНЛ не позволяют исключить наличие заболевания.

Говоря о факторах, принимающих участие в развитии клинических признаков НОН, стоит отметить роль дефицита витаминов и микроэлементов, являющихся важными участниками процессов окислительного фосфорилирования в клетке. Так известно, что дефицит фолиевой кислоты может нарушать процесс переноса электронов по электронтранспортной цепи в митохондриях, что само по себе приводит к нарушению жизнедеятельности клетки, а также накоплению токсичного соединения соли муравьиной кислоты - формиата, который усугубляет условия окислительного стресса, делая клетку более уязвимой. Обмен фолиевой кислоты регулируется каскадом реакций фолатного цикла,

коферментом в заключительной реакции которого является витамин В12. При его дефиците, фолиевая кислота не трансформируется в активную форму и не может быть усвоена организмом. Помимо этого, сам по себе дефицит витамина В12 может приводить к развитию симптомов оптической нейропатии. Согласно недавним исследованиям, цианкобаламин инактивирует пероксидные радикалы и обладает нейропротекторной активностью [27]. При его выраженном дефиците при поступлении с пищей или ввиду нарушений всасывания в желудочно-кишечном тракте у пациентов развиваются симптомы, характерные для алиментарной нейропатии.

У 28 пациентов с НОН в нашем исследовании мы определяли уровень фолиевой кислоты и витамина В12, сравнивая эти показатели с группой сравнения из 54 пациентов с ОН воспалительного, травматического, компрессионного генеза, а также группой контроля из 15 здоровых добровольцев. Концентрация фолиевой кислоты была достоверно ниже у пациентов с НОН по сравнению с пациентами с ОН другого генеза ($p < 3 \times 10^{-9}$) и группой контроля ($p < 1 \times 10^{-11}$). Показатели витамина В12 также статистически значимо снижены по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). Полученные в данной работе результаты указывают на необходимость корректировки содержания фолиевой кислоты и витамина В12 у пациентов с НОНЛ в случае его снижения.

В большинстве случаев у пациентов (~90%) с генетически верифицированной НОНЛ обнаруживается одна из трех наиболее частых мутаций мтДНК: m.3460G>A, m.11778G>A, m.14484T>C. Еще часть (~5%) приходится на редкие и кандидатные мутации. Тем не менее, остается часть пациентов, клиника которых соотносится с НОНЛ, однако генетический поиск дает отрицательные результаты, не обнаруживая известных дефектов мтДНК. Поиск и изучение этих вариантов вносят значительный вклад в расширение научного и клинического опыта ведения пациентов с НОН. Вклад патогенного варианта с.152A>G в гене *DNAJC30*, ассоциированного с АРОН в развитие НОНЛ был рассмотрен нами на выборке из 21 пациента.

Несмотря на то, что течение АРОН соответствовало клинической картине НОНЛ, были выявлены некоторые особенности. Так у пациентов с генетическим вариантом с.152A>G в гене *DNAJC30* дебют заболевания приходился на более ранний по сравнению с НОНЛ возраст, а в 62% случаев отмечалось частичное или полное восстановление зрительных функций.

Доля пациентов с АРОН составила 22% от всех пациентов с клинической картиной НОНЛ.

Наряду с генетическими и биохимическими исследованиями важную диагностическую и прогностическую роль при НОН играют клинические методы обследования пациентов. Новым и методом в диагностике НОН является ОКТА, дающая возможность оценивать плотность и особенности сосудистого кровотока глаза. В случае с НОН этот метод приобретает особую значимость и актуальность, ведь микроангиопатические изменения являются характерными находками при данном заболевании. По результатам проведенного нами исследования были выявлены нарушения сосудистой плотности микроциркуляторного русла сосудов сетчатки, ДЗН и перипапиллярной зоны по данным ОКТА у пациентов с НОН. Так, было выявлено более выраженное снижение сосудистой плотности поверхностного сосудистого комплекса сетчатки во всех секторах парафовеа и в темпоральном секторе перифовеа у больных с длительно существующим заболеванием. Помимо этого, у пациентов с НОН отмечались более высокие показатели сосудистой плотности в глубоком сосудистом комплексе в перифовеа и центральной зоне сетчатки 3x3 у пациентов с высокой остротой зрения 0,5-1,0. Также было показано наиболее выраженное снижение показателей сосудистой плотности в темпоральном сегменте, в темпоральных секторах верхнего и нижнего сегмента в перипапиллярной зоне у пациентов по мере увеличения длительности НОН. Кроме того, было обнаружено, что у пациентов после 1 года заболевания с остротой зрения 0,5-1,0 толщина СНВС и сосудистая плотность ДЗН в височном сегменте значимо больше по сравнению с пациентами с более низкой остротой зрения.

Полученные данные позволяют рассматривать ОКТА как эффективный метод обследования, который в комплексе с другими диагностическими методами может способствовать более глубокому пониманию пусковых патогенетических процессов, происходящих при НОН.

Еще одним клиническим методом обследования, показавшим эффективность при НОН, но мало изученным до настоящего времени оказалась оценка одного из параметров фотопической ЭРГ – ФНО. Учитывая избирательную специфичность ФНО отражать функциональные изменения ГКС, которые в первую очередь поражаются при манифестации клинической симптоматики при НОН, оценка амплитуды этого показателя у пациентов с НОН имеет высокую диагностическую и прогностическую значимость. При сравнительном анализе показателей ФНО пациентов ($n=14$, 28 глаз) и группы контроля ($n=9$, 18 глаз) были выявлены статистически значимые различия амплитуды ($p<0,0002$). Выявлена корреляционная связь между амплитудой ФНО и остротой зрения, показателем средней световой чувствительности MS лабильностью зрительного анализатора, КЧСМ, а также толщиной перипапиллярного СНВС в верхнем и темпоральном секторах.

