

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИМЕНИ АКАДЕМИКА Н.П.
БОЧКОВА»**

На правах рукописи

Крылова Татьяна Дмитриевна

**БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНЫХ
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Специальность 1.5.7. – Генетика

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук
Захарова Екатерина Юрьевна

Москва - 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
Актуальность темы исследования.....	7
Степень разработанности темы.....	8
Цель исследования:.....	9
Задачи, решаемые в ходе исследования:	9
Научная новизна	10
Теоретическая и практическая значимость работы	10
Методология и методы диссертационного исследования	11
Положения, выносимые на защиту.....	11
Степень достоверности результатов	12
Апробация работы	13
Личный вклад автора в проведение исследования.....	13
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	14
Публикации	14
Структура и объем диссертации	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Митохондрии - структура, функции, общие данные	16
1.2 Дыхательная цепь митохондрий	17
1.2.1 Комплекс дыхательной цепи митохондрий I (НАДФ-дегидрогеназа).....	19
1.2.2 Комплекс дыхательной цепи митохондрий II.....	19
1.2.3 Комплекс дыхательной цепи митохондрий III	20
1.2.4 Комплекс дыхательной цепи митохондрий IV	21
1.2.5 Митохондриальная АТФ-синтаза	22
1.2.6 Разобщенное дыхание	23
1.2.7 Суперкомплексы дыхательной цепи митохондрий.....	24
1.3 Активные формы кислорода (АФК)	24
1.4 Митохондриальные протеазы.....	25
1.5 Митохондриальная ДНК.....	25
1.5.1 Феномен гетероплазмии мтДНК.....	26
1.6 Классификация МЗ	26
1.6.1 Первичные и вторичные МЗ.....	27
1.6.2 Дифференциальная диагностика первичных митохондриальных заболеваний	34
1.7 Подходы к диагностике ПМЗ	34
1.7.1 Биохимические маркеры ПМЗ	38

1.7.2 Исследование структуры комплексов ДЦМ	42
1.7.3 Определение активности КДЦМ.....	43
1.7.4 Иммуногистохимические исследования	43
1.7.5 Исследование скорости потребления кислорода (респирометрия)	44
1.7.6 Экспериментальные модели ПМЗ	46
1.7.7 Омиксные подходы в изучении ПМЗ	47
1.8 Подходы к лечению ПМЗ.....	50
1.9 Пренатальная диагностика.....	52
1.10 Заключение по главе 1	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1 Выборки пациентов	55
2.2. Молекулярно-генетические методы	57
2.2.1 Выделение ДНК	57
2.2.2 Мультиплексная лигазно-зависимая амплификация проб (MLPA)	57
2.2.3 ПЦР и последующее секвенирование амплификационных фрагментов	59
2.2.4 ПЦР протяженных фрагментов (Long-Range PCR).....	60
2.2.5 Таргетное секвенирование	60
2.2.6 Полный анализ последовательности мтДНК	60
2.3 Определение концентрации органических кислот в моче методом ГХ-МС	61
2.4 Определение концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 в плазме крови.....	62
2.5 Культивирование фибробластов кожи	62
2.6 Высокоразрешающая респирометрия.....	62
2.6.1 Высокоразрешающая респирометрия с использованием интактного протокола	64
2.6.2 Высокоразрешающая респирометрия с использованием пермеабиллизованного протокола.....	65
2.7 Определение активности цитрат-синтазы.....	66
2.8 Статистическая обработка данных	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	68
3.1 Характеристика исследуемой выборки	68
3.2 Изучение особенностей спектра органических кислот мочи у пациентов с ПМЗ....	70
3.2.1 Метаболиты нарушения соотношения редокс-пары НАДН/НАД ⁺	72
3.2.2 Метаболиты цикла Кребса.....	75
3.2.3 Метаболиты нарушения функции печени: 4-гидроксифениллактат и 4-гидроксифенилпируват	78
3.2.4 Диагностические характеристики спектра метаболитов у пациентов с ПМЗ....	80
3.2.5 Особенности распределения метаболитов в отдельных группах ПМЗ.....	82

3.2.6 Особенности спектра органических кислот в моче у пациентов в зависимости от функциональной группы	84
3.2.7 Заключение	86
3.3 Исследование уровня плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15 в группе пациентов с ПМЗ и другими моногенными заболеваниями	88
3.3.1. Плазменный цитокин FGF-21	88
3.3.2 Плазменный цитокин GDF-15	93
3.3.3 Применение FGF-21 и GDF-15 как диагностических маркеров	95
3.3.4 Заключение	99
3.4 Высокора разрешающая респирометрия на ККФ пациентов с ПМЗ и контрольной группы	102
3.4.1 Респирометрический анализ: валидация метода и анализ контрольных ККФ	103
3.4.2 Валидация метода респирометрии на ККФ пациентов с известными патогенными мутациями ПМЗ	106
3.4.3 Респирометрический анализ вариантов неясной значимости	112
3.4.4 Ограничения метода респирометрии	117
3.4.5 Респирометрический анализ: значение метода в диагностике митохондриальных болезней	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
ВЫВОДЫ	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	125
СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128
ПРИЛОЖЕНИЯ	146

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МЗ - митохондриальные заболевания

ПМЗ - первичные митохондриальные заболевания

OXPHOS (акроним OXidative PHOSphorylation) - окислительное фосфорилирование

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

мтДНК - митохондриальная ДНК

ДЦМ - дыхательная цепь митохондрий

КДЦМ - комплекс дыхательной цепи митохондрий

НАД⁺ - никотинамидадениндинуклеотид, окисленная форма

НАДН - никотинамидадениндинуклеотид, восстановленная форма

ФАД - флавинадениндинуклеотид

ФАДН₂ - 1,5 - дигидрофлавинадениндинуклеотид

АДФ - аденозиндифосфорная кислота

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

ИМП - интермембранное пространство

АФК - активные формы кислорода

FCSP - карбонилцианид п-трифтор-метоксифенилгидразон

НОНЛ - наследственная оптическая нейропатия Лебера

ЦСЖ - цереброспинальная жидкость

БМ - биомаркер

ПААГ - полиакриламидный гель

NGS - (англ. Next Generation Sequencing) секвенирование нового поколения

WES - (англ. Whole Exome Sequencing) полноэкзомное секвенирование

WGS - (англ. Whole Genome Sequencing) полногеномное секвенирование

MLPA - (англ. Multiplex ligation-dependent probe amplification) мультиплексная амплификация лигазо-зависимых проб

ПЦР - полимеразная цепная реакция

dNTP - смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов

MIR05 - (англ. Mitochondrial Respiration Medium 05) - дыхательная среда для анализа потребления кислорода митохондриями в клетках/тканях методом респиromетрии

DTNB - 5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота)

ГХ-МС - газовая хроматография с последующей детекцией масс-спектрометрией

ТМС - тандемная масс-спектрометрия

ККФ – линия диплоидных клеток кожных фибробластов

KSS (англ. Kearns-Sayre syndrome) - синдром Кирнс-Сейра

РЕО (англ. Progressive External Ophthalmoplegia) - прогрессирующая наружная офтальмоплегия

MELAS (акроним от англ. Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) - митохондриальная энцефалопатия, лактат-ацидоз и инсультоподобные состояния

ОМIM (акроним от англ. Online Mendelian Inheritance in Man) – онлайн-база «менделевское наследование у человека» (<https://omim.org/>)

ТМПД (TMPD) - N, N, N', N'-тетраметил-п-фенилендиамин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Первичные митохондриальные заболевания (ПМЗ) относятся к классу наследственных болезней обмена веществ и обусловлены нарушением структуры и функции системы окислительного фосфорилирования (ОХРНОС) митохондрий. Поскольку митохондрии находятся под двойным генетическим контролем, к данным заболеваниям могут приводить мутации в ядерных генах, а также в митохондриальной ДНК (мтДНК). Известно более 300 ядерных генов и около 300 патогенных мутаций в мтДНК, что обуславливает крайнюю генетическую и клиническую гетерогенность (даже в пределах одного гена) ПМЗ [Wagner M. et al., 2019].

Суммарная частота ПМЗ составляет 1:5000 живых новорожденных, что позволяет отнести эту группу к одним из самых частых среди наследственных болезней обмена веществ [Parikh S. et al., 2017].

Несмотря на то, что молекулярная природа многих ПМЗ известна, их патогенез все еще не изучен. Эффективной терапии ПМЗ в настоящее время не существует, тактика лечения заключается в симптоматической терапии, однако существует ряд экспериментальных подходов (генная терапия, нуклеозид-заместительная терапия).

Универсального биомаркера (БМ) для ПМЗ не выявлено, однако анализ ряда метаболитов помогает в установлении диагноза. Повышение уровня лактата, пирувата, метаболитов цикла Кребса в биологических жидкостях являются индикаторами наличия митохондриальной патологии. Выявление особенностей спектра органических кислот мочи при различных формах ПМЗ до настоящего времени на больших выборках не проводилось, но это может быть полезным как для дифференциальной диагностики, так и для понимания механизмов патогенеза этих заболеваний.

Цитокины FGF-21 и GDF-15, концентрация которых повышается у пациентов с ПМЗ в плазме крови, являются многообещающими БМ, однако их чувствительность и специфичность оценена по-разному и требует дальнейшего изучения на большей выборке пациентов [Boenzi S., Diodato D., 2018].

В связи с феноменом гетероплазмии мтДНК, а также тканеспецифичности биохимического дефекта, «золотым стандартом» диагностики, в особенности у взрослых,

являются исследования биоптата мышечной ткани – гистохимическое окрашивание на наличие рваных красных волокон, SDH – и COX – окраска, электронная микроскопия, исследование скорости потребления кислорода митохондриями, а также измерение активности отдельных комплексов дыхательной цепи митохондрий. Биопсия мышцы является инвазивной процедурой и существуют ограничения для ее проведения у детей. В ряде работ показано, что исследование функции дыхательной цепи митохондрий можно проводить в линиях клеток кожных фибробластов (ККФ). При этом важным является оценка эффективности данного подхода при различных мутациях как ядерной, так и митохондриальной ДНК.

Поиск наиболее эффективных для диагностики метаболитов и оценка нарушений функции дыхательной цепи митохондрий при разных формах ПМЗ играют важную роль в их диагностике, подтверждении патогенности новых выявленных генетических вариантов и генов, а также для разработки терапевтических подходов для ПМЗ и мониторинга состояния пациентов.

Степень разработанности темы

В 2004 году Varshor впервые провел исследование концентрации метаболитов (таргетный метаболит) в моче пациентов с клиническим диагнозом ПМЗ, однако диагноз у данных пациентов не верифицирован молекулярно-генетическими методами [Varshor В.А., 2004]. В 2017 году Alban с соавторами исследовала уровень органических кислот в моче у 75 пациентов, диагноз “митохондриального заболевания” которым поставлен только на основании снижения активностей комплексов дыхательной цепи митохондрий (КДЦМ) и клинических данных [Alban С. et al, 2017].

В исследовании 2011 г. Suomalainen А. и соавт. показано, что концентрация цитокина FGF-21 в плазме крови повышается преимущественно у пациентов с митохондриальной патологией с вовлечением мышечной системы, а в 2014 г. Kalko S. с соавт. показали повышение уровня цитокина GDF-15 у пациентов с синдромом истощения мтДНК [Suomalainen А. et al., 2011; Kalko S.G. et al., 2014]. По литературным данным, сочетанное определение данных биомаркеров позволяет более эффективно проводить скрининг пациентов для дальнейшей биохимической и генетической диагностики [Varhaug K.N. et al., 2021; Huddar А. et al., 2021]. Несмотря на широкое

применение омиксных технологий (в частности, метаболомики и протеомики) в исследовании патогенеза ПМЗ, выявить высокоспецифичный и уникальный биомаркер ПМЗ до настоящего времени не удалось [Li H. et al., 2021].

Метод высокоразрешающей респирометрии применяют в исследованиях оценки скорости потребления кислорода митохондриями при различных патологических состояниях, связанных с нарушением функции митохондрий (болезнь Паркинсона, опухолевые процессы). При ПМЗ данный метод используется чаще для подтверждения патогенности новых генетических вариантов [Piekutowska-Abramczuk D. et al., 2018]. Однако в работе Bird в 2019 г. проведено исследование 34 линий диплоидных клеток кожных фибробластов (ККФ) пациентов с ПМЗ методом высокоразрешающей респирометрии, показывающее, что данный метод является более чувствительным и специфичным, чем измерение активностей отдельных КДЦМ спектрофотометрическим методом [Bird M.J. et al., 2019].

Данная работа выполнена в рамках научно-исследовательской деятельности ФГБНУ «МГНЦ» по исследованию болезней клеточных органелл и является первой отечественной работой, посвященной исследованию биохимических подходов к диагностике ПМЗ.

Цель исследования:

Изучить биохимические особенности первичных митохондриальных заболеваний и оценить информативность биохимических подходов к их диагностике.

Задачи, решаемые в ходе исследования:

1. Охарактеризовать особенности спектра и уровня органических кислот мочи, диагностическую значимость данного теста в различных группах пациентов с первичными митохондриальными заболеваниями.

2. Оценить диагностическую значимость анализа определения концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 в плазме периферической крови в различных группах пациентов с первичными митохондриальными заболеваниями.

3. Оценить основные показатели (соотношения) высокоразрешающего респирометрического анализа на линиях диплоидных клеток кожных фибробластов пациентов с первичными митохондриальными заболеваниями.

4. На линиях диплоидных клеток кожных фибробластов пациентов с вариантами неясного клинического значения (NM:032317: с.152A>G в гене *DNAJC30* и m.641A>T в гене *tRNA-Phe*) провести исследование скорости потребления кислорода методом высокоразрешающей респирометрии.

Научная новизна

Впервые в РФ изучен спектр и уровень метаболитов (таргетный метаболит) в моче на выборке пациентов с ПМЗ, оценена чувствительность, специфичность и диагностическая значимость концентрации метаболитов, связанных с нарушением редокс-пары НАДН/НАД⁺ в разных группах ПМЗ.

Проведена диагностическая оценка концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 в плазме крови больных с ПМЗ, полученные данные сопоставлены с данными пациентов с немитохондриальными наследственными заболеваниями, и демонстрируют, что данные биомаркеры не могут применяться в качестве высокоинформативных в диагностике ПМЗ.

Впервые изучены особенности функциональных изменений митохондрий при аутосомно-рецессивной форме нейропатии зрительного нерва Лебера с гомозиготным вариантом NM:032317: с.152A>G в гене *DNAJC30* и эпилептической энцефалопатией, обусловленной заменой m.641A>T в гене *tRNA-Phe*.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе работы определен спектр и уровень органических кислот в моче пациентов с ПМЗ, который позволяет оптимизировать биохимическую лабораторную диагностику данной группы заболеваний.

Полученные результаты определения концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-21 не позволяют внедрить данный анализ в диагностическую практику, однако вносят вклад в изучении биохимических особенностей пациентов с ПМЗ.

Введенный в практическую деятельность лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «МГНЦ» метод высокоразрешающей респирометрии на ККФ может эффективно применяться в качестве дополнительного критерия патогенности при обнаружении новых генетических вариантов неясной клинической значимости в ядерных генах или мтДНК у пациентов с ПМЗ.

Полученные результаты могут быть использованы в молекулярно-диагностических лабораториях, специализирующихся на ПМЗ, а также вносят вклад в изучение биохимических маркеров и биохимических процессов, характерных для ПМЗ и могут применяться для дальнейшей оптимизации диагностики ПМЗ.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологической и теоретической основой диссертационного исследования являлись научные работы отечественных и зарубежных исследователей в области изучения первичных митохондриальных заболеваний, их патогенеза, биохимических и функциональных подходов к их диагностике.

В выборку для исследования вошли пробанды с верифицированными молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ, которые направлены в ФГБНУ «МГНЦ» в период с 2016-2019 гг. Участниками исследования или их законными представителями подписано информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных. Проведение данного исследования одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ». В работе использованы общенаучные эмпирические (эксперимент, наблюдение, описание), теоретические (анализ, синтез, обобщение) и специальные методы (изучение литературных источников, молекулярно-генетические и биохимические методы, методы статистического анализа).

Положения, выносимые на защиту

1. Изменение концентрации органических кислот мочи является частым биохимическим отклонением у пациентов с первичными митохондриальными заболеваниями и зависит от конкретной патологии. Обнаружены характерные для митохондриальной гепатопатии, вызванной мутациями в гене *DGUOK*, метаболиты.

Анализ ROC-кривых показал убывание диагностической значимости в ряду: 3-гидроксибутират (AUC=0,9183), лактат (AUC=0,8575), пируват (AUC=0,8514). Повышение концентраций пирувата и 4-гидроксифениллактата может применяться при диагностике ПМЗ.

2. Концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 в плазме крови различались у пациентов с ПМЗ и в группе контроля. Не выявлено различий в этих показателях между пациентами с ПМЗ и другими немитохондриальными моногенными заболеваниями, что не позволяет использовать данные биомаркеры в качестве универсальных для ПМЗ.

3. Высокоразрешающая респирометрия является специфичным и чувствительным методом оценки работы митохондрий для диагностики ПМЗ, вызванных мутациями в генах, кодирующих структурные компоненты ДЦМ, но не может применяться для оценки изменений функций митохондрий при низком уровне гетероплазмии мутантных копий мтДНК в ККФ, а также при некоторых мутациях мтДНК (m.14484T>C, m.14487T>C и m.3635G>A).

4. Новые однонуклеотидные варианты NM:032317: c.152A>G в гене *DNAJC30*, а также m.641A>T в гене *tRNA-Phe* характеризуются наличием функциональных изменений митохондрий при респирометрическом анализе на ККФ.

Степень достоверности результатов

Работа проведена на выборке больных с ПМЗ из Российской Федерации, в которую вошли биообразцы 171 неродственного пробанда с клиническим диагнозом «митохондриальное заболевание», образцы которых поступили в лабораторию наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «МГНЦ» с 2016 по 2019 годы. Дополнительно собрано 107 образцов плазмы крови пациентов с другими (немитохондриальными) моногенными наследственными заболеваниями в качестве группы сравнения при исследовании концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15. Экспериментальные исследования проведены на репрезентативной выборке для каждого метода, интерпретация полученных результатов проведена с использованием методов статистической обработки данных. Теоретическую основу исследования составили многочисленные источники литературы, в число которых вошли как отечественные, так и зарубежные исследования. Полученные результаты подкреплены таблицами и

рисунками. Сделанные в ходе работы выводы полностью соответствуют поставленным задачам.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены на: VII съезде Общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, Россия, 2015); международном симпозиуме общества по исследованию врожденных болезней нарушения метаболизма SSIEM 2015 (Лион, Франция, 2015); XIX конференции по биоэнергетике EBEC2016 (Рива дель Гарда, Италия, 2016); международной конференции «Euromit 2017» (Кёльн, Германия, 2017); X международной школе по исследованию митохондриальной патологии MiPschool 2017 (Обергургль, Австрия, 2017); XX конференции по биоэнергетике EBEC2018 (Будапешт, Венгрия, 2018); международной конференции по исследованию митохондриальных заболеваний «Mitochondria in Human Disease» (Стокгольм, Швеция, 2019); международной виртуальной конференции сообщества ESHG «ESHG 2020» (Онлайн, 2020); IX съезде Общества медицинских генетиков (Москва, Россия, 2021).

Работа одобрена этическим комитетом и прошла экспертную комиссию, рекомендована к защите на заседании Диссертационного совета № 24.1.168.01 при ФГБНУ «МГНЦ».

Личный вклад автора в проведение исследования

Определение направления диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем д.м.н. Захаровой Е.Ю. Автором самостоятельно изучена отечественная и зарубежная литература по теме диссертации и лично написана рукопись данной работы. Автор непосредственно участвовал в подготовке материалов к публикациям по диссертационной теме и их написании. Измерение концентрации органических кислот в моче методом ГХ-МС и концентрации плазменных маркеров FGF-21 и GDF-15 проведено сотрудниками лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «МГНЦ» (н.с. Куркиной М.В., к.б.н., ст.н.с. Цыганковой П.Г. и н.с. Иткис Ю.С.). Культивирование ККФ из биопсии кожи и дальнейшая пробоподготовка образцов к анализу выполнена зав. ЦКП

“Биобанк” ФГБНУ “МГНЦ” к.б.н. Табаковым В.Ю. Измерение скорости потребления кислорода на ККФ пациентов и контролей методом высокоразрешающей респирометрии проводилась автором самостоятельно. Молекулярно-генетический анализ выполнен автором и сотрудниками лаб. наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ “МГНЦ” (к.б.н., ст.н.с. Цыганковой П.Г. и н.с. Иткис Ю.С.), исследование новой аутосомно-рецессивной формы наследственной оптической нейропатии Лебера (НОНЛ), вызванной мутациями в гене *DNAJC30*, проведено совместно с лабораторией митохондриальной геномики научно-исследовательского центра им. Гельмгольца в г. Мюнхен, Германия (зав. лаб. профессор, PhD Н. Prokisch). Сбор клинических данных выполнен автором совместно с научно-консультативным и поликлиническим отделением ФГБНУ «МГНЦ», отделением медицинской генетики Российской детской клинической больницы (зав. д.м.н. Михайлова С.В.), отделением наследственных болезней обмена веществ Морозовской детской клинической больницы (зав. Печатникова Н.Л.), ФГБНУ «Институт глазных болезней» (зав. д.м.н. Шеремет Н.Л.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.7. – Генетика (медицинские науки), охватывающей изучение явлений изменчивости и наследственности, закономерностей процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном уровнях. Области исследования: «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни», «Молекулярные и цитологические основы наследственности».

Публикации

Материалы диссертации представлены в 12 печатных работах соискателя, в том числе 9 статей в журналах (6 Web of Science и/или Scopus), рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для соискателей ученой степени кандидата медицинских наук.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа имеет следующую структуру: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы и приложения. Работа представлена на 174 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, 35 рисунков, 7 приложений. Библиографический указатель включает 166 наименований.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Митохондрии - структура, функции, общие данные

Митохондрии — это клеточные органеллы, ограниченные двумя мембранами (внутренней и внешней) и вовлеченные во множество ключевых метаболических процессов в клетке, таких как окисление жирных кислот, обмен аминокислот и окислительное фосфорилирование и многие другие. В среднем каждая клетка содержит от 300 до 2000 митохондрий. На внешней мембране митохондрий расположены поры и транслоказы, осуществляющие перенос ионов и крупных молекул внутрь митохондрий. Во внутреннюю мембрану встроена дыхательная цепь митохондрий, обеспечивающая посредством формирования электрохимического протонного градиента выработку АТФ. Также внутренняя мембрана образует кристы, которые могут видоизменяться под воздействием метаболических условий и стресса. Пространство между внешней и внутренней мембранами называется интермембранным пространством (ИМП). Митохондрия находится под двойным генетическим контролем: часть ее компонентов кодируется ядерным геномом, но также есть и собственная мтДНК. В матриксе митохондрий расположены собственная кольцевая двухцепочечная мтДНК размером 16569 п.н., специфические митохондриальные рибосомы, митохондриальные тРНК, ферменты и компоненты цикла Кребса и β -окисления жирных кислот. мтДНК содержит последовательности 37 генов, из которых 22 кодируют транспортные РНК, 12S и 16S субъединицы рРНК. Остальные гены кодируют субъединицы ДЦМ и АТФ-синтазы: ND1-6 (включая ND4 и ND4L) КДЦМ I, каталитические субъединицы цитохром *c* оксидазы I-III (CO1-3) КДЦМ IV, субъединицы АТФ6 и АТФ8 АТФ-синтазы, цитохром *b* КДЦМ III [Stefano G. et al., 2016].

Показано, что митохондрии человека содержат как минимум 1500 различных белков. Их функциональная классификация показала, что только 15% из них непосредственно вовлечены в образование АТФ, включая пути метаболизма энергии и все структурные субъединицы системы окислительного фосфорилирования, 20-25% поддерживают и регулируют работу митохондриального генома (который кодирует около 1% митохондриальных протеинов). Кроме того, многие митохондриальные белки связаны с различными клеточными сигнальными путями и динамикой мембраны [Pfanner N. et al., 2019].

1.2 Дыхательная цепь митохондрий

Окислительное фосфорилирование — это основной путь образования энергии у аэробных организмов. Углеводы, жиры и белки, поступающие с пищей, превращаются в глюкозу, жирные кислоты, глицерин, аминокислоты и преобразуются в ацетил-КоА через гликолиз и β -окисление липидов и деаминирование. Ацетил-коА в свою очередь поступает в цикл Кребса (рис. 1), где окисляется O_2 до CO_2 и происходит восстановление коэнзимов НАД⁺ и ФАД до НАДН и ФАДН₂ соответственно. Электроны от НАДН и ФАДН₂ затем ступенчато переносятся на кислород, восстанавливаются до H_2O . Полученная энергия тратится на образование АТФ. Суммарно за счет окислительного фосфорилирования и цикла Кребса образуется 38 молекул АТФ [Berg J.M. et al., 2002].

В 60-х годах прошлого столетия нобелевским лауреатом П. Митчеллом сформирована хемиосмотическая гипотеза о сопряжении синтеза энергии в виде АТФ с цепью переноса электронов митохондрий посредством образования электрохимического протонного градиента через внутреннюю мембрану. Градиент растрачивается АТФ-синтазой для образования АТФ из АДФ или выделяется в виде тепла пассивной утечкой протонов [Mitchell P., 2011].

Дыхательная цепь митохондрий состоит из 4 мультиферментных комплексов, белков-переносчиков электронов и АТФ-синтазы (рис. 2). КДЦМ I, III, IV переносят протоны из митохондриального матрикса в межмембранное пространство - тем самым формируя протонный градиент, изменяющий заряд мембраны и рН - что является “движущей” силой для фосфорилирования АДФ до АТФ АТФ-синтазой [Mukherjee S., Ghosh A., 2020]. Подробнее строение отдельных КДЦМ представлено ниже.

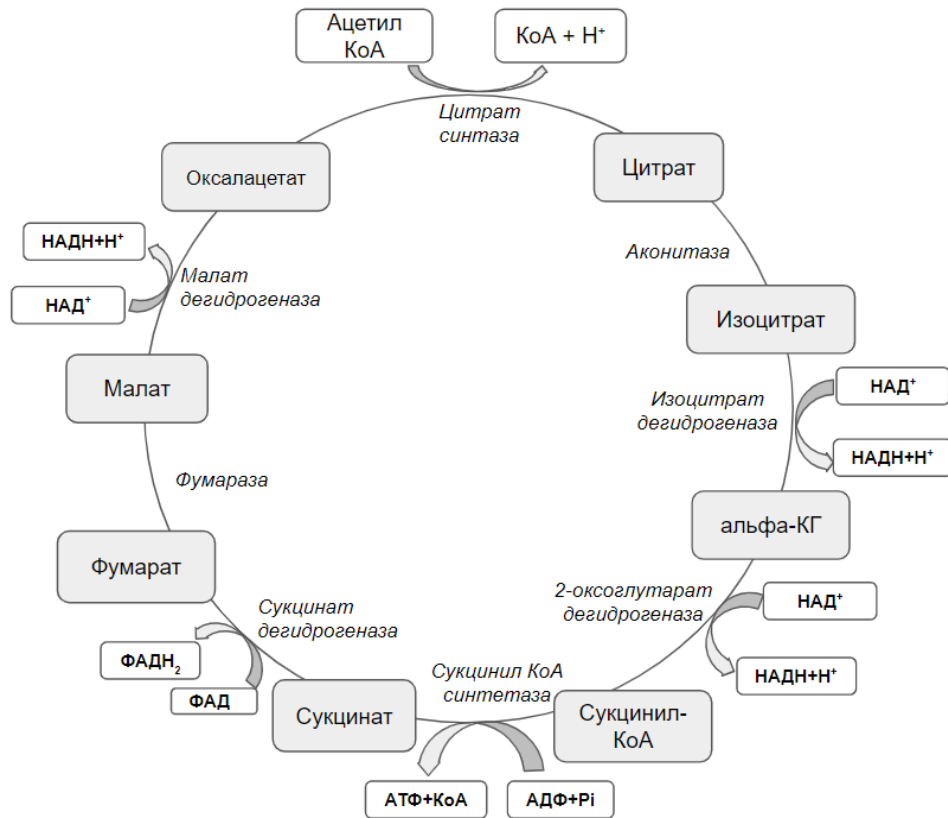
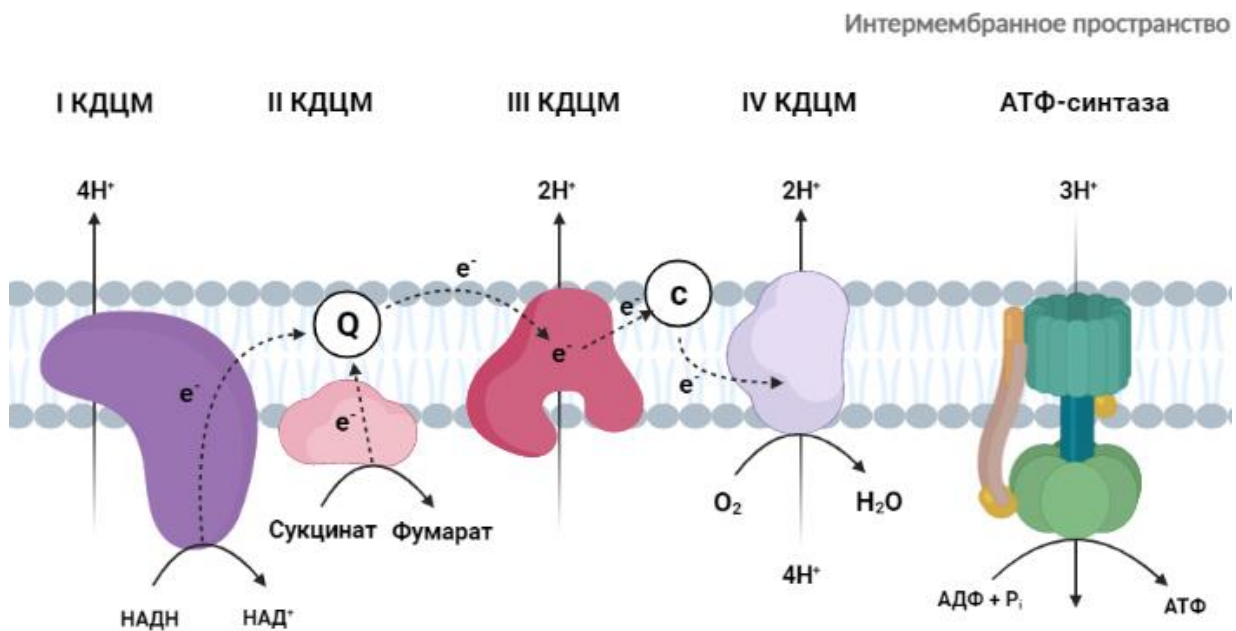


Рисунок 1 – Схема цикла Кребса. Адаптировано из [Protasoni M., Zeviani M., 2021]



Матрикс

Рисунок 2 – Схема дыхательной цепи митохондрий и АТФ-синтазы, Q - убинон, с-цитохром С. Адаптировано из [Alston C.L. et al., 2017]

1.2.1 Комплекс дыхательной цепи митохондрий I (НАДФ-дегидрогеназа)

Комплекс I (КДЦМ I) митохондрий – это один из самых крупных белков-ферментов дыхательной цепи митохондрий. КДЦМ I имеет L-форму и представлен гидрофильной частью, выступающей в матрикс митохондрии, и гидрофобной, встроенной во внутреннюю мембрану [Vinothkumar K.R. et al., 2014]. Минимально 14 субъединиц формирует КДЦМ I и могут позиционироваться как функциональные модули для окисления НАДФ (N-модуль), восстановления убихинона через 7 Fe-S кластеров (Q-модуль) и дальнейшего переноса электронов на убихинон-цитохром C-оксидоредуктазу (КДЦМ III) и перекачки протонов (протонных помп) из матрикса митохондрий в межмембранное пространство для формирования протон-движущей силы ($\Delta\mu\text{H}^+$), используемой в дальнейшем F_1F_0 -АТФазой для образования АТФ (P-модуль). Кроме того, КДЦМ I (рис. 3) состоит из около 31 дополнительных субъединиц, которые участвуют в его сборке, стабилизации и регулировании. КДЦМ I также является основным источником формирования активных форм кислорода (АФК) [Fiedorczuk K., Sazanov L.A., 2018].

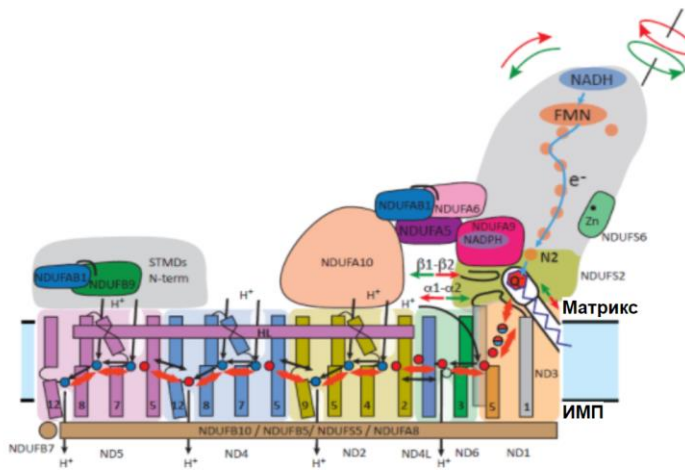


Рисунок 3 – Структура КДЦМ I. Из [Fiedorczuk K., Sazanov L.A., 2018]. ИМП - интермембранное пространство

1.2.2 Комплекс дыхательной цепи митохондрий II

Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа, КДЦМ II, рис. 4) — это гетеротетрамёрный белковый комплекс, который связывает цикл Кребса и дыхательную цепь. КДЦМ II состоит из 4 субъединиц - SdhA, SdhB, SdhC и SdhD, кодируемых только ядерным

геномом. КДЦМ II не выполняет функцию переноса протонов через внутреннюю мембрану митохондрий в процессе окислительного фосфорилирования. Сукцинатдегидрогеназа состоит из гидрофильного хвоста (SdhA и SdhB), расположенном в матриксе, и гидрофобной части (SdhC и SdhD), встроенной во внутреннюю мембрану митохондрий и имеющей короткий хвост в межмембранном пространстве и представляющий “якорь” комплекса [Jodeiri Farshbaf M., Kiani-Esfahani A., 2018]. SdhA - субъединица, на которой происходит окисление сукцината до фумарата; SdhB содержит 3 Fe-S кластера, посредством которых происходит перенос электронов на убихинон (Q) и последующее восстановление в убихинол (QH₂) [Signes A., Fernandez-Vizarra E., 2018].

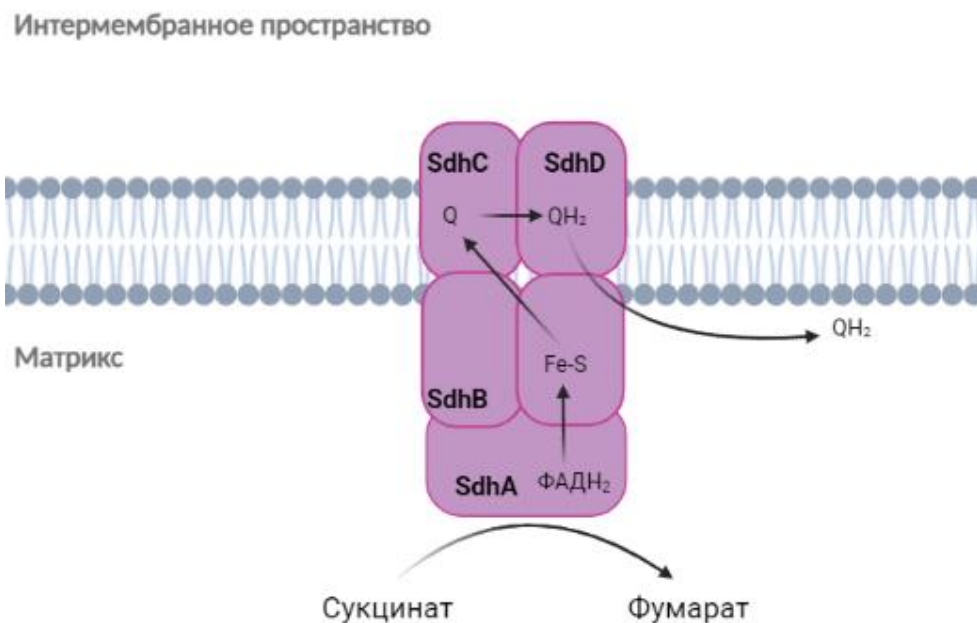


Рисунок 4 – Схема КДЦМ II; SdhA, SdhB, SdhC, SdhD - субъединицы КДЦМ II.

Адаптировано из [Grimm S., 2013]

1.2.3 Комплекс дыхательной цепи митохондрий III

КДЦМ III (рис. 5) катализирует перенос электронов от восстановленного CoQH₂ к митохондриальному цитохрому *c*, используя механизм Q-цикла, сопряженного с “прокачкой” протона. Каждый КДЦМ III представляет собой димер, состоящий из 10 субъединиц, кодируемых ядерным геномом, и субъединицы MT-CYB, которая кодируется мтДНК. Каталитическое “ядро” составляют коровые белки (MT-CYB, CYC1 и UQCRFS1) [Signes A., Fernandez-Vizarra E., 2018]. Убихинол, связываясь с Q₀ сайтом, передает один электрон на окисленный [2Fe-2S] кластер железосерного белка Риске,

который последовательно восстанавливает гем c_1 (высокопотенциальная цепь). Восстановленный цитохром c_1 переносит электрон на растворимый переносчик цитохром c . Нестабильный $SQ^{\bullet-}$ радикал образует на Q_0 сайте второй электрон, который переносится на низкопотенциальную цепь, состоящей из гемов b_L и b_H . На Q_i сайте молекула убихинона восстанавливается до $SQ^{\bullet-}$ гемом b_H для завершения Q-цикла, второй убихинол окисляется на Q_0 сайте для восстановления второго цитохрома c и восстановления стабильного $SQ^{\bullet-}$ до убихинола на Q_i сайте. Топологическое разделение сайтов Q_0 и Q_i обеспечивает векторный транспорт протонов через мембрану с поглощением двух H^+ на отрицательной стороне для образования хинола и выхода четырех H^+ на положительной стороне (два на молекулу хинола, которая при этом окисляется) [Sousa J.S. et al., 2018].

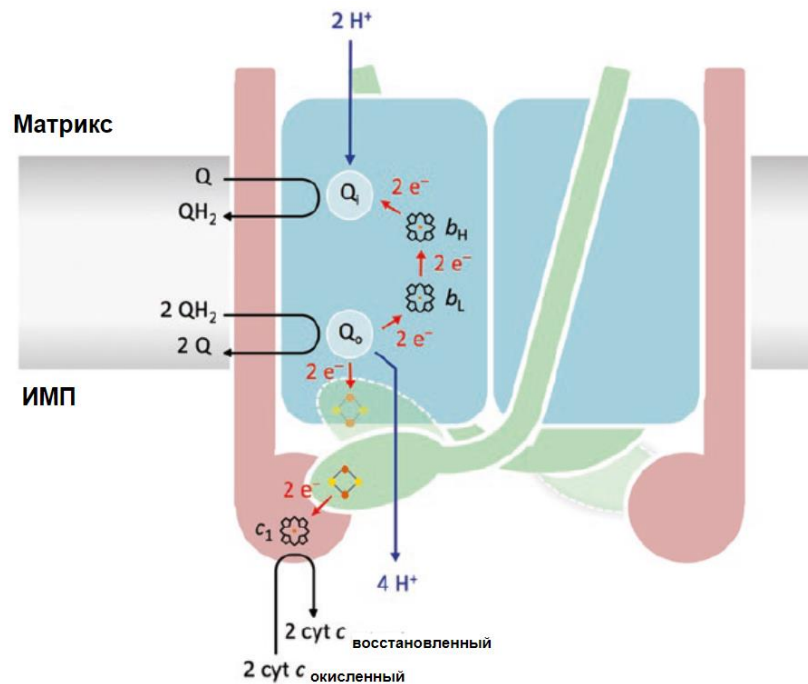


Рисунок 5 – Схема КДЦМ III и Q-цикла, из [Sousa J.S. et al., 2018].

Примечание: c_1 - цитохром c_1 , b_H - гем с высоким потенциалом и b_L - гем с низким потенциалом, Q - убихинон, QH_2 – убихинол, ИМП - интермембранное пространство

1.2.4 Комплекс дыхательной цепи митохондрий IV

Комплекс IV (цитохром C оксидаза), представленный на рис. 6, состоит из 14 различных субъединиц, из которых только три кодируются митохондриальным геномом (COI, COII, COIII). COI представляет собой встроенную в мембрану субъединицу с 12

трансмембранными спиралями (ТМС) и тремя кофакторами (гем *a*, гем *a₃* и Cu_B). Четвертый каталитический сайт, Cu_A , расположен на COII, который прикреплен 2 ТМС и имеет растворимый домен в ИМП, с которым связывается цитохром *c* [Čunátová K. et al., 2020].

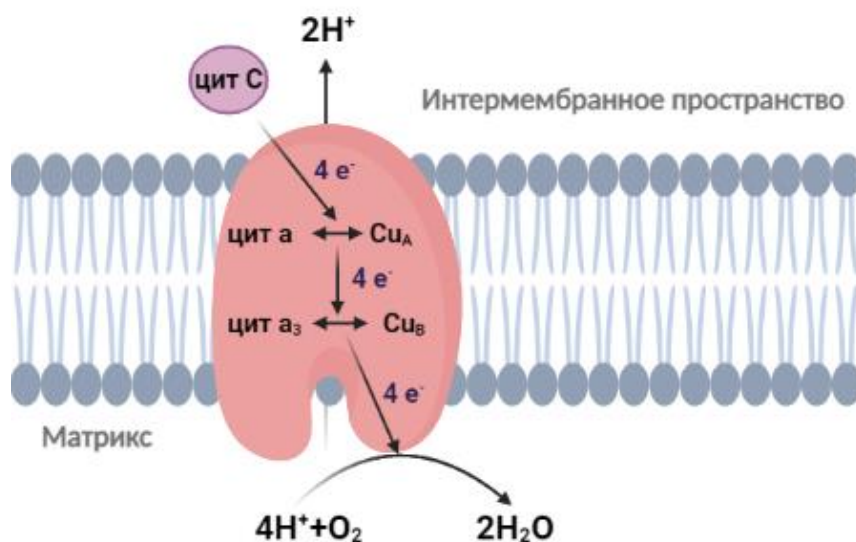


Рисунок 6 – Схема КДЦМ IV. Адаптировано из [Čunátová K. et al., 2020]

1.2.5 Митохондриальная АТФ-синтаза

Митохондриальная АТФ-аза (или F_1F_0 АТФ-синтаза), локализована на внутренней мембране митохондрий и состоит из 29 структурных субъединиц и 2 факторов сборки, кодируемых ядерным геномом и мтДНК (рис. 7). АТФ-синтаза состоит из 2-х функциональных доменов: F_1 - “головы” (катализирует синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата и содержит по 3 копии субъединиц α и β , а также по одной копии γ , δ и ϵ), расположенной в матриксе митохондрий, и F_0 - “мотора” (функционирует как переносчик протонов и представлен субъединицами *e*, *f*, *g*, $A6L$ и восьмью *c* субъединицами в виде кольца), локализованном на внутренней мембране митохондрий. В митохондриях млекопитающих молекула АТФ-синтазы представлена в виде димеров [He J. et al., 2018]. За счет электрохимического градиента, формируемого электрон-транспортной цепью митохондрий, реализуется вращение 2-х “моторов”: кольца из *c* субъединиц в F_0 домене вместе с γ -, δ - и ϵ - субъединицами домена F_1 образуют ротор, который в свою очередь “запускает” вращение гексамера $\alpha_3\beta_3$, образуемая энергия которого используется для синтеза АТФ из АДФ и молекулы неорганического фосфата.

За один цикл вращения γ -субъединицы (360°) АТФ-синтаза продуцирует 3 молекулы АТФ [Vinogradov A.D., 2019]. Возможна и обратная каталитическая реакция - гидролиз АТФ за счет обратного вращения γ -субъединицы и c -кольца, формируя протонный градиент. Для процессов синтеза и гидролиза АТФ необходимы ионы Mg^{2+} [Lippe G. et al., 2019].

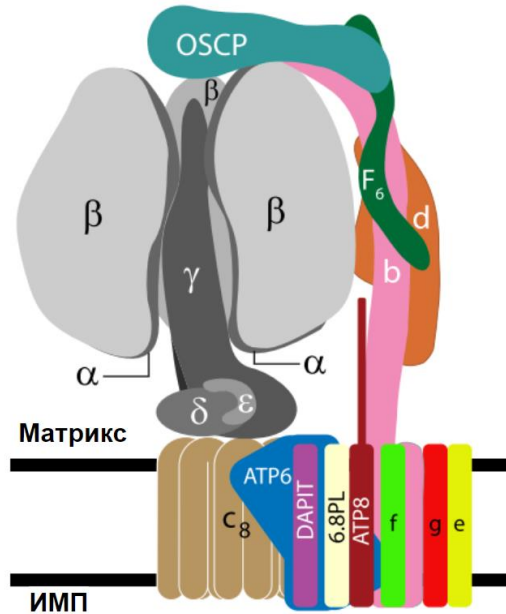


Рисунок 7 – Схема строения АТФ синтазы из [He J. et al., 2018].

Примечание: ИМП - интермембранное пространство. Периферический стебель - субъединицы OSCP, F6, b, и d; центральный стержень - субъединицы γ , δ , и ϵ ; F1 домен - субъединицы $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$; c_8 , ATP6, ATP8, e, f, g, DAPIT, 6.8PL - трансмембранные домены

1.2.6 Разобщенное дыхание

Перенос электронов от отрицательного потенциала к положительному через КДЦМ I, III, IV (также называемые “сайтами сопряжения”), сопряжены с перекачкой протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство. Протонный градиент (с термодинамически эквивалентным мембранным потенциалом) через мембрану “запускает” синтез АТФ на АТФ-синтазе. При разобщении митохондрии (например, при нарушении целостности мембраны или действии разобщителей, таких как FCCP или CCCP), электрон-транспортная цепь работает на “максимальной” скорости и не сопряжена с АТФ-синтазой. Такое дыхание называется “разобщенным”. В таком случае реализуемая энергия растрчивается в виде тепла [Ramsay R.R., 2019].

