

The background features a blue gradient with white and light blue curved abstract shapes. In the bottom-left corner, there is a photograph of laboratory glassware, including a graduated cylinder with markings at 2, 4, and 10, and several Erlenmeyer flasks containing blue liquid.

Профилактика МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ болезней

Бутинова Ирина
215 группа



**Митохондриальные
заболевания**— обширный класс наследственных болезней обмена веществ , обусловленных генетическими и структурно-биохимическими дефектами митохондрий и сопровождающихся нарушением тканевого дыхания

Современные методы предотвращения передачи мутаций митохондриальной ДНК

У пациентов, имеющих митохондриальные заболевания, имеется несколько репродуктивных возможностей, которые позволят предотвратить или минимизировать риск передачи их состояния детям:

1. Генетическая консультирование
2. Донорство яйцеклетки
3. Преимплантационная генетическая диагностика
4. Перенос цитоплазмы
5. Перенос ядерного генома в энуклеированные донорские ооциты
6. Перенос пронуклеусов зигот
7. Перенос веретена деления



Генетическое консультирование

мтДНК наследуется по материнской линии. Семейные исследования показали, что мутации могут возникать спонтанно или могут быть унаследованы, затрагивая многих членов семьи. Мутации широко варьируют по рискам передачи, например, одиночные делеции мтДНК часто носят спорадический характер, в то время как другие передаются с высокой степенью вероятности.

Передача мутаций мтДНК по материнской линии хорошо описана и определена, хотя исход конкретных беременностей остается непредсказуемым, особенно для гетероплазменных расстройств. Во многом это связано с генетической элиминацией, происходящей во время раннего развития, что приводит к значительным изменениям в ДНК и мутантной нагрузки в потомстве. Многие из клинических симптомов коррелируют с соотношением количества мутантной мтДНК и количества мтДНК дикого типа (или абсолютного количества ДНК дикого типа), соответственно исход для каждой беременности сложно предсказать.

В случае гомоплазменных расстройств мтДНК мутация передается всему потомству. Однако даже у таких пациентов развитие клинических признаков трудно предсказать, поскольку существует переменная пенетрантность, по-видимому, за счет сочетания действия факторов окружающей среды и генетического контроля ядра.

Таким образом, генетическое консультирование семей с митохондриальными заболеваниями остается сложной задачей

Донорство яйцеклетки

Донорские яйцеклетки от неродственного человека являются вариантом профилактики передачи мутаций мтДНК потомству. Тем не менее, несмотря на то что оплодотворение производится с помощью спермы отца, ребенок будет иметь ядерный генотип донора и генетическое родство лишь с отцом. Некоторые женщины, нуждающиеся в донорских яйцеклетках, высказывают беспокойство по этому поводу и испытывают тяжелый психологический дискомфорт, вплоть до симптомов депрессии. Кроме того, во многих странах существуют различные сложности с получением донорских яйцеклеток и выбором донора ооцитов. Другое ограничение — на данную процедуру часто затрачивается больше времени, чем на стандартную программу ВРТ с собственными ооцитами, во многом из-за времени ожидания донора.

1



Посещение гинеколога



2



Подбор женщин-кандидатов в доноры яйцеклеток



3



Выбор наиболее подходящего для вас донора яйцеклеток.