При сравнении показателей амплитуды и латентности ФНО пациентов с НОНЛ с $OЗ<0,1$, $OЗ\geq 0,13$ и группой контроля получены статистически значимые различия между латентностью ($p<0,01$), амплитудой ФНО ($p<0,008$) пациентов с $OЗ\leq 0,1$ и группой контроля, а также амплитудой ($p<0,05$) ФНО пациентов с $OЗ\geq 0,13$ и группой контроля.

У пациентов с $OЗ\geq 0,13$ выявлена прямая корреляционная связь высокой силы между показателями амплитуды ФНО и лабильностью зрительного анализатора, средней толщиной ГКС, толщиной ГКС в верхнем секторе, латентностью ФНО и толщиной ГКС в верхнем секторе. У пациентов с $OЗ\leq 0,1$ и ниже таких корреляций получено не было. Таким образом, резюмируя вышеперечисленные данные, есть основания полагать, что по показателям ФНО можно судить о функциональных возможностях ГКС.

Полученные результаты клинических и молекулярно-генетических исследований расширяют диагностические и терапевтические возможности при ведении пациентов с НОН.

ВЫВОДЫ:

1. На достаточном клиническом материале (95 пациентов) изучены особенности митохондриального биогенеза и клинико-генетические аспекты наследственных оптических нейропатий.
2. Выявлено отсутствие различий копийности мтДНК в клетках крови пациентов с НОНЛ, здоровых носителей мутаций мтДНК и группой контроля.
3. Выявлено, что концентрация маркера FGF-21 у пациентов с НОН отличалась большим разбросом значений, статистически была выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). Статистически значимых различий при определении концентрации маркера GDF-15 выявлено не было.
4. Обнаружено снижение уровня фолиевой кислоты по сравнению с пациентами с оптической нейропатией иного генеза ($p < 3 \cdot 10^{-9}$) и группой здоровых добровольцев ($p < 1 \cdot 10^{-11}$). Показано, что содержание витамина В12 в сыворотке крови у пациентов с НОН значительно отличается от группы здоровых добровольцев ($p < 0,001$).
5. Впервые в РФ у пациентов с клинической картиной НОНЛ в 22% случаев обнаружена гомозиготная мутация с.152A>G гена *DNAJC30*, соответствующая АРОН.
6. Отмечено частичное или полное восстановление зрительных функций в 62% случаев у пациентов с мутациями в гене *DNAJC30*.
7. Анализ показателей сосудистой плотности в сосудах микроциркуляторного кровотока сетчатки и ДЗН выявил нарушение микроциркуляторного кровотока сосудов сетчатки, ДЗН и перипапаллярной зоны по данным ОКТА.

- выявлено более выраженное снижение сосудистой плотности поверхностного сосудистого комплекса сетчатки во всех секторах парафовеа и в темпоральном секторе перифовеа у больных с длительно существующим заболеванием
 - выявлены более высокие цифры сосудистой плотности в глубоком сосудистом комплексе в перифовеа и центральной зоне сетчатки 3x3 у пациентов с высокой остротой зрения 0,5-1,0
 - показано наиболее выраженное снижение показателей сосудистой плотности в темпоральном сегменте, в темпоральных секторах верхнего и нижнего сегмента в перипапиллярной зоне у пациентов по мере увеличения длительности НОН
 - обнаружено, что у пациентов после 1 года заболевания с остротой зрения 0,5-1,0 толщина СНВС и сосудистая плотность ДЗН в височном сегменте значимо выше по сравнению с пациентами с более низкой остротой зрения.
8. Выявлены статистически значимые различия между амплитудой ФНО группы контроля и пациентов с $OЗ \leq 0,1$ ($p < 0,0001$), пациентов с $OЗ \geq 0,13$ ($p < 0,05$). Получена корреляционная связь высокой силы между показателями амплитуды ФНО и средней толщиной комплекса ГКС ($K=0,71$, $< 0,05$) у пациентов с $OЗ \geq 0,13$, что свидетельствует о более высоких функциональных возможностях ГКС этой группы пациентов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. Пациентам и носителям мутаций мтДНК и яДНК необходимо исследовать содержание уровня фолиевой кислоты и витамина В12 в сыворотке крови, и при выявлении снижения данных показателей поддерживать уровень вышеперечисленных

показателей в рамках средних цифр в диапазоне референсных значений.

2. Пациентов с клиническими проявлениями НОН, но при отсутствии мутаций мтДНК, следует направлять на молекулярно-генетический анализ методом секвенирования по Сенгеру для определения мутаций в ядерном гене *DNAJC30*. Выявление у пациентов гомозиготной мутации с.152А>G позволяет прогнозировать более вероятное восстановление зрения у пациентов с НОН.
3. Для комплексной диагностики сосудистых изменений у пациентов с НОН рекомендуется проводить ОКТ с функцией ангиографии. Это позволяет оценить степень структурных поражений и спрогнозировать дальнейшее течение заболевания.
4. Родственникам пациентов с НОН, у которых не отмечается клинической симптоматики рекомендуется проводить ОКТ с функцией ангиографии с прогностической целью для определения возможной конверсии заболевания из бессимптомной формы в форму с клиническими проявлениями.
5. Для диагностики НОНЛ при обследовании пациентов рекомендуется проводить оценку ФНО, что позволяет оценить степень вовлеченности в процесс заболевания ГКС.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Аветисов СЭ, Шеремет НЛ, Фомин АВ, Галоян НС, Ханакова НА, Жоржоладзе НВ, Логинова АН, Чухрова АЛ, Поляков АВ. Структурные

