

©Коллектив авторов

## РЕСПИРОМЕТРИЯ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С НАРУШЕНИЕМ РАБОТЫ I КОМПЛЕКСА ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ МИТОХОНДРИЙ

Т.Д. Крылова<sup>1\*</sup>, П.Г. Цыганкова<sup>1</sup>, Ю.С. Иткис<sup>1</sup>, Н.Л. Шеремет<sup>2</sup>, Т.А. Невиницына<sup>2</sup>,  
С.В. Михайлова<sup>3</sup>, Е.Ю. Захарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр,

115478, Москва, ул. Москворечье, 1; эл.почта: tatianadmkrlyova@gmail.com

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт глазных болезней, Москва

<sup>3</sup>Российская детская клиническая больница, Москва

Недостаточность I комплекса дыхательной цепи митохондрий (I КДЦМ) – наиболее частый дефект системы OXPHOS, составляет 30% случаев митохондриальной патологии и характеризуется клинической и генетической гетерогенностью. Наиболее часто встречающиеся клинические фенотипы в данной группе – наследственная оптическая нейропатия нерва Лебера (НОНЛ) и синдром Ли (СЛ). В данном исследовании проведён анализ фибробластов кожи 11 пациентов с мутациями в мтДНК, вызывающими НОНЛ и Ли-подобный фенотип: m.11778 G>A (N=3), m.3460 A>G (N=2), m.3635 G>A (N=1), m.3308 T>G (N=2), m.3472 T>C (N=1) и двух пациентов с Ли-подобным фенотипом и неописанными заменами m.3945 C>A и m.14441 T>C. Для комплексной оценки дыхательной функции митохондрий была проведена респирометрия высокого разрешения на клетках с интактной и пермеабилizированной плазматической мембраной. Соотношения респирометрии R/E, (R-L)/E; показатели R, E, L, нормализованные на активность цитратсинтазы, были статистически различными между группами ( $p<0,05$ ). В протоколе с пермеабилizированными клетками выявлены различия между соотношениями CII/E, Rot/E, R/CII, CI/CII ( $p<0,05$ ), что говорит о дисфункции системы окислительного фосфорилирования, в частности, I КДЦМ. Повышенный уровень активности цитратсинтазы и сниженное соотношение CI/CII свидетельствуют о компенсаторном метаболическом ответе на дисфункцию I КДЦМ. Результаты работы показывают, что респирометрия высокого разрешения может использоваться для подтверждения биохимического дефекта при патологии I КДЦМ, а также для функционального анализа других мутаций в генах I КДЦМ.

**Ключевые слова:** респирометрия высокого разрешения, НОНЛ, Ли-подобный синдром, недостаточность I комплекса дыхательной цепи митохондрий, цитратсинтаза

**DOI:** 10.18097/PBMC20176304327

## ВВЕДЕНИЕ

Митохондриальные заболевания (МЗ) – большая группа наследственных болезней обмена веществ, связанных с нарушениями системы окислительного фосфорилирования (OXPHOS). Суммарная частота МЗ составляет около 1:5000 живых новорожденных [1].

Система OXPHOS представлена электрон-транспортной системой (I-IV комплексы дыхательной цепи митохондрий (КДЦМ)) и АТР-синтазным комплексом, расположенными в митохондриях; субъединицы комплексов находятся под двойным генетическим контролем: они кодируются ядерным и собственным митохондриальным геномом [2].

Недостаточность NADH-дегидрогеназы (I КДЦМ) – наиболее частый биохимический дефект при МЗ. Примерно 30% митохондриальной патологии представлены именно дефектом I КДЦМ [3]. Одна из причин связана с тем, что NADH-дегидрогеназа является одним из самых больших ферментов системы OXPHOS. I КДЦМ включает в себя 3 структурных и функциональных модуля – N, P, Q. Окисление NADH до NAD<sup>+</sup> происходит в N-сайте; Q-сайт представляет собой 7 железосерных кластеров, обеспечивающих перенос электронов и финальное восстановление убихинона на NDUF5 субъединице. P-сайт, используя

энергию переноса электронов, производит трансмембранный перенос протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство [4].

