

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Sanja M. Petrović Pajić

**ISPITIVANJE POVEZANOSTI PROMENA U
MITOHONDRIJSKOM GENOMU SA FENOTIPSKIM
KARAKTERISTIKAMA PACIJENATA SA LEBEROVOM
HEREDITARNOM OPTIČKOM NEUROPATIJOM**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Sanja M. Petrović Pajić

**CORRELATION OF CHANGES IN THE
MITOCHONDRIAL GENOME WITH PHENOTYPIC
CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH LEBER'S
HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

Mentor 1 doktorske disertacije:

Prof. dr Ivanka Marković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Mentor 2 doktorske disertacije:

Prof. dr Marko Hawlina, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani

Članovi komisije:

Prof. dr Dragan Vuković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Sonja Misirlić Denčić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. Dr Tanja Kalezić, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. Dr Jelena Vasiljević, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Borut Peterlin, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Ljubljani

Datum odbrane:

Zahvalnica

Istraživanje iz kojeg je proistekla ova doktorska disertacija je urađeno je u Očnoj bolnici, Univerzitetskog Medicinskog Centra Ljubljana tokom usavršavanja iz vitreoretinalne hirurgije i hirurgije katarakte, a zahvaljujući stipendiji International Council of ophthalmology-Alcon.

Zahvaljujem se:

Svom mentoru, ***profesorki dr Ivanki Marković***, na dragocenim savetima tokom svih naučno-istraživačkih koraka, strogo, ali pravičnom rukovođenju prilikom izrade ove doktorske teze, na velikom trudu i zalaganju u mnogim presudnim trenucima, na strpljenju, podršci i bezgraničnom razumevanju za neke nerazumne zahteve i za pronalaženju rešenja u nerešivim situacijama.

Svom komentoru, ***prof. dr Marku Hawlini***, mom učitelju i prijatelju, koji je nesebično delio svoje veliko znanje i iskustvo sa mnom, koji me je usmeravao, od prvih dečjih koraka u hirurgiji, preko mnogih kongresa i "čupavih" radova, realizacija nezamislivih ideja, do kraja ove disertacije. Osobi koja me je naučila šta znači biti profesor, mentor i podrška, dao mi krila i naučio me da letim, koji me je oplemenio kao čoveka i zbog koga se i dan danas trudim da budem bolja osoba.

Poštovanim članovima komisije:

Prof. dr Draganu Vukoviću, mom šefu i učitelju, na razumevanju i strpljenju tokom mog odsustva, za sve savete i bezgraničnu podršku u svakodnevnom radu, hirurgiji, ali i životnim situacijama, kao i na uloženom trudu i pomoći pri oblikovanju konačne verzije disertacije.

Prof. dr Sonji Misirlić Denčić, na svoj podršci i pomoći od pacova do limfocita i uzoraka, na svim idejama, rešenjima i savetima, na entuzijazmu, inventivnosti i ljubavi prema nauci koja me svakodnevno inspiriše. Uz malo tuge i mnogo smeha, stigle smo do cilja!

Prof. dr Borutu Peterlinu, na predvodjenju genetskog dela ovog istraživanja, pametnim i konstruktivnim instrukcijama i savetima kroz zajedničke radove, kao i na pomoći u oblikovanju konačne verzije ove doktorske disertacije.

Doc dr Tanji Kalezić, na prijateljstvu, pomoći i angažovanju prilikom oblikovanja konačne verzije ove doktorske disertacije.

Doc. Dr Jeleni Vasiljević, na podršci u mračnim trenucima, kolegijalnosti i konstruktivnim idejama prilikom oblikovanja konačne verzije ove teze.

Direktoru Klinike za očne bolesti, **prof dr Milenku Stojkoviću**, za razumevanje i podršku tokom mog boravka na usavršavanju, kao i **prof. dr Branki Stirn Kranjec** i **prof. dr Mojci Globočnik Petrović**, direktorkama Očne bolnice u Ljubljani za svu podršku i dobrodošlicu tokom divnih 15 meseci i svake naredne posete.

Neurooftalmološkom timu Očne bolnice u Ljubljani, **doc dr Martini Jarc Vidmar**, **doc dr Ani Fakin**, **doc. Maji Šuštar Habjan**, **dr Lei Kovač** i **dr Luki Lapajne**, na pomoći prilikom pregleda pacijenata, prikupljanja podataka, obrade, prezentacija, na druženju, savetima i podršci!

Svim učiteljima Očne bolnice, Univerziteteskog Medicinskog Centra Ljubljana na znanju koje su mi preneli, dragim specijalizantima i mladim specijalistima na prijateljstvu i na nezaboravnim druženjima.

Doc. Dr Dejanu Rašiću, na iskrenom prijateljstvu, nesebičnoj podršci u najtežim trenucima, konstruktivnoj kritici i vetru u leđa za sve hirurške i naučne poduhvate.

Prof. dr Miroslavu Kneževiću, **dr Vladimiru Milutinoviću**, **dr Ranku Gvozdenu** i svim dragim specijalizantima kojima sam krv „pila“, i svim sestrama, naročito sestri Vidi, koje su mi zdušno pomagale u tome.

Dragim kolegama i prijateljima sa Klinike za očne bolesti, Univerziteteskog Kliničkog Centra Srbije za pomoć prilikom izrade disertacije, kao i tokom zajedničkog rada.

Doc dr Anđelki Isaković i **dr Kasji Pavlović**, za pomoć u eksperimentalnom delu ove teze, za zalaganje, trud, želju, volju i istrajnost da se, i pored svih obaveza i prepreka, uz osmeh, obrade svi uzorci.

Dr Mariji Volk i **dr Alešu Maveru**, za genetsku analizu i strpljive odgovore na mnoga glupa pitanja.

Prof dr Janezu Stare i **dr Boru Vratnaru** za statističku analizu i obradu podataka, Olgi i Petru za nemerljivu pomoć u pripremi podataka za izradu disertacije i kumu Žiletu za svu pomoć oko formatiranja slika za radove koji su proistekli iz ove teze.

Dr sci Mirelli Barbone na podršci u Math Labu, entuzijazamu i istrajnosti. Kroz filtere svih frekvencija isfiltriralo se divno prijateljstvo!

Darku Pavlšku i **Barbari Klemenc** na svim OCT snimcima, foto fundusima, angiografijama i ostalim snimanjima urađenima tokom ovog istraživanja, a laborantima Nadi i Sanji na volji da u pola noći izdvajaju limfocite.

Mojoj porodici, kumovima i prijateljima, mirnoj luci i oazi, i onima kojih više nema, ali su stalno prisutni u srcima i mislima.

Mojoj mami, koja me naučila da hodam, čitam, pišem, mislim, imam stavove, koja je moja stena, moja podrška, moja snaga, majka i otac koji na žalost nije sa nama.

Mojoj sestri Tiani, oftalmologu, naučniku, svađalici, na konstruktivnim savetima i kritikama, nepopijenim kafama provedenim u kucanju podataka, na pomoći i podršci na koju uvek mogu da računam. I na kumovima Olgi i Petru koji su jednim programom rešili noćnu moru prikupljanja podataka.

Mojoj baki, tetki, svekru i svekrvi na razumevanju za propuštena porodična okupljanja i na pomoći sa decom u svim satima provedenim za računarom.

Mojim sinovima, ***Milošu i Mateji***, neiscrpnim generatorima ljubavi, energije i snage da idem dalje. Na svim zagrljajima, poljupcima, maženju pred spavanjem, na svakom "volim te najviše" i na svakom minutu sreće kojim su ispunili moj život.

Mom suprugu, ***Zoranu Pajiću***, čuvaru moje vatre, stabilnosti moje bure, oseki moje plime, mojoj polovini jabuke, na... apsolutno svemu!

For those who shine through....

ISPITIVANJE POVEZANOSTI PROMENA U MITOHONDRIJSKOM GENOMU SA FENOTIPSKIM KARAKTERISTIKAMA PACIJENATA SA LEBEROVOM HEREDITARNOM OPTIČKOM NEUROPATIJOM

Sažetak

Cilj ove doktorske disertacije bila je detaljna genotipska i fenotipska karakterizacija grupe pacijenata sa kliničkom slikom Leberove hereditarne optičke neuropatije (LHON) u akutnoj ili hroničnoj fazi bolesti i funkcionalna analiza mitohondrijske funkcije kod nosilaca mogućih novih patogenih mutacija.

Metodologija: U grupi od 82 pacijenata sa kliničkom slikom LHON-a urađena je genetska analiza (MLPA, sekvenciranje nove generacije mitohondrijske DNK [mtDNK], celog egzoma i genoma), kao i detaljna fenotipska karakterizacija (vidna oštrina, kolorni vid, optička koherentna tomografija [OCT] i elektrofiziologija). Karakteristike genetski različitih grupa međusobno su poređene. Kod nosilaca novih mogućih patogenih mutacija izvedeni su testovi mitohondrijske funkcije (respirometrija visoke rezolucije Oroboros i protočna citometrija).

Metodom spekularne mikroskopije, utvrđivali smo i broj endotelih ćelija rožnjače.

Rezultati: Kod 17 pacijenata je identifikovan genetski uzrok LHON-a, a kod 6 pacijenata promene u mitohondrijskoj DNK (retke mutacije) koje su mogući uzročnici pojave LHON-a. Testovi mitohondrijske funkcije su kod ovih pacijenata pokazali smanjenu aktivnost kompleksa I lanca prenosilaca elektrona, povećanu produkciju slobodnih kiseoničnih radikala (ROS) i depolarizaciju unutrašnje membrane miohondrija, što ukazuje na patogenu prirodu identifikovanih promena. Kod 2 pacijenta, čije su fenotipske karakteristike prikazane zasebno, potvrđen je autozomno recesivni LHON. Kod nekoliko pacijenata sa genetski potvrđenim LHON-om došlo je do poboljšanja vidne oštrine. Poređenjem fenotipskih karakteristika ovih pacijenata sa pacijentima bez poboljšanja utvrđena je bolja očuvanost pojedinih slojeva retine u srednjem ETDRS prstenu, kao i bolje elektrofiziološke karakteristike u akutnoj i u hroničnoj fazi bolesti. Kod izvesnog broja pacijenata i pored jasnog fenotipa LHON-a nije identifikovana genetska osnova, ali su upoređivane fenotipske karakteristike ovih pacijenata sa grupom genetski potvrđenih LHON pacijenata radi identifikovanja kliničkih biomarkera bolesti. Utvrđeno je postojanje bolje očuvanosti debljine unutrašnje retine kod LHON pacijenata što se stoga može smatrati potencijalnim biomarkerom bolesti, kao i smanjen broj endotelih ćelija rožnice.

Zaključak: Rezultati prikazani u okviru ove teze pomogli su boljoj karakterizaciji pacijenata sa LHON-om, kao i identifikaciji potencijalnih biomarkera bolesti. Takođe su identifikovane nove promene u mtDNK, i potvrđena je njihova potencijalna patogenost.

Ključne reči: Leberova hereditarna optička neuropatija (LHON), sekvenciranje nove generacije, mtDNK, optička koherentna tomografija (OCT), segmentacija, elektrofiziologija, oscilatorni potencijali

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj: _____

CORRELATION OF CHANGES IN THE MITOCHONDRIAL GENOME WITH PHENOTYPIC CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH LEBER'S HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY

Abstract

The goal of this doctoral dissertation was to genotypically and phenotypically characterize a group of patients with a clinical presentation of Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON) in the acute and chronic phase of the disease and perform functional analysis of the mitochondrial function in carriers of the possible pathogenic novel changes in mitochondrial DNA.

Methodology: Genetic analysis (MLPA, next-generation sequencing of the mtDNK, whole exome, and genome) and detailed clinical work-up (visual acuity testing, color vision, optical coherent tomography (OCT), and electrophysiology) were performed in a group of 82 patients with phenotypic characteristics of LHON. Patients were divided into groups based on the genetic testing results and their phenotypic characteristics were compared. In patients with identified novel mtDNK changes testing of mitochondrial function was performed. We have also determined the count of endothelial cells in patients with confirmed LHON.

Results: We have identified the genetic cause of LHON in 17 patients, and possible causative pathogenic mtDNK changes (rare mutations) in 6 patients. Mitochondrial function testing in these patients showed decreased complex I-based respirometry, membrane depolarization and increased ROS production. These results indicate the pathogenic nature of the novel changes. Autosomal recessive LHON as a distinct entity has been identified in two patients and presented separately. The improvement of the visual function has been noticed in 4 LHON patients. By comparing the phenotypic characteristics of LHON patients with and without visual function improvement we have concluded that there is better preservation of the retinal layers in the middle ETDRS ring and that these patients have better electrophysiology results both in the acute and the chronic phase in patients with improvement. A certain number of patients remained unclarified regardless of the typical LHON phenotype. We have compared the phenotypic characteristics of these patients with a group of patients with genetically confirmed LHON in order to identify clinical biomarkers of the disease and concluded that in genetically confirmed LHON patients there is a better preservation of the ETDRS center which could be a novel biomarker of the disease. We have also found a small decrease in the endothelial cell count in the cornea of LHON patients.

Conclusions: The results presented in this doctoral dissertation have attributed to a better characterization of LHON patients and the identification of novel biomarkers of the disease. We have also identified novel changes in the mtDNK whose pathogenicity has been proven by the serial of the mitochondrial function tests.

Keywords: Leber hereditary optic neuropathy (LHON), next-generation sequencing, mtDNK, optical coherent tomography (OCT), segmentation, electrophysiology, oscillatory potentials

Scientific field: Medicine

Scientific subfield: Molecular medicine

UDC number: _____

SADRŽAJ

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | UVOD..... | 1 |
| 1.1 | Mitohondrije | 1 |
| 1.1.1 | Struktura mitohondrija | 1 |
| 1.1.2 | Mitohondrijski genom..... | 2 |
| 1.1.3 | Oksidativna fosforilacija (OXPHOS) | 4 |
| 1.1.4 | Slobodni kiseonični radikali, odnosno reaktivne kiseonične vrste (ROS)..... | 7 |
| 1.1.5 | Kompleks I..... | 8 |
| 1.2 | Mitohondrijske bolesti | 9 |
| 1.2.1 | Mutacije mtDNK..... | 9 |
| 1.2.2 | Mutacije u nuklearnoj DNK (nDNK) i mitohondrijske bolesti | 10 |
| 1.3 | Funkcionalna anatomija retine | 11 |
| 1.4 | Leberova hereditarna optička neuropatija | 15 |
| 1.4.1 | Genetske osobine i nasleđivanje kod LHON-a | 15 |
| 1.4.2 | Kliničke osobine LHON pacijenata..... | 18 |
| 1.4.3 | Elektrofiziološke karakteristike LHON pacijenata..... | 27 |
| 1.4.4 | Uticaj mutacija povezanih sa LHON na biohemijske karakteristike ćelija | 39 |
| 1.4.5 | LHON plus..... | 41 |
| 1.4.6 | Sekundarne optičke neuropatije i diferencijalna diagnoza | 41 |
| 1.4.7 | Terapijski pristupi lečenju LHON-a | 42 |
| 1.4.8 | Dijagnostički proces kod LHON-a | 43 |
| 2 | CILJEVI ISTRAŽIVANJA..... | 44 |
| 3 | MATERIJAL I METODE..... | 45 |
| 3.1 | Genetska analiza | 45 |
| 3.1.1 | Multipla ligand-zavisna amplifikacija (Multiplex ligand-dependent probe amplification MLPA) 45 | |
| 3.1.2 | Sekvenciranje mitohondrijske DNK..... | 46 |
| 3.1.3 | Sekvenciranje egzoma..... | 47 |
| 3.1.4 | Analiza verzija..... | 47 |
| 3.1.5 | Strategija filtriranja verzija | 47 |
| 3.2 | Klinička ispitivanja | 48 |
| 3.2.1 | Elektrofiziološka ispitivanja | 48 |
| 3.2.2 | OCT spektralnog domena SD-OCT (Spectral Domain-Optical Coherence Tomography) 49 | |
| 3.2.3 | Spekularna mikroskopija | 50 |
| 3.3 | Ispitivanje mitohondrijske funkcije | 50 |
| 3.3.1 | Respirometrijska analiza MNČPK | 50 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.3.2 | Određivanje membranskog potencijala mitohondrija i produkcije ROS..... | 51 |
| 3.4 | STATISTIČKA ANALIZA..... | 52 |
| 4 | REZULTATI..... | 54 |
| 4.1 | GENETSKA ANALIZA PACIJENATA SA KLINIČKOM SLIKOM LHON-a | 54 |
| 4.1.1 | Rezultati genetskog testiranja pacijenata | 54 |
| 4.2 | FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA PACIJENATA SA ATIPIČNIM MUTACIJAMA..... | 65 |
| 4.2.1 | Autozomno recesivni LHON | 65 |
| 4.2.2 | Fenotipska karakterizacija pacijenata sa novoidentifikovanim mutacijama (VUS) u mitohondrijskoj DNK (mtDNK) | 74 |
| 4.3 | REZULTATI ISPITIVANJA FUNKCIJE MITOHONDRIJA U MONONUKLEARNIM ĆELIJAMA PERIFERNE KRVI PACIJENATA SA NOVOIDENTIFIKOVANIM PROMENAMA U MITOHONDRIJALNOJ DNK 102 | |
| 4.3.1 | Ispitivanje respiracije u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz krvi pacijenata sa LHON 102 | |
| 4.3.2 | Ispitivanje produkcije superoksidnog anjona..... | 104 |
| 4.3.3 | Ispitivanje polarizacije unutrašnje membrane mitohondrija kod LHON pacijenata .. | 105 |
| 4.4 | REZULTATI ANALIZE SEGMENTACIJE OPTIČKOM KOHERENTNOM TOMOGRAFIJOM..... | 108 |
| 4.4.1 | Segmentaciona analiza debljine retinalnih slojeva optičkom koherentnom tomografijom | 108 |
| 4.4.2 | Analiza karakteristika optičkog diska optičkom koherentnom tomografijom | 115 |
| 4.5 | REZULTATI ODREĐIVANJA ELEKTROFIZIOLOŠKIH PARAMETARA | 120 |
| 4.5.1 | Rezultati analize fokalnog ERG (FERG), pattern ERG-a (PERG) i vizuelnih evociranih potencijala (VEP) | 120 |
| 4.5.2 | Elektroretinogram celog polja (full-field ERG) | 121 |
| 4.5.3 | Korelacije strukture i funkcije..... | 128 |
| 4.6 | REZULTATI SPEKULARNA MIKROSKOPIJA | 130 |
| 4.7 | PODGRUPE GENETSKI POTVRĐENIH LHON PACIJENATA SA SPECIFIČNIM KARAKTERISTIKAMA..... | 132 |
| 4.7.1 | Podgrupa LHON pacijenata sa poboljšanjem vidne oštine..... | 132 |
| 4.7.2 | Podgrupa pacijenata sa monokularno lošom vidnom oštrinom od detinjstva (LHON ili ambliopija) | 135 |
| 5 | DISKUSIJA | 140 |
| 6 | ZAKLJUČCI..... | 159 |
| 7 | LITERATURA..... | 160 |

1 UVOD

1.1 *Mitochondrije*

Mitochondrije su organele prisutne u svim eukariotskim ćelijama, one su primarni izvor energije i imaju centralnu ulogu u zdravlju i preživljavanju ćelija. To su organele sa dvostrukom membranom koje imaju centralnu ulogu u obezbeđivanju energija za ćeliju (1). Dvostruka mitohondrijska membrana ograničava četiri “mitohondrijska prostora” gde se odvijaju reakcije različitih metaboličkih puteva: spoljašnja membrana, unutrašnja membrana, međumembranski prostor i matriks.

Spoljašnja membrana mitohondrija (SMM) je propustljiva za jone i male proteine (MW<10 kDa) zbog prisustva velikih sprovodnih kanala (mitohondrijski porinski ili voltažno- zavisni anjonski kanali (VDAC)) (1). Zato je po koncentraciji metabolita i jona međumembranski prostor veoma sličan citoplazmatskom. Drugi proteini koji su aktivni u spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani su uključeni u unos proteina sintetisanih u citosolu i kao iaktiviranih masnih kiselina, koje u matriksu ulaze u process beta-oksidacije. Međumembranski prostor sadrži oko 6% ukupnih mitohondrijskih proteina, a najviše je zastupljen citohrom c, komponenta sistema oksidativne fosforilacije (OXPHOS). U međumembranskom prostoru nalaze se i enzimi koji su uključeni u energetski metabolizam (adenilat kinaza i kreatin kinaza), u slobodnih kiseoničnih radikala (engl. reactive, oxygen species, ROS) i organizaciju membrana, kao i proapoptotski proteini. U poređenju sa SMM, unutrašnja mitohondrijska membrana (UMM) ima viši odnos protein:fosfolipid (3:1 vs. 1:1 u SMM) i bogata je kardiolipinom koji izgleda da igra centralnu ulogu ne samo u održavanju membranskih struktura već takođe i u interakcijama između transmembranskih proteina (2),(3). Unutrašnja membrana je organizovana u mnogobrojne invaginacije, koje se nazivaju kriste, koje protrudiraju u matriks.

1.1.1 *Struktura mitohondrija*

Mitohondrijske kriste sadrže sve komplekse lanca prenosilaca elektrona i osnova su sistema oksidativne fosforilacije (OXPHOS). Pošto je OXPHOS glavni izvor za sintezu ATP-a u ćeliji, ekstenzija i organizacija kristi zavisi od energetskih potreba ćelije. U zavisnosti od metaboličkih potreba tkiva, menja se i broj kristi mitohondrija, tako da povećanje broja kristi ukazuje na veći intenzitet oksidativne fosforilacije (4). Pored OXPHOS kompleksa, unutrašnja membrana mitohondrija sadrži nekoliko transportnih sistema, koji omogućavaju da ATP sintetisan u mitohondrijama može da se prenese u citosol. Na unutrašnjoj membrani mitohondrija se mogu razlikovati dva različita segmenta: unutrašnja granična membrana, koja ograničava međumembranski prostor i okrenuta je ka spoljašnjoj membrani, i membrana krista. Elektronska mikroskopska tomografija (EMT) je pokazala da kriste nisu samo nasumični nabori na unutrašnjoj membrane, već unutrašnji odeljci formirani invaginacijom membrane (5), (6). Ove invaginacije proističu iz mesta gde unutrašnja granična membrana i membrana krista formiraju tubularne veze.

Ove dinamične strukture, koje se zovu spojevi kristi se definišu kao peti mitohondrijski prostor: međukristni prostor (1). Morfologija kriste je visoko varijabilna, ne samo između različitih organizama ali isto tako i unutar jedne organele.