- изменения сетчатки и зрительного нерва у пациентов с наследственной оптической нейропатией Лебера. Вестник офтальмологии. 2014; 130(1): 4-11
2. Будзинская МВ, Шеланкова АВ, Михайлова МА, Плюхова АА, Нуриева НМ, Фомин АВ. Изменения центральной зоны глазного дна при ретинальных венозных окклюзиях по данным оптической когерентной томографии-ангиографии. Вестник Офтальмологии. 2016; 132 (5): 15-22.
 3. Невиницына ТА, Шеремет НЛ. Молекулярные механизмы митохондриальных заболеваний зрительного нерва и возможности патогенетического лечения. Вестник офтальмологии. 2016. 132(1):91-96.
 4. Цыганкова ПГ, Иткис ЮС, Крылова ТД, Захарова ЕЮ, Эффективность новых плазменных биомаркеров FGF-21 и GDF-15 в дифференциальной диагностике митохондриальных заболеваний. Медицинская Генетика. 2018; 17(5).
 5. Рабкин ЕБ. Полихроматические таблицы для исследования цветоощущения. Медицина, издание 9-е. – 1971.
 6. Шеремет НЛ, Андреева НА, Жоржоладзе НВ, Шмелькова МС, Иткис ЮС, Крылова ТД, Цыганкова ПГ. Клинические особенности восстановления зрения у пациентов с наследственной оптической нейропатией Лебера. Точка зрения. Восток-Запад: научно-практический журнал. 2020; 2:47-49.
 7. Шеремет НЛ, Андреева НА, Шмелькова МС, Цыганкова ПГ. Митохондриальный биогенез при наследственных оптических нейропатиях. Вестник офтальмологии. 2019; 135(5):85-91
 8. Шеремет НЛ, Шмелькова МС, Ханакова НА, Иткис ЮС, Крылова ТД, Цыганкова ПГ. Метаболические нарушения у пациентов с наследственной оптической нейропатией Лебера. Современные технологии в офтальмологии. 2019. (3): 212-214
 9. Aleyasin A, Ghazanfari M, Houshmand H, Leber Hereditary Optic Neuropathy: Do Folate Pathway Gene Alterations Influence the Expression of Mitochondrial DNA Mutation? Iranian Journal of Public Health. 2010; (39):53

10. Angebault C, Guichet PO, Talmat-Amar Y, Charif M, Gerber S, Fares-Taie L, Gueguen N, Halloy F, Moore D, Amati-Bonneau P, Manes G, Hebrard M, Bocquet B, Quiles M, Piro-Mégy C, Teigell M, Rossel M, Meunier I, Lenaers G. Recessive Mutations in RTN4IP1 Cause Isolated and Syndromic Optic Neuropathies. *The American Journal of Human Genetics*. 2015;97(5): 754-760.
11. Asanad S, Tian JJ, Frousiakis S, Jiang JP, Kogachi K, Felix CM, Fatemeh D, Irvine AG, Ter-Zakarian A, Falavarjani KG, Barboni P, Karanjia R, Sadun AA. Optical Coherence Tomography of the Retinal Ganglion Cell Complex in Leber's Hereditary Optic Neuropathy and Dominant Optic Atrophy. *Curr Eye Res*. 2019 Jun;44(6):638-644.
12. Avram VF, Merce AP, Hâncu IM, Bătrân AD, Kennedy G, Rosca MG, Muntean DM. Impairment of Mitochondrial Respiration in Metabolic Diseases: An Overview. *International Journal of Molecular Science*. 2022; 9;23(16):8852.
13. Balayre S, Gicquel JJ, Mercie M, Dighiero P. Childhood Leber's hereditary optic neuropathy. A case of a 6-year-old girl with loss vision. *Journal Français d'Ophthalmologie*. – 2003; 26(10):1063-6.
14. Balducci N, Cascavilla ML, Ciardella A, et al. Peripapillary vessel density changes in Leber's hereditary optic neuropathy: a new biomarker. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2018; 46(9):1055–1062.
15. Barnabé A, Aléssio AC, Bittar LF, de Moraes Mazetto B, Bicudo AM, de Paula EV, Höehr NF, Annichino-Bizzacchi JM. Folate, vitamin B12 and Homocysteine status in the post-folic acid fortification era in different subgroups of the Brazilian population attended to at a public health care center. *Nutrition Journal*. 2015; 19;14:19.
16. Behl C, Holsboer F. The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1999; 20(11):441–444.
17. Berninger TA, Jaeger W, Krastel H. Electrophysiology and colour perimetry in dominant infantile optic atrophy. *British Journal of Ophthalmology*. 1991; (75):49-52