На сегодняшний день выявлено 44 гена (ядерных и митохондриальных), кодирующих субъединицы I КДЦМ человека. мтДНК кодирует 7 субъединиц I КДЦМ: MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5, MT-ND6. Мутации описаны в каждой субъединице, а клинический фенотип очень варьируется даже в пределах одной точковой мутации. Более того, для заболеваний, вызванных мутациями в мтДНК, характерен феномен гетероплазмии – различное содержание мутантных и нормальных копий мтДНК в клетке. Степень гетероплазмии варьирует в зависимости от ткани и клеток организма: выше всего она в высокоэнергетозависимых органах – головной мозг, сердце, мышцы. Чёткой зависимости между тяжестью заболевания и степенью гетероплазмии не установлено, однако известно, что мутация m.8993T>G вызывает синдром NARP (нейропатия, пигментная дегенерация сетчатки), если степень гетероплазмии до 90%; если степень гетероплазмии выше 95%, то наблюдается синдром Ли [5]. Кроме того, мутации в различных белках, участвующих в сборке дыхательной цепи, вызывают дефект I КДЦМ.

\* - адресат для переписки

Клинические проявления недостаточности I КДЦМ разнообразны и могут включать как мультисистемную патологию, так и поражение отдельных органов. Типичные синдромы представлены кардиомиопатией, миопатией, лейкоэнцефалопатией, гепатопатией с тубулопатией, MELAS (митохондриальная энцефалопатия с лактат-ацидозом и инсультоподобными состояниями), синдромом Ли или Ли-подобным фенотипом, которые чаще проявляются в детском (неонатальном) возрасте. В литературе описаны пациенты с наследственной оптической нейропатией Лебера с манифестацией во взрослом возрасте (НОНЛ) [6].

Синдром Ли – наиболее частая митохондриальная патология среди детей. Это нейродегенеративное заболевание клинически и генетически гетерогенно; известно более 75 генов (ядерных и митохондриальных), ответственных за патогенез. Характерные клинические признаки – миопатия, экстрапирамидные нарушения, глазодвигательные нарушения (офтальмоплегия); птоз, как правило, выявляется на первом году жизни, но описаны и взрослые формы данного синдрома [7, 8]. Патогномоничным является наличие симметричных очагов в базальных ганглиях или стволе мозга, выявленных МРТ.

Одна из самых частых патологий, вызываемых мутациями в мтДНК – это наследственная оптическая нейропатия зрительного нерва Лебера (НОНЛ). Заболевание характеризуется безболезненной потерей зрения (обычно двусторонней), первые признаки заболевания проявляются во взрослом возрасте (17-50 лет), мужчины в 4-5 раз чаще поражаются, чем женщины. Самые частые патогенные мутации, вызывающие НОНЛ: m.11788G>A, m.3460G>A, m.14484T>C. На данный момент (по данным [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)) известно около 18 мутаций, вызывающих данный синдром и число кандидатных замен с каждым годом увеличивается [9].

Диагностика дефектов I КДЦМ проводится биохимическими методами: измеряется активность ротенон-чувствительной NADH-убихинолуксидоредуктазы в биопсийном материале. “Золотой стандарт” для диагностики – это мышечная ткань; но можно использовать также фибробласты кожи, хотя в данном случае можно не регистрировать недостаточность I КДЦМ в силу специфичности накопления биохимического дефекта в зависимости от тканей организма. Также наличие/отсутствие отдельных субъединиц I КДЦМ и его факторов сборки можно определить при помощи Вестерн-блот анализа и BNGE (Blue-Native Gel Electrophoresis).

В связи с использованием технологии NGS (Next-Generation Sequencing) число выявленных мутаций, имеющих неоднозначное клиническое значение, с каждым годом увеличивается, что вызывает необходимость проведения функциональных тестов на культурах клеток. Фотометрические методы дают представление об активности КДЦМ, однако с их помощью сложно оценить общую функциональную активность всей дыхательной цепи. Полярография (респирометрия высокого разрешения)

является методом, позволяющим функционально в условиях, максимально приближенных к *in vivo*, на клетках или тканях оценить работу ДЦМ в целом, либо оценить функционирование отдельного комплекса. Данная методика основана на использовании сверхчувствительного кислородного электрода, с помощью которого можно измерить скорость потребления кислорода клетками или тканями в режиме реального времени.

Цели исследования – оценить возможности респирометрии как биохимического метода диагностики митохондриальной патологии с недостаточностью I КДЦМ, а также применимость данного метода для проверки патогенности неописанных ранее изменений в нуклеотидной последовательности ДНК генов I КДЦМ.

## МЕТОДИКА

### Пациенты

В исследование включено 11 пациентов (9 неродственных семей, таблица) с подтвержденным молекулярно-генетически диагнозом Ли-подобного синдрома (m.3308T>G у двух сибсов, ранее не описанные замены m.3945C>A, m.14441T>C) и НОНЛ (m.3460G>A, m.11778 G>A, m.3635G>A, m.3472T>C) [10, 11]. Мутации были выявлены в клетках крови и фибробластах пациентов методом MLPA (Multiplex Ligase-Dependent Probe Amplification) на панели для частых мутаций мтДНК или секвенированием всей последовательности мтДНК методом NGS на базе Ion Torrent и подтверждены методом прямого автоматического секвенирования с использованием секвенатора ABI 3500xL (“Applied Biosystems”, США).