4



Донор получает курс гормональной терапии, направленной на стимуляцию овуляции



Женщина-реципиент начинает медикаментозное лечение

5



Извлечение яйцеклеток из яичников женщины-донора



6



Получение и обработка образца спермы

7



Оплодотворение яйцеклеток и культивирование эмбрионов



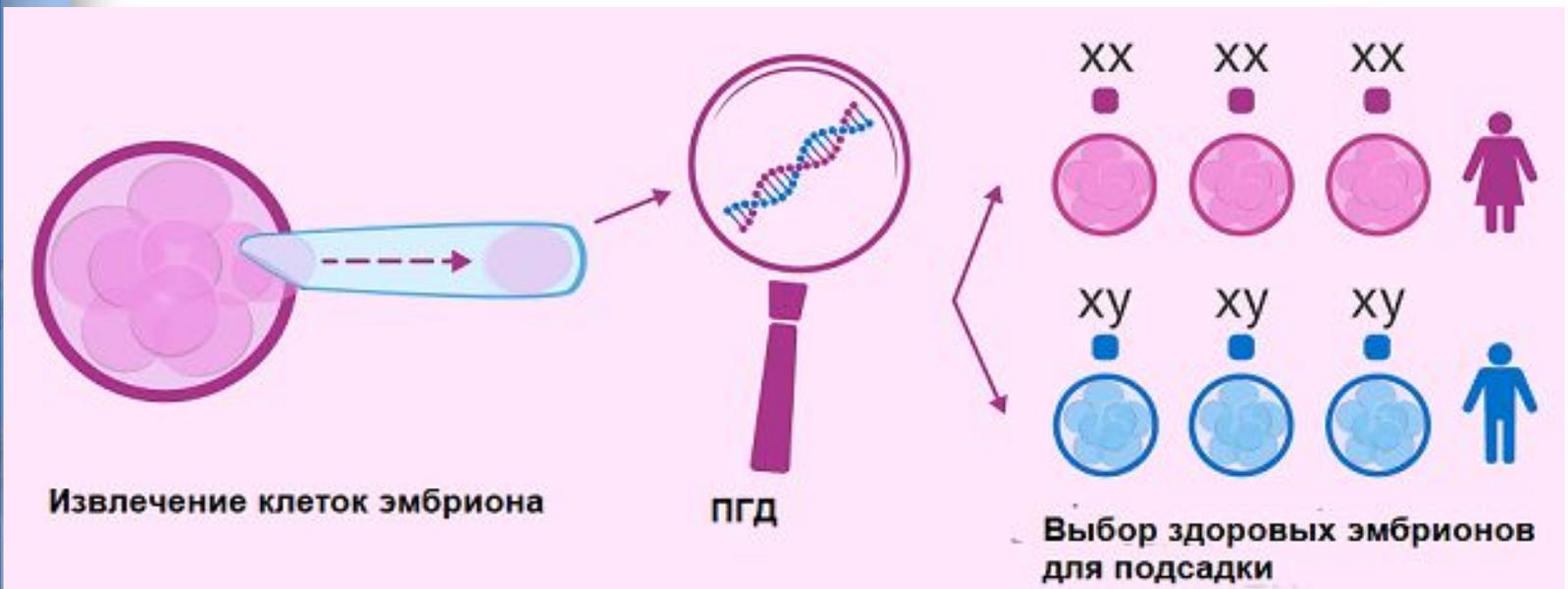
8



Перенос эмбрионов женщине-реципиенту

Преимплантационная генетическая диагностика

Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) позволяет анализировать мтДНК из полярных тел неоплодотворенных ооцитов, отдельных бластомеров 6—8 клеточных эмбрионов либо клеток трофэктодермы с последующим переносом в полость матки только здоровых эмбрионов. В настоящее время ПГД — метод выбора для пациентов с наследственными дефектами мтДНК. Показано, что каждая клетка имеет в среднем около 10 до 100 000 копий мтДНК. Хотя число копий может различаться между клетками разных эмбрионов и разных стадий развития, высокое количество копий предполагает, что возможно провести программу ПГД для митохондриальных заболеваний. Существует опасение, что полярные тела или отдельные клетки не могут отражать реального количества ДНК от общего мутационного груза, хотя эксперименты на гетероплазмичных мышцах и бластомерах человека показали однородное распространение в начале эмбриогенеза



Преимплантационная генетическая диагностика осуществляется определением моногенных и хромосомных дефектов у ооцитов и эмбрионов, а также определением числа половых хромосом с целью исключения заболеваний, сцепленных с полом. ПГД применяется для супружеских пар, имеющих высокий риск рождения детей с генетической патологией.

