

*На правах рукописи*

**Невиницына Татьяна Алексеевна**

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАСЛЕДСТВЕННЫХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ  
ОБОСНОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОДХОДА К ИХ  
ЛЕЧЕНИЮ**

14.01.07 – глазные болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2018

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук

**Шермет Наталия Леонидовна**

**Официальные оппоненты:**

**Киселева Татьяна Николаевна**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней имени Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, начальник отдела ультразвуковых исследований

**Мосин Илья Михайлович**, доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ «Детская городская клиническая больница имени З.А. Башляевой Департамента здравоохранения города Москвы», руководитель офтальмологической службы

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

Защита диссертации состоится «19» марта 2018 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета Д 001.040.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт глазных болезней», по адресу: 119021, г. Москва, ул. Россолимо, д.11, корп. А, Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте [www.niigb.ru](http://www.niigb.ru) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт глазных болезней».

Автореферат диссертации разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

**М.Н. Иванов**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Двустороннее выраженное, практически необратимое снижение зрительных функций, возникающее в результате наследственных оптических нейропатий (НОН, частота встречаемости 1 на 10 000 – 50 000 населения), в значительной мере ограничивает трудовую и социальную активность пациентов, снижает качество жизни [Kjer B., 1996, Yu-Wai-Man P., 2009]. Для клинической картины атрофии зрительных нервов, развивающейся вследствие НОН, характерна вариабельность манифестации, течения заболевания, степени выраженности зрительных нарушений, отягощенности семейного анамнеза, что осложняет дифференциальную диагностику с иными оптическими нейропатиями [Amati-Bonneau P., 2008, Cornille K., 2008, Nochez Y., 2009].

Большое разнообразие мутаций затрудняет поиск патологических изменений митохондриальной (мтДНК) и ядерной (ядДНК) ДНК, являющихся причиной наследственной оптической нейропатии Лебера (НОНЛ) и аутосомно-доминантной оптической нейропатии (АДОН) [Yu-Wai-Man P., 2011]. В последние годы в РФ отмечено повышение доступности генетической диагностики наследственных заболеваний, однако исследование яДНК, особенно ее полное секвенирование, остается дорогостоящей процедурой, редко используемой в рутинной практике.

НОН относят к группе митохондриальных заболеваний, для которых характерно нарушение процессов окислительного фосфорилирования (ОФ), снижение мембранного потенциала и ухудшение выработки энергии [Carelli V., 2004, Varacca A., 2005, Chevrollier A., 2008, Zanna C., 2008]. Одновременно с ухудшением работы дыхательной цепи митохондрий (ДЦМ), в первую очередь I комплекса, нарастает количество активных форм кислорода (АФК) [Howell N., 1997, Carelli V., 2004, Jarrett S.G., 2010]. При НОН нарушение жизнедеятельности митохондрий обнаружено не только в ганглиозных клетках сетчатки (ГКС), но и в других тканях организма. На клеточной модели фибробластов кожи изучают функционирование отдельных компонентов

ДЦМ, количество АФК, изменение мембранного потенциала [Robinson B.H., 1992, Zanna C., 2008, Angebault C., 2011, Ye F., 2013, Ханаква Н.А., 2014], а также индивидуальный ответ на лекарственные средства [Saada A., 2011, Цыганкова П.Г., 2012, Yu-Wai-Man P., 2017].

Эффективного лечения митохондриальных заболеваний не разработано, генная терапия проходит первые фазы клинических исследований и только для мутации мтДНК m.11778G>A. Рост АФК является одним из ключевых звеньев патогенеза НОН, поэтому их нейтрализация – необходимый компонент терапии. Неоднозначные результаты были получены при использовании идебенона и других препаратов, участвующих в переносе электронов по ДЦМ и элиминации свободных радикалов, положительный эффект был замечен у ряда больных [Gueven N., 2017].

В РФ зарегистрированы глазные капли Визомитин с митохондриально-направленным антиоксидантом – пластохинонилдецилтрифенилфосфония бромидом (ПДТФ) (регистрационный номер ЛП-001355 от 13.12.2011). Его применение при НОН патогенетически обосновано. Наномолярные концентрации ПДТФ в культурах человеческих клеток резко тормозят перекисное окисление липидов митохондрий и ингибируют апоптоз, вызванный добавлением перекиси водорода [Антоненко Ю.Н., 2008, Скулачев В.П., 2009]. В эксперименте на кроликах породы шиншилла при инстилляции в глаза 25 мкм ПДТФ в течение 2 недель было выявлено активное вещество в сетчатке и зрительном нерве в терапевтически значимых концентрациях [Каргер Е.М., 2014].

Чувствительные и специфичные методы молекулярно-генетической и цитологической диагностики, в том числе проверка индивидуального ответа на препарат на клеточных культурах, способны сократить время от момента постановки клинического диагноза до назначения корректной терапии. Раннее начало патогенетически обоснованного лечения, в частности митохондриально-адресованного антиоксиданта, должно повысить шансы пациентов с НОН на более благоприятное течение заболевания.

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

**Цель:** изучить молекулярные механизмы НОН путем определения генетических мутаций мтДНК и яДНК и особенностей функционирования митохондрий, а также исследовать действие митохондриально-направленного антиоксиданта.

### **Задачи**

1. Сформировать выборку пациентов с клиническим диагнозом наследственная оптическая нейропатия.
2. Провести молекулярно-генетический анализ митохондриальной и ядерной ДНК пациентов с клиническим диагнозом оптическая нейропатия Лебера и аутосомно-доминантная оптическая нейропатия для выявления причинных мутаций.
3. Изучить функциональное состояние митохондрий (работа дыхательных комплексов, уровень мембранного потенциала и продукции активных форм кислорода) на фибробластах кожи пациентов и контрольной группы.
4. Оценить влияние митохондриально-адресованного антиоксиданта ПДТФ на уровень окислительного стресса в фибробластах кожи пациентов.
5. Исследовать действие митохондриально-адресованного антиоксиданта ПДТФ у пациентов с наследственными оптическими нейропатиями.

