

**Лекция 3. Вне расписания
Диагностика и лечение
митохондриальных болезней**

Как заподозрить митохондриальную патологию?

Для митохондриальных заболеваний типичны сочетанное поражение разных органов и одновременное проявление внешне не связанных между собой аномалий:

- ✓ Глухота с наружной офтальмоплегией, птозом и ретинопатией;
- ✓ Диабет с глухотой;
- ✓ Задержка развития или потеря навыков и офтальмоплегия, офтальмопарез;
- ✓ Мигрени с мышечной слабостью;
- ✓ Наружная офтальмоплегия с нарушением проводимости сердечной мышцы и мозжечковой атаксией;
- ✓ Низкорослость с миопатией и инсультоподобными эпизодами;
- ✓ Тошнота, рвота с оптической атрофией и кардиомиопатией;
- ✓ Экзокринная дисфункция поджелудочной железы с сидеробластной анемией.

Диагностика митохондриальных болезней

1. Изучение окислительно-восстановительного статуса клетки – определение концентрации:
 - лактата, пирувата и кетоновых тел в крови до и после пищевой нагрузки;
 - лактата, пирувата и кетоновых тел в крови после нагрузки глюкозой;
 - лактата в ЦСЖ.
2. Морфологическое исследование мышечного биоптата
 - «Рваные красные волокна»;
 - Гистохимическое определение ферментов (лактат- и пируватдегидрогеназ).
3. Определение активности ферментов
4. ДНК-диагностика, анализ мутаций:
 - мтДНК,
 - яДНК.

І этап

(первичный скрининг на митохондриальное заболевание)

Лактат-ацидемия ($>2,0\text{мМ}$)

Лактат/пируват (>25)

Лактат/пируват (10-20)

3-ОН-бутират/
ацетоацетат
(<1)

3-ОН-бутират/
ацетоацетат
(>1)

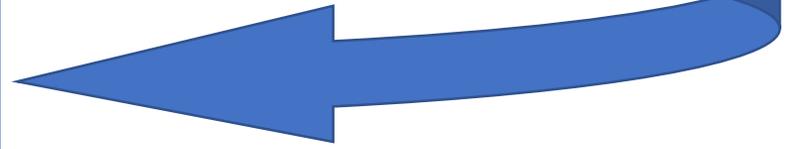
Дефекты
метаболизма
пирувата

Дефекты
метаболизма
пирувата

Дефекты
дыхательной
цепи
митохондрий

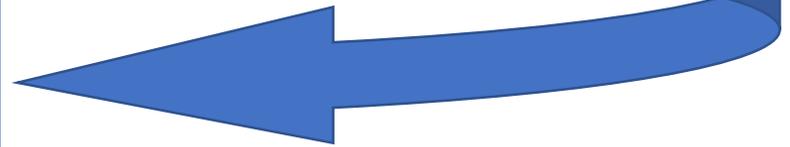
Концентрация лактата в референтных пределах

- Синдром LHON (всегда)
- Синдром KSS/CPRO (часто)



Концентрация лактата повышена

Синдром MERRF
Синдром MELAS
Синдром Ли
МБ, обусловленные мутациями
яДНК



II этап (Морфологические маркеры)

