

На правах рукописи

Ханакова Наталья Алексеевна

**КЛИНИЧЕСКИЙ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ И
ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ОПТИЧЕСКИХ
НЕЙРОПАТИЙ**

14.01.07 — глазные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2014

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней» Российской академии медицинских наук.

Научные руководители:

Кандидат медицинских наук

Шерemet Наталия Леонидовна

Доктор биологических наук, профессор Поляков Александр Владимирович

Официальные оппоненты:

Серова Наталья Константиновна, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Российской академии медицинских наук, руководитель группы офтальмологических исследований

Мосин Илья Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения РФ, профессор кафедры офтальмологии.

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

Защита диссертации состоится «17» ноября 2014 г. В 14-00 на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней» Российской академии медицинских наук, по адресу: 119021, г. Москва, ул. Россолимо, д.11, кор. А,Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.niigb.ru Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней» Российской академии медицинских наук.

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Иванов М.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Наследственные оптические нейропатии (ОН) – группа генетически гетерогенных митохондриальных заболеваний, характеризующихся нарушением энергетических функций в клетках из-за повреждения электронтранспортной цепи митохондрий и снижения уровня окислительного фосфорилирования (Benard G. et al., 2006; Maresca A. et al., 2012; Korsten A. et al., 2010; Мосин И.М. 2001). Вследствие этого уменьшается продукция АТФ – основного источника клеточной энергии, что приводит к гибели ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) и их аксонов, развитию частичной атрофии зрительного нерва (АЗН). Нарушения энергетических процессов в митохондриях могут быть детерминированы мутациями как в митохондриальном, так и ядерном геноме (Carroll J. et al., 2006; Besch D. et al., 1999).

Наследственные ОН встречаются с частотой 1 на 10000 населения и являются причиной слепоты и слабовидения преимущественно у людей молодого и среднего возраста (Man P.Y. et al., 2003; Schaefer A.M et al., 2008; Yu-Wai-Man P. et al., 2009). Среди всех наследственных ОН наиболее часто встречаются аутосомно-доминантная оптическая нейропатия (АДОН), возникающая в результате мутаций в ядерной ДНК (ядДНК), и наследственная оптическая нейропатия Лебера (НОНЛ), связанная с мутациями в митохондриальной ДНК (мтДНК).

Клинические особенности, а также неполная пенетрантность и переменная экспрессивность наследственных ОН часто приводят к сложностям в распознавании этих заболеваний. Комплексное применение новых современных технологий функциональной и структурной диагностики зрительного нерва и сетчатки может способствовать определению специфических изменений, характерных наследственной ОН (Barboni P. et al., 2010; Seo J.H. et al., 2010; Zhang Y. et al., 2014; Yu-Wai-Man P. et al., 2011).

Наследственная ОН является генетически гетерогенным заболеванием. В настоящее время признано 12 первичных мутаций мтДНК, связанных с

НОНЛ (Ruiz-Pesini E. et al., 2007; <http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/MutationsLHON>). Однако в настоящее время в практической медицине проводится диагностика трех мутаций мтДНК в нуклеотидных позициях 3460А, 11778А и 14484С, исследования спектра других патогенных мутаций в популяциях России носят единичный характер.

АДОН связывают с мутациями в яДНК, в настоящее время известно более 230 мутаций гена *OPA1* (Delettre C. et al., 2000; Thiselton D.L. et al., 2002; Van Bergen N.J. et al., 2011). Сегодня выявлены и генетически изучены многочисленные семьи с АДОН среди различных этнических групп в Европе, Северной Америке, Австралии и Азии. В популяциях России подобные исследования не проводились.

Наследственные ОН относятся к группе митохондриальных заболеваний. Именно поэтому изучение структуры и функций митохондрий на клеточном уровне при такой патологии является важной частью исследования, особенно в случаях с неverified генетическим дефектом.

Разработка быстрых и точных методов клинической, молекулярно-генетической и цитологической диагностики наследственных ОН даст возможность своевременного назначения специфической энерготропной терапии, показанной при данной группе заболеваний (Enns G.M. et al., 2012).

Целью настоящей работы является клинический, молекулярно-генетический и цитологический анализ бинокулярных оптических нейропатий для выявления наследственной природы заболеваний.

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

1. Сформировать выборку пациентов с двусторонней патологией зрительного нерва, клиническая картина которой соответствует наследственным ОН.
2. Провести молекулярно-генетический анализ ДНК пациентов с клиническим диагнозом НОНЛ и АДОН для выявления первичных

мутаций митохондриальной ДНК и наиболее часто встречающихся мутаций ядерной ДНК.

3. Изучить клинические особенности и морфофункциональные характеристики генетически верифицированных наследственных ОН на основании использования современных высокотехнологичных методов диагностики.
4. Изучить мембранный потенциал митохондрий в фибробластах кожи пациентов с генетически верифицированными и неверифицированными наследственными ОН, а также здоровых людей.
5. Создать алгоритм диагностики наследственных ОН.

Научная новизна

1. Впервые для больных с наследственной ОН, проживающих на территории РФ, проведено молекулярно-генетическое исследование наиболее часто встречающихся мутаций ядерной ДНК, а также первичных мутаций митохондриальной ДНК. В результате работы впервые выявлена мутация яДНК, ответственная за развитие АДОН, ранее не описанная в литературе (патент РФ на изобретение №2491350).
2. Впервые с помощью спектрального ретинотомографа определены информативные морфометрические изменения макулярной зоны и перипапиллярного СНВС, характерные для НОНЛ (патент РФ на изобретение №2513596).
3. Впервые в России создана коллекция линии фибробластов пациентов с НОНЛ и АДОН. Это позволит в течение длительного времени исследовать патогенетические механизмы митохондриальных заболеваний зрительного нерва и изучать новые терапевтические подходы.
4. Впервые предложена методика дифференциальной диагностики митохондриальных заболеваний зрительного нерва путем изучения

мембранного потенциала митохондрий в фибробластах кожи пациентов.