1.2.7 Суперкомплексы дыхательной цепи митохондрий

Дыхательные комплексы внутренней митохондриальной мембраны — это ключевой компонент крупной белковой сети, который связывает биоэнергетику и биогенез, регуляцию и процессы обратного захвата митохондрий. Дыхательные комплексы I (НАДН: убихинонредуктаза), III (цитохром C редуктаза) и IV (цитохром C оксидаза) образуют крупный I-III₂-IV суперкомплекс, который называется респиросомой. Сам факт существования таких комплексов принимается большинством исследователей, но взгляды на их функциональную значимость различаются. Суперкомплексы могут влиять на сборку и стабильность КДЦМ, регулировать их активность и/или снижать выработку АФК [Chinnery P.F., Gomez-Duran A., 2018]. Например, диссоциация суперкомплекса I + III₂ увеличивает уровень выработки АФК; ингибирование активности КДЦМ IV и III опосредованно приводит к снижению активности КДЦМ I [Mukherjee S., Ghosh A., 2020].

1.3 Активные формы кислорода (АФК)

ДЦМ образует до 90% суммарного числа клеточных активных форм кислорода (АФК), в большей степени вырабатываемые КДЦМ I, II и III. Электроны могут высвободиться из ДЦМ и реагировать с молекулярным кислородом, образуя супероксид анион, который затем превращается в пероксид водорода (H₂O₂) и затем генерирует пероксинитрит (ONOO⁻). АФК вырабатываются на различных сайтах субстратного окисления и окислительного фосфорилирования и могут повреждать макромолекулы, такие как ДНК, белки и липиды. Существуют различные клеточные пути для нейтрализации АФК различными изоформами антиоксидантов, включая супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатион пероксидазу, пероксиредоксин. СОД превращает супероксид до перекиси водорода (H₂O₂) и затем деактивируется в молекулы H₂O каталазой или до H₂O и глутатиона различными формами глутатион пероксидазы [Spinelli J.V., Naigis M.C., 2018].

С генерацией АФК и его повреждающим действием на макромолекулы связан патогенез митохондриальных заболеваний. Когда продукция АФК повышена, эффективность трансляции белков компонентов окислительного фосфорилирования

снижена, в связи с чем синтез молекул АТФ происходит в недостаточном количестве [Gou C. et al., 2013].

1.4 Митохондриальные протеазы

Митохондрии обладают собственным протеолитическим аппаратом, позволяющим полностью расщеплять белки на аминокислоты в различных ее компартментах. Известно 45 протеаз, локализованных в митохондриях. Как минимум 23 из них существуют только в митохондриях; остальные могут функционировать как в митохондриях, так и в цитоплазме. Митопротеазы действуют как ферменты “контроля качества” - они “удаляют” поврежденные белки и предотвращают их вероятно патогенное накопление, функционируя как защита “первой линии” до того, как запустится механизм митофагии; а также регулируют состав субъединиц дыхательной цепи митохондрий. На внутренней мембране митохондрий расположены 2 АТФ-зависимых протеазных комплекса: протеаза iAAA и протеаза mAAA [Bliek Van Der A.M. et al., 2017].

Мутации в генах, кодирующих субъединицы митопротеаз, ассоциированы с некоторыми нейродегенеративными заболеваниями. Например, гомозиготные варианты в гене *YME1L* вызывают нарушение созревания протеазы iAAA и клинически представлены младенческой энцефалопатией с атрофией зрительного нерва. Рецессивные мутации в гене *AFG3L2*, который кодирует каталитическую субъединицу протеазы mAAA, вызывает спастическую атаксию 5 типа, а аутосомно-доминантные мутации клинически выражены в спиноцеребеллярной атаксии 28 типа. Ген *SPG7*, кодирующий параплегин, компонент mAAA протеазы, ассоциирован со спастической параплегией 7 типа [Opalińska M., Jańska H., 2018].

1.5 Митохондриальная ДНК

В матриксе митохондрий могут содержаться от 100 до 10000 копий собственной митохондриальной ДНК молекулы - двухцепочечной кольцевой ДНК, состоящей из 16569 п.н. и кодирующей 37 различных генов (13 структурных субъединиц системы окислительного фосфорилирования за исключением КДЦМ II, 2 рибосомальные РНК и 22 транспортных РНК). мтДНК не содержит интронов, однако в ее структуре содержатся

некодирующие контрольные регионы. Высокая скорость мутаций мтДНК (примерно в 45 раз превышающий мутационную изменчивость в ядерном геноме) связывают с отсутствием защиты гистонов и механизмов ДНК репарации. По данным базы данных MITOMAP подтверждена патогенность 93 мутаций мтДНК, примерно 300 вариантов описаны как потенциально патогенные [Schon K.R. et al., 2020].

1.5.1 Феномен гетероплазии мтДНК

Гетероплазия — это одновременное присутствие копий мутантной и нормальной мтДНК в клетке. Тип мутации, как и процент гетероплазии, являются одними из важных факторов, определяющие тяжесть и клинические особенности МЗ, связанных с мутациями мтДНК. Процент гетероплазии должен превысить определенный порог, при котором возникнет биохимический дефект, приводящий к нарушению функции митохондрии. Этот порог зависит от типа мутации, пораженной клетки/ткани; уровень гетероплазии может варьировать от 60% до 90% для проявления клинического фенотипа [Nissanka N. et al., 2019]. Следует отметить, что у пациентов с митохондриальной миопатией патогенные варианты мтДНК будут выявляться чаще всего в мышечной ткани, а в клетках крови отклонений от нормы могут быть не обнаружены. Также уровень гетероплазии вариантов в мтДНК имеет тенденцию к снижению в лейкоцитах крови с течением жизни, в то же время уровень гетероплазии увеличивается в постмитотических тканях (например, в мышцах) [Nissanka N., Moraes C.T., 2020].

1.6 Классификация МЗ

В 1962 г. Luft и соавт. впервые описали двух сестер с нетиреодным гиперметаболизмом и нарушением сопряжения между окислением и фосфорилированием в митохондриях мышечной ткани (болезнь Люфта). Этот год принято считать началом эры митохондриальных болезней. В течение десяти лет, с 1970 по 1980 г., описаны биохимические нарушения при МЗ и создана их первая классификация [Бочков Н.П. и др., 2012]. Точкой отсчета молекулярной эры «митохондриальной медицины» можно считать описание Harding и соавт. в 1988 г. пациентов с митохондриальными миопатиями, у которых выявили одиночные или множественными делеции мтДНК. Wallace D. впервые

обнаружил точковую гомоплазмическую мутацию в мтДНК (m.11778G>A) у пациента с нейропатией оптического нерва Лебера [DiMauro S., Garone C., 2010].

1.6.1 Первичные и вторичные МЗ

Изучение патогенеза многих заболеваний привело к пониманию роли митохондрий в различных патологических процессах. Практически при всех нейродегенеративных и онкологических заболеваниях, а также при мультифакториальных болезнях, в патологические каскады вовлечены митохондрии. Эти болезни относят к вторичным МЗ, при них нарушение структуры и функций митохондрий не является основным этиологическим фактором [Chinnery P., 2003; Niyazov D. et al., 2016].

В отличие от них, первичные МЗ (ПМЗ) — это генетически обусловленные (мутациями в ядерном или митохондриальном геномах) метаболические заболевания, характеризующиеся непосредственным нарушением структуры или функций системы окислительного фосфорилирования (ОХРНОС), включая электрон-транспортную цепь. Минимальная распространенность ПМЗ по эпидемиологическим данным, основанным на популяциях северо-восточной Англии и южно-восточной Австралии, составляет 1 на 5000 новорожденных и может манифестировать в любом возрасте. Отмечается, что мутации мтДНК наиболее распространены среди взрослого населения, в то время как мутации в ядерных генах чаще наблюдаются у детей [Schaefer A. et al., 2019].

1.6.1.1 Классификация первичных МЗ

В современной литературе можно встретить довольно много вариантов классификаций первичных МЗ: по типу генетического дефекта (мутации ядерного или митохондриального геномов), по типу наследования (аутосомно-рецессивные, аутосомно-доминантные, X-сцепленные, митохондриальные), по локализации дефекта (структурные субъединицы и факторы сборки КДЦМ, нарушения деления/слияния митохондрий, нарушения репликации мтДНК и т.д.). Один из вариантов современной классификации приведен в таблице 1.

1.6.1.1.1 Клинические проявления первичных МЗ

Поскольку для функционирования каждой клетки необходимы митохондрии, их дисфункция обычно выражается мультисистемными поражениями: в первую очередь страдают высоко энергозависимые ткани и органы (нервная и мышечная система, сердце, эндокринные органы). ПМЗ могут дебютировать в любом возрасте и манифестировать нарушениями функции любой системы организма. Основные клинические признаки, характерные для ПМЗ, представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Классификация генов, вызывающих ПМЗ, по локализации дефекта [Schon K.R. et al., 2020]

Механизм	Ядерные гены
Структурные субъединицы КДЦМ и АТФ-синтазы	КДЦМ I: <i>NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NDUFA1XLR, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA6, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11</i> КДЦМ II: <i>SDHA, SDHB, SDHD</i> КДЦМ III: <i>TTC19, UQCRB, CYC1, UQCC2</i> КДЦМ IV: <i>COX14, COX15, COX20, XOC6A1, COX6B1, COX7B, TACO1, PET100</i> АТФ-синтаза: <i>ATP5D, ATP5E, TMEM70, ATP5, ATP5A1</i>
Факторы сборки	<i>NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFAF8, FOXRED1, SCO1, SCO2, SURF1, ATPAF2</i>
Биосинтез КоQ	<i>PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ4, COQ6, COQ8A, COQ8B, COQ9</i>
Деление/слияние митохондрий	<i>OPA1, MFN2</i>
Деплеции и делеции мтДНК (вторичные)	<i>POLG, POLG2, TYMP, SLC25A4, TWNK, GFER, RNASEH1, MGME1, DNA2, SUCLA2, SUCLG1, FBXL4, TYMP, TFAM, DGUOK, RRM2B, MPV17</i>

Синтез митохондриальных белков	<i>MTO1, GTP3BP, TRMU, PUS1, MTFMT, MRPS2, MRPS22, MRPS34, MRPL3, MRPL44</i>
Аминоацил тРНК синтетазы	<i>AARS2, DARS2, EARS2, RARS2, YARS2, FARS2, LARS2, VARS2, CARS2, PARS2, NARS2, KARS, SARS2, MARS2</i>
Транспорт белков/“контроль качества”	<i>SPG7, TIMM50, TIMM8A</i>
Ферменты метаболизма пирувата	<i>PDHA1, PC</i>

Таблица 2 – Основные клинические проявления ПМЗ. Из [Rahman S., 2020]

Орган/система	Клинические признаки
Нервная система	Когнитивные нарушения, задержка психомоторного развития, мигрень, инсультоподобные состояния, судороги, мозжечковые нарушения, офтальмоплегия/офтальмопарез, нистагм
Скелетные мышцы	Птоз, миопатия, толерантность к физической нагрузке, рабдомиолиз
Орган зрения	Помутнение роговицы, катаракта, нейропатия оптического нерва, пигментная ретинопатия
Орган слуха	Вовлечение кохлеарной системы, нейропатия слухового нерва
Сердце	Гипертрофическая кардиомиопатия, дилатационная кардиомиопатия, нарушения сердечной проводимости
Легкие	Легочная гипертензия, дыхательная недостаточность
Эндокринная система	Сахарный диабет I типа, нарушения гормона роста, дисфункция надпочечников, гипотиреозидизм, гипопаратиреозидизм, гипогонадизм, низкорослость
Мочевыделительная система	Тубулопатия (синдром Фанкони), стероид-резистентный нефротический

	синдром, фокально-сегментарный гломерулосклероз
ЖКТ	Нарушение моторики, энтеропатия, псевдообструкция, нарушение экзокринной функции поджелудочной железы
Печень	Макро- или микровезикулярный стеатоз, микро- или макронодулярный цирроз
Кроветворная система	Сидеробластная анемия, нейтропения, тромбоцитопения
Иммунная система	Иммунная недостаточность В-клеток
Кожа и волосы	Дряблая кожа, гипертрихоз, скрученные волосы, алопеция, липоматоз

Основные клинические синдромы представлены ниже.

1.6.1.1.2 НОНЛ (Нейропатия оптического нерва Лебера)

НОНЛ (OMIM #535000) одна из самых частых форм ПМЗ. НОНЛ вызывается мутациями в мтДНК, затрагивающими субъединицы КДЦМ I. Наиболее частые из них - m.11778G>A (*MT-ND4*), m.3460G>A (*MT-ND1*) и m.14484T>C (*MT-ND6*) – представлены в основном в гомоплазмическом состоянии, однако у некоторых пациентов данные мутации могут присутствовать и в гетероплазмическом состоянии. НОНЛ манифестирует в основном в подростковом периоде или после 20-ти лет, но реже в детстве или в более позднем взрослом возрасте, и характеризуется острой или подострой безболезненной потерей зрения. Пенетрантность заболевания выше у мужчин (50%), чем у женщин (10%), но данную особенность пока исследователи не могут объяснить. Предполагается, что есть генетические факторы на X-хромосоме, влияние эстрогенов, компенсаторный эффект увеличения биогенеза митохондрий [Carelli V., Morgia C. La, 2018; Couser N., Gucsavas-Calikoglu M., 2017].

1.6.1.1.3 Синдром Ли

Синдром Ли (ОМIM #256000) или подострая некротизирующая энцефаломиелопатия, обычно манифестирует в возрасте от 3 до 12 месяцев жизни, однако первые признаки заболевания могут дебютировать в подростковом или взрослом возрасте. Описаны митохондриальный, аутосомно-рецессивный, X-сцепленный типы наследования (представлен только одним геном - *PDHA1*-недостаточность пируватдегидрогеназного комплекса). Известно 92 гена (субъединицы и факторы сборки системы окислительного фосфорилирования), мутации в которых приводят к развитию Ли или Ли-подобного синдромов. Симптомы заболевания очень гетерогенны и могут включать в себя задержку психомоторного развития, мышечную гипотонию, гиперкинезы, мозжечковую атаксию, периферическую нейропатию, атрофию зрительного нерва; для мутаций в гене *SURF1* характерно наличие гипертрихоза. Для синдрома Ли типично наличие билатеральных симметричных изменений в базальных ганглиях, мозжечке и/или стволе мозга на МРТ; повышение уровня лактата в крови или ЦСЖ. Примечательно, что мутация m.8993T>G/C в гене *MT-ATP6* в состоянии гетероплазмии выше 90% вызывает синдром Ли, в то время как при гетероплазмии ниже 90% вызывает синдром NARP (акроним: «Нейропатия, Атаксия, пигментная дегенерация сетчатки, ОМIM #551500) [Rahman J., Rahman S., 2019].

1.6.1.1.4 Синдром MELAS

Митохондриальная энцефалопатия, лактат-ацидоз и инсультоподобные состояния (MELAS-синдром, ОМIM #540000) одно из самых частых митохондриально-наследуемых заболеваний (ассоциировано с генами *MT-CO1*, *MT-CO2*, *MT-CO3*, *MT-CYB*, *MT-ND1*, *MT-ND5*, *MT-ND6*, *MT-TC*, *MT-TF*, *MT-TH*, *MT-TK*, *MT-TL1*, *MT-TQ*, *MT-TS1*, *MT-TS2*, *MT-TV*, *MT-TW*). Наиболее частая мутация, составляющая около 80% всех случаев MELAS - m.3243A>G в гене *MT-TL*, кодирующем митохондриальную тРНК лейцин (UUR), приводит к нарушению трансляции РНК, синтезу белков и комплексов КДЦМ, и в результате снижает выработку АТФ и уровень окислительного фосфорилирования в клетках. MELAS — это системное заболевание, которое обычно манифестирует в возрасте от 2 до 10 лет. Характерными признаками являются мигрень, судороги, инсультоподобные эпизоды (гемипарезы), корковая слепота, мышечная

слабость, нейросенсорная тугоухость, сахарный диабет и лактат-ацидоз [Goldstein A., Servidei S., 2019].

1.6.1.1.5 Синдром MERRF

Синдром миоклонической эпилепсии с рваными красными волокнами (MERRF, OMIM #545000) представляет собой мультисистемное заболевание, в акроним которого включены основные клинические признаки - миоклонус- эпилепсия и наличие волокон с “рваными красными краями” при иммуногистохимическом исследовании мышечного биоптата. В 1990 году описана первая мутация, ассоциированная с данным синдромом в мтДНК - m.8344A>G в гене *MT-TK*, кодирующем митохондриальную транспортную РНК лизин. Мутация обуславливает около 80% всех случаев MERRF. Кроме мутаций в гене *MT-TK*, описаны мутации в генах *MT-TH*, *MT-TL1*, *MT-TP*, *MT-TS1*, *MT-TS2*, *MT-TT*. Первые клинические симптомы манифестируют в младенческом, детском и подростковом возрастах и имеют тенденцию к прогрессированию. У 80% пациентов описаны семейные случаи митохондриальной энцефалопатии, не обязательно представленной MERRF [Couser N., Gucsavas-Calikoglu M., 2017].

1.6.1.1.6 Синдром PEO

Прогрессирующая наружная офтальмоплегия (PEO, progressive external ophthalmoplegia) является наиболее частым заболеванием среди митохондриальных миопатий и характеризуется наличием птоза и офтальмоплегии, однако чаще данный синдром встречается в совокупности с другими системными митохондриальными проявлениями (PEO+), манифестирует в любом возрасте. Половина всех случаев представлены спорадическими формами (крупные делеции мтДНК), остальные составляют аутосомно-рецессивное (*TYMP*, *POLG*, *DGUOK*, *TK2*, *MGM1*, *RNASEH1*), аутосомно-доминантное (*POLG*, *POLG2*, *ANT1*, *TWNK*, *RRM2B*, *DNA2*, *OPA1*) или митохондриальное наследования. У пациентов могут наблюдаться когнитивные нарушения, инсульты, судороги, атаксия, дистония, гиперкинезы [Iakovenko E.V. et al., 2019].

1.6.1.1.7 Синдром Кирнс-Сейра (KSS)

Синдром Кирнс-Сейра (KSS) — это клинический подтип хронической наружной прогрессирующей офтальмоплегии (CPEO), включающий в себя следующую триаду: манифестация до 20 лет, наружная прогрессирующая офтальмоплегия, пигментная ретинопатия. Синдром вызывается крупными делециями мтДНК. 90% случаев KSS спорадические и обусловлены крупной делецией мтДНК (от 1,1 до 10 т.п.н.), самая частая из них - 4977 п.н., обнаруживаются в основном на ДНК, выделенной из биопсии мышц или клетках мочевого осадка. Пациенты также имеют как минимум одно из следующих клинических проявлений: нарушение проводимости сердца (полная/неполная блокада), наличие белка в ЦСЖ более 100 мг/дл, мозжечковую атаксию, низкий рост, глухоту, деменцию и эндокринные нарушения [Parikh S., 2016].

1.6.1.1.8 Синдром Пирсона

Синдром Пирсона впервые описан в 1979 году как фатальное мультисистемное митохондриальное заболевание среди пациентов неонатального и младенческого возрастов, и проявляющееся в нарушении кроветворной системы, экзокринной и эндокринной функций поджелудочной железы, печени, почек, мышечной и нервной систем. Заболевание обусловлено крупными делециями мтДНК, подобно синдрому KSS, однако мутации выявляются также в клетках крови. Основные клинические признаки включают: анемию (макроцитарную сидеробластную), тромбоцитопению, нейтропению, хроническую диарею, нарушение мальабсорбции, тубулопатию, гепатомегалию, цитолиз, холестаза, сахарный диабет, нарушения функции коры надпочечников [Mats S.J., Cortez D., 2020].

1.6.1.1.9 Синдром истощения (деплеции) мтДНК

Синдром истощения мтДНК характеризуется уменьшением числа копий мтДНК по сравнению с ядерной ДНК в пораженных тканях. Сниженное количество мтДНК может быть вызвано дефектами в следующих процессах: 1) репликации и поддержании целостности мтДНК (*TWNK, SLC25A4, MGME1, TFAM, DNA2, RNASEH1, POLG, POLG2, DNA2*); 2) балансе дезоксирибонуклеотидов (*TK2, DGUOK, RRMB2, TYMP, SUCLA2*,

SUCLG1); 3) динамике митохондрии и их “контроле качества”(*OPA1, MFN2, DRP1, SPG7, AFG3L2*). Наследование может быть как аутосомно-рецессивным, так и аутосомно-доминантным. Клинически выделяют следующие формы: миопатическая форма, связанная с мутациями в *TK2*; энцефаломиопатическая форма, связанная с мутациями в *SUCLA2, SUCLG1* или *RRM2B*; гепатоцеребральная форма, связанная с мутациями в *DGUOK, MPV17, POLG* или *TWNK* и нейрогастроинтестинальная форма, связанная с мутациями в *TYMP* [El-Hattab A.W., Scaglia F., 2013].

1.6.2 Дифференциальная диагностика первичных митохондриальных заболеваний

Несмотря на то, что существуют системы диагностических критериев, такие как оценочная система Walker, Неймегенская шкала для ПМЗ и критерии Wolf и Smeitink для митохондриальных заболеваний, они не могут обеспечить точность постановки клинического диагноза [Liang C. et al., 2014]. Отсутствие четких гено-фенотипических корреляций, наличие бессимптомных носителей в семье затрудняет диагностический поиск. В зависимости от клинической формы, дифференциальную диагностику ПМЗ необходимо проводить с довольно большим кругом наследственных болезней. В таблице 3 приведены заболевания, с которыми необходимо проводить дифференциальную диагностику в зависимости от ведущего клинического синдрома.

Например, миопатия с офтальмоплегией может быть обусловлена мутациями в генах *MYH2, MTM, DNM2, RYR1, CHAT*; билатеральные симметричные изменения в подкорковых структурах наблюдаются при мутациях в генах *NUP62, RANBP2, PDE8B*. Также некоторые биохимические изменения в работе митохондрий могут проявляться как вторичная дисфункция при немитохондриальных заболеваниях, например, снижение активности КДЦМ I обнаружено при недостаточности GLUT1, мутациях в генах *ETFDH, ETFB, MTHFR* [Parikh S. et al., 2019].

1.7 Подходы к диагностике ПМЗ

Классический подход к диагностике ПМЗ включает: сбор анамнеза, анализ клинического фенотипа (табл. 3), определение лактата и пирувата в крови и исследование

Таблица 3 – Клинические признаки при ПМЗ и их дифференциальная диагностика

Клинические проявления, характерные для ПМЗ	ПМЗ	Дифференциальный диагноз (наследственные и ненаследственные причины)
Дистония	Синдром Ли, синдром дистонии-глухоты, митохондриальные энцефалопатии	Недостаточность биотинидазы, недостаточность транспортера тиамин 2, синдром Айкарди-Гутьереса, органические ацидурии, нейродегенерация с накоплением железа в мозге, некротизирующая энцефалопатия
Эпилептическая энцефалопатия	Синдром Альперса-Хутенлохера, синдром Ли	Синдром Драве, пиридоксин-зависимые и другие формы эпилепсии
Прогрессирующая миоклоническая эпилепсия	MERRF	Болезнь Лафора, салидоз, мутации в гене <i>PRICKLE1</i> , другие формы миоклонус-эпилепсии
Лейкоэнцефалопатия	Недостаточность КДЦМ I, II, <i>SURF1</i> , ПМЗ с нарушением митохондриальной трансляции и Fe-S кластеров	Болезнь исчезающего белого вещества, лизосомные болезни накопления, болезнь Канавана, болезнь Александра, болезнь Пелициуса-Мельцбахера, гипомиелинизирующие лейкодистрофии
Атаксия	Мутации в гене <i>ADCK3</i> , синдромы атаксии-нейропатии, как SCAE, MIRAS, MERRF, NARP, заболевания биосинтеза коэнзима Q ₁₀	Различные формы атаксий
Демиелинизация	MNGIE	Множественный склероз, острый рассеянный энцефаломиелит

Периферическая нейропатия	Мутации в генах <i>POLG</i> , <i>MPV17</i> , <i>KARS</i> и <i>SURF1</i> ; MNGIE	Шарко-Мари-Тус, недостаточность транспортера рибофлавина, токсические нейропатии
Птоз и офтальмоплегия	PEO, KSS, MNGIE, MELAS	Околофарингеальная мышечная дистрофия, горизонтальный паралич взгляда и сколиоз (мутации в гене <i>ROBO3</i>)
Оптическая нейропатия	НОНЛ, АД оптическая атрофия, синдром Ли	Токсические оптические нейропатии (метанол, цианид, никотиновая зависимость)
Гипертрофическая кардиомиопатия с лактат-ацидозом	Недостаточность КДЦМ I, мутации в гене <i>TMEM70</i> , синдром Сэнгера, нарушение митохондриальной трансляции	Вирусные инфекции, кардиомиопатии
Дилатационная кардиомиопатия с лактат-ацидозом	Синдром Барта	Вирусные инфекции, кардиомиопатии
Недостаточность экзокринной функции поджелудочной железы, панцитопения	Синдром Пирсона	Муковисцидоз, наследственные анемии
Диабет и глухота	MIDD, MELAS	СД II тип, несиндромальная тугоухость
Сидеробластная анемия	Синдром Пирсона, мутации в гене <i>YARS2</i>	Блэефана-Даймонда синдром, Швахмана-Даймонда синдром, X-сцепленная сидеробластная анемия

Недостаточность функции печени	Синдром деплеции мтДНК	Недостаточность NBAS, LARS и IARS, вирусные инфекции, лизосомальные болезни накопления
Почечная тубулопатия/недостаточность	Синдромы Пирсона и Кирнса-Сейра	Синдром Гилтемана, синдром Фанкони-Бикела
Миопатия	Синдром деплеции мтДНК и другие формы ПМЗ	Врожденные мышечные дистрофии, миозит
Рабдомиолиз	Митохондриальные миопатии (мутации в генах <i>MTCO1</i> , <i>MTCO2</i> , <i>MTCO3</i> и <i>MTCYB</i>)	Нарушения β -окисления жирных кислот, дефекты гликолитического пути, токсические и инфекционные миопатии

ферментов окислительного фосфорилирования в мышечной ткани пациента (“золотой стандарт”, исследования первой линии). При наличии отклонений и сопоставлении клинических и биохимических данных, выполняется секвенирование таргетных генов (“от функции к гену”). В связи с широким использованием технологий секвенирования нового поколения (таргетного, экзомного, геномного и РНК секвенирования) исследование начинается с клинического обследования, затем молекулярно-генетических тестов, а биохимические методы используются в качестве функциональных тестов для подтверждения патогенности найденных изменений нуклеотидной последовательности (“от гена к функции”) [Wortmann S.B. et al., 2017].

1.7.1 Биохимические маркеры ПМЗ

Биомаркеры (БМ) - биологические молекулы, которые можно объективно измерить и оценить как индикаторы нормального биологического процесса, патологического состояния или ответа на применение лекарственных средств [Boenzi S., Diodato D., 2018]. Анализ БМ должен улучшить качество и снизить время постановки диагноза, чтобы проводить мониторинг развития заболевания и эффективности лечения. Также желательно, чтобы БМ присутствовал в биоматериалах, которые можно получить наименее инвазивным способом (кровь, моча, слюна).

На сегодняшний день в литературе не описан специфический и чувствительный БМ митохондриальных заболеваний. Ранее исследования первой линии включали в себя измерение уровня лактата/пирувата в крови и ЦСЖ, определение уровня органических кислот в моче, исследование активности комплексов дыхательной цепи митохондрий в мышцах и тканях пациентов с клиническим фенотипом митохондриального заболевания. В последнее время эта тенденция изменилась в пользу использования NGS технологий [Parikh S. et al., 2019]. Кроме того, плазменные БМ могут быть в норме, если биоматериал взят вне периода метаболического криза или были нарушены условия транспортировки и взятия биологического материала [Nyhan W.L. et al., 2020].

Однако некоторые биохимические подходы к диагностике ПМЗ помогают в дифференциальном диагнозе, одновременное их применение может помочь в функциональном анализе новых изменений нуклеотидной последовательности или исследовании новых кандидатных генов.

Далее рассмотрены основные биомаркеры ПМЗ (табл. 4).

Таблица 4 – Основные биомаркеры ПМЗ и их референсные и патологические значения из [Davison J.E., Rahman S., 2017]

Параметр	Сыворотка (Плазма) Патология/Норма (мкмоль/л)	ЦСЖ Патология/ Норма (мкмоль/л)
Лактат	>2000/450–1800	>2000/1100–1700
Пируват	>130/60–100	>200/80–140
Лактат/Пируват	>17/<15	>17/<15

1.7.1.1 Лактат и пируват

Лактат (молочная кислота, 2-гидроксипропановая кислота), является продуктом анаэробного гликолиза (рис. 8). При нарушении работы ДЦМ, образование АТФ через систему окислительного фосфорилирования становится неэффективным, поэтому клетка активно переходит на гликолиз (компенсаторный эффект), тем самым увеличивая уровень внутриклеточного лактата.

Однако, повышение уровня лактата не является строго специфичным для ПМЗ, например, у пациентов с диагнозами НОНЛ, синдромом Ли, синдромом Кирнс-Сейра и дефицитом КДЦМ I выявляли нормальный уровень лактата, а у пациентов с MELAS, MERRF синдромами и синдромом деплеции мтДНК обнаруживали повышенный уровень в крови и ЦСЖ. Отмечено, что уровень лактата также повышается при инфекциях ЦНС, эпилептических приступах, инсульте, печеночной недостаточности [Uittenbogaard M., Chiaramello A., 2015].

При недостаточности пируватдекарбоксилазного комплекса, выявляют повышенный уровень пирувата и лактата в крови, моче, ЦСЖ. При этом соотношение лактат:пируват может быть нормальным или даже низким. Это

соотношение может повышаться при дефектах системы окислительного фосфорилирования [Boenzi S., Diodato D., 2018].

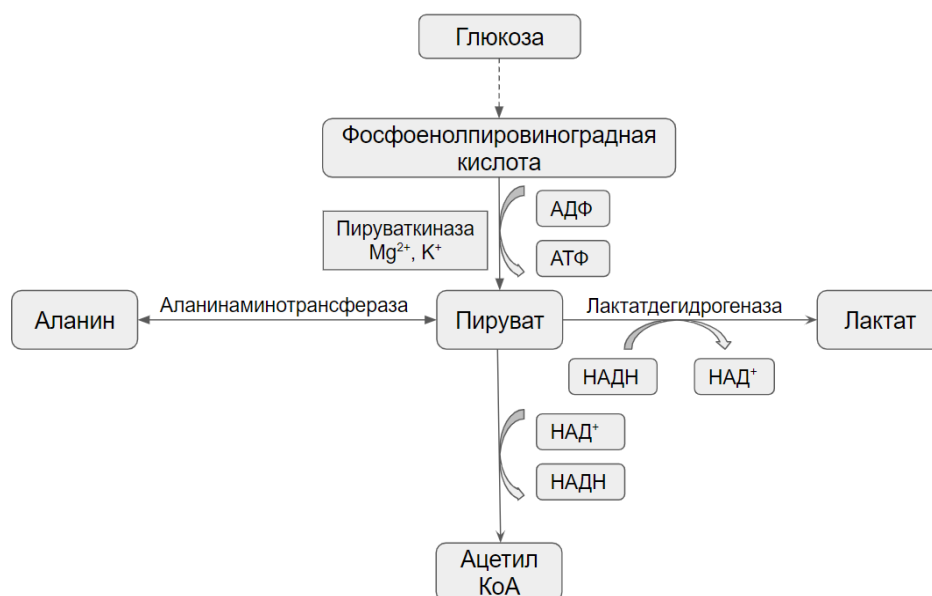


Рисунок 8 – Метаболизм глюкозы и пирувата в цитоплазме клетки. Адаптировано из [Nyhan W.L. et al., 2020]

1.7.1.2 Ацилкарнитины и аминокислоты в крови

Изменения уровня ацилкарнитинов и аминокислот в крови не показывает статистические корреляции с ПМЗ и чаще всего их концентрация в норме. Однако, иногда может наблюдаться “вторичное” повышение уровня пролина и аланина, связанное с повышением уровня пирувата, но повышение концентрации данных метаболитов также наблюдается при сепсисе, гиперинсулинизме, хронической недостаточности тиамин или как побочный эффект применения вальпроатов. При этом, исследование ацилкарнитинов и аминокислот помогает в дифференциальной диагностике ПМЗ [Boenzi S., Diodato D., 2018].

1.7.1.3 Органические кислоты мочи

Исследование спектра и уровня органических кислот в моче методом газовой хроматографии с последующей детекцией масс-спектрометрией (ГХ-МС) является наиболее чувствительным методом. Однако на спектр органических кислот

существенное влияние оказывают лекарственные препараты, а также нарушение условий транспортировки [Haas R.H. et al., 2008].

Профиль органических кислот у пациентов с ПМЗ неспецифичный: чаще всего выявляют повышение уровня лактата, пирувата, а также метаболиты цикла Кребса, представленные на рис. 9 (фумарат, малат, 2-кетоглутарат, цитрат, изоцитрат), кетоны, метаболиты тирозина. Высокое содержание метилмалоновой кислоты (до 500 ммоль/моль креатинина) совместно с метаболитами цикла Кребса характерно для синдрома деплеции мтДНК, вызванными мутациями в генах *SUCLA2* и *SUCLG1*. 3-метилглутаконовая кислота может быть выявлена при многих наследственных болезнях обмена, включая синдром Барта [Davison J.E., Rahman S., 2017]. Повышение дикарбоновых кислот может быть связано с нарушением β -окисления жирных кислот в митохондриях.

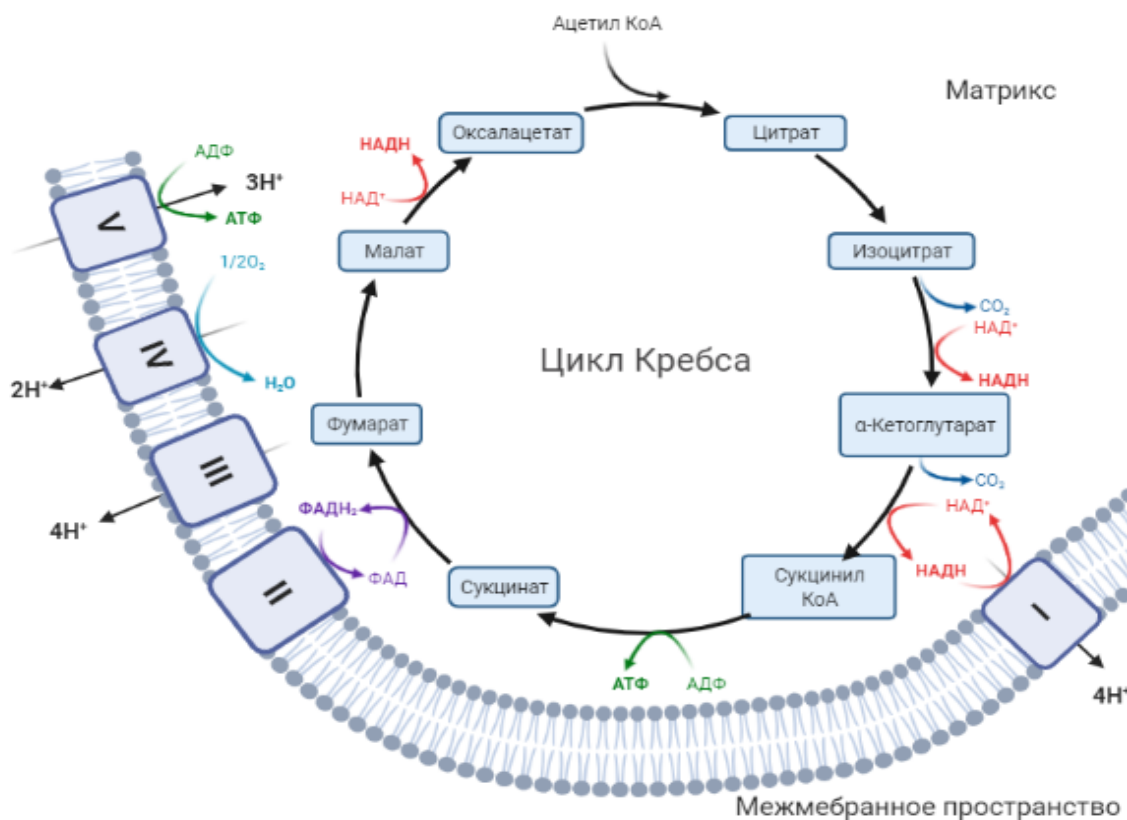


Рисунок 9 – Схема взаимодействия цикла Кребса и системы окислительного фосфорилирования в митохондриях клетки.

Примечание: Римскими цифрами обозначены комплексы дыхательной цепи митохондрий и V-АТФ-синтаза. Адаптировано из [Martínez-Reyes I., Chandel N.S., 2020]

1.7.1.4 Циркулирующие цитокины в крови как маркеры ПМЗ

FGF-21 (Fibroblast Growth Factor-21, фактор роста фибробластов) и GDF-15 (Growth Differentiation Factor-15, фактор роста и дифференцировки 15) описаны ранее как потенциальные маркеры ПМЗ. В 2011 году группа Suomalainen A. показала, что содержание FGF-21 в плазме и сыворотке повышается у пациентов с ПМЗ с миопатией. В 2014 Kalko S., изучая транскриптом пациента с недостаточностью тимидин-киназы 2, обусловленной мутацией в гене *TK2*, выявил повышенный уровень GDF-15 у данного пациента. По данным Lehtonen J.M., одновременная оценка маркеров FGF-21 и GDF-15 может помочь в дифференциальном диагнозе митохондриальных миопатий [Lehtonen J.M. et al., 2016]. Однако, согласно последним исследованиям, эти маркеры являются неспецифическими, повышение их концентрации ассоциировано с другими группами патологий (диабет, гепатопатия, почечная недостаточность, рак, ожирение и т. д.) [Scholle L.M. et al., 2018].

Несмотря на плюсы биохимической и функциональной диагностики ПМЗ, при их выполнении можно столкнуться с рядом сложностей: относительно низкая чувствительность и специфичность методов, вторичным митохондриальным проявлениям при других немитохондриальных патологиях, вариабельность референсных пределов и методов между лабораториями, проблемы с выбором ткани и клеток (тканеспецифичность дефекта) [Parikh S. et al., 2019].

1.7.2 Исследование структуры комплексов ДЦМ

Как отмечено выше, дыхательная цепь митохондрий состоит из электрон-транспортной цепи, представленной комплексами I-IV и АТФ-синтазой. Каждый комплекс включает в себя множество структурных и вспомогательных (факторы сборки, стабилизирующие протеины и т.д.) белков. Каждую субъединицу того или иного комплекса можно исследовать в отдельности, используя Вестерн-блот (Western Blot) или ПААГ-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (SDS-PAGE). Модифицированный метод, открытый Schagger в 1991 году, Blue native ПААГ-электрофорез (BN-PAGE), позволяет разделять белковые комплексы согласно их нативному молекулярному весу в присутствии красителя

Кумасси. При помощи BN-PAGE можно изучать белковые взаимодействия, факторы сборки, а также определять активность в изолированных митохондриях из различных тканей (фибробласты, мышцы). Данные методы широко используют в функциональном анализе белковых продуктов генов и новых генетических вариантов в них [Kopovalova S., 2019].

1.7.3 Определение активности КДЦМ

Спектрофотометрическое измерение активностей комплексов ДЦМ и АТФ-синтазы также является одним из важных методов диагностики МЗ. Мышечная ткань - наиболее предпочтительный биоматериал для исследования ввиду тканеспецифичности биохимического дефекта. Измерения могут проводиться как в мышечном гомогенате (свежем или замороженном), так и в выделенных митохондриях из ткани. Чаще всего используют фибробласты кожи пациента, поскольку это менее инвазивный метод, не требует применения анестетиков, которые могут снизить активность КДЦМ, а также более воспроизводимы, нежели мышечная ткань. При мутациях в ядерных генах, вызывающих недостаточность КДЦМ I обычно выявляют изолированное снижение активности КДЦМ I (например, в гене *NUBPL*). Однако описана также изолированная недостаточность КДЦМ I в гене мт тРНК лейцине при синдроме MELAS — это связывают с тем, что в комплексе I больше всего находятся аминокислотных остатков лейцина [Myer J.A. et al., 2015]. Но чаще всего наблюдают комбинированное снижение активностей комплексов при мутациях в генах, затрагивающих синтез мтДНК, РНК, протеинов (*POLG*, *TWINK*), гомеостаз митохондрий (*OPA1*, *MFN2*), кофакторы (*COQ2*, *COQ4*) и образование суперкомплексов (*SURF1*) [Ni Y. et al., 2019].

1.7.4 Иммуногистохимические исследования

Изменения на препаратах мышц, выявленных при световой микроскопии, включая детекцию рваных красных волокон (RRF) при окраске Гомори или обнаружение цитохром-С оксидазных (COX) негативных волокон, могут предположить наличие ПМЗ. RRF также можно обнаружить, используя

сукцинатдегидрогеназу (SDH, КДЦМ II), при котором обнаруживаются митохондриальные агрегаты под сарколеммой из-за активной пролиферации митохондрий в ответ на дисфункцию OXPHOS. Наличие RRF больше всего характерно для ПМЗ, вызванных мутациями в мтДНК - синдромах KSS, PEO, MERRF. Методом квадрупольной иммунофлуоресценции можно точно детектировать комплексы I-IV и АТФ-синтазу, используя необходимые антитела к ним и антитела к маркеру митохондриальной массы – порину (VDAC) [Alston C.L. et al., 2017].

1.7.5 Исследование скорости потребления кислорода (респирометрия)

Исследование скорости потребления кислорода клетками или тканями — это один из функциональных подходов, определяющих дисфункцию системы окислительного фосфорилирования. Важно отметить, что коэффициент скорости потребления кислорода митохондрией зависит от потребления субстратов (например, пирувата или сукцината) и доступности АДФ для фосфорилирования. Chance и Williams определили 5 состояний дыхания: 1, 2, 5 отражают состояние митохондрии в состоянии “голодания” (отсутствии АДФ, субстратов, кислорода соответственно). Стадии 3, 4 отражают функционирование митохондрий.

Стадия 3 возникает, когда АДФ, субстраты и кислород доступны; стадия 4 наступает, когда все молекулы АДФ конвертируются в АТФ, уровень потребления кислорода падает. Соотношение стадии 3 к стадии 4 отражает целостность митохондриальной мембраны и “утечку” протонов через внутреннюю мембрану митохондрий [Blik Van Der A.M. et al., 2017].

Полярографические методы определения емкости кислорода (на респирометрах Oxygraph-2k, Hansatech) или флуоресцентный метод в плашке (технология “Seahorse”) довольно чувствительны и позволяют провести оценку работы митохондрий, измеряя такие параметры, как максимальная мощность работы электрон-транспортной цепи, выявить недостаточность отдельного КДЦМ, а также оценить вклад гликолиза в выработке энергии АТФ (“Seahorse”).

Принцип высокоразрешающей респирометрии в закрытой камере оксиграфа (рис. 10) основан на определении изменения концентрации кислорода в камере в

зависимости от времени (скорость потребления кислорода, кислородная ёмкость) [Hütter E. et al., 2006]. Концентрация кислорода регистрируется с помощью сверхчувствительного электрода Кларка (хлорсеребряного электрода), который содержит платиновый или золотой катод и Ag/AgCl анод, а в качестве электролита используется раствор KCl [Gnaiger E., 2008].

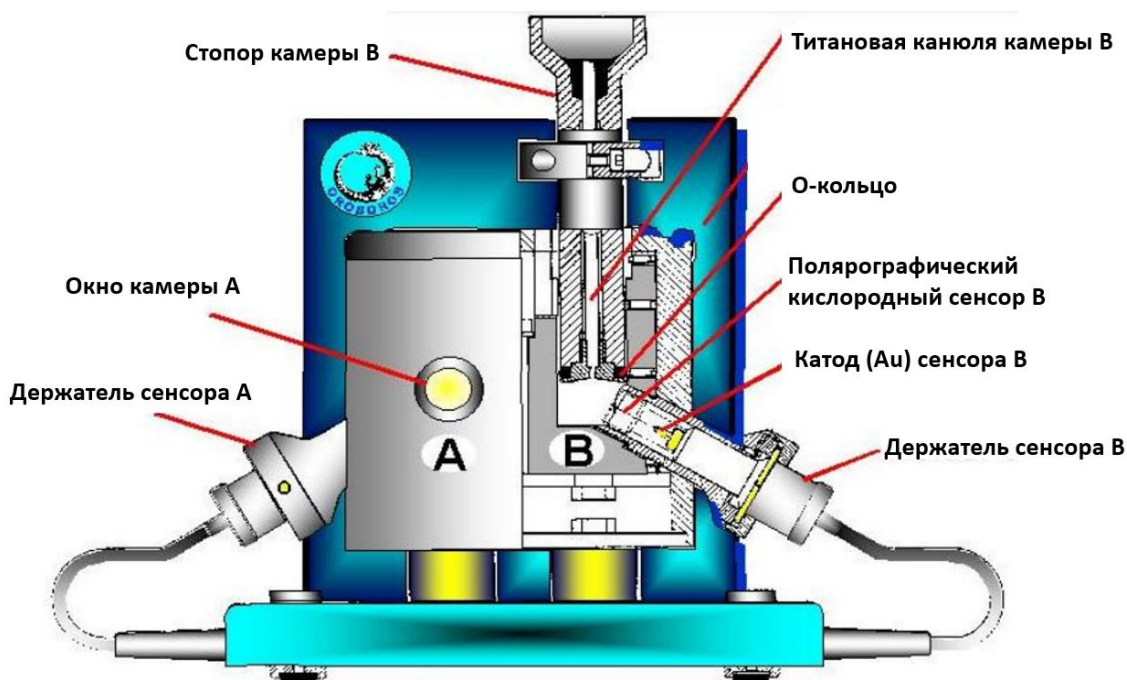


Рисунок 10 – Схема строения оксиграфа Oxygraph 2k (Oroboros Corp., Austria) из [Gnaiger E., 2001]

Данная технология позволяет выявить дефект, когда измерения активностей отдельных комплексов показывают норму. Например, при мутациях, затрагивающих КДЦМ I, дыхание на НАДН-продуцирующих субстратах (пируват) будет снижено. Так, Ogawa E. и соав. показали эффективность плащечной респирометрии у пациентов с синдромом Ли, когда энзиматические исследования не выявили отклонения от нормы [Ogawa E. et al., 2017]. Респирометрия также используется в исследовании механизмов и биоэнергетики рака, старения, нейродегенеративных заболеваний, ожирении и в поиске/тестировании новых лекарств. По базе данным портала BioBlast [<https://wiki.orooboros.at>] на сегодняшний день из 3976 опубликованных научных трудов по применению данной методики лишь около 350 научных трудов посвящены изучению патогенеза ПМЗ. Актуальным остается важность применения метода респирометрии для функциональных исследований

клеток и тканей пациентов с ПМЗ, однако в литературе недостаточно данных, чтобы оценить возможность использования данной методики.