От всех пациентов, участвующих в исследовании, было получено письменное информированное согласие о целях исследования, используемых методах и возможных рисках.

### Клеточные культуры

У пациентов (n=11) и здоровых индивидуумов (n=7) был взят участок кожи с внутренней стороны предплечья для получения культур фибробластов. Клетки культивировали при 37°C до 85% конfluenceции в среде, содержащей антибиотики (гентамицин 10 мг/мл, пенициллин 5000 Ед/мл, стрептомицин 5000 мкг/мл), NEPES, DMEM с глюкозой (4,5 г/л) и фетальную бычью сыворотку (FBS).

### Респирометрия высокого разрешения

Полученный осадок клеток ( $2 \times 10^6$ /мл) ресуспендировали в подогретой при 37°C дыхательной среде MIR05, содержащей сахарозу 110 мМ, NEPES 20 мМ, таурин 20 мМ, К-лактобионат 60 мМ,  $MgCl_2$  3 мМ,  $KH_2PO_4$  10 мМ, EGTA 0,5 мМ, BSA 1 г/л, pH 7,1.

Респирометрия высокого разрешения (измерение скорости потребления кислорода) была проведена на оксиграфе Oxygraph-2k (“Oroboros corp.”, Австрия).

Таблица. Пациенты, исследуемые в данной работе

Пациент	Возраст, пол	Мутация	Затрагиваемая субъединица I КДЦМ	Клинический диагноз	Протокол
1	34 г., муж	m.11778 G>A	MT-ND4	НОНЛ	интактный
2	32 г., муж	m.3635 G>A	MT-ND1	НОНЛ	интактный
3	12 л., муж	m.3945 C>A*	MT-ND1	Ли-подобный синдром	интактный, перм.
4	11 л., муж	m.14441 T>C*	MT-ND6	Ли-подобный синдром	интактный, перм.
5	28 л., муж	m.3460 G>A	MT-ND1	НОНЛ	интактный
6	26 л., муж	m.3460 G>A	MT-ND1	НОНЛ	интактный, перм.
7	12 л., муж	m.3308 T>G	MT-ND1	Ли-подобный синдром	интактный
8	10 л., жен	m.3308 T>G	MT-ND1	Ли-подобный синдром	интактный, перм.
9	20 л., муж	m.3472 T>C	MT-ND1	НОНЛ	интактный, перм.
10	32 г., муж	m.11778 G>A	MT-ND4	НОНЛ	интактный, перм.
11	38 л., муж	m.11778 G>A	MT-ND4	НОНЛ	интактный, перм.

Примечание. Звёздочкой отмечены мутации, ранее не описанные в литературе. НОНЛ - наследственная оптическая нейропатия зрительного нерва Лебера, перм. - протокол высокоразрешающей респирометрии с пермеабиллизированной мембраной.

Эксперимент с интактными клетками (с целостной плазматической мембраной) проводили, согласно протоколу Pesta и Gnaiger [12]. После измерения базового (на эндогенных субстратах) дыхания клеток (R) добавляли 5 мМ пируват и 0,5 мМ малат, затем 2,5 мкМ олигомицин для ингибирования АТФ-синтазы (L), затем определяли максимальную скорость дыхания титрованием 0,05 мкМ разобщителя окислительного фосфорилирования карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP) (E), далее добавляли 0,5 мкМ ротенон для ингибирования I комплекса, затем ингибировали III комплекс с помощью 2,5 мкМ антимицина А для определения антимицин-нечувствительного дыхания (ROX).

Для эксперимента с пермеабиллизированными клетками (рис. 1) использовали протокол, предложенный Ye и Norpel для последовательного измерения кислородной емкости I, II и IV КДЦМ: к клеткам добавляли 5 мМ пируват и 0,5 мМ малат, затем 0,5 мкг/мл дигитонина для пермеабиллизации плазматической мембраны, далее 1 мМ ADP, 10 мМ глутамат (CI), 10 мМ сукцинат (CII), титровали 0,05 мкМ FCCP (E), затем добавляли 0,5 мкМ ротенон (Rot), потом 2,5 мкМ антимицин А (ROX) [13].