18. Bianco A, Bisceglia L, Russo L, Palese L, D'Agruma L, Emperador S, Montoya J, Guerriero S, Petruzzella V. High Mitochondrial DNA Copy Number Is a Protective Factor From Vision Loss in Heteroplasmic Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) . *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2017; 58: 2193-2197.
19. Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*. 2011;34(1):75-81.
20. Botelho GIS, Salomão SR, Tengan CH, Karanjia R, Moura FV, Rocha DM, da Silva PBE, Fernandes AG, Watanabe SES, Sacai PY, Belfort R Jr, Carelli V, Sadun AA, Berezovsky A. Impaired Ganglion Cell Function Objectively Assessed by the Photopic Negative Response in Affected and Asymptomatic Members From Brazilian Families With Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Frontiers in Neurology*. 2021;18;11:628014.
21. Bychkov IO, Itkis YS, Tsygankova PG, Krylova TD, Mikhaylova SV, Klyushnikov SA, Pechatnikova NL, Degtyareva AV, Nikolaeva EA, Seliverstov YA, Kurbatov SA, Dadali EL, Rudenskaya GE, Illarioshkin SN, Zakharova EY. Mitochondrial DNA maintenance disorders in 102 patients from different parts of Russia: Mutational spectrum and phenotypes. *Mitochondrion*. 2021;57:205-212
22. Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Scientific Reports*. 2017; 7 :42201.
23. Caporali L, Maresca A, Capristo M, Del Dotto V, Tagliavini F, Valentino ML, La Morgia C, Carelli V. Incomplete penetrance in mitochondrial optic neuropathies. *Mitochondrion*. 2017;36:130-137.
24. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Progress in Retinal and Eye Reseach*. 2004; 23:53 – 89
25. Chalam KV, Sambhav K. Optical Coherence Tomography Angiography in Retinal Diseases. *Journal of Ophthalmic and Visual Research*. 2016;11(1):84–92

26. Chan W, Almasieh M, Catrinescu MM, Levin LA. Cobalamin-Associated Superoxide Scavenging in Neuronal Cells Is a Potential Mechanism for Vitamin B12-Deprivation Optic Neuropathy. *American Journal of Pathology*. 2018;188:160–172.
27. Chang C, Yu C, Lu H, Chou Y, Huang R. Folate deprivation promotes mitochondrial oxidative decay: DNA large deletions, cytochrome c oxidase dysfunction, membrane depolarization and superoxide overproduction in rat liver. *British Journal of Nutrition*. 2007;97(5), 855-863.
28. Chang JY, Hong HJ, Kang SG, Kim JT, Zhang BY, Shong M. The Role of Growth Differentiation Factor 15 in Energy Metabolism. *Diabetes and Metabolism Journal*. 2020;44(3):363-371.
29. Chango A, Parrot-Roulaud F, Nicolas J. Génétique moléculaire de la reméthylation de l'homocystéine [Molecular genetics of the remethylation of homocysteine]. *Annales de Biologie Clinique (Paris)*. 1999;57(1):37-42. French.
30. Colotto A, Falsini B, Salgarello T, Iarossi G, Galan ME, Scullica L. Photopic negative response of the human ERG: losses associated with glaucomatous damage. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*. 2000; 41: 2205–2211.
31. Côté H. Mechanisms of antiretroviral therapy-induced mitochondrial dysfunction. *Current Opinion on HIV and AIDS*. 2007; 2(4):253-60.
32. Davis RL, Liang C, Sue CM. A comparison of current serum biomarkers as diagnostic indicators of mitochondrial diseases. *Neurology*. 2016; 86(21): 2010-2014.
33. De Rojas JO, Rasool N, Chen RW, Horowitz J, Odel JG. Optical coherence tomography angiography in Leber hereditary optic neuropathy. *Neurology*. 2016; 8;87(19):2065-2066.
34. De Silva P, Jayamanne G, Bolton R. Folic acid deficiency optic neuropathy: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2008; 10;2:299.
35. Dupas B, Minvielle W, Bonnin S, Couturier A, Erginay A, Massin P, Tadayoni R. Association Between Vessel Density and Visual Acuity in Patients With

- Diabetic Retinopathy and Poorly Controlled Type 1 Diabetes. *JAMA Ophthalmology*. 2018; 136 (7)
36. Ebara S. Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies (Kyoto)*. 2017; 57(5):138-141
 37. ElGohary AA, Elshazly LH. Photopic negative response in diagnosis of glaucoma: an experimental study in glaucomatous rabbit model. *International Journal of Ophthalmology*. 2015;8(3):459-464.
 38. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011; 93(4):884S-90.
 39. Fogarty MJ, Rana S, Mantilla CB, Sieck GC. Quantifying mitochondrial volume density in phrenic motor neurons. *Journal of Neuroscience Methods*. 2021(1);353:109093.
 40. Friedman JR, Nunnar J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014; 505:335–343.
 41. Gaier ED, Gittinger JW, Cestari DM, Miller JB. Peripapillary Capillary Dilation in Leber Hereditary Optic Neuropathy Revealed by Optical Coherence Tomographic Angiography. *JAMA Ophthalmology*. 2016; 1;134(11):1332-1334.
 42. Ghasemi Falavarjani K, Tian JJ, Akil H, Garcia GA, Sadda SR, Sadun AA. Swept-Source optical coherence tomography angiography of the optic disc in optic neuropathy. *Retina*. 2016; 36 (1):168–S177.
 43. Giordano C, Iommarini L, Pisano A, Caporali L. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2014
 44. Giordano C, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, Carelli V. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2014; 137; 335–353.
 45. Giordano L, Sadun AA, Carelli V. Cigarette toxicity triggers Leber's hereditary optic neuropathy by affecting mtDNA copy number, oxidative phosphorylation and ROS detoxification pathways. *Cell Death and Disease*. 2015; 17(6):e2021.