Практическая значимость

1. Определены особенности течения, клинической картины наследственных ОН, которые могут помочь практикующим врачам заподозрить заболевания, сократить сроки обследования, повысить точность и уровень диагностики.
2. Структурные изменения, выявленные с помощью ОКТ - истончение внутренних слоев сетчатки в макулярной зоне в сочетании с увеличением толщины перипапиллярного СНВС в острой стадии НОНЛ, а также последовательное развитие выраженных атрофических изменений в центральной зоне сетчатки и лишь отсрочено в перипапиллярной зоне, дают возможность заподозрить наследственную этиологию ОН среди ОН иной этиологии еще до проведения генетического исследования, а также обосновать клинический диагноз НОНЛ в случаях заболеваний с редкими, не исследуемыми мутациями мтДНК.
3. Проведенное молекулярно-генетическое исследование выявило новую мутацию яДНК с.2850delT (p.950Gly>Glu), которая позволяет генетически верифицировать АДОН.
4. Предложенная методика изучения мембранного потенциала митохондрий в фибробластах кожи пациентов может быть использована для дифференциальной диагностики митохондриальных заболеваний зрительного нерва.
5. Разработан алгоритм современной диагностики наследственных ОН, включающий морфофункциональные методы оценки состояния внутренних слоев сетчатки и зрительного нерва, молекулярно-генетическое и цитологическое исследование.

Реализация результатов работы

Полученные результаты исследования внедрены и применяются в работе ФГБУ «НИИ глазных болезней» РАМН, в работе ФГБУ «МГНЦ» РАМН.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Клиническая картина наследственных ОН, несмотря на специфичность проявлений, характеризуется особенностями течения, возрастом манифестации заболевания, низкими показателями отягощенности наследственного анамнеза по АЗН.
2. В клиническом течении возможно частичное восстановление остроты зрения, которое во всех случаях сочеталось с периметрическими, электрофизиологическими, структурными изменениями внутренних слоев сетчатки и зрительного нерва, менее выраженными, чем у пациентов со стабильно низкой остротой зрения.
3. Большое разнообразие мутаций в митохондриальном и ядерном геноме, затрудняет поиск патологических изменений у пациентов с наследственной ОН.
4. Выявлена новая мутация яДНК, ответственная за развитие АДОН, которая позволяет определить этиологию заболевания.
5. Алгоритм развития изменений ОКТ при НОНЛ, является специфичным для данного заболевания и позволяет дифференцировать НОНЛ с ОН другой этиологии.
6. Методика изучения мембранного потенциала митохондрий в фибробластах кожи пациентов, позволяет дифференцировать митохондриальные ОН и при выявлении митохондриальной патологии у пациентов с неverified генетическим дефектом рекомендовать расширенный поиск мутаций яДНК и мтДНК.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в подготовке и проведении всех исследований, апробации результатов, подготовке

публикаций и докладов по теме работы. Вся обработка и интерпретация полученных результатов выполнена лично автором.

Апробация результатов исследования

Основные положения работы доложены на: III Российской конференции с международным участием «Проблемы нарушения клеточной энергетики (Митохондриальная патология)» (Москва, 2012); XVIII Международном офтальмологическом конгрессе "Белые ночи" (Санкт-Петербург, 2012); XIII Научно-практической нейроофтальмологической конференции «Актуальные вопросы нейроофтальмологии» (Москва, 2012); XIV Научно-практической нейроофтальмологической конференции «Актуальные вопросы нейроофтальмологии» (Москва, 2013); научно-практической конференции «Федоровские чтения - 2013» (Москва, 2013); VIII Всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии» (Москва, 2013); XV Научно-практической нейроофтальмологической конференции «Актуальные вопросы нейроофтальмологии» (Москва, 2014); заседании проблемной комиссии ФГБУ «НИИ ГБ» РАМН от 16 июня 2014г.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ, из них 3 в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, определенных Высшей аттестационной комиссией. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 161 источник, из них 13 отечественных и 148 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 33 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Клиническое исследование основано на анализе данных обследования 97 пациентов (194 глаза, 72 мужчины, 25 женщин) с бинокулярной оптической нейропатией. Критерии для включения больных в исследование с подозрением на наследственную ОН были следующие:

1. Двустороннее, симметричное, одновременное или последовательное безболезненное снижение остроты зрения, острое или хроническое;
2. двусторонняя центральная или центрорезекальная 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.

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

Отсутствие наследственного анамнеза по частичной АЗН не исключало отбор пациентов для исследования.

В контрольные группы были набраны здоровые добровольцы для проведения электрофизиологических исследований (ЭФИ), определения критической частоты слияния мельканий (КЧСМ) (10 человек, 20 глаз), зрительно вызванных потенциалов (ЗВП) (17 человек, 34 глаза), ОКТ (17 человек, 33 глаза), а также для биопсии кожи и проведения цитологических исследований (6 человек). Группы пациентов и группы контроля были однородны по возрасту (критерий Колмогорова-Смирнова, $p > 0,1$).

Материалом для клеточного исследования служили фибробласты кожи 23 пациентов, в том числе 13 пациентов с НОНЛ, 2 пациента с АДОН, 8 пациентов без выявленных мутаций.