1.7.6 Экспериментальные модели ПМЗ

Использование цибридных (цитоплазматических) моделей позволяет исследовать влияние различных вариантов мтДНК на патогенез митохондриальных заболеваний. Поскольку направленный мутагенез в мтДНК затруднен в силу двойной плазматической мембраны в митохондриях, используют rho0 клеточные линии, у которых отсутствует мтДНК [Fernández-Moreno M. et al., 2016]. Такие цибридные модели сконструированы из иммортализованных фибробластов человека, несущих мутации ПМЗ (MELAS синдром, MERRF, НОНЛ). Обработывая цибриды агентами, вызывающими деплецию мтДНК, можно варьировать уровень гетероплазмии в клетках. Это позволяет исследовать действие различных веществ и метаболитов на фенотипические проявления. Например, использование рибофлавина в цибридных моделях MELAS синдрома увеличило биогенез митохондрий, активность КДЦМ I и III и снизило выработку АФК [Kuszek A.J. et al., 2018].

Разработаны методики, позволяющие дифференцировать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) от пациентов с ПМЗ в клетки, наиболее чувствительные к недостаточному функционированию митохондрий – в нейроны или мышечные клетки. Такой подход был реализован с использованием фибробластов от пациентов с атаксией Фридрейха и спинальной мышечной атрофией и дифференцировкой их в нейрональные клетки. Исследование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных от пациентов с гетероплазмическими заменами в мтДНК m.3243A>G, m.13513G>A и m.5541C>T, а также с гетероплазмическими делециями мтДНК, показало, что уровень гетероплазмии сильно варьирует между клонами, но остается неизменным в ходе дифференцировки [Inak G. et al., 2017].

В настоящее время создано несколько моделей животных, которые воспроизводят патологии, связанные с нарушением работы системы окислительного фосфорилирования. Такие модели с мутациями в мтДНК или ядерном геноме

позволяют более детально изучить интересующие ткани/органы и биохимические дефекты. Патогенез некоторых ПМЗ изучен на таких организмах, как дрожжи, круглые черви (*C. elegans*) и дрозофилы. Однако очевидно, что между ними и человеком существуют физиологические различия. Поэтому активно используются мышинные модели из-за наличия гомологии между генами человека и мыши. Например, нокаут гена *NDUFS4*, кодирующего субъединицу КДЦМ I, в трансгенной мышинной модели фенотипически выражался в наличии фатальной прогрессирующей энцефалопатии. Мыши с патогенной гомозиготной однонуклеотидной заменой в гене *TWNK* с.1526A>G (p.Y509C) имели эпилептические судороги, прогрессивную нейродегенерацию гипоккампа и нейронов Пуркинью, сопоставимую с клиническими проявлениями у пациентов с таким же патогенным вариантом [Ruzzenente B. et al., 2016].

1.7.7 Омиксные подходы в изучении ПМЗ

Высокопроизводительные омиксные технологии, основанные на секвенировании нового поколения и масс-спектрометрии, такие как геномика (полный анализ последовательности ДНК), транскриптомика (анализ мРНК), протеомика (анализ белков), метаболомика (анализ метаболитов) в последнее время стали активно развиваться. Эти подходы особенно предпочтительны в выявлении релевантных генов, белков и метаболитов, имеющих отношение к митохондриальной физиологии и патологии. Кроме того, омиксные технологии помогают в поиске терапевтических мишеней и биомаркеров для скрининга и мониторинга степени тяжести ПМЗ [Maldonado E.M. et al., 2019].

1.7.7.1 Геномные подходы в изучении ПМЗ

Поскольку ПМЗ могут быть вызваны мутациями в митохондриальном и ядерном геномах, для них характерна широкая клиническая и генетическая гетерогенность, наличие нечеткой клинической картины, которая может пересекаться с другими наследственными болезнями обмена веществ. В связи с этим, использование таких методов, как секвенирование по Сэнгеру отдельных

генов, ограничено. Полноэкзомное секвенирование (WES) покрывает примерно 2% всего генома человека и представлено только кодирующими областями (экзонами) генома. В среднем WES обнаруживает 20000 генетических вариантов у отдельного индивидуума. Полногеномное секвенирование (WGS) включает в себя также некодирующие области генома, поэтому позволяет выявить глубокие интронные замены, варианты в регуляторных областях, и в среднем детектирует до 3 млн вариантов у каждого человека. Анализ вариантов требует использование биоинформатических алгоритмов для фильтрации и анализа данных. Классификация вариантов по степени патогенности согласуется с рекомендациями ACMG, однако в случае обнаружения новых замен необходимо проводить функциональные тесты для подтверждения патогенности. Использование WGS/WES в некоторых исследованиях увеличило диагностический выход ПМЗ с 10% до 50% [Rahman J., Rahman S., 2018].

1.7.7.2 Транскриптомные исследования при ПМЗ

РНК-секвенирование позволяет выявить уровень экспрессии гена, а также обнаружить влияние редких интронных замен (в т.ч. “глубоких”) на сплайсинг мРНК (результатом которого является пропуск или появление нового экзона). Данная информация крайне важна для определения патогенности вариантов неясной значимости, выявленных методами WES/WGS.

В работе Kremer et al., РНК-секвенирование фибробластов пациентов с вероятным диагнозом ПМЗ выявило патогенные варианты (приводящие к моноаллельной экспрессии, альтернативной экспрессии и абберантному сплайсингу) у 10% пациентов (5 из 48), для которых до этого при проведении WES и WGS не удалось выявить патогенных вариантов. Однако выбор ткани для РНК-секвенирования является важным этапом, поскольку некоторые гены не экспрессируются в крови или фибробластах. В таком случае можно использовать направленную дифференцировку iPSCs в интересующие ткани/органы [Kremer L.S. et al., 2017; Prigione A., 2015].

1.7.7.3 Протеомные исследования при ПМЗ

Протеомные методы исследования дают представление о составе, структуре и функции протеома, а также об активности, взаимодействии и локализации белков. Кроме того, они позволяют выявлять нарушение синтеза белков, их фолдинга, модификации, стабильности и деградации. Используя изобарические химические метки (метки тандемных масс), можно одновременно анализировать до 10 образцов. Известно более 1500 белков, которые вовлечены в структуру и функционирование митохондрий.

Karpler L. с соавт. исследовали протеом митохондрий в мышце и печени мыши, и выявили, что их распределение является тканеспецифичным. Так, в мышечной ткани преобладают белки, которые в основном ответственны за систему окислительного фосфорилирования, систему декарбоксилирования пирувата и за цикл Кребса; а в клетках печени преобладают белки, участвующие в β -окислении жиров, а также в глюконеогенезе, метаболизме аминокислот и кетогенезе [Karpler L. et al., 2019].

Alston C.L. с соавт. использовали комплексный анализ (профиль белков в составе отдельных КДЦМ и их факторов сборки) для подтверждения патогенности замен в гене *NDUFAF8*, кодирующий белок-фактор сборки КДЦМ I, выявленных у трех пробандов с синдромом Ли. Полученные результаты показали снижение активности, а также нарушение последовательности сборки КДЦМ I [Alston C.L. et al., 2020].

Как и для РНК-секвенирования, основное ограничение для данного метода - выбор исследуемой ткани/органа, поскольку концентрация исследуемого белка сильно варьирует в различных тканях [Palmfeldt J., Bross P., 2017].

1.7.7.4 Исследование метаболома пациентов с ПМЗ

Метаболомика нацелена на выявление и количественное определение метаболитов (размером менее 1500 Да), содержащихся в исследуемом образце. Методы, которые позволяют разделить и детектировать метаболиты в исследованиях, включают в себя газовую хроматографию, жидкую хроматографию, масс-спектрометрию и ядерно-магнитный резонанс (ЯМР). Метаболом позволяет

определить новые биохимические пути, которые могут быть вовлечены в развитии митохондриальной патологии. Также комбинация различных метаболитов может использоваться в качестве биомаркера ПМЗ, а также в оценке прогрессирования осложнений и ответа на терапию [Esterhuizen K. et al., 2017]. Morvan D. с коллегами исследовали метаболом фибробластов пяти пациентов с НОНЛ и выявили увеличение липидного профиля и снижение уровня ацилкарнитинов, а также снижение активности КДЦМ I. Добавление в среду фибробластов пациентов ресвератрола и идебенона увеличило активность КДЦМ I, повысило уровень ацилкарнитинов и снизило уровень жирных кислот [Morvan D., Demidem A., 2018].

Важно отметить, что омиксные подходы должны быть скоординированы, т.е. результаты WES/WGS необходимо комбинировать с результатами исследования транскриптома, протеома и метаболома, особенно в вопросах поиска новых кандидатных генов и подтверждения патогенности генетических вариантов неясной клинической значимости, а также в понимании функционирования митохондрий в норме и патологии [Buzkova J. et al., 2018].

1.8 Подходы к лечению ПМЗ

На данный момент не существует этиотропного лечения митохондриальных заболеваний, тактика ведения пациентов основывается на симптоматической терапии, как, например, применение антиконвульсантов (кроме вальпроатов, способствующих развитию печеночной недостаточности) для устранения эпилептических приступов, инсулинотерапия для корректировки гипергликемии, кардиостимуляторы и антиаритмические препараты для лечения осложнений, вызванных нарушением проводимости сердца. Однако существуют некоторые экспериментальные подходы, направленные на патогенетическое лечение ПМЗ.

Некоторые подходы в лечении ПМЗ направлены на повышение интенсивности работы компонентов ЭТЦ (CoQ₁₀, идебенон) или на скорость потребления субстратов для нее (тиамин). CoQ₁₀ является жирорастворимым коферментом и переносит электроны с КДЦМ I и II на КДЦМ III. Однако эффективность применения CoQ₁₀ при ПМЗ в исследованиях и клинических испытаниях показана только для пациентов с недостаточностью CoQ₁₀ [Zhang L. et al., 2020].

Ниацин (никотиновая кислота, витамин В3), ранее используемый для лечения гиперхолестеринемии, является предшественником НАД⁺ и усиливает митохондриальный биогенез [Russell O.M. et al., 2020]. Pirinen E. с соавторами показали, что применение ниацина в дозировке 750-1000 мг/день у взрослых пациентов с митохондриальной миопатией усиливает мышечную силу и митохондриальный биогенез [Pirinen E. et al., 2020].

Антиоксиданты уменьшают токсический эффект от излишней выработки АФК и, таким образом, могут быть использованы в лечении ПМЗ. Так, синтетический аналог витамина Е EPI-743 увеличивает внутриклеточный уровень восстановленного глутатиона. Клинические исследования EPI-743 еще продолжаются, однако отмечается, что у пациентов с синдромами MELAS, синдромом Ли и атаксией Фридрейха при его применении уменьшилось прогрессирование неврологической симптоматики [Weissig V., 2020].

На сегодняшний день очень перспективным механизмом терапии видится возможность реэкспрессии мутантного или делетированного гена, хотя данный подход не может рассматриваться для мультисистемных заболеваний. Потенциальными векторами таргетной доставки интересующих генов в пораженный орган или ткань могут служить аденоассоциированные вирусные векторы (ААВ). Одно из ПМЗ, для которых разрабатывается ААВ-терапия - НОНЛ, вызванная мутацией m.11778G>A в гене *MT-ND4*. Некоторые клинические исследования показали улучшение остроты зрения у пациентов с НОНЛ, при использовании ААВ-аллотропической экспрессии (т.е. экспрессии гена мтДНК, включенного в ядерный геном) гена *MT-ND4* [Zhang Y. et al., 2017].

Многие митохондриальные заболевания обусловлены мутациями в мтДНК, представленными в гетероплазмическом состоянии, что допускает идею о снижении копийности мутантных молекул в пользу здоровых. Подходы, направленные на элиминацию мутантных копий мтДНК, основаны на использовании сконструированных эндонуклеаз, которые могут связываться и удалять (через двухцепочечные разрывы) специфические мутантные последовательности мтДНК. Данные конструкции представляют собой митохондриально-направленные нуклеазы по типу “цинковых пальцев” (mtZFN) или по типу эффекторов активации

транскрипции (mitoTALEN). Доставляются такие нуклеазы при помощи специальных пептидов [Jackson C.B. et al., 2020; Garone C., Viscomi C., 2018].

Система CRISPR/Cas9 не применима к мтДНК, поскольку данный подход основан на использовании специальной РНК (sgRNA), чтобы “направить” к таргетному локусу, а в митохондриях невозможно импортировать РНК [Craven L. et al., 2017]. Однако в 2020 г. группа ученых во главе с В.У. Мок при помощи сконструированного инактивированного интербактериального токсина DddA смогла использовать систему редактирования без задействования CRISPR/Cas9 непосредственно в митохондриях - данная технология открывает перспективы терапии ПМЗ, вызванных точковыми мутациями в мтДНК [Mok V.Y. et al., 2020].

Тимидин киназа 2 (TK2) — это один из ключевых митохондриальных ферментов, который фосфорилирует пиримидиновые нуклеозиды деоксицитидин и деокситимидин до дЦМФ и дТМФ. В работе Domínguez-González протестировано 16 пациентов с подтвержденными патогенными вариантами в гене *TK2*, которых лечили введением (орально или энтерально) дЦМФ и дТМФ и/или деоксицитидином и деокситимидином. Показано, что у пациентов снизилось проявление неврологической симптоматики, а также стабилизировалась или улучшилась дыхательная функция [Domínguez-González C. et al., 2019].

1.9 Пренатальная диагностика

Поскольку в настоящее время эффективная терапия для предотвращения осложнений ПМЗ не разработана, дородовая диагностика актуальна для семей пациентов. В случае ПМЗ, вызванных мутациями в ядерном геноме, тактика ведения семьи не отличается от тактики при других моногенных генетических заболеваниях (с мутациями в ядерных генах): генетическое консультирование, инвазивная пренатальная диагностика (исследование ворсин хориона или амниотической жидкости плода), а также преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ).

Для семей, в которых ПМЗ вызвано мутациями в мтДНК, дородовая диагностика на сегодняшний день невозможна. Прогноз осложняется феноменом “бутылочного горлышка”, поскольку уровень гетероплазии у матери-носительницы патогенной замены в мтДНК, различается в отдельном ооците.

Методики, позволяющей предсказать уровень гетероплазии у эмбриона и пороговый эффект для развития заболевания, на данном этапе развития медицины не существует.

Одно из перспективных направлений для разработки подобной методики включает в себя донорство митохондрий и подразумевает использование 2-х подходов. Первый основан на пересадке пронуклеуса матери-носительницы патогенного варианта в мтДНК в яйцеклетку донора без ядра после завершения мейоза. Второй подход основан на использовании материнского веретена (II метафаза мейоза) и представляет собой перенос ооцита матери-носителя в донорский безъядерный ооцит до оплодотворения отцовским сперматозоидом. В настоящий момент данная технология легализована в Великобритании и США, в остальных странах ее использование запрещено по биоэтическим соображениям [Gorman G.S. et al., 2016].

1.10 Заключение по главе 1

В связи с развитием омиксных технологий (геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики), число новых ядерных генов, мутации в которых с высокой вероятностью ведут к развитию ПМЗ, и число новых патогенных вариантов в известных генах, возрастает. Для подтверждения клинического и генетического диагноза крайне важно выявить функциональные нарушения, вызываемые генетическими вариантами неизвестного клинического значения с неоднозначной патогенностью. Поиск биохимических маркеров, специфичных для ПМЗ или для определенной группы ПМЗ, является важной задачей для дальнейшего мониторинга состояния пациента, понимания патогенеза заболевания и разработки дальнейшего патогенетического лечения. Однако, наличие феномена гетероплазии и “порогового эффекта” экспрессии клинического фенотипа, тканеспецифичность биохимического дефекта, отсутствие четких фенотипических корреляций ПМЗ, а также высокий клинический полиморфизм (в том числе внутрисемейный) затрудняют диагностику ПМЗ. Несмотря на то, что мышечная ткань является референсной в биохимических исследованиях, взятие биопсии мышцы - довольно инвазивная процедура, и использование фибробластов

кожи имеет более перспективное применение в рутинной диагностике в силу меньшей инвазивности и относительной простоты получения культур.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Выборки пациентов

Диссертационная работа выполнялась в лаборатории наследственных болезней обмена веществ в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении “Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова”. Пациенты, принимавшие участие в исследовании, направлены в лабораторию наследственных болезней обмена веществ из консультативного отделения ФГБНУ “МГНЦ”, отделения медицинской генетики Российской детской клинической больницы (зав. д.м.н. Михайлова С.В.), отделения наследственных болезней обмена веществ Морозовской детской городской клинической больницы (зав. Печатникова Н.Л.), ФГБНУ “Институт глазных болезней” (зав. д.м.н. Шеремет Н.Л.). Исследование пациентов с мутациями в гене *DNAJC30* проводилось совместно с лабораторией генетики митохондриальных заболеваний Научно-исследовательского центра им. Гельмгольца г. Мюнхен, Германия (зав. лаб., профессор, PhD Holger Prokisch). От каждого пациента или его законного представителя получено письменное информированное согласие на участие в исследовании, мерах и рисках, связанных с выполнением исследования согласно Хельсинской конвенции.

В период с 2016-2019 гг. собраны биообразцы 171 пациента с верифицированным молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ. Суммарно количество пациентов и контролей, включенных в работу, представлено в табл. 5. Подробнее разделения на подгруппы описаны в главе 3 “Результаты и обсуждение”.

Для выполнения анализа уровня органических кислот методом ГХ-МС исследовали образцы мочи 84 пациентов с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ (приложение 1). Референсные значения определены на основании анализа 650 контрольных образцов мочи условно здоровых индивидов из биобанка лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ “МГНЦ”.

Для выполнения респирометрического анализа на оксиграфе Oxygraph-2k сформирована выборка из 27 пациентов (5 женщин, 22 мужчин, возраст 1 г.-40 л.) с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ (приложение 2). Для определения референсных значений параметров респирометрии исследовали 10 контрольных линий диплоидных клеток кожных фибробластов (здоровые доноры, 8 муж., 2 жен., 23-45 л.).

Для определения концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 исследовали образцы плазмы крови пациентов с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ (N=105) а также с подтвержденным диагнозом других групп моногенных наследственных заболеваний (N=107) и группы контроля (N=60 взрослых волонтеров 16-60 л., N=60 условно здоровых детей 1 м.-10 л.) в период с 2014 по 2018 гг. (приложение 3).

Таблица 5 – Выборки пациентов, участвовавших в исследовании

Выборка	Количество	Исследование
Образцы мочи здоровых индивидов (для определения референсных значений)	650	Оценка спектра уровня органических кислот в моче методом ГХ-МС
Образцы мочи пациентов с ПМЗ (верифицированных)	84	Оценка спектра уровня органических кислот в моче методом ГХ-МС
Образцы плазмы крови (для определения референсных значений)	60 - взрослые, 60 - дети	Определение содержания плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15 методом ИФА
Образцы плазмы крови пациентов с ПМЗ (верифицированных)	105	Определение содержания плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15 методом ИФА
Образцы плазмы крови пациентов с другими формами моногенных наследственных заболеваний (верифицированных)	107	Определение содержания плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15 методом ИФА
ККФ здоровых индивидуумов (для определения референсных значений)	10	Респирометрия высокого разрешения
ККФ пациентов с ПМЗ (верифицированных)	27	Респирометрия высокого разрешения

2.2. Молекулярно-генетические методы

2.2.1 Выделение ДНК

В качестве материала для молекулярно-генетического исследования использовали образцы ДНК, выделенные из цельной крови с консервантом этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА, pH=8,0), мочевого осадка и ККФ. Выделение ДНК производилось с использованием готового набора реактивов для выделения AxyPrep™ Blood Genomic DNA Miniprep Kit 250-prep (AXYGEN) по методике, рекомендованной изготовителем.

2.2.2 Мультиплексная лигазно-зависимая амплификация проб (MLPA)

Для анализа частых точковых мутаций мтДНК проведен дизайн олигонуклеотидных MLPA-проб на следующие мутации (приложение 4), для удобства исследуемые мутации разделены на 2 панели: «Point» (m.3243A>G; m.8344A>G; m.3460G>A, m.8993T>G/C, m.13094T>C, m.13513G>A, m.14459G>A) и «LP» (m.3460G>A, m.11778G>A, m.14484T>C; m.3697G>A, m.8363G>A, m.10197G>A).

MLPA-анализ выполнялся в три этапа: денатурация образцов (50-100 нг исходной ДНК) при 95°C, затем последующая гибридизация MLPA-проб на ДНК-матрице и реакция лигирования при помощи термостабильной ДНК-лигазы фирмы “New England Biolabs” при 62°C. Последующая амплификация MLPA-проб проходила по следующей схеме: в лигированные пробирки добавляли 15 мкл амплификационной смеси, содержащей 2 мкл ПЦР-буфера (с 2,5 mM MgCl₂), 2 мкл смеси dNTP (каждый дезоксирибонуклеотид в концентрации 0,2 mM), по 2 мкл праймеров unish и unirmy с концентрацией 1 пкмоль/мкл (unish-5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTAC-3', unirmy-5'-CATGAAGGCATCGGATCGCATC-3'); 0,5 мкл 0,5 е.а. термофильной ДНК-полимеразы *Thermus Aquaticus* производства фирмы «Силекс», 6,5 мкл деионизированной воды (MilliQ, Merck). Программа амплификации: денатурация при 95°C 5 мин. – 1 цикл; отжиг праймеров: 94°C - 20 с., 62°C - 20 с., 72°C - 20 с. (35 циклов); элонгация: 72°C 3 мин. – 1 цикл; хранение при 10°C.

Продукт амплификации детектировали при помощи 9% ПААГ, окрашенного в бромистом этидии и визуализировали на трансиллюминаторе в проходящем UV-свете (Табл. 6, 7) при длине волны 260 нм.

Таблица 6 – Интерпретация результатов МЛРА-анализа, Point-панель

Точка	Длина фрагмента (п.н.)	Интерпретация
m.14459	151	m.14459G>G (Норма)
	147	m.14459G>A (Мутация)
m.8344	143	m.8344A>A (Норма)
	139	m.8344A>G (Мутация)
m.13513	99	m.13513G>G (Норма)
	103	m.13513G>A (Мутация)
m.13094	131	m.13094T>T (Норма)
	127	m.13094T>C (Мутация)
m.3243	115	m.3243A>A (Норма)
	111	m.3243A>G (Мутация)
m.8993	92	m.8993T>T (Норма)
	89	m.8993T>G (Мутация)
	86	m.8993T>C (Мутация)

Таблица 7 – Интерпретация результатов MLPA-анализа, LP-панель

Точка	Длина фрагмента (п.н.)	Интерпретация
m.8363	151	m.8363G>G (Норма)
	147	m.8363G>A(Мутация)
m.14484	131	m.14484T>T (Норма)
	127	m.14484T>C (Мутация)
m.10197	119	m.10197G>G (Норма)
	121	m.10197G>A(Мутация)
m.3460	115	m.3460G>A (Мутация)
	111	m.3460G>G (Норма)
m.11778	103	m.11778G>G (Норма)
	99	m.11778G>A (Мутация)
m.3697	89	m.3697G>G (Норма)
	92	m.3697G>A (Мутация)

2.2.3 ПЦР и последующее секвенирование амплификационных фрагментов

Методом прямого автоматического нерадиоактивного секвенирования проводилось исследование нуклеотидной последовательности в двух отдельных реакционных смесях для каждого фрагмента: с прямого и обратного праймера. Матрицей для проведения секвенирования служили фрагменты, полученные после проведения ПЦР. Автоматическое секвенирование проводили согласно протоколу фирмы-производителя на приборе ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Результаты секвенирования анализировали с помощью программ Chromas и Nucleotide BLAST (NCBI, США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.2.4 ПЦР протяженных фрагментов (Long-Range PCR)

Для детекции крупных делеций мтДНК выполнялась ПЦР протяженных фрагментов с использованием полимеразы HF-Fuzz («Dialat LTD», Россия) и парой праймеров, покрывающих регион, в котором описано большинство патогенных крупных делеций (m.6381-m.16566, NC_012920.1): MT.DEL (5'-GGGGCCATCAATTTTCATCACAACAATTATC-3') и mito34R (5'-CGTGATGTCTTATTTAAGGGGAACGTGTGGGCTAT-3'). Полученный фрагмент 10 т.п.н. анализировали в 1% агарозном геле в проходящем УФ-свете ($\lambda=260$ нм) при помощи окрашивания в бромистом этидии.

2.2.5 Таргетное секвенирование

Секвенирование 62 ядерных митохондриальных генов и 587 ядерных генов наследственных болезней обмена веществ (приложения 5 и 6) проведено методом NGS (Next Generation Sequencing) на приборе Ion Torrent PGM™ System for Next-Generation Sequencing (Thermo Fisher Scientific, США). Пробоподготовка образцов ДНК проводилась набором реагентов Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (дизайн пула праймеров по технологии Ampliseq) согласно протоколу производителя. Визуализация выравнивания секвенируемых фрагментов на референсную последовательность генома человека Human.hg19 проведена в программе IGV (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute, USA) [Robinson J.Y. et al., 2017]. Обнаруженные изменения аннотировали с помощью онлайн биоинформатического сервиса ANNOVAR [Wang K. et al., 2010].

2.2.6 Полный анализ последовательности мтДНК

Пробоподготовка включала несколько этапов. С использованием полимеразы HF-Fuzz («Dialat LTD», Россия) проводили ПЦР с двумя длинными фрагментами мтДНК (по 8,5 и 9 т.п.н. соответственно): праймеры для I фрагмента – L644 (5'-GACGGGCTCACATCACCCATAA-3'), H8982 (5'-GCGTACGGCCAGGGCTATTGGT-3'); праймеры для II фрагмента – mito34F (5'-TCATTTTTTATTGCCACAACCTCCTCGGACTC-3'), mt1195R (5'-

AGAGGGATATGAAGCACCGCCA–3’), покрывающими всю последовательность мтДНК, с последующим выделением их из агарозного геля на колонках Monarch DNA Gel Extraction Kit («New England Biolabs», Великобритания), согласно протоколу производителя. Смесь двух фрагментов мтДНК, по 50 нг каждый, использовали для подготовки библиотек для секвенирования с помощью коммерческого набора NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent™ («New England Biolabs», Великобритания) с целью последующего параллельного секвенирования на приборе IonTorrent (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ полученных данных проводили с помощью выравнивания секвенируемых фрагментов мтДНК относительно референсной последовательности (GenBank NC_012920) в программе IGV. Обнаруженные нуклеотидные замены сравнивали с базой данных по мутациям и полиморфизмам мтДНК MITOMAP [www.mitomap.org]. Данное исследование не включало поиск крупных перестроек мтДНК.

2.3 Определение концентрации органических кислот в моче методом ГХ-МС

Для анализа концентрации органических кислот использовали утреннюю порцию мочи, собранную в стерильный контейнер. Собранные образцы мочи хранили при -20°C. Уровень органических кислот в моче анализировали методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) в виде триметилсилиловых эфиров. Пробоподготовку проводили аналогично Lefevre M.F. с модификациями [Lefevre M.F. et al., 1989]. Анализ выполняли на приборе 7890A/5975C (Agilent Technologies, США) с колонкой HP-5MS (30 м*0.25 мм*4 мкм). Исследовали 72 метаболита (приложение 7). Расчет полученных результатов осуществляли методом внутреннего стандарта (2-гидроксиизокапроновая кислота концентрацией 380 нМ) и проводили нормализацию на уровень креатинина в образце.

2.4 Определение концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 в плазме крови

Иммуноферментный анализ для измерения концентрации FGF-21 и GDF-15 проводили наборами Human fibroblast factor-21 ELISA, Human GDF-15 фирмы Biovendor (Czech Republic) по протоколу производителя на плащечном спектрофлуориметре LS55 Luminescence Spectrometr (Perkin Elmer, Великобритания). Концентрацию образца рассчитывали по калибровочной кривой. При обнаружении максимально допустимой флуоресценции, образец плазмы крови пациента дополнительно разведен в 10 раз.

2.5 Культивирование фибробластов кожи

Первичные ККФ получены из фрагмента биопсии кожи внутренней стороны предплечья (0,5 см в диаметре). Клетки выращивали до 85% конfluence при 37°C в специальной пролиферативной среде “Амниокар” (Пан-Эко, Москва). Для исследования клетки субкультивировали в среде DMEM с добавлением 10% бычьей сыворотки (FBS) и 200 мкМ уридина. Все приготовления образцов и их пробоподготовка осуществлена центром коллективного пользования “Биобанк” (ФГБНУ “МГНЦ”, зав. к.б.н. Табаков В.Ю.).

2.6 Высокорастворимая респирометрия

Для снятия ККФ с 25 см² культуральных флаконов использовали 0,25% раствор трипсина, полученную суспензию с клетками центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Полученный осадок клеток (1,5-4,0x10⁶ клеток/мл) ресуспендировали в предварительно подогретой при 37°C 2 мл дыхательной среды MIR05 (табл. 8) рН=7,1. Все компоненты (исключая лактобionate и BSA) взвешены и перемешаны на магнитной мешалке.

Таблица 8 – Дыхательная среда MIR05

Компонент	Конечная концентрация	Молекулярный вес	Фирма-производитель
EGTA	0,5 мМ	380,4 г/моль	Sigma-Aldrich, E4378
MgCl ₂ *6 H ₂ O	3 мМ	203,3 г/моль	Serva
Лактобионат	60 мМ	358,3 г/моль	Sigma-Aldrich, 153516
Таурин	20 мМ	125,1 г/моль	Sigma-Aldrich, T0625
KH ₂ PO ₄	10 мМ	136,1 г/моль	РеалХим
HEPES	20 мМ	238,3 г/моль	Sigma-Aldrich, H7523
D-Сахароза	110 мМ	342,3 г/моль	Sigma-Aldrich, 84097
BSA (бычий сывороточный альбумин)	1 г/л	-	Sigma-Aldrich, A6003

Затем добавляли предварительно подготовленный К-лактобионат (0,5 М, рН=7,0) и доводили рН до 7,1 с помощью 5 М КОН. После добавляли BSA и осторожно перемешивали, не создавая пузырей.

Для анализа скорости потребления кислорода клетками использовали метод высокоразрешающей респирометрии на оксиграфе Oxуgraph-2k (Oroboros Corp., Австрия), обработку данных производили с помощью программы DatLab 5.0.

Перед экспериментом проводили калибровку с открытыми камерами (“Air calibration”) для оценки состояния кислородных сенсоров прибора и наличия биологической контаминации в камерах. После замены мембран на сенсорах проводили калибровку с открытыми камерами и “нулевую” калибровку (“Zero calibration”) в присутствии 30 мМ дитионина для корректировки побочных шумов (“Background correction”). Эксперименты выполняли при 37°C с помощью магнитного перемешивания при скорости 750 об/мин. Подсчет клеток выполнен в камере Горяева. Список использованных субстратов, ингибиторов и разбавителя представлен в табл. 9 [Gnaiger E., 2014].

Таблица 9 – Субстраты, ингибиторы, разобщители для респирометрических экспериментов

Реактив	Рабочая концентрация	Конечная концентрация (2 мл камера оксиграфа)	Фирма-производитель
Пируват	2 М	5 мМ	Serva 15220.01
Малат	0,4 М	0,5 мМ	Sigma M1000
Олигомицин	5 мМ	2 мкМ	Sigma O4876
FCCP	4 мМ	0,05 мкМ	Sigma C2920
Антимицин А	5 мМ	2,5 мкМ	Sigma A8674
Ротенон	1 мМ	0,5 мкМ	Sigma R8875
ГлютаMAT	2 М	10 мМ	Sigma G1626
Сукцинат	1 М	10 мМ	Sigma S2378
Дигитонин	10 мг/мл	10 мкг/10 ⁻⁶ клеток	Serva 19551.02
АДФ	0,5 М	5 мМ	Sigma A5285
ТМРD	0,2 М	0,5 мМ	Sigma T3134
Аскорбат	0,8 М	2 мМ	Sigma A7631
Азид Na	4 М	100 мМ	Sigma S2002
Цитохром С	4 мМ	10 мкМ	Sigma C7752
Дитионин	30 мМ	-	Sigma 71699

2.6.1 Высокора разрешающая респирометрия с использованием интактного протокола

Полученную суспензию клеток помещали в камеры оксиграфа и регистрировали дыхание на эндогенных субстратах (R, ROUTINE). Через 10-15 мин после стабилизации сигнала добавляли 5 мМ пируват и 0,5 мМ малат для проверки интактности плазматической мембраны. 2,5 мкМ олигомицин добавлен для ингибирования АТФ-азы (L, LEAK) и затем достигали максимальной скорости потребления кислорода титрованием 0,05 мкМ разобщителем FCCP (E, ETS). После

стабилизации сигнала добавляли 0,5 мкМ ротенон для ингибирования КДЦМ I и 2,5 мкМ антимицин А для определения антимицин-нечувствительного дыхания (ROX).

2.6.2 Высокора разрешающая респирометрия с использованием пермеабиллизованного протокола

Применяли SUIT (substrate-uncoupler-inhibitor-titration) протокол согласно Ye F. [Ye F., Noppel C., 2013]. Чтобы определить оптимальную концентрацию дигитонина для селективной пермеабиллизации плазматической мембраны, проводили титрование согласно D. Pesta [Pesta D., Gnaiger E., 2012]. 4×10^6 линий клеток кожных фибробластов, суспендированных в 2 мл дыхательной среды MIR05, добавляли в камеру оксиграфа, 10 минут регистрировали дыхание на эндогенных субстратах. Затем ингибировали КДЦМ I 1 мМ ротеноном, добавляли последовательно 1 М сукцинат и 0,5 М АДФ.

Для проведения пермеабиллизованного протокола $2-4 \times 10^6$ линий клеток кожных фибробластов и пациентов помещали в камеры оксиграфа в дыхательной среде MIR05, регистрировали дыхание на эндогенных субстратах, затем добавляли 5 мМ пируват и 0,5 мМ малат для проверки интактности плазматической мембраны. Затем добавляли дигитонин при оптимальной концентрации для пермеабиллизации плазматической мембраны. 1 мМ АДФ добавлен для стимуляции окислительного фосфорилирования, затем добавлялся НАДН-связанный субстрат 10 мМ глютамат (C_{IETS}), субстрат КДЦМ II 10 мМ сукцинат (C_{I+IIETS}). Титрованием 0,05 мкМ разобщителем FCCP достигали максимальной скорости потребления кислорода, стимулированного субстратами КДЦМ I и II (E, ETS). После стабилизации сигнала добавляли 0,5 мкМ ротенон для ингибирования КДЦМ I (C_{IIETS}) и 2,5 мкМ антимицин А для определения антимицин-нечувствительного дыхания (ROX). Для измерения скорости дыхания КДЦМ IV, добавляли 2 мМ аскорбат и 0,5 мМ TMPD и 100 мМ азида натрия для ингибирования КДЦМ IV (C_{IV}). C_{IV} определяли вычитанием ответа на TMPD+аскорбат за вычитанием скорости потребления кислорода при добавлении азида натрия.

2.7 Определение активности цитрат-синтазы

Активность цитрат-синтазы (как контрольного маркера митохондриальной массы) в ККФ, собранных из камер оксиграфа после респирометрического анализа, измеряли согласно протоколу Eigentler на спектрофотометре UV-1800 фирмы “Shimadzu” (Япония) в 1 мл кювете [Larsen S. et al., 2012]. 100 мкл суспензии клеток в MIR05, собранных из камер оксиграфа после эксперимента, смешивали с 0,25 % Triton X-100, 0,31 мМ Ацетил-КоА, 0,1 мМ DTNB и в самом конце добавляли 0,5 мМ оксалацетат в 1 мл кварцевой кювете, проводя измерение изменения оптической плотности во времени при длине волны 412 нм. В качестве стандарта реакции использовали коммерческую цитрат-синтазу из сердца свиньи (Sigma C3260) с разведением 1:1000000.

Полученный результат нормализован на уровень тотального белка в образце, измеренном методом Брэдфорда на плащечном спектрофлуориметре LS55 Luminescence Spectrometr (Perkin Elmer, США). 40 мкл реагента Брэдфорда (100 мг Coomassie Blue G-250, 50 мл 96% этанола, 100 мл ортофосфорной кислоты в 1 л дистиллированной воды) смешивали с 20 мкл образца и добавляли дистиллированной воды до 200 мкл. Далее измеряли оптическую плотность образца при длине волны 595 нм после 15 мин инкубации. Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой, которую строили для стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл [Bradford M.M., 1976].

Специфическая активность рассчитывалась по формуле:

$$v = \frac{r}{l \cdot \varepsilon \cdot \beta} \cdot \frac{V_{\text{кюветы}}}{V_{\text{образца}} \cdot \rho},$$

где ν - специфическая активность в образце,

ε - коэффициент экстинкции TNB при длине волны 412 нм и pH=8.1 (13.6 мМ⁻¹ см⁻¹)

β - стехиометрический коэффициент TNB в реакции (= 1).

l - оптический путь, 1 см.

$r = dA/dt$ = скорость абсорбции образца [мин⁻¹]

$V_{\text{кюветы}}$ - 1000 мкл

$V_{\text{образца}}$ - 100 мкл

Полученное значение нормализовалось на содержание белка в образце (ρ , [мг/мл]) и выражалось в [IU/мг белка].

2.8 Статистическая обработка данных

Для определения различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с уровнем значимости $\alpha = 0,05$. Для оценки чувствительности и специфичности использовали ROC-анализ и подсчет площади под кривой (AUC) в программе GraphPrism 6.0. Максимальная специфичность (95%) использована для определения порогового значения концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15. Диагностическую значимость рассчитывали как положительную прогностическую значимость (Positive Predictive Value, PPV) и отрицательную прогностическую значимость (Negative Predictive Value, NPV). Для подсчета корреляций использовали непараметрический регрессионный анализ по Спирмену. Для построения графиков использовали код R в приложении RStudio.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика исследуемой выборки

Сформирована выборка из биообразцов 171 пациента с верифицированным молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ, включающая 9 клинических групп: синдром Ли, синдром KSS, синдром Пирсона, MELAS синдром, синдром Альперса, *DGUOK*-ассоциированная гепатопатия, митохондриальная миопатия/энцефалопатия, НОНЛ и синдром РЕО (Табл. 10).

Определение уровня органических кислот методом ГХ-МС проведено у 84 пациентов, распределенных по клиническим группам: синдром KSS (N=4), MELAS синдром (N=6), синдром Альперса (N=5), синдром Ли (N=33), синдром Пирсона (N=7), митохондриальная миопатия/энцефалопатия (N=24), *DGUOK*-ассоциированная гепатопатия (N=5). Распределение мутаций по генам: *MT-ND1* (N=2), *MT-ND3* (N=1), *MT-ND5* (N=6), *MT-ND6* (N=3), *MT-ATP6* (N=8), *NDUFAF6* (N=1), *NDUFS2* (N=1), *NDUFS4* (N=1), *NDUFV1* (N=1), *POLG* (N=6), *RRM2B* (N=1), *SCO2* (N=11), *SUCLG1* (N=1), *SURF1* (N=9), *TK2* (N=1), *tRNA Leu (UUR)* (N=7), *tRNA Phe* (N=1), *TWINK* (N=4), *FBXL4* (N=1), *DGUOK* (N=5), *COX10* (N=1), *NUBPL* (N=1); крупные делеции мтДНК (N=11). В данном исследовании пациенты с мутациями в мтДНК составили 46,4% (39/84); преобладали пациенты с мутациями в ядерных генах, вызывающих ПМЗ, большинство составили пациенты с мутациями в генах-сборщиках IV КДЦМ (*SURF1*, *SCO2*).

Определение концентрации плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15 проводили у 105 пациентов в плазме крови с диагнозами: синдром Ли (N=29), НОНЛ (N=22), митохондриальная миопатия/энцефалопатия (N=25), MELAS синдром (N=10), синдром KSS (N=5), синдром РЕО (N=5), Альперс синдром (N=5), *DGUOK*-ассоциированная гепатопатия (N=4). Распределение выборки пациентов в зависимости от молекулярно-генетической причины (мутаций в генах): *POLG* (N=14), *MT-ND4* (N=12), *MT-ND1* (N=10), *MT-ATP6* (N=8), *SURF1* (N=8), *tRNA Leu (UUR)* (N=8), *TWINK* (N=8), *MT-ND6* (N=5), *SCO2* (N=5), *DGUOK* (N=4), *MT-ND5* (N=4), *MT-ND3* (N=3), *tRNA Lys* (N=2), *tRNA Phe* (N=1), *COX10* (N=1), *FBXL4* (N=1), *MT-TL1* (N=1), *NDUFS2* (N=1), *NDUFV1* (N=1), *RRM2B* (N=1), *SUCLG1* (N=1);

крупные делеции мтДНК (N=6). 57,2 % пациентов представлены мутациями в мтДНК, 42,8% - в ядерном геноме.

Таблица 10 – Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика исследуемой выборки

Клинический фенотип	Функциональная группа	Ген
Синдром Ли (N=49)	КДЦМ I (N=16)	<i>MT-ND1 (N=4), MT-ND3 (N=3), MT-ND5 (N=8), MT-ND6 (N=5), NDUFV1 (N=1), NDUFS2 (N=1), NDUFS4 (N=1)</i>
	АТФаза 6	<i>MT-ATP6 (N=11)</i>
	КДЦМ IV	<i>SURF1 (N=15)</i>
Синдром KSS (N=9)	Делеции мтДНК	-
Синдром Пирсона (N=7)	Делеции мтДНК	-
Синдром MELAS (N=15)	мт тРНК	<i>tRNA Leu (UUR) (N=12), MT-ND3 (N=1), MT-ND1 (N=1), MT-TL1 (N=1)</i>
Синдром Альперса (N=9)	Истощение мтДНК/дефекты нескольких КДЦМ	<i>POLG</i>
DGUOK-ассоциированная гепатопатия (N=5)	Истощение мтДНК/дефекты нескольких КДЦМ	<i>DGUOK</i>
Миопатия/Энцефалопатия (N=39)	Недостаточность КДЦМ IV (N=14)	<i>SCO2 (N=13), COX10 (N=1)</i>
	Истощение мтДНК/дефекты нескольких КДЦМ (N=25)	<i>TWINK (N=9), FBXL4 (N=1), RRM2B (N=1), tRNA Leu (UUR) (N=1), tRNA Lys (N=1), SUCLG1 (N=1), tRNA Phe (N=1), MT-ATP6 (N=1), POLG (N=8)</i>

	КДЦМ I (N=1)	<i>NUBPL</i>
НОНЛ (N=33)	КДЦМ I	<i>MT-ND1 (N=9)</i> <i>MT-ND4 (N=15), MT-ND5 (N=2), MT-ND6 (N=5), DNAJC30 (N=2)</i>
Синдром РЕО (N=5)	Истощение мтДНК/дефекты нескольких КДЦМ	<i>POLG</i>

Для оценки скорости потребления кислорода митохондриями исследовали 27 ККФ с диагнозами: НОНЛ (N=21), Ли-подобный синдром (N=3), синдром MELAS (N=1), митохондриальная миопатия с высоким лактат-ацидозом (N=1), эпилептическая энцефалопатия (N=1). Распределение мутаций по генам: *MT-ND1* (N=9), *MT-ND3* (N=1), *MT-ND4* (N=4), *MT-ND5* (N=3), *MT-ND6* (N=5), *MT-TF* (N=1), *MT-TL1* (N=1), *DNAJC30* (N=2), *NUBPL* (N=1). 88% выборки ККФ пациентов составили мутации в мтДНК, преимущественно в генах, кодирующих субъединицы КДЦМ I.

3.2 Изучение особенностей спектра органических кислот мочи у пациентов с ПМЗ

Среди 84 пациентов с ПМЗ, отклонения в спектре и уровне органических кислот в моче выявлены в 78% (66/84) случаев (рис. 11). Это согласуется с данными, полученными в других исследованиях. Так в работе Alban C. показано, что повышение концентрации органических кислот в моче выявлено у 82% пациентов, однако в этом исследовании диагноз ПМЗ поставлен без молекулярно-генетического подтверждения [Alban C. et al, 2017]. При этом в каждой из клинических групп выявлены пациенты, у которых концентрация метаболитов была в пределах нормы.

Основными патологическими изменениями в спектре органических кислот в моче было повышение концентрации следующих метаболитов: лактат (77%, 51/66), пируват (42%, 28/66), 2-гидроксиизобутират (86%, 57/66), 3-гидроксибутират (95%, 63/66), фумарат (92%, 61/66), 4-гидроксифениллактат (27%, 18/66) и 4-

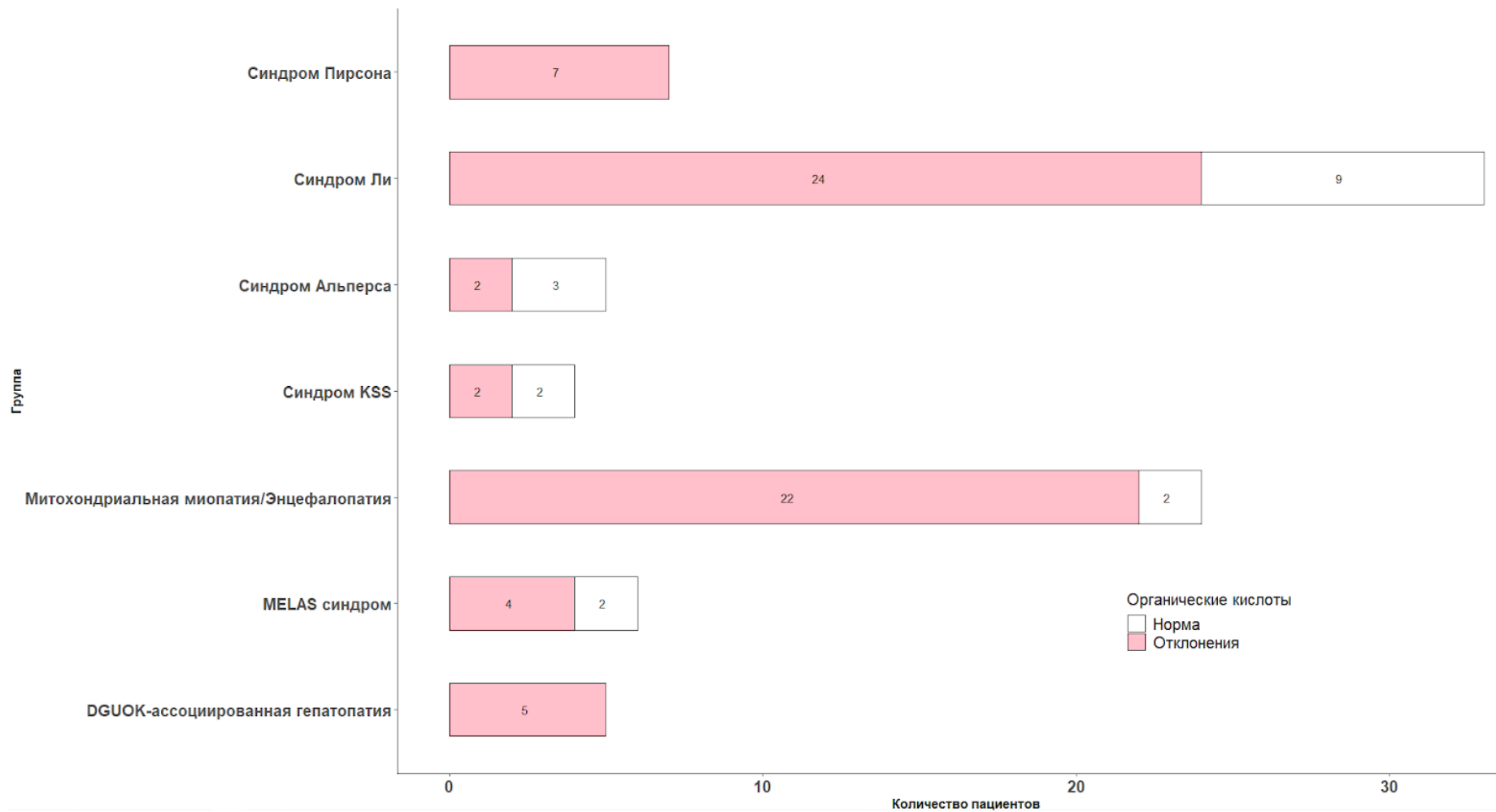


Рисунок 11 – Распределение отклонений уровня органических кислот у пациентов с ПМЗ.