46. Gotoh Y, Machida S, Tazawa Y. Selective loss of the photopic negative response in patients with optic nerve atrophy. *Archives of Ophthalmology*. 2004; (122):3:341–346
47. Gourelain K, Amellal B, Arkoub Z, Dupin K, Katlama C, Calvez V. Quantitative analysis of human mitochondrial DNA using a real-time PCR assay. *HIV Medicine*. 2003; 4(3):287–292.
48. Grzybowski A, Zülsdorff M, Wilhelm H, Tonagel F. Toxic optic neuropathies: an updated review. *Acta Ophthalmologica*. 2015; 93(5):402-10.
49. Guillard JC, Aimone-Gastin I. Vitamine B12 (cobalamines) [Vitamin B12 (cobalamin)]. *La Revue du Practicien*. 2013;63(8):1085-7, 1089-90.
50. Henderson, G. B. Folate-binding proteins. *Annual review of nutrition*. 1990. 9100:319-335.
51. Herst PM, Rowe MR, Carson GM, Berridge MV. Functional Mitochondria in Health and Disease. *Frontiers in Endocrinology*. 2017; 8:296.
52. Hirano T, Chanwimol K, Weichsel J. Distinct Retinal Capillary Plexuses in Normal Eyes as Observed in Optical Coherence Tomography Angiography Axial Profile Analysis. *Scientific Reports*. 2018; 8, 9380.
53. Hoffbrand AV. Folate absorption . *Journal of Clinical Pathology*. 1971 (5) ; 66-76.
54. Holloszy JO. Biochemical Adaptations in Muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 1967; 242, 2278-2282
55. <https://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/MutationsLHON>
56. Hwang TJ, Karanjia R, Moraes-Filho MN, et al. Natural history of conversion of Leber's hereditary optic neuropathy: a prospective case series. *Ophthalmology*. 2017; 124: 843–850.
57. Iommarini L, Maresca A, Caporali L, Valentino ML, Liguori R, Giordano C, Carelli V. Revisiting the issue of mitochondrial DNA content in optic mitochondriopathies. *Neurology*. 2012; 79(14):1517-9.

58. Jacobson DM, Stone EM. Difficulty differentiating Leber's from dominant optic neuropathy in a patient with remote visual loss. *Journal of Clinical Neuro-Ophthalmology*. 1991(11) :152–157
59. Javadov S, Jang S, Chapa-Dubocq XR, Khuchua Z, Camara AK. Mitochondrial respiratory supercomplexes in mammalian cells: structural versus functional role. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)*. 2021;99(1):57-73.
60. Jia Y, Simonett JM, Wang J. Wide-Field OCT Angiography Investigation of the Relationship Between Radial Peripapillary Capillary Plexus Density and Nerve Fiber Layer Thickness. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2017; 58(12):5188–5194.
61. Jia Y, Bailey ST, Wilson DJ, Tan O, Klein ML, Flaxel CJ, Potsaid B, Liu JJ, Lu CD, Kraus MF, Fujimoto JG, Huang D. Quantitative optical coherence tomography angiography of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2014 Jul;121(7):1435-44.
62. Johnston PB, Gaster RN, Smith VC, Tripathi RC. A clinicopathological study of autosomal dominant optic atrophy. *American Journal of Ophthalmology*. 1979; 88. – 868–875
63. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochemistry*. 2010; 47:69-84
64. Kamen B, Smith AK. A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. // *Advanced drug delivery reviews*. 2004; 56 (8):1085-1097.
65. Karanjia R, Berezovsky A, Sacai P.Y., Cavascan N.N, Liu H.Y., Nazarali S., Moraes-Filho M.N., Anderson K., Tran J.S., Watanabe S.E., Moraes M.N., Sadun F., DeNegri A.M., Barboni P., Ferreira Ramos C.V., La Morgia C., Carelli V., Belfort R., Coupland S.G., Rios Salomao S., Sadun A.A. The Photopic Negative Response: An Objective Measure of Retinal Ganglion Cell Function in Patients With Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*. 2017;58(6)

66. Kaynezhad P, Tachtsidis I, Sivaprasad S, Jeffery G. Watching the human retina breath in real time and the slowing of mitochondrial respiration with age. *Scientific Reports*. 2023 Apr 20;13(1):6445.
67. Kim HD, Park JY, Ohn YH. Clinical applications of photopic negative response (PhNR) for the treatment of glaucoma and diabetic retinopathy. *Korean Journal of Ophthalmology*. 2010; 24: 89–95.
68. Kjer P. Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance: a clinical and genetic study of 19 Danish families. *Acta Ophthalmologica Supplementum*. 1959; 164:1-147.
69. Kline LB, Glaser JS. Dominant optic atrophy. The clinical profile. *Archives of Ophthalmology*. 1979; 97:1680-1686
70. Knez J, Winckelmans E, Plusquin M, Thijs L, Cauwenberghs N, Gu Y. Correlates of Peripheral Blood Mitochondrial DNA Content in a General Population. *American Journal of Epidemiology*. 2016; 183(2):138–146
71. Koul P. Ocular toxicity with ethambutol therapy: Timely recaution. *Lung India*. 2015; 32(1): 1–3.
72. Kräutler B. Biochemistry of B12-cofactors in human metabolism. *Subcellular Biochemistry*. 2012;56:323-46.
73. Lachmund U, Mojon DS, Leber's hereditary optic neuropathy in malnutrition: a case report. *Klinische Monatsblätter Augenheilkunde*. 2006;223(5):393-6.
74. Laker RC, Xu P, Ryall KA, Sujkowski AA. Novel MitoTimer reporter gene for mitochondrial content, structure, stress, and damage in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 2014; 25;289(17):12005-15.
75. Lan X, Field MS, Stover PJ. Cell cycle regulation of folate-mediated one-carbon metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: System Biology and Medicine*. 2018;10(6):e1426
76. Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT, McKenzie M. Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1793:78–88.