### **Научная новизна**

Впервые для больных с НОН, проживающих на территории РФ, проведен поиск мутаций яДНК с использованием полногеномного секвенирования кодирующих участков яДНК (экзома), в результате которого выявлены 2 мутации, приводящие к развитию АДОН, ранее не описанные в литературе. Подтверждена патогенность двух замен в мтДНК, приводящих к развитию НОНЛ, благодаря оценке митохондриальной дисфункции на фибробластах кожи пациентов. Апробирован метод респирометрии для клеток

пациентов с НОНЛ. Выявлены особенности функционирования комплексов ДЦМ при определенных мутациях митохондриального генома. Впервые разработан способ диагностики НОНЛ с использованием параквата, позволяющий подтвердить наличие дисфункции I комплекса ДЦМ (патент №2617803 от 26.04.2017 «Способ диагностики наследственной оптической нейропатии Лебера»). Впервые исследовано действие митохондриально-направленного антиоксиданта ПДТФ на культуры фибробластов пациентов с НОН и показана эффективность и безопасность его применения у пациентов с НОН.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Проведенное молекулярно-генетическое исследование выявило 2 новые мутации яДНК в гене *OPA1* с.266G>A и с.1577T>C, что позволило генетически верифицировать АДОН. В ходе анализа мтДНК была заподозрена патогенность 2 замен в мтДНК, которая была подтверждена в ходе последующих цитологических исследований. Были изучены нарушения биоэнергетических функций митохондрий при мутациях мтДНК. Апробированная методика респирометрии, оценивающая характеристики клеточного дыхания, а также новый способ обнаружения дисфункции I комплекса ДЦМ с использованием параквата на фибробластах кожи пациентов с НОНЛ позволили подтвердить митохондриальный генез заболевания. Изученное влияние препарата с митохондриально-адресованным антиоксидантом ПДТФ на уровень окислительного стресса в фибробластах кожи пациентов с НОН, позволяет сделать вывод о патогенетической обоснованности его применения в клинической практике. Выполненное клиническое исследование действия препарата ПДТФ у пациентов с НОН, подтверждает наличие положительного эффекта на динамику ОЗ, цветоощущения и показателей периметрии у пациентов с НОН, особенно выраженное при назначении ПДТФ в ранние сроки заболевания (до 1,5 лет), и позволяет рекомендовать его для лечения НОН.

## **Методология и методы диссертационного исследования**

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

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Проведение развернутых генетических исследований позволило выявить наличие новых и редких мутаций мтДНК и яДНК в 22% случаев.
2. Подробный генетический анализ мтДНК и яДНК не гарантирует обнаружение причинной мутации из-за широкого спектра возможных мутаций и ограниченности современных методик.
3. В случае выявления новых замен в мтДНК изучение митохондриальных функций на фибробластах кожи пациентов позволяет подтвердить патогенность генетических изменений.
4. При НОНЛ в фибробластах кожи пациентов отмечено снижение мембранного потенциала митохондрий и дыхательной емкости преимущественно I комплекса, с компенсаторным усилением работы II комплекса.
5. Способ оценки дисфункции I комплекса на фибробластах кожи пациентов с НОНЛ с помощью параквата позволяет проводить одновременный скрининг большого количества клеточных линий и подтверждать митохондриальный генез заболевания.
6. Митохондриально-направленный антиоксидант ПДТФ способен снижать уровень окислительного стресса в фибробластах кожи пациентов с НОНЛ.
7. При длительном применении ПДТФ установлено повышение показателей зрительных функций у пациентов с НОНЛ, что позволяет рекомендовать данный препарат в качестве патогенетической терапии.

## **Степень достоверности и апробации 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 в программе STATISTICA 10. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, аргументированы и логически вытекают из системного анализа результатов клинических и лабораторных исследований.

Основные положения работы доложены на: SSIEM 2015 Annual Symposium (Лион, Франция, 2015); X съезде офтальмологов России (Москва, 2015); XVI Научно-практической нейроофтальмологической конференции «Актуальные вопросы нейроофтальмологии» (Москва, 2016); Научной конференции офтальмологов Невские горизонты-2016 (Санкт-Петербург, 2016); 19<sup>th</sup> European Bioenergetics Conference (Рива дель Гардия, Италия, 2016); XVII Научно-практической нейроофтальмологической конференции «Актуальные вопросы нейроофтальмологии» (Москва, 2017); International meeting on mitochondrial pathology «Euromit 2017» (Кельн, Германия, 2017), X Российском общенациональном офтальмологическом форуме (Москва, 2017), заседании проблемной комиссии ФГБНУ «НИИ ГБ» от 23 октября 2017 г.

## **Личный вклад автора в проведенное исследование**

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

## **Внедрение результатов работы**

Полученные результаты исследования внедрены и применяются в работе ФГБНУ «НИИ глазных болезней».



## **Публикации**

По теме диссертационной работы опубликовано 18 печатных работ, из них 4 в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, определенных Высшей аттестационной комиссией. Получен патент РФ на изобретение.

## **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 226 источников, из них 17 отечественных и 209 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 36 таблицами и 38 рисунками.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материал и методы исследования**

Исследование основано на анализе данных обследования 59 пациентов (118 глаз) с НОН и 3 клинически здоровых родственников пациентов. Критерии включения в исследование:

1. Двустороннее, симметричное, одновременное или последовательное безболезненное снижение остроты зрения, острое или хроническое;
2. центральная или центрорекальная скотома в поле зрения;
3. дисхроматопсия;
4. в острой стадии заболевания гиперемия и отек ДЗН, извитость ретинальных сосудов, или отсутствие изменений при офтальмоскопии; отек перипапиллярного слоя нервных волокон сетчатки (СНВС);
5. в хронической стадии заболевания частичная атрофия зрительных нервов с диффузной или височной бледностью ДЗН, истончение комплекса ГКС и перипапиллярного СНВС.

В исследование не включали пациентов с другой подтвержденной этиологией оптической нейропатии. Из основной выборки была сформирована группа из 35 пациентов в возрасте от 18 до 64 лет ( $29,2 \pm 10,5$  лет), с

длительностью заболевания 3,4 мес - 47,6 лет ( $71,39 \pm 123,2$  мес), которые получали митохондриально-направленный антиоксидант ПДТФ (155 нг/мл) по 1-2 кап 3-4 раза в день в течение 1-2,5 лет. Клиническое исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИГБ» РАМН (протокол №6 от 01.12.2014). От всех пациентов было получено письменное добровольное информированное согласие.

В контрольную группу вошло 28 пациентов с НОН (55 глаз) в возрасте от 15 до 56 лет, группы были сопоставимы по возрасту, длительности заболевания и ОЗ. Дополнительно было проведено сравнение динамики ОЗ по шкале LogMAR с литературными данными 44 пациентов (83 глаза) с мутацией мтДНК m.11778G>A [Lam V.L., 2014], они имели сопоставимые показатели длительности заболевания, но отличались по ОЗ на момент первого визита ( $p < 0,001$ ) (в группе ПДТФ ОЗ была хуже и составила  $1,76 \pm 0,31$  LogMAR против  $1,39 \pm 0,43$  LogMAR по данным литературы).