Перенос цитоплазмы

● Перенос цитоплазмы В этой технике нормальные митохондрии цитопластов донора переносятся в ооцит реципиента и таким образом разбавляют эффекты любого дефекта мтДНК . Перенос цитоплазмы между ооцитами человека был выполнен впервые, чтобы попытаться улучшить результаты ВРТ . Тем не менее некоторые из рожденных детей были гетероплазмичны с низким уровнем мтДНК от доноров ооцитов. Поэтому, вероятно, данный метод будет иметь небольшую ценность у пациентов с митохондриальной дисфункцией . Эксперименты на мышах показывают, что количество мтДНК донора при переносе цитоплазмы составляет меньше $1/3$ общего количества мтДНК, таким образом, доля мтДНК дикого типа изменится мало. Кроме того, есть опасения, что перенос цитоплазмы может вызвать серьезные эпигенетические модификации, а также хромосомные аномалии.

Перенос ядерного генома в энуклеированные донорские ооциты

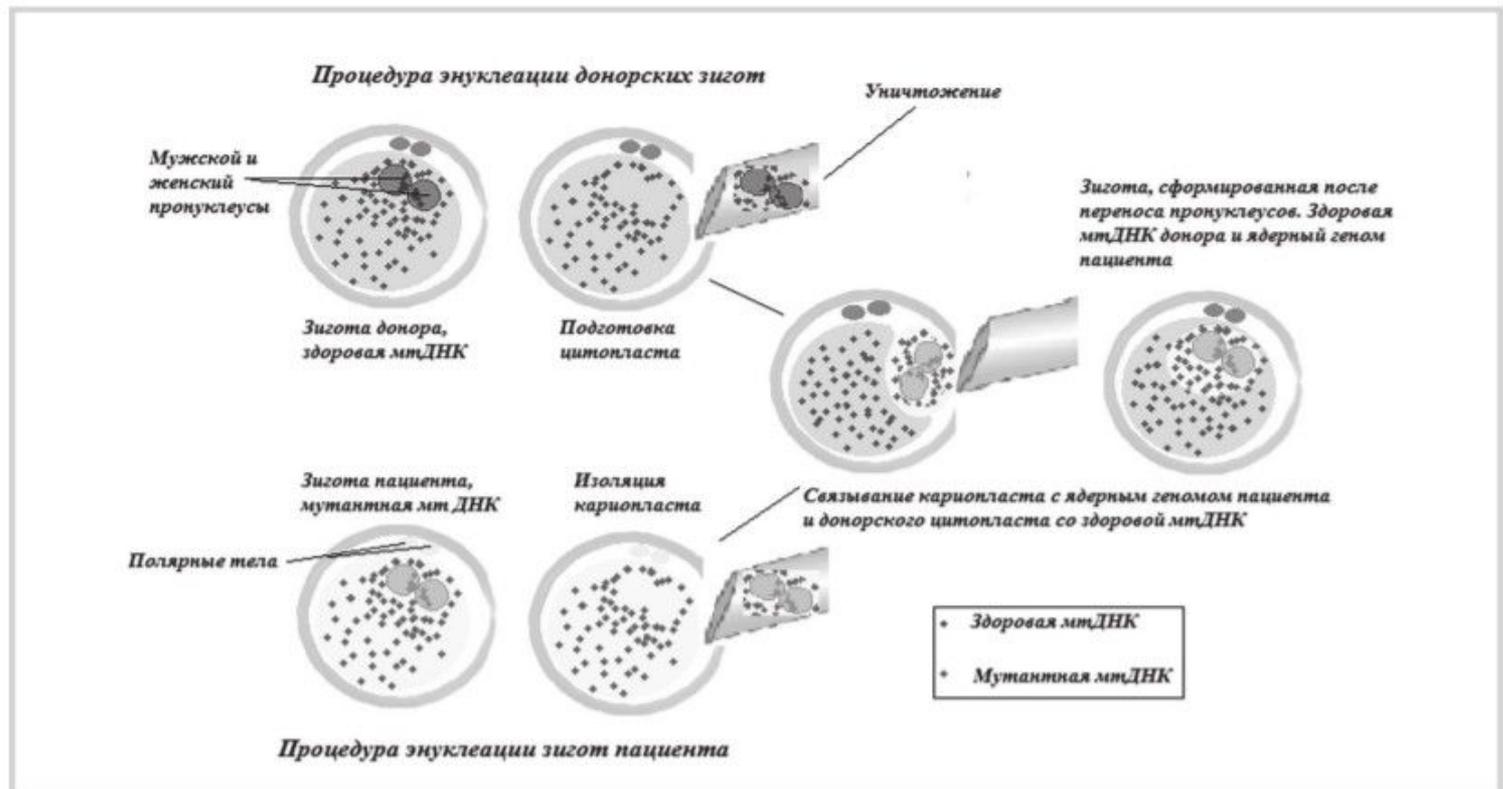
Перенос ядерного генома в энуклеированные донорские ооциты. Альтернативная стратегия предполагает перенос ядерной ДНК от матери с болезнью мтДНК в энуклеированные ооциты или эмбрионы от здоровой женщины-донора ооцитов. Существуют некоторые трудности, ассоциированные с данными процедурами. В стадии метафазы II ооцит не имеет ядерной мембраны, поэтому существует большой риск потери хромосом во время процедуры. Использование флуорофоров для визуализации хромосом в данном случае может повлиять на дальнейшее нормальное эмбриональное развитие. Если использовать ооциты в стадии зародышевого пузырька (GV), значительно снижается жизнеспособность полученных эмбрионов *in vitro*, что продемонстрировано на ооцитах человека и мыши.