Данные респирометрии были обработаны в программе DatLab 5.0 и нормализованы на количество клеток в камере, статистическая обработка выполнялась в программе STATISTICA 10.0, используя непараметрический критерий Манна-Уитни.

Калибровку сенсоров оксиграфа при открытых камерах ("Air calibration") выполняли один раз в день перед экспериментом для контроля качества работы сенсоров и наличия биологической контаминации.

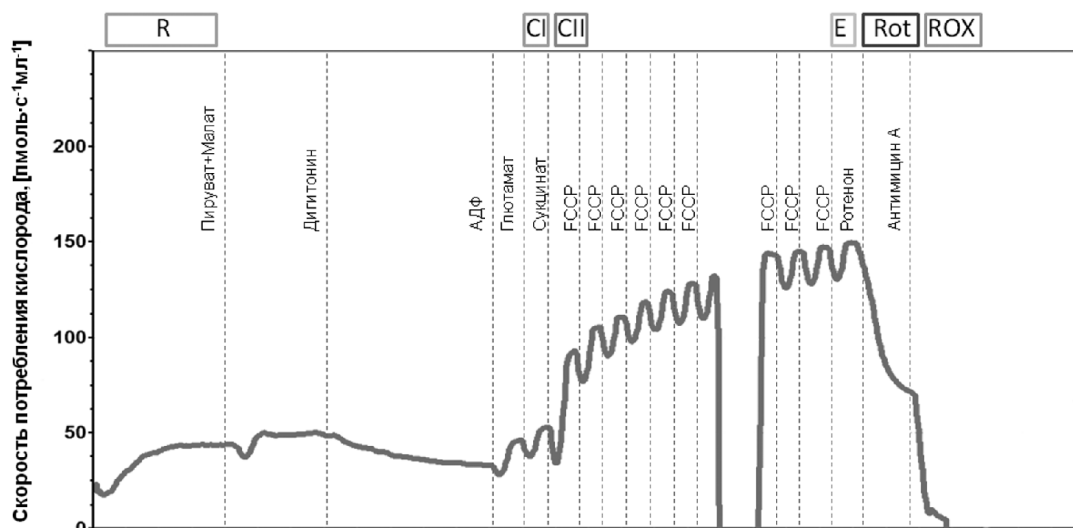
#### Измерение активности цитратсинтазы

Активность цитратсинтазы (как контрольного митохондриального фермента) в фибробластах,

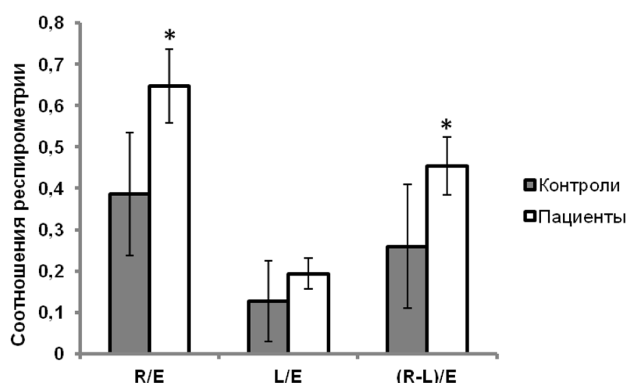
собранных из камер оксиграфа после респирометрического анализа, измеряли согласно протоколу Eigentler на спектрофотометре UV-1800 фирмы "Shimadzu" (Япония) в 1 мл кювете [14, 15]. Результаты приведены в IU/10<sup>6</sup> клеток, 1 IU цитратсинтазы соответствует количеству фермента, который катализирует образование 1 мкмоль цитрата в мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

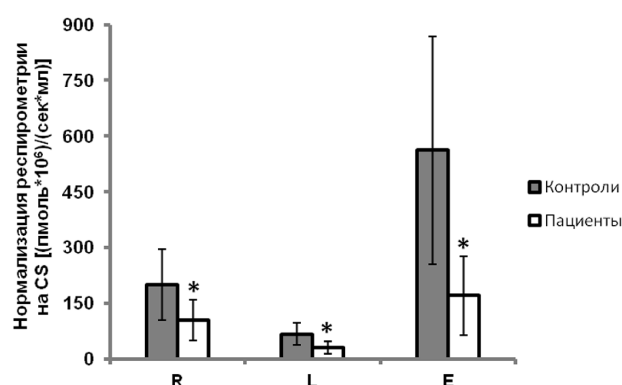
На рисунке 2 представлены результаты респирометрии интактных фибробластов пациентов и контрольной группы. Для оценки работы дыхательной цепи использовали следующие соотношения скоростей дыхания на различных этапах эксперимента: R/E, L/E, (R-L)/E. Средние значения у пациентов были соответственно 0,648±0,148; 0,194±0,097; 0,454±0,150, что примерно в 1,5 раза превышало данные значения у группы контроля. Статистические различия (p<0,05) между группами контроля и группой пациентов наблюдали только в соотношениях R/E, (R-L)/E. При нормализации показателей респирометрии в интактном протоколе на уровень цитратсинтазы (кроме пациента с m.3635G>A) выявлены статистические различия между группой контроля и группой пациентов (p<0,05) для всех респирометрических показателей R, L, E (рис. 3). Повышение соотношения (R-L)/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 было также продемонстрировано в исследовании Iueg и соавт. [16].