Схема обследования: перед началом инстилляций и каждые 6 мес осуществляли сбор жалоб, визометрию (по таблице Головина-Сивцева, Фрейбургский тест [Vach M., 2007]), биомикроскопию, офтальмоскопию, исследование цветового зрения (по таблицам для исследования цветоощущения Е.Б. Рабкина), компьютерную периметрию (Octopus 900, Interzeag AG, Швейцария), спектральную оптическую когерентную томографию (ОКТ, RTVue-100, США); перед началом инстилляций и через 1 год – электрофизиологические методы исследования (вЗВП, пЗВП, – «Tomey EP-1000, Multifocal», Германия; ПЭЧ, ЛЗА, КЧСМ – «Lametesk», Россия). Помимо стандартной визометрии использовали Фрейбургский тест хорошо адаптированный для оценки низкого зрения, включая счет пальцев и движение руки [Schulze-Bonsel K., 2006]. Пациенту на экране компьютера в стандартных условиях предъявляли 30 колец Ландольта различной величины, обсчет производился автоматически в шкале LogMAR.

Для молекулярно-генетического анализа использовали образцы венозной крови 32 пациентов с НОН и их 3 родственников. Пациентам с

подозрением на НОНЛ проводили поиск 3 наиболее частых мутаций мтДНК (m.11778G>A, m.3460G>A, m.14484T>C) методом MLPA, если мутацию не находили, то проводили секвенирование всей мтДНК. 16 пациентам было выполнено полногеномное секвенирование кодирующих участков яДНК (экзомное секвенирование).

Материалом для клеточных исследований служили фибробласты кожи 16 пациентов с НОНЛ, 1 сестры пациента и 8 здоровых лиц группы контроля.

Уровень клеточного дыхания в фибробластах кожи оценивали с помощью респирометрии высокого разрешения на оксиграфе OxuGraph-2k (Oroboros corp., Австрия). В интактных фибробластах регистрировали базовое дыхание на эндогенных субстратах (R), дыхание после добавления ингибитора V комплекса ДЦМ олигомицина (L), максимальную скорость дыхания при добавлении разобщителя ОФ FCCP (E). В пермеабелизированных фибробластах дополнительно изучали скорость потребления кислорода после добавления субстрата I комплекса ДЦМ глутамата – CI и после добавления субстрата II комплекса сукцината – CII, дыхание после ингибирования I комплекса ротеноном (Rot).

Для подтверждения дисфункции I комплекса ДЦМ определяли устойчивость культуры клеток к токсическому действию параквата в концентрации до 5,0 мМ. Устойчивость клеток оценивали по изменению флуоресценции красителя резазурина в культуре клеток (Fluoroskan Ascent, Thermo, США).

Для оценки антиоксидантного действия ПДТФ использовали митохондриально-направленный краситель MitoBodiPY. Выдерживали клетки в растворе ПДТФ или C12TPP (аналог ПДТФ без антиоксидантной части) 17 часов, затем добавляли MitoBodiPY на 3 часа, затем – перекись водорода или гидроперекись Кумена. Через 1 час определяли соотношение сигналов в каналах FL1 и FL2 (окисленной/восстановленной формы MitoBodiPY) на проточном цитометре Beckman Coulter FC500 (США).

Статистический анализ проводили с использованием непараметрических статистик (критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона, дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса, ранговая корреляция по Спирмену) в программах STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Результаты молекулярно-генетических исследований

На момент обследования из 59 пациентов с диагнозом НОН у 27 была обнаружена мутация мтДНК или яДНК. Дальнейший генетический анализ, который проводили 32 пациентам, выявил мутации у 18 пациентов (56%), в том числе редкие мутации мтДНК и новые мутации яДНК у 7 пациентов (22%). У 11 пациентов обнаружена одна из 3 частых мутаций мтДНК при НОНЛ (m.11778G>A, m.14484T>C, m.3460G>A), у 4 пациентов – редкие мутации мтДНК. Полногеномное секвенирование экзома яДНК выявило наличие ранее не описанных мутаций (с.266G>A во 2 экзоне и с.1577T>C в 16 экзоне) в гене *OPA1* у 2 (12,5%) из 16 пациентов, секвенирование яДНК по Сэнгеру – у 1 пациентки (Табл. 1).

Таблица 1. Распределение пациентов в зависимости от выявленного генетического дефекта.

	Генетический дефект									
	мтДНК						яДНК		Мутация не найдена	Итого
	m.11778G>A	m.3460G>A	m.14484T>C	m.3635G>A	m.3472T>C	m.13379A>G	с.266G>A	с.1577T>C		
Кол-во пациентов М/Ж	6/0	4/0	1/0	2/0	1/0	1/0	0/2	1/0	11/3	27/5
Гомо/гетероплазмия	6/0	2/2	1/0	2/0	1/0	0/1	-	-	-	-

### Результаты цитологических исследований

В интактных фибробластах кожи пациентов с НОНЛ, в том числе пациента с кандидатной мутацией m.3472T>C, и его сестры выявили повышение соотношений скоростей дыхания (R/E, (R-L)/E) в 1,5-2 раза ( $p<0,01$ ) по сравнению с контролем (Табл. 2), что говорит о снижении максимальной и резервной мощности ДЦМ и мембранного потенциала.

Таблица 2. Контрольные соотношения респирометрии интактных фибробластов пациентов с НОНЛ и контрольной группы.

Группы пациентов	Респирометрические соотношения, доля скоростей дыхания, Mean±SD		
	R/E	L/E	(R-L)/E
НОНЛ	*** 0,73±0,21	0,20±0,11	** 0,53±0,17
Здоровый контроль	*** 0,39±0,09	0,13±0,04	** 0,26±0,07

Межгрупповая достоверность: \*\*-  $p < 0,01$ ; \*\*\*-  $p < 0,001$ .

В пермеабиллизированных фибробластах пациентов с НОНЛ наблюдали увеличение в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ) соотношения СИ/Е в сравнении с контролем, что говорит о недостаточной способности митохондрий использовать субстраты комплексов I и II для ОФ. Снижение соотношения СИ/СИ примерно в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ) указывает на компенсаторное относительное повышение активности II комплекса ДЦМ. Увеличение в 1,5 раза ( $p < 0,01$ ) соотношения Rot/Е, подтверждает дисфункцию I комплекса ДЦМ, а более низкие значения ( $p < 0,01$ ) соотношения (R/СИ) в фибробластах пациентов в сравнении с контролем подтверждают депрессию уровня ОФ (Табл. 3).

Таблица 3. Контрольные соотношения в пермеабиллизированных фибробластах пациентов с НОНЛ и контрольной группы при респирометрии.