Перенос пронуклеусов зигот

Стадия зиготы у млекопитающих характеризуется наличием двух пронуклеусов — мужского и женского, каждый отчетливо визуализируется и содержит гаплоидный набор хромосом ядерной (геномной) ДНК. Перенос пронуклеусов между зиготами впервые был осуществлен в начале 1980 г. на мышах, демонстрируя, что манипуляции с зиготами мыши позволяют получить жизнеспособное потомство. Сравнительно недавно перенос пронуклеусов между зиготами был использован для моделирования предотвращения передачи митохондриальных заболеваний. Эффективность переноса пронуклеусов зигот на мышах характеризуется высоким митохондриальным переносом у потомства и остается низкой в 24% случаев. Это связано с неизбежным совместным переносом небольшого количества цитоплазмы, содержащей митохондрии и мутантную мтДНК.

Таким образом, изоляция пронуклеусов, даже в небольших кариопластах, может привести к совместному переносу большого числа митохондрий

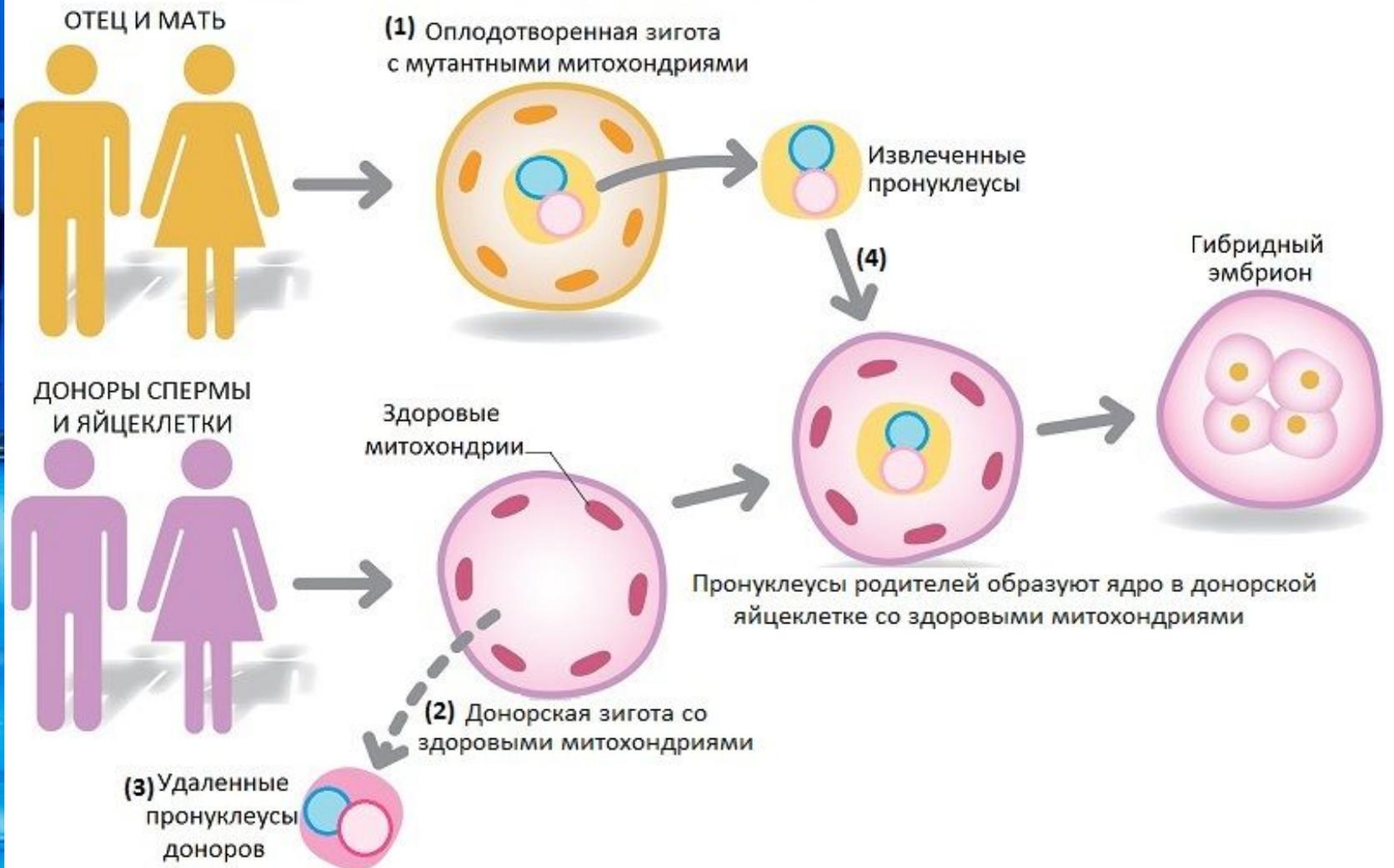
Мужские и женские пронуклеусы удаляются из зигот донора и пациента с формированием донорского цитопласта и кариопласта с ядерным геномом пациента, при помощи специальных микроинструментов. После связывания цитопласта и кариопласта эмбрионы готовы к культивированию и дальнейшему переносу. Кариопласт пациента содержит мутантные митохондрии, которые переносятся в реконструированный эмбрион. Реконструированная зигота все еще может содержать неприемлемые количества мутантной мтДНК, так называемый митохондриальный перенос.



A vertical strip on the left side of the slide shows laboratory glassware, including a beaker and a flask containing a blue liquid, set against a blue background.