**Рисунок 1.** График респирометрии на пермеабиллизированных фибробластах: R - рутинное дыхание на эндогенных субстратах, скорость потребления кислорода CI - после добавления глутамата, CII - после добавления сукцината, Rot - после добавления ингибитора I КДЦМ ротенона; E - максимальная емкость дыхательной цепи после титрования FCCP, ROX - антимицин-нечувствительное дыхание после добавления ингибитора III КДЦМ антимицина А.



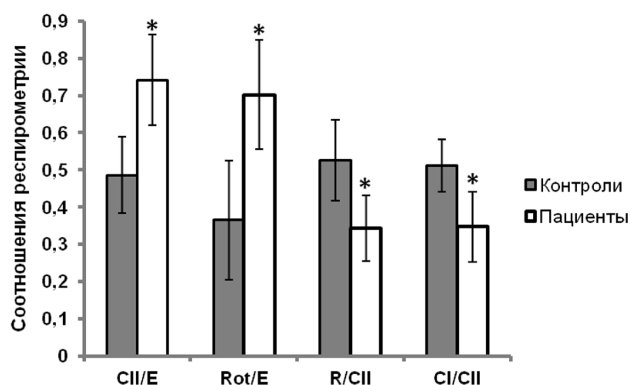
**Рисунок 2.** Результаты респирометрии на интактных фибробластах: R - дыхание клеток на эндогенных субстратах, E - максимальная скорость работы дыхательной цепи, L - скорость потребления кислорода клетками после добавления олигомицина (ингибитора АТФ-синтазы). Звёздочкой отмечены соотношения, которые имели достоверные различия ( $p<0,05$ ) между группой контроля и культурами фибробластов с дефектом I КДЦМ.



**Рисунок 3.** Результаты респирометрии на интактных фибробластах, нормализованных на уровень цитратсинтазы: R - дыхание клеток на эндогенных субстратах, E - максимальная скорость работы дыхательной цепи, L - скорость потребления кислорода клетками после добавления олигомицина (ингибитора АТФ-синтазы). Звёздочкой отмечены соотношения, которые имели достоверные различия ( $p<0,05$ ) между группой контроля и культурами фибробластов с дефектом I КДЦМ.

В исследованиях с пермеабиллизацией клеточной мембраны фибробластов (рис. 4) соотношение скоростей дыхания на эндогенных субстратах (R) к дыханию на субстратах I и II КДЦМ (R/CII) снижено по отношению к контролю ( $p<0,05$ ), что указывает на сниженный уровень окислительного фосфорилирования (OXPHOS). Также было обнаружено достоверно повышенное ( $p<0,05$ ) соотношение скоростей дыхания на смеси субстратов комплексов I и II дыхательной цепи и максимальной скорости дыхания на тех же субстратах (CII/E). Данный показатель в 1,5 раза увеличен у пациентов по сравнению с нормальными культурами, что указывает на снижение максимальной ёмкости окислительного фосфорилирования II КДЦМ.

Скорость разобщённого дыхания, чувствительного к действию ротенона, то есть зависящего от активности комплекса I (Rot/E), значительно отличается от нормы ( $p<0,05$ ), что отражает нарушение работы I КДЦМ. Уровень снижения функции I КДЦМ не отличается между группами пациентов с Ли-подобным синдромом и НОНЛ. Данный парадокс описан в работах с использованием спектрофотометрического измерения активности I КДЦМ в фибробластах пациентов с этими патологиями [8, 17]. Однако стоит учесть, что биохимический дефект I КДЦМ может быть менее выражен в клетках фибробластов по сравнению с мышечными и нервными клетками у пациентов с синдромом Ли, в особенности с мутациями в мтДНК. Такая тканеспецифичность