Группы пациентов	Респирометрические соотношения, доля скоростей дыхания, Mean±SD			
	СИ/Е	Rot/Е	R/СИ	СИ/СИ
НОНЛ	** 0,82±0,12	** 0,77±0,09	** 0,33±0,07	** 0,29±0,09
Здоровый контроль	** 0,48±0,11	** 0,35±0,16	** 0,51±0,11	** 0,51±0,08

Межгрупповая достоверность: \*\*-  $p < 0,01$ .

Паракват восстанавливается до радикальной формы на функционально активном I комплексе ДЦМ и вызывает гибель здоровых клеток. При добавлении параквата фибробласты пациентов с НОНЛ, в том числе с кандидатными мутациями m.13379A>G, m.3472T>C, и носителя мутации m.3472T>C демонстрировали значительно более интенсивную окраску после добавления в среду красителя резазурина ( $p < 0,05$ ), что говорит о более высокой их выживаемости (Рис. 1). У пациента с мутацией m.14484T>C в состоянии гетероплазмии показатели имели промежуточные значения между

контролем и культурами от пациентов. У пациентов с НОНЛ наблюдали выживаемость клеток, превышающую показатели здорового контроля на 50% и более при одинаковых концентрациях параквата и одинаковой первоначальной плотности культуры, что обусловлено сниженной функцией I комплекса ДЦМ и медленным восстановлением параквата до его радикальной формы у пациентов с НОНЛ.

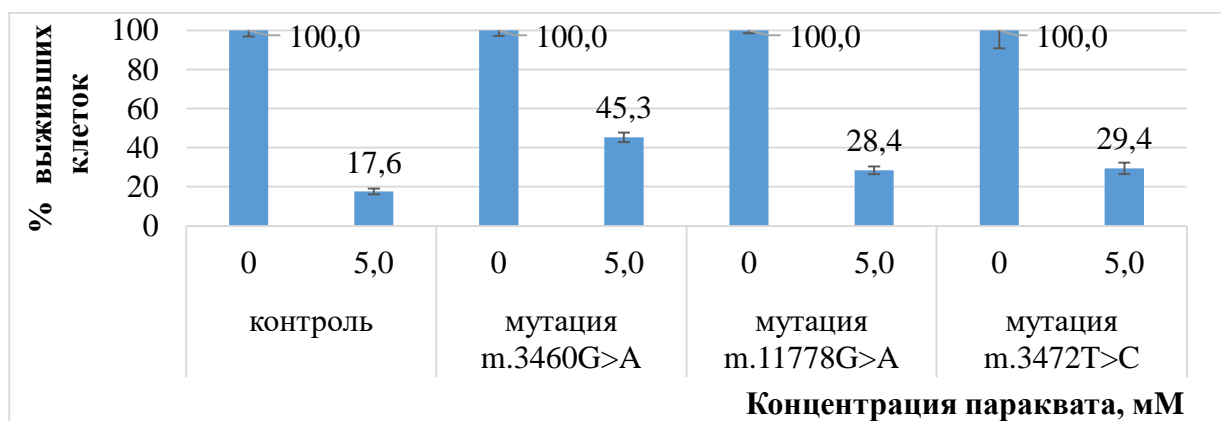


Рисунок 1. Выживаемость культур фибробластов пациентов с мутациями m.3460G>A, m.11778G>A, m.3472T>C и контроля (Mean±SD, %).

При оценке антиоксидантного действия в фибробластах кожи пациентов с НОНЛ с мутациями m.11778G>A и m.3460G>A и здоровых лиц ПДТФ достоверно снижал (изменял соотношение FL1/FL2 в пользу восстановленной формы) уровень базового и индуцированного окислительного стресса ( $p < 0,05$ ) в обеих группах в одинаковой степени. С12ТРР был не эффективен, подтверждая вывод о том, что регистрируемые результаты связаны именно с антиоксидантной активностью ПДТФ, а не с его способностью к разобщению ОФ. У одного пациента с мутацией m.3460G>A не было выявлено разницы в уровне окислительного стресса между культурами клеток, выдержанных в ПДТФ и С12ТРР, т.е. ПДТФ не проявил свои антиоксидантные свойства (Рис.2). У него имело место выраженное снижение зрительных функций на протяжении двух лет лечения без положительной динамики. Такие отличия могут быть объяснены индивидуальными особенностями пациента: грубой митохондриальной дисфункцией, не компенсируемой лекарственным воздействием ПДТФ, или же толерантностью к данному веществу.

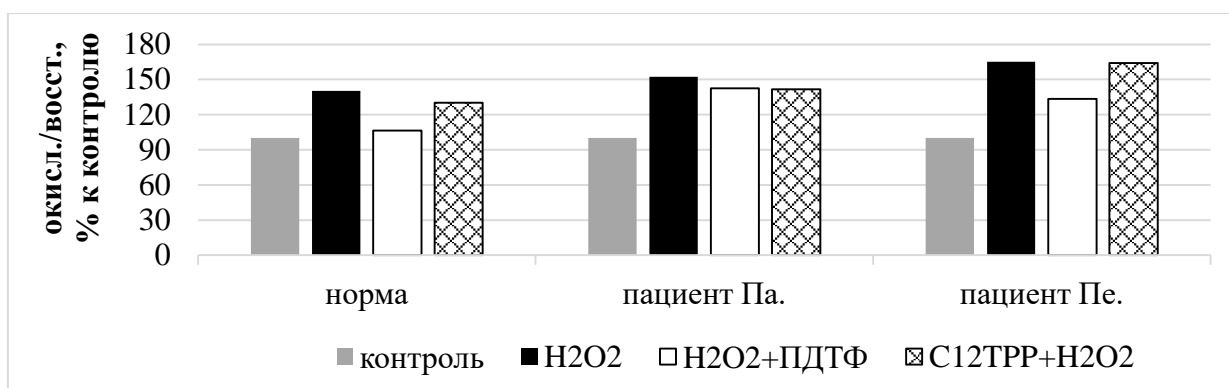


Рисунок 2. Уровень окислительного стресса в фибробластах кожи пациентов с НОНЛ (мутация m.3460G>A) и здоровых лиц (норма). Контроль – культуры фибробластов без добавления к ним окислителей, ПДФ, C12TRP.

Таблица 4. Генетическая характеристика пациентов, прошедших цитологический анализ.

Методика	Клеточная культура	Количество пациентов								
		мутация мтДНК						Контроль	Итого	
		m.11778G>A	m.3460G>A	m.14484T>C	m.4171C>A	m.3635G>A	m.3472T>C			m.13379A>G
Респирометрия	Фибробласты интактные	3	2	-	-	1	2	-	8	16
	Фибробласты пермеабиллизированные	2	1	-	-	-	2	-	7	12
Устойчивость к действию параквата	Фибробласты	2	2	1	1	-	2	1	3	12
Антиоксидантный эффект ПДФ	Фибробласты	3	3	-	-	-	-	-	3	9

### Результаты клинических исследований

По результатам лечения два пациента (4 глаза) с мутациями m.3460G>A, гетероплазмия, и m.14484T>C, гомоплазмия, со значительным улучшением ОЗ были исключены из анализа. Обсчет данных был проведён на основании показателей 33 пациентов (64 глаз) (Табл. 5).