Возможность переноса пронуклеусов между зиготами человека впервые продемонстрирована в 2010 г. команда ученых использовала для исследования аномальные зиготы, содержащие один или более двух пронуклеусов, которые обычно рутинно утилизируются в циклах ВРТ. Зиготы, содержащие два пронуклеуса, были реконструированы путем переноса одного пронуклеуса из полипронуклеарной зиготы в гаплоидные зиготы. Только половина реконструированных зигот содержала как мужской, так и женский пронуклеус в связи с трудностью дифференцировать их между собой в процессе процедуры. Реконструированные зиготы (n=36) культивировали до стадии бластоцисты. Три зиготы, или 8%, достигли стадии бластоцисты, анализ мтДНК показал низкий процент (менее 2%) митохондриального переноса. Несмотря на низкий процент полученных бластоцист, авторы сделали заключение о перспективности переноса пронуклеусов зигот для терапии митохондриальных заболеваний у человека. Тем не менее в настоящее время невозможно оценить безопасность и эффективность переноса пронуклеусов зигот на нормальных человеческих эмбрионах. Основываясь на данном исследовании, дальнейшее изучение метода требуется для окончательного заключения об оправданности применения переноса пронуклеусов для терапии митохондриальных заболеваний у человека

ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕНОСА ПРОНУКЛЕУСОВ



Перенос веретена деления

В 2009 г. был впервые выполнен перенос веретена деления на животной модели (макака-резус), демонстрируя, что высокая эффективность методики переноса ядерного генома может быть достигнута на стадии неоплодотворенных ооцитов. В этих экспериментах продемонстрированы эффективность и безопасность переноса веретена деления: было получено жизнеспособное потомство, которое нормально развивалось (кривые роста не отличались от кривых роста контрольной группы), более того, уровень митохондриального переноса был низким (ниже 2%).