Kontaktne mesta su definisana kao regioni jakih veza između SMM i UMM: u ovim regionima dve membrane interaguju da bi se omogućio uvoz proteina kodiranih u jedru ili transport nosilaca ATP-a u citosol. Mitohondrijski matriks sadrži visoku koncentraciju mešavine različitih proteina, i u njemu se vrši važni katabolički procesi, kao što su beta oksidacija masnih kiselina i trikarboksilnih kiselina (Krebsov ciklus). Zajedno sa enzimima i kofaktorima kataboličkog metabolizma, matriks sadrži i sve komponente mašinerije za sintezu mitohondrijskih proteina i nekoliko kopija mitohondrijskih DNK molekula, kao i enzime antioksidativne zaštite, kao što su, na primer, mangan superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i peroksiredoksin.

Mitohondrije se obično predstavljaju kao okrugle pojedinačne organelle ali je razvoj fluorescentne mikroskopije, zajedno sa brojnim mitohondrijskim fluorescentnim probama, dozvolio tačniji i realističniji uvid u mitohondrijsku organizaciju živih ćelija. Mitohondrije izgledaju i funkcionišu više kao kontinuirana tubularna mreža nego kao pojedinačni entiteti, i slika pojedinačnih mitohondrija dobijena EMT je zapravo transverzalnog preseka jednog mitohondrijskog tubula (1).

1.1.2 Mitohondrijski genom

Prema teoriji evolucije, mitohondrije potiču od simbioze između aerobnih bakterija i primordijalnih eukariotskih ćelija. Posle simbioze deo protomitohondrijskog genoma koji je sadržavao sve informacije potrebne slobodno-živećem organizmu, je prenet u nukleus (7).

Mitohondrijski poremećaji su klinički entiteti povezani sa sigurnim ili pretpostavljenim genetskim defektima mitohondrijskog OXPHOS sistema (8). Tkiva i organi koji za svoje funkcionisanje zahtevaju velike količine energije, kao što su neuroni i mišićna vlakna, zavisna su od adekvatnog snabdevanja ATPom. Ovo objašnjava zašto primarni mitohondrijski poremećaji uglavnom izazivaju neuro degeneraciju i/ili mišićnu slabost i kod odraslih i kod dece (9). Ipak specifični mitohondrijski sindromi mogu da zahvate bilo koji organ, bilo pojedinačno ili pak udruženo sa poremećajem mozga i skeletnih mišića. Činjenica da su proteini mitohondrija kodirani i jedanom i mitohondrijskom DNK, kao i kompleksnost mreže biohemijskih reakcija povezanih sa OXPHOS, doprinose velikoj kliničkoj i genetskoj heterogenosti mitohondrijskih poremećaja. Takođe, mnoge patogene mitohondrijske mutacije su heteroplazmične što znači da su u ćeliji zajedno prisutne kopije mutirane DNK i nemutirane, (engl. *wild type*, *wt*) mitohondrijske DNK, u varijabilnom procentu. Ovaj procenat može da varira od tkiva do tkiva, kao i u svakoj individui (10), na taj način određujući kliničke ishode i tkivno-zavisnu prezentaciju kod različitih osoba. Zbog poliplazmije transmisije mutirane DNK u odnosu na *wt* mitohondrijsku DNK, njihova zastupljenost umnogome zavisi od stohastičke distribucije organela tokom mitoze u somatskim ćelijama, kao i od mejotičke podele u ženskim germinativni ćelijama, ali i od kapaciteta različitih tkiva da prevaziđu disfunkciju

OXPHOS uzahvaćenim ćelijama. Usled toga, ista mutacija može da bude povezana sa potpunim odsustvom simptoma kada je procenat heteroplazmije u kritičnim tkivima nizak, ili može da prouzrokuje dijapazon različitih kliničkih sindroma ukoliko je zastupljen viši stepen heteroplazmije (11).

Iako kod eukariota mitohondrije u svojoj DNK sadrže gene koji nose informacije o sintezi proteina mitohondrija, i dalje su kompletno zavisne od nuklearnog genoma u smislu kataboličkog i energetskog metabolizma, translacije i replikacije DNK (8).

Molekul mtDNK sisara sadrži 37 gena koji kodiraju 13 polipeptida i 24 RNK (22 transportne i 2 ribozomalne RNK) koji su esencijalni za *in situ* sintezu proteina. Ovo je neophodno zato što se genetski kod mtDNK razlikuje od univerzalnog koda, pa se nuklearni i mitohondrijski genom ne mogu prevoditi jedan u drugi (12).

Trinaest polipeptida koje kodira mtDNK- su subjedinice pet OXPHOS kompleksa (c): Kompleks I (ND1-ND4, ND4L, ND5, ND6), Kompleks III (Citohrom b), Kompleks IV (COI, COII, COIII) i Kompleks V (ATP6, ATP8), koji reaguju sa preko 70 proteina kodiranih jedarnom DNK i nekoliko neproteinskih prostetskih grupa (8). Sve ostale delove subjedinica, kao i mitohondrijalne transkripcione i translacione faktore, i druge mitohondrijske enzime kodira nuklearna DNK (8).

MtDNK je, zajedno sa enzimima i drugim proteinima, organizovana u strukture zvane nukleoid, i približno ima 2-10 kopija po nukleoidu (13).

Mitohondrijski genom se udvaja nezavisno od ćelijskog ciklusa i u mitotičnim, i u postmitotičnim ćelijama. Individualni mtDNK molekuli u jednom ćelijskom ciklusu mogu da se umnožavaju više od jednom, ili pak nijednom (14) i mtDNK molekuli se nasumično raspoređuju u ćerke ćelije.

Suprotno nuklearnoj DNK, koja je u somatskim ćelijama prisutna kao diploidna, i prenosi se mendelejevskim načinom nasleđivanja, mtDNK je prisutna u svakoj ćeliji u hiljadama kopija (poliplazmija) i prenos sa generacije na generaciju se vrši isključivo preko ženskih gameta. U zigotu, dešava se eliminacija paternalne mtDNK, verovatno zato što su, na putu do oocita, spermatozoidi podložni visokom riziku od oksidativnog stresa. Maternalno nasleđivanje takođe dovodi do prenosa mutacija u mtDNK na potomstvo, što vodi ka razvoju bolesti.

Pošto svaka ćelija ima multiple kopije mtDNK molekula, prisustvo mutacija može da dovede do dva različita genetska stanja, definisana kao homoplazmija i heteroplazmija. Kada su svi mtDNK molekuli u ćeliji ili individui identični, u pitanju je homoplazmija, a u heteroplazmičnom stanju mutirani i izvorni (engl. *wild-tip*, *wt*) molekuli koegzistiraju u istoj ćeliji. U ovom slučaju, zbog nasumične segregacije, u deobi svake ćelije proporcija mutirane i *wt* mtDNK može potencijalno da skrene ka homoplazmičnom mutiranom ili homoplazmičnom *wt* stanju.

Uprkos visokom broju kopija mtDNK u zrelih oocitima (15), samo nekoliko njih se prenosi tokom mejoze, zbog fenomena "uskog grla" (engl. *bottleneck*) (14). Mitohondrijsko usko grlo se događa u

primordijalnoj germinativnoj liniji, dok se masivno povećanje u broju kopija mtDNK u ćeliji kopija dešava kroz formiranje zrelih oocita. Na ovaj način, genomske varijante mogu biti selektovane prouzrokujući genetski pomerač (tzv. šift) među generacijama, isto kao što randomizirana mitohondrijska segregacija tokom mitoze može da prouzrokuje genetski pomerač tokom života nosioca mtDNK mutacije.

Takođe, postoji mogućnost da nisu sve mtDNK jednako tretirane u germinativnoj liniji tokom duplikacije, što znači da neke mutacije mogu da imaju replikativnu prednost. Različite studije su pokušale da objasne zašto postoji takva heterogenost prenosa mutacije kod maternalnog nasleđivanja, i zaključeno je da je kod sisara transmisija polimorfni i patogenih mtDNK sekvenci primarno stohastički proces (13).

1.1.3 Oksidativna fosforilacija (OXPHOS)

Mitohondrije su glavni izvor najvažnijeg visokoenergetskog jedinjenja u ćeliji, adenzin trifosfata (ATP), koji se sintetiše u mitohondrijskom lancu prenosilaca elektrona kroz proces oksidativne fosforilacije (OXPHOS). Supstrat oksidativne fosforilacije su redukcion ekvivalenti koji nastaju u reakcijama katabolizma ugljenih hidrata, lipida i proteina. ATP je neophodan za sve aktivne procese u ćeliji i njegov nedostatak vodi ka ćelijskoj disfunkciji i na kraju smrti. Iako se većina reakcija oksidacije hranljivih materija odvija unutar mitohondrija, te unutar mitohondrija dolazi i do redukcije koenzima ($\text{NADH} + \text{H}^+$ i FADH_2) koji direktno predaju svoje redukcion ekvivalente lancu prenosilaca elektrona u mitohondrijama, neki katabolički putevi (npr. glikoliza) se odvijaju u citosolu, gde dolazi i do redukcije NAD u $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Pošto je unutrašnja membrana mitohondrija vrlo slabo propusna (osim za gasove i molekule za koje na istoj postoji transporter), redukcion ekvivalenti koji potiču iz citosolnog $\text{NADH} + \text{H}^+$ se prenose u mitohondrije sistemima povratnog transporta.

Krajnji akceptor elektrona koji se transportuju preko kompleksa respiratornog lanaca je molekularni kiseonik koji se tom prilikom redukuje u vodu.

Redukcija kiseonika događa se kroz višestepeni proces: Kompleks I (NADH:ubihinon oksidoreduktaza) ili kompleks II (sukcinat:ubihinon oksidoreduktaza) prihvataju dva elektrona porekla $\text{NADH} + \text{H}^+$ ili FADH_2 i predaju ih CoQ dajući ubisemihinon ($\text{CoQ}\bullet$) i potom ubihinol (CoQH_2).

Kompleks II je jedini enzimski kompleks respiratornog lanaca koji nije transmembranski, te nema aktivnost pumpanja protona iz matriksa u međumembranski prostor, ali predstavlja alternativnu tačku ulaska za elektrone i tačku provere za koordinaciju između Krebsovog ciklusa i oksidativne fosforilacije.

Ubihinol se oksiduje kada elektroni pređu na kompleks III (ubihinol:citohrom c oksidoreduktaza) koji dalje predaje elektrone citohromu c. Kompleks III postoji kao simetrični dimer gde se svaki monomer sastoji od 11 podjedinica.

Citohrom C predaje elektrone kompleksu IV (Citohrom oksidaza), koji katališe reakciju konačne redukuje molekularnog kiseonika do molekula vode. Kompleks IV se sastoji od 13 subjedinica; tri od njih - I, II and III – su kodirane mitohondrijskim genima i predstavljaju katalitičko jezgro enzima. Energiju koja se oslobađa ovim prilikom prenosa elektrona sa NADH+H⁺ na kompleks I, ztim na kompleks III i na kompleks IV koristi se na nivou CI, CIII i CIV za pumpanje protona preko UMM u međumembranski prostor. Kao rezultat toga, dolazi to nakupljanja protona u međumembranskom prostoru, generisanja mitohondrijskog membranskog potencijala MtMP, i nastanka elektrohemijškog gradijenta, koji se sastoji od protonskog gradijenta koncentracije (ΔpH) i elektrostatičkog gradijenta, sa nakupljanjem elektropozitivnosti sa spoljašnje, a elektronegativnosti sa unutrašnje strane UMM mitohondrija ($\Delta\Psi$).

Kompleks V (ATP sintaza), koja je zapravo protonski kanal, konvertuje energiju koja je dobijena uspostavljanjem elektrohemijškog gradijenta (ΔP) u visokoenergetske fosfatne veze koje su osnovni izvor energije za ćelijske procese u kojima se energija troši. Kompleks V se sastoji od dve subjedinice: F₀ i F₁. F₀ subjedinica koja je ugrađena u unutrašnju membranu sadrži kanal koji dozvoljava protonima da pređu nazad u matriks, zahvaljujući elektrohemijškom gradijentu. Energija koja se oslobodi ovim procesom se koristi za sintezu ATP na F₁ subjedinici, koja je uronjena u matriks. Kroz mehanizam od tri koraka u kojima se iz ADP i Pi dobija ATP koji se otpušta u matriks (16). Komponenta F₀ sisara sadrži 9 subjedinica (a, b, cn, d, e, f, g, A6L, F6), dok F₁ hidrofилna komponenta ima 3 α , 3 β , γ , δ , ϵ dok β subjedinica predstavlja aktivna mesta za sintezu ATP-a. U unutrašnjoj membrani 9-12 c subjedinica je organizovano u prsten povezanih drškom za katalitičku komponentu hidrofилnog dela. γ , δ i ϵ subjedinica izgrađuju centralni deo polovine drške dok se periferija sastoji od b, d, F6 i OSCP (engl. *oligomycin sensitivity conferring protein*) subjedinica (16).

Kompleks V radi kao molekularni rotatorni motor, u kome protoni prolaze kroz F₀ subjedinicu i dovode do promene konformacije komponenti F₁ subjedinice. Katalitička F₁ subjedinica postoji u tri različite konformacije α i β subjedinice, koje karakteriše različiti afinitet za ADP-Pi i ATP – otvorena (O), labava (L) i stegnuta (T) (17). U O konformaciji se otpušta novosintetisani ATP; u L konformaciji postoji visok afinitet za vezivanje supstrata, ADP i Pi, a u T konformaciji supstrati dolaze u kontakst sa katalitičkim mestom i dolazi do sinteze ATP-a. MtMP obezbeđuje motornu silu protona (Δp) (18) koja pokreće rotacioni motor H⁺-ATP sintaze koristeći protone koji teku sa spoljašnje ka unutrašnjoj strani unutrašnje membrane mitohondrija kroz kanal subjedinice A, da bi na kraju dovela do sinteze ATP iz ADP i Pi.

ATP se iz mitohondrija transportuje pomoću ANT (engl. *adenine nucleotide translocator*) dimeričkog transportera koji je lokalizovan na unutrašnjoj membrani mitohondrija. ANT vrši zamenu ADP-a iz citosola za mitohondrijski ATP. Pi neophodan u matriksu za sintezu ATPa je takođe uvežen iz citosola uz pomoć Pi-H⁺ simport sistema (19). Elektrohemijski gradijent koji se stvara kroz unutrašnju membranu mitohondrija pomoću transportnog lanca elektrona tako ne samo da proizvodi termodinamičku silu za sintezu i oslobađenje ATPa u matriks, već i pokreće uvoz supstrata kompleksa V (ADP i P_i) iz citosola. Aktivnost transportnog lanca elektrona je čvrsto povezana sa aktivnošću kompleksa V preko transmembranskog potencijala. Na taj način je stepen redukcije kiseonika indirektno regulisan i koncentracijom ADP u matriksu i aktivnošću kompleksa V.

Uparivanje između lanca prenosilaca elektrona i kompleksa V i kontrola mitohondrijskog membranskog potencijala su veoma važni za očuvanje mitohondrijske funkcije. MtMP obezbeđuje energiju za mnogobrojne druge procese kao što je prenos Ca²⁺, Fe²⁺, i drugih važnih jona, translokaciju mitohondrijskih proteina itd. (20). Veliki broj drugih puteva unutar mitohondrija može da modifikuje i utiče na OXPHOS. Isto tako i abnormalnosti OXPHOS mogu da generišu signale za pokretanje homeostatskih mehanizama kao što je mitohondrijska biogeneza ili programe egzekucije kao što je mitofagija koja eliminiše neke oštećene delove i nefunkcionalne organele ili apoptozu (6).

Smatra se da OXPHOS kompleksi koegzistiraju sa superkompleksima koji se formiraju interakcijom kompleksa I, III i IV organizovanih u respirozome. Supramolekularna organizacija OXPHOS kompleksa je pokazana kod mnogih organizama (17). Funkcionalna važnost respirozoma se ogleda u zavisnosti kompleksa I od interakcije sa kompleksom III. Mutacije u genu za citohrom c vode ka greškama u kompoziciji kompleksa III pokazujući istovremenu redukciju broja formiranih kompleksa I (21)

Smatra se da kompleks IV igra važnu ulogu u stabilnosti respirozoma (22). Prema integrisanom modelu u fiziološkim uslovima OXPHOS kompleksi postoje u ravnoteži sa superkompleksima tako da, u zavisnosti od metaboličkih uslova, prenos elektrona u elektronskom transportnom lancu se događa kanalisanjem supstrata ubihinona i citohroma c usled stvaranja superkompleksa ili slučajnom difuzijom ovih malih nosača (23). Glavna odrednica interakcije OXPHOS kompleksa je prezentovana lipidima u membranskom sloju. Kardiolipin igra ključnu ulogu u sastavljanju i stabilizaciji funkcionalnih superkompleksa (22) ali sem što učestvuju u povezivanju individualnih kompleksa, membranski lipidi takođe mogu biti važni u obezbeđivanju stabilne sredine za funkcionisanje ubihinona (CoQ) (17). Prednost organizovanja u superkomplekse primarno leži u činjenici da neposredna blizina enzima koji katalizuju uzastopne reakcije istog puta povećava metabolički protok što rezultira povećanom efikasnošću celog sistema i sekundarno u sprečavanju izbijanja elektrona, a zatim i proizvodnje ROS-a(17).

1.1.4 Slobodni kiseonični radikali, odnosno reaktivne kiseonične vrste (ROS)

Mali deo (~ 0,2%) kiseonika koji koriste mitohondrije, pretvara se, delimičnom redukcijom, u reaktivna jedinjenja kiseonika, slobodne kiseonične radikale, koji su prirodni nusproizvod prenosa elektrona u lancu prenosilaca elektrona (4). Sada je dobro poznato da, u malim koncentracijama, ROS imaju pozitivnu ulogu u nekoliko signalnih puteva, kroz reverzibilnu modifikaciju visoko konzerviranog cisteina ili metionina (22)-Međutim, akumulacija ROS-a zbog povećane proizvodnje ili neefikasnog uklanjanja može imati štetne posledice. Slobodni kiseonični radikali, odnosno ROS su molekuli i slobodni radikali sa jednim nesparenim elektronom, koji potiču od delimično redukovano molekularnog kiseonika. Nepotpuna redukcija molekularnog kiseonika (za jedan elektron umesto para elektrona) istovremeno daje intermedijere različite stabilnosti i rastuće oksidativne snage: superoksidni anjon ($O_2^{\bullet -}$), nastaje redukcijom kiseonika za jedan elektron i može dismutirati, spontano ili putem reakcije katalizovane superoksid dismutazama, u vodonik-peroksid. Vodonik-peroksid (H_2O_2) je relativno stabilan molekul koji može da ima ulogu glasnika u putevima prenosa signala i integriše funkciju mitohondrija sa ostatkom ćelije. Redukcija vodonik-peroksida pomoću anjona gvožđa daje hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), jedan od najjačih oksidansa u prirodi; prisustvo $O_2^{\bullet -}$ - može da ubrzava ovaj proces. Mitohondrije su važan izvor ROS-a. Proizvodnja ROS u mitohondrijima uglavnom zavisi i od koncentracije kiseonika i od redoks-statusa OXPHOS sistema, a u fiziološkim uslovima su oba parametra zapravo određena metaboličkim potrebama tkiva. Kompleksi I i III su glavni izvor superoksidnog anjona u mitohondrijima.

Promene bilo u aktivnosti i strukturi kompleksa I ili u celom OXPHOS sistemu mogu dovesti do prekomerne proizvodnje ROS-a, što dovodi do ireverzibilne oksidativne modifikacije lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Iako je pokazano da mora biti dostignut prag inhibicije za kompleks I (30%) ili kompleks III (70%) pre nego što se može detektovati značajna proizvodnja ROS-a (24), i delimična energetska oštećenja usled mutacija u genomu mtDNK i minimalni pomaci u redoks ravnoteži mogu predstavljati stres za ćeliju.

Lipidi membrane su posebno osetljivi na dejstvo ROS zbog prisustva dvostrukih veza, proteini mogu biti oksidovani ROS-om na tiolnim grupama cisteina ili metionina, dok ostaci tirozina mogu biti podvrgnuti nitrozilaciji. Mitohondrije su takođe veoma osetljive na oksidativna oštećenja zbog prisustva metala u prostetskim grupama kompleksa OXPHOS.

MtDNK igra ključnu ulogu u procesu starenja (25) zato što su zbog manje efikasnosti u njihovom sistemu popravki, molekuli mtDNK podložni oksidativnom oštećenju. Oksidativne modifikacije mtDNK dovode do izmenjene ili redukovane sinteze proteina i narušenog mitohondrijalnog metabolizma koji vodi ka deprivaciji energije, redoks disbalansu i ćelijskoj disfunkciji (25). Zbog potencijalnog štetnih efekta ROS kao prirodnog nusproizvoda metabolizma mitohondrija, aerobne ćelije su razvile efikasne sisteme za njihovo uklanjanje. Sistemi za uklanjanje ROS reaguju čak i na male promene u redoks stanju ćelije. Budući da su svi geni koji kodiraju proteine koji učestvuju u

mehanizmima antioksidativne zaštite, kodirani jedarnim genima, veza mitohondrija-jedro je od primarne važnosti za suzbijanje oksidativnog stresa. Najznačajniji enzimi antioksidativne zaštite su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza.

1.1.5 Kompleks I

Kod sisara subjedinice kompleksa I imaju dvostruko genetsko poreklo, sedam subjedinica (ND1-ND6, ND4L) je kodirano mitohondrijskom DNK, dok su preostale subjedinice kodirane nuklearnim genima.

Kompleks I je multi-proteinski kompleks u obliku slova L koji se sastoji od hidrofobnog kraka ugrađenog u unutrašnju membranu mitohondrija i hidrofilnog kraka okrenutog ka matriksu.

U eukariota „jezgro“, koje predstavlja funkcionalnu jedinicu enzima, se sastoji od svih sedam mitohondrijski kodiranih podjedinica lokalizovanih u hidrofobnom kraku i sedam nuklearno kodiranih podjedinica koje sadrže sve poznate redoks protetske grupe, jedan molekul flavin adenin-mononukleotida (FMN) i osam bi- ili tetranuklearnih gvožđe-sumpornih klastera (N1a, N1b, N2-N6a, N6b) (26). Postaje i dodatne subjedinice koje imaju regulatornu ulogu (27). Jedna od tih je subjedinica NDUFA13, kompleksna podjedinica I lokalizovana u kraku okrenutom ka matriksu. NDUFA13 je takođe poznat kao GRIM-19 (gen povezan sa smrtnošću izazvanom retinoidnim interferonom 19) koji je prvi put kloniran tokom skrininga gena odgovornih za ćelijsku smrt izazvanu interferonom-beta i retinoidnom kiselinom u ćelijskoj liniji karcinoma dojke. Kada je kasnije protein pronađen kao deo mitohondrijskog kompleksa I (OMIM® - Online Mendelian Inheritance in Man®. URL. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) videlo se da je njegova funkcija dvostruka: jedna u OXPHOS sistemu, kao strukturna komponenta kompleksa I, druga kao deo apoptotske kaskade.