Таблица 5. Количество пациентов с НОН на протяжении исследования.

Срок наблюдения, мес	0	6	12	18	24	30
Кол-во пациентов/глаз всего	33/64	33/64	33/64	25/48	18/35	11/21
Кол-во пациентов/глаз с мутацией m.11778G>A	13/25	13/25	13/25	10/19	7/14	4/7

При оценке ОЗ предпочтение было отдано шкале LogMAR, как более чувствительной и объективной. ОЗ с коррекцией достоверно улучшалась в течение всего периода наблюдения, к 30 мес на  $0,39 \pm 0,25$  относительно

базовых показателей (внутригрупповая достоверность  $p < 0,001$ ) (Рис.3А). Спустя год от начала инстилляций отмечали достоверное снижение количества нечитаемых таблиц Е.Б. Рабкина, которое к 30 мес составило  $-3,7 \pm 4,18$  (внутригрупповая достоверность  $p < 0,001$ ) (Рис.3Б).

Клинически значимое улучшение ОЗ на  $\geq 0,3$  LogMAR за все время исследования наблюдали в 43,75% глаз. Ухудшение зрения на  $\geq 0,3$  LogMAR было отмечено только у одного пациента однократно на одном глазу при длительности заболевания на момент начала лечения – 7 мес, с последующим улучшением ОЗ. Клинически значимое улучшение цветового зрения за все время наблюдения отмечено в 30% глаз, а ухудшение – меньше, чем в 5% (только при длительности заболевания меньше года).

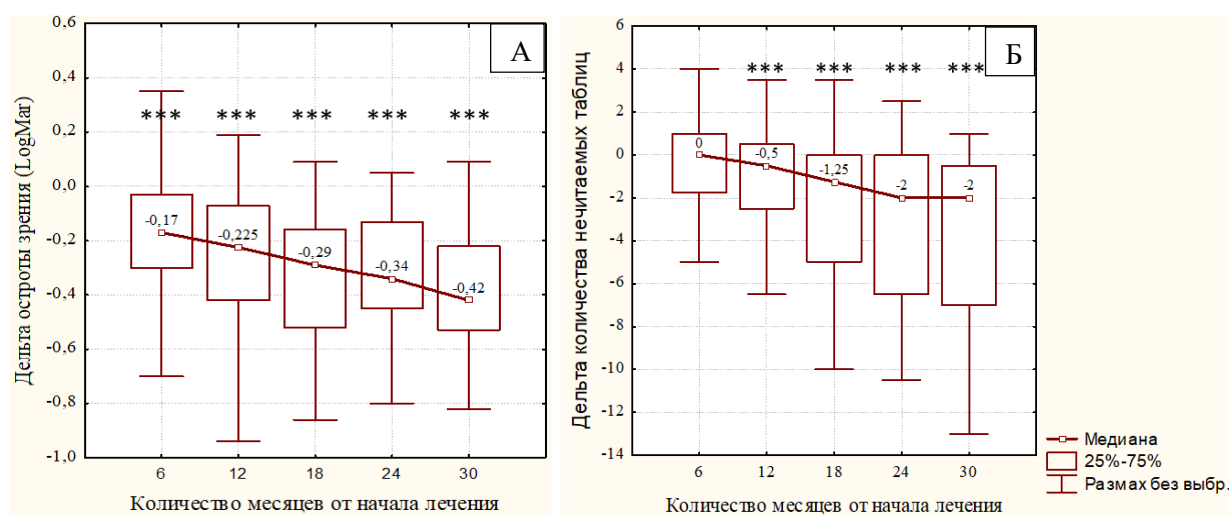


Рисунок 3. Динамика (дельта медианы, верхний и нижний квартили) относительно базовых показателей: А – ОЗ (LogMAR), Б – цветоощущения. Внутригрупповая достоверность: \*\*\* -  $p < 0,001$ .

С 6 по 24 мес отмечали достоверное повышение среднего показателя световой чувствительности (MS) и уменьшение среднего дефекта световой чувствительности (MD) ( $p < 0,05$ ) у пациентов, проходивших обследование по программе низкого зрения LVC. Улучшение показателей MS и MD у пациентов, проходивших обследование по неврологической программе N1, оказалось статистически достоверным только через 6 мес ( $p < 0,05$ ). Несмотря на значительное повышение ОЗ у пациентов с НОН, показатели компьютерной периметрии не в полной мере коррелировали с ОЗ. Чувствительности прибора



было недостаточно для выявления возникшего разряжения в центральной скотоме.

В наблюдаемой выборке при сравнении пациентов с двумя наиболее частыми мутациями мтДНК (m.11778G>A, m.3460G>A), имеющими неблагоприятный прогноз, у пациентов с мутацией m.11778G>A происходило достоверно более выраженное улучшение ОЗ ( $p<0,05$ ). По показателям цветового зрения и периметрии достоверной разницы между группами не отмечено, но у пациентов с мутацией m.11778G>A повышение цветоощущения было достоверным через 12, 18 и 24 мес ( $p<0,05$ ). С 6 по 30 мес толщина и объем глобальных потерь комплекса ГКС были хуже в группе пациентов с мутацией m.3460G>A ( $p<0,05$ ). Полученные данные характеризуют мутацию m.3460G>A как прогностически более тяжелую.

Клинически значимое улучшение ОЗ, цветового зрения и показателей компьютерной периметрии на фоне инстилляций ПДТФ происходило наиболее выражено в группе с наименьшей длительностью заболевания –  $\leq 1,5$  лет. В этой группе динамика ОЗ достоверно отличалась от группы  $>1,5$ , но  $\leq 5$  лет через 12 и 18 мес ( $p<0,05$ ) (Рис.4А), цветоощущения – от группы  $>1,5$ , но  $\leq 5$  лет и  $>5$  лет в срок 12 – 24 мес ( $p<0,05$ ), показателей MS и MD – от группы  $>1,5$ , но  $\leq 5$  лет в течение всего исследования (Рис.4Б).