В ходе проведения работы использовали традиционные офтальмологические методы обследования: визометрию с максимальной коррекцией аметропии, рефрактометрию, биомикроскопию, тонометрию обратную офтальмоскопию; дополнительные методы обследования: исследование цветового зрения, компьютерную периметрию на периметре Octopus 900 (Interzeag AG, Switzerland), ОКТ сетчатки и зрительного нерва с помощью спектрального ретинотомографа RTVue-100 (США) (преимуществом данного томографа является наличие уникального протокола анализа комплекса ГКС, который успешно используется в ранней диагностике нейродегенеративных заболеваний), электрофизиологические методы обследования - порог электрической чувствительности сетчатки (ПЭЧ), лабильность зрительного анализатора (ЛЗА) и КЧСМ на электроофтальмометре «Lametesk» (Россия), ЗВП на универсальной электрофизиологической установке «Tomey EP-1000, Multifocal» (Германия).

Для молекулярно-генетических исследований использовались образцы венозной крови 97 пациентов, собранной в пробирку с ЭДТА. Дизайн молекулярно-генетического исследования основывался на характере типа наследования частичной АЗН. Всем пациентам с доказанным аутосомно-доминантным типом наследования (по отцовской линии) проводили поиск мутаций в «горячих» участках (экзонах 8, 14, 15, 16, 18, 27, 28) гена *OPA1*. Пациентам с наследственным анамнезом по частичной АЗН, но без доказанной передачи по отцовской линии вначале проводили исследование на наличие трех наиболее часто встречающихся мутаций мтДНК m.14484 T>C m.3460 G>A m.11778G>A, затем при отрицательном результате проводили поиск более редких девяти мутаций мтДНК: m.3733G>A, m.4171C>A, m.10663T>C, m.14459G>A, m.14482C>G, m.14482C>A, m.14495A>G, m.14502T>C, m.14568C>T. При отсутствии исследуемых

мутаций осуществляли поиск мутаций в горячих участках гена *OPA1* яДНК. При отсутствии семейного анамнеза по частичной АЗН исследовали вышеперечисленные мутации мтДНК и участки яДНК. Для выявления мутаций использовали стандартные методы молекулярно-генетического исследования: ПЦР, сиквенс, MLPA, электрофорез.

Для цитологического исследования фибробласты кожи культивировали в среде DMEM (Dulbecco`s modified Eagle`s medium) и для микроскопии помещали их в специальную камеру. Для изучения мембранного потенциала митохондрий клетки окрашивали потенциалзависимым флюоресцентным красителем TMRE (этиловый эфир тетраметилродамина). Чтобы определить изменение потенциала внутренней мембраны митохондрий, к клеткам добавляли олигомицин – ингибитор V комплекса дыхательной цепи митохондрий, до конечной концентрации 10 мкМ. При помощи флюоресцентного микроскопа Axiovert 200 M (Zeiss, Германия) делали фотографии клеток, по которым с помощью программы ImageJ измеряли интенсивность флюоресценции митохондрий до и через 30 мин после добавления олигомицина.

Статистический анализ и оценка достоверности получаемых результатов проведены с помощью программы Statistica 6.0. Статистический анализ результатов проводили с использованием непараметрических статистик (критерий Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова, критерий Вилкоксона, дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, ранговая корреляция по Спирмену).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты генетических и клинических исследований

В результате молекулярно-генетического исследования мутации были выявлены у 38 пациентов (39%) из 97 обследуемых (6 женщин, 32 мужчин). Среди них у 36 пациентов (95%) найдены мутации мтДНК (5 женщин, 31 мужчина) и у 2 пациентов мутации яДНК (5%) (1 женщина, 1 мужчина).

Среди мутаций мтДНК m.11778G>A встречалась наиболее часто, была обнаружена у 21 пациента, что составило 58,3% от всех мутаций мтДНК, у 7 пациентов была выявлена мутация m.3460 G>A (19,4%), у 6 пациентов - m.14484 T>C (16,7%), у 2 пациентов - редко встречающаяся мутация m.4171C>A (5,6%). В 91,6% случаев мутации мтДНК обнаружены в гомоплазмическом состоянии, гетероплазмия выявлена у трех пациентов из трех семей (33%, 48%, 68% мутантной мтДНК в клетках крови).

Молекулярно-генетический анализ «горячих» участков гена *OPA1* позволил в 2-х случаях идентифицировать патогенные мутации: мутацию c.869G>A (Arg290Gln) в 8 экзоне, мутацию c.2850delT (p.950Gly>Glu) в 28 экзоне, которая была впервые обнаружена в нашей работе, ранее не была описана. (Табл. 1)

Таблица 1

Распределение пациентов с клинически установленным диагнозом наследственной оптической нейропатии в зависимости от выявленных мутаций.

Тип оптической нейропатии	Мутации	Кол-во пациентов	Пол (Ж/М)
Наследственная оптическая нейропатия Лебера	m.11778G>A	21	3/18
	m.14484T>C	6	2/4
	m.3460G>A	7	0/7
	m.4171C>A	2	0/2
	Итого	36	5/31
Аутосомно-доминантная оптическая нейропатия	c.869G>A	1	1/0
	c.2850delT	1	0/1
	Не обнаружены	59	19/40
Всего		97	25/72

Средний возраст пациентов с НОНЛ на момент обращения составил 33 года. Медиана возраста начала заболевания в этой группе составила 24 года, минимальные/максимальные значения этого показателя соответственно 4/57

лет. Соотношение мужчин и женщин среди пациентов с НОНЛ в нашем исследовании соответствует 6,2:1. При первичном осмотре и наблюдении пациентов до результатов генетического исследования НОНЛ, семейный анамнез по АЗН был установлен только в 19,4% случаев. Однако отсроченные данные наследственного анамнеза показывают значительно большее количество семейных форм заболевания (83,3% случаев) за счет получения новых сведений о родственниках самими пациентами, а также выявления новых случаев в семьях, с прежде неотягощенным семейным анамнезом.