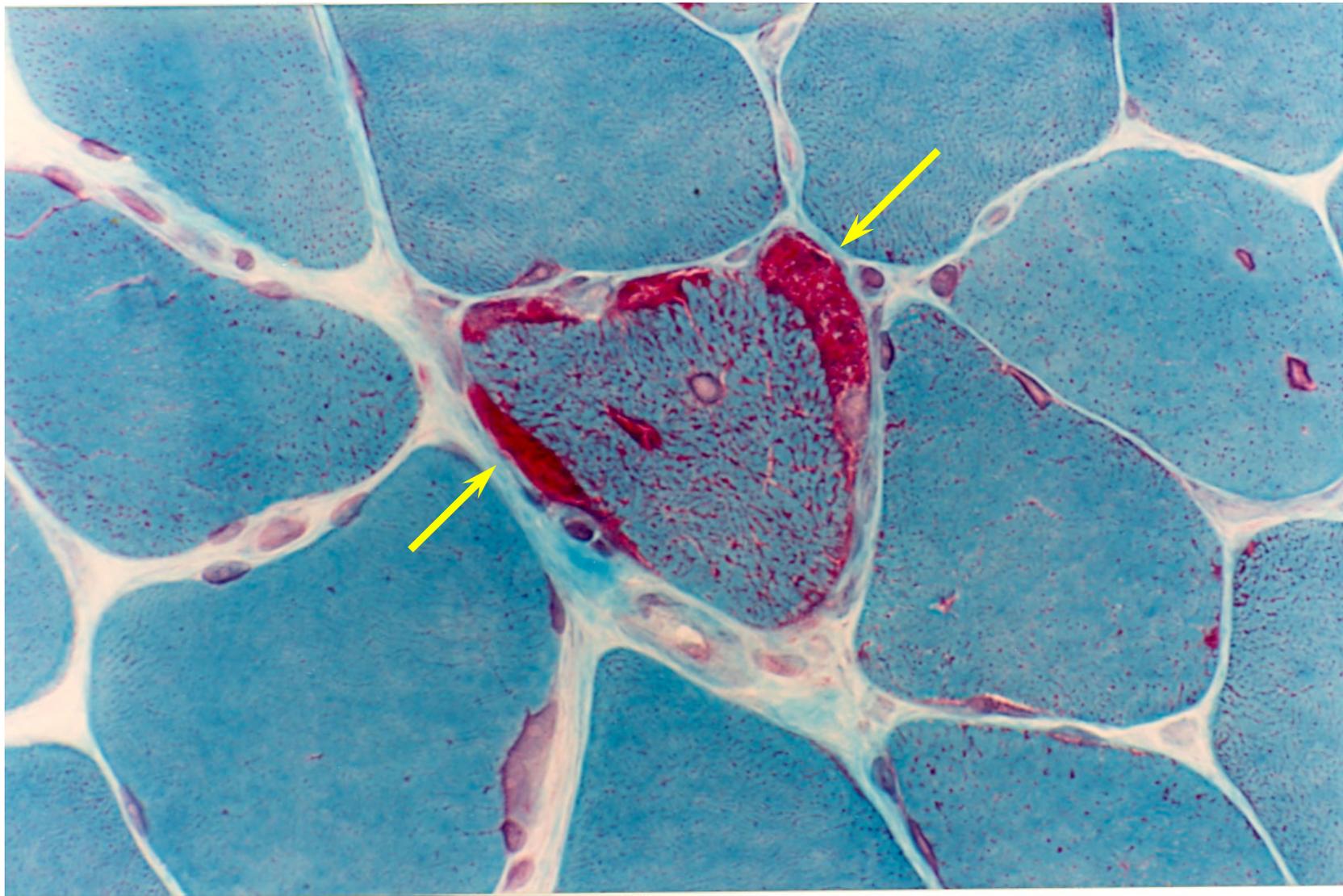
Морфологические изменения в мышечной ткани обусловлены периферическим субсарколемным и межфибрилярным накоплением аномальных митохондрий.

Трехцветная окраска по Гомори – RRF (красные миофибриллы с рваными краями). Не является ни очень чувствительным, ни очень специфичным тестом для выявления пролиферации митохондрий.

Гистохимические методы окраски на сукцинатдегидрогеназу (SDH) и цитохром с оксидазу (Cox). SDH-позитивные миофибриллы являются убедительными маркерами пролиферации митохондрий. Наличие SDH-негативных и Cox-негативных миофибрилл характерно для различных клинических фенотипов, обусловленных мутациями яДНК и мтДНК.

Рваные красные волокна, трехцветная окраска по Гомори
Muscle biopsy-Gomori Trichrome stain showing a ragged red
fibre (RRF)

From https://www.newcastlelaboratories.com/lab_service/histopathology-laboratory-services/



Морфологические маркеры

- **Позволяют подтвердить, но не установить диагноз**
- Не позволяют точно установить форму заболевания
- Не характерны для синдромов LHON, NARP, болезни Ли и некоторых МБ, обусловленных мутациями яДНК

III этап

Определение активности ферментов в тканях

Достоинства

- Позволяют точно установить диагноз, если обнаружено значимое снижение активности фермента
- При некоторых формах МБ активность ферментов может иметь пограничные значения
- Активность фермента может быть снижена только в определенных тканях

Недостатки

- Крайне дорогостоящие методы
- Требуют большого количества биологического материала