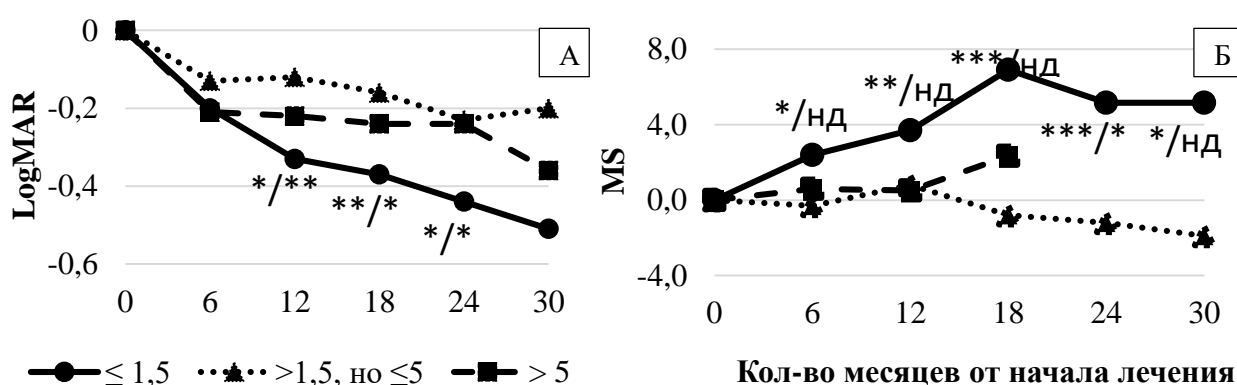


Рисунок 4. Динамика (дельта медианы) относительно базовых показателей в зависимости от длительности заболевания: А – ОЗ по шкале LogMAR, Б – показателя MS по программе LVC. Межгрупповая достоверность (группа с длительностью заболевания  $\leq 1,5$  лет в сравнении с группой  $>1,5$ , но  $\leq 5$  лет / группой  $>5$  лет): \* -  $p<0,05$ ; \*\* -  $p<0,01$ ; \*\*\* -  $p<0,001$ , нд – не достоверно.

Только в группе с длительностью заболевания не более 1,5 лет была отмечена внутригрупповая достоверность улучшения цветоощущения с 12 по 30 мес инстилляций ( $p < 0,05$ ), показателей MS и MD с 6 по 30 мес ( $p < 0,05$ ) и латентности пика P100 вЗВП через 12 мес ( $p < 0,05$ ). Улучшение зрительных функций происходили на фоне выраженного истончения СНВС и комплекса ГКС ( $p < 0,01$ ).

При анализе данных ОКТ также было выявлено менее выраженное истончение перипапиллярного СНВС у пациентов с  $O3 \leq 1,0$  LogMAR по сравнению с пациентами с низкими показателями O3. Выявлена высокая обратная корреляция показателей КЧСМ и ЛЗА с O3 по шкале LogMAR через 1 год инстилляций ПДТФ в группе пациентов с наименьшей длительностью заболевания на начало лечения ( $k = -0,79$ ,  $k = -0,75$ ,  $p < 0,05$ ). После лечения у 3 больных (6 глаз) удалось получить ранее нерегистрируемые основные пики пЗВП, у 3 пациентов (3 глаза) отмечено снижение латентности пика P100 пЗВП.

При сравнении с контрольной группой достоверная положительная динамика O3 (по таблице Головина-Сивцева) имела место только в группе ПДТФ, межгрупповые отличия получены только на 12 и 18 мес наблюдения ( $p < 0,05$ ), что может быть связано с ограниченным количеством знаков и их запоминанием пациентами с низким зрением.

При сравнении пациентов с мутацией m.11778G>A с данными литературы выявили достоверное улучшение O3 как внутри группы ПДТФ ( $p < 0,05$ ), так и между группами ( $p < 0,01$ ) на протяжении 0,5-2,5 лет (Рис.5). В группе ПДТФ улучшение зрения на  $\geq 0,3$  LogMAR зафиксировано у 14 из 25 глаз (56%), и не было отмечено снижения O3 на  $\geq 0,3$  LogMAR. По данным литературы улучшение и ухудшение O3 на  $\geq 0,3$  LogMAR происходило в одинаковом проценте случаев (13%, 11 из 83 глаз).

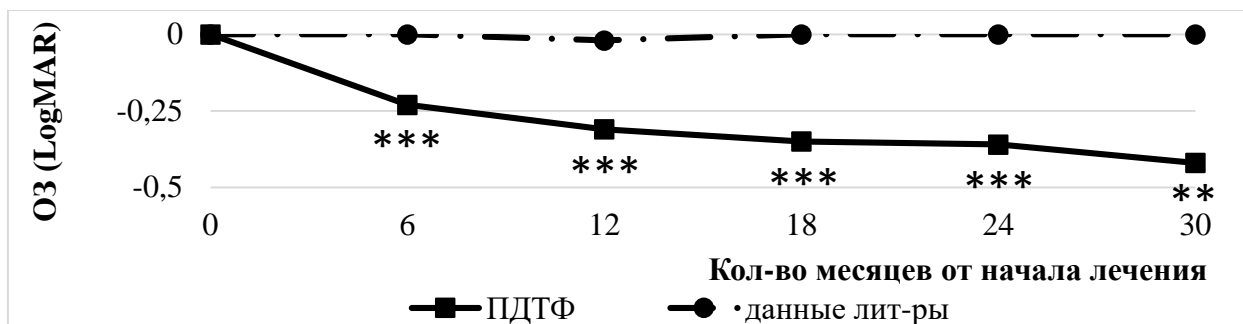


Рисунок № 5. Динамика O3 LogMAR (дельта медианы) у пациентов с мутацией m.11778G>A относительно базовых показателей. Межгрупповая достоверность: \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ .

## ВЫВОДЫ

1. На достаточном клиническом материале (59 пациентов) изучены молекулярные механизмы наследственных оптических нейропатий путем определения генетических мутаций мтДНК и яДНК и особенностей функционирования митохондрий, а также исследовано действие митохондриально-направленного антиоксиданта ПДТФ.
2. Молекулярно-генетический анализ мтДНК и полногеномное секвенирование яДНК позволили выявить мутации в 56% случаев, в том числе редкие мутации мтДНК и новые мутации мтДНК и яДНК в 22% случаев.
3. По результатам респирометрии в фибробластах кожи пациентов установлено снижение мощности дыхательной цепи и мембранного потенциала митохондрий, преимущественно за счет дисфункции I комплекса, на фоне компенсаторного увеличения работы II комплекса.
4. Разработанный новый способ обнаружения дисфункции I комплекса дыхательной цепи митохондрий продемонстрировал устойчивость фибробластов кожи пациентов с оптической нейропатией Лебера и носителя мутации мтДНК к цитотоксическому действию параквата по сравнению с контрольными культурами ( $p < 0,05$ ) за счет снижения функции I дыхательного комплекса.
5. Установлено, что митохондриально-адресованный антиоксидант ПДТФ в культуре фибробластов пациентов с оптической нейропатией Лебера

достоверно снижает уровень окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода или гидроперекисью Кумена ( $p < 0,05$ ), в 5 (83,3%) из 6 случаев и в контрольных культурах во всех случаях. Отсутствие эффекта может быть связано с индивидуальными особенностями пациента и выраженностью митохондриальной дисфункции.