АДОН была выявлена у женщины 32 лет и у мужчины 54 лет. В семейном анамнезе у каждого был выявлен один родственник с низкой остротой зрения: мать у женщины и отец у мужчины.

Клиническая картина НОНЛ у 34 пациентов (68 глаз) характеризовалась постепенным безболезненным снижением зрения на обоих глазах до 0,1 и ниже. У одного пациента снижение зрения было выявлено в 4-летнем возрасте до 0,5/0,33 на правом и левом глазу соответственно, без существенной динамики на протяжении 32 лет наблюдения. 24 пациента в начале заболевания отмечали последовательное снижение зрения, сначала на одном глазу, через несколько дней или недель на другом. 7 пациентов заметили одновременное снижение зрения на обоих глазах, 4 пациента не смогли четко определить последовательность или одновременность снижения зрения. У одного пациента, наблюдающегося в течение 15 месяцев, заболевание носило односторонний характер, второй глаз не был вовлечен в клинический процесс на текущий период наблюдения.

Динамическое наблюдение за пациентами с НОНЛ выявило частичное восстановление остроты зрения у 6 пациентов (17% случаев среди всех пациентов с НОНЛ). Начало восстановления зрения у пациентов было зафиксировано в диапазоне от 2 до 28 месяцев от начала заболевания, медиана составила 14 месяцев. Показатели визометрии остальных пациентов

с НОНЛ либо существенно не менялись, либо отмечалась тенденция к некоторому снижению остроты зрения (Рис.1).

Клиническая картина АДОН у 2 пациентов характеризовалась постепенным симметричным безболезненным снижением зрения на обоих глазах с дошкольного и раннего школьного возраста до 0,2 у пациентки и 0,08-0,06 у пациента на текущий период наблюдения.

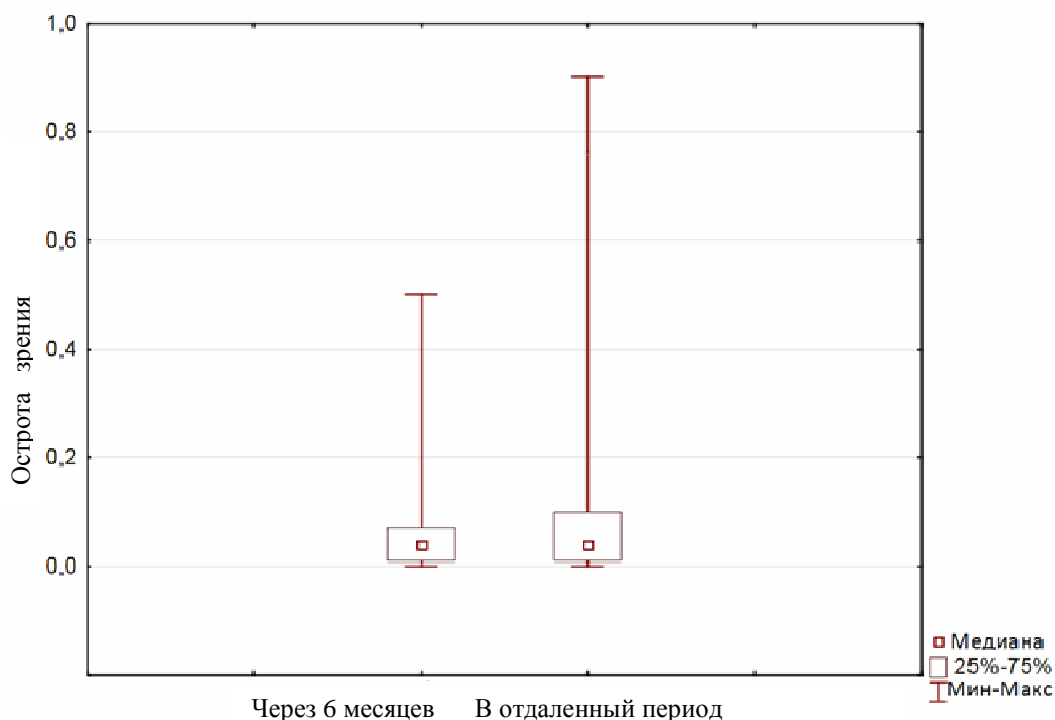


Рисунок 1. Острота зрения у пациентов с НОНЛ через 6 месяцев от начала заболевания и в отдаленный период наблюдения (1,5-5 лет от начала заболевания).

У всех пациентов с НОНЛ в острой и хронической стадиях заболевания и пациентов с АДОН выявляли нарушение цветового зрения в виде генерализованной дисхроматопсии.

Снижение остроты зрения у пациентов с НОНЛ и АДОН сопровождается развитием центральной или центроцекальной скотомы, которая в начале заболевания характеризуется ограниченной площадью и небольшой депрессией световой чувствительности MS. По мере развития заболевания скотома увеличивается в размерах, прогрессирует снижение световой чувствительности. Однако исследование динамики показателя MS

через 6 месяцев от начала заболевания и в отдаленном периоде не выявило статистически значимой разницы ($p > 0,05$, критерий Вилкоксона).

У пациентов с частично восстановленной остротой зрения повышение показателей остроты зрения сопровождалось снижением плотности и размеров центральной скотомы, однако, различия показателей периметрии MS, MD и sLV при остроте зрения 0,1 и в отдаленном периоде при остроте зрения 0,6-0,8 статистически не значимы ($p > 0,05$, критерий Вилкоксона)

Офтальмоскопическая картина в острой стадии у 88% пациентов с НОНЛ характеризовалась типичными изменениями: гиперемией ДЗН, извитостью ретинальных сосудов, перепапиллярными телеангиэктазиями, отеком перипапиллярного слоя нервных волокон, в хронической стадии формировалась частичная АЗН с диффузной бледностью ДЗН или бледностью ДЗН преимущественно в височной половине.