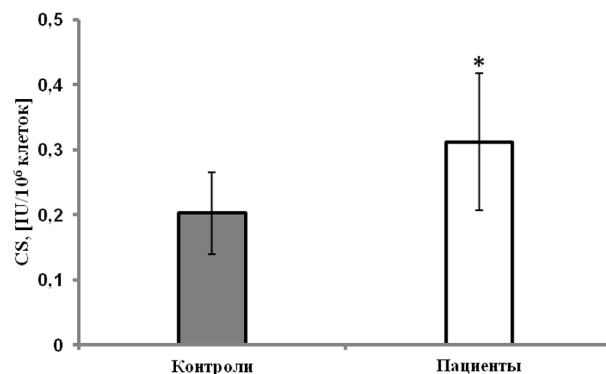


**Рисунок 4.** Результаты респирометрии на пермеабилizованных фибробластах: R - базовое дыхание клеток на эндогенных субстратах, E - максимальная скорость работы дыхательной цепи, CI - скорость потребления кислорода клетками после добавления глутамата (субстрата I КДЦМ), CII - скорость потребления кислорода клетками после добавления сукцината (субстрата II КДЦМ), Rot - скорость потребления кислорода клетками после добавления ротенона (ингибитора I КДЦМ). Звездочкой отмечены соотношения, которые имели достоверные различия ( $p < 0,05$ ) между группой контроля и культурами фибробластов с дефектом I КДЦМ.

описана для мутаций мтДНК с вариабельной степенью гетероплазмии по тканям. В нашем исследовании все мутации находились в гомоплазмическом состоянии (в клетках находится 100% мутантных молекул) в клетках фибробластов, а также в клетках крови пациентов. Ввиду данного факта, можно предположить, что респирометрия будет информативна для измерения функции I КДЦМ у представленных пациентов. Отсутствие различий в уровне снижения функции I КДЦМ между группами НОНЛ и Ли-подобный синдром может быть обусловлено включением в исследование пациентов ( $n=4$ ) с более мягким течением синдрома Ли, все пациенты старше 10-летнего возраста. У 5 пациентов (4 с Ли-подобным синдромом и 1 с НОНЛ) обнаруженные мутации ранее не были описаны в литературе. Подтверждение их функциональной значимости было особенно важным условием постановки заключительного диагноза. Таким образом, метод респирометрии зарекомендовал себя как эффективный биохимический метод подтверждения патогенности новых ранее не описанных мутаций при митохондриальных заболеваниях, связанных с недостаточностью I КДЦМ.

Соотношение CI/CII примерно в 1,5 раза снижено у пациентов с нарушением I КДЦМ по сравнению с группой контроля. Данный показатель говорит о компенсаторной активации II КДЦМ. В исследовании Yen и соавт. было показано, что у пациентов с НОНЛ активность II КДЦМ значительно повышена по сравнению с контролем, что авторы связывают с компенсаторным эффектом, направленным на увеличение скорости работы дыхательной цепи [18].

При измерении активности фермента цитратсинтазы – маркера митохондриальной массы (количества митохондрий на клетку) (рис. 5) – выявили



**Рисунок 5.** Уровень цитратсинтазы в культурах фибробластов контролей и пациентов с дефектом I КДЦМ ( $p < 0,05$ , отмечено звездочкой).

статистические различия между группой контроля и группой пациентов ( $p < 0,05$ ). Уровень активности цитратсинтазы был выше по сравнению с контрольной группой. В исследовании Distelmaier и др. было показано, что активность цитратсинтазы в культуре фибробластов, обработанных ротеноном (ингибитором I КДЦМ), была выше по сравнению с группой референсных культур. Данные изменения, вероятно, можно объяснить компенсаторным эффектом – индукция биогенеза митохондрий происходит в ответ на их дисфункцию [19]. В исследованиях по выявлению причин неполной пенетрантности у пациентов с НОНЛ показано, что здоровые носители мутаций НОНЛ имеют очень высокую активность цитратсинтазы, следовательно, повышенную митохондриальную массу; пациенты с выраженной симптоматикой имеют промежуточные значения уровня цитратсинтазы между группой контроля и здоровых носителей [20]. В нашем исследовании при пересчете показателей респирометрии на уровень цитратсинтазы (рис. 3) различия между группой контроля и пациентами намного более выражены, чем в случае использования респирометрических соотношений, следовательно, измерение цитратсинтазы имеет большее преимущество для использования в анализе данных респирометрии.