Kompleks I je regulisan post-translacijskim modifikacijama: IP-podjedinica koju kodira NDUF54 genom lokalizovan na hromozomu 5 uključena je u normalno sklapanje kompleksa i posredno fosforilacijom od strane PKA u regulaciju aktivnosti kompleksa od strane kaskada cAMP (28).

Ključnu ulogu u funkciji kompleksa I imaju lipidi mitohondrijske membrane. Kardiolipin koji je čvrsto vezan je neophodan za strukturni integritet kompleksa, možda i za supramolekularnu organizaciju, dok slabije vezani fosfatidilholin i fosfatidiletanolamin moduliraju katalitičku aktivnost (29).

Kompleks I je takođe glavni izvor mitohondrijskog superoksidnog anjona. U fiziološkim uslovima curenje elektrona iz redoks centara kompleksa I je vrlo malo, postoje dokazi koji pokazuju pojačanu proizvodnju ROS u prisustvu oštećenog kompleksa I, što ukazuje da strukturna modifikacija enzima može igrati presudnu ulogu u indukovanju oksidativnog stresa u ćeliji [99]. Defekti kompleksa I su povezani sa širokom grupom kliničkih poremećaja, od neonatalnih neurodegenerativnih bolesti do neurodegenerativnih bolesti sa početkom u starijoj životnoj dobi pošto defekti kompleksa I igraju glavnu ulogu u procesu starenja (28).

1.2 *Mitochondrijske bolesti*

1.2.1 *Mutacije mtDNK*

Prvi dokazi o bolestima povezanim sa mutacijama mtDNK datiraju iz 1988. godine kada su Wallace i saradnici pronašli tačkastu mutaciju u genu koji kodira podjedinicu 4 kompleksa I u porodici sa LHON-om (30). Danas je poznato da su tri tačkaste mutacije odgovorne za preko 90% simptomatskih LHON slučajeva (31), a više od stotine mutacija mtDNK povezano je sa nekoliko poremećaja i čini se da lista još uvek nije potpuna (32).

Tačkaste patogene mutacije mtDNK mogu se javiti u strukturnim genima, kao i u genima za rRNK ili tRNK i prenose se maternalno. Suprotno tome, sporadične patologije povezane su sa preuređivanjem mtDNK i javljaju se spontano. Najčešća delecija nalazi se kod jedne trećine pacijenata i uključuje segment od 5 Kbp (33) Tačkaste mutacije utiču na strukturne gene, delecije mtDNK dovode do nedostatka nekoliko genskih funkcija, a tačkaste mutacije gena za rRNA i tRNA dovode do opšteg oštećenja mitohondrijskih mehanizama za sintezu proteina što utiče na većinu komponenti OXPHOS kompleksa.

Sve bolesti koje nastaju kao posledica mutacija u mtDNK imaju kao zajedničku karakteristiku poremećaj puta oksidativne fosforilacije, ali klinički fenotipi su veoma heterogeni. Kompleksnosti doprinosi i nedostatak direktne veze između genetskog defekta i kliničke manifestacije zato što mutacije u različitim položajima mogu dovesti do istog kliničkog fenotipa, kao što i ista mutacija može biti povezana sa različitim patologijama.

Deo varijabilnosti koji je povezan sa ovim patologijama može se pripisati neobičnim pravilima genetike mitohondrija; većina patogenih mutacija mtDNK je u stvari heteroplazmična u ćelijama, tako da visoka heterogenost može postojati i među tkivima.

Smatra se da je za kliničku manifestaciju mutacije potrebna minimalna količina mutirane mtDNK, a što može varirati u zavisnosti od patogenosti mutacije, metabolizma tkiva i metaboličkog statusa ćelije (takozvani efekat praga). Postojanje praga za ispoljavanje kliničkog fenotipa zapravo je određeno postojanjem biohemijskog praga što znači da je neophodno da postoji minimalna količina mutiranog proteina ili RNK da bi došlo do oštećenja funkcije mitohondrija (34).

Dobar primer efekta praga je mutacija mtDNK u genu ATP6 na nukleotidu 8993 koja je povezana ili sa NARP (Neuropathy Ataxia and Retinitis Pigmentosa) kada je tkivna heteroplazmija niža od 90-95% ili sa smrtonosnim Leigh-ovim sindromom, teža progresivna encefalopatija, kada je prisutna u većem procentu (15).

Postojanje praga podrazumeva da su, fiziološki, nivoi rRNK, tRNK i OXPHOS proteina viši nego što je potrebno da bi se omogućio „dovoljan nivo“ funkcionisanja oksidativne fosforilacije; ova rezerva predstavlja zaštitni mehanizam koji obezbeđuje sigurnosnu marginu protiv efekata štetnih mutacija (35). Takođe na biohemijskom nivou prisustvo molekula izvorne (*wt*) mtDNK (*wt*) održava fiziološke potrebe ćelija i nadoknađuje štetne efekte mutacije sve dok se broj normalnih

mtDNK molekula ne smanji ispod granične vrednosti ili dok energetski zahtevi ćelije ne postanu izazov za mitohondrije. Isto tako, organizacija mitohondrija u mreže predstavlja izvesni kompenzatorni sistem protiv patogenih mutacija: fuzija mitohondrija rezultira mešanjem ne samo spoljašnje i unutrašnje membrane, već i molekula u sastavu mitohondrijskog matriksa. Na taj način mitohondrije razmenjuju proizvode gena tako da ukupna funkcija mitohondrija u ćeliji može da se očuva čak i u prisustvu mutiranih molekula DNK.

Iako se čini da je kretanje nukleoida ograničeno u poređenju sa proteinoma matriksa, publikovani su dokazi o rekombinaciji mitohondrijske DNK (35). Dinamička organizacija mitohondrija u prisustvu mutiranih molekula mtDNK može dovesti do toga da mitohondrije u jednoj ćeliji sadrže smešu mutiranih i normalnih molekula mtDNK, što omogućuje da se izbegnu brza skretanja odnosa mutirane mtDNK / izvorne (wt)) mtDNK tokom mitoze i smanjuje se verovatnoća stvaranja homoplazmične ćelije (25).

Ipak, heteroplazmija i efekat praga ne mogu objasniti osobine Leberove hereditarne optičke neuropatije a to je da su tri najčešće mutacije koje izazivaju LHON uglavnom homoplazmične u svim tkivima, ali klinički simptomi se ne manifestuju do odrasle dobi, jedino pogođeno "tkivo" je optički nerv i prisustvo patogene mutacije ne mora nužno dovesti do razvoja bolesti.

Uprkos širokoj varijabilnosti manifestacija mitohondrijskih bolesti, kod svih pacijenata dolazi do povećanja koncentracije mlečne kiseline u krvi, urinu, cerebrospinalnoj tečnosti, kao i u tkivima, što je tipičan znak oštećenja OXPHOS. Povećana proizvodnja mlečne kiseline može nastati akumulacijom piruvata u uslovima u kojima su inhibirani Krebsov ciklus i OXPHOS sistem i može dovesti do laktacidoze što rezultira globalnim poremećajem ćelijskog pH (36). Još jedno tipično obeležje "mitohondrija", koje je od velike pomoći u dijagnozi, je prisustvo pocepanih crvenih vlakana u biopsijama mišića, indeks masivne proliferacije mitohondrija tipično negativnih na aktivnost citohrom c oksidaze. Povećana proliferacija predstavlja pokušaj prevazilaženja mitohondrijskog defekta kompenzatornim povećanjem broja mitohondrija da bi se postigla dovoljna proizvodnja energije u ćeliji.

1.2.2 Mutacije u nuklearnoj DNK (nDNK) i mitohondrijske bolesti

Mitohondrijska DNK kodira samo trinaest od više od hiljadu proteina prisutnih u mitohondrijima (11). Svi proteini koji su potrebni za održavanje i ekspresiju mtDNK, sastavljanje OXPHOS kompleksa i sintezu kofaktora poput hema i Fe-S klastera, kodiraju se u nukleusu i uvoze u mitohondrije tako da je funkcija mitohondrija zavisna od nDNK i mutacije u ovom genomu takođe mogu dovesti do mitohondrijskih bolesti. Zapravo, većina pacijenata (80-90%) sa oštećenjem oksidativne fosforilacije ima nuklearnu mutaciju. Mutacije nDNK povezane sa mitohondrijskim bolestima mogu se klasifikovati u različite kategorije i uticati na oksidativnu fosforilaciju na direktan ili indirektan način te mutacije se prenose prema Mendelovim pravilima i mogu ležati u autozomnim genima, bilo u recesivnom ili dominantnom stanju, ili u X hromozomu.

Patogene mutacije pronađene su u nuklearnim genima koji kodiraju subjedinice svih kompleksa lanca prenosilaca mitohondrija, mada su mutacije koje utiču na kompleks III, IV i V ređe, što ukazuje na verovatniju nekompatibilnost sa životom [58]. Mitohondrijske bolesti mogu takođe biti posledica mutacija nuklearnih gena koji kodiraju "pomoćne" proteine OXPHOS sistema koji su uključeni u sastavljanje različitih podjedinica kodiranih mtDNK i nDNK, zajedno sa njihovim protetskim grupama. Oštećenje integriteta mtDNK može biti posledica mutacija ili u nuklearnim genima koji su direktno uključeni u replikaciju i održavanje mtDNK ili u genima koji su uključeni u kontrolu nukleotidnog snabdevanja u mitohondrijima. Mitohondrijska disfunkcija je takođe povezana sa promenama sistema uvoza citosolnih proteina, kao i proteina koji su uključeni u pokretljivost mitohondrija i homeostazu. Ipak, nuklearne mutacije ne podležu pravilima genetike mitohondrija, tako da očigledno preklapajući genetski defekti mogu dovesti do širokog spektra kliničkih manifestacija.

1.3 *Funkcionalna anatomija retine*

Svetlost prolazi kroz sočivo i vitreus, pada na unutrašnju stranu retine, prolazi kroz njenu čitavu debljinu i na kraju pada na čepiće i štapiće na spoljašnjoj strani retine. U centralnoj fovealnoj regiji unutrašnji slojevi su povučeni u stranu od fovee, površine koja pokriva vidni ugao od 1 min, zauzima površinu od 1mm² i odgovorna je za vidnu oštrinu i opažanje detalja. Centralna fovea površine samo 0.3 mm u prečniku je sastavljena gotovo u potpunosti od tankih čepića. Krvni sudovi, sloj retinalnih ganglijskih ćelija(RGC), unutrašnji nuklearni sloj (INL), unutrašnji pleksiformni sloj (IPL) i spoljašnji pleksiformni sloj (OPL) su pomereni u stranu, da bi dozvolili svetlosti da neometano stigne do čepića. Makularna regija koja okružuje centralnu foveu je jedini region retine koji se sastoji iz više slojeva RGC sposobnih da obezbede najviši stepen vidne diskriminacije tzv.vidnu oštrinu (37).

Glavni funkcionalni segmenti, bilo čepića ili štapića, su: (1) spoljašnji segment oblika konusa kod čepića, oblika štapa kod štapića, (2) unutrašnji segment, (3) nukleus i (4) sinaptičko telo. Fotohemijske supstance koje se su osetljive na svetlost nalaze se u spoljašnjem segmentu. Kod štapića to je rodopsin, kod čepića su to tri kolorna pigmenta, koja funkcionišu gotovo isto kao rodopsin, sem što se razlikuju u svetlosnoj senzitivnosti. Svaki spoljašnji segment štapića i čepića je napakovan sa približno 1000 nagomilanih diskova, gde svaki predstavlja ulegnuće ćelijske membrane. I rodopsin i kolorni pigmenti su inkorporirani u membrane diska. Pigmenti čine oko 40% čitave mase spoljašnjeg segmenta. Unutrašnji segment čepića i štapića sadrži citoplazmatske organele, naročito mitohondrije, koje obezbeđuju energiju. Sinaptička tela su delovi čepića i štapića koji se povezuju sa neuralnim ćelijama, horizontalnim i bipolarnim, sledećem delu u retinalnom kolu. Kada je izložen svetlu, stvara se potencijal u fotoreceptoru i podiže se negativnost membranskog potencijala i nastaje stanje hiperpolarizacije (38). To je potpuno suprotno smanjenju negativnosti (proces depolarizacije) koji se dešava kod skoro svih senzornih receptora. Kada svetlo razgradi rodopsin, smanjuje se provodljivost membrane štapića za jone Na⁺ u spoljašnjem

segmentu štapića, rezultujući hiperpolarizacijom cele membrane štapića. Na svetlosti se akumulira cGMP i Na⁺ kanali, koji su pod kontrolom cGMP, se zatvaraju i na taj način se smanjuje unutrašnja struja natrijuma. Joni Na⁺ se kontinuirano izbacuju na spoljašnju stranu kroz membrane unutrašnjih segmenata fotoreceptora, što dovodi do toga da veća količina jona Na⁺ napušta štapić nego što se u njega vraća, stvarajući tako rastuću negativnost unutar membrane, koja je proporcionalna količini svetlosne energije koja je pogodila štapić (38).

Fotohemijske supstance u čepićima imaju gotovo identičnu hemijsku kompoziciju kao rodopsin u štapićima. Jedina razlika je da su čepićima specifični fotopsini malo različiti u odnosu na skotopsin koji se nalazi u štapićima. Retinalni deo svih vidnih pigmenta je identičan u štapićima i u čepićima. Vidni pigmenti osjetljivi na boje koji se nalaze u čepićima su kombinacija retinalnih protina i fotopsina. Samo 1 od 3 tipa kolornih pigmenata je prisutan u svakom čepiću što čini čepiće selektivno senzitivnim na različite boje - plavu, zelenu i crvenu, sa maksimalnim apsorpcijama na 445, 535 i 570 nanometara (38).

Različite neuralne ćelije retine su (38):

1. Fotoreceptori, čepići i štapići, koji prenose svetlosne signale na spoljašni pleksiformni sloj gde se sinapsiraju sa sa bipolarnim i horizontalnim ćelijama.
2. Horizontalne ćelija koje prenose signale horizontalno u spoljašni pleksiformni sloj gde se sinapsiraju sa bipolarnim i horizontalnim ćelijama.
3. Bipolarne ćelije koje prenose signal vertikalno od štapića, čepića i horizontalnih ćelija ka IPL, gde se sinapsiraju sa ganglijskim i amakrinim ćelijama.
4. Amakrine ćelije koje prenose signale u dva pravca bilo direktno od bipolarnih ćelija do RGC ili horizontalno unutar IPL od aksona bipolarnih do dendrita ganglijskih ili do drugih amakrinih ćelija.
5. Retinalne ganglijske ćelije, RGC, koje prenose signale iz retine kroz optički nerv do mozga u vidnom i ne-vidnom putu (mRGC). Vidni put dovodi do formiranja slike, a ne-vidni do svetlom indukovano cikardijalnog ritma. I na kraju interpleksiformne ćelije prenose inhibitorne signale u retrogradnom smeru od IPL do OPL, kontrolišući na taj način lateralno širenje vidnih signala od strane horizontalnih ćelija u OPL i posledično stepen kontrasta u formiranom liku.

Gotovo svi retinalni neuroni, uključujući fotoreceptore, prenose svoje vidne signale elektronskom kondukcijom. Ovo omogućuje gradiranu kondukciju snage signala, što je direktno povezano sa intenzitetom svetla, tako da signal ne funkcioniše po principu sve ili ništa (kao što je slučaj kod akcionih potencijala). Jedini retinalni neuroni koji funkcionišu po principu akcionih potencijala su RGC.

Svaka retina sadrži oko 100 miliona štapića i 3 miliona čepića, dok RGC ima samo oko 1.2 miliona. U proseku 60 štapića i dva čepića konvergiraju na jednu RGC i korespondirajući akson koji je povezuje sa mozgom. Približavanjem fovei, sve manje čepića i štapića konvergira prema jednoj RGC,

i čepići i štapići postaju tanji. Ovo progresivno povećava vidnu oštrinu u centralnom delu retine. U centralnoj fovei nalaze se samo tanki čepići, njih oko 35000, i nema štapića. Broj aksona RGC koji potiču sa ovog dela retine je skoro jednak broju čepića. Ovo objašnjava stepen vidne oštrine u centralnoj retini u poređenju sa perifernom. Periferna retina je značajno osetljivija nego fovea na slabu svetlost, zbog većeg broja štapića koji su 30 do 300 puta senzitivniji na svetlost nego čepići.

Takođe, skoro dvesta štapića konvergira na jednu retinalnu ganglijsku ćeliju u perifernim delovima retine, zbog čega se signali sa štapića sumiraju i daju još intenzivniju stimulaciju perifernih ganglijskih ćelija. Dalje od fovee, broj RGC se smanjuje, postajući relativno oskudan na periferiji. Osim po distribuciji, RGC se razlikuju i po veličini gde su one u blizini fovee manje i sa aksonima manjeg kalibra.

Aksoni ganglijskih ćelija mrežnjače čine sloj nervnih vlakana mrežnjače (RNFL) i prelaze preko prednje površine retine u snopovima i konvergiraju na glavi optičkog nerva. PMB prenosi vlakna iz makule i formira temporalni deo optičkog nerva. Superiorni i inferiorni predeli nerva su formirani od vlakana koja nastaju superiorno i inferiorno od horizontalne linije (raphe-a) temporalno od fovee, dok se u nazalni deo optičkog nerva projektuju vlakna sa nazalne periferije (38). Oštećenje PMB-a utiče na funkciju makule i rezultira bledilom temporalnog dela optičkog nerva pri pregledu fundusa i istanjenjem peripapilarnog RNFL-a na OCT-u. Deo vlakana pre lamine cribrosae (prelaminarni) je nemijelizovan. Vlakna dalje prolaze kroz laminu cribrosa-u (laminarni deo) posle čega dobijaju mijelinski omotač i čine optički nerv (postlamelarni deo).

Mijeliniziovani postlamelarni deo aksona ima značajno višu efikasnost u odnosu na nemijelinizovani deo koji ima mnogo manju brzinu provodljivosti i zahteva veću energiju za obnavljanje električnog potencijala (39). Nemijelinizovani delovi aksona RGC imaju visoku gustinu voltažno-zavisnih Na⁺/K⁺ pumpi, i više mitohondrija nego mijelinizirani delovi (39), što ukazuje na to da nemijelinizirani aksoni imaju više zahteve za energijom i zato su podložniji bioenergetskom slomu koji nastaje kao posledica mitohondrijske disfunkcije.

Raspodela mitohondrija poklapa se sa energetske i funkcionalnim zahtevima. Prelamelarni i lamelarni delovi aksona RGC se odlikuju intenzivnom oksidativnom fosforilacijom, čiji intenzitet opada sa pojavom mijelina u postlamelarnom delu optičkog nerva (40).

Pored ova dva sistema fotoreceptora, čepića i štapića, kasnih 1990-ih i početkom 2000-ih otkriven je treći sistem fotoreceptora koji se znatno razlikuje od čepića i štapića (41). Ovaj sistem je baziran na melanopsinu, fotopigmentu koji je izražen u oko 1% ganglijskih ćelija mrežnjače (RGC)(41). Melanopsin je maksimalno osetljiv na plavu svetlost (~ 480 nm), a melanopsin RGC (mRGC) su fotosenzibilne i karakterišu ih trajni i tromi odgovori na svetlost (42). Fiziološke karakteristike unutrašnjeg odgovora na svetlo mRGC je drugačije od odgovora čepića i štapića. Čepići i štapići se hiperpolarizuju na svetlost dok je direktan odgovor mRGC depolarizacija. Senzitivnost na svetlost je značajno niža, a kinetika signalnog odgovora značajno sporija nego kod klasičnih fotoreceptora

(43). One su takođe sposobne da održe dugotrajan svetlosni odgovor i kodiraju svetlosni stimulus tokom dugog vremenskog perioda. Dendriti mRGC sadrže melanopsin i mogu direktno da odgovore na svetlost (43). Ove karakteristike su u skladu sa ulogom mRGC u prenošenju signala difuznog svetla okoline tokom dugog vremenskog perioda za tonične vizuelne funkcije.

mRGC su neophodne za funkciju retine koja ne formira sliku, odnosno neophodne su za uspostavljanje veze svetlosti i cirkadijalnog ritma, refleksa zenice, supresije melatonina, kao i regulacija budnosti, spavanja i saznanja (44). Noviji dokazi takođe ukazuju i na učešće mRGC-a u vizuelnim procesima, poput detektovanja osvetljenosti i grubog stvaranja slike (44).

Ćelije koje eksprimiraju melanopsin šalju projekcije na suprahijazmatično jedro (SCN), koji se smatra mestom centralnog cirkadijalnog sata sisara, hipotalamično preoptično područje umešano u inicijaciju spavanja, olivarno pretektno jezgro koje reguliše veličinu zenice, medijalnu amigdalnu, deo njuha i emocionalni odgovor (45). mRGC se takođe projektuju na regione koji su tipično deo vizuelnog puta, kao što je leđni deo talamusa LGN i srednji mozak superiorni kolikulus (45). Slepici sa teškom degeneracijom spoljašnjih slojeva retine, a relativno intaktnim mRGC sistemom, imaju bazičnu sposobnost detekcije jakog plavog svetla (46). Takođe postoje dokazi da melanopsin utiče na kolorni vid kod ljudi (47).

1.4 *Leberova hereditarna optička neuropatija*

Leberova hereditarna optička neuropatija (LHON) je mitohondrijsko neurodegenerativno oboljenje koje je još 1988 povezana sa mutacijom mitohondrijske DNK (30), i do skora je smatrano da je nasleđivanje isključivo maternalno (48). Leberova hereditarna optička neuropatija (LHON, OMIM 535000) je prvi puta opisana od strane Von Grafe (49), ali je kao poseban klinički entitet definisana 1871. godine od strane nemačkog oftalmologa Teodora Lebera (1840-1917) (50). On je prvi opisao karakterističan šablon gubitka vidne oštine u četiri porodice koji je kasnije potvrđen u drugim studijama (51,52). U ovim ranim studijama su definisane tipične karakteristike LHON-a kao što je maternalno nasleđivanje, predilekcija za muški pol i gotovo isključivo zavažanje samo optičkog nerva.

Maternalni obrazac nasleđivanja LHON-a otkrio je 1972. godine Erickson (48), ali su tek 1988. Wallace i kolege identifikovali prvu tačkastu mitohondrijsku mutaciju u devet rodoslova sa kliničkom dijagnozom LHON(30). Ova mutacija se nalazi na nukleotidnom položaju 11778 mtDNK i pretvara visoko konzervirani arginin u histidin na kodona 340 u natrijum dehidrogenaznoj podjedinici 4 (ND4) kompleksa I respiratornog lanca (30).

LHON je bilateralna optička neuropatija subakutnog toka, koja pogađa predominantno mlade odrasle muškarce. Prvi put je opisana u devetnaestom veku od strane Von Graefe-a, ali je posledično nazvana po Teodoru Leberu zbog njegove sistematične deskripcije bolesti. Prevalenca LHON kao što je izračunato u severoistočnoj Engleskoj gde su sve obolele osobe upućivane u jedan dijagnostički centar je 1/27 000 (53), dok je skorašnja meta analiza svih dostupnih studija zaključila da je prevalenca u Evropi 1/40000 (54). U svakom slučaju broj obolelih od LHON verovatno je značajno potcenjen zato što se do dijagnoze teško stiže ili se nikada ni ne postavi.