Примечание: внутри столбца указано количество пациентов

гидроксифенилпируват (56%, 37/66). В работе Alban C. у пациентов с ПМЗ также преобладали лактат и кетоновые тела (в основном 3-гидроксибутират) [Alban C. et al, 2017]. Все эти метаболиты относятся к соединениям, связанным с нарушением функции митохондрий, и отражают нарушение соотношения редокс-пары НАДН/НАД⁺ в цитоплазме клетки и внутри митохондрий.

3.2.1 Метаболиты нарушения соотношения редокс-пары НАДН/НАД⁺

При наличии дефектов OXPHOS, соотношение НАДН/НАД⁺ резко повышено вследствие сниженной скорости окисления НАДН в дыхательной цепи митохондрий. В связи с чем концентрация лактата, а также пирувата повышается у больных с ПМЗ.

3.2.1.1 Лактат

Повышение концентрации молочной кислоты (лактата) в крови и моче является одним из известных биомаркеров ПМЗ. Повышение содержания лактата является следствием блока дыхательной цепи митохондрий и перехода клеток на анаэробный путь выработки энергии. Однако этот маркер, с одной стороны, не является высокоспецифичным, так как может повышаться и при других наследственных и не наследственных заболеваниях (нарушения обмена углеводов, органические ацидурии, почечный-тубулярный ацидоз), а с другой стороны, может быть в пределах нормы у пациентов с ПМЗ [Haas R.H. et al., 2008]. Наибольшие значения концентрации лактата (рис. 12) наблюдались в группе пациентов с синдромом Ли (медиана - 27,24 мМ/М CRE, размах 0-19051 мМ/М CRE), митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана - 41,6 мМ/М CRE, размах 1,65-83640 мМ/М CRE), *DGUOK*-ассоциированной гепатопатией (медиана - 34,95 мМ/М CRE, размах 16,02-118,2 мМ/М CRE), синдромом Пирсона (медиана - 250,2 мМ/М CRE, размах 22,59-3211 мМ/М CRE). При сравнении с группой контроля все подгруппы пациентов (кроме синдрома Альперса) имели статистически значимые различия ($p < 0,001$), однако в каждой из подгрупп у отдельных пациентов выявлены нормальные значения концентрации лактата в моче.

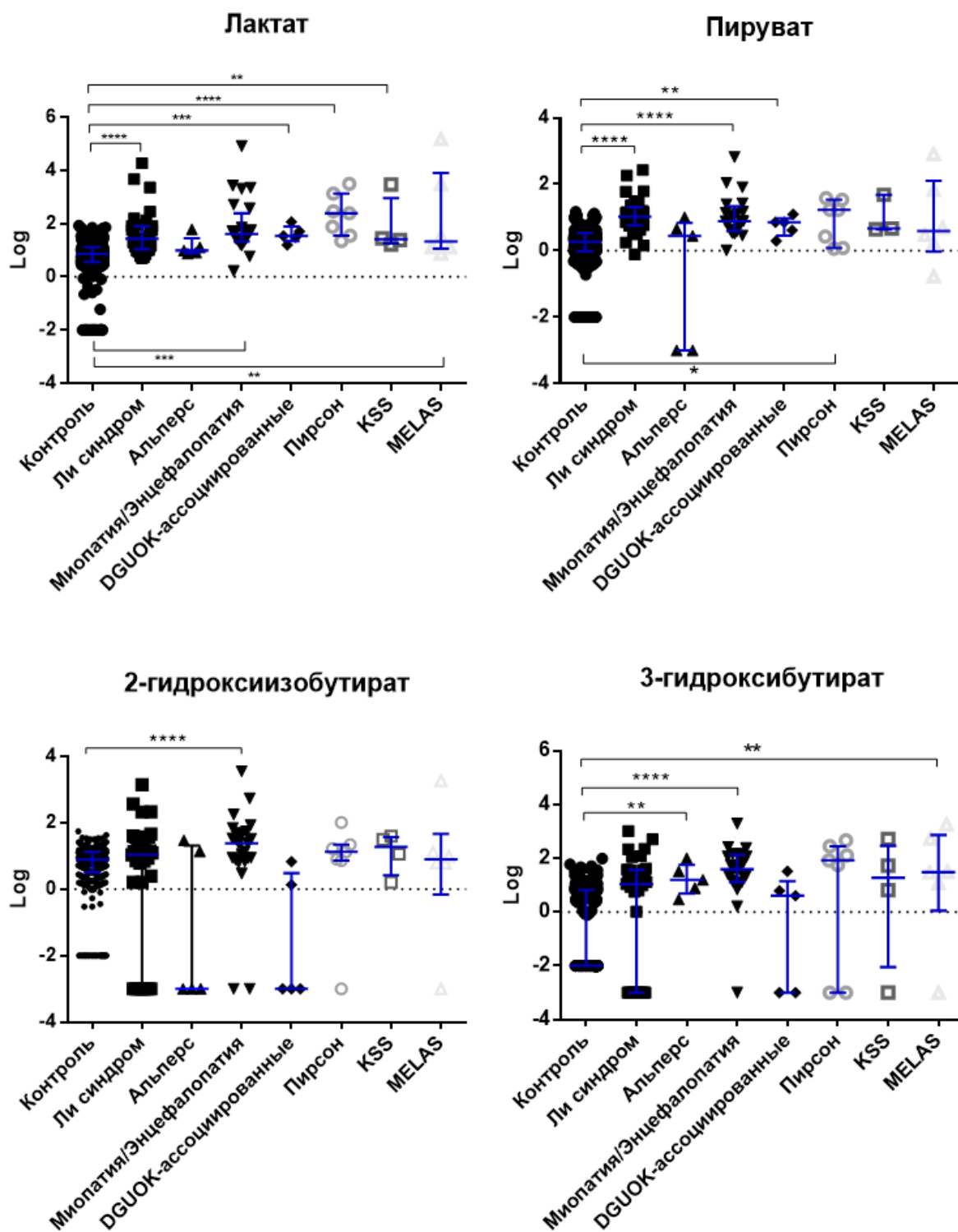


Рисунок 12 – Концентрация метаболитов, ассоциированных с лактатурией в группах пациентов с ПМЗ.

Примечание: Данные представлены как медиана±межквартильный размах. p-value отмечен звездочкой, использован непараметрический критерий Манна-Уитни при сравнении с контролем. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$, **** - $p < 0,0001$

3.2.1.2 Пируват

Пируват является конечным продуктом гликолиза. Из цитоплазмы пируват транспортируется в матрикс митохондрий, где превращается в ацетил-КоА или в оксалоацетат, участвующих в цикле Кребса [Gray L.R. et al., 2014]. Концентрация пирувата (рис. 12) значительно повышена в группах пациентов с синдромом Ли (медиана - 7,72 мМ/М CRE, размах 0-268 мМ/М CRE), Пирсона (медиана - 17,11 мМ/М CRE, размах 1,15-38,47 мМ/М CRE) и *DGUOK*-ассоциированной гепатопатией (медиана - 7,21 мМ/М CRE, размах 1,98-12,54 мМ/М CRE).

3.2.1.3 3-гидроксибутират

3-гидроксибутират образуется из ацетоацетата и НАДФ при помощи фермента 3-гидроксибутират дегидрогеназы. Концентрация 3-гидроксибутирата (рис. 12) превышала нормальные значения в группе пациентов с синдромом Альперса (медиана - 16,12 мМ/М CRE, размах 2,9-100 мМ/М CRE), митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана - 39,98 мМ/М CRE, размах 0-1963 мМ/М CRE) и в подгруппе пациентов с синдромом MELAS (медиана - 30,63 мМ/М CRE, размах 0-1879 мМ/М CRE). При сравнении с группой контроля все подгруппы имели статистически значимые различия ($p < 0,005$). При ПМЗ соотношение НАДН/НАД⁺ повышено, вследствие чего уровень 3-гидроксибутирата также повышается. В работе Legault при скрининге 9 пациентов с канадской формой синдрома Ли (вызванной мутациями в гене *LRPPRC*) на 45 различных метаболитов в плазме и моче, также выявлено значительное повышение концентрации 3-гидроксибутирата [Thompson Legault J. et al., 2015].

3.2.1.4 2-гидроксиизобутират

2-гидроксиизобутират (или α -гидроксиизобутират) не является эндогенным метаболитом и представляет собой побочный продукт метил-трет-бутилового эфира (2-метил-2-метоксипропан), который поступает в организм экзогенно и быстро выводится [Tsoukalas D et al., 2020]. 2-гидроксиизобутират в норме выводится почками с помощью переносчика монокарбоновой кислоты. Данный транспортер также

переносит и лактат; при лактат-ацидозе 2-гидроксиизобутират не может полностью реабсорбироваться, вследствие чего концентрация данного метаболита в моче повышается. Концентрация 2-гидроксиизобутирата максимально повышена в группах пациентов с митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана - 24,35 мМ/М CRE, размах 0-3544 мМ/М CRE) (рис. 12). Повышение 2-гидроксиизобутирата описано при диабете, болезни почек, при алкогольной интоксикации, поэтому он не является высокочувствительным биомаркером [Irwin C et al., 2018].

3.2.2 Метаболиты цикла Кребса

3.2.2.1 Фумарат

Фумарат — это дикарбоновая кислота, образующаяся в результате окисления сукцината сукцинатдегидрогеназой в цикле Кребса. Концентрация фумарата (рис. 13) повышена у всех подгрупп пациентов с ПМЗ, но значительное повышение выявлено только в группе пациентов с синдромом Пирсона (медиана - 31,9 мМ/М CRE, размах 7,1-74,73 мМ/М CRE) и у пациентов с митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана - 18,6 мМ/М CRE, размах 0-606 мМ/М CRE). Максимальное значение выявлено у пациента с мутациями в гене *NDUFV1*, кодирующем субъединицу комплекса дыхательной цепи митохондрий (КДЦМ) I, связанной с N-модулем. Вследствие нарушения функции КДЦМ I и повышенной выработке НАДН (нарушения соотношения НАДН/НАД⁺) и ФАДН, происходит нарушение регуляции цикла Кребса и повышение концентрации его метаболитов [Reinecke C.J. et al., 2012]. В работе Hertig D. при исследовании фибробластов пациентов с недостаточностью КДЦМ I методом ядерного магнитного резонанса - спектроскопии показали повышение содержания фумарата в лизате клеток [Hertig D. et al., 2019]. Также в работе Alahmad A. у пациента с вероятно патогенным гомозиготным вариантом в гене *NDUFC2*, кодирующем субъединицу КДЦМ I, выявлена повышенная экскреция фумарата с мочой [Alahmad A. et al., 2020].

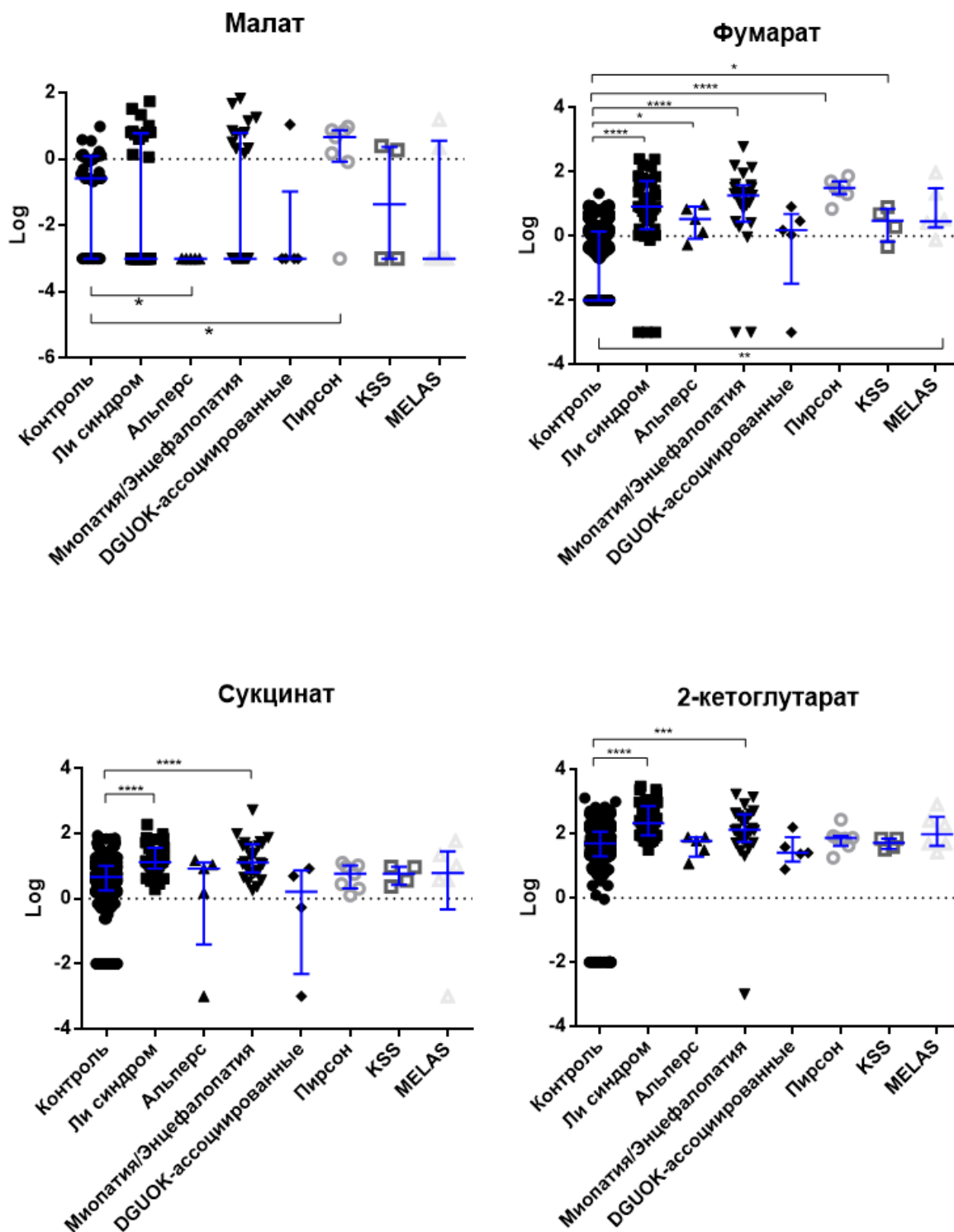


Рисунок 13 – Концентрация метаболитов цикла Кребса в группах пациентов с ПМЗ. Примечание: Данные представлены как медиана±межквартильный размах. p-value отмечен звездочкой, использован непараметрический критерий Манна-Уитни при сравнении с контролем. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$, **** - $p < 0,0001$

3.2.2.2 Сукцинат

Сукцинат — это дикарбоновая кислота, которая образуется из сукцинил КоА при помощи фермента сукцинил КоА синтетазы в цикле Кребса. В дальнейшем сукцинат используется как субстрат для КДЦМ II, где при помощи сукцинатдегидрогеназы он превращается в фумарат (ФАД-зависимая реакция) [Frezza С., 2017]. При исследовании концентрации сукцината (рис. 13) выявлено его значительное повышение в группе пациентов с митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана - 12,92 мМ/М CRE, размах 1,7-527,9 мМ/М CRE) и синдромом Ли (медиана - 13,02 мМ/М CRE, размах 1,9-188,7 мМ/М CRE).

3.2.2.3 Малат

Малат (яблочная кислота) — это 2-гидроксидикарбоновая кислота, которая образуется из фумарата посредством фермента фумаратдегидрогеназы [Frezza С., 2017]. Статистически достоверное отличие от контроля данного метаболита наблюдалось в группе пациентов с синдромом Пирсона (медиана - 4,62 мМ/М CRE, размах 0-9,47 мМ/М CRE) (рис. 13).

3.2.2.4 2-кетоглутарат

2-кетоглутарат (2-оксоглутарат, α -кетоглутарат) образуется при помощи НАДФ - зависимых изоцитрат дегидрогеназ в цикле Кребса из аконитазы (изоцитрата) [Frezza С., 2017]. При исследовании концентрации 2-кетоглутарата (рис. 13) выявлено его значительное повышение в группе пациентов с синдромом Ли (медиана - 212,8 мМ/М CRE, размах 31,34-3041 мМ/М CRE), и митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана - 133,2 мМ/М CRE, размах 0-1719 мМ/М CRE).

3.2.2.5 Цитрат и аконитовая кислота

Первый этап цикла Кребса включает в себя превращение ацетил КоА с оксалоацетатом в цитрат посредством фермента цитратсинтазы. Далее цитрат последовательно преобразуется в аконитовую кислоту и изоцитрат при помощи

митохондриального энзима аконитазы 2 [Frezza C., 2017]. В исследуемой выборке пациентов с ПМЗ не было представлено пациентов с повышенной концентрацией цитрата и аконитазы, что может быть связано с тем, что реакции превращения данных метаболитов не требуют присутствия таких кофакторов как НАДН/НАД⁺, баланс которых нарушен при ПМЗ.

3.2.3 Метаболиты нарушения функции печени: 4-гидроксифениллактат и 4-гидроксифенилпируват

4-гидроксифениллактат и 4-гидроксифенилпируват являются производными метаболизма тирозина. Концентрация данных соединений значительно повышены в группе пациентов с *DGUOK*-ассоциированной гепатопатией и статистически значимые различия концентрации 4-гидроксифенилпирувата выявлены в данной подгруппе и в подгруппе пациентов с синдромом Пирсона (рис. 14). У пациентов с мутациями в гене *DGUOK* выявлено статистически значимое повышение уровня 4-гидроксифениллактата (медиана - 1376 мМ/М CRE, размах 826-8615 мМ/М CRE), а также 4-гидроксифенилпирувата (медиана - 454,3 мМ/М CRE, размах 168,2-1018 мМ/М CRE), что связано с вовлечением дисфункции печени в патогенез заболевания [Boenzi S., Diodato D., 2018]. Наибольшие значения концентраций 4-гидроксифениллактата и 4-гидроксифенилпирувата выявлено у пациента с частой мутацией в гене *DGUOK* NM_080916.2:c.3G>A (p.M1I) и делецией около 9 кб, затрагивающий 2 экзон гена.

3.2.4 Этилмалоновая и метилмалоновая кислоты

В представленной выборке повышение концентрации этилмалоновой кислоты выявлено у пациентов в группе митохондриальной миопатии/энцефалопатии (медиана - 10,91 мМ/М CRE, размах 0-34,95 мМ/М CRE), синдромом Альперса (медиана - 8,44 мМ/М CRE, размах 0-17,84 мМ/М CRE), Пирсона (медиана - 3,04 мМ/М CRE, размах 1,56-7,53 мМ/М CRE) и KSS (медиана - 4,875 мМ/М CRE, размах 2,39-7,04 мМ/М CRE); статистически достоверного повышения концентрации метилмалоновой кислоты среди подгрупп пациентов с ПМЗ и группой контроля не обнаружено (рис. 14). Повышение концентрации этилмалоновой кислоты у

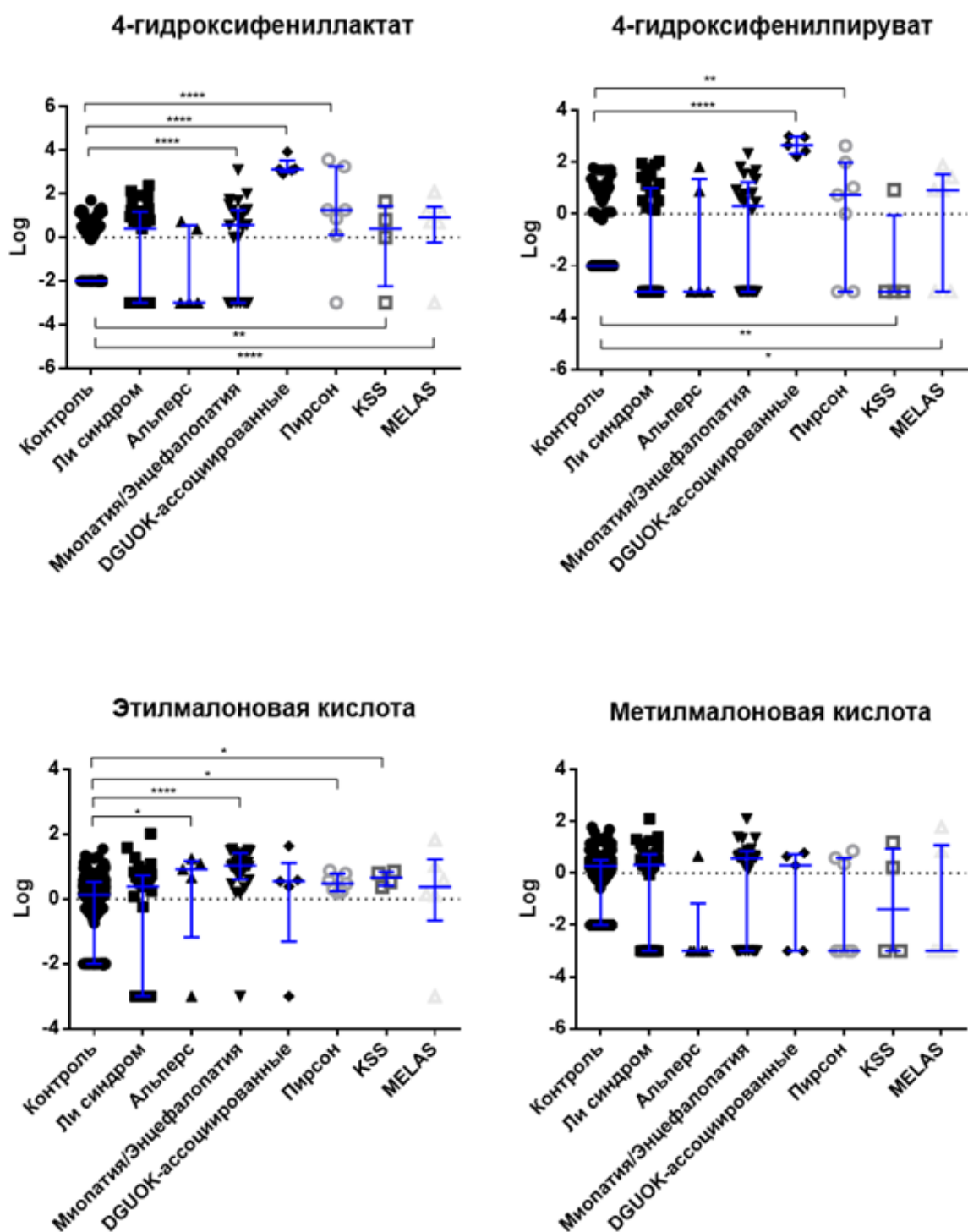


Рисунок 14 – Концентрация метаболитов, ассоциированных с нарушением функции печени (4-гидроксифениллактат и 4-гидроксифенилпируват) и двухосновные дикарбоновые кислоты в группах пациентов с ПМЗ.

Примечание: Данные представлены как медиана±межквартильный размах. p-value отмечен звездочкой, использован непараметрический критерий Манна-Уитни при сравнении с контролем. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$, **** - $p < 0,0001$

пациентов с ПМЗ, согласно литературным данным, наблюдается довольно часто [Boenzi S., Diodato D., 2018]. Максимальное значение концентрации метилмалоновой кислоты выявлено у пациента с мутациями в гене *SUCLG1*, кодирующий сукцинил-КоА синтазу. Среди всех форм синдромов истощения мтДНК, только пациенты с мутациями в генах *SUCLA2* и *SUCLG1* имеют значительное повышение концентрации метилмалоновой кислоты [El-Hattab A.W., Scaglia F., 1993].

3.2.4 Диагностические характеристики спектра метаболитов у пациентов с ПМЗ

В таблице 11 и на рис. 15 суммированы данные по результатам анализа ROC-кривых и соотношения для выражения результатов оценки диагностического теста для спектра метаболитов, характерных для пациентов с ПМЗ. Наибольшей чувствительностью по результатам ROC-анализа обладал 3-гидроксипируват (97,44%), а наибольшей специфичностью - 4-гидроксифенилпируват (93,8%) и 4-гидроксифениллактат (93,07%). При анализе площади под ROC-кривой (AUC) наибольшей диагностической значимостью теста обладал 3-гидроксипируват (0,9183), самой низкой - 4-гидроксифенилпируват (0,5172).

При проведении оценки достоверности теста наибольшая прогностическая ценность положительного теста выявлена у 4-гидроксифениллактата (94,74%) и пирувата (90,3%). Наибольшая прогностическая ценность отрицательного теста выявлена у фумарата (95,15%) и 3-гидроксипирувата (94,2%). Максимальный индекс точности выявлен у пирувата (90,7%) и 4-гидроксифениллактата (89,4%). Поскольку пируват и 4-гидроксифениллактат обладали максимальным отношением правдоподобия положительного результата теста (117,4 и 61 соответственно) и отношением правдоподобия отрицательного результата теста <1 (0,78 и 0,67 соответственно), данные метаболиты могут быть приняты во внимание при принятии решения о вероятности ПМЗ. В свою очередь, результаты отношений правдоподобия положительного и отрицательного результатов теста не дают основания учитывать диагностическую значимость повышения концентрации 2-гидроксиизобутирата при ПМЗ.

Таблица 11 – Диагностические характеристики спектра и уровня метаболитов у пациентов с ПМЗ

ПЦПТ - прогностическая ценность положительного теста, ПЦОТ - прогностическая ценность отрицательного теста, ОППР - отношение правдоподобия положительного результата теста, ОПОР - отношение правдоподобия отрицательного результата теста.

Параметр/ Метаболит	Лактат	Пируват	3- гидрокси- -бутират	2- гидрокси- изобутират	4- гидроксифенил лактат	4- гидроксифенил пируват	Сукцинат	Фумарат	2-кетоглутарат
Чувствительность, ROC-анализ	83,3%	87,95%	97,44%	65%	64,7%	52,94%	64,71%	89,41%	65,15%
Специфичность, ROC-анализ	74,63%	63%	69,61%	66,62%	93,07%	93,8%	65,69%	68,43%	58%
AUC, ROC-анализ	0,8575	0,8514	0,9183	0,7453	0,6331	0,5172	0,6820	0,8468	0,6574
Чувствительность теста	60,7%	33,3%	73,8%	66,7%	21,43%	44,05%	30,95%	72,62%	38,10%
Специфичность теста	89,8%	99,4%	65,6%	23,3%	99,82%	94,71%	84,49%	82,30%	81,39%
ПЦПТ	47,7%	90,3%	24,7%	11,7%	94,74%	56,06%	23,42%	38,61%	23,88%
ПЦОТ	93,7%	90,7%	94,2%	82%	89,23%	91,70%	88,87%	95,15%	89,56%
Индекс точности	85,6%	90,7%	66,7%	29%	89,40%	87,97%	77,37%	81,01%	75,63%
ОППР	5,9	61	2,14	0,87	117,4286	8,323481	1,995518	4,102602	2,046685
ОПОР	0,44	0,67	0,39	1,43	0,787151	0,590788	0,817237	0,3327	0,760624

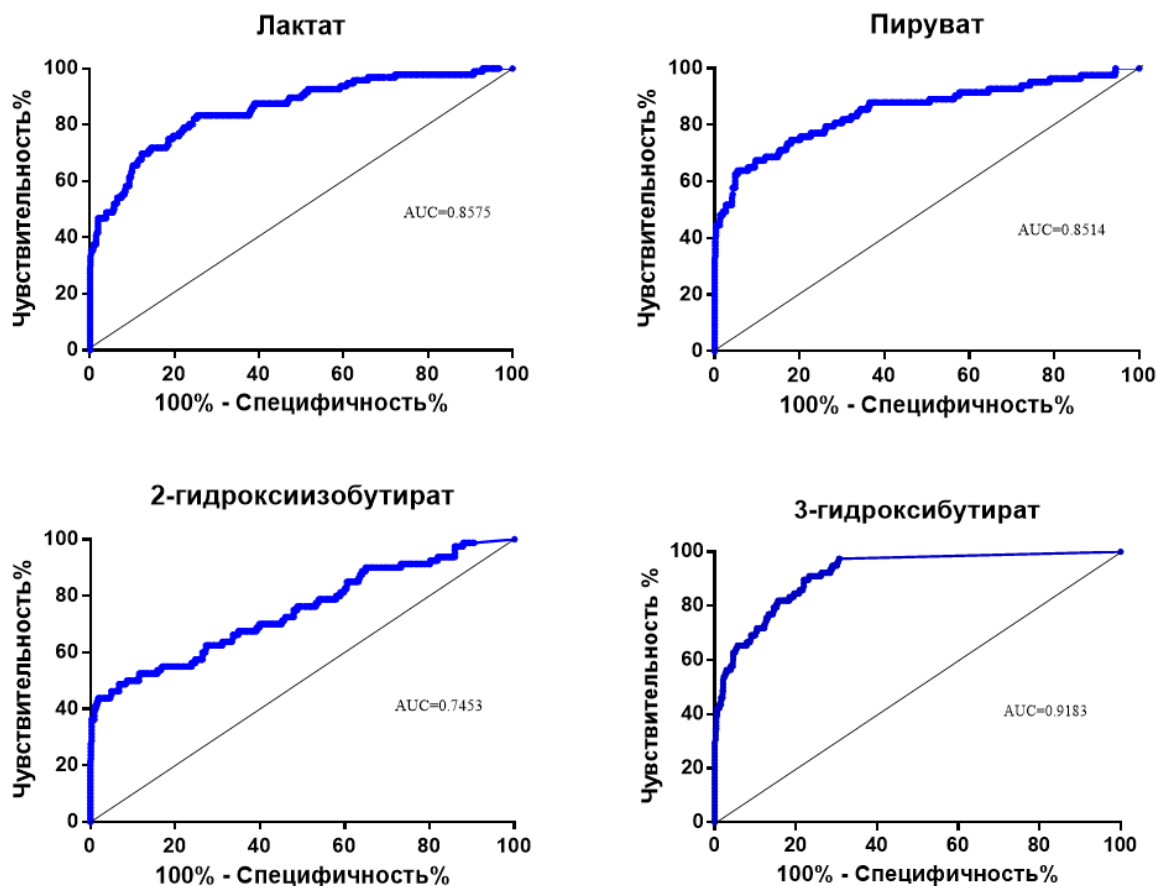


Рисунок 15 – Чувствительность и специфичность наиболее значимых метаболитов в исследуемой выборке пациентов с ПМЗ, ROC-анализ

3.2.5 Особенности распределения метаболитов в отдельных группах ПМЗ

Только у 4 из 6 пациентов с синдромом MELAS выявлены отклонения в спектре органических кислот в моче - у данной группы пациентов выявлен наибольший уровень лактата (размах 7,38-153849 мМ/М CRE), поскольку MELAS характеризуется стойкой лактатемией. Также повышен уровень кетоновых тел - 3-гидроксибутирата и 2-гидроксиизобутирата, что может быть связано с повышением уровня лактата и с сахарным диабетом I типа (как клинический признак данной группы больных), характеризующийся кетоацидозом в ответ на повышение уровня глюкозы в крови за счет дисфункции бета-клеток поджелудочной железы [Stojanovic V., Ihle S., 2011]. Esterhuizen K. с соавт. при исследовании метаболома в моче пациентов с MELAS синдромом также выявили повышение уровня лактата и 3-гидроксибутирата у данных больных. Повышение уровня кетоновых тел связано с

нарушением фермента дегидрогеназы 3-гидроксибутаровой кислоты, поскольку данный фермент зависим от соотношения НАДН/НАД⁺, а при MELAS содержание кофактора НАДН снижается [Esterhuizen K et al., 2019].

В исследуемой выборке у пациентов с синдромом KSS (2 из 4) не наблюдали повышения уровня органических кислот в моче, в то же время пациенты с синдромом Пирсона (N=6) имели явные статистически значимые отклонения в уровне органических кислот: повышенный уровень лактата (максимально 3005 мМ/М CRE), 2-гидроксиизобутирата и 3-гидроксибутирата, а также фумаровой кислоты. Ранее в работе Farrugia P. у 7 пациентов с синдромом Пирсона также обнаружили лактатурию и повышенную концентрацию фумарата [Farruggia P. et al., 2016]. Одно из объяснений может быть в различном уровне экспрессии делеций мтДНК в тканях у пациентов с синдромами KSS и Пирсона (т.е. тканеспецифичность дефекта).

Делеции при синдроме Пирсона в основном детектируют во всех тканях, тогда как при синдроме KSS мутации чаще всего находят в мышцах и мочевом осадке. В литературе описаны случаи фенотипического перехода из синдрома Пирсона в синдром KSS – вероятно, этим можно объяснить наличие отклонений в спектре органических кислот у пациентов с KSS [Lee H.F. et al., 2007]. В работе Semeraro M. описаны пациенты, манифестирующие как синдром Пирсона, а затем переходящие в синдром KSS, у которых в дебюте заболевания выявлены отклонения в спектре органических кислот в моче. Авторы связывают данный феномен также с тканеспецифичностью дефекта. Кроме того, исследователи выявили значительное повышение уровня 2-гидроксибутирата у пациентов с делециями мтДНК, однако в исследуемой в этой работе выборке выявлено повышение концентрации 2-гидроксиизобутирата, в то время как повышение концентрации 2-гидроксибутирата выявлено только у одного пациента с синдромом Пирсона и данное повышение было максимальным во всей выборке пациентов с ПМЗ [Semeraro M. et al., 2017].

В литературе описаны гено-фенотипические корреляции у пациентов с синдромом Ли, вызванном мутациями в гене *SURF1*. Пациенты, у которых присутствует частая мутация NM_003172.4:c.845_846delCT в гомозиготном состоянии, имеют более тяжелый фенотип и прогноз, по сравнению с пациентами, у которых встречаются мутации в гене *SURF1* в компаунд-гетерозиготном состоянии

[Piekutowska-Abramczuk D. et al., 2009]. В исследуемой выборке 8 пациентов с мутациями в гене *SURF1* было три пациента с гомозиготной частой мутацией NM_003172.4:c.845_846delCT и пять пациентов с компаунд-гетерозиготными мутациями. У пациентов с гомозиготным вариантом выявлено повышение концентрации 2-оксоглутарата (размах 383,77-2385,63 мМ/М CRE), лактата (размах 27,99-155,94 мМ/М CRE), пирувата (размах 7,72-23,24 мМ/М CRE), сукцината (размах 8,15-23,74 мМ/М CRE) и фумарата (размах 12,88-71,75 мМ/М CRE). В то время как у пациентов с компаунд-гетерозиготными мутациями выявлено только повышение 2-кетоглутарата (размах 75,15-212,8 мМ/М CRE) и незначительно фумарата (размах 0-4,42 мМ/М CRE).

3.2.6 Особенности спектра органических кислот в моче у пациентов в зависимости от функциональной группы

Пациенты с ПМЗ сгруппированы в зависимости от функционального дефекта: делеции мтДНК (N=11), истощение мтДНК (N=16), нарушение АТФазы 6 (N=8), нарушение КДЦМ I (N=20), КДЦМ IV (N=21), мутации мт тРНК (N=8). При исследовании в зависимости от функциональной группы (рис. 16), сочетанное повышение концентрации лактата, пирувата, 3-гидроксибутирата, 2-гидроксиизобутирата, 2-кетоглутарата, сукцината, малата и значительно фумарата наблюдалось у пациентов с недостаточностью КДЦМ I (у 13/20). Значительное повышение концентрации фумарата связано с компенсаторным механизмом КДЦМ II в ответ на дисфункцию КДЦМ I. В литературе описано, что для пациентов с нарушением КДЦМ I характерно повышение концентрации метаболитов цикла Кребса (преимущественно фумаровой кислоты и 2-кетоглутарата); в работе Emmerzaal T.L. при исследовании метаболома мышцы с гомозиготными мутациями в гене *NDUFS4* также выявлено повышение метаболитов цикла Кребса (преимущественно фумаровой кислоты, сукцината, 2-кетоглутарата и малата) [Emmerzaal T.L. et al., 2020].

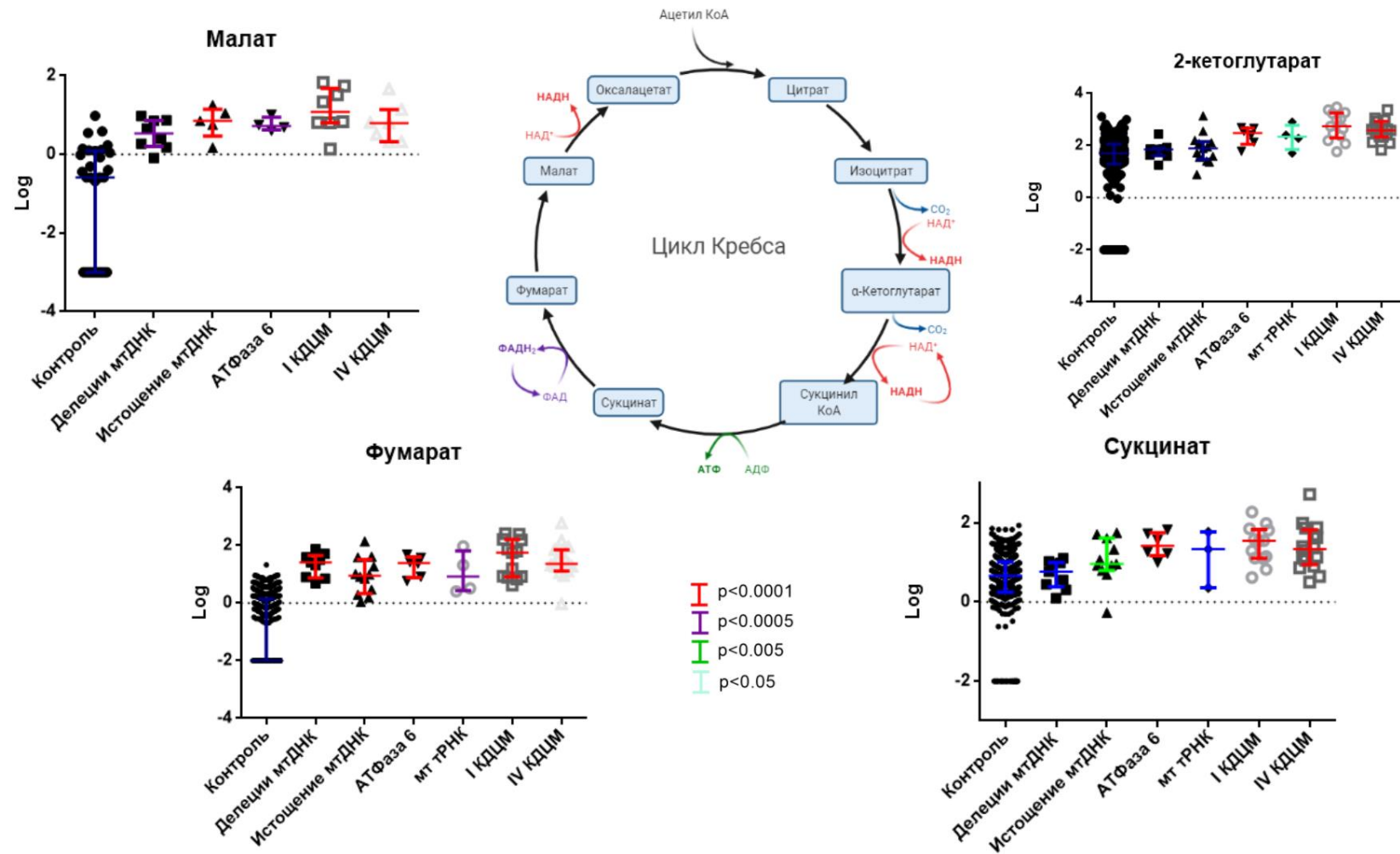


Рисунок 16 – Концентрации метаболитов цикла Кребса в функциональных группах пациентов с ПМЗ.

Примечание: Данные представлены как медиана±межквартильный размах. Цветом указаны p-value по непараметрическому критерию Манна-Уитни при сравнении с контрольной группой

Для КДЦМ IV (в 76% случаев, 16/21) наблюдали повышение содержания метаболитов цикла Кребса (сукцинат, фумарат, 2-кетоглутарат) и кетоновых тел (в особенности 3-гидроксибутирата), связанных с нарушением редокс-пары НАДН/НАД⁺. В группе пациентов с нарушением АТФазы выявлено повышение содержания сукцината (в связи с нарушением синтеза АТФ, являющийся кофактором реакции превращения сукцината из сукцинил КоА), фумарата и 2-кетоглутарата.

3.2.7 Заключение

При анализе органических кислот в моче у пациентов с различными формами ПМЗ выявляется как стандартный «набор» патологических метаболитов, отражающий нарушение окислительного фосфорилирования, так и абсолютно нормальный профиль органических кислот. При анализе ROC-кривых, одним из самых информативных биомаркеров при исследовании уровня органических кислот среди пациентов с ПМЗ оказался 3-гидроксибутират. Концентрация данного метаболита повышена во всех группах пациентов с ПМЗ. Его повышение связано с нарушением реакции редокс-пары НАДН/НАД⁺. При проведении оценки достоверности теста повышение концентрации пирувата и 4-гидроксифениллактата могут быть приняты во внимание при принятии решения о вероятности ПМЗ. Поскольку комплексы ДЦМ участвуют в регуляции цикла Кребса (КДЦМ I, КДЦМ II), повышение концентрации его метаболитов также характерно при нарушении функционирования дыхательной цепи митохондрий. Выявленные в работе спектр и изменения концентрации метаболитов при различных формах ПМЗ согласуются с литературными данными.

Несмотря на успешное применение методов массового параллельного секвенирования (NGS) в диагностике наследственных заболеваний в последнее десятилетие, диагностика ПМЗ все еще вызывает ряд трудностей, особенно при обнаружении ранее не описанных генов или новых вариантов нуклеотидной последовательности. Биохимическая диагностика ПМЗ направлена на выявление биомаркеров и метаболитов, которые являются индикаторами нарушения функций митохондрий.

С практической точки зрения, анализ органических кислот мочи должен проводиться всем пациентам с подозрением на митохондриальное заболевание, как с целью дифференциальной диагностики с органическими ацидуриями, имеющими сходные клинические проявления (например пропионовая и метилмалоновая), так и с целью получения дополнительной доказательной базы о нарушении функции дыхательной цепи митохондрий. Также следует учитывать, что нормальный профиль органических кислот не позволяет исключить заболевание из группы ПМЗ.

3.3 Исследование уровня плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15 в группе пациентов с ПМЗ и другими моногенными заболеваниями

3.3.1. Плазменный цитокин FGF-21

FGF-21 — это гормоноподобный цитокин, который при нормальных физиологических условиях в основном синтезируется в печени (гепатокин). Однако при патологических условиях он может вырабатываться в других органах и тканях, действуя как ауто/паракринный фактор [Klaus S. et al., 2021].

В настоящем исследовании проведено определение концентрации плазменного цитокина FGF-21 в различных подгруппах пациентов с ПМЗ, а также у пациентов с другими моногенными заболеваниями.

3.3.1.1 Определение референсных значений плазменного цитокина FGF-21

На первом этапе работы определяли референсные значения концентрации плазменного цитокина FGF-21. В контрольной группе не выявлено статистически значимых различий в зависимости от возраста. Медиана составила 43 пг/мл (межквартильный размах 30-102 пг/мл), пороговое значение - 400 пг/мл. Пороговое значение концентрации для FGF-21 среди контрольной группы в исследовании Davis R.L. определено на уровне 350 пг/мл [Davis R.L. et al., 2016]. В работе Lehtonen J.M. - 331 пг/моль, различий между подгруппами детей и взрослых также выявлено не было [Lehtonen J.M. et al., 2021]. Morovat выявил различие в концентрациях уровня FGF-21 контрольной группы в зависимости от возраста (автор разделил группу контроля на 2 подгруппы - 20-60 л. и >60 л) [Morovat A. et al., 2017]. В текущем исследовании не проводили определение концентрации данного цитокина у волонтеров и пациентов старше 60 лет. Пороговое значение содержания FGF-21, полученное в ходе исследования контрольной группы, сопоставимо с результатами международных исследований.

3.3.1.2 Концентрация FGF-21 у пациентов с ПМЗ

Медиана значений концентрации цитокина FGF-21 в плазме крови для группы пациентов с ПМЗ составила 232 пг/мл (межквартильный размах составил 64-900 пг/мл). Группа пациентов с ПМЗ поделена на следующие подгруппы: синдром Ли (N=29), НОНЛ (N=22), митохондриальная миопатия/энцефалопатия (N=25), MELAS синдром (N=10), синдром KSS (N=5), синдром PEO (N=5), Альперс синдром (N=5), *DGUOK*- ассоциированная гепатопатия (N=4) (рис. 17).