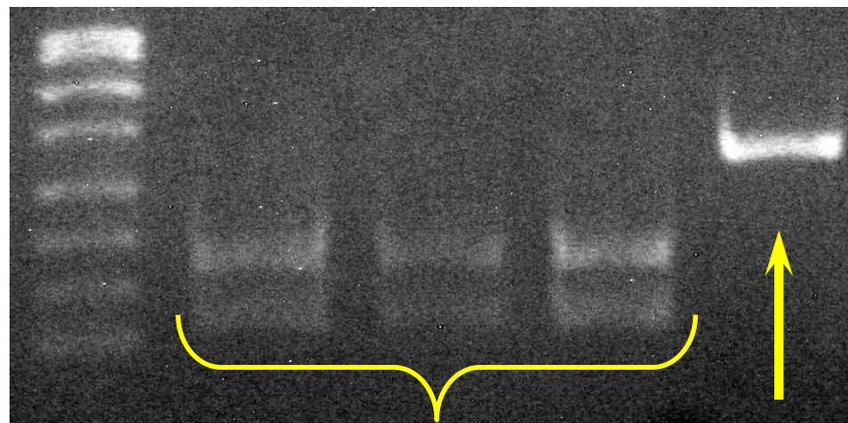
IV этап

ДНК-диагностика, анализ мутаций

Точковые мутации

мтДНК

Анализ ПДРФ



норма

11778А

(синдром LHON)

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) – это процедура исследования молекулы ДНК с использованием таких технологических инструментов, как:

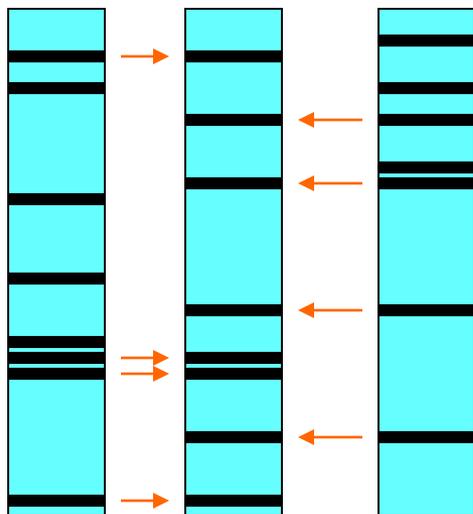
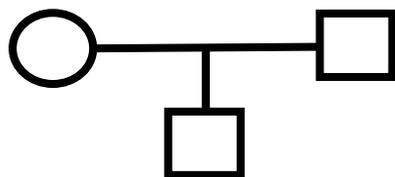
- полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- гель-электрофорез;
- саузерн-блоттинг.

Методика основана на сравнении длин определенных участков ДНК, потенциально содержащих поврежденный ген.

ДНК-фингерпринтинг

многолокусный

Блот-гибридизация ДНК-ДНК по Саузерну



ДНК-зонды

**Последовательности,
повторяющиеся в геноме**

**Полиморфизм длин рестрикционных
Фрагментов – (RFLP - Restriction
Fragment Length Polymorphism)**

30-40 полос

IV этап

ДНК-диагностика, анализ мутаций

ДНК-анализ на распространенные мутации мтДНК позволяет точно установить диагноз, если мутации обнаружены.

Неравномерное распределение мутантной мтДНК требует использования ДНК, выделенной из различных тканей.

Наличие множества ядерных генов, приводящих к МБ затрудняет ДНК-диагностику заболеваний, обусловленных мутациями яДНК.

Как диагностировать митохондриальную аномалию?

Свежую мышцу анализируют гистологически и гистохимически



«Рваные» мышечные волокна выявляются при окраске на сукцинатдегидрогеназную активность или с помощью трехцветной окраски по Гомори

Проводятся измерения активности отдельных звеньев комплексов дыхательной цепи



свежая
мышца

культура
фибробластов

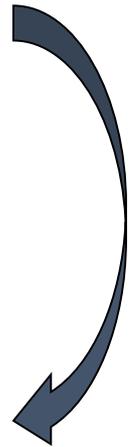
Если обнаруживается дефект в одном звене, это указывает на мутацию соответствующей субъединицы (**я** или **м**), если дефекты множественные – возможен дефект мт тРНК либо ядерных генов, участвующих в работе митохондрий

Как диагностировать митохондриальную аномалию?