Prezentuje se kao bezbolni, akutni ili subakutni gubitak centralne vidne oštine. Drugo oko obično biva zahvaćeno za nekoliko nedelja ili meseci (u proseku za 6 do 8 nedelja), dok je u oko 25% slučajeva oboljenje simultano bilateralno (55) mada su opisani i pojedinačni unilateralni slučajevi (56).

1.4.1 *Genetske osobine i nasleđivanje kod LHON-a*

Više od 90% svih LHON slučajeva se dešava zbog jedne od tri tačkaste mutacije u mtDNK koje su locirane na nukleotidima 11778(70%), 14484(14%) i 3460(13%) (31). Primarne patogene mutacije LHON utiču na mitohondrijske gene koji kodiraju podjedinice smeštene u membranskom sektoru kompleksa I. Mutacija G3460A u mitohondrijskom genu ND1 pretvara umereno konzervirani alanin 52 u treonin (A52T). Mutacija ND4 G11778A menja visoko konzervirani arginin 340 u histidin (R340H), dok mutacija ND6 T14484C menja slabo konzervirani metionin u poziciji 64 u valin (M64V). Primarne mutacije su uglavnom homoplazmične.

Nekoliko drugih mutacija je povezano sa fenotipovima LHON ili LHON plus, a većina je lokalizovana u genima ND1 i ND6 koji se smatraju mutacijskim "žarištima" (57)

Ove mutacije nazivaju se retkim mutacijama (58), smatraju se patogenima ukoliko je testovima mitohondrijske funkcije dokazana oslabljena funkcija mitohondrija. Mnoge mutacije su prisutne samo u pojedinačnim slučajevima i ne postoje čvrsti dokazi o njihovom funkcionalnom uticaju. Ovakve mutacije su retke, javljaju se u okviru pojedinih familija i uglavnom su heteroplazmične. Problem predstavljaju genetski nepotvrđeni slučajevi sa tipičnim LHON fenotipom. Rasvetljavanje ovakvih slučajeva predstavlja klinički izazov (59). Poznato je i da mutacije u egzomu mogu da dovedu do nastanka LHON-a kao i da skup pojedinačno benignih mutacija može da ispolji patogeni efekat.

U skorašnje vreme otkriven je otkrivena klinička fenokopija LHON-a koje se recesivno nasleđuju i povezane su sa nuklearno kodiranim komponentama ili blago patogenim varijantama sa inkompletnom penetrantnošću u genima povezanim sa OXPHOS,- kao što je Tyr51Cys u DNAJC30 genu (60),(61).

Penetrantnost bolesti zavisi od vrste tačkaste mutacije: samo polovina pacijenata sa mutacijom G11778A imala je pozitivnu porodičnu anamnezu, dok je taj procenat veći kod pacijenata sa G3460A (71%) i T14484C (100%)(62). Ova varijabilnost penetrantnosti u LHON pedigreima sugeriše da na razvoj, ozbiljnost i progresiju bolesti utiču i dodatni faktori (63).

Majka može da prenese mutaciju na muško i žensko potomstvo, ali do gubitka vida dolazi kod 50% muškaraca i samo 10% žena (62). Na gubitak vida utiču haplogrupe, heteroplazmija i faktori sredine (pušenje, alkohol, trauma glave, industrijski toksini, antiretrovirusni lekovi, etambutol kao i nutritivne deficijencije, naročito nizak nivo vitamina B12).

Samo neke osobe po maternalnoj liniji obole i zato se LHON definiše kao bolest sa nekompletnom penetrantnošću, sa dobro utvrđenom prevalencom za muški pol. Ovo ne može da se objasni samo primarnom mitohondrijskom DNK mutacijom koje je neophodan, ali ne i dovoljan genetski preduslov za razvoj bolesti (64) Prvi modifikujući faktor koji je odavno prepoznat i definisan je uticaj mitohondrijskog mtDNK nasleđa koji je definisan specifičnom mitohondrijskom DNK haplogrupom. Mitohondrijska genetska pozadina takođe se smatra mogućim faktorom rizika za modulaciju penetrantnosti LHON-a. Haplogrupe su definisane kao varijante mitohondrijske DNK u čiji sastav ulazi nekoliko uobičajenih polimorfizama koji odražavaju evolucionu istoriju diferencijacije mtDNK. "Neutralne" mutacije u određenoj haplogrupi mogu modilirati ekspresiju mitohondrijskih bolesti ili pogoršavajući ili štiteći od štetnog efekta mutacije. Polimorfizmi unutar haplogrupa povećavaju penetrantnost putem sinergizma sa delecionim efektom primarne LHON mutacije (haplogrupa J kod nosilaca 11778 i 14484, haplogrupa K kod nosioca 3460 mutacije) (12), sa nekim razlikama u zavisnosti od specifičnih podgrupa definisanih polimorfim varijantama koje utiču na cI i cIII (65), (66). Haplogrupu J karakterišu polimorfizmi u dva gena koja kodiraju podjedinice kompleksa I: T4216C u genu ND1 i G13708A u genu ND5. Iako ove genetske varijante samostalno ne narušavaju aktivnost respiratornog lanca u ćeliji, hipoteza je da je njihovo prisustvo

povezano sa promenama u strukturi ili funkciji kompleksa I koje bi mogle da doprinose manifestaciji bolesti. Uticaj haplogrupa na atipične mutacije još nije istražen. Na varijabilnost penetrantnosti utiče i heteroplazmija, stanje u kom je u ćelijama prisutna više od jedne vrste mitohondrijske DNK. Mitohondrije sadrže multiple kopije mtDNK koje mogu biti homoplazmične (sve kopije su identične bilo da su izvorne, *wt* ili mutirane) ili heteroplazmične (mešavina različitih mitohondrijalnih DNK čije sekvence variraju). Kod heteroplazmije, nejednaka distribucija mutirane mitohondrijske DNK može da rezultuje povećanom koncentracijom mutirane DNK u pojedinim ćelijama u poređenju sa drugima. Ova nejednakost je naročito važna tokom razvojnog procesa ili u drugim situacijama kada se ćelije ubrzano dele. Nasumična raspodela mutirane mtDNK u heteroplazmičnom stanju može da doprinese varijabilnoj ekspresivnosti bolesti, čak i među članovima iste porodice. Većina LHON pacijenata su homoplazmični za svoju mtDNK mutaciju, mada je oko 10-15% pacijenata heteroplazmično što ima za posledicu varijabilnost u ozbiljnosti i progresiji bolesti (67).

Pretpostavlja se da postoje i nuklearni DNK polimorfizmi koji igraju ulogu u nekompletnoj penetrantnosti što je i dokazano kod nekoliko porodica kod kojih je dokumentovana da proteini koje kodira jedarna DNK utiču na efikasnost OXPHOS sistema, odgovor na oksidativni stres i apoptozu (68). Ipak, još uvek nije definisan jedan činioc koji je prisutan kod većeg broja pacijenata i za koji bi se moglo sa sigurnošću tvrditi da je patogen. Zbog izraženije prevalencije kod pripadnika muškog pola, pretpostavlja se da geni na X hromozomu mogu imati protektivnu ulogu kod LHON-a. Velika studija u evropskim porodicama sa LHON-om, kao i analiza jedne brazilske porodice koja nosi mutaciju G11778A LHON, otkrila je postojanje protektivnih lokusa povezanih sa X-hromozomom (68,69), ali nije dokazano stvarno učešće hromozoma X u penetrantnosti LHON (69). Činioci životne sredine takođe utiče na penetrantnost LHON-a. U literaturi je zabeleženo pet parova monozigotnih blizanaca koji imaju primarnu LHON mutaciju, a u dva slučaja jedan blizanac je oboleo, a drugi ne. Iako uvek postoji mogućnost da neboleli brat ili sestra izgube vid kasnije tokom svog života, postojanje monozigotnih blizanaca koji nisu istovremeno oboleli ukazuje da negenetski faktori takođe doprinose penetrantnosti LHON-a (70). Doprinos sredinskih faktora potkrepljuje i činjenica da su kliničke manifestacije toksičnih i nutritivnih neuropatija slične onima uočenim u LHON-u (71). Nedvosmisleno je utvrđeno da pušenje predstavlja najrelevantniji faktor u konverziji iz prekliničkog u subakutni stadijum, zatim konzumacija alkohola kao i ekspozicija pojedinim toksinima i drogama (72). Na osnovu uticaja spoljašnje sredine je predloženo da se razdvoje slučajevi mladih odraslih sa preovlađujućim genetskim uticajem na razvoj bolesti i one sa kasnim početkom kod kojih pušenje ili druga produžena izloženost životne sredine igraju glavnu ulogu u ubrzavanju konverzije bolesti. Ovo implicira da se kod ovih osoba bolest ne bi niti razvila odnosno da ne bi došlo do prelaska iz prekliničke u subakutnu formu da nisu bili izloženi faktorima spoljašnje sredine.

Sa patološke osnove, serija in vitro studija na fibroblastima pacijenata obolelih od LHONa i hibridnim ćelijama pokazuje da postoji oštećenje funkcije Kompleksa I (CI) respiratornog lanca, koje je prouzrokovno mutacijama u mtDNK, mutacija i koje dovode do smanjene bioenergetske efikasnosti (15), povećanu produkcije ROS (73), što na kraju ima za posledicu povećanu sklonost ćelija da podležu ćelijskoj smrti apoptozom (73,74). Narušena mitohondrijska funkcija kod nekih nosilaca LHON mutacije može da bude efikasno kompenzovana univerzalnim kompenzatornim mehanizmima koje ćelije započinju u mitohondrijskim bolestima, kao što je porast biogeneze mitohondrija. In vitro je pokazano da estrogini mogu da promovišu mitohondrijsku biogenezu što obezbeđuje potencijalno objašnjenje za veću prevalencu bolesti kod muškaraca (75). U populaciji nosilaca LHON mutacije posmatran je broj kopija mtDNK kao pokazatelja mitohondrijske biogeneze i pokazano je da, kod nebolelih nosilaca mutacije, postoji efikasnija mitohondrijska biogeneza u poređenju sa obolelim rođacima po majčinskoj liniji, kao i sa kontrolnom populacijom (63). Ovo predstavlja potencijalni marker prediktivne vrednosti ko od potencijalnih pacijenata ima najveći rizik za kliničku konverziju. Dim cigarete smanjuje ovaj kompenzatorni mehanizam smanjujući na taj način broj kopija mtDNK i ponašajući se kao okidač bolesti i modulator penetrantnosti (76).

1.4.2 Kliničke osobine LHON pacijenata

U degeneraciji optičkog nerva kod pacijenata sa LHON-om prva i najteže su pogođena temporalna vlakna papilo-makularnog snopa (PMB), dok su nazalna vlakna delimično pošteđena u kasnoj fazi bolesti (40) zbog čega su pad centralne vidne oštine, dishromatopsija i centralni ili centrocekalni skotomi najraniji znaci bolesti. Aksoni ganglijskih ćelija unutar papilomakularnog snopa su nemijelinizovani i zahtevaju velike količine energije za širenje akcionih potencijala u odnosu na saltatornu provodljivost prisutnu u mijelinizovanim nervima. Papilomakularni snop ima visok udeo aksona koji potiču iz malokalibarskih brzih parvocelularnih RGC koja su zbog visokih energetske zahteva, malog kalibra i fizički suženog prostora u kome putuju izuzetno osetljiva na disfunkciju mitohondrija (38). Ovo donekle objašnjava zašto mitohondrijska disfunkcija koja bi trebalo da je prisutna u svakoj ćeliji u organizmu može selektivno da utiče na optički nerv i to naročito na papilomakularni snop (77). Ostali faktori za koje se smatra da utiču na vulnerabilnost centrocekalne regije retine su generisanje superoksida i regionalne razlike u retinalnoj vaskulaturi (39,78). Nalaz magnetne rezonance kod pacijenata sa LHON-om je uglavnom normalan, mada može da postoji hiperreflektivnost optičkog nerva.

U vidnom sistemu LHON pacijenata čepići i štapići su očuvani, pošto degeneracija uglavnom pogađa RGC. Uprkos generalnom gubitku RGC, mRGC su relativno sačuvane (47), što je potvrđeno očuvanjem integriteta retino-talamičkog trakta kod pet LHON pacijenata kao i histopatološkim postmortem studijama (79) zbog čega je refleks zenice na svetlost je kod LHON pacijenata obično očuvan, mada kod asimetričnih bilateralnih ili unilateralnih slučajeva postoji relativni aferentni pupilarni defekt (31).

Prema najnovijoj podeli bolest može da se podeli u 2 stadijuma (80). Preklinički stadijum može da traje celog života bez konverzije u aktivnu bolest i odnosi se na nebole nosioce mutacije kod kojih postoje različite abnormalnosti na očnom dnu (81) i sastoje se od oticanja RNFL različitog stepena kao i od mikroangiopatskih osobina sa tortuozištetom krvnih sudova i arteriovenskim šantovima (82).

Kod određenog broja ovih individua može da dođe do konverzije u aktivnu bolest i tad počinje subakutni stadijum koji se karakteriše gubitkom centralnog vida zbog progresivnog uvećavanja centralnog skotoma u vidnom polju koji slabi vidno oštrinu. Pacijenti opisuju zamagljenje slike i centralno sivilo (Slika 1).



Slika 1. Subjektivni prikaz centralnog skotoma kod LHON pacijenata (slika preuzeta od LHON Eye Society Sweden, <https://icrcat.com/en/eye-conditions/leber-hereditary-optic-neuropathy/>)

Na fundusu se opisuje pojačanje svih osobina koje su opisane u prekliničkom stadijumu (82) hiperemija diska, peripapilarne telangiektazije, vaskularni tortuozištet i edem sloja nervnih vlakana (RNFL) oko papile vidnoga živca, obično bez curenja na fluoresceinskoj angiografiji (pseudoedem) (Slika 2. a) Fotografija fundusa desnog oka LHON pacijenta u subakutnoj fazi bolesti, 2 nedelje od početka, sa hiperemičnim optičkim diskom i tortuozištetim krvnim sudovima, centralnim skotomom u vidnom polju i bez curenja na fluoresceinskoj angiografiji b) U hroničnoj fazi bolesti vidi se atrofija i bledilo optičkog diska, sa gustim velikim centralnim skotomom u vidnom polju.

U proseku, posle 6 nedelja hiperemija i tortuozištet se povlače, javlja se temporalno bledilo optičkog diska i dalja atrofije papile vidnog živca koja se dešava po precizno opisanom redosledu (83),(84). Na optičkoj koherentnoj tomografiji (OCT) u akutnoj fazi bolesti vidi se zadebljanje RNFL prvo u temporalnim i donjim, zatim u gornjim i nazalnim kvadrantima, da bi u hroničnoj fazi usledilo istanjenje (83). Mikroangiopatija koja se vidi u prvim nedeljama evolucije bolesti uglavnom nestaje sa progresijom atrofije optičkog nerva. Ovaj stadijum može da traje od nekoliko nedelja do 6 meseci i posle njega nastaje takozvani dinamički stadijum koji generalno traje 6 meseci do godinu dana od

početka bolesti, kada počinje hronični stadijum koji predstavlja konačni ishod aktivne bolesti. U dinamičkom stadijumu se dostiže NADIR vidna oštrina koja je zapravo najslabija vidna oštrina koju pacijent ostvari, ali RNFL i dalje može da bude otečen i da se prvo registruje normalizacija debljine, a kasnije dubok gubitak aksona i optička atrofija kao krajnji stadijum (38) (**Error! Not a valid bookmark self-reference.**). Bolest je u većini slučajeva bilateralna ili asimetrična sa gubitkom vidne oštine prvo na jednom oku, pa zatim na drugom unutar nekoliko dana, nedelja ili meseci, a ponekad i više godina (85).

Nekoliko longitudinalnih studija LHON pacijenata je opisalo karakteristike promena peripapilarnog RNFL na OCT-u. Kod asimptomatskih nosilaca postoji značajno zadebljanje temporalnog RNFL u poređenju sa kontrolama i trend zadebljanja inferiornog segmenta (11). Ovo rano zadebljanje smatra se posledicom poremećaja aksoplazmatskog transport i verovatno predstavlja rani tj osnovni stres na nervna vlakna. U momentu početka bolesti, tipično postoji zadebljanje superiornog i inferiornog dela RNFL dok je temporalni kvadrant normalne debljine zbog početka atrofije (12). Ove promene odgovaraju pojavljivanju pseudoedema optičkog diska, hiperemiji i mikrovaskularnim promenama na pregledu fundusa. Posle tri meseca javlja se temporalno istanjenje, a kroz devet meseci registruje se superiorno i inferiorno istanjenje (13).

OCT makule pokazuje istanjenje unutrašnjeg makularnog prstena i spoljašnjeg nazalnog kvadranta u prvih tri meseca od onseta bolesti.

Ovo dalje progredira ka temporalnom delu tokom naredna tri meseca i do 12. meseca od početka bolesti postoji difuzno istanjenje makule sa prosečnom debljinom od 251 μm u poređenju sa prosečnom debljinom zdravih osoba koja iznosi 281 μm (14). GCL-IPL je izgleda još senzitivnija na rane promene kod LHONa. Mala longitudinalna studija 4 pacijenta pokazuje da je istanjenje GCL-IPL u nazalnom kvadrantu prisutno i pre početka simptoma. Tokom prva tri meseca od početka bolesti GCL-IPL istanjenje progredira na donji, superiorni i temporalni kvadrant sa difuznim istanjenjem prosečnog GCL-IPL na 63 μm 3 meseca od onseta. Ovo istanjenje se nastavlja do 57 μm 6 meseci posle početka, da bi se posle stabilizovalo (7) (Slika 3. OCT i grafički prikaz istanjenja GCL-IPL koje je procentualno najveće u prvih 6 meseci od početka bolesti posle čega nastupa period stabilnosti).

Radialna peripapilarna kapilarna mreža je pogođena kod pacijenata sa LHONom što je potvrđeno OCT angiografijom (15-17). Studija koja je uključila 22 pacijenta u različitim stadijumima bolesti pokazala je da postoji isključenje kapilarne mreže u temporalnom peripapilarnom delu u ranom stadijumu bolesti da bi se kasnije to isključenje širilo inferiorno, superiorno pa sve do difuznog isključenja u hroničnim fazama bolesti. Vaskularne promene korespondiraju GC-IPL istanjenju, a prethode istanjenju RNFL (6).

Kod malog broja obolelih dolazi do spontanog oporavka vidne funkcije (56), koji se ogleda u smanjivanju ili fenestraciji centralnog skotoma, a rezultira u poboljšanju vidne oštine.

Veći procenat oporavka vidne funkcije je primećen kod m.14484T > C/MT-ND6 i DNAJC 30 mutacija koje imaju najbolju prognozu. Isto tako starost pacijenta u momentu nastanka bolesti, ukoliko se bolest javi u detinjstvu ima najbolju prognozu nezavisno od tipa mutacije (86). Bolest se najčešće javlja u mladosti nešto kasnije kod žena, ali su poznati slučajevi javljanja u ranom u detinjstvu (87), kao i u starosti (88), (89).

Barboni i saradnici(90) su u skorašnjem radu objavili da su dece starosti između 3 i 9 godina imala bolju vidnu oštrinu od onih koji su bili stariji od devet godina

Isto tako je kod dece mlađe od 9 godina srednja devijacija u rezultatima vidnog polja bila manja u poređenju sa decom starijom od devet godina. Srednja debljina sloja ganglijskih ćelija je bila viša u grupi dece starosti između 3 i 9 godina nego kod dece mlađe od 3 i starije od 9 godina. Ovi istraživači su takođe opisali četiri moguća obrasca gubitka vidne oštrine u dečjoj dobi:

Subakutni bilateralni (66.7%); Bilateralni sa podmuklim tokom (17.3%); unilateralni (11.1%); i subklinički bilateralni (4.9%). Majander i saradnici (87) su definisali tri moguća načina gubitka vidne oštrine: klasični akutni koji je bio najčešći, sporo progresivni i subakutni podmukli kod koga je bilo najduže vreme do postavljanja dijagnoze i iznosilo je čak 15 godina. Zbog opisanih unilateralnih slučajeva i slučajeva sa odloženom dijagnozom potrebno je da se svi slučajevi ambliopije u dečjem dobu detaljno dijagnostikuju u smislu LHON-a.

Kod nekih neurodegenerativnih mitohondrijskih oboljenja (Kearns-Sayre syndrome) javljaju se promene na endotelu rožnjače slične promenama kod Fuch's-ove endotelne distrofije u čijoj osnovi leži disfunkcija oksidativnog metabolizma (91). Endotel rožnjače kod LHON-a i drugih pacijenata sa genetskom mitohondrijskom disfunkcijom do sad nije ispitan.

1.4.3 Elektrofiziološke karakteristike LHON pacijenata

Elektrofiziološki modaliteti koji se najčešće koriste kod LHON-a za procenu funkcije retinalnih ganglijskih ćelija i vidnog puta su Patern elektroretinogram (PERG), Patern vidni evocirani potencijali (VEP), multifokalni VEP i fotopični negativni odgovori (PhNR). Najčešće se upotrebljavaju PERG i VEP. Internacionalni VEP i PERG stimulus podrazumevaju suprapragovne kontrastne stimulse po principu šahovske table koji može biti standardne veličine (12° x 15°) ili stimulus velikog polja (24° x 30°), dok psihofizika omogućuje merenje pragovne draži (Slika 4. Šematski prikaz polja (standardno i veliko) i njihovih projekcija na retini VEP-a i PERG-a

Patern elektroretinogram (PERG) potiče od unutrašnjih slojeva retine, omogućava procenu funkcije ganglijskih ćelija i sve više se koristi u proceni stanja prednjih delova vidnog puta(92,93) (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižen, a VEP abnormalan (101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b).). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćanje latencije P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja

ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Normalan PERG se sastoji od prominentne pozitivne komponente P50 i veće kasnije negativne komponente N95. N95 komponenta potiče od RGC dok 30% P50 potiče od anteriornijih retinalnih struktura (93,94).