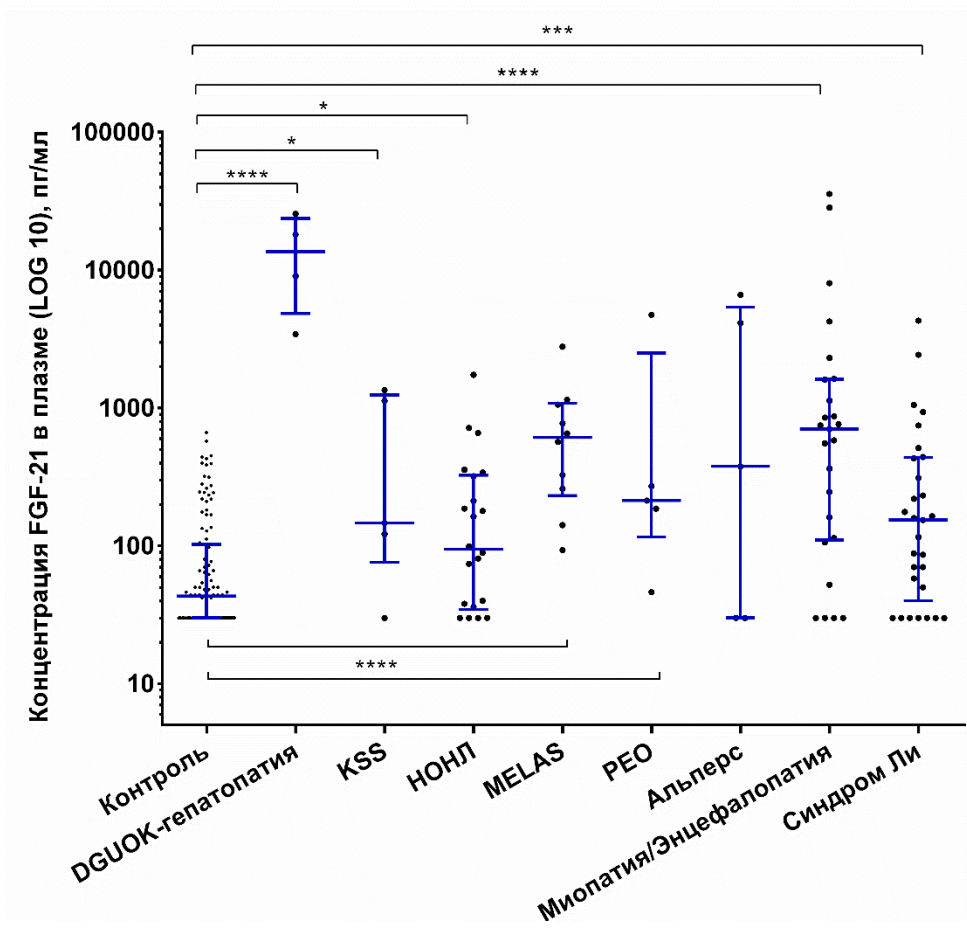


Рисунок 17 – Концентрация FGF-21 в плазме крови у групп пациентов с ПМЗ и контрольной группы.

Примечание: Данные представлены как медиана±межквартильный размах. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$, **** - $p < 0,0001$

Не выявлено статистически значимых различий в значении концентраций цитокина FGF-21 между контрольной группой и группой пациентов с синдромом Альперса. Слабые статистические различия выявлены также в группах НОНЛ и KSS.

FGF-21 является миогенным цитокином, а также в значительном количестве вырабатывается в печени; показатели концентрации в пределах референсных значений данного маркера в группе пациентов с НОНЛ связаны с отсутствием вовлечения мышечной ткани в патогенез данной группы ПМЗ [Ribas F. et al., 2014]. Наиболее значимые статистические различия содержания цитокина FGF-21 выявлены в группе пациентов с *DGUOK*-ассоциированной гепатопатией, MELAS синдромом и митохондриальной миопатией/энцефалопатией. Ранее показано, что максимальные значения концентрации FGF-21 обнаружены у пациентов в подгруппе нарушений трансляции митохондриальных белков (с синдромами деплеции/делеций мтДНК), но не в подгруппах пациентов с мутациями в субъединицах КДЦМ или их факторах сборки [Formichi P. et al., 2020; Garrido-Pérez N. et al., 2020; Lehtonen J.M. et al., 2016]. Самая высокая концентрация FGF-21 выявлена у пациента с мутациями в гене *RRM2B* (35777,1 пг/мл). Максимальное значение уровня FGF-21 у данного пациента может быть связано с тяжелой клинической симптоматикой, как ранее отмечалось у Suomalainen [Suomalainen A. et al., 2011].

При проведении ROC-анализа площадь под кривой составила $AUC=0,77$, чувствительность 77%, специфичность 62,5% (рис. 18). Таким образом, данный маркер не является высокоспецифичным и чувствительным для группы ПМЗ в целом.

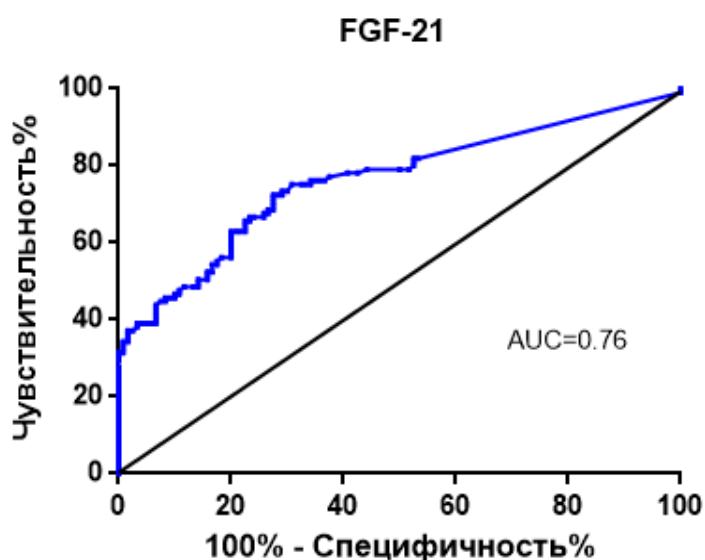


Рисунок 18 – Чувствительность и специфичность цитокина FGF-21 (ROC-анализ)

3.3.1.3 Концентрация FGF-21 в группе с другими моногенными заболеваниями

Ранее некоторые работы выявили связь между уровнем FGF-21 и ПМЗ с вовлечением мышечной системы [Suomalainen A. et al., 2011]. В настоящем исследовании проведено измерение концентрации FGF-21 в плазме крови также и при других формах немитохондриальных моногенных заболеваний с поражением мышечной ткани и мотонейронов (миодистрофия Дюшенна (DMD) и спинальной мышечной дистрофией (СМА)). Поскольку FGF-21 является гепатокином, проводили измерение его концентрации также при немитохондриальных гепатопатиях.

Группу немитохондриальных заболеваний составили пациенты детского возраста (0-18 л.): с миодистрофией Дюшенна (DMD, N=25), спинальной мышечной атрофией (СМА, N=23), лейкодистрофией (N=19), органическими ацидуриями (ОА, N=8), немитохондриальными гепатопатиями (гликогенозы 1a, 1b, 9a, 0 типов; синдром Аладжиля, прогрессивный семейный внутрипеченочный холестаз, галактоземия I типа, N=32) (рис. 19 А, Б).

Статистически значимые различия концентрации FGF-21 выявлены в подгруппах пациентов с миодистрофией Дюшенна, лейкодистрофиями и немитохондриальными гепатопатиями. У трех пациентов с органическими ацидуриями (пропионовая ацидурия, метилмалоновая ацидурия и глутаровая ацидурия I типа) выявлены высокие значения уровня FGF-21, однако значения не превышали максимального уровня в группе среди ПМЗ, как ранее показано у Manoli при сравнении концентрации FGF-21 между пациентами с метилмалоновой ацидурией и ПМЗ [Manoli I. et al., 2018; Molema F. et al., 2018]. Li на мышинной модели с миодистрофией Дюшенна выявил статистические различия в уровне экспрессии FGF-21 по сравнению с контрольной группой [Li H. et al., 2020]. Также повышение данного маркера ассоциировано с различными патологиями печени: вирусные гепатиты, неалкогольная жировая болезнь печени, рак печени [Tucker B. et al., 2019; Wu L. et al., 2017].

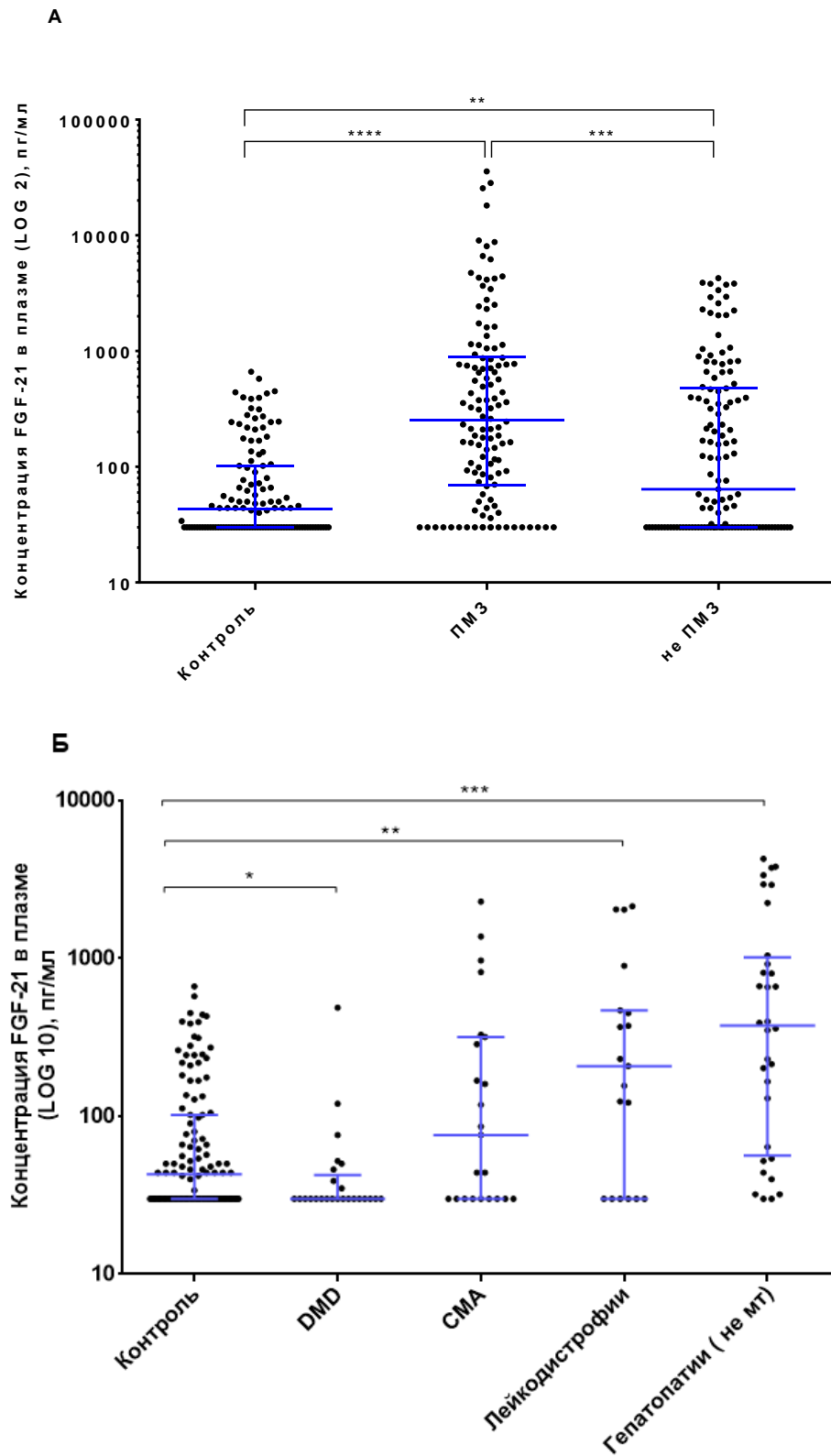


Рисунок 19 – Концентрация FGF-21 в плазме крови у групп пациентов с ПМ3 и не ПМ3 и контрольной группы (А), у групп пациентов с не ПМ3 и контрольной группы (Б).

Примечание: Данные представлены как медиана±межквартильный размах. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$, **** - $p < 0,0001$

3.3.2 Плазменный цитокин GDF-15

GDF-15 – это цитокин суперсемейства трансформирующих ростовых факторов β , который экспрессируется в основном в плаценте, почках, печени, легких, поджелудочной и предстательной железах. Этот цитокин выполняет важную роль в регуляции клеточного ответа на стресс и воспаление, а также подавляет иммунную реакцию на ранних сроках беременности, участвует в патогенезе онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний [Цыганкова П.Г. и др., 2018]. Показано, что GDF-15 является более чувствительным маркером МЗ, при которых поражается не только мышечная система [Davis R.L. et al., 2016]. Ниже представлены результаты измерения концентрации GDF-15 при различных формах ПМЗ и немитохондриальных моногенных заболеваниях.

3.3.2.1 Определение референсных значений GDF-15 в контрольной группе

При сравнении содержания GDF-15 в плазме крови между подгруппами контроля взрослых и детей выявлены статистические различия ($p < 0,0005$), как и в исследовании Maresca A. [Maresca A. et al., 2020]. Медиана значений концентрации GDF-15 в подгруппе контролей детей составила 907,5 пг/мл (пороговое значение составило 2400 пг/мл), взрослых - 1985 пг/мл (пороговое значение составило 5000 пг/мл). В работе Davis R.L. пороговое значение для уровня GDF-15 в контрольной группе, которую составили взрослые 20-83 л., составило 2330 пг/мл [Davis R.L. et al., 2016]. Пороговое значение GDF-15, полученное в ходе исследования контрольной группы, сопоставимо с результатами международных исследований.

3.3.2.2 Концентрация GDF-15 в группе пациентов с ПМЗ

Поскольку выявлены различия в референсных значениях концентрации GDF-15 в плазме крови контрольной группы между взрослыми и детьми, подгруппы пациентов с ПМЗ проанализированы отдельно по возрасту (рис. 20): дети - синдром Ли (N=28), MELAS синдром (N=3), синдром Альперса (N=5), митохондриальная миопатия/энцефалопатия (N=20), *DGUOK*-ассоциированная

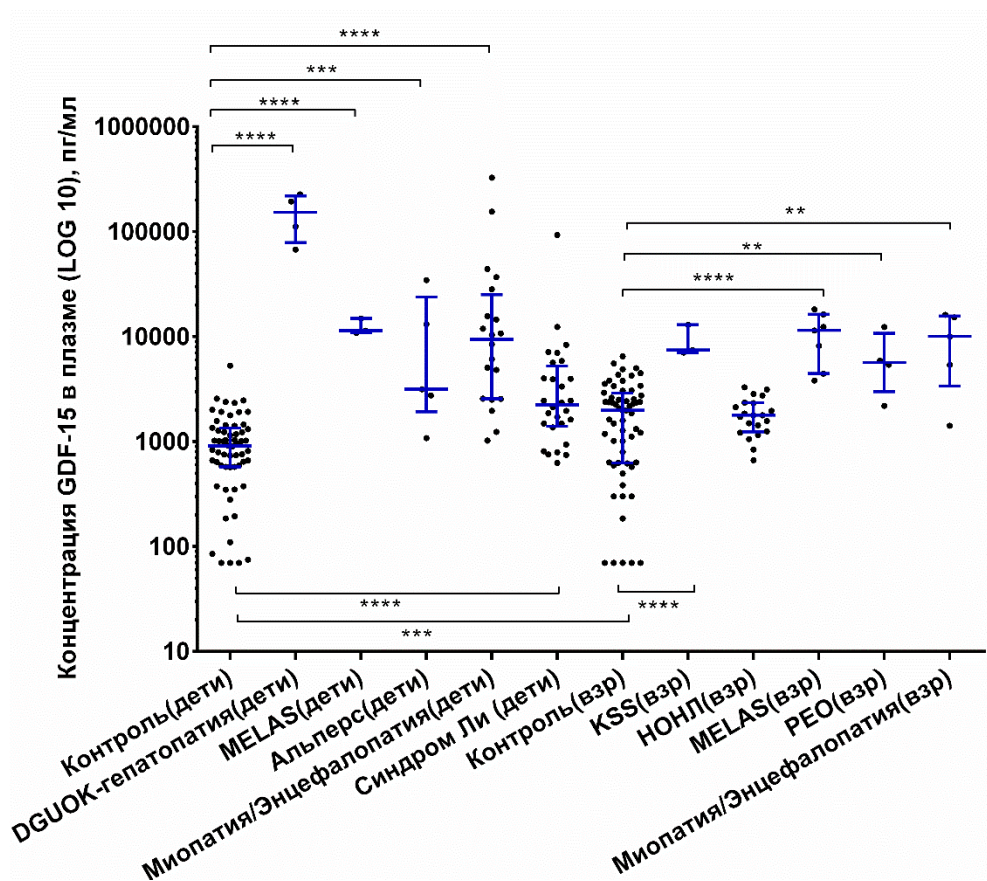


Рисунок 20 – Концентрация GDF-15 в плазме крови у групп пациентов с ПМЗ и контрольной группы.

Примечание: Данные представлены как медиана±межквартильный размах. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$, **** - $p < 0,0001$

гепатопатия (N=4); взрослые - с оптической нейропатией зрительного нерва Лебера (НОНЛ, N=22), KSS (N=3), синдром MELAS (N=7), митохондриальная миопатия/энцефалопатия (N=5), PEO (N=5). Концентрация GDF-15 в плазме крови пациентов значительно выше FGF-21, за исключением группы с НОНЛ, в которой концентрации этих биомаркеров были в норме. Наибольшие значения концентрации GDF-15 выявлены в группе митохондриальных миопатий/энцефаломиопатий - у пациента с мутациями в гене *RRM2B* концентрация GDF-15 в плазме крови составила 326320 пг/мл, а также у пациентов с мутациями в гене *DGUOK* значения варьировались от 67600 пг/мл до 226800 пг/мл. По результатам ROC-анализа для GDF-15 среди детей (рис. 21), площадь под кривой составила AUC=0,89, чувствительность 88,7%, специфичность 65%. По результатам ROC-анализа для

GDF-15 среди взрослых (рис. 21), площадь под кривой составила $AUC=0,69$, чувствительность 53,49 %, специфичность 73,3%.

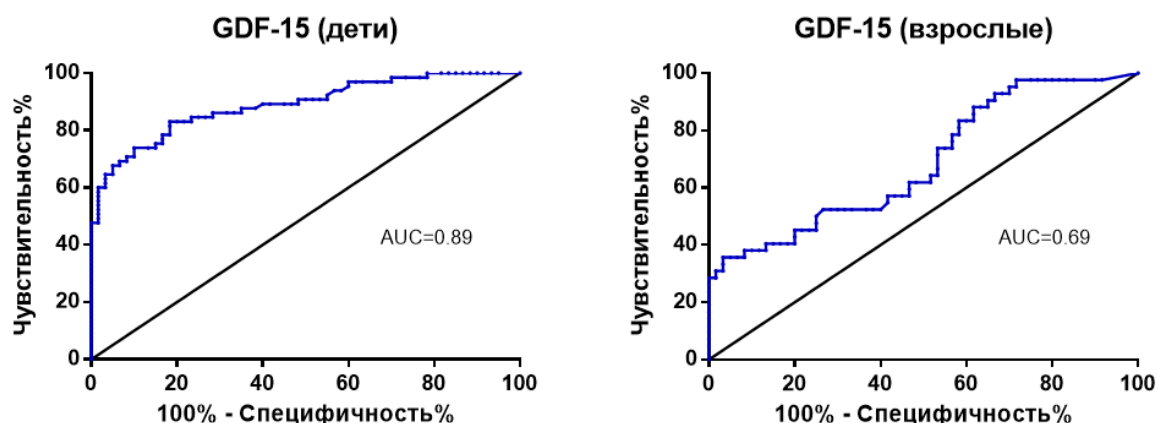


Рисунок 21 – Чувствительность и специфичность цитокина GDF-15 (ROC-анализ)

3.3.2.3 Концентрация GDF-15 при немитохондриальной патологии

Концентрация GDF-15 определена в образцах плазмы крови пациентов детского возраста (0-18 л.) со следующими наследственными заболеваниями, не связанными с первичной патологией митохондрий: миодистрофия Дюшенна (DMD, $N=25$), спинальной мышечной атрофией (СМА, $N=23$), лейкодистрофией ($N=19$), органическими ацидуриями (ОА, $N=8$), немитохондриальными гепатопатиями (гликогенозы 1a, 1b, 9a, 0 типов; болезнь Алажилия, прогрессивный семейный внутрипеченочный холестаза, галактоземия I типа, $N=32$) (рис. 22 А, Б). Статистически значимые различия и максимальные концентрации данного цитокина выявлены в группе гепатопатий (22030 пг/мл). Также высокие значения выявлены у 4-х пациентов с пероксисомной патологией и у пациентов с органическими ацидуриями (с мутациями в генах *MMACHC* и *PCCB*).

3.3.3 Применение FGF-21 и GDF-15 как диагностических маркеров

Регрессионный анализ по Спирмену при анализе уровня FGF-21 и GDF-15 не выявил зависимости между контрольными группами, однако выявил умеренную позитивную корреляцию в группе пациентов с ПМЗ ($r=0,71$, $p<0,00001$, рис. 23 А) и слабую корреляцию в группе пациентов с не ПМЗ ($r=0,49$, $p<0,0001$, рис. 23 Б).

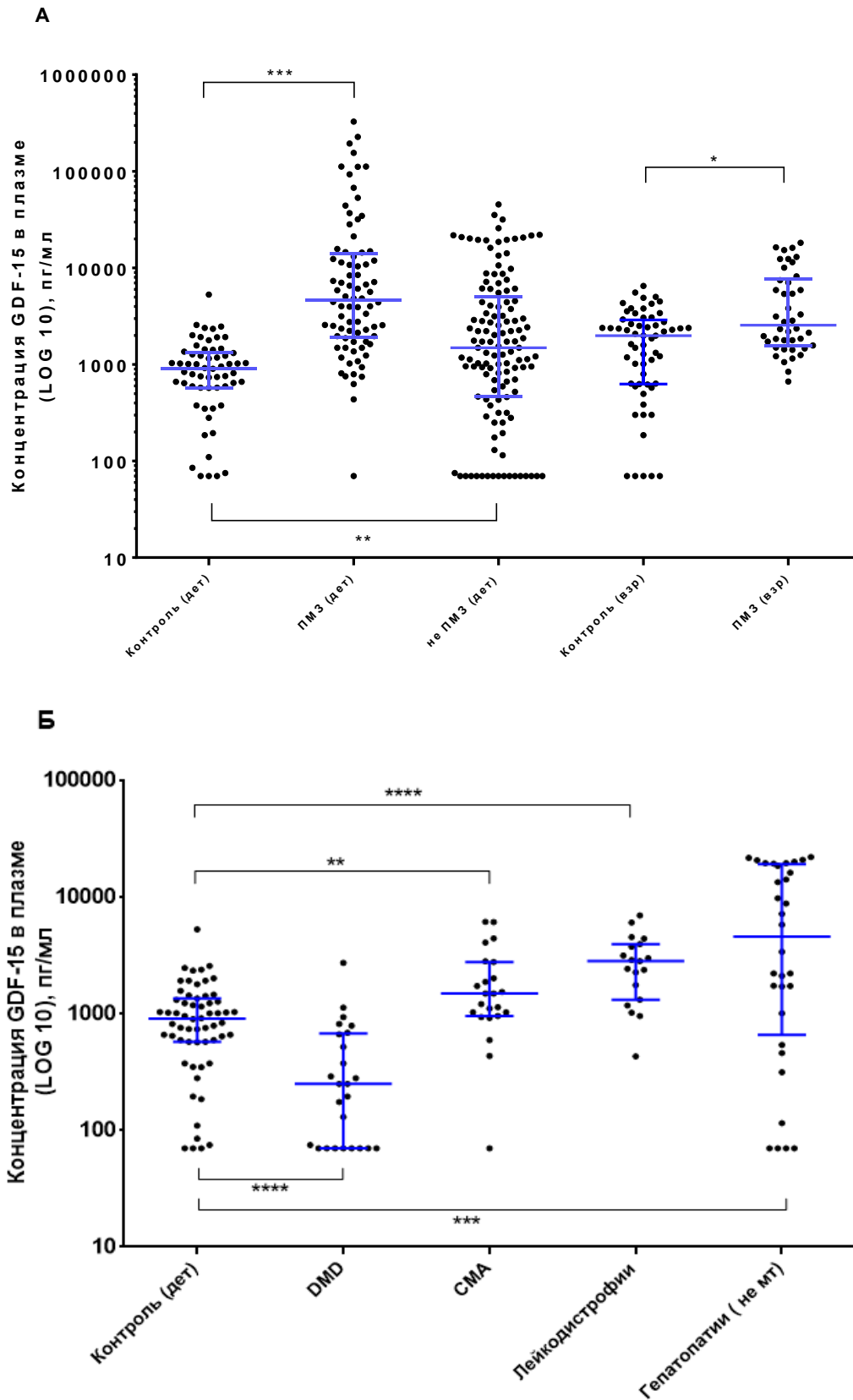


Рисунок 22 – Концентрация GDF-15 (А, Б) в плазме крови у групп пациентов с ПМЗ и не ПМЗ и контрольной группы.

Примечание: Данные представлены как медиана±межквартильный размах. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$, **** - $p < 0,0001$

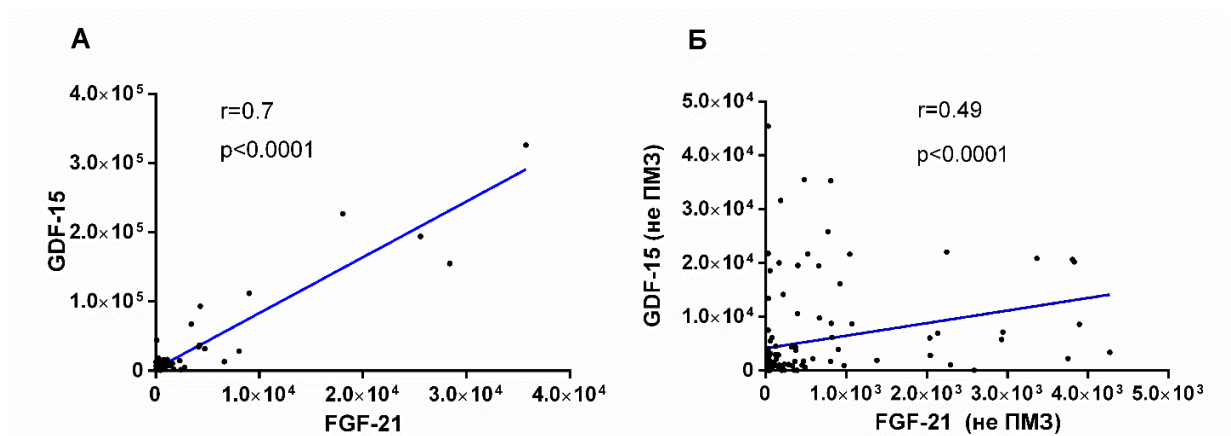


Рисунок 23 – Корреляционный анализ по Спирмену FGF-21 и GDF-15 в группах с ПМЗ(А) и не ПМЗ (Б)

При исследовании концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 (таблица 12) в плазме крови среди пациентов с ПМЗ и неПМЗ положительная прогностическая значимость для FGF-21 (Positive Predictive Value, PPV) составила 59,15%, а отрицательная прогностическая значимость (Negative Predictive Value, NPV) - 54,55%. Для GDF-15 (среди пациентов детского возраста) PPV составила 54,32%, а NPV – 76,92%; чувствительность теста составила для FGF-21 – 39,25%, для GDF-15 - 67,65%; специфичность теста составила 72,9% и 65,42% и распространенность (Prevalence) 50% и 37,79% для FGF-21 и GDF-15 соответственно.

Согласно ROC-анализу, плазменный цитокин GDF-15 показал более высокие специфичность, чувствительность, а также диагностическую значимость, чем плазменный цитокин FGF-21 среди пациентов с ПМЗ, что согласуется с данными других авторов [Formichi P. et al., 2020; Nohara S. et al., 2019].

Одновременное повышение FGF-21 и GDF-15 выявлено у 44 ПМЗ пациентов из 105. Самые значительные повышения обнаружены у пациентов в группе митохондриальных гепатопатий. У всех пациентов с патологией печени среди ПМЗ выявлено содержание GDF-15 до 100 раз и FGF-21 до 90 раз превышающем значение контролей. У подгруппы пациентов с немитохондриальной гепатопатией повышение наблюдалось только у 40% пациентов и не более чем в 10 раз для FGF-21 и GDF-15. Ранее показано, что нарушение функции печени запускает компенсаторный механизм повышенной экспрессии уровня GDF-15 в ответ на воспаление [Chung H.K. et al., 2017; Zhang M. et al., 2018]. В исследуемой выборке

представлена пациентка с синдромом истощения мтДНК, вызванного мутациями в гене *FBXL4*; концентрация цитокинов FGF-21 и GDF-15 в плазме крови составили соответственно 702 пг/мл и 15715 пг/мл, что превышало контрольные значения в 1,75 и 6,5 раз соответственно. Довольно высокое содержание GDF-15 может быть обусловлено тем, что в возрасте 11 мес. у пациента наблюдалась полиорганная недостаточность. Однако в работе Lehtonen J.M. у пациента с мутациями в гене *FBXL4* обнаружено небольшое повышение уровня GDF-15, в то время как уровень FGF-21 оставался в норме. Авторы связывают это с отсутствием вовлечения мышечной системы в клиническую картину заболевания [Lehtonen J.M. et al., 2021].

Таблица 12 – Диагностические характеристики содержания цитокинов у пациентов с ПМЗ

Параметр / Цитокин	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV	Индекс точности	Отношение правдоподобия положительного результата теста	Отношение правдоподобия отрицательного результата теста
FGF-21	39,25%	72,90%	59,15%	54,55%	56,07%	1,44	0,83
GDF-15	67,69%	65,42%	54,32%	76,92%	66,28%	1,96	0,49

У одного из пациентов с мутацией m.8993T>G выявлено повышенное содержание FGF-21 и GDF-15 (4300 пг/мл и 93040 пг/мл соответственно), что могло быть связано с терминальной стадией болезни на момент забора биоматериала - наличие острой почечной недостаточности, геморрагического инсульта, дыхательной недостаточности III ст. У остальных пациентов с заменой m.8993T>G уровень FGF-21 не превышал порогового значения, а уровень GDF-15 незначительно повышался. У пациентки с мутациями в гене *RRM2B* выявлены максимальные значения уровня FGF-21 и GDF-15 (35777 пг/мл и 326320 пг/мл соответственно); клиническая картина представлена синдромом Фанкони, гипертрофической кардиомиопатией; ранее исследователи связывали повышение концентрации данных плазменных цитокинов с наличием почечной дисфункции [Gamrot Z. et al., 2020; Nam Y.R. et al., 2018; Kim J.S. et al., 2019]. Также не выявлено ассоциаций со степенью тяжести ПМЗ и содержанием плазменных цитокинов, также как ранее отметил Davis R.L. [Davis R.L. et al., 2016].

Результаты не выявили различий между содержанием FGF-21 между пациентами взрослыми и детьми с нарушением трансляции и истощением мтДНК, как до этого показано в работе Lehtonen J.M.; напротив, содержание GDF-15 различалось в группах детей и взрослых с истощением мтДНК (содержание в группе детского возраста превышало в 2,5 раза) [Lehtonen J.M. et al., 2016].

У всех пациентов с MELAS синдромом, вызванным мутацией m.3243A>G, выявлено повышение уровня GDF-15, но только у 5 выявлено повышенное содержание FGF-21. Содержание GDF-15 не ассоциировано со степенью гетероплазмии в крови или с тяжестью симптомов, как показано ранее в работе Koene, однако выборка крайне мала (N=8) для построения корреляций [Koene S. et al., 2015]. Maresca A. с соавт. также выявили повышение уровня GDF-15 у пациентов с синдромом MELAS, входящих в группу пациентов с нарушением трансляции мтДНК [Maresca A. et al., 2020]. В нашей выборке также представлены пациенты с мутациями в генах митохондриальных тРНК, содержание GDF-15 в плазме крови которых статистически различалось от контрольной взрослой группы.

У пациентов с мышечной дистрофией и поражением мотонейронов (с мутациями в генах *DMD* и *SMN1*), не выявлено значительного повышения уровня GDF-15 и FGF-21. У пациентов со СМА выявлено незначительное повышение уровня GDF-15 (медиана составила 1490 пг/мл, разброс 70-6130 пг/мл), что согласуется с предыдущими данными Montero [Montero R. et al., 2016].

3.3.4 Заключение

Поскольку снижение активностей комплексов дыхательной цепи митохондрий запускает “переход” на альтернативные источники энергии, такие как гликолиз и β -окисление жирных кислот, а также происходит увеличение митохондриального биогенеза как компенсаторный эффект, зависимо увеличивается уровень экспрессии FGF-21 и GDF-15. В свою очередь, GDF-15 связан с провоспалительной реакцией, поэтому он также является общим маркером воспаления [Melvin A. et al., 2019].

В исследовании показано, что цитокины FGF-21 и GDF-15 не могут быть использованы в качестве универсальных маркеров ПМЗ, поскольку их уровень может повышаться при других формах наследственных заболеваний (спинальная

мышечная дистрофия, немитохондриальные гепатопатии и некоторые формы лейкодистрофий). Кроме того, данные маркеры обладают низкой специфичностью, чувствительностью и прогностической диагностической значимостью.

Однако данные маркеры, предположительно, можно применять в мониторинге течения заболевания, как показывают недавние исследования пациентов с синдромом MELAS и митохондриальной миопатией вследствие недостаточности тимидинкиназы 2 [Dominguez-Gonzalez C. et al., 2020; Koga Y. et al., 2019].

Согласно тепловой карте (рис. 24) среди характерных метаболитов и цитокинов для определенной группы ПМЗ выделить отдельный (специфический) биомаркер не предоставляется возможным. Для каждой клинической группы характерен набор определенных метаболитов, как например, для митохондриальных гепатопатий - повышение производных тирозина (4-гидроксифениллактата и 4-гидроксифенилпирувата), а также FGF-21 и GDF-15 (являющихся гепатокинами) в связи с вовлечением поражения печени в патогенез заболевания; а в случае синдрома Ли - повышение метаболитов, связанных с лактатурией и циклом Кребса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в биохимической диагностике ПМЗ необходимо использовать комплексный подход, т.е. рассматривать совокупность характерных метаболитов.

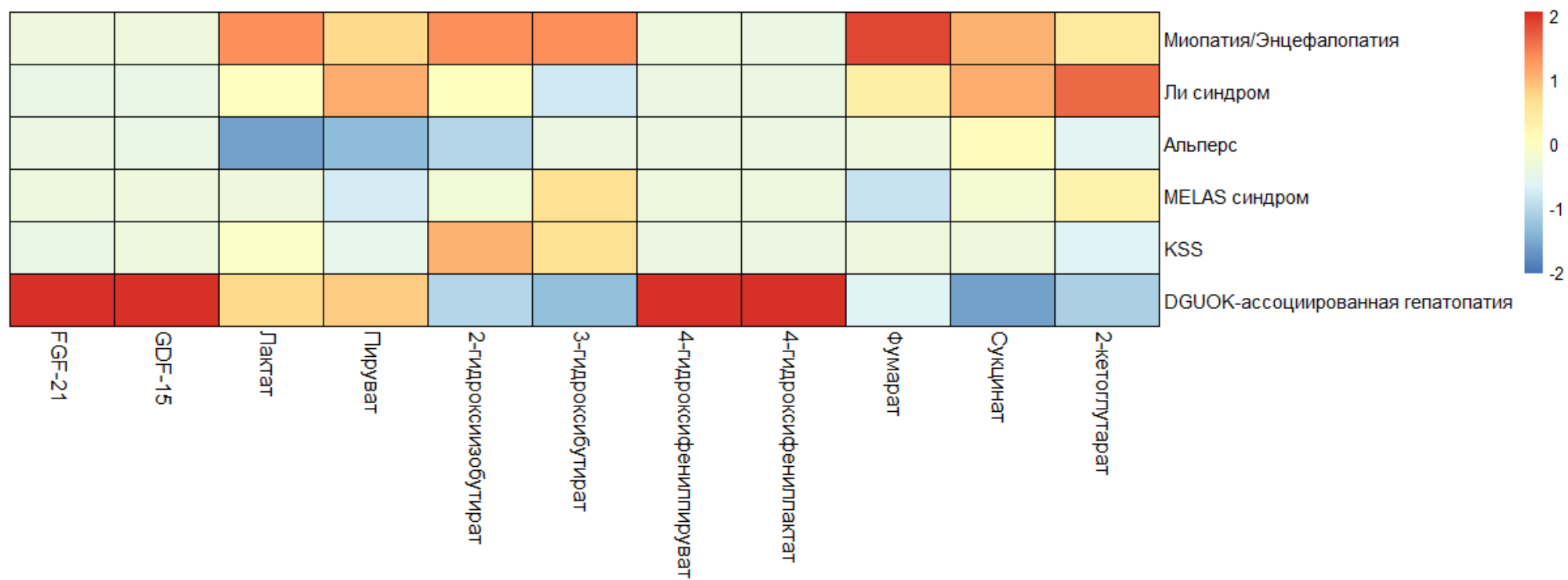


Рисунок 24 – Тепловая карта распределения концентрации значимых метаболитов и плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15 в клинических группах пациентов с ПМЗ

3.4 Высокоразрешающая респирометрия на ККФ пациентов с ПМЗ и контрольной группы

Для оценки функционирования системы окислительного фосфорилирования (OXPHOS) проводили респирометрию высокого разрешения (от англ. High-Resolution Respirometry) на интактных и пермеабилizованных ККФ здоровых доноров (N=10) и пациентов с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ (N=27). Для респирометрического анализа оценивали соотношения скоростей дыхания при добавлении различных субстратов/ингибиторов/разобщителей ДЦМ.

Применяли два исследовательских протокола: с интактной и пермеабилizованной мембраной. При использовании пермеабилizованного протокола в исследуемую систему добавляется детергент-дигитонин, формирующий “поры” при связывании с холестерином плазмолеммы. Данный подход позволяет экзогенным субстратам (например, глутамату, сукцинату), проникать в клетку, поскольку для них “естественных” переносчиков в митохондриях не существует [Kuznetsov A.V. et al., 2008]. Эту методику применяют для оценки системы OXPHOS в различных клетках и тканях, а также при различных патологических состояниях [Doerrier C. et al., 2018]. В данной работе нет иной оптимизации протоколов, используемых зарубежными коллегами.

3.4.1 Респирометрический анализ: валидация метода и анализ контрольных ККФ

Для валидации метода проанализировано 10 контрольных ККФ (от здоровых доноров). В интактном протоколе зарегистрирована типичная кривая (рис. 25) и проанализированы следующие параметры респирометрического графика: R, ROUTINE (рутинная скорость потребления кислорода на эндогенных субстратах), L, LEAK (скорость потребления кислорода после добавления ингибитора V КДЦМ олигомицина), E, ETS (максимальная мощность работы цепи переносчиков электронов за счет разобщителя FCCP) и антимицин-нечувствительное дыхание за счет ингибирования антимицином A (ROX), которое вычиталось из каждого параметра респирометрии. Соотношения респирометрии: R/E, L/E, netR/E ((R-L)/E) и их референсные значения представлены в табл. 13 [Doerrier C. et al., 2018].

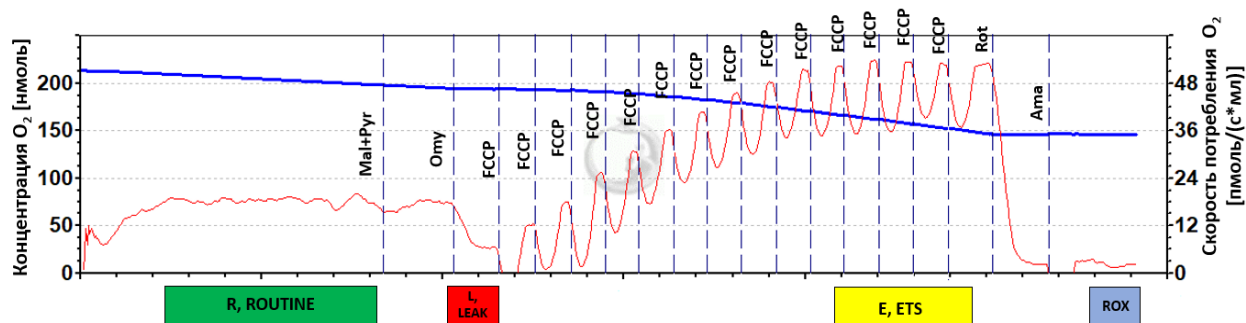


Рисунок 25 – Типичный график кривой потребления кислорода при использовании интактного протокола.

Примечание: здесь и далее: красная линия - траектория изменения скорости потребления кислорода ККФ контроля, синяя линия - траектория концентрации кислорода в камере оксиграфа с помещенными ККФ контроля в дыхательной среде MIR05). Mal+Pyr-малат+пируват, Omy-олигомицин, FCCP-титрование FCCP, Rot-ротенон, Ama-антимицин A

Таблица 13 – Референсные значения соотношений респирометрии для контрольных ККФ при использовании интактного протокола и мировые литературные данные

Соотношение	Значение контрольных ККФ (среднее±ст.отклонение)	Литературные данные [Hutter E. et al. 2004] (среднее±ст.отклонение)
R/E	0,37 ±0,03	0,34 ± 0,03
L/E	0,11 ±0,03	0,14 ± 0,02
netR/E	0,25 ±0,03	0,20 ± 0,02

Для определения оптимальной концентрации дигитонина для селективной пермеабиллизации плазматической мембраны проводили его титрование (рис. 26). При постепенном пошаговом добавлении дигитонина (1 мкл., $c = 2,5$ мкг/мкл), достигается точка насыщения субстратами (в нашем случае - 10 мкг/мкл). После титрования добавляли 4 mM цитохром С - для контроля целостности внешней митохондриальной мембраны, в нашем случае не выявлено резкого скачка сигнала - что говорит о её сохранности. Полученные результаты по определению оптимальной концентрации дигитонина на клетках ККФ согласуются с литературными данными [Макрека-Кука М. et al., 2015].

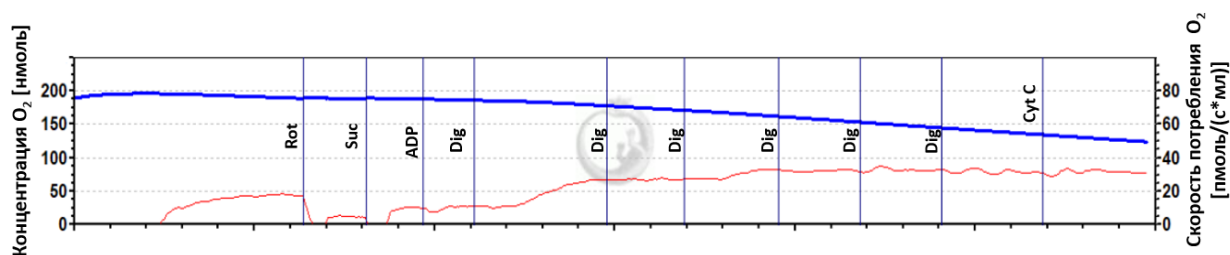


Рисунок 26 – Титрование дигитонина на ККФ контроля.

Примечание: Rot-ротенон, Suc- сукцинат, ADP-АДФ, Dig-титрование дигитонином 2,5мкг/мкл, Cyt C- цитохром c

На рис. 27 представлен график типичной кривой потребления кислорода контрольной ККФ с использованием пермеабиллизованного протокола. Для анализа результатов протокола использовались следующие соотношения респирометрии: CI/ETS - ответ на добавление глутамата в присутствии АДФ (CI) на максимальную скорость потребления кислорода титрованием FCCP (ETS); C_{I+II} /ETS - ответ на добавление сукцината в присутствии глутамата и АДФ (C_{I+II}) на максимальную

скорость потребления кислорода титрованием FCCP (ETS); CI_{ETS}/ETS - максимальная скорость потребления кислорода титрованием FCCP за счет КДЦМ II (CI_{ETS}) к максимальной скорости потребления кислорода титрованием FCCP (ETS); CI_{IV}/ETS - отношение скорости потребления кислорода при добавлении субстратов КДЦМ IV аскорбата и TMPD за вычетом нечувствительного дыхания к ингибитору КДЦМ IV азида натрия (CI_{IV}) к максимальной скорости потребления кислорода титрованием FCCP (ETS); CI/CI_{I+II} - отношение ответа на добавление глутамата в присутствии АДФ (CI) на добавление сукцината в присутствии глутамата и АДФ (CI_{I+II}); CI_{ETS}/ETS - отношение максимальной скорости потребления кислорода титрованием FCCP на долю КДЦМ I к максимальной скорости потребления кислорода титрованием FCCP (ETS). Используемые соотношения респирометрии при проведении пермеабиллизованного протокола и их референсные значения представлены в таблице 14.

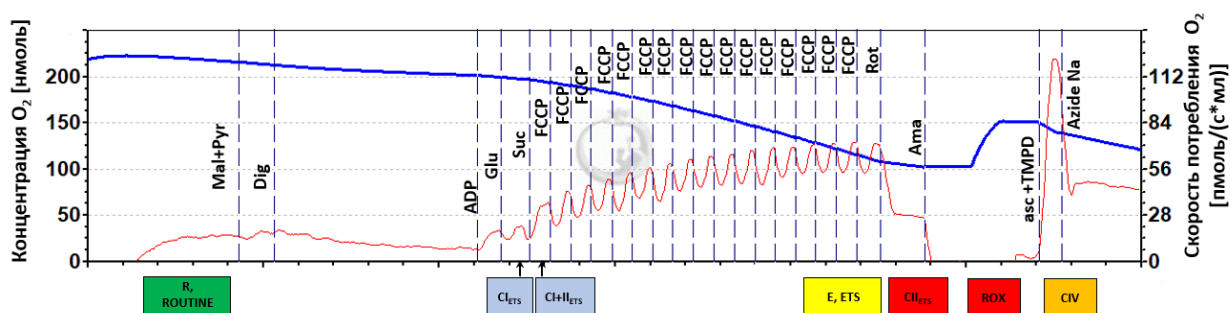


Рисунок 27 – Типичный график кривой потребления кислорода при использовании пермеабиллизованного протокола.

Примечание: Mal+Pyr-малат+пируват, Dig-дигитонин, ADP-АДФ, Glu-глутамат, Suc-сукцинат, FCCP-титрование FCCP, Rot-ротенон, Ama-антимидин А, asc+TMPD-аскорбат+ТМПД, Azide Na-азид натрия

Таблица 14 – Референсные значения соотношений респирометрии для контрольных ККФ при использовании пермеабиллизованного протокола

Соотношение	Значение контрольных ККФ (среднее±ст.отклонение)
CI/ETS	0,38±0,11
C _{I+II} /ETS	0,55±0,13
CII _{ETS} /ETS	0,43±0,07
CIV/ETS	1,09±0,21
CI/C _{I+II}	0,68±0,07
CI _{ETS} /ETS	0,57±0,07

3.4.2 Валидация метода респирометрии на ККФ пациентов с известными патогенными мутациями ПМЗ

Среди 27 исследуемых пациентов в интактном протоколе выявлены отклонения на 20 (74%) ККФ. При дальнейшем проведении респирометрического протокола на 15 пермеабиллизованных ККФ пациентов, отклонения выявлены у 13 (87%) больных. Ниже представлены результаты исследования по валидации метода среди пациентов с патогенными мутациями ПМЗ; неописанной ранее заменой в гене митохондриальной тРНК; пациентов с мутацией в гене *DNAJC30*; а также приведены условия и ограничения применения данного метода.