6. Клиническое исследование действия митохондриально-направленного антиоксиданта ПДТФ в течение 1-2,5 лет продемонстрировало клинически значимое улучшение остроты зрения в 43,8%, цветового зрения в 30% и показателей компьютерной периметрии в 26,6% глаз, во всех случаях происходившее на фоне истончения слоя ганглиозных клеток и нервных волокон сетчатки.

6.1. При сравнении двух наиболее частых мутаций мтДНК с неблагоприятным прогнозом (m.11778G>A и m.3460G>A) установлено более выраженное восстановление зрительных функций у пациентов с мутацией m.11778G>A на фоне инстилляций ПДТФ.

6.2. В группе пациентов с длительностью заболевания не более 1,5 лет на момент начала инстилляций ПДТФ установлена более выраженная положительная динамика зрительных функций, в том числе показателей зрительных вызванных потенциалов на вспышку ( $p < 0,05$ ).

6.3. Отмечено менее выраженное истончение перипапиллярного слоя нервных волокон сетчатки по показателю средней толщины у пациентов с остротой зрения 1,0 и менее по шкале LogMAR по сравнению с пациентами с низкими показателями визометрии ( $p < 0,05$ ).

6.4. В группе пациентов с наследственными оптическими нейропатиями на фоне инстилляций ПДТФ за период наблюдения до 2,5 лет выявлена положительная динамика остроты зрения по таблице Головина-Сивцева в отличие от контрольной группы ( $p < 0,05$ ).

6.5. Выявлена достоверная положительная динамика остроты зрения у пациентов с мутацией m.11778G>A, получавших ПДТФ, на протяжении 1-2,5 лет при сравнении с данными литературы ( $p < 0,01$ ). Клинически

значимое улучшение остроты зрения на 0,3 и более по шкале LogMAR установлено в 56% на фоне приема ПДТФ и в 13% случаев в контрольной группе. Клинически значимое ухудшение на 0,3 и более по шкале LogMAR отмечено в 14% случаев только в контрольной группе.

### **Практические рекомендации**

1. При отсутствии у пациентов с наследственной оптической нейропатией Лебера одной из трех наиболее часто встречающихся первичных мутаций мтДНК (m.14484T>C, m.3460G>A, m.11778G>A) рекомендовано проводить секвенирование мтДНК, а при подозрении на аутосомно-доминантную оптическую нейропатию – секвенирование гена *OPA1* с последующим полногеномным секвенированием яДНК.
2. При отсутствии генетического подтверждения диагноза оптической нейропатии Лебера или при обнаружении новой потенциально патогенной замены мтДНК необходимо проведение цитологических исследований (респирометрия или оценка цитотоксического действия параквата) с целью подтверждения митохондриальной природы заболевания.
3. Для оценки динамики низкой остроты зрения, в том числе «счет пальцев» и «движение руки» у пациентов с наследственной оптической нейропатией предпочтительным методом является Фрейбургский тест, позволяющий повысить объективность и точность измерений.
4. При постановке диагноза наследственной оптической нейропатии необходимо раннее начало патогенетической терапии, одним из вариантов которой является назначение глазных капель с митохондриально-адресованным антиоксидантом ПДТФ в концентрации 0,155 мкг/мл (Визомитин®) по 1-2 капли 3-4 раза в день. Длительность терапии составляет не менее 1 года и может быть увеличена при наличии положительной динамики.
5. Целесообразно предварительное тестирование культуры фибробластов пациентов с наследственной оптической нейропатией с целью выявления чувствительности к действию назначаемого препарата.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шеремет Н.Л., Ронзина И.А., Галоян Н.С., Ханакова Н. А., Жоржолодзе 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.
2. Шеремет Н.Л., Ханакова Н.А., Невиницына Т.А., Цыганкова П.Г., Иткис Ю.С., Крылова Т.Д., Логинова А.Н., Чухрова А.Л., Венкова Л.С., Свистунова Д.М., Черноиваненко И.С., Захарова Е.Ю., Поляков А.В., Минин А.А. Современные возможности и перспективы изучения патогенеза, диагностики и лечения наследственных оптических нейропатий// **Вестник офтальмологии.** – 2014. – Т.130, №6. – С.62-70.
3. Krylova T., Tsygankova P., Itkis Y.S., Sheremet N.L., Nevinityna T.A., Malakhova V.A., Zakharova E.Y. Respirometry in blood and fibroblasts of LHON patients. *J Inherit Metab Dis* (2015) 38 (Suppl 1):S221-222.
4. Невиницына Т.А., Ханакова Н.А., Крылова Т.Д., Иткис Ю.С., Цыганкова П.Г., Логинова А.Н., Поляков А.В., Захарова Е.Ю., Шеремет Н.Л. Редкие мутации митохондриальной ДНК в развитии наследственной оптической нейропатии Лебера. Российский общенациональный офтальмологический форум, 8-й. Сб. науч. тр.: В 2 т./ Под ред. В.В.Нероева. – М.: Апрель, 2015. Т.1. – С. 242-245.
5. Невиницына Т.А., Ханакова Н.А., Крылова Т.Д., Иткис Ю.С., Цыганкова П.Г., Захарова Е.Ю., Шеремет Н.Л. Фибробласты кожи пациентов – модель для биохимических исследований при наследственной оптической нейропатии Лебера. Российский общенациональный офтальмологический форум, 8-й. Сб. науч. тр.: В 2 т./ Под ред. В.В. Нероева. – М.: Апрель, 2015. Т.2. – С. 866-868.
6. Невиницына Т.А., Ханакова Н.А., Жоржолодзе Н.В., Ронзина И.А., Остапенко В., Гуляева Е.С., Почуприна А.А., Лямзаев К.Г., Каргер Е.М., Шеремет Н.Л. Применение митохондриально направленных антиоксидантов в качестве патогенетической терапии наследственных оптических нейропатий. XVI Научно-практическая нейроофтальмологическая конференция «Актуальные вопросы нейроофтальмологии». - Москва. – 2016. – С.62-64.
7. Невиницына Т.А., Шеремет Н.Л. Молекулярные механизмы митохондриальных заболеваний зрительного нерва и возможности патогенетического лечения // **Вестник офтальмологии.** – 2016. – Т.132. №1. – С.91-97.
8. Невиницына Т.А., Крылова Т.Д., Иткис Ю.С., Цыганкова П.Г., Захарова Е.Ю., Токарчук А.В., Пантелеева А.А., Лямзаев К.Г., Шеремет Н.Л. Подтверждение патогенности новой мутации мтДНК при наследственной оптической нейропатии Лебера. Невские горизонты-2016: Материалы научной конференции офтальмологов / СПбГПМУ. – СПб.: Политехника-сервис, 2016. – С. 505-506.
9. Krylova T., Tsygankova P., Itkis Y.S., Sheremet N.L., Nevinityna T.A., Zakharova E.Y. High-resolution respirometry in fibroblasts of mitochondrial complex I deficiency patients. 19th European Bioenergetics Conference. Lecture and poster abstracts. 2016. P. 123.
10. Шеремет Н.Л., Невиницына Т.А., Жоржолодзе Н.В., Ронзина И.А., Иткис Ю.С., Крылова Т.Д., Цыганкова П.Г., Малахова В.А., Захарова Е.Ю., Токарчук А.В., Пантелеева А.А., Каргер Е.М., Лямзаев К.Г., Аветисов С.Э. Доказательство патогенности ранее неклассифицированной мутации мтДНК m.3472T>C при оптической нейропатии Лебера// **Биохимия.** – 2016 – Т.81. №7. – С. 982-990. Sheremet N.L., Nevinityna T.A., Zhorzholadze N.V., Ronzina I.A., Itkis Y.S., Krylova T.D., Tsygankova P.G., Malakhova V.A., Zakharova E.Y., Tokarchuk A.V., Panteleeva A.A., Karger E.M., Lyamzaev K.G., Avetisov S.E. Previously Unclassified Mutation of mtDNA