VEP sa preokretom uzorka beleži bioelektrične odgovore iz vidnog korteksa (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERG-a celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

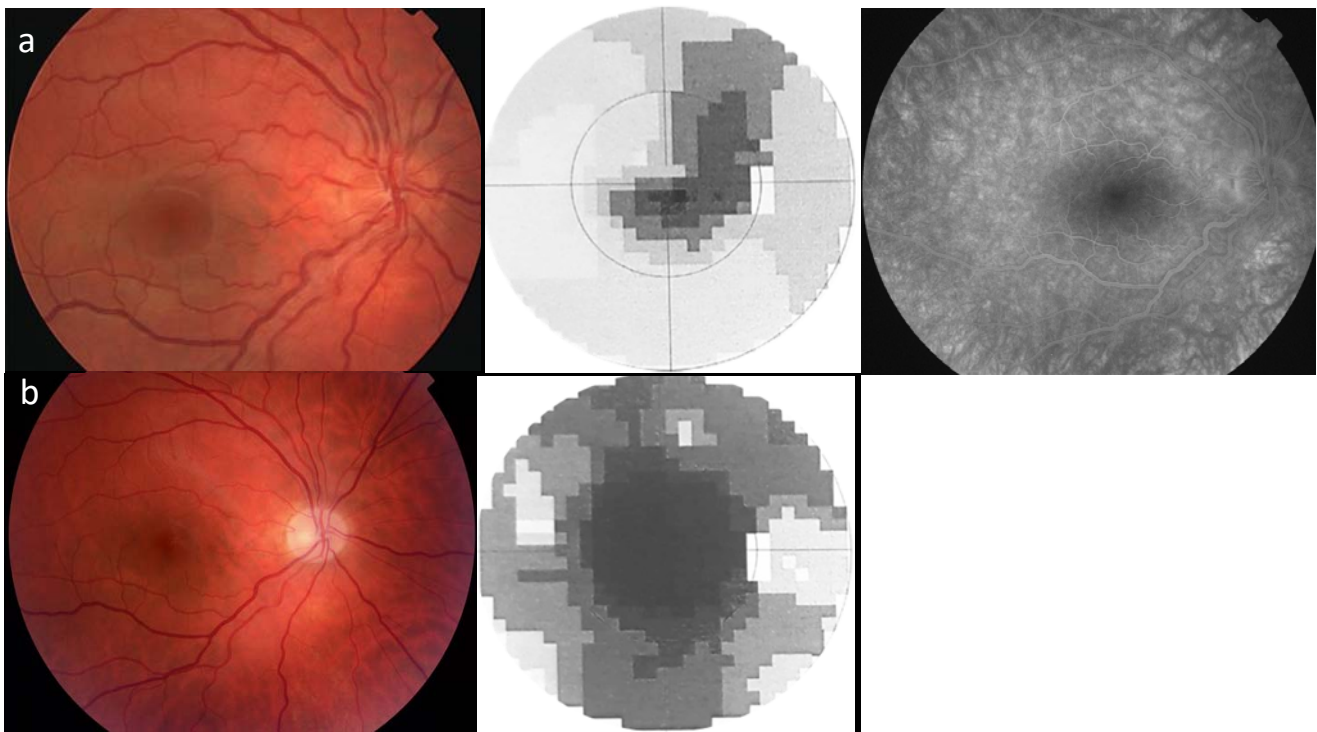
Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulus centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižen, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b.). Majander je dobila slične rezultate koji su kozistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latenca P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćenje latence P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Variranjem prostornih frekvencija moguće je da se utvrdi preovlađujuću aktivaciju različitih neuronskih komponenti vidnog puta na osnovu veličine receptivnih polja mrežnjače, da se izazovu odgovori u kortikalnim oblastima u koje se signali dovode putem različitih populacija aksona sa promenljivom neuronskom provodljivošću (95). Korišćenjem polja 60° (prostorna učestalost sa većim poljima), aktiviraju se velika receptivna polja mrežnjače, čime se podstiču odgovori korteksa prenošeni velikim aksonima. Nasuprot tome, korišćenjem polja 15° (prostorna frekvencija sa manjim poljima), aktiviraju se prvenstveno manja receptivna polja mrežnjače i bioelektrički signal koji se dovodi do vizuelnog korteksa malim aksonima (96.).).a).



Slika 2. a) Fotografija fundusa desnog oka LHON pacijenta u subakutnoj fazi bolesti, 2 nedelje od početka, sa hiperemičnim optičkim diskom i tortuotičnim krvnim sudovima, centralnim skotomom u vidnom polju i bez curenja na fluoresceinskoj angiografiji b) U hroničnoj fazi bolesti vidi se atrofija i bledilo optičkog diska, sa gustim velikim centralnim skotomom u vidnom polju.

U proseku, posle 6 nedelja hiperemija i tortuozitet se povlače, javlja se temporalno bledilo optičkog diska i dalja atrofije papile vidnog živca koja se dešava po precizno opisanom redosledu (83),(84). Na optičkoj koherentnoj tomografiji (OCT) u akutnoj fazi bolesti vidi se zadebljanje RNFL prvo u temporalnim i donjim, zatim u gornjim i nazalnim kvadrantima, da bi u hroničnoj fazi usledilo istanjenje (83). Mikroangiopatija koja se vidi u prvim nedeljama evolucije bolesti uglavnom nestaje sa progresijom atrofije optičkog nerva. Ovaj stadijum može da traje od nekoliko nedelja do 6 meseci i posle njega nastaje takozvani dinamički stadijum koji generalno traje 6 meseci do godinu dana od početka bolesti, kada počinje hronični stadijum koji predstavlja konačni ishod aktivne bolesti. U dinamičkom stadijumu se dostiže NADIR vidna oštrina koja je zapravo najslabija vidna oštrina koju pacijent ostvari, ali RNFL i dalje može da bude otečen i da se prvo registruje normalizacija debljine, a kasnije dubok gubitak aksona i optička atrofija kao krajnji stadijum (38) (**Error! Not a valid bookmark self-reference.**b). Bolest je u većini slučajeva bilateralna ili asimetrična sa gubitkom vidne oštine prvo na jednom oku, pa zatim na drugom unutar nekoliko dana, nedelja ili meseci, a ponekad i više godina (85).

Nekoliko longitudinalnih studija LHON pacijenata je opisalo karakteristike promena peripapilarnog RNFL na OCT-u. Kod asimptomatskih nosilaca postoji značajno zadebljanje temporalnog RNFL u poređenju sa kontrolama i trend zadebljanja inferiornog segmenta (11). Ovo rano zadebljanje smatra se posledicom poremećaja aksoplazmatskog transport i verovatno predstavlja rani tj osnovni stres na nervna vlakna. U momentu početka bolesti, tipično postoji zadebljanje superiornog i inferiornog dela RNFL dok je temporalni kvadrant normalne debljine zbog početka atrofije (12). Ove promene odgovaraju pojavljivanju pseudoedema optičkog diska, hiperemiji i mikrovaskularnim promenama na pregledu fundusa. Posle tri meseca javlja se temporalno istanjenje, a kroz devet meseci registruje se superiorno i inferiorno istanjenje (13).

OCT makule pokazuje istanjenje unutrašnjeg makularnog prstena i spoljašnjeg nazalnog kvadranta u prvih tri meseca od onseta bolesti.

Ovo dalje progredira ka temporalnom delu tokom naredna tri meseca i do 12. meseca od početka bolesti postoji difuzno istanjenje makule sa prosečnom debljinom od 251 μm u poređenju sa prosečnom debljinom zdravih osoba koja iznosi 281 μm (14). GCL-IPL je izgleda još senzitivnija na rane promene kod LHONa. Mala longitudinalna studija 4 pacijenta pokazuje da je istanjenje GCL-IPL u nazalnom kvadrantu prisutno i pre početka simptoma. Tokom prva tri meseca od početka bolesti GCL-IPL istanjenje progredira na donji, superiorni i temporalni kvadrant sa difuznim istanjenjem prosečnog GCL-IPL na 63 μm 3 meseca od onseta. Ovo istanjenje se nastavlja do 57 μm

6 meseci posle početka, da bi se posle stabilizovalo (7) (Slika 3. OCT i grafički prikaz istanjenja GCL-IPL koje je procentualno najveće u prvih 6 meseci od početka bolesti posle čega nastupa period stabilnosti.

Radialna peripapilarna kapilarna mreža je pogođena kod pacijenata sa LHONom što je potvrđeno OCT angiografijom (15-17). Studija koja je uključila 22 pacijenta u različitim stadijumima bolesti pokazala je da postoji isključenje kapilarne mreže u temporalnom peripapilarnom delu u ranom stadijumu bolesti da bi se kasnije to isključenje širilo inferiorno, superiorno pa sve do difuznog isključenja u hroničnim fazama bolesti. Vaskularne promene korespondiraju GC-IPL istanjenju, a prethode istanjenju RNFL (6).

Kod malog broja obolelih dolazi do spontanog oporavka vidne funkcije (56), koji se ogleda u smanjivanju ili fenestraciji centralnog skotoma, a rezultira u poboljšanju vidne oštrine.

Veći procenat oporavka vidne funkcije je primećen kod m.14484T > C/MT-ND6 i DNAJC 30 mutacija koje imaju najbolju prognozu. Isto tako starost pacijenta u momentu nastanka bolesti, ukoliko se bolest javi u detinjstvu ima najbolju prognozu nezavisno od tipa mutacije (86). Bolest se najčešće javlja u mladosti nešto kasnije kod žena, ali su poznati slučajevi javljanja u ranom u detinjstvu (87), kao i u starosti (88), (89).

Barboni i saradnici(90) su u skorašnjem radu objavili da su dece starosti između 3 i 9 godina imala bolju vidnu oštrinu od onih koji su bili stariji od devet godina

Isto tako je kod dece mlađe od 9 godina srednja devijacija u rezultatima vidnog polja bila manja u poređenju sa decom starijom od devet godina. Srednja debljina sloja ganglijskih ćelija je bila viša u grupi dece starosti između 3 i 9 godina nego kod dece mlađe od 3 i starije od 9 godina. Ovi istraživači su takođe opisali četiri moguća obrasca gubitka vidne oštrine u dečjoj dobi:

Subakutni bilateralni (66.7%); Bilateralni sa podmuklim tokom (17.3%); unilateralni (11.1%); i subklinički bilateralni (4.9%). Majander i saradnici (87)su definisali tri moguća načina gubitka vidne oštrine:klasični akutni koji je bio najčešći, sporo progresivni i subakutni podmukli kod koga je bilo najduže vreme do postavljanja dijagnoze i iznosilo je čak 15 godina. Zbog opisanih unilateralnih slučajeva i slučajeva sa odloženom dijagnozom potrebno je da se svi slučajevi ambliopije u dečjem dobu detaljno dijagnostikuju u smislu LHON-a.

Kod nekih neurodegenerativnih mitohondrijskih oboljenja (Kearns-Sayre syndrome) javljaju se promene na endotelu rožnjače slične promenama kod Fuch's-ove endotelne distrofije u čijoj osnovi leži disfunkcija oksidativnog metabolizma (91). Endotel rožnjače kod LHON-a i drugih pacijenata sa genetskom mitohondrijskom disfunkcijom do sad nije ispitan.

1.4.4 Elektrofiziološke karakteristike LHON pacijenata

Elektrofiziološki modaliteti koji se najčešće koriste kod LHON-a za procenu funkcije retinalnih ganglijskih ćelija i vidnog puta su Patern elektroretinogram (PERG), Patern vidni evocirani

potencijali (VEP), multifokalni VEP i fotopični negativni odgovori (PhNR). Najčešće se upotrebljavaju PERG i VEP. Internacionalni VEP i PERG stimulus podrazumevaju suprapragovne kontrastne stimulse po principu šahovske table koji može biti standardne veličine ($12^\circ \times 15^\circ$) ili stimulus velikog polja ($24^\circ \times 30^\circ$), dok psihofizika omogućuje merenje pragovne draži (Slika 4. Šematski prikaz polja (standardno i veliko) i njihovih projekcija na retini VEP-a i PERG-a

Patern elektroretinogram (PERG) potiče od unutrašnjih slojeva retine, omogućava procenu funkcije ganglijskih ćelija i sve više se koristi u proceni stanja prednjih delova vidnog puta(92,93) (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b)Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabiln. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabiln i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b)Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabiln. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b.). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latenca P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćenje latence P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Normalan PERG se sastoji od prominentne pozitivne komponente P50 i veće kasnije negativne komponente N95. N95 komponenta potiče od RGC dok 30% P50 potiče od anteriornijih retinalnih struktura (93,94).

VEP sa preokretom uzorka beleži bioelektrične odgovore iz vidnog korteksa (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

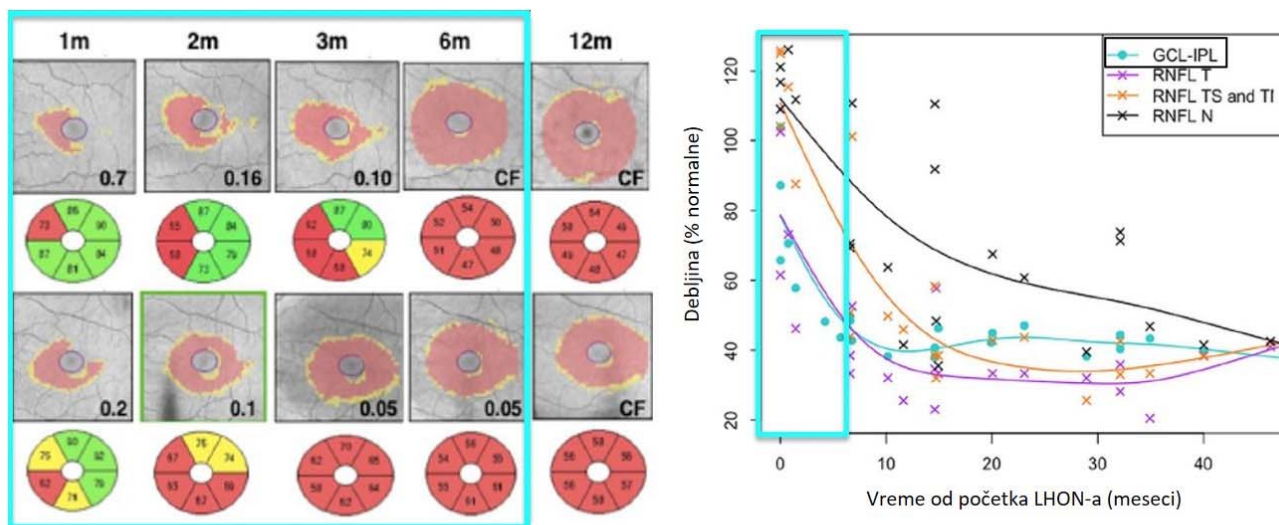
Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b).). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćanje latencije P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Variranjem prostornih frekvencija moguće je da se utvrdi preovlađujuću aktivaciju različitih neuronskih komponenti vidnog puta na osnovu veličine receptivnih polja mrežnjače, da se izazovu odgovori u kortikalnim oblastima u koje se signali dovode putem različitih populacija aksona sa promenljivom neuronskom provodljivošću (95). Korišćenjem polja 60° (prostorna učestalost sa većim poljima), aktiviraju se velika receptivna polja mrežnjače, čime se podstiču odgovori korteksa prenošeni velikim aksonima. Nasuprot tome, korišćenjem polja 15° (prostorna frekvencija sa manjim poljima), aktiviraju se prvenstveno manja receptivna polja mrežnjače i bioelektrički signal koji se dovodi do vizuelnog korteksa malim aksonima (96).).



CF (eng. *Counting fingers*) – brojanje prstiju

Slika 3. OCT i grafički prikaz istanjenja GCL-IPL koje je procentualno najveće u prvih 6 meseci od početka bolesti posle čega nastupa period stabilnosti.

Radijalna peripapilarna kapilarna mreža je pogođena kod pacijenata sa LHONom što je potvrđeno OCT angiografijom (15-17). Studija koja je uključila 22 pacijenta u različitim stadijumima bolesti pokazala je da postoji isključenje kapilarne mreže u temporalnom peripapilarnom delu u ranom stadijumu bolesti da bi se kasnije to isključenje širilo inferiorno, superiorno pa sve do difuznog isključenja u hroničnim fazama bolesti. Vaskularne promene korespondiraju GC-IPL istanjenju, a prethode istanjenju RNFL (6).

Kod malog broja obolelih dolazi do spontanog oporavka vidne funkcije (56), koji se ogleda u smanjivanju ili fenestraciji centralnog skotoma, a rezultira u poboljšanju vidne oštrine.

Veći procenat oporavka vidne funkcije je primećen kod m.14484T > C/MT-ND6 i DNAJC 30 mutacija koje imaju najbolju prognozu. Isto tako starost pacijenta u momentu nastanka bolesti, ukoliko se bolest javi u detinjstvu ima najbolju prognozu nezavisno od tipa mutacije (86). Bolest se najčešće javlja u mladosti nešto kasnije kod žena, ali su poznati slučajevi javljanja u ranom u detinjstvu (87), kao i u starosti (88), (89).

Barboni i saradnici(90) su u skorašnjem radu objavili da su dece starosti između 3 i 9 godina imala bolju vidnu oštrinu od onih koji su bili stariji od devet godina

Isto tako je kod dece mlađe od 9 godina srednja devijacija u rezultatima vidnog polja bila manja u poređenju sa decom starijom od devet godina. Srednja debljina sloja ganglijskih ćelija je bila viša u grupi dece starosti između 3 i 9 godina nego kod dece mlađe od 3 i starije od 9 godina. Ovi istraživači su takođe opisali četiri moguća obrasca gubitka vidne oštrine u dečjoj dobi:

Subakutni bilateralni (66.7%); Bilateralni sa podmaklim tokom (17.3%); unilateralni (11.1%); i subklinički bilateralni (4.9%). Majander i saradnici (87) su definisali tri moguća načina gubitka vidne oštine: klasični akutni koji je bio najčešći, sporo progresivni i subakutni podmakli kod koga je bilo najduže vreme do postavljanja dijagnoze i iznosilo je čak 15 godina. Zbog opisanih unilateralnih slučajeva i slučajeva sa odloženom dijagnozom potrebno je da se svi slučajevi ambliopije u dečjem dobu detaljno dijagnostikuju u smislu LHON-a.

Kod nekih neurodegenerativnih mitohondrijskih oboljenja (Kearns-Sayre syndrome) javljaju se promene na endotelu rožnjače slične promenama kod Fuch's-ove endotelne distrofije u čijoj osnovi leži disfunkcija oksidativnog metabolizma (91). Endotel rožnjače kod LHON-a i drugih pacijenata sa genetskom mitohondrijskom disfunkcijom do sad nije ispitan.

1.4.5 Elektrofiziološke karakteristike LHON pacijenata

Elektrofiziološki modaliteti koji se najčešće koriste kod LHON-a za procenu funkcije retinalnih ganglijskih ćelija i vidnog puta su Patern elektroretinogram (PERG), Patern vidni evocirani potencijali (VEP), multifokalni VEP i fotopični negativni odgovori (PhNR). Najčešće se upotrebljavaju PERG i VEP. Internacionalni VEP i PERG stimulus podrazumevaju suprapragovne kontrastne stimulse po principu šahovske table koji može biti standardne veličine ($12^{\circ} \times 15^{\circ}$) ili stimulus velikog polja ($24^{\circ} \times 30^{\circ}$), dok psihofizika omogućuje merenje pragovne draži (Slika 4. Šematski prikaz polja (standardno i veliko) i njihovih projekcija na retini VEP-a i PERG-a

Patern elektroretinogram (PERG) potiče od unutrašnjih slojeva retine, omogućava procenu funkcije ganglijskih ćelija i sve više se koristi u proceni stanja prednjih delova vidnog puta (92,93) (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101), (97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćivanje latencije P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Normalan PERG se sastoji od prominentne pozitivne komponente P50 i veće kasnije negativne komponente N95. N95 komponenta potiče od RGC dok 30% P50 potiče od anteriornijih retinalnih struktura (93,94).

VEP sa preokretom uzorka beleži bioelektrične odgovore iz vidnog korteksa (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latencije VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latencije VEP P100 talasa (98), (99),

(100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitudu PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovana PERG N95 (podignuta u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjena amplituda (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

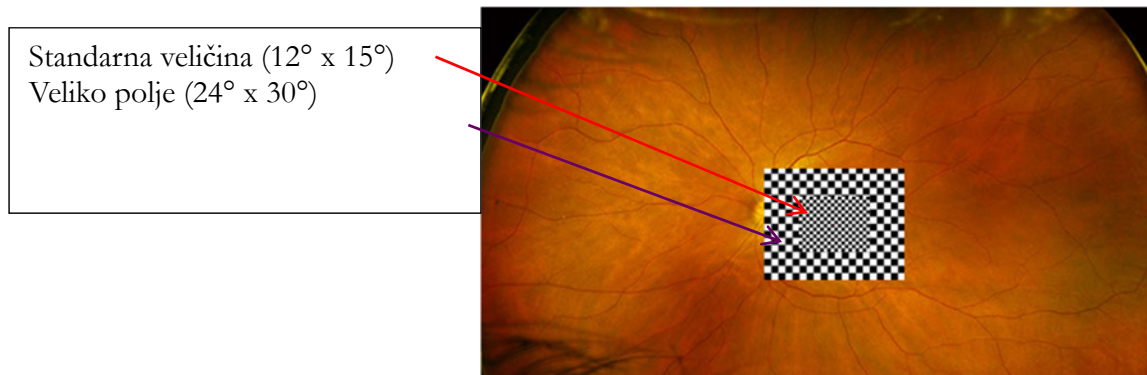
a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovana PERG N95 (podignuta u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjena amplituda (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b).). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćivanje latencija P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Variranjem prostornih frekvencija moguće je da se utvrdi preovlađujuću aktivaciju različitih neuronskih komponenti vidnog puta na osnovu

veličine receptivnih polja mrežnjače, da se izazovu odgovori u kortikalnim oblastima u koje se signali dovode putem različitih populacija aksona sa promenljivom neuronskom provodljivošću (95). Korišćenjem polja 60° (prostorna učestalost sa većim poljima), aktiviraju se velika receptivna polja mrežnjače, čime se podstiču odgovori korteksa prenošeni velikim aksonima. Nasuprot tome, korišćenjem polja 15° (prostorna frekvencija sa manjim poljima), aktiviraju se prvenstveno manja receptivna polja mrežnjače i bioelektrički signal koji se dovodi do vizuelnog korteksa malim aksonima (96.).



Slika 4. Šematski prikaz polja (standardno i veliko) i njihovih projekcija na retini VEP-a i PERG-a

Patern elektoretinogram (PERG) potiče od unutrašnjih slojeva retine, omogućava procenu funkcije ganglijskih ćelija i sve više se koristi u proceni stanja prednjih delova vidnog puta(92,93) (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b)Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćivanje latencije P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Normalan PERG se sastoji od prominentne pozitivne komponente P50 i veće kasnije negativne komponente N95. N95 komponenta potiče od RGC dok 30% P50 potiče od anteriornijih retinalnih struktura (93,94).