Офтальмоскопическая картина пациентов с АДОН соответствовала двусторонней частичной АЗН с преимущественным побледнением височной стороны ДЗН.

Спектральная ОКТ, выполненная у пациентов с НОНЛ в динамике, продемонстрировала определенный алгоритм структурных изменений. В раннем остром периоде заболевания (1-2 мес) возникает истончение внутренних слоев сетчатки, что соответствует уменьшению толщины КГК, который объединяет СНВС, ГКС и внутренний плексиформный слой. Наиболее ранние изменения выявлены в носовом и нижнем секторах парафовеа, в которых толщина КГК по сравнению с группой контроля снижена на 15,1 и 11,3% соответственно. В этот период заболевания возникает увеличение объема фокальной потери (FLV) до 3,7%. Истончение КГК прогрессирует к 3-4 месяцу, распространяясь на все сектора парафовеа, а также назальный и нижний сектора перифовеа. С 7 месяца заболевания НОНЛ характеризуется выраженными атрофическими изменениями КГК во всех секторах макулярной зоны, что отражает значительное снижение объема фокальной и глобальной потерь – на 10,9 и 34,9% соответственно, средней

толщины КГК на 37,4% по сравнению с контрольной группой. Толщина сетчатки в фовеа согласно нормативной базе данных прибора находится в пределах нормы.

Толщина перипапиллярного СНВС в первые два месяца развития НОНЛ по сравнению с контрольной группой увеличена на 23,4%, 15,5%, 5,6% соответственно в височном, нижнем, верхнем секторах. В дальнейший период происходит постепенное уменьшение этих величин, более значимое в височном секторе, на 16,1% и 26,6% соответственно на 3-4 и 5-6 месяцах наблюдения по сравнению с контрольной группой. В поздний период заболевания (более 7 мес) отмечено выраженное истончение перипапиллярного СНВС на 49,7%, 35,6%, 28,3%, 35,4% соответственно в височном, верхнем, назальном и нижнем секторах.

Сравнение структурных изменений при различных мутациях выявило менее выраженные потери у пациентов с мутацией m.14484T>C по показателям средней толщины КГК, объема глобальных потерь, а также толщины СНВС в носовом секторе ($p < 0,05$).

Частичное восстановление остроты зрения у 5 исследованных пациентов происходило на фоне выраженных структурных изменений. Однако уменьшение объема внутренних слоев сетчатки, истончение перипапиллярного СНВС по показателю средней толщины, а также отдельно по всем квадрантам было менее выражено у пациентов с восстановленной остротой зрения по сравнению с пациентами с низкими показателями визометрии ($p < 0,05$).

Анализ показателей ПЭЧ, ЛЗН, КЧСМ, а также латентности и амплитуды пика P100 ЗВП как наиболее устойчивого и регулярно регистрируемого выявил статистически достоверное различие между показателями у пациентов с НОНЛ в сравнении с группой контроля ($p < 0,01$, критерий Манна-Уитни). У пациентов с частично восстановленной остротой зрения выявленные отклонения были менее выраженными, чем в группе пациентов с низкой неизменной остротой зрения.

Молекулярно-генетическое исследование на наличие 12 мутаций мтДНК, а также мутаций в 7 экзонах гена *OPA1*, не выявило мутации у 59 пациентов (61%) из 97 обследуемых (18 женщин, 41 мужчин). Из них клиническую картину, соответствующую НОНЛ, наблюдали у 37 обследованных пациентов (63%) с генетически неverified болезнью, у 5 пациентов был выявлен наследственный анамнез по АЗН по материнской линии.

Классическая клиническая картина, типичная для АДОН, была отмечена у 22 обследованных пациентов с генетически неverified болезнью (37% случаев), из них у 9 пациентов с их слов имелись родственники с АЗН.

Результаты цитологических исследований

Предложенная методика дифференциальной диагностики наследственных ОН путем изучения мембранного потенциала митохондрий в культуре фибробластов кожи пациентов выявила, что олигомицин, ингибитор АТФ-синтазы, в линии клеток здоровых людей вызывает увеличение интенсивности флюоресценции митохондрий в среднем на 33,3%, что свидетельствует о повышении потенциала митохондрий (Рис.2). В то же время у 13 пациентов с НОНЛ отмечалось снижение интенсивности флюоресценции митохондрий на 6,3% обусловленных влиянием олигомицина. У 1 пациента с АДОН выявлено снижение интенсивности флюоресценции митохондрий под действием олигомицина на 13,4%, у 2 пациента небольшое увеличение на 4,7%.

У всех 8 исследованных пациентов с клиническим диагнозом наследственная ОН и неverified болезнью генетическим дефектом было выявлено снижение интенсивности флюоресценции митохондрий фибробластов кожи на 13,4%.

При анализе полученных данных выявлено статистически достоверное различие изменения показателей интенсивности флюоресценции

митохондрий после добавления олигомицина у пациентов с НОНЛ, а также пациентов с наследственной ОН без генетической верификации в сравнении с группой контроля ($p < 0,005$).