3.4.2.1 Результаты на ККФ пациентов с известными патогенными мутациями ПМЗ с использованием интактного протокола

У 17 пациентов с патогенными (известными) мутациями мтДНК m.10158T>C, m.3460G>A (N=6), m.11778G>A (N=4), m.3472T>C, m.4171C>A, m.14597A>G (N=2), m.3260A>G, а также пациента с компаунд-гетерозиготными мутациями в гене *NUBPL*, в интактном протоколе выявлены изменения в контрольных соотношениях респирометрии (FCR, от англ. Flux Control Ratios). На рисунке 28А представлены типичные графики респирометрического анализа - график пациента с НОНЛ

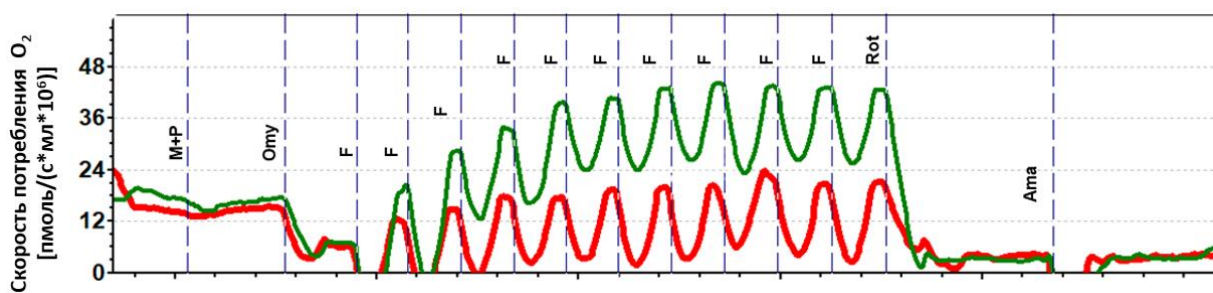
(m.3460G>A) имеет явно отличные значения скоростей дыхания при титровании разобщителем FCCP. На рисунке 28Б представлены результаты анализа респирометрии интактных ККФ пациентов с патогенными мутациями ПМЗ и контрольной группы. Для оценки работы дыхательной цепи использовали следующие соотношения скоростей дыхания на различных этапах эксперимента: R/E, L/E, netR/E (где R- скорость потребления кислорода клетками на эндогенных субстратах, E-максимальная мощность ДЦМ при титровании разобщителем FCCP, L-скорость потребления кислорода при добавлении ингибитора КДЦМ V олигомицина, $netR/E = ((R-L)/E)$). Средние значения соотношений респирометрии R/E, L/E, netR/E ККФ пациентов соответственно в 1,9, 1,7, 2 раз превышало данные значения у группы ККФ контроля и статистически различались ($p < 0,001$).

В работе проанализированы пациенты с мутациями в генах-субъединицах КДЦМ I, кодируемые мтДНК. Продукты данных генов составляют Р-модуль, который формирует протонный градиент в мембране митохондрий и поскольку он нарушен, снижается уровень мембранного потенциала и происходит нарушение сопряжения между электрон-транспортной системой и эффективным производством АТФ. Повышение соотношения netR/E указывает на то, что резервная мощность работы ДЦМ на эндогенных субстратах сильно снижена, полученная энергия полностью тратится на выработку АТФ. Митохондриальный потенциал также снижен, о чём свидетельствует повышенное соотношение R/E. Повышение респирометрических показателей в интактных клетках пациентов с НОНЛ также продемонстрировано в исследовании Iyer S. и соавт. Giorgio V. на гибридной модели клеток с частой мутацией НОНЛ m.3460G>A методом микроплащечной оксиграфии также показал снижение соотношений скоростей потребления кислорода; в работе Invernizzi F. исследовались фибробласты пациентов с мутациями в генах, ответственных за развитие недостаточности КДЦМ I (в ядерном и митохондриальном геномах), результаты микроплащечной респирометрии подтвердили предыдущие исследования и методика оказалась более чувствительной, чем спектрофотометрический анализ активностей комплексов, однако данный метод не позволяет выявить нарушение отдельного КДЦМ [Giorgio V. et al., 2012; Invernizzi F. et al., 2012; Iyer S. et al., 2012].

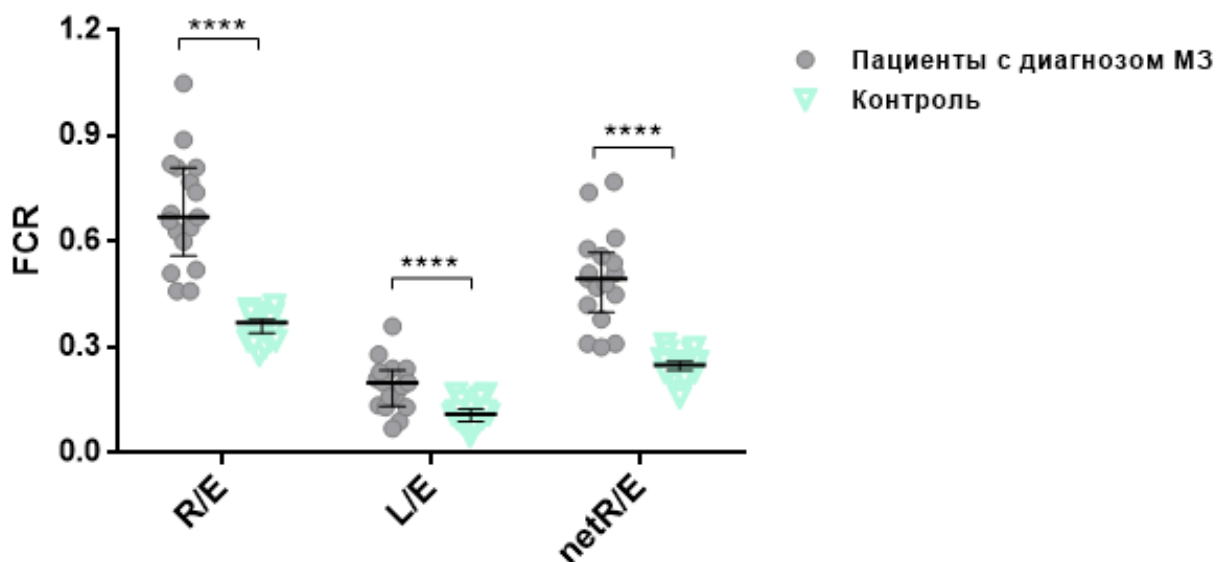
При ROC-анализе (рис. 28 В) самым чувствительным (100%, 95% CI 80,49%-100%) и специфичным (100%, 95% CI 88,06%-100%) является соотношение R/E

(площадь под кривой составила $AUC=1,000$); соотношение $netR/E$ показало чувствительность 94,12 % (95% CI 71,31%-99,85%) и специфичность 93,1% (95% CI 77,23%-99,15%), площадь под кривой составила $AUC=0,9949$; соотношение L/E показало чувствительность 82,35 % (95% CI 56,57%-96,20%) и специфичность 86,21% (95% CI 68,34%-96,11%), площадь под кривой составила $AUC=0,8590$. Полученные данные показывают, что соотношение R/E может применяться как довольно значимый функциональный маркер при ПМЗ, связанных с нарушениями дыхательной цепи митохондрий, соотношение $netR/E$ имеет чувствительность и специфичность ниже, чем R/E , однако также может применяться в качестве диагностического показателя. Соотношение L/E следует не рассматривать в качестве функционального маркера.

А



Б



В

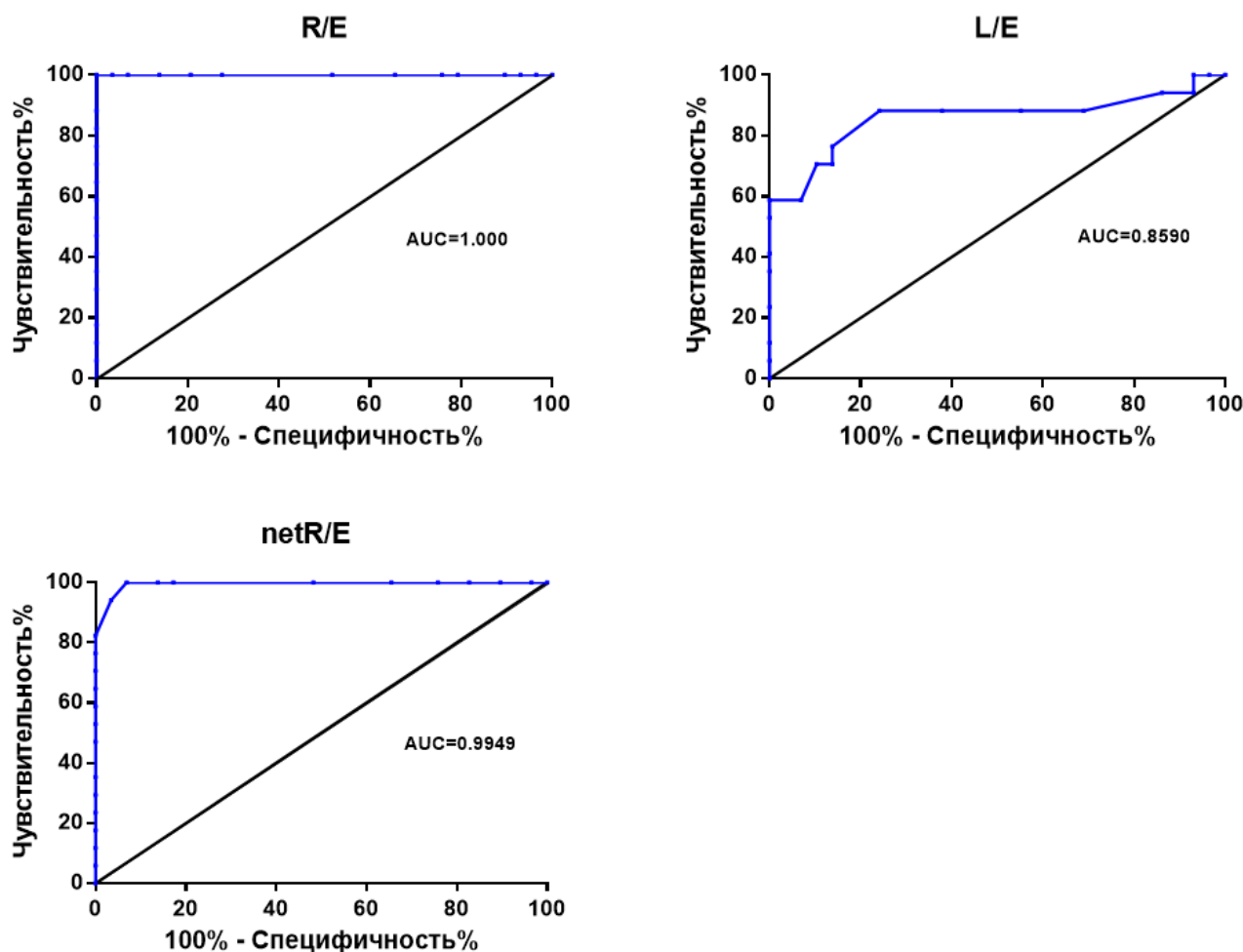


Рисунок 28 – Результаты респирометрического анализа (интактный протокол) на ККФ пациентов с ПМЗ.

Примечание: А. Графики результатов оксиграфии на интактных ККФ контроля (зеленый) и пациента с заменой m.3460 (красный). М+Р-малат+пируват, Ому-олигомицин, F-титрование FCCP, Rot-ротенон, Ама-антимидин А. Б. Контрольные значения респирометрии (FCR, интактный протокол) пациентов с подтвержденным диагнозом первичного МЗ и контрольными ККФ. В. ROC-анализ соотношений респирометрии на интактных ККФ у пациентов с подтвержденным диагнозом ПМЗ. Данные представлены как медиана±межквартильный размах. ****- $p < 0,0001$

3.4.2.2 Результаты на ККФ пациентов с известными патогенными мутациями ПМЗ с использованием пермеабиллизованного протокола

ККФ 12 пациентов с патогенными (известными) мутациями мтДНК m.10158T>C, m.14597A>G (N=2), m.3460G>A (N=4), m.4171C>A, m.11778G>A (N=2), m.3260A>G, а также пациента с компаунд-гетерозиготными мутациями в гене *NUBPL*, проанализированы с помощью протокола с пермеабиллизованной дигитонином мембраной. Типичный график представлен на рис. 29. Для оценки работы дыхательной цепи использовали следующие соотношения значений скоростей дыхания на различных этапах эксперимента: CI/ETS , C_{I+II}/ETS , CI_{ETS}/ETS , CIV/ETS , CI/C_{I+II} , CI_{ETS}/ETS , где CI - скорость потребления кислорода при добавлении глутамата, C_{I+II} - на смеси глутамата и сукцината, CI_{ETS} - максимальная мощность ДЦМ за исключением доли КДЦМ I, CIV - скорость потребления кислорода при добавлении аскорбата и TMPD за вычетом CIV -нечувствительного дыхания при добавлении азидата натрия, CI_{ETS} - максимальная мощность ДЦМ за счет КДЦМ I. Результаты респирометрического анализа (рис. 30 А) показали статистически достоверные различия между пациентами с ПМЗ и контрольной группой. Соотношения CI/ETS и CI_{ETS}/ETS снижены у пациентов с ПМЗ в 1,5 и 1,2 раз соответственно, по сравнению с контролем, что говорит о нарушении НАДН-зависимого пути из-за дисфункции КДЦМ I. Отмечено повышение соотношений C_{I+II}/ETS , CI_{ETS}/ETS и снижение CI/C_{I+II} по сравнению с контролем в 1,2, 1,22 и 1,5 раз соответственно, что связано с компенсаторной реакцией на нарушение КДЦМ I. Для поддержания уровня АТФ происходит подача электронов через ФАДН₂ к КДЦМ II и КоQ [Barrow J.J. et al., 2016]. В работе Friederich также отмечено повышение ответа на добавление сукцината на ККФ пациента с мутацией в гене *NUBPL*, являющийся фактором сборки КДЦМ I и вызывающий недостаточность КДЦМ I [Friederich M.W. et al., 2020]. Выявлено небольшое статистически значимое снижение КДЦМ IV (CIV/ETS), как это ранее описано у Bird M. - авторы связывали данный эффект с образованием суперкомплексов ($CI+CIII_2+CIV$) [Bird M.J. et al., 2019].

При проведении ROC-анализа (рис. 30 Б) соотношение CI/C_{I+II} показало высокую чувствительность 100% (95% CI 80,49%-100%) и специфичность 93,3% (95% CI 82,24%-99,91%), площадь под кривой составила $AUC=0,99$.

Полученные данные демонстрируют, что у пациентов с представленными мутациями ПМЗ происходит снижение функциональной активности КДЦМ I (за счет нарушения НАДН-зависимого пути и протонного градиента), а сукцинат-зависимый путь через КДЦМ II функционирует на полную мощность, по сравнению с контрольной группой, как компенсационный механизм. В работе Schöpf V. показано, что клетки опухоли с заменами в мтДНК, затрагивающие КДЦМ I, используют сукцинат-зависимый путь как компенсаторный эффект, в то время как активность КДЦМ I (НАДН-зависимый путь) снижена функционально, авторы отмечают, что данный подход может в дальнейшем использоваться для создания терапии [Schöpf V. et al., 2020]. Ehinger показал, что фибробласты пациента с синдромом Ли, вызванном мутациями в гене *NDUFS2* при обработке клеток сукцинатом увеличивали выработку АТФ, что доказывает использование КДЦМ II как мишень для терапии пациентов с недостаточностью КДЦМ I [Ehinger J.K. et al., 2016].

3.4.3 Респирометрический анализ вариантов неясной значимости

3.4.3.1 Анализ нового гетероплазмического варианта m.641A>T в мт тРНК (tRNA-Phe) методом респирометрии

У пациентки 11 лет с клинической картиной, типичной для митохондриальной патологии: эпилепсия, задержка психомоторного развития, лактат-ацидоз, некрозы в области базальных ганглиев на МРТ головного мозга, выявлен ранее не описанный вариант в 80 % гетероплазмическом состоянии на ККФ в мт тРНК (*tRNA-Phe*) m.641A>T.

Замена m.641A>T в гене *tRNA-Phe*, кодирующем митохондриальную транспортную РНК фенилаланин, ингибирует синтез митохондриальных белков (субъединиц КДЦМ и факторов сборки) и как следствие, снижается активность КДЦМ [Itkis Y.S. et al., 2019]. При исследовании ККФ в интактом протоколе (рис. 31) выявлены изменения, характерные для ПМЗ (рис. 32 А). Показатели R/E, netR/E на ККФ пациента в 1,7 и 1,8 раз, соответственно превышали данные значения на ККФ

контроля. Однако при использовании протокола с дигитонином в соотношениях респирометрии не выявлено отклонений. При нормализации первичных данных на уровень активности цитрат-синтазы получены достоверные отличия от контроля (рис. 32 Б), выявлено функциональное снижение активностей КДЦМ I, II, IV. Полученные данные указывают на нарушение системы окислительного фосфорилирования в митохондриях пациента с вовлечением КДЦМ I, II, IV. Функциональное снижение КДЦМ II, который полностью кодируется ядерным геномом, можно объяснить вторичным эффектом снижения функциональной активности остальных комплексов. В работе Burgin также показано снижение КДЦМ II на гибридных клетках с мутацией мТ РНК m.3243A>G [Burgin H.J. et al., 2020].

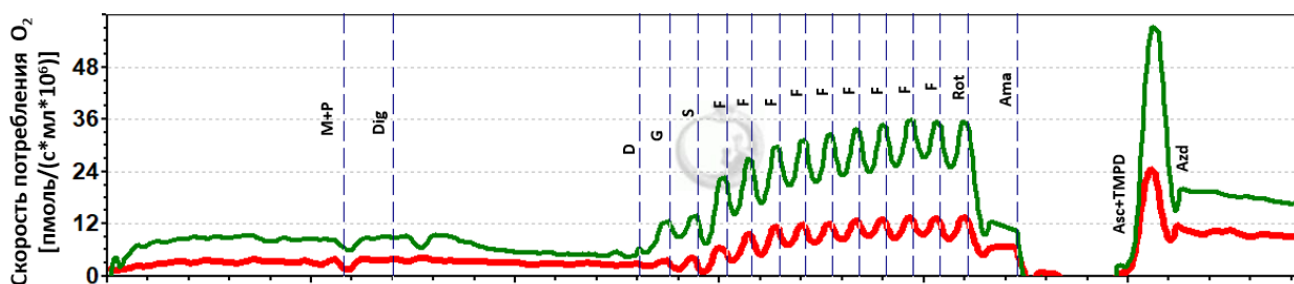
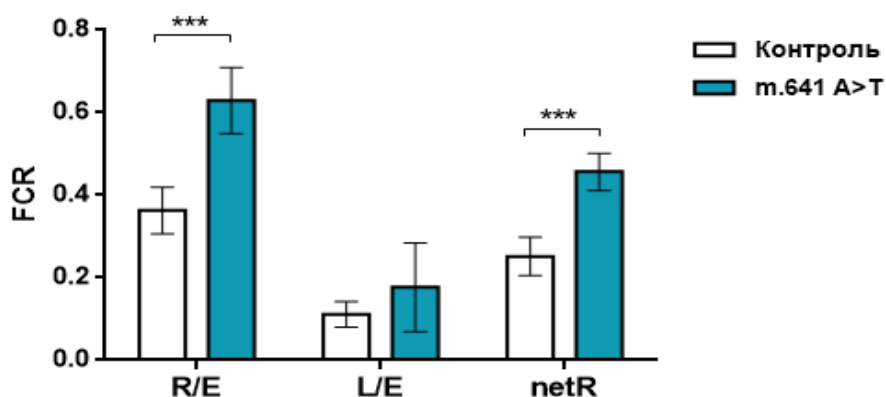


Рисунок 31 – Графики результатов респирометрии на пермеабелизованных ККФ контроля (зеленый) и пациента с заменой m.641A>T (красный)

А



Б

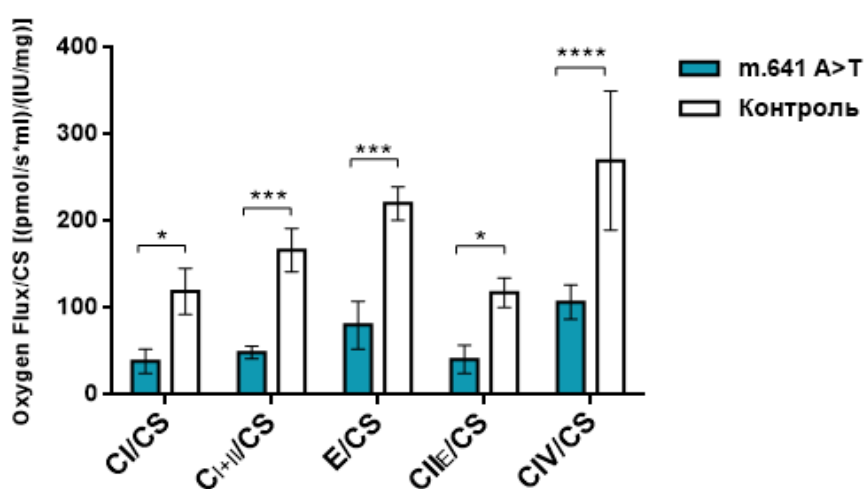


Рисунок 32 – Результаты респирометрического анализа на ККФ пациента с заменой m.641A>T

Примечание: А. Результаты респирометрического анализа на интактных ККФ пациента с заменой m.641A>T и на ККФ контрольной группы (эксперименты выполнены в трипликате). Б. Результаты респирометрического анализа пермеабилizованных ККФ пациента с заменой m.641A>T и контрольных ККФ, нормализованных на уровень активности цитрат-синтазы (эксперименты выполнены в трипликате). * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$, **** - $p < 0,0001$

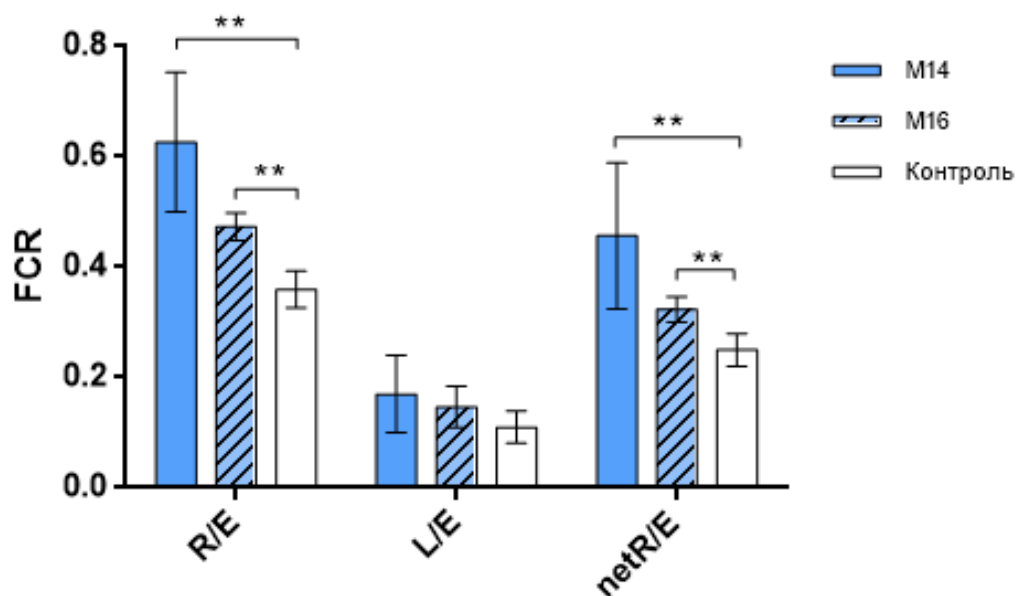
3.4.3.2 Респирометрический анализ ККФ пациентов в неопisanном ранее гене *DNAJC30*, вызывающем аутоcомно-рецессивную форму НОНЛ

В 2021 году научным коллективом соавторов во главе с S. Stenton и H. Prokisch опубликована работа, в которой описаны случаи пациентов с синдромом нейропатии

зрительного нерва Лебера, у которых не выявлено патогенных вариантов в мтДНК или других ядерных генах, ассоциированных с НОНЛ (*OPA1*, *SSBP1*) [Stenton S.L. et al., 2021; Dotto Del V. et al., 2019]. У данных больных выявлены вероятно патогенные компаунд-гетерозиготные и гомозиготные варианты в новом гене *DNAJC30*, ассоциированном с аутосомно-рецессивным типом наследования НОНЛ. Ранее А. Tebbenkamp и соавторы показали, что белок DNAJC30 взаимодействует с АТФ синтазой; клетки неокортекса нокаутных мышей по данному гену показали статистически значимое снижение уровня окислительного фосфорилирования, высокую выработку уровня АФК, снижение уровня АТФ и митохондриального мембранного потенциала. Клинически дефект данного гена выражался в синдроме Уильямса, представленный CNV участка 7q11.23 [Tebbenkamp A.T.N. et al., 2018].

В результате ретроспективного анализа методом прямого секвенирования по Сэнгеру 56 пациентов с классической картиной НОНЛ без мутаций в мтДНК, выявлено 16 пациентов с частым вариантом *DNAJC30*: NM:032317: c.152A>G, у 2-х из которых получена биопсия кожи. На ККФ от пациентов и здоровых доноров проведен респирометрический анализ с использованием интактного и пермеабиллизованного протоколов. По результатам интактного протокола (рис. 33 А) выявлены статистически значимые отклонения в соотношениях респирометрии у пациентов М14 и М16, по сравнению с контрольной группой. Средние значения соотношений R/E и netR/E превышали значения в 1,7 и 1,8 раз и в 1,3 и 1,29 раз у пациентов М14 и М16 соответственно, по сравнению с контрольной группой (рис. 33 А). Пациент М14 имел более выраженные изменения, чем М16. В клинической картине данных пациентов не выявлено существенных различий. В пермеабиллизованном протоколе, нормализованном на уровень активности цитрат-синтазы (рис. 33 Б), выявлены незначительные изменения у пациента М14 - уровень максимальной кислородной емкости в присутствии субстратов КДЦМ I и II и доля КДЦМ II в максимальной мощности работы электрон-транспортной цепи снижены у пациента М14 по сравнению с контролем. У пациента М16 отклонений не наблюдалось.

А



Б

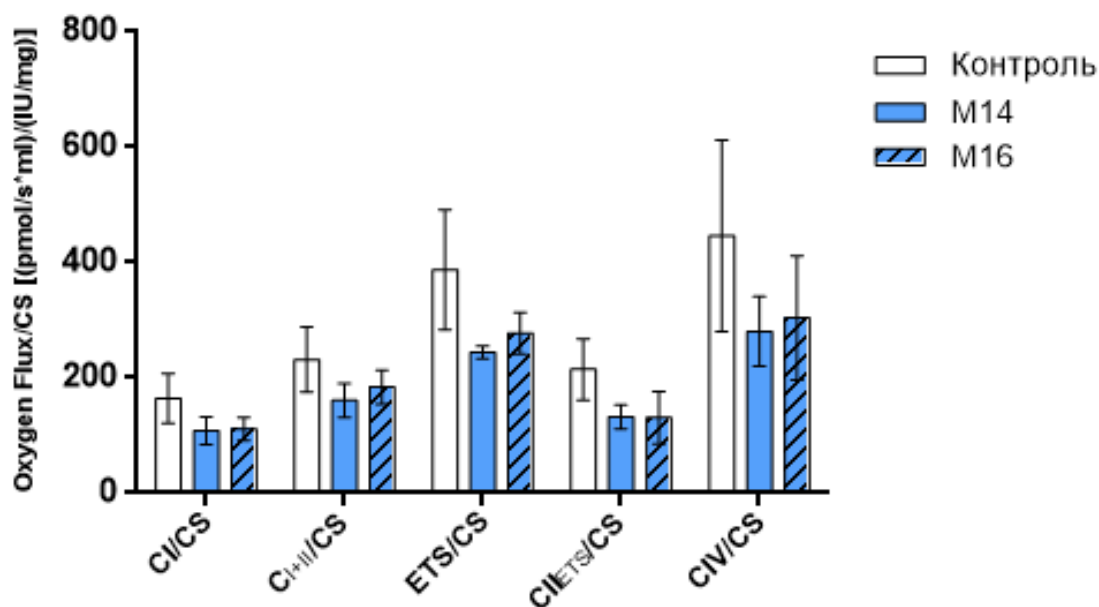


Рисунок 33 – Результаты респирометрического анализа на ККФ пациентов с высоковероятной заменой в гене *DNAJC30*

Примечание: А. Результаты респирометрического анализа на интактных ККФ пациентов с высоковероятной заменой в гене *DNAJC30* и на ККФ контрольной группы (эксперименты выполнены в трипликате). Б. Результаты респирометрического анализа пермеабелизованных ККФ пациентов с высоковероятной заменой в гене *DNAJC30* и ККФ контрольной группы. Данные представлены как среднее±стандартное отклонение. ** - $p < 0,005$

Белок *DNAJC30* представляет собой шаперон, функция которого предположительно связана с участием деградации “устаревших” компонентов КДЦМ I [Stenton S.L. et al., 2021]. Вероятно, нарушение этого механизма, а именно накопления дефектных субъединиц КДЦМ I, выражается в неэффективном синтезе АТФ, поскольку соотношения R/E, netR/E в интактном протоколе и ETS/CS в протоколе с дигитонином отражают максимальную и резервную мощность работы электрон-транспортной цепи.

Полученные результаты совпадают с выводами по результатам комплексного анализа и микроплащечной респирометрии фибробластов пациентов с частой мутацией в гене *DNAJC30*, что на данных ККФ нарушена деградация субъединиц N-модуля КДЦМ I, результирующем в снижении максимальной ёмкости скорости потребления кислорода. Однако в данный момент нет литературных данных о влиянии данного варианта на отдельные КДЦМ [Stenton S.L. et al., 2021].

3.4.4 Ограничения метода респирометрии

3.4.4.1 Пациенты с патогенными гетероплазмическими заменами в мтДНК

Результаты высокоразрешающей респирометрии в интактных фибробластах у двух пациентов с гетероплазмической заменой в крови *m.13513G>A* не показали отклонений от нормы в интактном протоколе (рис. 34). В фибробластах данных пациентов выявлена мутация в состоянии 24% гетероплазмии (пациент с НОНЛ) и в состоянии 25% гетероплазмии (пациент с синдромом Ли); предположительно из-за низкого уровня гетероплазмии, функциональных проявлений мутации не обнаружено. Поэтому при применении респирометрического анализа в качестве одного из функциональных тестов оценки митохондриальной дисфункции следует учитывать, что процент мутантных копий мтДНК может быть недостаточным для проявления биохимического дефекта в фибробластах пациентов [Folmes C.D. et al., 2014]. В работе McMillan установлено, что цибридные клетки с 30% гетероплазмической заменой *m.3243A>G*, вызывающей синдром MELAS также не показывают отклонений в респирометрическом анализе - более того, клетки с низкой гетероплазмией вырабатывали большее количество АТФ, чем клетки контрольной группы [McMillan R.P. et al., 2019]. В работе Ma H. при исследовании первичных фибробластов пациентов

с частыми мутациями в мтДНК (m.3243A>G, m.8993T>G, m.13513G>A) и скорректированных плюрипотентных стволовых клеток от данных пациентов с разной степенью гетероплазии, продемонстрировано, что клетки с низкой гетероплазией не показывают функционального дефекта ОХРНOS при проведении анализа микроплащечной респирометрией.

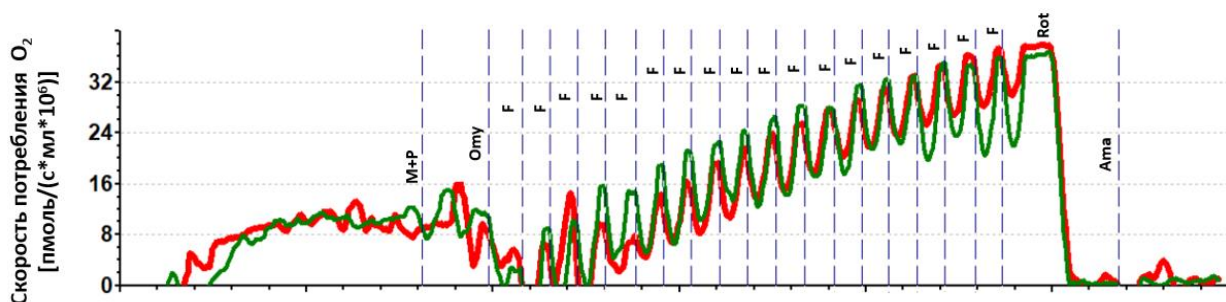


Рисунок 34 – Графики кривых потребления кислорода при использовании интактного протокола.

Примечание: Красная линия - траектория изменения скорости потребления кислорода ККФ пациента с m.13513G>A, зеленая линия - траектория изменения скорости потребления кислорода ККФ контроля. M+P-малат+пируват, Omy-олигомицин, F-титрование FCCP, Rot-ротенон, Ama-антимидин А

Таким образом, уровень митохондриального дыхания может коррелировать со степенью гетероплазии в клетках [Ma H. et al., 2015].

3.4.4.2 Респирометрический анализ ККФ пациентов с мутациями в мтДНК, ответственных за развитие ПМЗ, без отклонений на интактном протоколе

В исследование вошли пять ККФ от пациентов с известными патогенными мутациями в мтДНК m.14484T>C (N=2), m.14487T>C (N=1) и m.3635G>A (N=2), которые не показали отклонений в соотношениях респирометрии, по сравнению с контролем в интактном протоколе (рис. 35). Catarino с соавт. также выявили, что пациенты с мутацией 14484T>C не показывают наличие снижения кислородной емкости в фибробластах [Catarino C.V. et al., 2017]. Brown M.D. при исследовании фибробластов пациента с гомоплазмической мутацией 14484T>C полярографическим

методом не выявил отклонений от нормы [Brown M.D. et al., 2000]. Также отмечено, что у пациентов с данной мутацией чаще всего встречается спонтанное восстановление зрения и клинический прогноз у таких пациентов благоприятнее, чем у пациентов с другими частыми мутациями НОНЛ в мтДНК [Spruijt L. et al., 2006]. Chen D. с соавт. использовали гибридные модели клеток от пациента с синдромом Ли с гомоплазмической мутацией m.14487T>C и показали, что данная мутация не вызывает статистических различий в показателях респирометрии, по сравнению с контролем, мембранный митохондриальный потенциал не изменился и активность КДЦМ I, как и уровень АТФ, не снижались. Авторы объясняют патогенный эффект данной мутации с возможным наличием ядерных модификаторов и влиянием митохондриальной гаплогруппы [Chen D. et al., 2020].

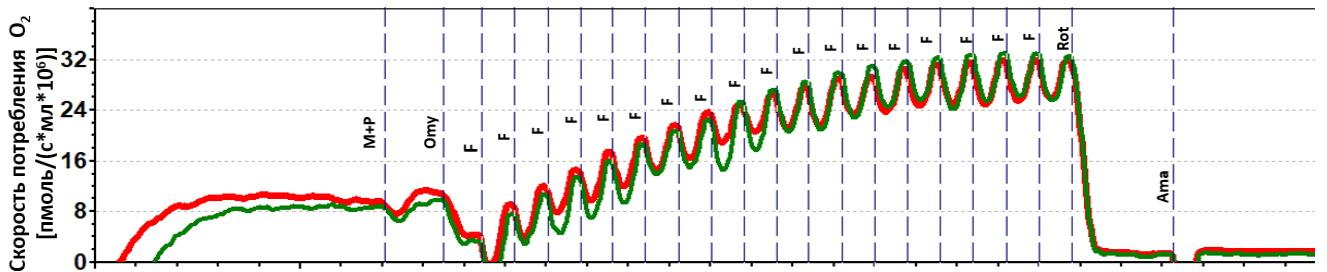


Рисунок 35 – Графики кривых потребления кислорода при использовании интактного протокола.

Примечание: Красная линия - траектория изменения скорости потребления кислорода ККФ пациента с m.3635G>A, зеленая линия - траектория изменения скорости потребления кислорода ККФ контроля. М+P-малат+пируват, Ому-олигомицин, F-титрование FCCP, Rot-ротенон, Ama-антимидин А

Предположительно, мутации m.14484T>C, m.14487T>C и 3635G>A вызывают нарушение транспорта протонов через E-канал КДЦМ I. Мутации мтДНК в других точках, вызывающий недостаточность КДЦМ I, представленные в п.3.2.2, связаны с нарушением сборки КДЦМ I вследствие дефектного взаимодействия между субъединицами; либо с нарушением переноса электрона через Q-сайт [Fiedorczuk K. et al., 2018]. В работе Desquiret-Dumas V. показано, что на переключение образования АТФ через гликолиз вместо окислительного фосфорилирования на клетках у пациентов с недостаточностью КДЦМ I больше влияет неправильная сборка КДЦМ, нежели нарушение их каталитической активности [Desquiret-Dumas V. et al., 2019].

3.4.5 Респирометрический анализ: значение метода в диагностике митохондриальных болезней

Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод высокоразрешающей респирометрии может применяться для подтверждения патогенности новых выявленных вариантов нуклеотидной последовательности и также при исследовании патогенности ранее не описанных мутаций в генах. Однако будет ли выявлен функциональный дефект - зависит от расположения варианта (насколько вариант влияет на конформацию белка, структуру ДЦМ), в случаях выявления вариантов в мтДНК - в каком состоянии гетероплазмии обнаружено изменение.

Респирометрия высокого разрешения с использованием ККФ может применяться для функциональной оценки работы митохондрий. ККФ является менее инвазивным анализом по сравнению с исследованием мышечного биоптата, обладает большей воспроизводимостью. Однако при выявлении нормальных значений соотношений респирометрии при исследовании генетических вариантов с неясной клинической значимостью данный метод не позволяет полностью исключить патогенность выявленных вариантов, в таком случае необходимо выполнить дополнительные функциональные исследования (измерение активности КДЦМ спектрофотометрическим методом, вестерн-блоттинг белков КДЦМ, методы иммуногистохимии).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика ПМЗ представляет крайне сложную задачу в силу их генетической гетерогенности, которая является причиной выраженного клинического разнообразия. Кроме сложности клинической диагностики, существует проблема лабораторной диагностики, поскольку ни один из биохимических подходов не обладает абсолютной диагностической значимостью. В силу двойного генетического контроля, феномена гетероплазмы мтДНК, тканеспецифичности биохимического дефекта и порогового эффекта экспрессии клинического фенотипа, ПМЗ являются довольно трудно диагностируемой группой наследственных болезней обмена веществ.

Впервые в РФ проведено исследование уровня органических кислот в моче, определено содержание плазменных цитокинов FGF-15 и GDF-15 и исследована их диагностическая значимость, проведен анализ работы мощности дыхательной цепи митохондрий на ККФ на выборке пациентов с ПМЗ.

В работе представлено исследование содержания 72 метаболитов методом ГХ-МС и показано, что в моче пациентов с ПМЗ повышается концентрация метаболитов, связанных с нарушением редокс-пары НАДН/НАД⁺ и метаболитов цикла Кребса. Однако, оценка уровня органических кислот в моче не может применяться в качестве универсальных маркеров, поскольку наличие метаболитов (таких как лактат, пируват, 3-гидроксибутират) могут наблюдаться не только при ПМЗ, но и при других наследственных патологиях и синдромальных состояниях. Кроме того, даже внутри нозологической группы ПМЗ (таких как синдром Ли), показатели могут, как отличаться, так и быть в норме.

Исследование плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15 у пациентов с ПМЗ подтвердило опубликованные ранее результаты: концентрации данных метаболитов повышаются у пациентов с ПМЗ, однако проведенный анализ на содержание данных маркеров у пациентов с другими формами моногенных заболеваний не позволяет сделать вывод об их универсальности и диагностической значимости в отношении ПМЗ.

Высокоразрешающая респирометрия на ККФ у пациентов с подтвержденным диагнозом ПМЗ показала эффективность в оценке функциональной активности митохондрий у пациентов с дефицитом КДЦМ I, однако на ККФ, мутации в которых

затрагивают нарушение образования протонного канала (“Е-канал”), отклонений выявлено не было; более того, данные мутации ассоциированы с менее тяжелым фенотипом пациентов. При наличии мутации мтДНК в низком гетероплазмическом состоянии, наличие отклонений в показателях респирометрии маловероятно, что ограничивает использование данного метода в качестве функционального анализа дисфункции митохондрий.

Впервые охарактеризованы ККФ пациентов с мутациями в новом гене *DNAJC30*, вызывающем аутосомно-рецессивную форму НОНЛ и в гене *tRNA-Phe*. Показана возможность применения метода высокоразрешающей респирометрии в качестве функционального анализа работы митохондрий для данной группы пациентов.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа чувствительности и специфичности теста по определению концентрации метаболитов в моче установлено, что диагностическая значимость биомаркеров при ПМЗ убывает в ряду: 3-гидроксibuтират ($AUC=0,9183$), лактат ($AUC=0,8575$), пируват ($AUC=0,8514$). Пируват и 4-гидроксифениллактат обладали максимальным отношением правдоподобия положительного результата теста (117,4 и 61 соответственно) и отношением правдоподобия отрицательного результата теста <1 (0,78 и 0,67 соответственно).

2. Выявлен уникальный спектр органических кислот в моче, характерный для митохондриальной гепатопатии, вызванной генетическими вариантами в гене *DGUOK* (наравне с повышением уровня лактата, пирувата, 3-гидроксibuтирата, выявлено повышение концентрации 4-гидроксифениллактата, 4-гидроксифенилпирувата).

3. Показаны статистические значимые различия концентрации цитокинов FGF-21 ($p < 0,0001$) и GDF-15 ($p < 0,0005$ - дети; $p < 0,05$ - взрослые) в группе пациентов с ПМЗ по сравнению с группой контроля. Для ПМЗ тест по определению концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 в плазме крови обладает низкой положительной прогностической значимостью (PPV - 56% для FGF-21 и PPV - 58% для GDF-15); низкой чувствительностью и специфичностью (77% и 62,5% для FGF-21 и 88,7%/53,49% (дети/взрослые) и 65%/73,3% (дети/взрослые) для GDF-15 соответственно).

4. Определены референсные значения соотношений респирометрии в интактном и пермеабелизованном протоколах на линиях клеток кожных фибробластов контрольных образцов. Для интактного протокола референсные значения составляют: R/E ($0,37 \pm 0,03$), L/E ($0,11 \pm 0,03$), netR/E ($0,25 \pm 0,03$). Для пермеабелизованного протокола референсные значения составляют: CI/ETS ($0,38 \pm 0,11$), C_{I+II} /ETS ($0,55 \pm 0,13$), CI_{ETS} /ETS ($0,43 \pm 0,07$), CIV/ETS ($1,09 \pm 0,21$), CI/C_{I+II} ($0,68 \pm 0,07$), CI_{ETS} /ETS ($0,57 \pm 0,07$).

5. На линиях клеток кожных фибробластов пациентов с известными вариантами мтДНК m.10158T>C, m.3460G>A, m.11778G>A, m.3472T>C, m.4171C>A, m.14597A>G, m.3260A>G, а также для NM_025152: c.[815-27T>C];[1A>T] в гене *NUBPL* обнаружены отклонения в соотношениях респирометрии R/E ($p < 0,0001$), L/E ($p < 0,0001$), netR/E ($p < 0,0001$) по сравнению с контролем при использовании интактного протокола; в пермеабелизованном протоколе выявлены статически

достоверные различия соотношений CI/ETS ($p < 0,05$), CI_{ETS}/ETS ($p < 0,005$), C_{I+II}/ETS ($p < 0,05$), CII_{ETS}/ETS ($p < 0,005$), CIV/ETS ($p < 0,05$) и CI/C_{I+II} ($p < 0,0001$). Параметры R/E, netR/E, CI/C_{I+II} можно использовать в качестве функциональных маркеров нарушения системы окислительного фосфорилирования.

6. Проведено уточнение функциональной значимости двух генетических вариантов с неизвестным клиническим значением: NM:032317: c.152A>G в гене *DNAJC30* у пациентов с аутосомно-рецессивной формой НОНЛ и m.641A>T в гене *tRNA-Phe* у пациентки с эпилептической энцефалопатией методом высокоразрешающей респирометрии на линиях клеток кожных фибробластов. Показано, что данные варианты влияют на функциональную активность митохондрий, выраженную в неэффективном уровне окислительного фосфорилирования.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Следует обращать внимание в диагностической практике на повышение концентрации лактата, пирувата, 3-гидроксибутирата и метаболитов цикла Кребса (малат, фумарат, сукцинат, 2-оксоглутарат) в моче при анализе методом ГХ-МС, поскольку в 78% случаев изменения концентрации данных метаболитов выявляются у пациентов с ПМЗ.

2. Для постановки диагноза необходимо комплексно оценивать биохимические маркеры. Так, наиболее высокие концентрации цитокинов FGF-21 и GDF-15 в плазме крови выявлены в группе *DGUOK*-ассоциированных гепатопатий. В группе немитохондриальных гепатопатий концентрации данных цитокинов также повышены. При анализе уровня органических кислот в моче у пациентов с *DGUOK*-ассоциированной гепатопатией наблюдается повышение 4-гидроксифенилактата и 4-гидроксифенилпирувата.

3. Респирометрический анализ на ККФ пациентов с ПМЗ может использоваться в качестве функционального теста митохондриальной дисфункции при обнаружении новых генетических вариантов/генов. Однако стоит отметить, что наличие нормальных показателей респирометрического анализа не исключает ПМЗ.