VEP sa preokretom uzorka beleži bioelektrične odgovore iz vidnog korteksa (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latencije VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latencije VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latencije i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitudu PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjena amplituda (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulus centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižen, a VEP abnormalan (101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

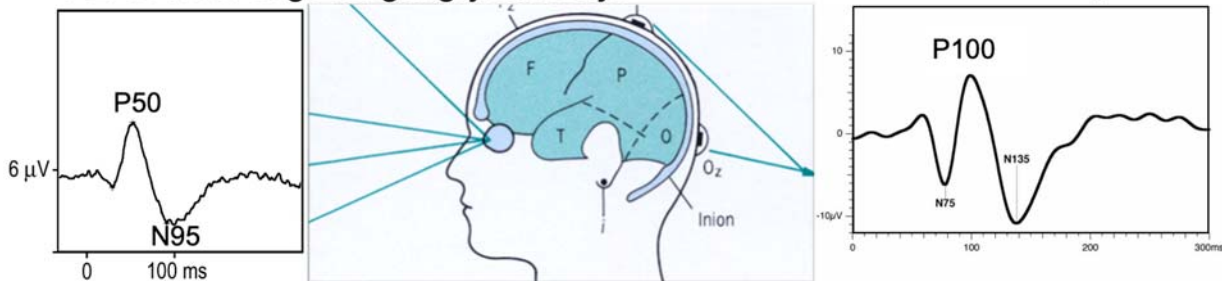
Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjena amplituda (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulus centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćivanje latencije P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Variranjem prostornih frekvencija moguće je da se utvrdi preovlađujuću aktivaciju različitih neuronskih komponenti vidnog puta na osnovu veličine receptivnih polja mrežnjače, da se izazovu odgovori u kortikalnim oblastima u koje se signali dovode putem različitih populacija aksona sa promenljivom neuronskom provodljivošću (95). Korišćenjem polja 60° (prostorna učestalost sa većim poljima), aktiviraju se velika receptivna

polja mrežnjače, čime se podstiču odgovori korteksa prenošeni velikim aksonima. Nasuprot tome, korišćenjem polja 15° (prostorna frekvencija sa manjim poljima), aktiviraju se prvenstveno manja receptivna polja mrežnjače i bioelektrički signal koji se dovodi do vizuelnog korteksa malim aksonima (96).

- PERG N95: odgovor ganglijskih ćelija
- VEP P100: kortikalni odgovori



Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

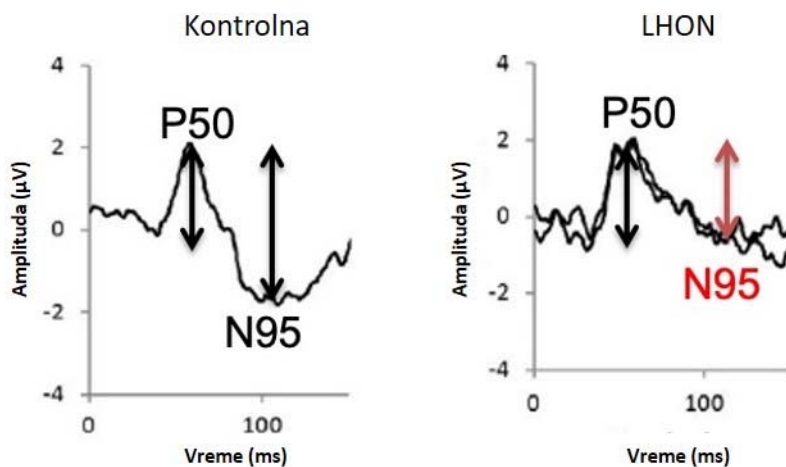
a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižen, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka

bolesti: redukovano PERG N95 (podignuto u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERG-a celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON-pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćivanje latencije P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.



Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latencije VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latencije i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabiln. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

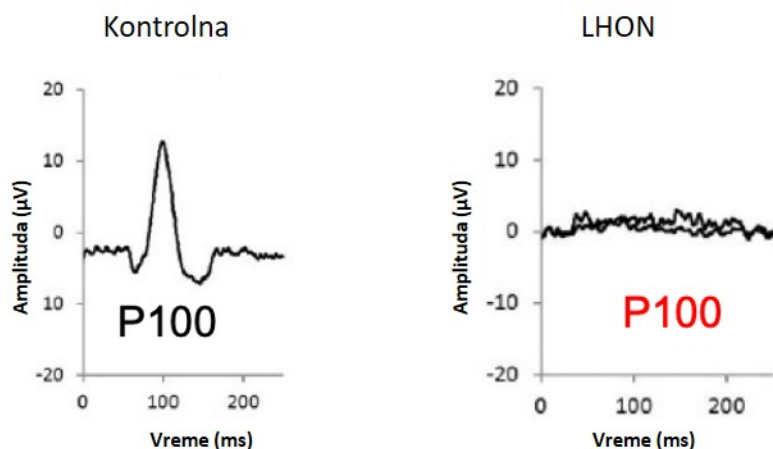
Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabiln i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabiln. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabiln i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b).). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latenca P100 talasa se progresivno produžava (97).



Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

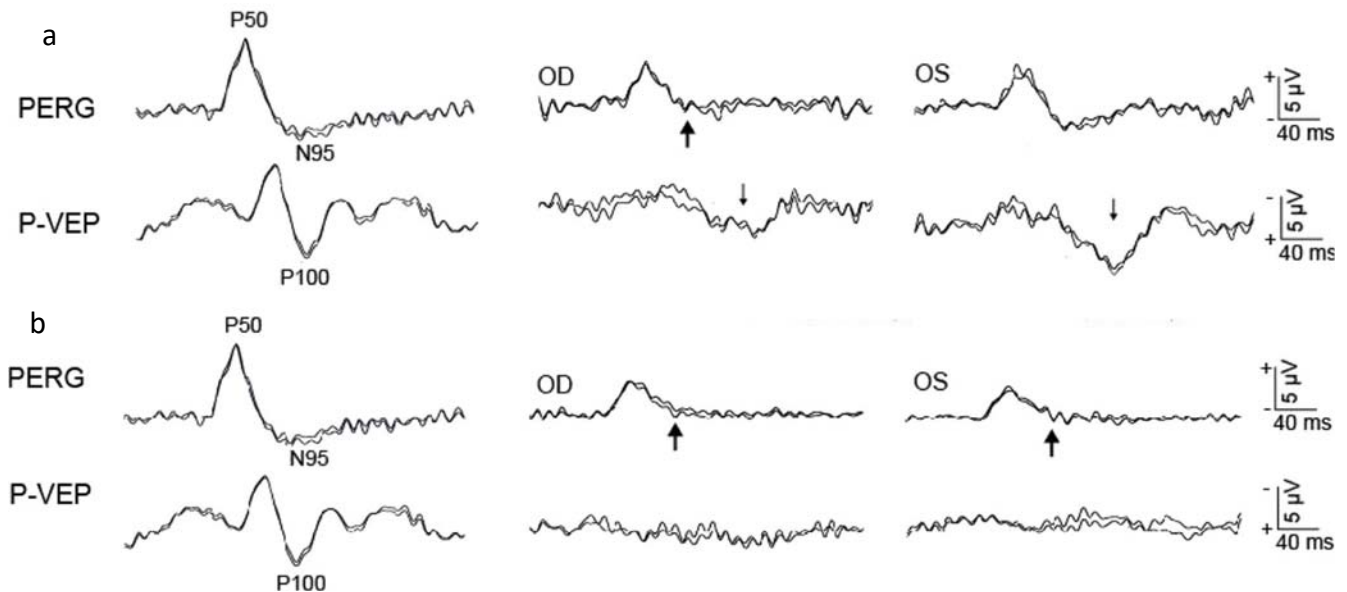
Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižen, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

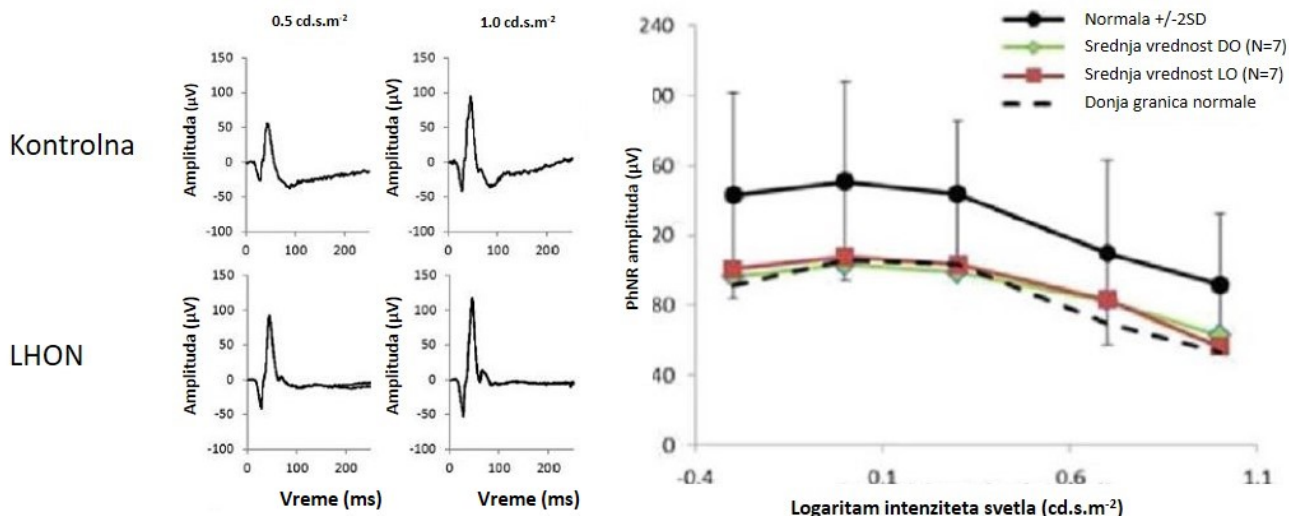
b).



Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

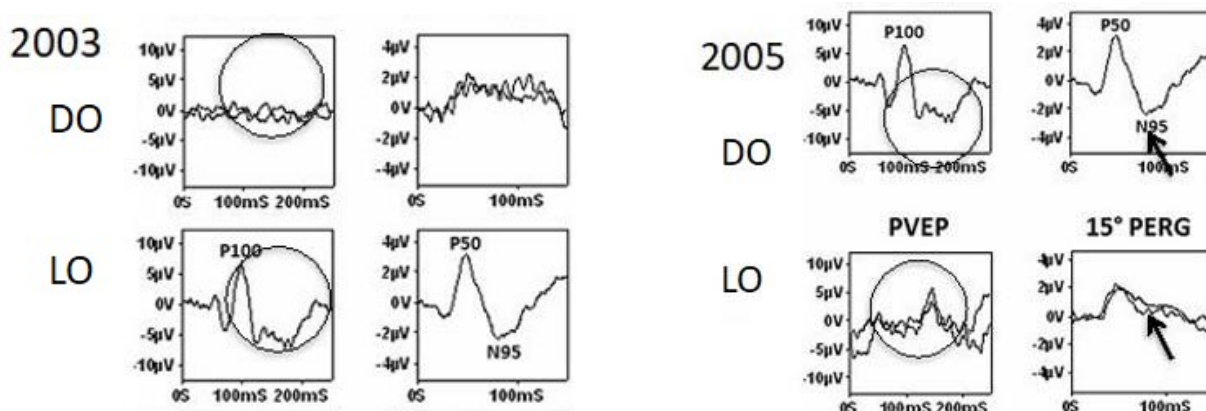
Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.



Slika 9. Fotopični negativni odgovori pacijenta sa LHON i kontrole. Prerađeno po uzoru na referencu (97).

Kod izvesnog broja LHON pacijenata dolazi do oporavka vidne oštine i vidnog polja sa ili bez tretmana. Kod nekih pacijenata postoji korelacija sa elektrofiziološkim poboljšanjem (100), (98) dok u drugim studijama nije pronađena korelacija (59).



Slika 10. Poboljšanje VEP P100 amplitude i latence, poboljšanje amplitude PERG N95 talasa. Prerađeno po uzoru na referencu (103)(Sharkawi i sar)

1.4.6 Uticaj mutacija povezanih sa LHON na biohemijske karakteristike ćelija

Funkcija subjedinica kompleksa i kod kojih je došlo do mutacija kod pacijenata sa LHON-om nije u potpunosti razjašnjena. Studije su pokazale da su subjedinice ND4 i ND6 od suštinskog značaja za sklapanje ostalih ND subjedinica u kompleks, a slično bi moglo da važi i za ND1 subjedinicu, čije mutacije mogu dovesti do ozbiljnog smanjenja nivoa aktivnosti kompleksa I (104)

Promene u aktivnosti kompleksa I se prvenstveno odražavaju na smanjenu proizvodnju ATP što dovodi smanjene dostupnosti energije ćeliji. Neuron zavisi od snabdevanja ATP-om za neurotransmisiju, ali i za transport mitohondrija duž aksona. U ganglijskim ćelijama mrežnjače, kao i u drugim nervnim ćelijama, biogeneza mitohondrija se odvija samo u telu neurona, odakle mitohondrije treba da se transportuju duž aksona pomoću mehanizma zavisnog od ATP-a (74). Oštećenje proizvodnje ATP-a se odražava na normalnu distribuciju mitohondrija duž aksona, što je veoma relevantno u nemijelinizovanom delu optičkog nerva.

In vitro je pokazano na hibridnim ćelijama koji nose jednu od tri primarne mutacije LHON, da mutacije utiču samo na nivo ATP-a i brzinu potrošnje kiseonika koje su regulisane kompleksom I, dok sinteza ATP-a i respiracija pokrenuta sukcinatom nisu oštećeni (15). Ove ćelije su efikasno nadoknadile oštećenje OXPHOS kroz održavanje sinteze ATP alternativnim putevima kao što je glikoliza (15). Isto tako rezultati kod pacijenata sa LHON-om in vivo pokazuju narušenu sintezu ATP u skeletnim mišićima i / ili mozgu (105).

Analiza limfocita pacijenata sa mutacijom G11778A nije pokazala razlike u odnosu na kontrole u pogledu energije naelektrisanja, odnosno relativnog odnosa ATP, ADP i AMP, a u fibroblastima koji sadrže mutaciju G3460A utvrđeno je da je sinteza ATP vezana za kompleks I normalna (74).

U LHON hibridnim ćelijama ukupni ćelijski sadržaj ATP-a je smanjen u poređenju sa kontrolama kada se ćelije uzgajaju u metabolički stresnim uslovima, tj. medijumu gde je glukoza zamenjena galaktozom (74), što ukazuje da bi biohemijski efekat mutacije mogao da se ispolji samo u uslovima visoke energetske potražnje. Ova varijabilnost u rezultatima može da ukaže na uticaj modulirajućih genetskih i faktora sredine.

Drugu značajnu ulogu u patogenezi LHON-a igra i apoptotska ćelijska smrt koja gotovo istovremeno pogađa ganglijske ćelije mrežnjače što dovodi do atrofije optičkog nerva. Na mehanizam programirane ćelijske smrti po tipu apoptoze ukazuje odsustvo znakova zapaljenja na histopatološkom pregledu, a takođe je potvrđen biohemijskom analizom.

Različita ispitivanja LHON ćelija uzgajanih u galaktoznom medijumu pokazala su da su ove ćelije sklonije apoptotskoj smrti u odnosu na kontrolne uzorke. Sporo metabolisanje galaktoze u glukozo-1-fosfat ne obezbeđuje da se u glikolizi sintetiše dovoljna količina ATP za zadovoljavanje energetske potrebe, pa ćelije zavise od oksidativne fosforilacije kao osnovnog mehanizma za sintezu ATP.

U ovim uslovima dolazi do povećanog oslobađanja citohroma c u citosol kod LHON ćelija što ukazuje na aktivaciju unutrašnjeg puta apoptoze, koji se pokreće u mitohondrijama (106). Apoptotska ćelijska smrt LHON ćelija uzgajanih u medijumu sa galaktozom je nezavisna od kaspaza i posredovana je faktorom indukcije apoptoze (Apoptosis Inducing Factor - AIF) i endonukleazom G (74). Iako je utvrđeno da se degeneracija RGC u LHON-u odvija apoptotskim putem, veza između narušene funkcije kompleksa I i apoptoze nije u potpunosti razjašnjena, i smatra se da dodatni

faktor, povećana proizvodnja ROS i oksidativni stres, imaju ključnu ulogu u degeneraciji optičkog nerva.

Kompleks I je glavni izvor superoksidnog anjona i poremećaj njegove funkcije je povezan sa povećanom proizvodnjom $O_2 \cdot$ i sa disbalansom redoks statusa ćelije. Mogućnost da LHON mutacije utiču na interakciju kompleksa I sa CoQ govori u prilog uloge oksidativnog stresa u patogenom mehanizmu pošto delimično redukovani molekuli CoQ mogu biti još jedan potencijalni izvor reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (ROS)(40).

Mitohondrije iz ćelija sličnih RGC pokazuju količinski manji sadržaj kompleksa respiratornog transportnog lanca i manji sadržaj MnSOD u odnosu na mitohondrije mozga, što ukazuje na to da su ganglijske ćelije mrežnjače veoma osetljive i na blage promene u ravnoteži proizvodnja/uklanjanje ROS-a (39).

Studija sprovedena na pacovima je pokazala da su mitohondrije kod jedinki ženskog pola manje sklone oksidativnom stresu u odnosu na muške, zahvaljujući većoj ekspresiji antioksidativnih enzima koji mogu biti modulirani estrogenima (107). Ovi rezultati mogu predstavljati efikasnu vezu između oksidativnog stresa i predilekcije LHON-a za muški pol.

Patogeni mehanizam LHON-a je rezultat složene kombinacije nedostatka proizvodnje energije, oksidativnog stresa i apoptoze.

Mononuklearne ćelije periferne krvi (MNČPK) mogu da obezbede uvid u mitohondrijske mehanizme humanih patogenih stanja i da omoguće prikupljanje bioenergetskih informacija. Ovaj pristup je značajno manje invazivan nego uobičajene mišićne biopsije ili kožni graftovi (108). U skorije vreme je postalo jasno da veliki broj različitih patologija koje su prezentovane simptomima predominantno na jednom organu, npr. mozgu ili retinalnim ganglijskim ćelijama, takođe moduliraju mitohondrijalnu energetiku u ćelijama periferne krvi, kao što su MNČPK ili trombociti. Najveći deo MNČPK čine limfociti, dok monociti čine najmanji deo. U studijama je pokazano da razlike u metaboličkim procesima limfocita, monocita i trombocita indikuju da se svaki od njih može koristiti kao sensor metaboličkog i inflamatornog stresa u različitim patologijama (109). Zbog toga je upotreba limfocita za merenje funkcije mitohondrija kod LHON pacijenata sve više u upotrebi.

1.4.7 LHON plus

Retko se, pored okularnih manifestacija, uz Leberovu hereditarnu optičku neuropatiju mogu javiti pridruženi i sistemski poremećaji i ova povezanost se zove LHON plus (110).

LHON, bilo se 3 primarne mtDNK mutacije, ali češće sa retkim mutacijama mtDNK koje takođe utiču na mtDNK gene koji kodiraju subjedinice kompleksa I, može da se prezentuje spektrom kliničkih manifestacija počev od optičke atrofije sa distonijom i bilateralnim lezijama bazalnih ganglija koje liče na Leigh sindrom do MELAS sindroma (111). LeberPlus fenotip koji uključuje sistemske abnormalnosti kao što je spastična distonija i encefalopatija kao dodatak optičkoj atrofiji su bili

opisani kod nekih familija sa primarnim mtDNK mutacijama (112). Druge mutacije su takođe povezivane sa LHONPlus fenotipom i to mtDNK 14596, mtDNK14459, i mtDNK 4160 (113).

Publikovani su slučajevi sa povezanosti sa cerebelarnaom atrofijom, mioklonusom, mijelopatijom i perifernom neuropatijom (38). Najzagonetnija i najkontroverznija je asocijacija sa multiplom sklerozom za koju se još uvek istražuje da li je u pitanju samo slučajnost bazirano na prevalenci oba poremećaja ili se dešava da je jedna bolest okidač za nastanak druge (114). Verovatno je da jedno oboljenje utiče na prirodni tok drugog oboljenja , i ovaj identitet takođe poznat kao Hardingova bolest ("Harding disease") (115), zahteva dalje istraživanje.

1.4.8 Sekundarne optičke neuropatije i diferencijalna dijagnoza

Većina metaboličkih, toksičkih i naslednih optičkih neuropatija su posledica mitohondrijalne disfunkcije. Prezentuju se sličnim simptomima: bezbolnim centralnim ili centrocekalnim skotomom, padom vidne oštine i dishromatopsijom. Promene su uglavnom bilateralne ili unilateralne sa sekvencionalnim zahvatanjem drugog oka. Početak može da bude nagao ili postepen u zavisnosti od etiologije, a vidni ishod varira od kompletnog oporavka do potpunog slepila. OCT uglavnom pokazuje istanjenje ili bledilo temporalnog dela PNO i odgovara stepenu oštećenja optičkog nerva naročito kod produženog trajanja bolesti. Od naslednih optičkih neuropatija diferencijalno dijagnostički dolaze u obzir Autozomno dominantna optička atrofija (ADOA), Behrov sindrom (116), Wolframov sindrom (koji se od skora ne smatra mitohondrijskom bolešću(116)). Klinički, ADOA se razlikuje od LHON po veoma ranom početku, gotovo uvek pre desete godine života, varijabilnom toku bolesti koji se uglavnom karakteriše značajnom stabilnošću tokom decenija i postepenom progresijom koja se ponekad dešava u koracima (117). U krajnjem stadijumu ADOA se klinički ne razlikuje od LHON-a, kod obe bolesti optički nerv pokazuje odsustvo inflamatorne reakcije, gubitak i demijelinizaciju aksona pri čemu su najranjivija najmanja vlakna papilo-makularnog snopa (118).

Toksično dejstvo pojedinih lekova (npr. Amjodaron) kao i deficit kobalamina (vitamin B12), tiamina (vitamin B1), folata i bakra su povezani sa optičkom atrofijom (119). U razvijenom svetu deficit vitamina B12, tiamina i bakra nastaje uglavnom zbog loše ishrane, alkoholizma i dugotrajne upotrebe metotreksata (120).

Sa izuzetkom neuropatije zbog nedostatka bakra, ostale neuropatije imaju odličan oporavak uz uslov brze odgovarajuće suplementacije.

eMnoge druge bolesti kao što su glaukom (naročito normotenzivni), multipla skleroza i neuromijelitis, neki infiltrativni inflamatorni ili maligni procesi kao što su sarkoidoza, limfoproliferativni poremećaji, meningeom ovojnice optičkog nerva i gliom optičkog nerva, kao i mnogobrojni infektivni agensi kao što je Lajmska bolest, sifilis i tuberkuloza i neke tumorske kompresivne lezije moraju da se isključe tokom dijagnostičkog procesa LHON-a.

1.4.9 Terapijski pristupi lečenju LHON-a

Trenutno ne postoji terapija za LHON, jedini dostupni terapijski režimi su idebenon (antioksidans) i genska terapija. Definitivni lek za ovu i druge mitohondrijske bolesti će verovatno biti genska terapija.

1.4.9.1 Idebenon

Trenutno je idebenon, benzohinon kratkog lanca, jedini tretman vidne disfunkcije kod obolelih od LHON-a koji je specifičan za bolest.