77. Lazarou M, Neal S, Ohtake F, Cuervo AM, Hegde RS, Jakob U, Gilbert WV, Chen ZJ, Tooze SA, Haber JE, Walters KJ, Hartl FU. Quality Control: Maintaining molecular order and preventing cellular chaos. *Mol Cell*. 2022 Apr 21;82(8):1390-1397.
78. Leruez S, Amati-Bonneau P, Verny B, Reynier P, Procaccio V, Bonneau D, Milea D. Dysfonctionnement mitochondrial et atteinte des voies visuelles. *Revue Neurologique*. 2014; 170(5): 344-354
79. Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular genetics and metabolism*. 2000; 71. (1-2); 121-138.
80. Lukyanova LD, Kirova YI. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Frontiers in Neuroscience*. 2015; 1;9:320.
81. Ma YY, Li XY, Li ZQ, Song JQ, Hou J, Li JH, Sun L, Jiang J, Yang YL. Clinical, biochemical, and genetic analysis of the mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(32):e11606.
82. Machida S, Gotoh Y, Tanaka M, Tazawa Y. Predominant loss of the photopic negative response in central retinal artery occlusion. *American Journal of Ophthalmology*. 2004; 137: 938–940.
83. Machida S. Clinical Applications of the Photopic Negative Response to Optic Nerve and Retinal Diseases. *Journal of ophthalmology*. 2012.; 24: 89–95
84. Mackey DA, Fingert JH, Luzhansky JZ, McCluskey PJ, Howell N, Hall AJ, Pierce AB, Hoy JF. Leber's hereditary optic neuropathy triggered by antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus. *Eye*. 2003 Apr;17(3):312-7.
85. Majander A, Robson AG, João C, Holder GE, Chinnery PF, Moore AT, Votruba M, Stockman A, Yu-Wai-Man P. The pattern of retinal ganglion cell dysfunction in Leber hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion*. 2017;36:138-149
86. Malik A, Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*. 2013; 481–492
87. Mason CG. Ocular accumulation and toxicity of certain systemically administered drugs. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1997; 2(5):977-95.

88. McNulty H, Pentieva K. Folate bioavailability. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2007; (63):04:529-536.
89. Melamud A, Kosmorsky G, Lee M. Ocular Ethambutol Toxicity. *Mayo Clinic Proceedings*. 2003; 78(11): 1409–1411
90. Melanie R, Lalonde, Kantungane AL, Sadun AA, Coupland SG, Karanjia R; Photopic Negative Response in Carriers and Affected Patients with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*. 2019;60(9):4242.
91. Metodiev MD, Gerber S, Hubert L, Delahodde A, Chretien D, Gérard X, Amati-Bonneau P, Giacomotto MC, Boddaert N, Kaminska A, Desguerre I, Amiel J, Rio M, Kaplan J, Munnich A, Rötig A, Rozet JM, Besmond C. Mutations in the tricarboxylic acid cycle enzyme, aconitase 2, cause either isolated or syndromic optic neuropathy with encephalopathy and cerebellar atrophy. *Journal of Medical Genetics*. 2014;51(12):834-8.
92. Meyerson C, Van Stavern G, McClelland C. Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. *Clinical Ophthalmology*. 2015; 9, 1165–1176
93. Milea D, Cassoux N, LeHoang P. Blindness in a strict vegan. *New England Journal of Medicine*. 2000; 23;342(12):897-8.
94. Milea D, Mati-Bonneau P, Reynier P, Bonneau D. Genetically determined optic neuropathies. *Current Opinion in Neurology*. 2010; 23 :24-28.
95. Miller NR, Newman NJ. *Walsh & Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA: 2005.
96. Miyata K, Nakamura M, Kondo M, et al. Reduction of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with autosomal dominant optic atrophy with OPA1 mutations. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*. 2007;48(2):820-824.
97. Molloy AM. Genetic aspects of folate metabolism. *Subcellular Biochemistry*. 2012;56:105-30. doi: 10.1007/978-94-007-2199-97

98. Montero R, Yubero D, Villarroya J, Henares D, Jou C, Rodríguez MA. GDF-15 Is Elevated in Children with Mitochondrial Diseases and Is Induced by Mitochondrial Dysfunction. *PLoS ONE*. 2016; 11(2): e0148709.
99. Monzel AS, Enríquez JA, Picard M. Multifaceted mitochondria: moving mitochondrial science beyond function and dysfunction. *Nature Metabolism*. 2023;5(4):546-562.
100. Moore E, Mander A, Ames D, Carne R, Sanders K, Watters D. Cognitive impairment and vitamin B12: a review. *International Psychogeriatrics*. 2012;24(4):541-56
101. Moreira ES, Brasch NE, Yun J. Vitamin B12 protects against superoxide-induced cell injury in human aortic endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51:876–883.
102. Napolitano G, Fasciolo G, Venditti P. Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species. *Antioxidants (Basel)*. 2021;17;10(11):1824.
103. Narahashi T. Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiological Reviews*, 1974; 54; (4): 813–889.
104. Newman NJ. Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. *American Journal of Ophthalmology*. 2005; 140(3):517-23.
105. Ng YS, Bindoff LA, Gorman GS, Klopstock T, Kornblum C, Mancuso M, McFarland R, Sue CM, Suomalainen A, Taylor RW, Thorburn DR, Turnbull DM. Mitochondrial disease in adults: recent advances and future promise. *Lancet Neurology*. 2021 Jul;20(7):573-584.
106. Nishioka T, Soemantri A, Ishida T. mtDNA/nDNA ratio in 14484 LHON mitochondrial mutation carriers. *Journal of Human Genetic*. 2004;49(12):701-705.
107. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*. 2012; 148(6):1145–1159.
108. Okamoto N, Miya F, Hatsukawa Y, Suzuki Y, Kawato K, Yamamoto Y, Tsunoda T, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K. Siblings with optic neuropathy and RTN4IP1 mutation. *Journal of human genetics*. 2017.(62): 927–929