В отличие от зигот распределение митохондрий в ооцитах однородно, что позволяет осуществить перенос веретена деления без существенного митохондриального переноса мутантной мтДНК. Кариопласты объемом около 1,5% от объема донорского цитопласта содержали мейотическое веретено деления с небольшим объемом цитоплазмы. После реконструирования ооцитов производили оплодотворение методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ). Полученные эмбрионы культивировали до стадии бластоцисты. Качество и развитие бластоцист были сопоставимы с контрольной группой. Пятнадцать бластоцист перенесли 9 суррогатным матерям, в результате чего получили три беременности и родились 4 живорожденных. Результаты были аналогичны результатам с нереконструированными эмбрионами.

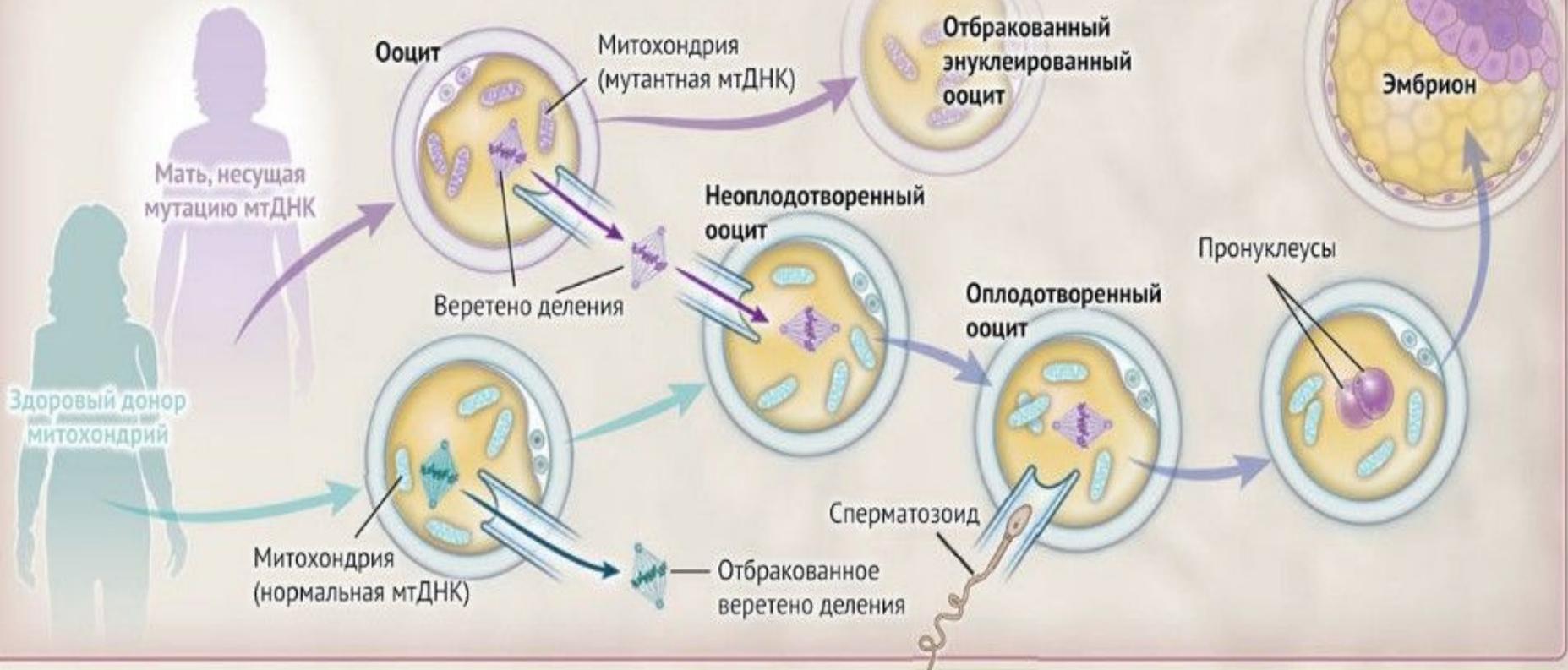


Веретено деления визуализируется при помощи специальной оптической системы микроскопа и удаляется из МП ооцитов донора и пациента. При помощи специальных микроинструментов формируются донорский цитопласт и кариопласт с ядерным геномом пациента. После связывания цитопласта и кариопласта образуется реконструированный ооцит, который оплодотворяют спермой партнера. Кариопласт пациента содержит мутантные митохондрии (менее 2%), которые переносятся в реконструированный ооцит



Исследования на ооцитах человека от доноров с различными гаплотипами мтДНК были проведены в дальней шем. Из 106 яй цеклеток, пожертвованных для исследования, 65 были подвергнуты переносу веретена деления и 33 составили контрольную группу. Частота оплодотворения в экспериментальной группе составила 73% и была близка к контрольной (75%). Однако значительная часть (52%) зигот после переноса веретена деления продемонстрировала аномальное оплодотворение (чаще присутствие трех пронуклеусов). Уровень гетероплазии в полученных эмбрионах был менее 1%. Результаты данного исследования согласуются с выводом, что перенос веретена деления может быть эффективным и безопасным методом терапии митохондриальных заболеваний с минимальным митохондриальным переносом.

В Перенос материнского веретена деления с целью предотвращения митохондриальной болезни



Заключение