Mehanizam delovanja idebenona uključuje njegova antioksidativna svojstva i sposobnost da deluje kao mitohondrijski nosač elektrona. Idebenon zaobilazi nedostatke kompleks I mitohondrijskog respiratornog lanca kod pacijenata sa LHON, direktnim prenosom elektrona do mitohondrijalnog kompleksa III (zaobilazeći kompleks I), čime se obnavlja proizvodnja ćelijske energije (ATP) i ponovno aktiviraju neaktivne, ali vijabilne RGC-a, što na kraju sprečava dalji gubitak vida i podstiče oporavak vidne funkcije (121). Trenutni vodiči za upotrebu idebenona definišu da tokom prvih godinu dana od početka bolesti Idebenon treba da se koristi 3x300g na dan tokom perioda od minimum godinu dana (80). Efikasnost idebenona ukoliko se primenjuje u akutnoj fazi bolesti je dokazana nizom kliničkih studija (121), (122), (123), (124), a trenutno je u toku četvrta faza eksterno kontrolisane otvorene intervecione studije za primenu Idebenona i u hroničnim fazama bolesti-LEROS studija (ARVO meeting abstracta, ARVO 2022, Denver).

1.4.9.2 Genska terapija kod LHON-a

Oko je jedna od retkih imuno-privilegovanih sredina u telu i stoga je idealna za lokalizovanu gensku terapiju. Izrazita prednost nesindromskog LHON-a je u tome što je pogođen samo RGC sloj mrežnjače koji je najpovršnije i kome se može pristupiti minimalno invazivnim tehnikama za dopremanje genske terapije, kao što je intravitrealna injekcija. Još jedna prednost je što dostupnost dva oka teoretski omogućava dizajniranje kliničkog ispitivanja tako da se tretira samo jedna mrežnjača i potom uporedi efikasnost terapije sa kontrolnom kontralateralnom, netretiranom retinom. Treća važna prednost da se oštrina vida, vidno polje, kao i debljina mrežnjače mogu kvantitativno izmeriti, čime se obezbeđuje precizna metrika za procenu stanja na početku lečenja kao i procena varijacije tokom praćenja kako bi se potvrdila efikasnost tretmana

Tri velike studije RESCUE, REVERSE i REFLECT su procenjivale efikasnost intravitrealne injekcije rAAV2/2-ND4 genske terapije i pokazale značajno poboljšanje vidne funkcije kod pacijenata sa 11778 mutacijom i na tretiranom oku, ali i na netretiranom i ovaj efekat se zadržao tokom tri godine (125–127). Ova terapija još nije registrovana za kliničku primenu.

1.4.10 Dijagnostički proces kod LHON-a

Akutna faza LHON-a je fenotipski slična drugim optičkim neuropatijama. Klinički, glavna razlika u ovoj fazi je odsustvo curenja na fluoresceinskoj angiografiji, iako su opisani i slučajevi curenja kod pacijenata sa LHON-om (128–131), kao i odsustvo poboljšanja na primenjenu kortikosteroidnu

terapiju, mada i u izvesnom broju neuromijelitisa takođe ne dolazi do poboljšanja. U hroničnoj fazi, sve optičke atrofije izgledaju slično sa bleđim optičkim diskovima i gotovo je nemoguće utvrditi tačan uzrok optičke neuropatije samo na osnovu kliničkog izgleda. Tobako alkoholna neuropatija, kao i deficit vitamina B12, su kliničke fenokopije LHON-a i klinički je nemoguće ih razlikovati, zato se neretko ispostavi da je nešto što je smatrano alkoholno-nikotinskom neuropatijom zapravo LHON (132). Zato je neophodno da se sprovede detaljno kliničko ispitivanje, kako oftalmološko, tako i sistemsko (uključujući pregled neurologa i NMR mozga i kičmene moždine) da bi se isključili mogući kompresivni, demijelinizirajući, inflamatorni, infektivni, infiltrativni i toksični uzroci pojave optičke atrofije, kako u akutnoj tako i u hroničnoj fazi bolesti.

Proces genetskog testiranja je krucijalan za postavljanje dijagnoze. Obično, prvo se traže tri najčešće mutacije pomoću MLPA (engl. *multiplex liganand-dependent probe amplification*), Sanger sekvenciranja ili neke druge PCR metode kojom se ciljano traže mutacije na određenim lokusima. U slučaju negativnog rezultata, radi se sekvenciranjem celog mitohondrijskog genoma u potrazi za retkim/novim patogenim varijantama ili varijantama nepoznatog značaja. Ukoliko se identifikuju nove, nepublikovane, promene u mtDNK i one se klasifikuju kao varijante nepoznatog značaja, VUS (engl. *variants of unknown significance*) čija se patogenost mora potvrditi serijom testova mitohondrijske funkcije. Ukoliko se ne identifikuju promene u mitohondrijalnoj DNK, neophodno je da uradi sekvenciranje celog egzoma, a u pojedinim slučajevima i celokupnog genoma u potrazi za novim mutacijama ili čak genima povezanim sa optičkom atrofiom. Međutim, čak i uz detaljno kliničko i genetsko ispitivanje, mnogi slučajevi optičkih atrofija ostaju nerazjašnjeni. Ovi slučajevi predstavljaju klinički i dijagnostički izazov.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu hipotezu da pored potvrđenih i poznatih mutacija postoje i druge promene u mtDNK koje mogu da daju kliničku sliku LHON-a koja se funkcionalno ne razlikuje od kliničke slike kod pacijenata sa tipičnim LHON mutacijama, u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- **Utvrđiti zastupljenost poznatih i novootkrivenih promena u mtDNK u populaciji pacijenata sa kliničkom slikom LHON-a.**
- **Ispitati tok bolesti, kliničke i elektrofiziološke karakteristike kod već dijagnostikovanih slučajeva LHON-a i uporediti sa karakteristikama pacijenata sa atipičnim promenama u mtDNK.**
- **Ispitati strukturne promene u retini i endotelu rožnjače kod pacijenata sa LHON-om.**

3 MATERIJAL I METODE

Istraživanje je obuhvatilo sve novodijagnostikovane pacijente sa optičkom neuropatijom (sumnja na LHON) na Očnoj klinici, Univerzitetškog medicinskog centra Ljubljana u periodu od 1.januara 2017. do 1.juna 2021. U studiju su uključeni svi pacijenti sa bilateralnim akutnim ili subakutnim padom vida koji je praćen promenama na vidnom živcu ili bez njih, zatim unilateralnim akutnim ili subakutnim padom vida praćenim promenama na vidnom živcu kao i svi pacijenti sa bilateralnom optičkom atrofijom bez nekog drugog potvrđenog uzroka.

Retrospektivno su u studiju uključeni i svi prethodno dijagnostikovani slučajevi LHON-a u populaciji Slovenije od 1.januara 2000-1.januara 2017, kod kojih je za potrebe ovog istraživanja ponovo urađeno sekvenciranje i kompletan klinički pregled.

Kriterijumi za isključivanje iz studije: Utvrđivanje alternativnog uzroka pada vida (inflamatorne, nutritivne i toksične optičke neuropatije, virusne bolesti, sarkoidoza, ADEM, kao i druge oftalmološke bolesti koje rezultuju sličnim promenama na vidnom živcu).

Kao kontrolna grupa za različita ispitivanja korišćeni su zdravi pojedinci normalne vidne funkcije bez znakova mitohondrijskih bolesti kao i bez prisutnih slepih ili slabovidih osoba u porodici.

Svim pacijentima je urađena magnetna rezonanca, kompletna krvna slika i biohemija, oGF (CKD-EPI), s-HEP-2 test, antinuklearna antitela (ANA), anticitoplazmatska antitela (AMA), s-aCL (anti kardiolipinska antitela), antitela protiv citoplazmatskog antigena neutrofila s-ANCA, antitela protiv borelije i treponeme pallidum, antitela na akvaporin 4 (Aq4) i anti MOG antitela, kao i pregled neurologa.

Kod svih pacijenata koji ispunjavaju kriterijume najpre je urađeno genetsko testiranje za tri tipične LHON mutacije (m.3460G>A, m.11778G>A, m.14484T>C). Kod negativnih pacijenata je urađeno sekvenciranje sledeće generacije (eng. *next generation sequencing*, NGS) celokupne mtDNK u potrazi za atipičnim mutacijama. Kod pacijenata koji su bili negativni na NGS mtDNK urađeno je sekvencioniranje celokupnog egzoma sa dodatnim orijentacijskim sekvencioniranjem mtDNK, dok je kod 8 pacijenata urađeno i sekvenciranje celog genoma.

3.1 Genetska analiza

3.1.1 Multipla ligand-zavisna amplifikacija (*Multiplex ligand-dependent probe amplification MLPA*)

MLPA je urađena prema standardnom protokolu opisanom ranije (133). Ukratko, MLPA je multiplicirani PCR esej koji koristi do molekularnih sekvenci za različite DNK sekvence. Svaka molekularna sekvenca se sastoji iz 2 polusekvence (5' i 3' polusekvence), koje se sastoje od sekvenci specifičnih za metu što dozvoljava istovremenu v i šestruku PCR amplifikaciju na svim molekularnim sekvencama. MLPA reakcija može da se podeli u 5 koraka: 1. Denaturacija DNK i hibridizacija molekularnih sekvenci 2. Reakcija ligacije 3. PCR amplifikacija 4. Odvajanje produkata amplifikacije elektroforezom 5. Analiza podataka. U prvom koraku dolazi do denaturacije DNK i

ona se meša sa mešavinom MLPA molekularnih sekvenci. Dve polusekvence prepoinaju kontinuirane sekvence specifične za metu i tek ako postoji savršeno poklapanje bez ijedne praznine, posle hibridizacije, dolazi do ligacije i amplifikacije. PCR amplifikacija se radi korišćenjem para PCR prajmera od kojih je jedan fluorescentno obeležen. Samo vezani produkti će biti pojašani PCR-om i na taj način je broj produkata ligacije zapravo mera broja ciljnih sekvenci u uzorku. PCR produkti se dalje raydvajaju kapilarnom elektroforezom i meri se jačina fluorescence, određujući na taj način količinu PCR produkata. Poređenjem sa kontrolnim uzorcima određuje se relativna količina ciljanih DNK sekvenci u DNK uzorku.

3.1.2 Sekvenciranje mitohondrijske DNK

Istraživanje mitohondrijalnog genoma obavljeno je primenom metodologije sekvenciranja nove generacije na uzorku DNK. Ulaz celokupnog mitohondrijalnog genoma je pojačan PCR reakcijom u dva preklapajuća segmenta, a priprema sekvencionalne biblioteke nove generacije je izvršena korišćenjem Illumina Nexter XT protokola. Sekvenciranje uzoraka je obavljeno na Illumina MiSeq uređaju u setu uzoraka po dvosmernom protokolu sekvenciranja u 2x150 ciklusa. Nakon uklanjanja duplikata sekvenci, izvršili smo čitanje referentnog mitohondrijalnog genoma hg19 (u sklopu UCSC) koristeći algoritam BWA 0.6.3. U sledećem koraku, očitavanja su bila bliže usklađena sa identifikovanim i ranije poznatim kratkim polimorfizmima umetanja-brisanja (insertion-deletion) pomoću GATKv2.8 IndelRealigner kompjuterskog programa; UnifiedGenotiper GATKv2.8 je korišćen za određivanje varijanti nukleotida, gde su razmatrane samo varijante u oblastima sa pokrivenošću preko 5x i pouzdanošću označavanja iznad 30,0. Analiza identifikovanih varijanti u mitohondrijskom genomu izvršena je korišćenjem MITOMASTER kompjuterskog programa (sa Cambrian rCRS referencom) i MitoSeek-a. Za bioinformatičku analizu korišćena je prilagođena analitička putanja Mendelian Genomics Centra, verzija 0.5. Sekvenciranje uzorka DNK je rezultiralo 87x medijanom pokrivenosti ciljanih regiona i pokrilo je preko 99,9% ciljnih regiona sa najmanje 10x dubinom sekvenciranja.

U svim slučajevima, mitohondrijalne varijante su otkrivene mapiranjem očitavanja izvan kliničke mete u mitohondrijsku sekvencu. Samo podaci o egzomskom sekvenciranju korišćeni su bez daljeg ciljanog poboljšanja ili obogaćivanja očitavanja mtDNK. Mitohondrijalne sekvence su rekonstruisane na osnovu očitavanja izvan kliničke mete koja su bila usklađena sa hg19 mitohondrijskom referencom. U početku su otkrivene mitohondrijalne varijante zajedno sa drugim egzomskim varijantama, nakon čega je usledila rekonstrukcija mitohondrijalne sekvence pacijenta korišćenjem GATK FastAlternateReferenceMaker (Brzi menjajući stvaralac referenci). Ova rekonstruisana mitohondrijalna sekvenca u FASTA formatu je konvertovana u Kembridž rCRS sekvencu korišćenjem MITOMASTER alata. Varijante su obeležene podacima iz projekta MITOMAP, koji je utvrđeni izvor informacija o mitohondrijalnim varijantama, kako onima pronađenim u opštoj populaciji, tako i onima koje su ranije prijavljene u vezi sa ljudskim bolestima (134). Rutinski smo filtrirali varijante koje se javljaju sa učestalošću iznad 1% u slovenačkoj bazi podataka o

populaciji, koja je kreirana na osnovu podataka pacijenata i članova porodice, kao i one primećene sa učestalošću iznad 1% u GenBank mtDNK (izvor MITOMAP, <http://www.mitomap.org/>). Pri tome nismo razmatrali mitohondrijalne varijante koje su bile pokrivena sa manje od 10 čitanja. Stopa heteroplazmije je procenjena kao odnos broja referentnih i alternativnih očitavanja.

3.1.3 Sekvenciranje egzoma

Egzomsko sekvenciranje je izvedeno hvatanjem ciljne regije korišćenjem Illumina Nexter Coding Exome, obuhvatajući 37 Mb sekvenci koje kodiraju egzon (214,405 kodiranja prema RefSeq genskim modelima). Sekvenciranje je obavljeno na Illumina MySeq or NextSeq 550 prateći protokol dvosmernog sekvenciranja. Podaci sekvencioniranja su obrađeni korišćenjem sopstvenog analitičkog algoritma zasnovanog na bwa-GATK algoritmu. Ukratko, nakon uređivanja referentne humanje kompozicije za čitanje hg19 pomoću Burrows-Wheeler Editor-a (BWA), duplikati sekvenci su uklonjeni korišćenjem Picard MarkDuplicates, nakon čega je usledila ponovna kalibracija osnovnog kvaliteta, detekcija varijanti, ponovna kalibracija procene varijanti i filtriranje varijanti pomoću elemenata GATK softvera(135).

3.1.4 Analiza verzija

Verzije su sačuvane i označene korišćenjem vtools-a i softvera ANNOVAR (136,137). Refseq genski modeli su korišćeni za pozicioniranje varijantnih transkripata, a napomene iz dbSNP v138 su korišćene za označavanje SNP-ova. Koristili smo internu procenu učestalosti verzije zasnovanu na više od 3000 prikupljenih slovenačkih egzoma. Podaci o učestalosti verzija u globalnoj populaciji zasnovani su na podacima iz projekta GnomAD (gnomad.broadinstitute.com). Unapred izračunata predviđanja patogenosti u bazi podataka dbNSFP v2 korišćena su za procenu patogenosti za 'missense' varijante (138). Pored toga, koristili smo SNPeff prediktore da bismo dalje anotirali efekat verzije (139). Evolucionari nivoi očuvanosti regiona u kojem je lokalizovana varijanta zasnovani su na rezultatima GERP ++ procene (RS) (140). Takođe smo koristili ClinVar kao izvor poznatih varijanti povezanih sa ljudskim bolestima (134).

3.1.5 Strategija filtriranja verzija

Varijante su filtrirane prema autozomno dominantnom, autosomno recesivnom i X-vezanom modelu nasleđivanja. Filtrirali smo varijante prisutne u populaciji iznad 0,01% za dominantni model nasleđivanja i varijante koje prelaze 0,1% za autozomno recesivni i X-vezani model. Varijante koje su preostale nakon što su ovi filteri primenjeni skenirani su na poravnatom nivou čitanja da bi se izbeglo lažno otkrivanje zbog nepravilnog uklapanja ili male dubine pokrivenosti.

Ocena patogenosti nađenih varijanti je temeljena na smernicama udruženja ACMG (26), koja razvrstava varijante u sledeće grupe: grupa 1 – benigne varijante, grupa 2 – verovatno benigne varijante, grupa 3 – varijante sa nejasnim značenjem (VUS), grupa 4 - verovatno patogene varijante, grupa 5 – patogene varijante.

Kod 11 pacijenata urađena je i dodatna genetska analiza uzorka dobijenog bukalnim brisom korištenjem panela Blueprint genetic.

Pacijenti su na osnovu rezultata genetskog ispitivanja podeljeni u III osnovne grupe:

Grupa I Pacijenti sa potvrđenim tipičnim i atipičnim LHON mutacijama

Grupa II Pacijenti sa nepotvrđenim mutacijama u mitohondrijskom genomu

Grupa III Pacijenti sa optičkom atrofijom i LHON-like fenotipom bez promena u u mitohondrijskom genomu.

3.2 Klinička ispitivanja

3.2.1 Elektrofiziološka ispitivanja

Vidni evocirani potencijali (VEP) su mera električnog signala generisanog u vidnom korteksu kao odgovor na vidne stimuluse. Vidni korteks je primarno aktiviran centralnim vidnim polje, a najveći deo vidnog korteksa pripada upravo vlaknima iz žute mrlje. VEP zavisi od integriteta vidnih puteva počev od oka, preko optičkog nerva, optičke hijazme, optičkog trakta, radijacije i korteksa. Standardni protokoli Međunarodnog Društva za Kliničku Elektrofiziologiju (ISCEV) procenjuju stanje prednjih vidnih puteva-od oka do optičke hijazme).

Kontrolnu grupu za elektrofiziološka ispitivanja čine rezultati 40 zdravih pojedinaca koji su snimljeni na istoj mašini i po istom protokolu kao i pacijenti sa identifikovanim mutacijama. Svi elektrofiziološki testovi su snimljeni po ISCEV protokolima (141–143).

3.2.1.1 Elektroretinogram i vizuelni evocirani potencijali

Pattern elektroretinogram (PERG) velikog polja i vizuelni evocirani potencijali su snimani simultano na oba oka prema standardima Interacionalnog udruženja kliničke elektrofiziologije vida (International Society of Clinical Electrophysiology of Vision-ISCEV) (27). Elektroda koja je korištena za snimanje je HK-petlja pozicionirana u fornix donjeg kapka (28). Referentna elektroda od srebro-hlorida je pozicionirana na ipsilateralni temporalni deo lica, dok je elektroda za uzemljenje pozicionirana na čelo. PERG i VEP će biti snimani na aparatu ESPION (Espion visual testing system, Diagnosys LLC, Littleton, MA, USA). Stimulus je prezentovan na ekranu 21.6° X 27.8°, a 50' patern šahovske table sa 99% kontrasta i menja se 1.8 puta u sekundi. Zenice nisu širene za snimanje, a dobijeni rezultati su predstavljeni kao središnju vrednost 100 odgovora.

Skotopični ERG odgovori (odgovor štapića, maksimalni odgovor i oscilatorni potencijali) su snimljeni nakon 20-to minutne adaptacije na tamu, a fotopični odgovori (odgovor štapića i fliker 30-Hz) nakon 10 minuta adaptacije na osvetljenje pozadine (22 cd/m²). Intenzitet standardnog fleša (maksimalni odgovor, oscilatorni potencijali, odgovor čepića i fliker 30-Hz) je bio 2.4 cd s/m², a intenzitet atenuisanog "dark-adapted" fleša (odgovor čepića) je 0.03 cd s/m². VEP P100 amplituda ≥5.5 μm, VEP P100 latenca ≤110 ms, PERG P50 amplituda ≥3.0 μm, PERG N95 amplitude

$\geq 4.3 \mu\text{m}$ i N95/P50 odnos >1 smatrani su normalnim vrednostima prema normativima naše laboratorije (Očesna Klinika, UKC Ljubljana).

3.2.1.2 PhNR i izdvajanje oscilatornih potencijala

Među svim ERG odgovorima u punom polju, samo su ERG 3 prilagođeni tami (DA 3 ERG) i ERG 3 prilagođeni svetlosti (LA 3 ERG) iz desnog oka uzeti u analizu. Komponente ERG-a su analizirane detekcijom najviše/najniže (peak/trough) vrednosti. Amplituda a-talasa je definisana kao razlika u μV između osnovne i minimalne vrednosti nakon početka stimulusa. Amplituda b-talasa je razlika u μV između najniže vrednosti a-talasa i vrha b-talasa. Fotopični negativni odgovor (PhNR) je razlika između osnovne linije i kasne negativne komponente nakon i-talasa (Slika 1B). Vremena maksimuma (vrha) su odgovarala intervalima, u mikrosekundama (ms), između početka stimulusa i vrhova a-talasa, b-talasa i PhNR-a.

Izolovani OP-i su dobijeni iz originalnih ERG signala korišćenjem samonapisanih Matlab® rutina (The Mathworks Inc., Natick, Massachusetts, Sjedinjene Države) i Excel tabela (Microsoft Office 2010, ©Microsoft Corporation, Redmond, VA, USA). Pojasni filteri na niskih graničnim frekvencijama od 50, 75 i 100 Hz su primenjeni na osnovu spektralne distribucije signala. OP-i su zatim analizirani u vremenskom domenu detekcijom pik/najniže vrednosti.

3.2.2 OCT spektralnog domena SD-OCT (Spectral Domain-Optical Coherence Tomography)

SD-OCT segmentacija je urađena za svakog pacijenta na aparatu Spectralis HRA (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). Snimanja su se sastojala iz gustih 30x25-stupinjskih skenova centriranih na foveu i od 61-og horizontalnog B skena (120-mm intersken distanca) sa 16 automatskih (AutomaticReal-time Tracking -ART) frejmova svaki. Drugi sken je urađen za nasumično odabranu grupu pacijenata da bi se potvrdila ponovljivost snimanja, bez postavljanja prvog skena kao reference radi garancije nezavisnosti među dva merenja. Automatska segmentacija je urađena pomoću ugrađenog softvera Eye Explorer (version 1.9.10.0, Heidelberg Engineering). Algoritam automatske segmentacije je obezbedio kontinuiranu sliku s leva na desno napravljenu od slika dobijenih za svaki sloj retine. Upotrebljena su imena slojeva iz International Nomenclature for Optical Coherence Tomography (IN_OCT) konsenzusa (29). Softver je automatski obezbedio ETDRS (eng. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study) mapu (8 polja i centar) debljine retine za sledeće slojeve: sloj nervnih vlakana retine (RNFL), sloj ganglijskih ćelija (GCL), unutrašnji pleksiformni sloj (IPL), unutrašnji nuklearni sloj (INL), spoljašnji pleksiformni sloj (OPL), spoljašnji nuklearni sloj (ONL) i retinalni pigmentni epitel (RPE). Po završetku automatske segmentacije, svaki snimak je proveren, B-sken po B-sken da bi se identifikovali artefakti u segmentaciji ETDRS regija. Ukoliko postoji artefakt u 2 konsekutivna B-skena oko je biti isključeno iz analize. Neadekvatno definisani slojevi su manuelno popravljani. Debljina retinalnih slojeva je merena u osam ETDRS kvadrata i centru. Dalje su formirana tri prstena, od foveola: ETDRS centar, srednji prsten (prosečna vrednost debljine retine u svim kvadrantima oko ETDRS centra) i

spoljašnji prsten (prosečna vrednost debljine retine u svim kvadrantima oko srednjeg ETDRS prstena). Podaci dobijeni segmentacijom su poređeni između dve grupe pacijenata (Grupa I i III) i sa normativima segmentacije za istu mašinu dobijeni analizom podataka 200 zdravih osoba koji su dobijeni korištenjem iste mašine i iste metodologije. (30).