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Список статей, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК при
Минобрнауки России**

1. Шеремет Н.Л., Невиницына Т.А., Жоржоладзе 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.Е. Доказательство патогенности ранее неклассифицированной мутации мтДНК m.3472T>C при оптической нейропатии Лебера. // Биохимия. – 2016. – Т. 81(7). – С. 982-900. (Scopus, Web of Science)
2. **Крылова Т.Д.**, Прошлякова Т.Ю., Байдакова Г.В., Иткис Ю.С., Куркина М.В., Захарова Е.Ю. Биомаркеры в диагностике и мониторинге лечения болезней клеточных органелл. // Медицинская генетика. – 2016. – Т. 15(7). – С. 3–10.
3. **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. (Scopus)
4. Цыганкова П.Г., Иткис Ю.С., **Крылова Т.Д.**, Захарова Е.Ю. Эффективность новых плазменных биомаркеров FGF-21 и GDF-15 в дифференциальной диагностике митохондриальных заболеваний. // Медицинская генетика. – 2018. – Т. 17(5). – С. 13–18.
5. **Крылова Т.Д.**, Куркина М.В., Баранова П.В., Пыркова Е.Ю., Цыганкова П.Г., Иткис Ю.С., Доброхотова Ю.А., Захарова Е.Ю. Диагностическая значимость анализа органических кислот мочи при первичных митохондриальных заболеваниях. // Медицинская генетика. – 2021. – Т. 20(10). – С. 13–24.
6. Itkis Y., **Krylova T.**, Pechatnikova N.L., De Grassi A., Tabakov V.Y., Pierri C.L., Aleshin V., Boyko A., Bunik V.I., Zakharova E.Y. A novel variant m.641A>T in the mitochondrial MT-TF gene is associated with epileptic encephalopathy in adolescent. // Mitochondrion. – 2019. – Vol. 47. – P. 10-17. (Scopus, Web of Science)
7. Tsygankova P.G. Itkis Y.S., **Krylova T.D.**, Kurkina M.V., Bychkov I.O., Ilyushkina A.A., Zabnenkova V.V., Mikhaylova S.V., Pechatnikova N.L., Sheremet N.L.,

- Zakharova E.Y. Plasma FGF-21 and GDF-15 are elevated in different inherited metabolic diseases and are not diagnostic for mitochondrial disorders. // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2019. – Vol. 42(5). – P. 918-933. (Scopus, Web of Science)
8. **Krylova T.D.**, Sheremet N.L., Tabakov V.Y., Lyamzaev K.G., Itkis Y.S., Tsygankova P.G., Andreeva N.A., Shmelkova M.S., Nevinitsyna T.A., Kadyshev V.V., Zakharova E.Y. Three rare pathogenic mtDNA substitutions in LHON patients with low heteroplasmy. // *Mitochondrion.* – 2020. – Vol. 50. – P. 139-144. (Scopus, Web of Science)
9. Stenton S.L., Sheremet N.L., Catarino C.B., Andreeva N.A., Assouline Z., Barboni P., Barel O., Berutti R., Bychkov I., Caporali L., Capristo M., Carbonelli M., Cascavilla M.L., Issa P.C., Freisinger P., Gerber S., Ghezzi D., Graf E., Heidler J., Hempe M., Heon E., Itkis Y.S., Javasky E., Kaplan J., Kopajtich R., Kornblum C., Kovacs-Nagy R., **Krylova T.D.**, Kunz W.S., La Morgia C., Lamperti C., Ludwig C., Malacarne P.F., Maresca A., Mayr J.A., Meisterknecht J., Nevinitsyna T.A., Palombo F., Podeshak B., Shmelkova M.S., Strom T.M., Tagliavini F., Tzadok M., van der Ven A.T., Vignal-Clermont C., Wagner M., Zakharova E.Y., Zhorzholadze N.V., Rozet J.-M., Carelli V., Tsygankova P.G., Klopstock T., Wittig I., Prokisch H. Impaired complex I repair causes recessive Leber's hereditary optic neuropathy. // *J. Clin. Invest.* – 2021. – Vol.131(6). – P. 1-12. (Scopus, Web of Science)

Список публикаций в других изданиях

10. **Krylova T.D.**, Sheremet N.L., Tabakov V.Y., Tsygankova P.G., Itkis Y.S., Kadyshev V.V., Zakharova E.Y. Novel pathogenic heteroplasmic substitution m.14597 A>G in the *MT-ND6* gene in female with Leber's hereditary optic neuropathy. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* – 2018. – Vol. 1859. – P. e75. (Scopus)
11. **Krylova T.D.**, Tsygankova P.G., Itkis Y.S., Sheremet N.L., Nevinitsyna T.A., Zakharova E.Yu. High-resolution respirometry in fibroblasts of mitochondrial complex I deficiency patients. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* – 2016. – Vol. 1857. – P. e104–e105. (Scopus)
12. **Krylova T.**, Tsygankova P., Itkis Y.S., Sheremet N.L., Nevinitsyna T.A., Malakhova V.A., Zakharova E.Y. Respirometry in blood and fibroblasts of LHON patients. // *Journal of Inherited Metabolic Disease.* – 2015. – Vol.1 (38). – P. 221. (Scopus, Web of Science)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бочков Н. П., Гинтер Е. К., Пузырев В. П. Наследственные болезни: национальное руководство. // М.: ГЭОТАР-Медиа – 2012.
2. Alahmad A., Nasca A., Heidler J., Thompson K., Oláhová M., Legati A., Lamantea E., Meisterknecht J., Spagnolo M., He L., Alameer S., Hakami F., Almehdar A., Ardisson A., Alston C.L., McFarland R., Wittig I., Ghezzi D., Taylor R.W. Bi-allelic pathogenic variants in NDUFC2 cause early-onset Leigh syndrome and stalled biogenesis of complex I. // *EMBO Mol. Med.* –2020. –Vol.12(11). –P. 1–14.
3. Alban C., Fatale E., Joulani A., Ilin P., Saada A. The Relationship between Mitochondrial Respiratory Chain Activities in Muscle and Metabolites in Plasma and Urine: A Retrospective Study. // *J. Clin. Med.* –2017. –Vol.6(31). –P. 1-9.
4. Alston C.L., Rocha M.C., Lax N.Z., Turnbull D.M., Taylor R.W. The genetics and pathology of mitochondrial disease // *J. Pathol.* –2017. –Vol.241(2). –P. 236–250.
5. Alston C.L., Veling M.T., Heidler J., Taylor L.S., Alaimo J.T., Sung A.Y., He L., Hopton S., Broomfield A., Pavaine J., Diaz J., Leon E., Wolf P., McFarland R., Prokisch H., Wortmann S.B., Bonnen P.E., Wittig I., Pagliarini D.J., Taylor R.W. и др. Pathogenic Bi-allelic Mutations in NDUFAF8 Cause Leigh Syndrome with an Isolated Complex I Deficiency. // *Am. J. Hum. Genet.* –2020. –Vol. 106(1). –P. 92–101.
6. Barrow J.J., Balsa E., Verdeguer F., Tavares C.D.J., Soustek M.S., Hollingsworth L.R., Jedrychowski M., Vogel R., Paulo J.A., Smeitink J., Gygi S.P., Doench J., Root D.E., Puigserver P. Bromodomain Inhibitors Correct Bioenergetic Deficiency Caused by Mitochondrial Disease Complex I Mutations. // *Mol. Cell.* –2016. –Vol.64(1). –P. 163–175.
7. Barshop B.A. Metabolomic approaches to mitochondrial disease: correlation of urine organic acids. // *Mitochondrion.* –2004. – Vol.4. –P. 521–527.
8. Berg J. M., Stryer L., Tymoczko J. L. Biochemistry. 5th edition. // W. H. Freeman Publishing, New York. –2002.
9. Bird M.J., Adant I., Windmolders P., Elst I. Vander, Felgueira C., Altassan R., Gruenert S.C., Ghesquière B., Witters P., Cassiman D., Vermeersch P. Oxygraphy Versus Enzymology for the Biochemical Diagnosis of Primary Mitochondrial Disease. //

- Metabolites. –2019. –Vol.9(10). –P. 220.
10. Blik A. M. Van Der, Sedensky M. M., Morgan P. G. Cell biology of the mitochondrion. // Genetics. –2017. –Vol.207(3). –P.843–871.
 11. Boenzi S., Diodato D. Biomarkers for mitochondrial energy metabolism diseases. // Essays Biochem. –2018. –Vol.62(3). –P. 443–454.
 12. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. – 1976. –Vol.72. –P. 248–254.
 13. Brown M.D., Trounce I.A., Jun A.S., Allen J.C., Wallace D.C. Functional Analysis of Lymphoblast and Cybrid Mitochondria Containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's Hereditary Optic Neuropathy Mitochondrial DNA Mutation. // J. Biol. Chem. –2000. –Vol.275(51). –P. 39831–39836.
 14. Burgin H.J., Sanchez M.I.G.L., Smith C.M., Trounce I.A., McKenzie M. Pioglitazone and Deoxyribonucleoside Combination Treatment Increases Mitochondrial Respiratory Capacity in m.3243A>G MELAS Cybrid Cells. // Int. J. Mol. Sci. –2020. –Vol. 21(6). –P. 1–16.
 15. Buzkova J., Nikkanen J., Ahola S., Hakonen A.H., Sevastianova K., Hovinen T., Yki-Järvinen H., Pietiläinen K.H., Lönnqvist T., Velagapudi V., Carroll C.J., Suomalainen A. Metabolomes of mitochondrial diseases and inclusion body myositis patients: treatment targets and biomarkers. // EMBO Mol. Med. –2018. –Vol.10(12). –P. 1–15.
 16. Carelli V., Morgia C. La. Clinical syndromes associated with mtDNA mutations: where we stand after 30 years // Essays Biochem. –2018. –Vol. 62(3). –P. 235–254.
 17. Catarino C.B., Ahting U., Gusic M., Iuso A., Repp B., Peters K., Biskup S., von Livonius B., Prokisch H., Klopstock T. Characterization of a Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) family harboring two primary LHON mutations m.11778G > A and m.14484T > C of the mitochondrial DNA. // Mitochondrion. –2017. –Vol.36. –P. 15–20.
 18. Chen D., Zhao Q., Xiong J., Lou X., Han Q., Wei X., Xie J., Li X., Zhou H., Shen L., Yang Y., Fang H., Lyu J. Systematic analysis of a mitochondrial disease-causing ND6 mutation in mitochondrial deficiency. // Mol. Genet. Genomic Med. – 2020. Vol.8(5). –P. 1–17.
 19. Chinnery P. F., Gomez-Duran A. Oldies but goldies mtDNA population variants and

- neurodegenerative diseases. // *Front. Neurosci.* –2018. –Vol. 12. –P. 1–11.
20. Chinnery P. The Mitochondrion and its Disorders. // *Pract. Neurol.* –2003. –Vol. 3. –P. 100–105.
21. Chung H.K., Kim J.T., Kim H.W., Kwon M., Kim S.Y., Shong M., Kim K.S., Yi H.S. GDF15 deficiency exacerbates chronic alcohol- and carbon tetrachloride-induced liver injury. // *Sci. Rep.* –2017. –Vol. 7(1). –P. 1–13.
22. Couser N., Gucsavas-Calikoglu M. Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism. // Elsevier Inc. – 2017. – P. 167–190.
23. Craven L., Alston C.L., Taylor R.W., Turnbull D.M. Recent Advances in Mitochondrial Disease. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* –2017. –Vol.18(1). –P. 257–275.
24. Čunátová K., Reguera D.P., Houštek J., Mráček T., Pecina P. Role of cytochrome c oxidase nuclear-encoded subunits in health and disease. // *Physiol. Res.* –2020. –Vol.69(6). –P. 947–965.
25. Davis R. L., Liang C., Sue C. M. A comparison of current serum biomarkers as diagnostic indicators of mitochondrial diseases. // *Neurology.* –2016. –Vol.86(21). –P. 2010–2015.
26. Davison J. E., Rahman S. Recognition, investigation and management of mitochondrial disease. // *Arch. Dis. Child.* 2017. –Vol.102(11). –P. 1082–1090.
27. Del Dotto V., Pippucci T., Carelli V., Ullah F., Meo I. Di, Magini P., Gusic M., Maresca A., Caporali L., Palombo F., Tagliavini F., Harris E. SSBP1 mutations cause mtDNA depletion underlying a complex optic atrophy disorder. // *J. Clin. Invest.* – 2020. –Vol.130(1). –P. 108–125.
28. Desquiret-Dumas V., Leman G., Wetterwald C., Chupin S., Lebert A., Khiati S., Le Mao M., Geffroy G., Kane M.S., Chevrollier A., Goudenege D., Gadras C., Tessier L., Barth M., Leruez S., Amati-Bonneau P., Henrion D., Bonneau D., Procaccio V., Reynier P., Lenaers G., Gueguen N. Warburg-like effect is a hallmark of complex I assembly defects. // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* – 2019. –Vol.1865(9). –P. 2475–2489.
29. DiMauro S., Garone C. Historical perspective on mitochondrial medicine. // *Dev. Disabil. Res. Rev.* – 2010. –Vol.16(2). –P. 106–113.
30. Doerrier C., Garcia-Souza L.F., Krumschnabel G., Wohlfarter Y., Mészáros A.T.,

- Gnaiger E. High-resolution fluoro-respirometry and oxphos protocols for human cells, permeabilized fibers from small biopsies of muscle, and isolated mitochondria. // *Methods in Molecular Biology*. – 2018. – Vol.1782. –P. 31–70.
31. Dominguez-Gonzalez C., Badosa C., Madruga-Garrido M., Martí I., Parada C., Ortez C., Diaz-Manera J., Berardo A., Alonso-Pérez J., Trifunov S., Cuadras D., Kalko S.G., Blázquez-Bermejo C., Cámara Y., Martí R., Mavillard F., Martin M.A., Montoya J., Ruiz-Pesini E., Villarroya J., Montero R., Villarroya F., Artuch R., Hirano M., Nascimento A., Jimenez-Mallebrera C. Growth Differentiation Factor 15 is a potential biomarker of therapeutic response for TK2 deficient myopathy. // *Sci. Rep.* – 2020. – Vol.10(1). –P. 1–13.
32. Domínguez-González C., Madruga-Garrido M., Mavillard F., Garone C., Aguirre-Rodríguez F.J., Donati M.A., Kleinsteuber K., Martí I., Martín-Hernández E., Morealejo-Aycinena J.P., Munell F., Nascimento A., Kalko S.G., Sardina M.D., Álvarez del Vayo C., Serrano O., Long Y., Tu Y., Levin B., Thompson J.L.P., Engelstad K., Uddin J., Torres-Torronteras J., Jimenez-Mallebrera C., Martí R., Paradas C., Hirano M. Deoxynucleoside Therapy for Thymidine Kinase 2–Deficient Myopathy. // *Ann. Neurol.* – 2019. –Vol.86(2). –P. 293–303.
33. Ehinger J.K., Piel S., Ford R., Karlsson M., Sjövall F., Frostner E.Å., Morota S., Taylor R.W., Turnbull D.M., Cornell C., Moss S.J., Metzsch C., Hansson M.J., Fliri H., Elmér E. Cell-permeable succinate prodrugs bypass mitochondrial complex I deficiency. // *Nat. Commun.* – 2016. –Vol.7. –P. 1–8.
34. El-Hattab A. W., Scaglia F. Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. // *Neurotherapeutics*. – 2013. –Vol.10(2). –P. 186–198.
35. El-Hattab A. W., Scaglia F. SUCLG1-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Encephalomyopathic Form with Methylmalonic Aciduria. // Seattle (WA). – 1993.
36. Emmerzaal T.L., Preston G., Geenen B., Verweij V., Wiesmann M., Vasileiou E., Grüter F. de Groot C., Schoorl J., de Veer R., Roelofs M., Arts M., Hendriksen Y., Klimars E., Donti T.R., Graham B.H., Morava E., Rodenburg R.J., Kozicz T. Impaired mitochondrial complex I function as a candidate driver in the biological stress response and a concomitant stress-induced brain metabolic reprogramming in male mice. //

- Transl. Psychiatry. – 2020. –Vol.10(1). –P. 1–13.
37. Esterhuizen K., Lindeque J.Z., Mason S., van der Westhuizen F.H., Suomalainen A., Hakonen A.H., Carroll C.J., Rodenburg R.J., de Laat P.B., Janssen M.C.H., Smeitink J.A.M., Louw R. A urinary biosignature for mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS). // *Mitochondrion*. – 2019. –Vol.45. –P. 38–45.
 38. Esterhuizen K., Westhuizen F. H. van der, Louw R. Metabolomics of mitochondrial disease. // *Mitochondrion*. – 2017. –Vol.35. –P. 97–110.
 39. Farruggia P., Di Cataldo A., Pinto R.M., Palmisani E., Macaluso A., Valvo L. Lo, Cantarini M.E., Tornesello A., Corti P., Fioredda F., Varotto S., Martire B., Moroni I., Puccio G., Russo G., Dufour C., Pillon M. Pearson Syndrome: A Retrospective Cohort Study from the Marrow Failure Study Group of A.I.E.O.P. (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). // *JIMD Reports*. – 2016. –Vol.26. –P. 37–43.
 40. Fernández-Moreno M., Hermida-Gómez T., Gallardo M.E., Dalmao-Fernández A., Rego-Pérez I., Garesse R., Blanco F.J. Generating Rho-0 Cells Using Mesenchymal Stem Cell Lines. // *PLoS One*. – 2016. –Vol.11(10). –P. 1–23.
 41. Fiedorczuk K., Sazanov L. A. Mammalian Mitochondrial Complex I Structure and Disease-Causing Mutations. // *Trends Cell Biol*. 2018. –Vol.28(10). –P. 835–867.
 42. Folmes C.D., Martinez-Fernandez A, Perales-Clemente E, Li X, McDonald A, Oglesbee D, Hrstka SC, Perez-Terzic C, Terzic A, Nelson TJ. Disease-causing mitochondrial heteroplasmy segregated within induced pluripotent stem cell clones derived from a MELAS patient. // *Stem Cells*. – 2014. –Vol.31(7). –P. 1298–1308.
 43. Formichi P., Cardone N., Taglia I., Cardaioli E., Salvatore S., Gerfo A. Lo, Simoncini C., Montano V., Siciliano G., Mancuso M., Malandrini A., Federico A., Dotti M.T. Fibroblast growth factor 21 and growth differentiation factor 15 are sensitive biomarkers of mitochondrial diseases due to mitochondrial transfer-RNA mutations and mitochondrial DNA deletions. // *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* – 2020. –Vol.41(12). –P. 3653–3662.
 44. Frezza C. Mitochondrial metabolites: undercover signalling molecules. // *Interface Focus*. – 2017. –Vol.7(2). –P. 1–6.
 45. Friederich M.W., Perez F.A., Knight K.M., Van Hove R.A., Yang S.P., Saneto R.P., Van Hove J.L.K. Pathogenic variants in NUBPL result in failure to assemble the matrix

- arm of complex I and cause a complex leukoencephalopathy with thalamic involvement // *Mol. Genet. Metab.* – 2020. –Vol.129(3). –P. 236–242.
46. Gamrot Z., Adameczyk P., Świętochowska E., Roszkowska-Bjanid D., Gamrot J., Szczepańska M. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) in children and adolescents with chronic kidney disease. // *Physiol. Res.* – 2020. –Vol.69. –P. 451–460.
47. Garone C., Viscomi C. Towards a therapy for mitochondrial disease: an update // *Biochem. Soc. Trans.* – 2018. –Vol.46(5). –P. 1247–1261.
48. Garrido-Pérez N., Vela-Sebastián A., López-Gallardo E., Emperador S., Iglesias E., Meade P., Jiménez-Mallebrera C., Montoya J., Bayona-Bafaluy M.P., Ruiz-Pesini E. Oxidative Phosphorylation Dysfunction Modifies the Cell Secretome. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. –Vol.21(3374). –P. 1-16.
49. Giorgio V., Petronilli V., Ghelli A., Carelli V., Rugolo M., Lenaz G., Bernardi P. The effects of idebenone on mitochondrial bioenergetics. // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* – 2012. –Vol.1817(2). –P. 363–369.
50. Gnaiger E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control. An Introduction to OXPHOS Analysis. // Oroboros MiPNet Publications, Innsbruck. – 2014. – P. 1–80.
51. Gnaiger E. Polarographic Oxygen Sensors, the Oxygraph, and High-Resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function. // *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunct.* – 2008. –P. 325–352.
52. Gnaiger E. The Oxygraph for high-resolution respirometry. // *Mitochondr Physiol Network.* – 2001. –P. 1-18.
53. Goldstein A., Servidei S. Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-Like Episodes (MELAS). Diagnosis and Management of Mitochondrial Disorders. // Cham: Springer International Publishing, – 2019. –P. 81–100.
54. Gorman G.S., Chinnery P.F., DiMauro S., Hirano M., Koga Y., McFarland R., Suomalainen A., Thorburn D.R., Zeviani M., Turnbull D.M. Mitochondrial diseases. // *Nat. Rev. Dis. Prim.* – 2016. –Vol.2. –P. 1–23.
55. Gray L. R., Tompkins S. C., Taylor E. B. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. –Vol.71(14). –P. 2577–2604.
56. Grimm S. Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* – 2013. –Vol.1827(5). –P. 565–572.
57. Guo C., Sun L., Chen X., Zhang D. Oxidative stress, mitochondrial damage and

- neurodegenerative diseases. // *Neural Regen. Res.* – 2013. –Vol.8(21). –P. 2003–2014.
58. Haas R.H., Parikh S., Falk M.J., Saneto R.P., Wolf N.I., Darin N., Wong L.-J., Cohen B.H., Naviaux R.K. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. // *Mol. Genet. Metab.* – 2008. –Vol.94(1). –P. 16–37.
59. Haas R.H., Parikh S., Falk M.J., Saneto R.P., Wolf N.I., Darin N., Cohen B.H. Mitochondrial disease: a practical approach for primary care physicians. // *Pediatrics.* – 2007. –Vol.120(6). –P. 1326–1333.
60. Ham Y.R., Song C.H., Bae H.J., Jeong J.Y., Yeo M.-K., Cho, D.E., Na K.-R., Lee K.W. Growth Differentiation Factor-15 as a Predictor of Idiopathic Membranous Nephropathy Progression: A Retrospective Study. // *Dis. Markers.* –2018. –Vol.2018. –P. 1-9.
61. He J., Ford H.C., Carroll J., Douglas C., Gonzales E., Ding S., Fearnley I.M., Walker J.E. Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2018. –Vol.115(12). –P. 2988–2993.
62. Hertig D., Felser A., Diserens G., Kurth S., Vermathen P., Nuoffer J.M. Selective galactose culture condition reveals distinct metabolic signatures in pyruvate dehydrogenase and complex I deficient human skin fibroblasts. // *Metabolomics.* – 2019. –Vol.15(3). –P. 1–12.
63. Hutter E., Renner K., Pfister G., Stöckl P., Jansen-Dürr P., Gnaiger E. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. // *Biochem. J.* – 2004. –Vol.380(3). –P. 919–928.
64. Hütter E., Unterluggauer H., Garedew A., Jansen-Dürr P., Gnaiger E. High-resolution respirometry—a modern tool in aging research. // *Exp. Gerontol.* – 2006. –Vol.41(1). –P. 103–109.
65. Iakovenko E. V., Fedotova E. Y., Illarioshkin S. N. Progressive external ophthalmoplegia // *Russ. Neurol. J.* – 2019. –Vol.24(6). –P. 4–13.
66. Inak G., Lorenz C., Lisowski P., Zink A., Mlody B., Prigione A. Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cell-Based Drug Discovery for Mitochondrial Disease. // *Stem Cells.* – 2017. –Vol.35(7). –P. 1655–1662.
67. Invernizzi F., D’Amato I., Jensen P.B., Ravaglia S., Zeviani M., Tiranti V. Microscale oxygraphy reveals OXPHOS impairment in MRC mutant cells. // *Mitochondrion.* – 2012. –Vol.12(2). –P. 328–335.

68. Irwin C., Mienie L.J., Wevers R.A., Mason S., Westerhuis J.A., Van Reenen M., Reinecke C.J. GC-MS-based urinary organic acid profiling reveals multiple dysregulated metabolic pathways following experimental acute alcohol consumption. // *Sci. Rep.* – 2018. –Vol.8(1). –P.1–13.
69. Iyer S., Bergquist K., Young K., Gnaiger E., Rao R.R., Bennett Jr J.P. Mitochondrial gene therapy improves respiration, biogenesis, and transcription in G11778A Leber's hereditary optic neuropathy and T8993G Leigh's syndrome cells. // *Hum. Gene Ther.* – 2012. –Vol.23(6). –P.647–657.
70. Jackson C.B., Turnbull D.M., Minczuk M., Gammage P.A. Therapeutic Manipulation of mtDNA Heteroplasmy: A Shifting Perspective. // *Trends Mol. Med.* – 2020. –P.1–12.
71. Jodeiri Farshbaf M., Kiani-Esfahani A. Succinate dehydrogenase: Prospect for neurodegenerative diseases. // *Mitochondrion.* – 2018. –Vol.42. –P.77–83.
72. Kalko S.G., Paco S., Jou C., Rodríguez M.A., Meznaric M., Rogac M., Jekovec-Vrhovsek M., Sciacco M., Moggio M., Fagiolari G., De Paepe B., De Meirleir L., Ferrer I., Roig-Quilis M., Munell F., Montoya J., López-Gallardo E., Ruiz-Pesini E., Artuch R., Montero R., Torner F., Nascimento A., Ortez C., Colomer J., Jimenez-Mallebrera C. Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies. // *BMC genomics.* – 2014. –Vol.15. – P. 1-22.
73. Kappler L., Hoene M., Hu C., von Toerne C., Li J., Bleher D., Hoffmann C., Böhm A., Kollipara L., Zischka H., Königsrainer A., Häring H.U., Peter A., Xu G., Sickmann A., Hauck S.M., Weigert C., Lehmann R. Linking bioenergetic function of mitochondria to tissue-specific molecular fingerprints. // *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* – 2019. –Vol.317(2). –P. E374–E387.
74. Kim J.S., Kim S., Won C.W., Jeong K.H. Association between plasma levels of growth differentiation factor-15 and renal function in the elderly: Korean frailty and aging cohort study. // *Kidney Blood Press. Res.* – 2019. –Vol.44(3). –P.405–414.
75. Klaus S., Igual Gil C., Ost M. Regulation of diurnal energy balance by mitokines. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2021. –Vol.78(7). –P. 3369–3384.
76. Koene S., de Laat P., van Tienoven D.H., Weijers G., Vriens D., Sweep F.C.G.J.,

- Timmermans J., Kapusta L., Janssen M.C.H., Smeitink J.A.M. Serum GDF15 Levels Correlate to Mitochondrial Disease Severity and Myocardial Strain, but Not to Disease Progression in Adult m.3243A>G Carriers. // *JIMD Rep.* – 2015. –Vol.24. –P. 69–81.
77. Koga Y., Povalko N., Inoue E., Nashiki K., Tanaka M. Biomarkers and clinical rating scales for sodium pyruvate therapy in patients with mitochondrial disease. // *Mitochondrion.* – 2019. –Vol.48. –P. 11–15.
78. Konovalova S. Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in Cultured Human Cells using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunoblotting. // *JoVE.* – 2019. –Vol.144. –P. e59269.
79. Kremer L.S., Bader D.M., Mertes C., Kopajtich R., Pichler G., Iuso A., Haack T.B., Graf E., Schwarzmayr T., Terrile C., Koňářikova E., Repp B., Kastenmüller G., Adamski J., Lichtner P., Leonhardt C., Funalot B., Donati A., Tiranti V., Lombes A., Jardel C., Gläser D., Taylor R.W., Ghezzi D., Mayr J.A., Rötig A., Freisinger P., Distelmaier F., Strom T.M., Meitinger T., Gagneur J., Prokisch H. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. // *Nat. Commun.* – 2017. –Vol.8. –P. 1–11.
80. Kuszak A.J., Espey M.G., Falk M.J., Holmbeck M.A., Manfredi G., Shadel G.S., Vernon H.J., Zolkipli-Cunningham Z. Nutritional Interventions for Mitochondrial OXPHOS Deficiencies: Mechanisms and Model Systems. // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* – 2018. – Vol.13(1). – P.163–191.
81. Kuznetsov A. V., Veksler V., Gellerich F.N., Saks V., Margreiter R., Kunz W.S. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. // *Nat. Protoc.* – 2008. –Vol.3(6). –P. 965–976.
82. Larsen S., Nielsen J., Hansen C.N., Nielsen L.B., Wibrand F., Stride N., Schroder H.D., Boushel R., Helge J.W., Dela F., Hey-Mogensen M. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. // *J. Physiol.* – 2012. –Vol.590(14). –P. 3349–3360.
83. Lee H.F., Lee H.J., Chi C.S., Tsai C.R., Chang T.K., Wang C.J. The neurological evolution of Pearson syndrome: Case report and literature review. // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* – 2007. –Vol.11(4). –P.208–214.
84. Lefeverre M.F., De Sagher R.M., Declerck D.H., Van Bocxlaer J.F., De Leenheer A.P. Metabolic profiling of urinary organic acids by single and multicolumn capillary gas

- chromatography. // *J. Chromatogr. Sci.* – 1989. –Vol.27(1). –P. 23–29.
85. Lehtonen J.M., Auranen M., Darin N., Sofou K., Bindoff L., Hikmat O., Uusimaa J., Vieira P., Tulinius M., Lönnqvist T., de Coo I.F., Suomalainen A., Isohanni P. Diagnostic value of serum biomarkers FGF21 and GDF15 compared to muscle sample in mitochondrial disease. // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2021. –Vol.44(2). – P. 469–480.
86. Lehtonen J.M., Forsström S., Bottani E., Viscomi C., Baris O.R., Isoniemi H., Höckerstedt K., Österlund P., Hurme M., Jylhävä J., Leppä S., Markkula R., Heliö T., Mombelli G., Uusimaa J., Laaksonen R., Laaksovirta H., Auranen M., Zeviani M., Smeitink J., Wiesner R.J., Nakada K., Isohanni P., Suomalainen A. FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. // *Neurology.* – 2016. –Vol.87(22). –P. 2290–2299.
87. Li H., Sun H., Qian B., Feng W., Carney D., Miller J., Hogan M.C. V., Wang L. Increased Expression of FGF-21 Negatively Affects Bone Homeostasis in Dystrophin/Utrophin Double Knockout Mice. // *J. Bone Miner. Res.* – 2020. – Vol.35(4). –P. 738–752.
88. Li H., Uittenbogaard M., Hao, L., Chiaramello A. Clinical Insights into Mitochondrial Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders: Their Biosignatures from Mass Spectrometry-Based Metabolomics. // *Metabolites.* – 2021. –Vol.11(233). – P. 1-24.
89. Liang C., Ahmad K., Sue C. M. The broadening spectrum of mitochondrial disease: Shifts in the diagnostic paradigm. // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* – 2014. – Vol.1840(4). –P. 1360–1367.
90. Lippe G., Coluccino G., Zancani M., Baratta W., Crusiz P. Mitochondrial F-ATP Synthase and Its Transition into an Energy-Dissipating Molecular Machine. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2019. –Vol.2019. –P. 1–10.
91. Ma H., Folmes C.D.L., Wu J., Morey R., Mora-Castilla S., Ocampo A., Ma L., Poulton J., Wang X., Ahmed R., Kang E., Lee Y., Hayama T., Li Y., Van Dyken C., Gutierrez N.M., Tippner-Hedges R., Koski A., Mitalipov N., Amato P., Wolf D.P., Huang T., Terzic A., Laurent L.C., Izpisua Belmonte J.C., Mitalipov S. Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. // *Nature.* – 2015. – Vol.524(7564). –P. 234–238.
92. Makrecka-Kuka M., Krumschnabel G., Gnaiger E. High-Resolution Respirometry for

- Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. // *Biomolecules*. – 2015. –Vol.5(3). – P. 1319–1338.
93. Maldonado E.M., Taha F., Rahman J., Rahman S. Systems Biology Approaches Toward Understanding Primary Mitochondrial Diseases. // *Front. Genet.* – 2019. – Vol.10. – P. 1–16.
94. Manoli I., Sysol J.R., Epping M.W., Li L., Wang C., Sloan J.L., Pass A., Gagné J., Ktena Y.P., Li Lingli, Trivedi N.S., Ouattara B., Zerfas P.M., Hoffmann V., Abu-Asab M., Tsokos M.G., Kleiner D.E., Garone C., Cusmano-Ozog K., Enns G.M., Vernon H.J., Andersson H.C., Grunewald S., Elkahloun A.G., Girard C.L., Schnermann J., DiMauro S., Andres-Mateos E., Vandenberghe L.H., Chandler R.J., Venditti C.P. FGF21 underlies a hormetic response to metabolic stress in methylmalonic acidemia. // *JCI insight*. – 2018. –Vol.3(23). –P. 1–16.
95. Maresca A., Dotto V. Del, Romagnoli M., Morgia C. La, Vito L. Di, Capristo M., Valentino M.L., Carelli V., Group E.S. Expanding and validating the biomarkers for mitochondrial diseases. // *J. Mol. Med. (Berl)*. – 2020. –Vol.98(10). –P. 1467–1478.
96. Martínez-Reyes I., Chandel N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. // *Nat. Commun.* – 2020. –Vol.11(1). –P. 1–11.
97. Mats S. J., Cortez D. Pearson marrow-pancreas syndrome with cardiac conduction abnormality necessitating prophylactic pacemaker implantation. // *Ann. Noninvasive Electrocardiol.* – 2020. –Vol.25(1). –P. 1–4.
98. Mayr J.A., Haack T.B., Freisinger P., Karall D., Makowski C., Koch J., Feichtinger R.G., Zimmermann F.A., Rolinski B., Ahting U., Meitinger T., Prokisch H., Sperl W. Spectrum of combined respiratory chain defects. // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2015. – Vol.38(4). –P. 629–640.
99. McMillan R.P., Stewart S., Budnick J.A., Caswell C.C., Hulver M.W., Mukherjee K., Srivastava S. Quantitative Variation in m.3243A > G Mutation Produce Discrete Changes in Energy Metabolism. // *Sci. Rep.* – 2019. –Vol.9(1). –P. 1–11.
100. Melvin A., Lacerda E., Dockrell H.M., O’Rahilly S., Nacul L. Circulating levels of GDF15 in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. // *J. Transl. Med.* – 2019. –Vol.17(409). –P. 1-11.
101. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.

- // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* – 2011. –Vol.1807(12). –P. 1507–1538.
102. Mok B.Y., de Moraes M.H., Zeng J., Bosch D.E., Kotrys A. V, Raguram A., Hsu F., Radey M.C., Peterson S.B., Mootha V.K. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing. // *Nature.* – 2020. –Vol.583(7817). –P. 631–637.
103. Molema F., Jacobs E.H., Onkenhout W., Schoonderwoerd G.C., Langendonk J.G., Williams M. Fibroblast growth factor 21 as a biomarker for long-term complications in organic acidemias. // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2018. –Vol.41(6). –P. 1179–1187.
104. Montero R., Yubero D., Villarroya J., Henares D., Jou C., Rodríguez M.A., Ramos F., Nascimento A., Ortez C.I., Campistol J., Perez-Dueñas B., O’Callaghan M., Pineda M., Garcia-Cazorla A., Oferil J.C., Montoya J., Ruiz-Pesini E., Emperador S., Mezmaric M., Campderros L., Kalko S.G., Villarroya F., Artuch R., Jimenez-Mallebrera C. GDF-15 is elevated in children with mitochondrial diseases and is induced by mitochondrial dysfunction. // *PLoS One.* – 2016. –Vol.11(2). –P. 1–15.
105. Morovat A., Weerasinghe G., Nesbitt V., Hofer M., Agnew T., Quaghebeur G., Sergeant K., Fratter C., Guha N., Mirzazadeh M., Poulton J. Use of FGF-21 as a Biomarker of Mitochondrial Disease in Clinical Practice. // *J. Clin. Med.* – 2017. – Vol.6(80). –P. 1-14.
106. Morvan D., Demidem A. NMR metabolomics of fibroblasts with inherited mitochondrial Complex I mutation reveals treatment-reversible lipid and amino acid metabolism alterations. // *Metabolomics.* – 2018. –Vol.14(55). –P. 1-10.
107. Mukherjee S., Ghosh A. Molecular mechanism of mitochondrial respiratory chain assembly and its relation to mitochondrial diseases. // *Mitochondrion.* – 2020. –Vol.53. –P. 1–20.
108. Ni Y., Hagrais M., Konstantopoulou V., Mayr J., Stuchebrukhov A., Meierhofer D. Mutations in *NDUFS1* Cause Metabolic Reprogramming and Disruption of the Electron Transfer. // *Cells.* – 2019. –Vol.8(1149). –P. 1-22
109. Nishino I., Komatsu M., Kodama S., Horai S., Nonaka I., Goto Y. The 3260 mutation in mitochondrial DNA can cause mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS). // *Muscle Nerve.* – 1996. –Vol.19(12). – P. 1603–1604.
110. Nissanka N., Minczuk M., Moraes C. T. Mechanisms of Mitochondrial DNA

- Deletion Formation. // *Trends Genet.* – 2019. –Vol.35(3). –P. 235–244.
111. Nissanka N., Moraes C. T. Mitochondrial DNA heteroplasmy in disease and targeted nuclease-based therapeutic approaches. // *EMBO Rep.* – 2020. –Vol.21. –P. 1-13.
112. Niyazov D. M., Kahler S. G., Frye R. E. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. // *Mol. Syndromol.* – 2016. –Vol.7(3). –P. 122–137.
113. Nohara S., Ishii A., Yamamoto F., Yanagiha K., Moriyama T., Tozaka N., Miyake Z., Yatsuga S., Koga Y., Hosaka T., Terada M., Yamaguchi T., Aizawa S., Mamada N., Tsuji H., Tomidokoro Y., Nakamagoe K., Ishii K., Watanabe M., Tamaoka A. GDF-15, a mitochondrial disease biomarker, is associated with the severity of multiple sclerosis. // *J. Neurol. Sci.* – 2019. –Vol.405. –P. 1-5.
114. Nyhan W. L., Al-Aqeel A. I., Barshop B. A. Introduction to lactic acidemias. // *Atlas of Inherited Metabolic Diseases.*: CRC Press. – 2020. –P. 353–363.
115. Ogawa E., Shimura M., Fushimi T., Tajika M., Ichimoto K., Matsunaga A., Tsuruoka T., Ishige M., Fuchigami T., Yamazaki T., Mori M., Kohda M., Kishita Y., Okazaki Y., Takahashi S., Ohtake A., Murayama K. Clinical validity of biochemical and molecular analysis in diagnosing Leigh syndrome: a study of 106 Japanese patients. // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2017. –Vol.40(5). –P. 685–693.
116. Opalińska M., Jańska H. AAA Proteases: Guardians of Mitochondrial Function and Homeostasis. // *Cells.* – 2018. –Vol.7(163). –P. 1-15.
117. Paepe B. De, Coster R. Van. A Critical Assessment of the Therapeutic Potential of Resveratrol Supplements for Treating Mitochondrial Disorders. // *Nutrients.* – 2017. – Vol.9(9). –P. 1-10.
118. Palmfeldt J., Bross P. Proteomics of human mitochondria. // *Mitochondrion.* – 2017. –Vol.33. –P. 2–14.
119. Parikh S. Kearns–Sayre Syndrome. // Boston: Academic Press. – 2016. –P. 43–47.
120. Parikh S., Goldstein A., Karaa A., Koenig M.K., Anselm I., Brunel-Guitton C., Christodoulou J., Cohen B.H., Dimmock D., Enns G.M., Falk M.J., Feigenbaum A., Frye R.E., Ganesh J., Griesemer D., Haas R., Horvath R., Korson M., Kruer M.C., Mancuso M., McCormack S., Raboisson M.J., Reimschisel T., Salvarinova R., Saneto R.P., Scaglia F., Shoffner J., Stacpoole P.W., Sue C.M., Tarnopolsky M., Van Karnebeek C., Wolfe L.A., Cunningham Z.Z., Rahman S., Chinnery P.F. Patient care

- standards for primary mitochondrial disease: a consensus statement from the Mitochondrial Medicine Society. // *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. – 2017. –Vol.12 (19). –P. 1–18.
121. Parikh S., Karaa A., Goldstein A., Bertini E.S., Chinnery P.F., Christodoulou J., Cohen B.H., Davis R.L., Falk M.J., Fratter C., Horvath R., Koenig M.K., Mancuso M., McCormack S., McCormick E.M., McFarland R., Nesbitt V., Schiff M., Steele H., Stockler S., Sue C., Tarnopolsky M., Thorburn D.R., Vockley J., Rahman S. Diagnosis of ‘possible’ mitochondrial disease: an existential crisis. // *J. Med. Genet.* – 2019. – Vol.56(3). –P. 123–130.
122. Patel K.P., O’Brien T.W., Subramony S.H., Shuster J., Stacpoole P.W. The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients. // *Mol. Genet. Metab.* – 2012. –Vol.105(1). –P. 34–43.
123. Pesta D., Gnaiger E. High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols*. // Totowa, NJ: Humana Press. – 2012. –P. 25–58.
124. Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2019. –Vol.20(5). –P. 267–284.
125. Piekutowska-Abramczuk D., Magner M., Popowska E., Pronicki M., Karczmarewicz E., Sykut-Cegielska J., Kmiec T., Jurkiewicz E., Szymanska-Debinska T., Bielecka L., Krajewska-Walasek M., Vesela K., Zeman J., Pronicka E. SURF1 missense mutations promote a mild Leigh phenotype. // *Clin. Genet.* – 2009. –Vol.76(2). –P. 195–204.
126. Pirinen E., Auranen M., Khan N.A., Brillhante V., Urho N., Pessia A., Hakkarainen A., Kuula J., Heinonen U., Schmidt M.S., Haimilahti K., Piirilä P., Lundbom N., Taskinen M.-R., Brenner C., Velagapudi V., Pietiläinen K.H., Suomalainen A. Niacin Cures Systemic NAD⁺ Deficiency and Improves Muscle Performance in Adult-Onset Mitochondrial Myopathy. // *Cell Metab.* – 2020. –Vol.31(6). –P. 1078–1090.
127. Prigione A. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) for Modeling Mitochondrial DNA Disorders. *Mitochondrial Medicine: Volume II, Manipulating Mitochondrial Function*. // New York, NY: Springer New York. – 2015. –P. 349–356.
128. Protasoni M., Zeviani M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. –Vol.22(586). –P. 1–53.

129. Rahman J., Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. // *Lancet*. – 2018. – Vol.391(10139). –P. 2560–2574.
130. Rahman J., Rahman S. The utility of phenomics in diagnosis of inherited metabolic disorders. // *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians London*. – 2019. –Vol.19(1). –P. 30–36.
131. Rahman S. Mitochondrial disease in children. // *J. Intern. Med*. – 2020. –Vol.287(6). –P. 609–633.
132. Ramsay R. R. Electron carriers and energy conservation in mitochondrial respiration. // *ChemTexts*. – 2019. –Vol.5(2). –P. 1–14.
133. Reihani N., Arlet J.B., Dussiot M., De Villemeur T.B., Belmatoug N., Rose, C., Colin-Aronovicz Y., Hermine O., Le Van Kim C., Franco M. Unexpected macrophage-independent dyserythropoiesis in gaucher disease. // *Haematologica*. – 2016. –Vol.101(12). –P. 1489–1498.
134. Reinecke C.J., Koekemoer G., van der Westhuizen F.H., Louw R., Lindeque J.Z., Mienie L.J., Smuts I. Metabolomics of urinary organic acids in respiratory chain deficiencies in children. // *Metabolomics*. – 2012. –Vol.8(2). –P. 264–283.
135. Ribas F., Villarroya, J., Elayne H., Giralt M., Villarroya F. FGF21 expression and release in muscle cells: Involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. // *Biochem. J*. – 2014. –Vol.463(2). –P. 191–199.
136. Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. // *Cancer Res*. – 2017. –Vol.77(21). –P. 31–34.
137. Russell O.M., Gorman G.S., Lightowlers R.N., Turnbull D.M. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. // *Cell*. – 2020. –Vol.181(1). –P. 168–188.
138. Ruzzenente B., Rötig A., Metodiev M. D. Mouse models for mitochondrial diseases. // *Hum. Mol. Genet*. – 2016. –Vol.25(R2). –P. R115–R122.
139. Schaefer A., Lim A., Gorman G. Epidemiology of Mitochondrial Disease. *BT- Diagnosis and Management of Mitochondrial Disorders*. // Cham: Springer International Publishing. – 2019. –P. 63–79.
140. Scholle L.M., Lehmann D., Deschauer M., Kraya T., Zierz S. FGF-21 as a potential biomarker for mitochondrial diseases. // *Curr. Med. Chem*. – 2018. –Vol.25. –P. 2070–2081.
141. Schon K.R., Ratnaike T., van den Ameele J., Horvath R., Chinnery P.F.

- Mitochondrial Diseases: A Diagnostic Revolution. // *Trends Genet.* – 2020. –P. 1–16.
142. Schöpf B., Weissensteiner H., Schäfer G., Fazzini F., Charoentong P., Naschberger A., Rupp B., Fendt L., Bukur V., Giese I., Sorn P., Sant'Anna-Silva A.C., Iglesias-Gonzalez J., Sahin U., Kronenberg F., Gnaiger E., Klocker H. OXPHOS remodeling in high-grade prostate cancer involves mtDNA mutations and increased succinate oxidation. // *Nat. Commun.* – 2020. –Vol.11(1). –P. 1–16.
143. Semeraro M., Boenzi S., Carrozzo R., Diodato D., Martinelli D., Olivieri G., Antonetti G., Sacchetti E., Catesini G., Rizzo C., Dionisi-Vici C. The urinary organic acids profile in single large-scale mitochondrial DNA deletion disorders. // *Clin. Chim. Acta.* 2018. –Vol.481. – 2017. –P. 156–160.
144. Signes A., Fernandez-Vizarra E. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I–V and supercomplexes. // *Essays Biochem.* – 2018. –Vol.62(3). –P. 255–270.
145. Sousa J. S., D'Imprima E., Vonck J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. // *Subcell. Biochem.* – 2018. –Vol.87. –P. 167–227.
146. Spinelli J. B., Haigis M. C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. // *Nat. Cell Biol.* – 2018. –Vol.20(7). –P. 745–754.
147. Spruijt L., Kolbach D.N., De Coo R.F., Plomp A.S., Bauer N.J., Smeets H.J., De Die-Smulders C.E.M. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. // *Am. J. Ophthalmol.* – 2006. –Vol.141(4). –P. 676–682.
148. Stefano G. B., Kream R. M. Mitochondrial DNA heteroplasmy in human health and disease. // *Biomed. Reports.* – 2016. –Vol.4(3). –P. 259–262.
149. Stojanovic V., Ihle S. Role of beta-hydroxybutyric acid in diabetic ketoacidosis: a review. // *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* – 2011. –Vol.52(4). –P. 426–430.
150. Suomalainen A., Elo J.M., Pietiläinen K.H., Hakonen A.H., Sevastianova K., Korpela M., Isohanni P., Marjavaara S.K., Tyni T., Kiuru-Enari S., Pihko H., Darin N., Öunap K., Kluijtmans L.A.J., Paetau A., Buzkova J., Bindoff L.A., Annunen-Rasila J., Uusimaa J., Rissanen A., Yki-Järvinen H., Hirano M., Tulinius M., Smeitink J., Tynysmaa H. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. // *Lancet. Neurol.* – 2011. –Vol.10(9). –P. 806–818.
151. Tebbenkamp A.T.N., Varela L., Choi J., Paredes M.I., Giani A.M., Song J.E., Sestan-

- Pesa M., Franjic D., Sousa A.M.M., Liu Z.W., Li M., Bichsel C., Koch M., Szigeti-Buck K., Liu F., Li Z., Kawasaki Y.I., Paspalas C.D., Mineur Y.S., Prontera P., Merla G., Picciotto M.R., Arnsten A.F.T., Horvath T.L., Sestan N. The 7q11.23 Protein DNAJC30 Interacts with ATP Synthase and Links Mitochondria to Brain Development. // *Cell*. – 2018. –Vol.175(4). –P. 1088- 1104.
152. Thompson Legault J., Strittmatter L., Tardif J., Sharma R., Tremblay-Vaillancourt V., Aubut C., Boucher G., Clish C.B., Cyr D., Daneault C., Waters P.J., Morin C., Laprise C., Rioux J.D., Mootha V.K., Des Rosiers C. A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. // *Cell Rep*. – 2015. –Vol.13(5). –P. 981–989.
153. Tsoukalas D., Fragoulakis V., Papakonstantinou E., Antonaki M., Vozikis A., Tsatsakis A., Buga A.M., Mitroi M., Calina D. Prediction of Autoimmune Diseases by Targeted Metabolomic Assay of Urinary Organic Acids. // *Metabolites*. – 2020. – Vol.10(12). –P. 1–20.
154. Tucker B., Li H., Long X., Rye K.A., Ong K.L. Fibroblast growth factor 21 in non-alcoholic fatty liver disease. // *Metabolism*. – 2019. –Vol.101. –P. 1–11.
155. Uittenbogaard M., Chiaramello A. Mitochondrial Respiratory Disorders: A Perspective on their Metabolite Biomarkers and Implications for Clinical Diagnosis and Therapeutic Intervention. // *Biochem Mol Biol J*. – 2015. Vol.1(1). –P.1–7.
156. Vinogradov A. D. New Perspective on the Reversibility of ATP Synthesis and Hydrolysis by Fo·F1-ATP Synthase (Hydrolase). // *Biochem*. – 2019. –Vol.84(11). – P. 1247–1255.
157. Vinothkumar K. R., Zhu J., Hirst J. Architecture of mammalian respiratory complex I. // *Nature*. – 2014. –Vol.515(7525). –P. 80–84.
158. Wagner M., Berutti R., Lorenz-Depiereux B., Graf E., Eckstein G., Mayr J.A., Meitinger T., Ahting U., Prokisch H., Strom T.M., Wortmann S.B. Mitochondrial DNA mutation analysis from exome sequencing—A more holistic approach in diagnostics of suspected mitochondrial disease. // *J Inherit Metab Dis*. – 2019 Vol.42(5). P. 909–17.
159. Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. // *Nucleic Acids Res*. – 2010. – Vol.38(16). –P. 1–7.