109. Oliveira C. Toxic-Metabolic and Hereditary Optic Neuropathies. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2019 ;25(5):1265-1288.
110. Parrott J, Frank L, Rabena R, Craggs-Dino L, Isom KA, Greiman L American Society for Metabolic and Bariatric Surgery Integrated Health Nutritional Guidelines for the Surgical Weight Loss Patient 2016 Update: Micronutrients. *Surgery for Obesity and Related Diseases*. 2017; 13(5):727-741.
111. Pawlak R, Lester SE, Babatunde T. The prevalence of cobalamin deficiency among vegetarians assessed by serum vitamin B12: a review of literature. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2014;68(5):541-8.
112. Picca A, Calvani R, Coelho-Junior HJ, Marzetti E. Cell Death and Inflammation: The Role of Mitochondria in Health and Disease. *Cells*. 2021; 3;10(3):537.
113. Pisano A, Preziuso C, Iommarini L, Perli E, Grazioli P, Sadun A. Targeting estrogen receptor β as preventive therapeutic strategy for Leber's hereditary optic neuropathy. *Human Molecular Genetics*. 2015; Vol. 24 (24): 6921–6931
114. Popov LD. Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020;24(9):4892-4899.
115. Pott JW, Wong KH. Leber's hereditary optic neuropathy and vitamin B12 deficiency. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2006;244(10):1357-9.
116. Preiser D, Lagrèze WA, Bach M, Poloschek CM. Photopic Negative Response versus Pattern Electroretinogram in Early Glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*. 2013;54(2):1182-1191.
117. Prida E, Álvarez-Delgado S, Pérez-Lois R, Soto-Tielas M, Estany-Gestal A, Fernø J, Seoane LM, Quiñones M, Al-Massadi O. Liver Brain Interactions: Focus on FGF21 a Systematic Review. *International Journal of Molecular Science*. 2022(1);23(21):13318.
118. Priglinger C, Klopstock T, Rudolph G, Priglinger SG. Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie [Leber's Hereditary Optic Neuropathy]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2019;236(11):1271-1282.

119. Pujari A, Bhaskaran K, Sharma P, Singh P, Phuljhele S, Saxena R, Azad SV. Optical coherence tomography angiography in neuro-ophthalmology: Current clinical role and future perspectives. *Survey of Ophthalmology*. 2020; 3:S0039-6257(20)30147-8.
120. Riordan-Eva P, Harding A. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations *Journal of Medical Genetics*. 1995; 32: (81 – 87)
121. Rizzo G, Laganà AS, Rapisarda AM, La Ferrera GM, Buscema M, Rossetti P, Nigro A, Muscia V, Valenti G, Sapia F, Sarpietro G, Zigarelli M, Vitale SG. Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation. *Nutrients*. 2016; 29;8(12):767.
122. Rizzo JF 3rd. Adenosine triphosphate deficiency: a genre of optic neuropathy. *Neurology*. 1995 ;45(1):11-6.
123. Rossmann M, Dubois S, Agarwal S, Zon L. Mitochondrial function in development and disease. *Disease Models and Mechanism*. 2021(1);14(6)
124. Rudolph G, Dimitriadis K, Büchner B. Effects of idebenone on color vision in patients with leber hereditary optic neuropathy. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 2013;33(1):30-36.
125. Ryan MT, Hoogenraad NJ. Mitochondrial-nuclear communications. *Annual Review on Biochemistry*. 2007; 76: 701-22.
126. S. Viswanathan LJ, Frishman JG, Robson RS, Harwerth EL, Smith I. The photopic negative response of the macaque electroretinogram: reduction by experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1999; (40), 6:1124–1136, 1999
127. Sadun AA. Metabolic optic neuropathies. *Seminars in Ophthalmology*. 2002; 17(1):29-32.
128. Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica*. 2014;44(5):480-8.