Кроме фибробластов материалом для исследования на оксиграфе могут быть и другие клетки и ткани. В исследовании Pecina и др. были использованы лимфоциты периферической крови пациентов для биохимической диагностики недостаточности I, IV КДЦМ и АТР-синтазы; авторы провели респирометрию на интактных и пермеабилizованных клетках [21]. В работе Sjoval и др. были использованы интактные и пермеабилizованные тромбоциты для оценки работы ДЦМ при помощи высокоразрешающей респирометрии [22]. Данные работы предполагают использование менее инвазивной методики исследования ДЦМ для пациентов, однако для исследования клеток крови необходимо в короткие сроки (до 4-х часов после взятия) провести биохимический анализ, поскольку комплексы ДЦМ с течением времени теряют свою активность. Однако большим

преимуществом высокоразрешающей респирометрии является малое минимальное количество исследуемого биоматериала: для фибробластов кожи – 2 млн. клеток, для крови – 10 мл венозной крови, для мышечной ткани – 3 мг биопсийного материала (размер с булавочную головку). В пользу повсеместного использования метода респирометрии также говорит тот факт, что в исследовании митохондриальной патологии более важна оценка функционирования всей дыхательной цепи, а не спектрофотометрическое определение активности комплексов. Так, ещё в 1991 году было показано, что, несмотря на нормальную активность I КДЦМ, определённую спектрофотометрическим методом в мышце у пациентов с НОНЛ, респирометрия выявила снижение функции I КДЦМ [23]. В данный феномен может вносить вклад сложная структура I КДЦМ, а также существование надмолекулярных комплексов с другими белками дыхательной цепи [24].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе исследования с помощью респирометрии, были получены результаты, указывающие на снижение активности I КДЦМ и компенсаторное повышение активности II КДЦМ у пациентов. Также выявлено повышение содержания митохондриальной массы, что может быть связано с увеличением митохондриального биогенеза в ответ на дисфункцию митохондрий. Эксперимент с интактными фибробластами достаточно прост и не занимает много времени. Он позволяет оценить уровень митохондриального мембранного потенциала и мощность разобщенного дыхания на эндогенных субстратах, однако не даёт представления о функции отдельных комплексов. Протокол с пермеабиллизированной мембраной более трудоёмок, требует титрования дигитонина для выявления оптимальных концентраций для получения максимальной проницаемости клеточной мембраны для всех субстратов дыхательной цепи. Но протокол всё же имеет ряд преимуществ: с помощью специфических субстратов и ингибиторов можно исследовать функцию отдельных КДЦМ, выявить максимальную мощность окислительного фосфорилирования. Выявленная недостаточность I КДЦМ может использоваться в качестве дополнительного диагностического критерия при постановке диагноза пациентам с митохондриальными заболеваниями. Из проведённого исследования следует, что метод респирометрии для диагностики митохондриальных заболеваний является современным и востребованным не только для измерения функции I КДЦМ, но и для оценки патогенности новых ранее не описанных изменений в нуклеотидной последовательности ДНК.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Skladal D., Halliday J., Thorburn D.R. (2003) *Brain*, **126**, 1905-1912.
2. Ben-Shachar D. (2016) *Schizophr. Res.* DOI: 10.1016/j.schres.2016.10.022
3. Rodenburg R. (2016) *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, **1857**, 938-945.
4. Leman G., Gueguen N., Desquiere-Dumas V., Selma Kane M., Wettervald C., Chupin S., Chevrollier A., Lebre A., Bonnefont J., Barth M. et al. (2015) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **65**, 91-103.
5. Praeter C., Vanlander A., Vanhaesebrouck P., Smet J., Seneca S., Sutter P., Coster R. (2015) *Eur. J. Pediatr.*, **174**, 267-270.
6. Scheffler I. (2015) *J. Inherit. Metab. Dis.*, **38**, 405-415.
7. Gerards M., Sallevelt S., Smeets H. (2016) *Mol. Genet. Metab.*, **117**(3), 300-312.
8. Fassone E., Rahman S. (2012) *J. Med. Genet.*, **49**, 578-590.
9. Yu-Wai-Man P., Chinnery P.F. (2000) *Leber Hereditary Optic Neuropathy*, GeneReviews, Seattle (WA): University of Washington, Seattle, p. 55-64.
10. Шеремет Н.Л., Невиницына Т.А., Жоржоладзе Н.В., Ронзина И.А., Иткус Ю.С., Крылова Т.Д., Цыганкова П.Г., Малахова В.А., Захарова Е.Ю., Токарчук А.В., Пантелеева А.А., Каргер Е.М., Лямзаев К.Г., Аветисов С.Э. (2016) *Биохимия*, **81**, 982-990.
11. Цыганкова П.Г. (2012) Молекулярно-генетическая характеристика болезней дыхательной цепи митохондрий у детей. Автореф. дисс. канд. наук, Медико-генетический научный центр РАМН, Москва.
12. Pesta D., Gnaiger E. (2012) *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols*, **810**, 25-58.
13. Ye F., Hoppel C.L. (2013) *Anal. Biochem.*, **437**(1), 52-58.
14. Larsen S., Nielsen J., Hansen C. (2012) *J. Physiol.*, **590**(14), 3349-3360.
15. Eigentler A., Draxl A., Wiethuchter A., Kuznetsov A., Lassnig B., Gnaiger E. (2015) *Mitochondr. Physiol. Network*, **17.04**(03), 1-11.
16. Iyer S., Bergquist K., Young K., Gnaiger E., Rao R., Bennett J. (2012) *Hum. Gene Ther.*, **23**, 647-657.
17. Angebault C., Gueguen N., Desquiere-Dumas V. (2011) *BMC Res. Notes*, **4**, 557.
18. Yen M., Lee H., Liu J., Wei Y. (1996) *Br. J. Ophthalmol.*, **80**(1), 78-81.
19. Distelmaier F., Valsecchi F., Liemburg-Apers D., Lebieczinska M., Rodenburg R., Heil S., Keijzer J., Franssen J., Imamura H., Danhauser K. et al. (2015) *Biochim. Biophys. Acta*, **1852**, 529-540.
20. Giordano C., Iommarini L., Giordano L., Maresca A. (2014) *Brain*, **137**(2), 335-353.
21. Pecina P., Houstkova H., Mracek T., Pecinova A., Nuskova H., Tesarova M., Hansikova H., Janota J., Zemanc J., Houstek J. (2014) *Biochim. Biophys. Acta Clinical*, **2**, 62-71.
22. Sjovald F., Ehinger J., Marelsson S., Morota S., Frostner E., Uchino H., Lundgren J., Arnbjornsson E., Hansson M., Fellman V., Elmer E. (2013) *Mitochondrion*, **13**, 7-14.
23. Larsson N., Andersen O., Holme E., Oldfors A., Wahlstrom J. (1991) *Ann. Neurol.*, **30**, 701-708.
24. Genova M., Lenaz G. (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 427-443.