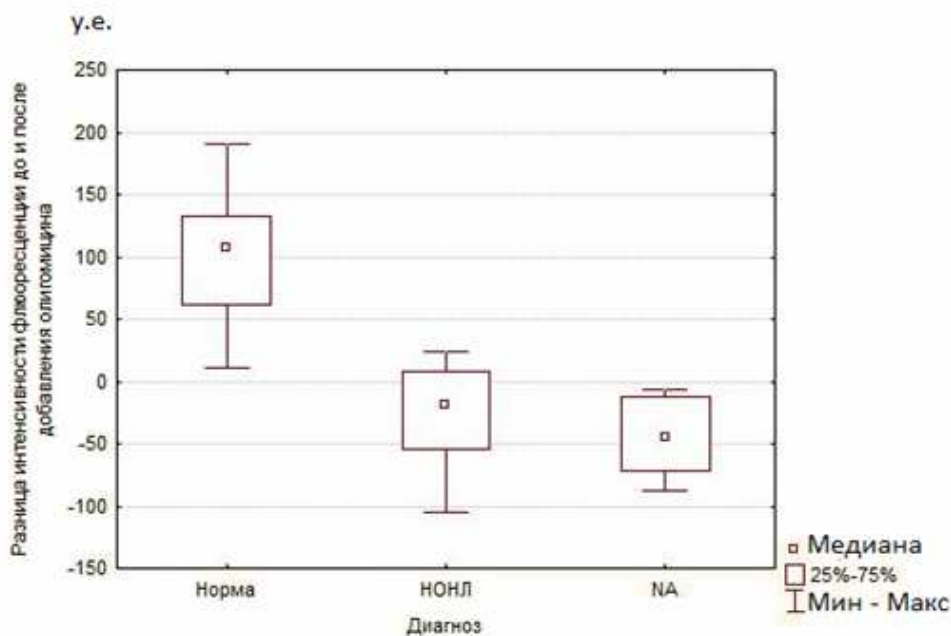


Рисунок 2. Изменение интенсивности флуоресценции митохондрий в культуре фибробластов группы контроля, пациентов с НОНЛ, пациентов с наследственной ОН без генетической верификации (NA) после добавления олигомицина.

Алгоритм диагностики наследственных оптических нейропатий

На основании результатов клинического, молекулярно-генетического и цитологического анализа наследственных ОН был составлен алгоритм, который позволяет поставить правильный клинический диагноз, определить направление поиска генетического дефекта, вызвавшего заболевание, выявить наличие митохондриальной патологии в случае редких неустановленных мутаций (Рис. 3).