160. Weissig V. Drug Development for the Therapy of Mitochondrial Diseases. // Trends Mol. Med. – 2020. –Vol.26(1). –P. 40–57.
161. Wortmann S.B., Mayr J.A., Nuoffer J.M., Prokisch H., Sperl W. A Guideline for the Diagnosis of Pediatric Mitochondrial Disease: The Value of Muscle and Skin Biopsies in the Genetics Era. // Neuropediatrics. – 2017. –Vol.48(4). –P. 309–314.
162. Wu L., Pan Q., Wu G., Qian L., Zhang J., Zhang L., Fang Q., Zang G., Wang Y., Lau G., Li H., Jia W. Diverse Changes of Circulating Fibroblast Growth Factor 21 Levels in Hepatitis B Virus-Related Diseases. // Sci. Rep. – 2017. –Vol.7(1). –P. 1–9.
163. Ye F., Hoppel C. L. Measuring oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. // Anal. Biochem. – 2013. –Vol.437(1). –P. 52–58.
164. Zhang L., Zhang Z., Khan A., Zheng H., Yuan C., Jiang H. Advances in drug therapy for mitochondrial diseases. // Ann. Transl. Med. –2020. –Vol.8(1). –P. 1–10.
165. Zhang M., Sun W., Qian J., Tang Y. Fasting exacerbates hepatic growth differentiation factor 15 to promote fatty acid β -oxidation and ketogenesis via activating XBP1 signaling in liver. // Redox Biol. – 2018. –Vol.16. –P. 87–96.
166. Zhang Y., Tian Z., Yuan J., Liu C., Liu H.L., Ma S.Q., Li B. The Progress of Gene Therapy for Leber's Optic Hereditary Neuropathy. // Curr. Gene Ther. – 2017. – Vol.17(4). –P. 320–326.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Выборка пациентов для анализа уровня органических кислот в моче методом ГХ-МС

№	Возраст	Пол	Ген	Вариант нуклеотидной последовательности	Изменения аминокислотной последовательности	Диагноз
П1	2 м.	Ж	"-"	Делеция 4500 п.н. в моче и крови в гомоплазмии	"-"	Синдром Пирсона
П2	10 л.	М	"-"	Делеция 4977 п.н. только в моче в гомоплазмии	"-"	KSS
П3	1 г.	Ж	<i>MT-ND6</i>	m.14487T>C в гомоплазмии в крови и моче	p.[Met63Val]	Синдром Ли
П4	9 м.	Ж	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G гомоплазмия в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П5	4 г.	Ж	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>C гомоплазмия в крови	p.[Leu156Pro]	Синдром Ли
П6	4 м.	Ж	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G гомоплазмия в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П7	13 л.	М	"-"	Делеция 4977 п.н. только в моче в гомоплазмии	"-"	KSS
П8	2 г.	Ж	"-"	Делеция 5 т.п.н. в 50% гетероплазмии в крови	"-"	Синдром Пирсона
П9	12 л.	Ж	"-"	Делеция 4977 п.н. в гомоплазмии в крови и в моче	"-"	Синдром Пирсона
П10	1 г.	Ж	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[Glu140Lys]; [Glu140Lys]	Недостаточность КДЦМ IV
П12	5 м.	Ж	"-"	Делеция 5 т.п.н. в 95% гетероплазмии в крови	"-"	Синдром Пирсона

П13	10 л.	М	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A гомоплазмия в крови и в моче	p.[Asp393Asn]	Синдром Ли
П14	2 г.	Ж	<i>MT-ND6</i>	m.14487T>C 80% гетероплазмия в крови	p.[Met63Val]	Синдром Ли
П15	5 м.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693 c.[2243G>C];[2639C>A]	p.[Trp748Ser];[Ala880Asp]	Синдром Альперса
П16	1 г.	Ж	<i>TK2</i>	NM_004614: c.[547C>T];[547C>T]	p.[Arg183Trp];[Arg183Trp]	Синдром истощения мтДНК
П17	1 г.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[688C>T]; [845del2]	p.[Arg230X];[Ser282fs]	Синдром Ли
П19	1 г.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693: c.[1399G>A];[2665G>C]	p.[Ala467Thr]; [Ala889Pro]	Синдром Альперса
П21	1 г.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693.2: c.[2243G>C];[75G>A]	p.[Trp748Ser];[Trp25Ter]	Синдром Альперса
П22	8 м.	Ж	"-"	Делеция около 5 т.п.н.в гомоплазмии в крови и в моче	"-"	Синдром Пирсона
П23	6 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693 c.[2243G>C];[3630C>A]	p.[Trp748Ser];[Tyr1210X]	Синдром Альперса
П24	2 г.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[584G>A]	p.[Ser282Cysfs*9];[Gly195Asp]	Синдром Ли
П25	1 г.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT]; [752-2A>G]	p.[Ser282Cysfs*9];[?]	Синдром Ли
П26	8 м.	Ж	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[16_17ins19];[?]	p.[Arg6Qfs*82]; [?]	Недостаточность КДЦМ IV
П27	11 м.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[Glu140Lys]; [Glu140Lys]	Недостаточность КДЦМ IV
П28	31 г.	Ж	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G гетероплазмия 24% в крови, 74% в моче	"-"	MELAS синдром

П30	10 м.	М	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G гомоплазмия кровь	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П31	9 л.	Ж	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3260A>G гетероплазмия 64% в крови, гомоплазмия в моче	"-"	Митохондриальная миопатия, кардиомиопатия, высокий лактат-ацидоз
П32	6 л.	Ж	<i>NDUFS4</i>	NM_002495: c.[511A>G]; [c.350+6T>C]	p.[Arg171Gly]; [?]	Синдром Ли
П33	5 л.	Ж	"-"	Делеция 4000 п.н. в гомоплазмии в моче	"-"	Синдром Пирсона/KSS
П34	6 м.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138.2: c.[418G>A];[512G>A]	p.[Glu140Lys];[Arg171Gln]	Недостаточность КДЦМ IV
П35	7 м.	Ж	"-"	Делеция 4977 п.н. в гомоплазмии в крови	"-"	Синдром Пирсона
П36	1 г.	М	<i>MT-ND3</i>	m.10197G>A гомоплазмия в крови	p.[Ala47Thr]	Синдром Ли
П37	2 г.	Ж	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A в 50% гетероплазмии в крови, гомоплазмия в моче	p.[Asp393Asn]	Синдром Ли
П38	1 г.	Ж	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[845_846delCT]	p.[Ser282Cysfs*9];[Ser282Cysfs*9]	Синдром Ли
П39	31 г.	Ж	"-"	Делеция 4000 п.н. гомоплазмия в моче	"-"	KSS
П40	4 г.	М	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A в 85% гетероплазмии в крови	p.[Asp393Asn]	Синдром Ли
П41	1 г.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[845_846delCT]	p.[Ser282Cysfs*9];[Ser282Cysfs*9]	Синдром Ли
П42	10 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693:c.[2310C>A];[961_962insGGGCAAA CACA]	p.[Phe770Leu];[p.Lys321fs]	Синдром деплеции мтДНК

П43	1 г.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в гомоплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
П44	2 г.	М	<i>TWNK</i>	NM_021830: c.[1196A>G];[1523A>G]	p.[Asn399Ser]; [Tyr508Cys]	Синдром истощения мтДНК
П45	1 г.	Ж	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[845_846delCT]	p.[Ser282Cysfs*9];.[Ser282Cysfs*9]	Синдром Ли
П46	4 г.	М	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П47	11 л.	Ж	<i>tRNA Phe</i>	m.641A>T 20% гетероплазмии в крови	"-"	Эпилептическая энцефалопатия
П48	8 л.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT]; [187C>T]	p.[Ser282Cysfs*9];[Gln63*]	Синдром Ли
П49	1 г.	Ж	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П50	1 г.	М	<i>TWNK</i>	NM_021830: c.[1199G>T];[1628G>A]	p.[Arg400Leu];[Arg543Gln]	Синдром истощения мтДНК
П51	4 г.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[Glu140Lys]; [Glu140Lys]	Недостаточность КДЦМ IV
П52	1 г.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[752-1G>C]	p.[Ser282Cysfs*9];[?]	Синдром Ли
П53	6 м.	М	<i>MT-ND3</i>	m.10197G>A в гомоплазмии в крови	p.[Ala47Thr]	Синдром Ли
П54	9 м.	М	<i>DGUOK</i>	NM_080916.2: c.[3G>A];[592_595del]	p.[Met1Ile];[Val198fs]	Синдром истощения мтДНК
П55	1 г.	Ж	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A в 50% гетероплазмии в крови	p.[Asp393Asn]	Синдром Ли
П57	1 г.	М	<i>TWNK</i>	NM_021830.4: c.[574C>T];[938G>A]	p.[Arg192Cys];[Arg313Gln]	Синдром истощения мтДНК
П58	9 м.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[Glu140Lys]; [Glu140Lys]	Недостаточность КДЦМ IV

П59	1 г.	Ж	<i>DGUOK</i>	NM_080916: c.[3G>A];[821_822insAAAG]	p.[Met1Ile];[Val274fs]	Синдром истощения мтДНК
П61	6 л.	Ж	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[312_321delTCTGCCAGCCinsAT];[?]	"-"	Синдром Ли
П62	2 м.	Ж	<i>NDUFV1</i>	NM_007103.3: c.[475C>T];[632C>T]	p.[Arg159X];[Ala211Val]	Синдром Ли
П63	8 л.	Ж	<i>MT-ND1</i>	m.3308T>G в гомоплазмии в крови	p.[Met1*]	Синдром Ли
П64	6 м.	Ж	<i>NDUFS2</i>	NM_004550: c.[245T>A];[412C>T]	p.[Leu82Gln];[Arg138Trp]	Синдром Ли
П65	9 м.	Ж	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П66	3 г.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693: c.[2591A>G];[c.3649G>C]	p.[Asn864Ser];[p.Ala1217Pro]	Синдром Альперса
П67	12 л.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G 50% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
П68	4 г.	М	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>C в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Pro]	Синдром Ли
П69	1 м.	М	<i>DGUOK</i>	NM_080916.2: c. [3G>A]; [c.143-4311_255+4397del8820]	p.[Met1Ile];[Ala48Glyfs*43]	Синдром истощения мтДНК
П70	4 м.	М	<i>TWNK</i>	NM_021830: c.[1232C>T];[1523A>G]	p.[Thr411Met]; [Tyr508Cys]	Синдром истощения мтДНК
П71	24 г.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 90% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
П72	7 м.	Ж	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[Glu140Lys]; [Glu140Lys]	Недостаточность КДЦМ IV

П73	6 м.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[Glu140Lys]; [Glu140Lys]	Недостаточность КДЦМ IV
П74	4 м.	Ж	<i>RRM2B</i>	NM_015713: c.[649C>G];[649C>G]	p.[Leu217Val];[Leu217Val]	Синдром деплеции мтДНК
П76	2 м.	Ж	<i>DGUOK</i>	NM_080916: c.[3G>A];[3G>A]	p.[Met1Ile];[Met1Ile]	Синдром истощения мтДНК
П77	3 г.	Ж	<i>MT-ND6</i>	m.14459G>A в гомоплазмии в крови	p.[Ala72Val]	Синдром Ли
П78	1 г.	Ж	<i>MT-ND1</i>	m.3697G>A в гомоплазмии в крови	p.[Gly131Ser]	Синдром Ли
П79	7 м.	Ж	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A в гомоплазмии в крови	p.[Asp393Asn]	Синдром Ли
П80	3 м.	Ж	<i>SCO2</i>	NM_005138:c.[227_230del];[418G>A]	p.[Leu76fs];[Glu140Lys]	Недостаточность КДЦМ IV
П81	1 г.	Ж	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[533C>T];[418G>A]	p.[Ala178Val];[Glu140Lys]	Недостаточность КДЦМ IV
П82	8 м.	М	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A в 76% гетероплазмии в крови	p.[Asp393Asn]	Синдром Ли
П83	25 л.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 88% гетероплазмии в моче и в 31% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
П84	11 л.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в гомоплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
П86	4 м.	М	<i>DGUOK</i>	NM_080916: c.[235C>T];[410T>A]	p.[Gln79*];[Val137Glu]	Синдром истощения мтДНК
П87	5 м.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[16_17ins19]	p.[Glu140Lys]; [Arg6Qfs*82]	Недостаточность КДЦМ IV
П88	7 м.	Ж	<i>FBXL4</i>	NM_012160: c.[627_633del];[1694A>G]	p.[Val209fs];[Asp565Gly]	Синдром истощения мтДНК

П94	10 л.	Ж	"-"	Делеция 7000 п.н. в 50% гетероплазмии в крови и в 80% гетероплазмии в моче	"-"	KSS
П95	4 г.	М	<i>NUBPL</i>	NM_025152: с.[815-27T>C];[1A>T]	р.[p.Met1Leu];[?]	Недостаточность КДЦМ I
П96	10 л.	Ж	<i>SUCLG1</i>	NM_003849.3:с.[665T>C];[665T>C]	р.[L222S];[L222S]	Синдром истощения мтДНК
П97	1 г.	Ж	<i>COX10</i>	NM_001303: с.[1037C>T];[1037C>T]	р.[S346L];.[S346L]	Недостаточность КДЦМ IV

Приложение 2

Выборка пациентов для анализа методом высокоразрешающей респирометрии. И-интактный протокол, П-пермеабилizованный протокол.

№	Ген	Мутация	Регион	Пол	Клинический диагноз	Возраст	Протокол
P2	<i>MT-ND3</i>	m.10158T>C, 30% гетероплазмия в крови	КДЦМ I	Ж	MELAS	24 л.	И, П
M1	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	20 л.	И, П
M2	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	28 л.	И
M3	<i>MT-ND1</i>	m.3635G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	31 л.	И
P6	<i>MT-ND6</i>	m.14484T>C, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	20 л.	И
П60	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	26 л.	И
M6	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	22 г.	И, П
P46	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	28 л.	И, П
P8	<i>MT-ND1</i>	m.3472T>C, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	19л.	И
M9	<i>DNAJC30</i>	NM_032317: c.152A>G в гомозиготном состоянии	КДЦМ I	М	НОНЛ	20 л.	И, П

M10	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	31 г.	И, П
M11	<i>DNAJC30</i>	NM_032317: c.152A>G в гомозиготном состоянии	КДЦМ I	М	НОНЛ	22 г.	И, П
П47	<i>MT-TF</i>	m.641A>T, 20% гетероплазмия в крови	тРНК Phe	Ж	Эпилептическая энцефалопатия	11 л.	И, П
P48	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	24 г.	И, П
M12	<i>MT-ND6</i>	m.14597A>G, 25% гетероплазмия в крови	КДЦМ I	Ж	НОНЛ	40 л.	И, П
M13	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A, 25% гетероплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	22 г.	И
P26	<i>MT-ND1</i>	m.4171C>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	20 л.	И, П
M16	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	22 л.	И, П
M17	<i>MT-ND1</i>	m.3635G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	40 л.	И
M18	<i>MT-ND6</i>	m.14597A>G, 25% гетероплазмия в крови	КДЦМ I	М	Ли-подобный синдром	6 л.	И, П
П13	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A, 50% гетероплазмия в крови	КДЦМ I	М	Ли-подобный синдром	10 л.	И
M19	<i>MT-ND6</i>	m.14484T>C, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	24 г.	И

M20	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	Ж	НОНЛ	27 л.	И
П31	<i>MT-TL1</i>	m.3260A>G гетероплазмия 64% в крови, гомоплазмия в моче	тРНК Leu	Ж	Митохондриальный лактат-ацидоз	10 л.	И, П
П95	<i>NUBPL</i>	NM_025152: c.[815-27T>C];[1A>T]	КДЦМ I	М	Недостаточность КДЦМ I	4 г.	И, П
M21	<i>MT-ND6</i>	m.14487T>C, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	Синдром Ли	6 мес.	И
M22	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A, гомоплазмия в крови	КДЦМ I	М	НОНЛ	15 л.	И

Выборка пациентов для анализа содержания плазменных цитокинов FGF-21 и GDF-15

№	Возраст	Пол	Ген	Вариант нуклеотидной последовательности	Изменения аминокислотной последовательности	Диагноз
П3	1 г.	Ж	<i>MT-ND6</i>	m.14487T>C в гомоплазмии в крови и моче	p.[Met63Val]	Синдром Ли
П4	9 м.	Ж	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П6	4 м.	Ж	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
Р1	25 л.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
П42	10 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693:c.[2310C>A];[961_962insGGGCAAACA CA]	p.[F770L];[p.K321fs]	Синдром истощения мтДНК
П45	1 г.	Ж	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[845_846delCT]	p.[Ser282Cysfs*9];[Ser282Cysfs *9]	Синдром Ли
П46	4 г.	М	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П47	11 л.	Ж	<i>tRNA Phe</i>	m.641A>T в 20% гетероплазмии в крови	"-"	Эпилептическая энцефалопатия
П51	4 г.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[E140K]; [E140K]	Недостаточность КДЦМ IV
П53	6 м.	М	<i>MT-ND3</i>	m.10197G>A в гомоплазмии в крови	p.[Ala47Thr]	Синдром Ли

П54	9 м.	М	<i>DGUOK</i>	NM_080916.2: c.[3G>A];[592_595del]	p.[M1I];[V198fs]	Синдром истощения мтДНК
П88	7 м.	Ж	<i>FBXL4</i>	NM_012160: c.[627_633del];[1694A>G]	p.[V209fs];[D565G]	Синдром истощения мтДНК
П55	1 г.	Ж	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A в 50% гетероплазмии в крови	p.[Asp393Asn]	Синдром Ли
П57	1 г.	М	<i>TWNK</i>	NM_021830.4: c.[574C>T];[938G>A]	p.[R192C];[R313Q]	Синдром истощения мтДНК
П59	1 г.	Ж	<i>DGUOK</i>	NM_080916: c.[3G>A];[821_822insAAAG]	p.[M1I];[V274fs]	Синдром истощения мтДНК
П60	26 л	М	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A в гомоплазмии в крови	p.[Ala52Thr]	НОНЛ
П61	6 л.	Ж	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[312_321delTCTGCCAGCCinsAT];[?]	"-"	Синдром Ли
П62	2 м.	Ж	<i>NDUFV1</i>	NM_007103.3: c.[475C>T];[632C>T]	p.[R159X];[A211V]	Синдром Ли
П64	6 м.	Ж	<i>NDUFS2</i>	NM_004550: c.[245T>A];[412C>T]	p.[L82Q];[R138W]	Синдром Ли
П65	9 м.	М	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в кровь	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
П66	3 г.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[2591A>G];[c.3649G>C]	p.[N864S];[A1217P]	Синдром Альперса
П67	12 л.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 50% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром

П46	4 г.	М	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>C в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Pro]	Синдром Ли
П54	1 м.	М	<i>DGUOK</i>	NM_080916.2:c.[3G>A]; [c.143-4311_255+4397del8820]	p.[M1I];[Ala48Glyfs*43]	Синдром истощения мтДНК
П70	4 м.	М	<i>TWNK</i>	NM_021830:c.[1232C>T];[1523A>G]	p.[T411M]; [Y508C]	Синдром истощения мтДНК
П71	24 г.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 90% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
П72	7 м.	Ж	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[E140K]; [E140K]	Недостаточность КДЦМ IV
П74	4 м.	Ж	<i>RRM2B</i>	NM_015713: c.[649C>G];[649C>G]	p.[L217V];[L217V]	Синдром истощения мтДНК
П76	2 м.	Ж	<i>DGUOK</i>	NM_080916: c.[3G>A];[3G>A]	p.[M1I];[M1I]	Синдром истощения мтДНК
П77	3 г.	Ж	<i>MT-ND6</i>	m.14459G>A в гомоплазмии в крови	p.[Ala72Val]	Синдром Ли
П78	1 г.	Ж	<i>MT-ND1</i>	m.3697G>A в гомоплазмии в крови	p.[Gly131Ser]	Синдром Ли
П81	1 г.	Ж	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[533C>T];[418G>A]	p.[A178V];[E140K]	Недостаточность КДЦМ IV
Р2	24 г.	Ж	<i>MT-ND3</i>	m.10158T>C в 30% гетероплазмии в крови	p.[Ser34Pro]	MELAS синдром

P3	1 г.	Ж	<i>MT-ND3</i>	m.10191T>C в 80% гетероплазмии в крови	p.[Ser45Pro]	Синдром Ли
P4	26 л.	Ж	<i>MT-ND1</i>	m.3697G>A в 10% гетероплазмии в крови	p.[Gly131Ser]	MELAS
P5	29 л.	М	<i>MT-ND5</i>	m.13379A>G в 47% гетероплазмии в крови	p.[His348Arg]	НОНЛ
P6	20 л.	М	<i>MT-ND6</i>	m.14484T>C гомоплазмия в крови	p.[Met64Val]	НОНЛ
P7	20 л.	М	<i>MT-ND6</i>	m.14484T>C гомоплазмия в крови	p.[Met64Val]	НОНЛ
P8	19 л.	М	<i>MT-ND1</i>	m.3472T>C гомоплазмия в крови	p.[Phe56Leu]	НОНЛ
P9	7 л.	Ж	"-"	делеция 8000 п.н. только в моче в гомоплазмии	"-"	KSS
P10	7 л.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3:c.[845_846delCT];[845_846delCT]	p.[Ser282Cysfs*9];[Ser282Cysfs*9]	Синдром Ли
P11	12 л.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[2243G>C];[2243G>C]	p.[W748S];[W748S]	Синдром Альперса
P12	6 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[1760C>T];[2591A>T]	p.[P587L];[N864I]	Синдром Альперса
P13	13 л.	Ж	<i>TWINK</i>	NM_021830.4:c.[1523A>G];[1523A>G]	p.[Y508C];[Y508C]	Синдром истощения мтДНК
P14	10 л.	Ж	<i>TWINK</i>	NM_021830.4:c.[1314C>G];[1199G>T]	p.[N438K];[R400L]	Синдром истощения мтДНК
P15	35 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[2243G>C];[2243G>C]	p.[W748S];[W748S]	SANDO
P16	24 г.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмическом состоянии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ

P17	26 л.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмическом состоянии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P18	18 л.	М	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A в гомоплазмическом состоянии в крови	p.[Ala52Thr]	НОНЛ
P20	45 л.	Ж	"-"	делеция 7000 п.н. в 20% гетероплазмии в крови, в моче - примерно 70%	"-"	СРЕО
P21	4 г.	М	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G гомоплазмия в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
P22	8 л.	М	<i>TWNK</i>	NM_021830.4: c.[1199G>T];[46delC]	p.[R400L];[Pro16fs]	Синдром истощения мтДНК
P23	24 г.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A гомоплазмия в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P24	23 г.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A гомоплазмия в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
П60	26 л.	М	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A в гомоплазмии в крови	p.[Ala52Thr]	НОНЛ
P26	20 л.	М	<i>MT-ND1</i>	m.4171C>A в гомоплазмии в крови	p.[Leu289Met]	НОНЛ
П97	1 г.	Ж	<i>COX10</i>	NM_001303: c.[1037C>T];[1037C>T]	p.[S346L];[S346L]	Недостаточность КДЦМ IV
P27	61 г.	Ж	<i>MT-TK</i>	m.8344A>G в 40% гетероплазмии в крови	"-"	MERRF
P28	16 л.	Ж	"-"	делеция 4977 п.н.; гетероплазмия в моче - примерно 70%	"-"	KSS
P29	17 л.	М	<i>MT-TL1</i>	m.3252A>G в гомоплазмии в крови	"-"	MELAS

P30	25 л.	М	"-"	делеция 6000 п.н.; гетероплазмия в крови 10%, в моче - примерно 80%	"-"	KSS
P31	6 л.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[845_846delCT]	p.[Ser282Cysfs*9];[Ser282Cysfs*9]	Синдром Ли
P32	64 г.	М	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[2243G>C];[2243G>C]	p.[W748S];[W748S]	SANDO
P33	24 г.	М	<i>MT-ND6</i>	m.14484T>C в гомоплазмии в крови	p.[Met64Val]	НОНЛ
P34	4 г.	Ж	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
P35	3 г.	М	<i>MT-ATP6</i>	m.8993T>G в гомоплазмии в крови	p.[Leu156Arg]	Синдром Ли
P36	24 г.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P37	39 л.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P38	20 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[2243G>C];[2792T>G]	p.[W748S];[L931R]	PEO
P39	29 л.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P40	56 л.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[1760C>T];[1735C>T]	p.[P587L];[R579W]	PEO
P41	7 л.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[752-1G>C]	p.[Ser282Cysfs*9];[?]	Синдром Ли
P42	6 л.	Ж	<i>TWINK</i>	NM_021830.4: c.[1199G>T];[1196A>G]	p.[R400L];[N399S]	Синдром истощения мтДНК

P43	38 л.	Ж	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 50% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
P44	58 л.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[1399G>A];[1735C>T]	p.[A467T];[R579W]	PEO
P45	6 л.	Ж	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[856T>C]	p.[Ser282Cysfs*9];[S286P]	Синдром Ли
P46	28 л.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P47	28 л.	Ж	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 50% гетероплазмии в моче	"-"	MELAS синдром
P48	24 г.	М	<i>MT-ND1</i>	m.3460G>A в гомоплазмии в крови	p.[Ala52Thr]	НОНЛ
P49	39 л.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P50	5 л.	М	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[845_846delCT]	p.[Ser282Cysfs*9];[Ser282Cysfs*9]	Синдром Ли
P51	13 л.	Ж	<i>MT-ND5</i>	m.13513G>A в 50% гетероплазмии в крови	p.[Asp393Asn]	Синдром Ли
P52	4 г.	Ж	<i>SURF1</i>	NM_003172.3: c.[845_846delCT];[752-1G>C]	p.[Ser282Cysfs*9];[?]	Синдром Ли
P53	31 г.	Ж	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 50% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
P54	11 л.	Ж	<i>tRNA Lys</i>	m.8344A>G в 95% гетероплазмии в крови	"-"	MERRF

P55	40 л.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 30% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
P56	36 л.	Ж	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P57	8 л.	М	<i>MT-ND5</i>	m.13094T>C в 50% гетероплазмии в крови	p.[Val253Ala]	Синдром Ли
П50	1 г.	М	<i>TWNK</i>	NM_021830.4: c.[1199G>T];[1628G>A]	p.[R400L];[R543Q]	Синдром истощения мтДНК
P58	4 г.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[E140K]; [E140K]	Недостаточность КДЦМ IV
P59	5 л.	М	<i>SCO2</i>	NM_005138: c.[418G>A];[418G>A]	p.[E140K]; [E140K]	Недостаточность КДЦМ IV
P60	36 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[2666C>T];[1735C>T]	p.[A889V];[R579W]	SAE
P61	8 л.	Ж	<i>MT-ND1</i>	m.3697G>A в гомоплазмии в крови	p.[Gly131Ser]	Синдром Ли
P62	11 л.	М	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 50% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
P63	29 л.	Ж	"-"	делеция 5000 п.н.; гетероплазмия в моче - примерно 40%	"-"	KSS
P64	57 л.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[32G>A];[1735C>T]	p.[G11D];[R579W]	SANDO

P65	56 л.	Ж	<i>tRNA Leu (UUR)</i>	m.3243A>G в 24% гетероплазмии в крови	"-"	MELAS синдром
P66	24 г.	М	"-"	делеция 7500 п.н.; гетероплазмия в моче - примерно 60%	"-"	KSS
P67	14 л.	Ж	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[3294T>A]	p.[N1098K]	Синдром Альперса
P68	43 г.	М	<i>MT-ND4</i>	m.11778G>A в гомоплазмии в крови	p.[Arg340His]	НОНЛ
P69	7 л.	Ж	<i>MT-ND1</i>	m.3697G>A в гомоплазмии в крови	p.[Gly131Ser]	Синдром Ли
П96	10 л.	Ж	<i>SUCLG1</i>	NM_003849.3:c.[665T>C];[665T>C]	p.[L222S];[L222S]	Синдром истощения мтДНК
P71	8 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[2243G>C];[856-1G>C]	p.[W748S];[?]	Синдром Альперса
P72	6 л.	Ж	<i>TWNK</i>	NM_021830.4: c.[1272C>G];[1628G>A]	p.[R400L];[R543Q]	Синдром истощения мтДНК
P74	18 л.	М	<i>POLG</i>	NM_002693.2:c.[911T>G];[911T>G]	p.[L304R];[L304R]	PEO

Название	Последовательность олигонуклеотидных МЛРА-проб
14459G>A	R: 5'- CTGTAGTATATCCAAAGACAACCATCATCCCCCTAAATAAATTGTTTCTGGA TGCGATCCGATGCCTTCATG-3'
	Gn: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACTTTATTTCTTTATTATTATTACCCCCATGCCT CAGGATACTCCTCAATAGCATCG-3'
	Am :5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACTTTATTTCTTTATTATTTCATGCCTCAGG ATACTCCTCAAATAGCCATCA-3'
3460G>A	R: 5'- CCATAAAACTCTTCACCAAAGAGCCTTTATCTTATTTACTTATTTCGATGCGAT CCGATGCGTTCATG-3'
	Am: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTGCTACTACAACCCTTCGCTGACA-3'
	Gn: 5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCTACTACAACCCTTCGCTGACG-3'
11778G>A	R: 5'- CATCATAATCCTCTCTCAAGGACTTCAAACCTTCGATGCGATCCGATGCCTTC ATG-3'
	Am : 5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCAAACCTACGAACGCACTCCAGTCA- 3'
	Gn: 5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCTACGAACGCACTCACAGTCG-3'
3697G>A	R: 5'-GCGCACTGCGCAGTATTTATGATGCGATCCGATGCCTTCATG-3'
	Gn: 5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTACAAACTCAAACCTACGCCCTGATCG-3'
	Am: 5'- CTCAAACGTTTCGTACGTGAATCGCGGTACATCAAATACGCCCTGATCA-3'
8363G>A	R: 5'- AAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCACCATATTTATTGATGCGAT CCGATGCCTTCATG-3'
	Am: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGGTTATTTGTTCTTGGTTCGGTTAAAGATTA AGAGAACCAACACCTCTTTACAGTA-3'
	Gn: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGGTTATTTGTTCTTGGTTCGGTTAAGTTAAAG ATTAAGAGAACCAACACCTCTTTACAGTG-3'

8344A>G	R: 5'- TCTCTTAATCTTTAACTTAAAAGGTTAATGCTAAGTTAGGCTATTCTTATTT GATGCGATCCGATGCCTTCATG-3'
	Gm: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTATTATTTCTTTTGCATTTCACTGTA GAGGTGTTGGC-3'
	An: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTATTATTTCTTTATTTGGCATTTC TAAAGAGGTGTTGGT-3'
13094T>C	R: 5'- TGTAGCAGGAATCTTCTTACTCATCCGTTTATTATCTTATACTTATCGATGCG ATCCGATCCCTTCATG-3'
	Cm: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATCATTTCCTACTCCACTCAAGCACT CAAGCACTATAGC-3'
	Tn: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTATCATTATTTGCCCTACTCCACTCAAG CACTATAGT-3'
3243A>G	R: 5'- GCCCCGTAATCGCATAAACTTAAAACCTTATTCTTATTTATATCGATGCGAT CCGATGCCTTCATG-3'
	Gm: 5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCAGGGTTTGTTAAGATGGCAGG-3'
	An: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACTGAACAGGGGTTTGTTAAGATGGCAGA-3'
13513A>G	R: 5'- TTTGGAGTAGAAACCTGTGAGGAAAGGTTTATTACGATGCGATCCGATGCCT TCATGCGATCCGATGCCTTCATG-3'
	An: 5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTGCGGTTTCGATGATGTGGTT-3'
	Gm: 5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGCGGTTTCGATGATGTGGTC-3'
8993T>G/C	R: 5'-GGCCGTACGCCTAACCGCGATGCGATCCGATGCCTTCATG-3'
	Gm: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTCCCTACTCATTCAACCAATAGCCCC-3'
	Cm: 5'-GTTCGTACGTGAATCGCGGTACCCTACTCATTCAACCAATAGCCCC-3'
	Tn: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCT- 3'

10197G>A	R: 5'- CCCGCGTCCCTTTCTCCATAATTTATTCTTATTTACTTCGATGCGATCCGATGC CTTCATG-3'
	Gn: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACTATATAAATAGTGCGGGCTTCGACCCTATATC CCCCCG-3'
	Am: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACTTAATATATATCTAGTGCGGGCTTCGACCCTA TATCCCCCA-3'
14484T>C	R: 5'- CATTCCCCCTAAATAAATTAAAAAAACTATTA AACCCCTTTATTCTTTTCGATGC GATCCGATGCCTTCATG-3'
	Tn: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTATTTTCATGCCTGTAGTATACCAAAGA CAACCAT-3'
	Cm: 5'- GTTCGTACGTGAATCGCGGTACGTTTTATTTTCGCTGTAGTATATCCAAAGACAA CCAC-3'

Приложение 5

Список генов, входящих в панель “587 генов”: AAAS, AARS2, AASS, ABCA1, ABCB6, ABCB7, ABCD1, ABCD3, ABCD4, ABCG5, ABCG8, ACAD8, ACAD9, ACADM, ACADS, ACADSB, ACADVL, ACAT1, ACO2, ACOX1, ACSF3, ACY1, ADA, ADA2, ADSL, AGK, AGL, AGXT, AIFM1, AIRE, AK2, AKR1D1, ALAD, ALAS2, ALDH18A1, ALDH4A1, ALDH5A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDOA, ALDOB, ALG1, ALG11, ALG12, ALG13, ALG2, ALG3, ALG6, ALG8, ALG9, ALPL, AMACR, AMPD1, AMT, ANKH, AP1S3, APOA2, APOB, APOPT1, ARG1, ARHGEF9, ARSA, ARSB, ARX, ASAH1, ASL, ASS1, ATP13A2, ATP1A2, ATP1A3, ATP5A1, ATP5E, ATP6V0A2, ATP7A, ATP7B, ATPAF2, ATXN2, AUH, B4GALT1, BCKDHA, BCKDHB, BCKDK, BCS1L, BOLA3, BTB, C12orf65, C19orf12, CA5A, CAVIN1, CBS, CD320, CDKL5, CFTR, CHCHD10, CISD2, CLDN16, CLDN19, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CLPB, CLPP, CNTNAP2, COA5, COA6, COASY, COG1, COG4, COG5, COG6, COG7, COG8, COMT, COQ2, COQ4, COQ6, COQ7, COQ8A, COQ9, COX10, COX11, COX14, COX15, COX20, COX4I2, COX6A1, COX6B1, COX7B, CP, CPOX, CPS1, CPT1A, CPT1B, CPT1C, CPT2, CTNS, CTSA, CTSD, CTSF, CTSK, CUBN, CYC1, CYCS, CYP24A1, CYP27B1, CYP7B1, D2HGDH, DARS2, DBH, DBT, DCAF17, DDC, DDOST, DECR1, DGUOK, DHCR7, DHDDS, DHTKD1, DLAT, DLD, DNA2, DNAJC19, DNAJC3, DNAJC5, DNMI1, DOK7, DOLK, DPM1, DPM2, DPM3, EARS2, ECHS1, ELAC2, ELANE, ENO3, EPHX2, ETFA, ETFB, ETFDH, ETHE1, F12, FA2H, FAH, FARS2, FASTKD2, FBP1, FBXL4, FECH, FH, FOLR1, FOXG1, FOXRED1, FTL, FUCA1, G6PC, GAA, GABRG2, GALC, GALE, GALK1, GALNS, GALT, GAMT, GARS, GATM, GBA, GBE1, GCDH, GCH1, GCK, GCSH, GFER, GFM1, GHR, GIF, GLA, GLB1, GLDC, GLRX5, GLYCTK, GMPPA, GNE, GNPTAB, GNPTG, GNS, GPHN, GPT2, GPX1, GRHR, GRIN2A, GRIN2B, GRN, GSR, GTPBP3, GUSB, GYG1, GYS1, GYS2, HADH, HADHA, HADHB, HARS2, HAX1, HCCS, HCFC1, HEXA, HEXB, HFE, HGD, HGSNAT, HIBCH, HINT1, HLCS, HMBS, HMGCL, HMGCS2, HOGA1, HPD, HPRT1, HSD3B7, HSPD1, IARS2, IBA57, IDH2, IDS, IDUA, IL10, IL10RA, IL10RB, IL1RN, IL36RN, ISCA2, ISCU, ITIH4, IVD, KARS, KCNJ1, KCNJ10, KCNQ2, KCNQ3, KCNT1, KCTD7, L2HGDH, LARGE1, LAMP2, LARS2, LDHA, LDLR, LIAS, LIPA, LIPT1, LMBRD1, LPL, LRPPRC, LYRM7, MAN1B1, MAN2B1, MANBA, MARS2, MCCC1, MCCC2, MCEE, MCOLN1, MECP2, MEFV, MFF, MFSD8, MGAT2, MGME1, MICU1, MIP, MLC1, MLYCD,

MMAA, MMAB, MMACHC, MMADHC, MOCS1, MOCS2, MOGS, MPC1, MPDU1, MPI, MPV17, MRPL44, MRPS16, MRPS22, MSRB3, MTFMT, MTHFR, MTO1, MTPAP, MTR, MTRR, MUT, MVK, NADK2, NAGA, NAGLU, NAGS, NARS2, NBAS, NDUFA1, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA9, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFB11, NDUFB3, NDUFB9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NEU1, NFU1, NGLY1, NLRC4, NLRP12, NLRP3, NNT, NOD2, NPC1, NPC2, NTHL1, NUBPL, OAT, OCRL, OGDH, OPA1, OPA3, OTC, OXCT1, PAH, PANK2, PARK7, PC, PCBD1, PCCA, PCCB, PCDH19, PCK2, PCSK9, PDHA1, PDHB, PDHX, PDK3, PDP1, PDSS1, PDSS2, PDX1, PET100, PEX1, PEX10, PEX11B, PEX12, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PFKM, PGAM2, PGM1, PHKA1, PHKA2, PHKB, PHKG2, PHYH, PINK1, PKLR, PLA2G6, PLCB1, PLCG2, PLP1, PMM2, PNKD, PNKP, PNPO, POLG, POLG2, PPM1K, PPOX, PPP1R17, PPT1, PRICKLE1, PRKAG2, PRODH, PRPS1, PRPS2, PRRT2, PSMB8, PSTPIP1, PTRH2, PTS, PUS1, PYCR2, PYGL, PYGM, QDPR, RARS, RARS2, RBCK1, RDH11, RFT1, RMND1, RNASEH1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, RPIA, RPL35A, RRM2B, SAMHD1, SARS2, SCN1A, SCN1B, SCN2A, SCN8A, SCN9A, SCO1, SCO2, SCP2, SDHA, SDHAF1, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SERAC1, SERPING1, SERPINA1, SFXN4, SGSH, SLC17A5, SLC18A2, SLC19A3, SLC22A5, SLC25A1, SLC25A12, SLC25A13, SLC25A15, SLC25A19, SLC25A20, SLC25A22, SLC25A3, SLC25A38, SLC25A4, SLC25A46, SLC2A1, SLC2A2, SLC35A1, SLC35A2, SLC35C1, SLC37A4, SLC46A1, SLC52A3, SLC6A3, SLC6A5, SLC6A8, SLC7A7, SLC9A6, SMPD1, SOD1, SPG7, SPR, SPTAN1, SRD5A3, SSR4, ST3GAL3, STT3A, STT3B, STXBPI, SUCLA2, SUCLG1, SUCLG2, SUGCT, SUMF1, SUOX, SURF1, SYN1, TACO1, TALDO1, TARS2, TAT, TAZ, TCN2, TH, TIMM8A, TK2, TMEM126A, TMEM165, TMEM173, TMEM70, TNFRSF1A, TPI1, TPK1, TPP1, TREX1, TRMU, TRNT1, TSC1, TSFM, TTC19, TTPA, TUBB3, TUFM, TUSC3, TWNK, TXNRD2, TYMP, UBE3A, UGT1A1, UNG, UQCC2, UQCRB, UQCRC2, UQCRQ, UROD, UROS, VARS2, VDR, WDR45, WFS1, XDH, XPNPEP3, YARS2.

Приложение 6

Список генов, входящих в панель “62 ядерных гена”: *AARS2, ACAD9, AGK, ATP5A1, ATP5E, ATPAF2, BCS1L, COA5, COX10, COX14, COX15, COX20, CYC1, DGUOK, DNA2, FBXL4, FOXRED1, LRPPRC, MPV17, MTO1, NDUFA1, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA9, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFB3, NDUFB9, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2, NUBPL, PDHA1, PET100, POLG, POLG2, RRM2B, SCL25A4 (ANT1), SCO1, SCO2, SDHA, SUCLA2, SUCLG1, SURF1, TK2, TMEM70, TWNK, TYMP, YARS2.*

Исследуемые метаболиты методом ГХ-МС и их референсные значения

Наименование метаболита	Ед.изм	Референсные значения	Комментарий: повышение при патологии/вторичные причины
2-гидроксibuтират	мМ/М CRE	< 3	> 3
2-гидроксивалериановая	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-гидроксиглутаровая	мМ/М CRE	< 16	> 16
2-гидроксидроксифенилацетат	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-гидрокси-3-метилвалериановая	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-гидроксиизобутират	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-гидроксиизовалериановая	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-гидроксиизокапроновая	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-метил-3-гидроксibuтират	мМ/М CRE	< 11	> 11
2-метилацетоацетат	мМ/М CRE	не определяется	> 0
2-метилбутирилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-оксо-3-метилвалериановая	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-оксоадипиновая	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-оксобутират	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-оксоглутаровая	мМ/М CRE	< 152	> 152
2-оксоизовалериановая	мМ/М CRE	< 2	> 2
2-оксоизокапроновая	мМ/М CRE	< 2	> 2

3,4-дигидроксибутират	мМ/М CRE	не определяется	> 0
3-гидрокси-3-метилглутаровая	мМ/М CRE	< 36	> 36
3-гидроксибутират	мМ/М CRE	< 3	> 3
3-гидроксиглутаровая	мМ/М CRE	< 2	> 2
3-гидроксидекандиовая	мМ/М CRE	< 2	> 2
3-гидроксиизобутират	мМ/М CRE	< 2	> 2
3-гидроксиизовалериановая	мМ/М CRE	< 46	> 46
3-гидроксиизокапроновая	мМ/М CRE	< 2	> 2
3-гидроксипропионовая	мМ/М CRE	3-10	> 10
3-гидроксисебацಿನовая	мМ/М CRE	< 2	> 2
3-метилглутаконовая	мМ/М CRE	< 9	> 9
3-метиладипиновая	мМ/М CRE	< 2	> 2
3-метилглутаровая	мМ/М CRE	< 7	> 7
3-метилкротонилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
4-гидроксибутират	мМ/М CRE	< 2	> 2
4-гидроксиизовалериановая	мМ/М CRE	< 2	> 2
4-гидроксифенилацетат	мМ/М CRE	6 - 28	> 28
4-гидроксифениллактат	мМ/М CRE	6 - 28	> 28
4-гидроксифенилпируват	мМ/М CRE	< 2	> 2
5-гидроксигексановая	мМ/М CRE	< 7	> 7

7-гидроксиоктановая	мМ/М CRE	< 2	> 2
N-ацетиласпарат	мМ/М CRE	< 2	> 2
Адипиновая	мМ/М CRE	< 12	> 12
Ацетоацетат	мМ/М CRE	< 2	> 2
Бутирилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
Ванилиллактат	мМ/М CRE	< 0,6	> 0,6
Ванилилманделиновая	мМ/М CRE	< 15	> 15
Гексаноилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
Гликолевая	мМ/М CRE	11 - 103	> 103
Глицерол	мМ/М CRE	< 9	> 9
Глутаровая	мМ/М CRE	< 2	> 2
Гомованилиновая	мМ/М CRE	2 - 15	> 15
Гомогентизиновая	мМ/М CRE	< 10	> 10
Изобутирилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
Изовалерилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
Лактат	мМ/М CRE	< 25	> 25
Маликовая	мМ/М CRE	< 2	> 2
Малоновая	мМ/М CRE	< 2	> 2
Мевалон Лактон	мМ/М CRE	< 2	> 2
Метилмалоновая	мМ/М CRE	< 2	> 2

Метилсукцинат	мМ/М CRE	< 3	> 3
Метилцитрат	мМ/М CRE	< 12	> 12
Оротовая	мМ/М CRE	< 11	> 11
Пируват	мМ/М CRE	< 12	>12
Пропионилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
Себациновая	мМ/М CRE	< 2	> 2
Суберилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
Субериновая	мМ/М CRE	< 2	> 2
Сукцинат	мМ/М CRE	0,5 - 16	> 16
Сукцинилацетон	мМ/М CRE	< 2	> 2
Тиглилглицин	мМ/М CRE	< 2	> 2
Фениллактат	мМ/М CRE	< 2	> 2
Фенилпируват	мМ/М CRE	< 2	> 2
Фумаровая	мМ/М CRE	< 2	> 2
Этималоновая	мМ/М CRE	< 7	> 7