Поступила: 12. 03. 2017.  
Принята к печати: 26. 06. 2017.

## HIGH-RESOLUTION RESPIROMETRY IN DIAGNOSTIC OF MITOCHONDRIAL DISORDERS CAUSED BY MITOCHONDRIAL COMPLEX I DEFICIENCY

*T.D. Krylova<sup>1</sup>, P.G. Tsygankova<sup>1</sup>, Yu.S. Itkis<sup>1</sup>, N.L. Sheremet<sup>2</sup>, T.A. Nevinitsyna<sup>2</sup>,  
S.V. Mikhaylova<sup>3</sup>, E.Yu. Zakharova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Research Centre for Medical Genetics,

1 Moskvorechie str., Moscow, 115478 Russia; e-mail: tatianadmkylova@gmail.ru

<sup>2</sup>Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia

Complex I (CI) deficiency is one of the most common defects in the OXPHOS system; it represents more than 30% cases of mitochondrial diseases. The group is characterized by clinical and genetic heterogeneity and comprise several nosological forms. The most prevalent phenotypes for CI are LHON and Leigh syndrome. In this study we have analyzed skin fibroblasts from 11 patients with mutations in mtDNA, which cause LHON or Leigh-like phenotypes: m.11778 G>A (n=3), m.3460 A>G (n=2), m.3635 G>A (n=1), m.3308 T>G (n=2), m.3472 T>C (n=1) and 2 patients with earlier unknown substitutions m.3945 C>A and m.14441T>C. High-resolution respirometry (HRR) on the Oxygraph-2k instrument ("Oroboros corp.", Austria) was performed for complex analysis of the mitochondrial respiratory function in intact and permeabilized fibroblasts of patients and healthy controls. Flux control ratios in intact cells R/E, (R-L)/E ( $p<0.05$ ) were raised compared to the control. Rates of R, E, L normalized on the CS were statistically varied between patients and controls. In permeabilized fibroblasts we observed differences in CII/E, Rot/E, R/CII, CI/CII ( $p<0.05$ ) between groups. These data highlight the dysfunction of the OXPHOS system and particularly CI. Increased citrate synthase level and decreased CI/CII ratio indicate compensatory metabolic response to respiratory chain dysfunction. Our results show applicability of HRR in revealing the biochemical abnormalities of complex I in fibroblasts of patients with LHON and Leigh-like syndrome. We also suggest HRR to be a useful method for inspection of other mutations causing complex I deficiency.

**Key words:** high-resolution respirometry, complex I deficiency, LHON, Leigh syndrome