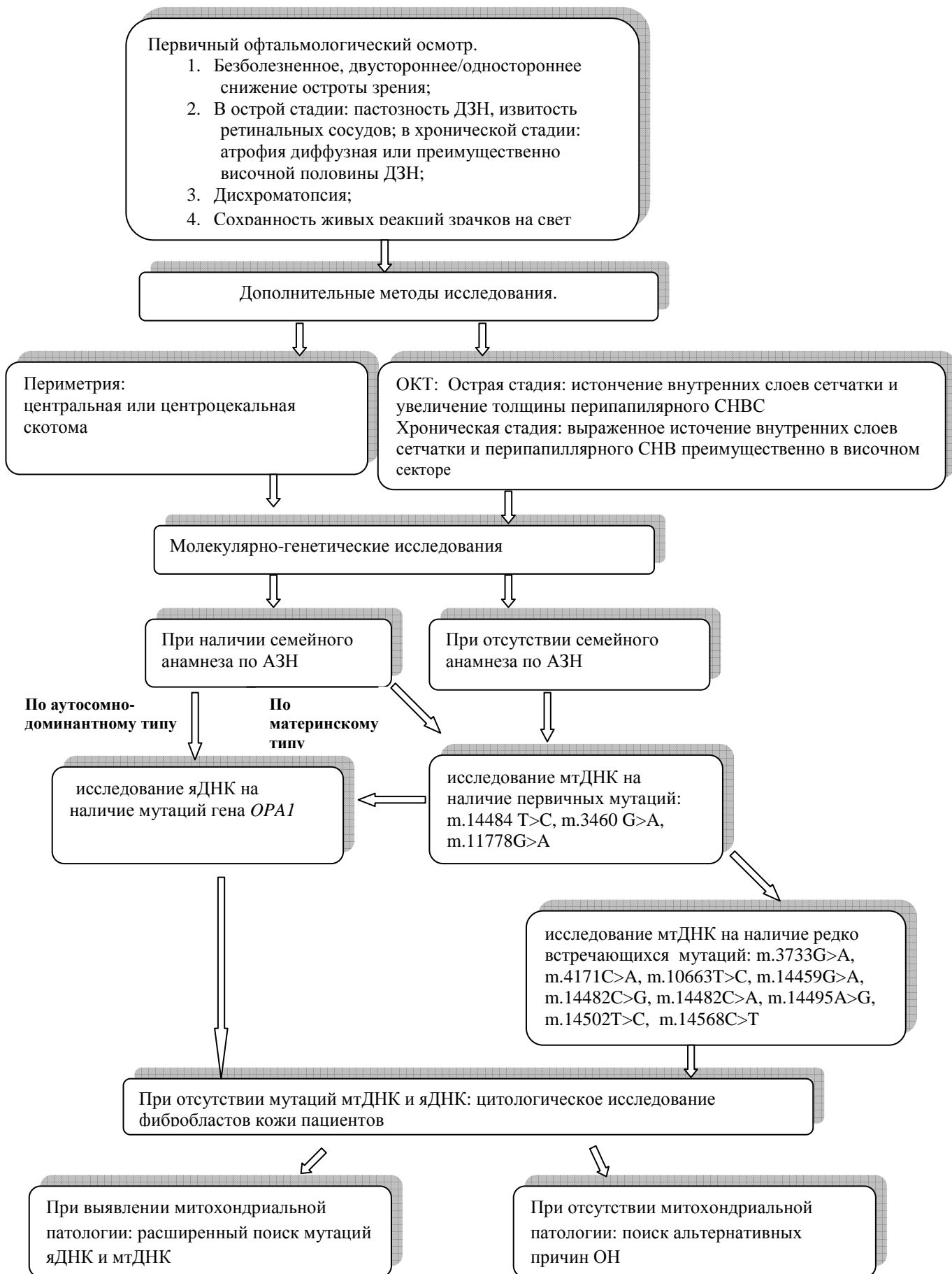


Рисунок 3. Алгоритм диагностики наследственных ОН.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на достаточном клиническом материале (97 пациентов) проведен клинический, молекулярно-генетический и цитологический анализ бинокулярных оптических нейропатий для выявления наследственной природы заболеваний.
2. Молекулярно-генетический анализ ДНК пациентов на 12 первичных мутаций мтДНК (m.11778G>A, m.14484T>C, m.3460G>A, m.3733G>A, m.4171C>A, m.10663T>C, m.14459G>A, m.14482C>G, m.14482C>A, m.14495A>G, m.14502T>C, m.14568C>T) и мутаций яДНК (в горячих участках гена *OPA1* - экзонах 8, 14, 15, 16, 18, 27, 28) выявил мутации у 38 пациентов (39%): среди них у 36 пациентов - мутации мтДНК и у 2 пациентов мутации яДНК. В 91,6% случаев мутации мтДНК обнаружены в гомоплазмическом состоянии, гетероплазмия выявлена у трех пациентов из трех семей (33%, 48%, 68% мутантной мтДНК в клетках крови).
3. У 34 пациентов с НОНЛ выявлена одна из трех частых мутаций мтДНК m.11778G>A (58,3% случаев), m.14484T>C (16,7%), m.3460G>A (19,4%), у 2 пациентов - редко встречающаяся мутация m.4171C>A. Впервые выявлена новая мутация яДНК c.2850delT (p.950Gly>Glu), приводящая к развитию АДОН.
4. Клинико-диагностическое исследование, проведенное у 36 пациентов с НОНЛ, позволило выявить следующее:
 - Наличие атрофии зрительного нерва у родственников по данным первичного и отсроченного (через 5 лет) наследственного анамнеза в 19,4% и 83,3% случаев соответственно;
 - Возможность частичного восстановления остроты зрения, которое было выявлено у 17% пациентов и во всех случаях сочеталось с центральной относительной скотомой, дисхроматопсией, изменениями электрофизиологических

показателей, менее выраженными, чем у пациентов со стабильно низкой остротой зрения. Уменьшение объема внутренних слоев сетчатки, истончение перипапиллярного слоя нервных волокон сетчатки по показателю средней толщины, а также отдельно по всем квадрантам было менее выражено у пациентов с восстановленной остротой зрения по сравнению с пациентами с низкими показателями визометрии ($p < 0.05$);

- Истончение внутренних слоев сетчатки в макулярной зоне в сочетании с увеличением толщины перипапиллярного СНВС в острой стадии НОНЛ по сравнению с контрольной группой, а также последовательное развитие выраженных атрофических изменений в центральной зоне сетчатки и лишь отсрочено в перипапиллярной зоне по данным спектральной ОКТ. Более ранние и значимые структурные изменения возникают в носовом и нижнем секторах параfoвеа, а также височном секторе перипапиллярного СНВС.

5. На основании цитологического исследования установлено, что под действием олигомицина происходит снижение интенсивности флюоресценции митохондрий фибробластов кожи 13 пациентов с НОНЛ на 6,3%, 8 пациентов с неверифицированной мутацией на 13,4%, 1 пациента с АДОН на 13,4% и увеличение интенсивности флюоресценции у 1 пациента с АДОН на 4,7%, что свидетельствует о снижении или небольшом увеличении потенциала митохондрий в исследуемых группах. В контрольной группе отмечено выраженное увеличение интенсивности флюоресценции митохондрий фибробластов кожи под действием олигомицина на 33,3%, что свидетельствует о повышении потенциала митохондрий.
6. Впервые разработана методика для определения нарушений функций митохондрий в фибробластах кожи пациентов. Методика позволила выявить у пациентов с неверифицированным генетическим дефектом

митохондриальную патологию и рекомендовать расширенный поиск мутаций яДНК и мтДНК.