- m.3472T>C: Evidence of Pathogenicity in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Biochemistry (Mosc)*. 2016 Jul;81(7):748-54.
11. Невиницына Т.А., Шеремет Н.Л., Крылова Т.Д., Иткис Ю.С., Цыганкова П.Г., Захарова Е.Ю., Токарчук А.В., Пантелеева А.А., Лямзаев К.Г. Новый способ диагностики наследственной оптической нейропатии Лебера с использованием фибробластов кожи пациента. Российский общенациональный офтальмологический форум, 9-й. Сб. науч. тр.: В 2 т./ Под ред. В.В. Нероева. – М.: Апрель, 2016. Т.1. – С. 219-222.
  12. Шеремет Н.Л., Невиницына Т.А., Ханакова Н.А., Крылова Т.Д., Иткис Ю.С., Цыганкова П.Г., Захарова Е.Ю., Токарчук А.В., Пантелеева А.А., Лямзаев К.Г. Диагностика митохондриальных оптических нейропатий. XVII Научно-практическая нейроофтальмологическая конференция «Актуальные вопросы нейроофтальмологии». - Москва. – 2017. – С.89-91.
  13. Nevinitzyna T.A., Sheremet N.L., Zhorzholadze N.V., Itkis Y.S., Krylova T.D., Tsygankova P.G., Zakharova E.Y., Tokarchuk A.V., Panteleeva A.A., Karger E.M., Lyamzaev K.G. A case of LHON caused by m.3472T>C mutation. *Euromit 2017, International meeting on mitochondrial pathology. Abstract book*. 2017. P. B 28
  14. Nevinitzyna T.A., Sheremet N.L., Itkis Y.S., Krylova T.D., Tsygankova P.G., Zakharova E.Y., Tokarchuk A.V., Panteleeva A.A., Karger E.M., Lyamzaev K.G. Using of paraquat in LHON diagnostics. *Euromit 2017, International meeting on mitochondrial pathology. Abstract book*. 2017. P. B 44
  15. Sheremet N.L., Nevinitzyna T.A., Khanakova N.A., Zhorzholadze N.V., Ronzina I.A., Vygodin V.A., Gulyaeva E.S., Skulachev M.V., Karger E.M. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in the therapy of LHON. *Euromit 2017, International meeting on mitochondrial pathology. Abstract book*. 2017. P. C 95
  16. Krylova T.D., Tsygankova P.G., Itkis Y.S., Sheremet N.L., Nevinitzyna T.A., Mikhaylova S.V., Zakharova E.Y. High resolution respirometry in diagnostic of mitochondrial complex I deficiency. *Euromit 2017, International meeting on mitochondrial pathology. Abstract book*. 2017. P. B 36
  17. Крылова Т.Д., Цыганкова П.Г., Иткис Ю.С., Шеремет Н.Л., Невиницына Т.А., Михайлова С.В., Захарова Е.Ю. Респирометрия высокого разрешения в диагностике митохондриальных заболеваний с нарушением работы I комплекса дыхательной цепи митохондрий // **Биомедицинская химия. –2017. – Т.63 №4. С.327-333.**
  18. Шеремет Н.Л., Невиницына Т.А., Ханакова Н.А., Жоржоладзе Н.В., Ронзина И.А., Гуляева Е.С., Выгодин В.А., Лямзаев К.Г., Пантелеева А.А., Логачева М.Д., Крылова Т.Д., Иткис Ю.С., Цыганкова П.Г., Захарова Е.Ю., Коновалов Ф.А., Скулачев М.В., Каргер Е.М. Митохондриально-направленный антиоксидант в терапии наследственных оптических нейропатий X Российский общенациональный офтальмологический форум. Сб. науч. тр.: В 2 т./ Под ред. В.В. Нероева. – М.: Апрель, 2017. Т.1. – С. 143-146.

#### **Изобретения по теме диссертации**

1. Шеремет Н.Л., Невиницына Т.А., Лямзаев К.Г., Пантелеева А.А., Токарчук А.В., Иткис Ю.С., Крылова Т.Д., Цыганкова П.Г. Патент РФ на изобретение №2617803 от 26.04.2017 «Способ диагностики наследственной оптической нейропатии Лебера». Опубликовано: 26.04.2017 Бюл. № 12.

## СПИСОК ПРИМЕНЯЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДОН – аутосомно-доминантная оптическая нейропатия	НОН – наследственные оптические нейропатии
АФК – активные формы кислорода	НОНЛ – наследственная оптическая нейропатия Лебера
ГКС – ганглиозные клетки сетчатки	ОКТ – оптическая когерентная томография
ДЗН – диск зрительного нерва	ОФ – окислительное фосфорилирование
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	ПЭЧ – порог электрической чувствительности
ДЦМ – дыхательная цепь митохондрий	СНВС – слой нервных волокон сетчатки
ЗВП – зрительные вызванные потенциалы	ЭФИ – электрофизиологические исследования
КЧСМ – критическая частота слияния мельканий	ядНК – ядерная ДНК
ЛЗН – лабильность зрительного нерва	
мтДНК – митохондриальная ДНК	