Генетическая консультация семей с митохондриальной дисфункцией имеет важное значение, так как риски передачи различаются для различных мутаций мтДНК. Врачи с опытом в этой области должны обеспечить правильное консультирование и поддержку семей с выявленным риском передачи заболевания потомству. В настоящее время ПГД является методом выбора для снижения риска передачи митохондриальных расстройств, особенно у женщин с низким уровнем гетероплазмии мтДНК. Однако успешное использование ПГД зависит от количества эмбрионов высокого качества с низким уровнем мутантной нагрузки, что делает его непригодным для некоторых пациентов.

A vertical strip on the left side of the slide shows laboratory glassware, including a beaker and a flask, partially filled with a blue liquid, set against a blue background.

Новые методы микроманипуляции с неоплодотворенными ооцитами и зиготами, которые являются альтернативой донорским яйцеклеткам представляют собой перспективное и многообещающее направление для профилактики заболеваний мтДНК. Однако вопросы безопасности и эффективности этих методов должны быть тщательно изучены в дальнейшем. Ни одна из вышеописанных методик не гарантирует полной ликвидации мутантной мтДНК пациента. Поэтому необходимы дальнейшие исследования на животных моделях, доказывающие, что пенетрантность гетероплазмии мтДНК не повлияет на жизнеспособность потомства при всех методах микроманипуляции с ядерным геномом, до того, как данные методы войдут в клиническую практику. Несмотря на технические и этические проблемы этих подходов, митохондриальное донорство имеет большие перспективы, позволяющие женщинам, несущим мутации мтДНК, иметь генетически родственного ребенка без передачи мутантной мтДНК, тем самым предотвращая передачу митохондриальных расстройств.

Список литературы

1. Brown D, Herbert M, Lamb V, et al. Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the future. The Lancet. 2006;
2. Tachibana M, Sparman M, Sritanaudomchai H, et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. Nature. 2009
3. Локшин В. Н., Козлова Н. В., Нигматова Н. П. Современные методы предотвращения передачи мутаций митохондриальной ДНК в рамках вспомогательных репродуктивных технологий . Проблемы репродукции. 2015;
4. Вельтищев Ю.Е., Темин П.А. Митохондриальные болезни. В кн.: Наследственные болезни нервной системы. Под ред. Ю.Е. Вельтищева, П.А. Темина. Медицина 1998;