7. На основании проведенных исследований разработан алгоритм современной диагностики наследственных оптических нейропатий, включающий морфофункциональные методы оценки состояния внутренних слоев сетчатки и зрительного нерва, молекулярно-генетическое и цитологическое исследование.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения уровня диагностики и сокращения сроков обследования пациентам с клинической картиной, характерной для наследственной ОН на ранней стадии заболевания следует проводить спектральную ОКТ сетчатки и зрительного нерва.
2. Пациентов с подозрением на НОНЛ необходимо направлять на проведение молекулярно-генетического анализа на наличие трех наиболее часто встречающихся первичных мутаций мтДНК (m.14484T>C, m.3460G>A, m.11778G>A), а затем на наличие редко встречающихся мутаций (m.3733G>A, m.4171C>A, m.10663T>C, m.14459G>A, m.14482C>G, m.14482C>A, m.14495A>G, m.14502T>C, m.14568C>T). Пациентов с подозрением на АДОН необходимо направлять на проведение молекулярно-генетического анализа мутаций гена *OPA1*.
3. У пациентов с клиническим диагнозом наследственной ОН и неverified генетическим дефектом для выявления митохондриальной патологии целесообразно изучать функции митохондрий в фибробластах кожи пациентов по описанной методике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шеремет Н.Л., Воробьева О.К., Елисеева Э.Г., Ханакова Н.А., Чухрова А.Л., Логинова А.Н., Поляков А.В. Молекулярно-генетическая диагностика наследственных оптических нейропатий. III Российская конференция с межд.участием. «Проблемы нарушения клеточной энергетики (Митохондриальная патология)» - Москва. – 2012.- С.305.
2. Шеремет Н.Л., Чухрова А.Л., Логинова А.Н., Елисеева Э.Г., Воробьева О.К., Ханакова Н.А., Поляков А.В. Возможности молекулярно-генетического анализа наследственных оптических нейропатий. XIII Научно-практическая нейроофтальмологическая конференция «Актуальные вопросы нейроофтальмологии». - Москва. – 2012.- С.57-59.
3. Шеремет Н.Л., Елисеева Э.Г., Галоян Н.С., Ронзина И.А., Чухрова А.Л., Логинова А.Н., Казарян Э.Э. , Ханакова Н.А., Поляков А.В. Аутосомно-доминантная оптическая нейропатия: клинические случаи. XIII Научно-практическая нейроофтальмологическая конференция «Актуальные вопросы нейроофтальмологии». - Москва. – 2012.- С.98-100.
4. Аветисов С.Э., Шеремет Н.Л., Елисеева Э.Г., Ханакова Н.А., Чухрова А.Л., Логинова А.Н., Поляков А.В. Способ диагностики аутосомно-доминантной оптической нейропатии. Патент РФ на изобретение №2491350 от 27.08.2013. Опубликовано: 27.08.2013 Бюлл. Изобр. №24.
5. Аветисов С.Э., Шеремет Н.Л., Воробьева О.К., Елисеева Э.Г., Чухрова А.Л., Логинова А.Н., Ханакова Н.А., Поляков А.В. Клинический и молекулярно-генетический анализ наследственных оптических нейропатий // **Вестник офтальмологии.** – 2013. - №2. – С.8-13.
6. Ханакова Н.А., Шеремет Н.Л., Логинова А.Н., Чухрова А.Л., Поляков А.В. Наследственные оптические нейропатии: клинические и молекулярно-генетические характеристики // **Вестник офтальмологии.** – 2013. - №6. – С.82-87.
7. Шеремет Н.Л., Галоян Н.С., Ханакова Н.А., Логинова А.Н., Чухрова А.Л., Поляков А.В. Структурные изменения сетчатки и зрительного нерва у пациентов с наследственной оптической нейропатией Лебера по результатам оптической когерентной томографии. XIV Научно-практическая нейроофтальмологическая конференция «Актуальные вопросы нейроофтальмологии». - Москва. – 2013.- С.57-59.
8. Ханакова Н.А., Шеремет Н.Л., Фомин А.В., Галоян Н.С., Логинова А.Н., Чухрова А.Л., Поляков А.В. Оценка структурных изменений сетчатки и зрительного нерва у пациентов с наследственной оптической нейропатией Лебера по результатам оптической когерентной томографии. VIII Всероссийская научная конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы офтальмологии». - Москва. – 2013. - С.265-267.

9. Аветисов С.Э., Шеремет Н.Л., Фомин А.В., Галоян Н.С., Ханакова Н.А., Жоржоладзе Н.В., Логинова А.Н., Чухрова А.Л., Поляков А.В. Структурные изменения сетчатки и зрительного нерва у пациентов с наследственной оптической нейропатией Лебера // **Вестник офтальмологии.** – 2014. - №1. – С.4-11
10. Ханакова Н. А., Венкова Л. С., Комаревцев С. К., Черноиваненко И. С., Цыганкова П. Г., Поляков А.В., Минин А. А., Шеремет Н.Л. Использование клеточной модели для изучения нарушений функций митохондрий при наследственной оптической нейропатии Лебера. XV Научно-практическая нейроофтальмологическая конференция «Актуальные вопросы нейроофтальмологии».- Москва. – 2014.-С.54-55.
11. Шеремет Н.Л., Ронзина И.А., Галоян Н.С., Ханакова Н. А., Жоржоладзе Н.В., Невиницына Т.А., Логинова А.Н., Чухрова А.Л., Поляков А.В. Клинические особенности восстановления зрения у пациентов с наследственной оптической нейропатией Лебера. XV Научно-практическая нейроофтальмологическая конференция «Актуальные вопросы нейроофтальмологии». - Москва. – 2014.-С.55-58.
12. Шеремет Н.Л., Галоян Н.С., Ханакова Н.А., Логинова А.Н., Чухрова А.Л., Поляков А.В. Способ диагностики наследственной оптической нейропатии Лебера. Патент РФ на изобретение №2513596 от 18.02.2014. Опубликовано: 20.04.2014 Бюлл. Изобр. №11.

СПИСОК ПРИМЕНЯЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДОН – аутосомно-доминантная оптическая нейропатия	ПЦР – полимеразная цепная реакция
АЗН – атрофия зрительного нерва	ПЭЧ – порог электрической чувствительности
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота	СНВС – слой нервных волокон сетчатки
ГКС – ганглиозные клетки сетчатки	ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ДЗН – диск зрительного нерва	ЭФИ – электрофизиологические исследования
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	ядНК – ядерная ДНК
ЗВП – зрительно вызванные потенциалы	FLV – уровень фокальных потерь
КЧСМ – критическая частота слияния мельканий	MD – средний дефект световой чувствительности
ЛЗН – лабильность зрительного нерва	MLPA – мультиплексная проба-зависимая лигазная реакция с последующей амплификацией
мтДНК – митохондриальная ДНК	MS – средний показатель световой чувствительности
НОНЛ – наследственная оптическая нейропатия Лебера	sLV – Loss variance
ОКТ – оптическая когерентная томография	
ОН – оптические нейропатии	