Иногда дефект проявляется при нагрузке (NARP синдром при мутации гена *ATPase6*) – нужно клиническое тестирование:

физические нагрузки с замерахми лактата, магнитно-резонансной или инфракрасной спектроскопией

Наконец, в случае еще не описанных, редких «private» мутаций проводят прямое секвенирование мтДНК



Если у больного митохондриопатия, то



после перенесенных инфекционных заболеваний его состояние может резко ухудшиться

также отягощают состояние

стресс, голодание, переохлаждение,
продолжительная обездвиженность,
прием седативных средств

Осторожно применять местную и общую анестезию – можно спровоцировать синдром злокачественной гипертермии!

Лечение митохондриальных болезней – насколько это реально?

Вылечить от митохондриального заболевания сегодня невозможно

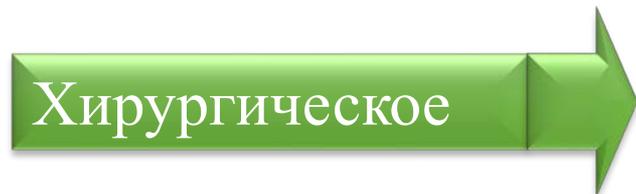
Применяется симптоматическое лечение:



Физиотерапия, аэробная гимнастика,
умеренные и легкие нагрузки



Анти-эпилептические
препараты, гормоны, витамины,
метаболиты, кофакторы



Блефаропластика, имплантация cochlear,
трансплантация сердца, почек, печени,
подкожная эндоскопическая гастротомия,
cricopharyngeal миотомия

Терапия митохондропатий

- ✓ Метаболическая терапия (карнитин, бикарбонат натрия, дихлорацетат с целью активации пируватдегидрогеназы и снижения уровня лактата (при этом возможно развитие тиаминовой недостаточности или полиневропатии при длительном использовании)).
- ✓ В критических случаях – метиленовый синий в разовой дозе 2мг/кг.
- ✓ Адекватное использование жидкости и электролитов
- ✓ Избегать длительного голодания и многоуглеводистой пищи.
- ✓ Кетогенная диета + янтарная кислота.
- ✓ Избегать длительных больших физических нагрузок.
- ✓ Своевременное и эффективное лечение лихорадки.

Терапия митохондропатий

- ✓ Эффективное лечение эпилепсии.
- ✓ Кофермент Q10 дважды на день по 4-5 мг/кг/сут.
- ✓ Рибофлавин 3-20 мг/кг/сут в 4 приема.
- ✓ Витамин К3(менадион) по 1мг/кг или 0,4мг/кг/сут.
- филлохинона (К1) вместе с вит С 50-60мг/кг.
- ✓ Сукцинат натрия 6мг/кг.
- ✓ Тиамин по 25-30 мг/кг – при недостаточности пируватдегидрогеназы.
- ✓ Альфа-липолиевая кислота по 5-50 мг.
- ✓ Токоферол (вит Е) 100-1000 мг/кг.
- ✓ Креатин по 4-10 г в день при митохондриальных миопатиях.
- ✓ **Кортикостероиды не применять!**

Терапия митохондропатий

Другой подход – уменьшить соотношение

мутантная : нормальная мтДНК

I. Увеличить количество немутантных молекул путем

«сдвига генов»

У некоторых больных с миопатией % мутантной мтДНК в сателлитных клетках ниже, чем в скелетной мышце



Обычно сателлитные клетки пролиферируют и сливаются со скелетными миофибриллами в ответ на стресс или упражнение



Индуцируется пролиферация сателлитных клеток в скелетных мышцах



Пропорция нормальных мтДНК молекул в мышце увеличивалась – дефект скорректировался

Терапия митохондропатий

II. Уменьшить количество мутантных молекул мтДНК

Разработка синтетических молекул, **избирательно связывающихся** с мутантными ДНК и **блокирующих их репликацию**

Введение в митохондрии фермента **рестриктазы**, избирательно разрушающего мутантную ДНК

Успех достигнут пока только *in vitro*

Терапия митохондропатий

«Молекулярно-внутриклеточная реконструкция»