129. Seo JH, Hwang JM, Park SS. Antituberculosis medication as a possible epigenetic factor of Leber's hereditary optic neuropathy. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2013; 38(4): 363–366.
130. Shipton MJ, Thachil J. Vitamin B12 deficiency - A 21st century perspective . *Clinical Medecine Journal*. 2015;15(2):145-50.
131. Sijilmassi O. Folic acid deficiency and vision: a review. *Graefes Archives of Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2019; 257(8):1573-1580.
132. Stenton SL, Sheremet NL, Catarino CB, Andreeva NA, Assouline Z, Barboni P, Barel O, Berutti R, Bychkov I, Caporali L, Capristo M, Carbonelli M, Cascavilla ML, Charbel Issa P, Freisinger P, Gerber S, Ghezzi D, Graf E, Heidler J, Hempel M, Heon E, Itkis YS, Javasky E, Kaplan J, Kopajtich R, Kornblum C, Kovacs-Nagy R, Krylova TD, Kunz WS, La Morgia C, Lamperti C, Ludwig C, Malacarne PF, Maresca A, Mayr JA, Meisterknecht J, NevinitSYna TA, Palombo F, Pode-Shakked B, Shmelkova MS, Strom TM, Tagliavini F, Tzadok M, van der Ven AT, Vignal-Clermont C, Wagner M, Zakharova EY, Zhorzholadze NV, Rozet JM, Carelli V, Tsygankova PG, Klopstock T, Wittig I, Prokisch H. Impaired complex I repair causes recessive Leber's hereditary optic neuropathy. *Journal of Clinical Investigations*. 2021 15;131(6):e138267.
133. Suarez-Moreira E, Yun J, Birch CS, Williams JH, McCaddon A, Brasch NE. Vitamin B(12) and redox homeostasis: cob(II)alamin reacts with superoxide at rates approaching superoxide dismutase (SOD). *Journal of American Chemistry Society*. 2009;131(42):15078-9.
134. Suomalainen A. Fibroblast growth factor 21: a novel biomarker for human muscle-manifesting mitochondrial disorders. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*.2013; 7(4).
135. Tamada K, Machida S, Yokoyama D, Kurosaka D. Photopic negative response of full-field and focal macular electroretinograms in patients with optic nerve atrophy. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2009; 53: 608–614
136. Tan AK, Mallika PS, Aziz S, Asok T, Intan G. Ethambutol Ocular Toxicity in a patient with ocular tuberculosis. *Malaysian Family Physician*. 2008; 3(2):87-90

137. Teng D. Structural impairment patterns in peripapillary retinal fiber layer and retinal ganglion cell layer in mitochondrial optic neuropathies. *International Journal of Ophthalmology*. 2018; 11,10 1643-1648.
138. Thomas PK, Workman JM, Thage O. Behr's syndrome. A family exhibiting pseudodominant inheritance. *Journal of Neurological Sciences*. 1984; (64): 137-148.
139. Tokuyama T, Hirai A, Shiiba I, et al. Mitochondrial Dynamics Regulation in Skin Fibroblasts from Mitochondrial Disease Patients. *Journal of Biomolecules*. 2020;10(3):0.
140. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*. 2003;552:335–344.
141. Usui Y, Westenskow PD, Kurihara T, et al. Neurovascular crosstalk between interneurons and capillaries is required for vision. *Journal of Clinical Investigation*. 2015; 125(6):2335-2346.
142. Viswanathan S, Marmoy OR. Clinical electrophysiology of the optic nerve and retinal ganglion cells. *Eye (London)*. 2021;35(9):2386-2405.
143. Votruba M, Moore AT, Bhattacharya SS. Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. *Journal of Medical Genetics*. 1998; 35:793-800.
144. Weng Q, Wang J, Wang J, Tan B, Wang J, Wang H, Zheng T, Lu QR, Yang B, He Q. Folate metabolism regulates oligodendrocyte survival and differentiation by modulating AMPK α activity. *Scientific Reports*. 2017;7
145. White AJ. Mitochondrial toxicity and HIV therapy. *Sexually transmitted infections*. 2001; 77:158–173.
146. Williams JA, Zhao K, Jin S, Ding W-X. New methods for monitoring mitochondrial biogenesis and mitophagy in vitro and in vivo. *Experimental Biology and Medicine*. 2017; 242(8):781-787
147. Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam K. Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clinical Endocrinology*. 2013; 78, 489–496.

148. Xiao H, Liu X, Lian P, Liao LL, Zhong Y M. (2020). Different damage patterns of retinal nerve fiber layer and ganglion cell-inner plexiform layer between early glaucoma and non-glaucomatous optic neuropathy. *International Journal of Ophthalmology*, 13(6), 893–901.
149. Yamashita T, Kato K, Kondo M, Miki A, Araki S, Goto K, Ieki Y, Kiryu J. Photopic negative response recorded with RETeval system in eyes with optic nerve disorders. *Science Reports*. 2022;12(1):9091.
150. Yen MY, Chen CS, Wang AG, Wei YH. Increase of mitochondrial DNA in blood cells of patients with Leber's hereditary optic neuropathy with 11778 mutation. *British Journal of Ophthalmology*. 2002;86(9):1027-30.
151. Yu PK, Cringle SJ, Yu DY. Correlation between the radial peripapillary capillaries and the retinal nerve fibre layer in the normal human retina. *Experimental Eye Research* . 2014; 129 (2014): 83-92.
152. Yu-Wai-Man P, Griffiths P, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies – Disease mechanisms and therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2011; 30(2-2): 81–114.
153. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Dominant optic atrophy: novel OPA1 mutations and revised prevalence estimates. *Ophthalmology*. 2013; 120:1712.
154. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Gene Review*. 2016; 39(3):162-9
155. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *The American Journal of Human Genetic*. 2003; 72: 333–339.
156. Zhang XH, Xie Y, Xu QG, Cao K, Xu K, Jin ZB, Li Y, Wei SH. Mitochondrial Mutations in Ethambutol-Induced Optic Neuropathy. *Frontiers in Cell Developmental Biology*. 2021;(5);9:754676.
157. Zhao L, Mao Z, Brinton RD. A select combination of clinically relevant phytoestrogens enhances estrogen receptor beta-binding selectivity and neuroprotective activities in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2009; 150(2):770

158. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annual Review of Nutrition*. 2011; (31):177-201.