Импорт из цитоплазмы нормальных тРНК вместо
дефектных митохондриальных

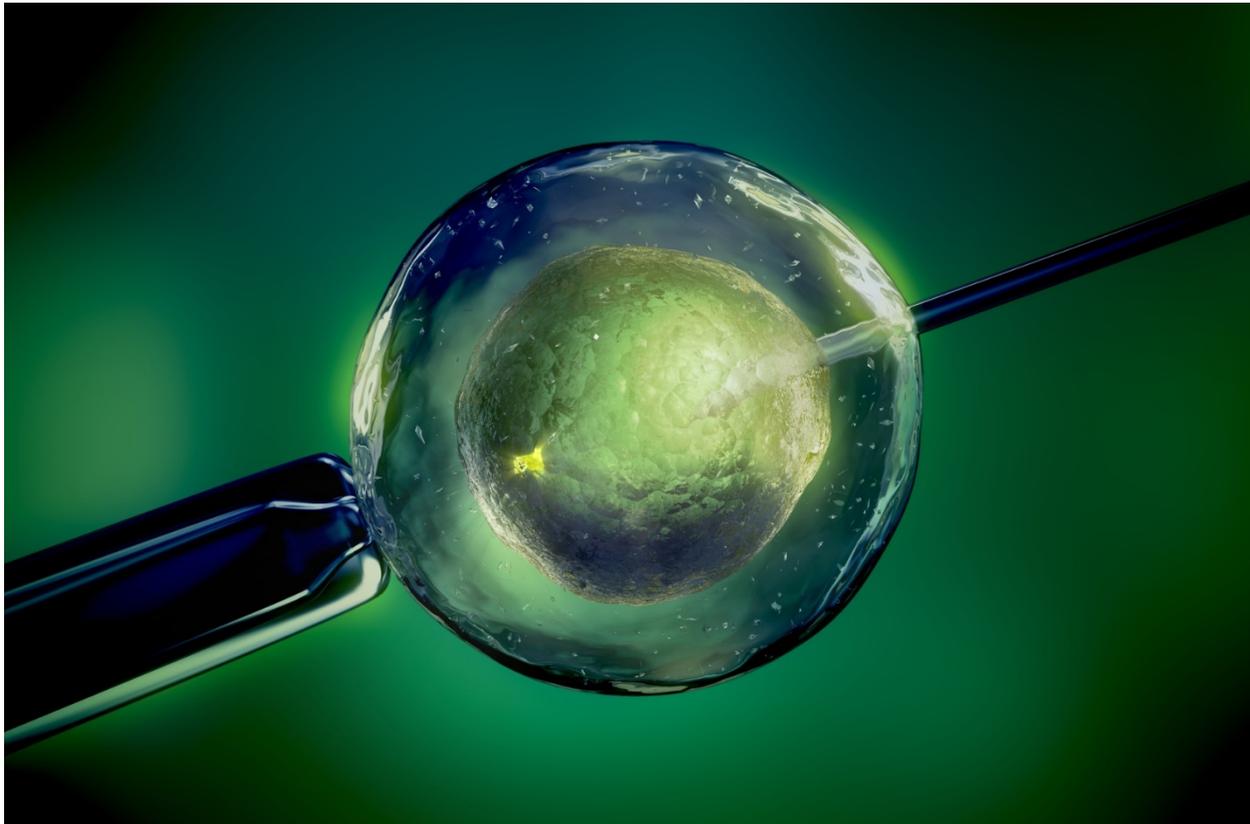
Замена дефектного комплекса дыхательной цепи на нормальный,
полученный из другого организма (дрожжей)

Все эти подходы – в стадии экспериментальной разработки

Терапия митохондропатий

Зачатие детей от трех родителей по методике, разработанной казахстанско-американским биологом Шукратом Миталиповым.

Пересадка ядра яйцеклетки, содержащей мутантные митохондрии, в яйцеклетку с нормальными митохондриями.



Оплодотворяется спермой одного мужчины две яйцеклетки – донорская с нормальными митохондриями и материнская – с дефектными митохондриями.

Из донорской яйцеклетки удаляется ядро и на его место помещается ядро из материнской яйцеклетки.

В результате получаем гибридную яйцеклетку с нормальным митохондриальным геномом от женщины-донора яйцеклетки и ядерным геномом от женщины-носительницы митохондриальной патологии и ее мужа.

Таким образом ребенок получил геномы от трех родителей.

Ряд препаратов провоцирует митохондриальные заболевания или отягощает их течение

Вальпроат: увеличивает частоту судорог при MELAS, гепатотоксичен

Аспирин, фенобарбитал

Кортикостероиды

Тетрациклин, хлорамфеникол

Аминогликозиды стрептомицин, гентамицин, амикацин, неомицин, канамицин – ототоксичны

Этамбутол (провоцирует проявление LHON)

Статин (провоцирует проявление MELAS)

Антиретровирусные препараты, используемые для лечения ВИЧ: AZT – zidovudine, doxorubicin вызывают делецию мтДНК

Список далеко не полный!