3.2.3 Spekularna mikroskopija

Kod potvrđenih LHON pacijenata i pacijenata sa otkrivenim atipičnim mutacijama urađena je spekularna mikroskopija za evaluaciju promena na rožnjači (broj, oblik i veličina endotelnih ćelija) u odnosu na populaciju (spekularni mikroskop Tomey, L-count metoda). Dobijene vrednosti su upoređene sa normativima za populaciju za gore navedenu mašinu.

3.3 Ispitivanje mitohondrijske funkcije

Mononuklearne ćelije periferne krvi (MNČPK) 11 pacijenata i kontrola koje odgovaraju po polu i uzrastu su sakupljene iz 24 ml heparinizovanih uzoraka pune krvi.

Nakon inicijalnog centrifugiranja pune krvi, izdvajanje MNČPK je urađeno po standardnom protokolu centrifugiranjem na gustinskom gradijentu.

MNČPK su sakupljene, isprane u puferovanom fiziološkom rastvoru (PBS), izbrojane, zamrznute u odgovarajućem medijumu (70% RPMI (Carpricorn Scientific GmbH) 20% FBS (Carpricorn Scientific GmbH) i 10% DMSO) i čuvane u tečnom azotu 7-10 dana do korišćenja za analize funkcije mitohondrija.

Nakon odmrzavanja, ćelije su resuspendovane u medijumu RPMI 1640 prebrojane, ostavljene 2 sata da se odmire i oporave, a zatim korišćene za respiometriju ili analizu protočne citometrije uparenih uzoraka (pacijent i njegova [po polu i starosti] odgovarajuća zdrava kontrola).

3.3.1 Respiometrijska analiza MNČPK

Mitohondrijska respiratorna funkcija MNČPK je merena respiometrijom visoke rezolucije (Oroboros Oxigraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austrija). Nakon izolacije, MNČPK su resuspendovane u mitohondrijskom respiratornom medijumu MiR05 (EGTA 0,5 mM, MgCl₂ × 6H₂O 3 mM, laktobionska kiselina 60 mM, taurin 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, D-saharoza 110 mM, BSA 1 g/l, pH 7.1), i sva merenja su urađena u istom medijumu. Optimalni broj ćelija po komori i koncentracija digitonina (8 µg/10⁶ ćelija) su optimizovani pre eksperimenata u skladu sa protokolom. Merenja su izvršena po protokolu titracije dekuplujućih agenasa, inhibitora i supstrata (engl. substrate-uncoupler-inhibitor titration protocol - SUIT) i mitohondrijalna respiracija je izražena kao protok O₂ po ćelijama [pmol/(s×10⁶ ćelija)], i to prvo u intaktnim ćelijama (**stanje označeno kao ROUTINE**). Zatim je merenje izvršeno nakon permeabilizacije digitoninom (deterdžent za permeabilizaciju ćelijske membrane), i sledstvenog dodavanja supstrata kompleksa I (piruvata (5 mM), malata (2 mM) i glutamata (10 mM)), u odsustvu supstrata oksidativne fosforilacije (ADP), kada ATP sintaza nije aktivna (**LEAK**). Kapacitet NADH-zavisne oksidativne

fosforilacije je određen u uslovima dodavanja supstrata za sintezu ATP (ADP (2,5 mM)) i koenzima ATP sintaze (MgCl (1,5 mM)) (**OXPHOS CI**), dok je kapacitet NADH i sukcinat-zavisne oksidativne fosforilacije određen dodavanjem supstrata za kompleks II (sukcinat (10 mM)) (**OXPHOS CI+CII**). U uslovima dodavanja specifičnog inhibitora kompleksa I (rotenon (0,5 μ M)) određen je kapacitet sukcinat-zavisne oksidativne fosforilacije (**OXPHOS CII**); dok je dodavanjem specifičnog inhibitora kompleksa III (antimicin A (2,5 μ M)) izmerena rezidualna potrošnja kiseonika (**residual oxygen consumption ROX**). Dodavanjem veštačkog donora elektrona za kompleks IV (TMPD (0,5 mM)) uz dodatak askorbata da bi se sprečila njegova autooksidacija (2 mM) izmerena je aktivnosti kompleksa IV (**CIV**); koja je zatim blokirana dodavanjem inhibitora kompleksa IV (natrijum-azid (0,1 mM)). Sve stope disanja su korigovane za ROX. Svi reagensi za respirometriju visoke rezolucije kupljeni su od Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Nemačka).

3.3.2 Određivanje membranskog potencijala mitohondrija i produkcije ROS

MNČPK periferne krvi pacijenata i odgovarajućih kontrola su zasejani (raspoređeni) u ploče za kultivaciju sa 24 bunarčića ($2-4 \times 10^5$ ćelija /bunarčiću, u medijumu RPMI 1640 (Carpricorn Scientific GmbH) sa dodatkom 10% goveđeg seruma FBS (Carpricorn Scientific GmbH) i ostavljeni da odmore tokom 1h, nakon čega je urađena analiza potencijala unutrašnje membrane mitohondrija i produkcije superoksidnog anjona

Promena potencijala membrane mitohondrija ($\Delta\Psi$), određivana je metodom protočne citofluorimetrije, nakon bojenja ćelija lipofilnom katjonskom bojom 5',6,6 - tetrahloro1,1',3,tetraetilbenzimidazilkarbocijanin jodidom (JC-1) (Thermo Fisher Scientific), koja u uslovima očuvanog potencijala UMM formira agregate intenzivne crveno-narandžaste fluorescence (FL2). U uslovima promene potencijala membrane, odnosno depolarizacije mitohondrija, boja ostaje u citoplazmi u svom monomernom obliku, pri čemu emituje zelenu fluorescencu (FL1). Porast odnosa zelene fluorescence u odnosu na crvenu (porast F1/FL2), označava smanjenje mitohondrijalnog potencijala, odnosno pojavu depolarizacije mitohondrija. Rezultati su izraženi kao odnos zelene/crvene fluorescencije (FL1/FL2), kao višestruka promena GeoMean FL1/FL2 u uzorku pacijenta u poređenju sa kontrolom čija je vrednost uzeta za jediničnu.

Ukupna produkcija superoksidnog anjona određivana je metodom protočne citofluorimetrije nakon bojenja redoks senzitivnom bojom, dihidroetidijumom (DHE) ((Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), koja slobodno ulazi u ćeliju. Nakon reakcije sa superoksidnim anjonom, DHE stvara crveno obojeni proizvod, etidijum, koji se ugrađuje u DNK. Uzorci su pripremani prema uputstvu proizvođača. MNČPK su analizirane i u kontrolnim uslovima i sa dodatkom H₂O₂ (100 μ M, 1 h) što odgovara uslovima oksidativnog stresa. DHE je dodavan u ćelijsku suspenziju (finalna koncentracija 20 μ M) a inkubacija je trajala 30 minuta na 37 °C. Nakon toga ćelije su prebačene u odgovarajuće epruvete, centrifugirane (500 g/5min/22 °C) i oprane u 1 ml PBS. Na kraju procedure ćelije su resuspendovane u 500 μ l PBS i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta fluorescence DHE

(FL2), pri čemu je pomeraj intenziteta fluorescence udesno u odnosu na kontrolne ukazivao na povećanje produkcije superoksidnog anjona što je numerički izraženo kao intenzitet povećanja u odnosu na vrednost izmerenu u odgovarajućoj kontroli koja je uzeta za jediničnu. U svakom uzorku, pacijent i njegova kontrola, analizirano je 10 000 ćelija na protočnom citofluorimetru FACSCalibur opremljenom softverom za analizu CellQuest Pro).

Ukupno je analizirano devet parova uzoraka.

3.4 **STATISTIČKA ANALIZA**

Za obradu podataka je korišćen program SPSS za Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Rezultati segmentacione analize obrađeni su korišćenjem programa R verzija 3.5.1. Za opis uzorka su korištene mere centralne tendencije (aritmetička sredina, medijana) i mere varijabiliteta (standardna devijacija, varijansa). Dobijene rezultati su prikazati u vidu srednje vrednosti +/- standardna devijacija gde je to bilo moguće. U statističkoj obradi podataka su primenjene metode deskriptivne statistike. Za analizu razlika između grupa je korišćen t-test za kontinualne varijable i χ^2 za kategoričke varijable. Normalnost raspodele varijabli je proverena Kolgomorov-Smirnov testom. Varijable koje ne pokazuju normalnu raspodelu su transformisane na pogodan način (dekadnim logaritmovanjem). Za morfološke studije rezultati su dati opisno.

Pri statističkoj analizi za svakog pacijenta je odabrano desno oko osim ako nije ambliopno ili slabo fiksirajuće (u takvim slučajevima je korišćeno levo oko). Srednja debljina slojeva retine upoređena je korišćenjem Welch-ovog t-testa za nezavisne uzorke za svaki sloj mrežnjače (33). Fišerov test je korišćen za ispitivanje odnosa između dve binarne varijable.

Da bi se povećala statistička moć poređenja razlika u debljinama pojedinih slojeva retine između LHON i nonLHON grupe, korišćeni su podaci iz oba oka svakog pacijenta. Pošto su levo i desno oko istog pacijenta u visokoj korelaciji ($r_{\min} = 0,35$, $r_{\max} = 0,87$, $\bar{r} = 0,7$), podaci su analizirani metodom mešovitih modela (32). Ova metoda je prikladna u takvim slučajevima u poređenju sa standardnim statističkim testovima (npr. t-test, linearna regresija) koji pretpostavljaju da su posmatranja nezavisna. Dva modela su ugrađena u naše podatke za svaki sloj mrežnjače i ETDRS polje: u prvom modelu (osnovni model) uključen je samo nasumični deo modela (ID učesnika). U drugom modelu (pun model) uključena je dijagnostička grupa (LHON ili nonLHON) kao fiksni faktor i ID učesnika kao slučajni faktor. Dva modela su upoređena korišćenjem testa odnosa verovatnoće. Razlika između dva modela je dokaz protiv nulte hipoteze, koja kaže da je srednja debljina mrežnjače ista između dve grupe.

Grupna poređenja oscilatornih potencijala su izvršena korišćenjem jednosmerne ili dvosmerne ANOVA u zavisnosti od prisustva ponovljene mere unutar subjekta. Uparena poređenja su obavljena korišćenjem Bonferronijeve post hoc analize. p vrednosti $< 0,05$ smatrane su statistički značajnim.

Bonferroni-Holm korekciona procedura je korišćena za korigovanje p vrednosti zbog multiplih poređenja.

4 REZULTATI

4.1 GENETSKA ANALIZA PACIJENATA SA KLINIČKOM SLIKOM LHON-a

4.1.1 Rezultati genetskog testiranja pacijenata

U naše istraživanje uključena su 82 pacijenta sa optičkom atrofijom ili koji je po fenotipskim karakteristikama odgovarao LHON-u. Rezultati su prikazani u Tabela 1.

Genetskom analizom prvo su tražene tipične mutacije (MLPA), a ukoliko nisu pronađene urađeno je testiranje celog mitohondrijskog genoma u cilju identifikacije atipičnih promena u mitohondrijskoj (sekvenciranje nove generacije mtDNK) ili jedarnoj (sekvenciranje celog egzoma ili genoma) DNK.

Uz pomoć MLPA identifikovano je petnaest pacijenata koji su nosioci jedne od tri najčešće LHON mutacije (6 pacijenata MT-ND4:m.11778G>A, MT-ND1: m.3460G>A 8 pacijenata i 1 pacijent MT-ND6: m14484 T >C), kao i tri velike LHON porodice (dve porodice sa 11778G>A i jedna sa m.3460G>A tipičnom mutacijom sa ukupno 31 slabovidim (potencijalno obolelim) članom koje su predstavljene zasebno. U toku je testiranje svih članova ovih porodica, a 10 članova je uključeno u rezultate ove disertacije (Tabela 1 i Tabela 2).

Kod preostalih pacijenata rađeno je sekvenciranje nove generacije mtDNK. S tim proširenim testiranjem, genetski je pojašnjen jedan pacijenta sa ranije publikovanom retkom mutacijom MT-ND1:m.3700G>A mtDNK. Ista mutacija je potvrđena i kod njegove sestre koja je asimptomatski nosilac.

Kod sledećih 6 pacijenata otkrivene su do sada nepublikovane promene u mtDNK: MT-ND5, m.13042G>T u homoplazmatskom stanju kod dva pacijenta, MT-NDI:m.4130A>T, MT-CIB 15309 T>C obe u homoplazmatskom stanju, MT -ND4:m.11443A>C, 65% heteroplazmija, MT-ND6:m.14598T>C, heteroplazmija 22% (Tabele 1 i 2). Prema preporukama za klasifikaciju promena u mitohondrijskoj DNK ove varijante su klasifikovane kao varijante nepoznatog značaja (PM2, PM5 suportivna) (144). Ovi pacijenti su imali tipični LHON fenotip i njihov fenotipi su prikazani zasebno. Kod ove grupe pacijenata urađeno je testiranje mitohondrijske funkcije kako bi se potvrdila patogenost ovih novoidentifikovanih varijanti.

Nadalje, kod svih pacijenata kod kojih nisu nađene konačne promene sekvenciranjem mtDNK, urađeno je bilo i sekvenciranje kliničkog i celog egzoma (CES i WES). S tim testiranjem otkrili smo i 2 pacijenta sa nedavno otkrivenom autozomalno recesivnom DNAJC 30 152 A>G (p.Tyr51Cys) mutacijom sa tipičnim LHON fenotipom koji će takođe biti prikazani odvojeno.

Kod jednog pacijenta identifikovane su prethodno publikovane patogene varijante koje odgovaraju fenotipu dominantne optičke atrofije: OPA1: c.2635delC (p.Arg879Glu>Ter3) mutacija klase 5; (ACO2):c.2253dupC u c.719G>C (Ile752His>Ter13) (klasa 5) i kod istog pacijenta verovatno patogena 719G>C ACO2. (Gli240Ala) (klasa 3), OPA1: c.2489G>A klasa 4 i VFS1: c.2480C>T de novo mutacija klase 4. Kod deset pacijenata smo pronašli promene u egzomu nepoznatog značaja

(Tabela 1), a u okviru jedne porodice smo otkrili potencijalno patogenu novu mutaciju c.722 C>T p.(Pro241Leu) na genu OAT koji do sada nije povezivana sa optičkom atrofijom

Kod sedam pacijenata pronašli smo alternativni uzrok optičke atrofije: toksični/nutritivni kod 4 pacijenata, encefalomalacija kod jednog pacijenta, ADEM i hipoksična optička atrofija takođe kod po jednog pacijenta. Takođe, kod 13 pacijenata je došlo do trajnog poboljšanja vidne oštine ili je bolest ostala jednostrana, pa smo ih isključili iz dalje analize.

Kod 20 pacijenta sa bilateralnom optičkom atrofijom nismo pronašli genetske uzroke optičke atrofije, od kojih smo kod 17 pacijenata pronašli jednu ili više benignih mutacija ranije objavljenih u kombinaciji sa patološkom LHON mutacijom. Kliničke karakteristike ovih pacijenata su uspoređene sa kliničkim karakteristikama LHON pacijenata u cilju pronalaženja kliničkih biomarkera LHON-a.

Tabela 1. Rezultati genetske analize svih pacijenata sa atrofijom optičkog nerva. 23 pacijenta sa potvrđenom ili verovatnom LHON patološkom mutacijom iz ove tabele su izdvojena u Tabela 2.

| | STAROST | POL | GENETSKO TESTIRANJE | REZULTAT | HAPLOGRUPA | |
|--|---|--------------------|---|---|--------------|---------------|
| MTDNK MUTACIJE (3 TIPIČNE ILI PRETHODNO PUBLIKOVANE) | 1 26.02.1959 | M | CES+ orient. mtDNA | MT-ND4:m.11778G>A, homoplasm (class 5) | J1c | Proband |
| | 2 20.3.1947. | | MLPA | MT-ND4:m.11778G>A, homoplasm (class 5) | | Oboleli rodak |
| | 3 20.07.2001. | M | mtDNA | MT-ND4:m.11778G>A, 92 % heteroplasm (class 5) | | Proband |
| | 4 25.10.1989. | M | MLPA | MT-ND6: m.14484 T>C, p.Met64Val (homoplasm) | | Proband |
| | 5 13.11.1956. | M | MLPA | MT-ND4:m.11778G>A, homoplasm (class 5) | | Proband |
| | 6 20.03.1984. | Ž | MLPA | MT-ND4:m.11778G>A, homoplasm (class 5) | | Proband |
| | 7 14.12.2004. | M | MLPA | MT-ND4:m.11778G>A, homoplasm (class 5) | | Proband |
| | 8 8.12.1985. | M | MLPA | MT-ND1: m.3460G>A homoplasm (class 5) | | Proband |
| | 9 07.08.1939 | Ž | MLPA | MT-ND1: m.3460G>A homoplasm (class 5) | | Oboleli rodak |
| | 10 07.05.1962 | Ž | MLPA | MT-ND1: m.3460G>A homoplasm (class 5) | | Oboleli rodak |
| | 11 16.12.1964 | Ž | MLPA | MT-ND1: m.3460G>A homoplasm (class 5) | | Oboleli rodak |
| | 12 31.05.1984 | Ž | MLPA | MT-ND1: m.3460G>A homoplasm (class 5) | | Oboleli rodak |
| | 13 07.05.1999. | M | MLPA | MT-ND1: m.3460G>A homoplasm (class 5) | | Oboleli rodak |
| | 14 15.07.1977. | Ž | MLPA | MT-ND1: m.3460G>A homoplasm (class 5) | | Oboleli rodak |
| | 15 16.10.1957 | Ž | MLPA | MT-ND1: m.3460G>A homoplasm (class 5) | | Oboleli rodak |
| | 16 15.10.1998 | M | mtDNA | MT-ND1:m.3700G>A, homoplasm (class 5) | H55 | Proband |
| MUTACIJE U NUKLEARNOMI DNK | 17 11.07.1991 | M | WES+ mtDNA | DNAJC 30 152 A>G (p.Tyr51Cys) | U5a | Proband |
| | 18 09.10.1989. | M | WES+ mtDNA | DNAJC 30 152 A>G (p.Tyr51Cys) | J | Proband |
| | 19 28.10.1959 | M | WES+ orient.mtDNA | OPA1: c.2635delC (p.Arg879GlufsTer3), pathogenic, (class 5) | K1b | Proband |
| | 20 25.12.1981 | Ž | CES+ orient. mtDNA | (ACO2):c.2253dupC in c.719G>C (Ile752HisfsTer13) (class 5) ACO2:c.719G>C (Gly240Ala) (class 3) | H56 | Proband |
| | 21 24.08.1998 | M | CES+ orient. mtDNA | WFS1: c.2480C>T de novo, likely pathogenic, (class 3) | H6a | Proband |
| 22 06.04.1977 | M | CES+ orient. mtDNA | OPA1: c.2489G>A, likely pathogenic, (class 4) | H3h | Proband | |
| NOVOIDENTIFIKOVANE PROMENE U NUKLEARNOMI DNK (VUS) | 23 13.08.1984. | M | | MT-ND5, m.13042G>T homoplasm (class 3) | | Proband |
| | 24 04.09.1995. | M | | MT-ND5, m.13042G>T homoplasm (class 3) | | Oboleli rodak |
| | 25 30.05.1960 | Ž | WES+ orient.mtDNA | MT-ND1:m.4130A>T (VUS, class 3) | T1a | Proband |
| | 26 18.01.1990 | M | CES+ orient. mtDNA | MT-CYB 15309 T>C (class 3) | K1a | Proband |
| | 27 11.03.1963 | M | CES+ orient. mtDNA | MT-ND4:m.11443A>C, 65% heteroplasm (class 3) | T2b | Proband |
| 28 16.02.1961 | M | CES+ orient. mtDNA | MT-ND6:m.14598T>C, heteroplasm 22%; (class 3) | T2 | Proband | |
| NOVOIDENTIFIKOVANE PROMENE U NUKLEARNOMI DNK | 29 07.12.1991 | M | WES+ orient.mtDNA | OPA3:c.209C>T (Pro70Leu) | V1a | Proband |
| | 30 18.06.1973 | Ž | WES+ orient.mtDNA | NM_130837.2:c.1567A>G (p.Lys523Glu) (4) | HV0 | Proband |
| | 31 15.09.1959 | M | WES+ orient.mtDNA | SEMA4A:c.528C>A (VUS, class 3) | J1c | Proband |
| | 32 19.09.1954 | M | WES+ orient.mtDNA | RPGR:c.1506+4delA (VUS, class 3) | HV6 | Proband |
| | 33 15.10.1983 | M | WES+ orient.mtDNA | MT-COI:m.7158-7159A>C (VUS, class 3) | U5a | Proband |
| | 34 04.01.199 | M | CES+ orient. mtDNA | GUCY2D:c.1567-15A>T (VUS, class 3) | K1a | Proband |
| | 35 10.11.1974 | Ž | CES+ orient. mtDNA | deletion 16p11.2 (VUS) | U2e | Proband |
| | 36 28.5.1981 | M | WES+ orient.mtDNA | OAT c.722C>T, p.(Pro241Leu), | H5b | Oboleli rodak |
| | 37 15.11.1958 | M | WES+ orient.mtDNA | OAT c.722C>T, p.(Pro241Leu), | | Oboleli rodak |
| | 38 01.08.1976 | Ž | WES+ orient.mtDNA | OAT c.722C>T, p.(Pro241Leu), | H5b | Proband |
| | 39 29.10.1957 | M | WES+ orient.mtDNA | negative, VARS2:c.603_606dupGATG p.Arg203fs - H1 | | Proband |
| | PACIJENTI BEZ IDENTIFIKOVANOG UZROKA OPTIČKE ATROFIJE | 40 13.06.1964. | Ž | mtDNA | negativno | |
| 41 15.03.1971. | | Ž | mtDNA | negativno | | Proband |
| 42 19.09.1936 | | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | H105 | Proband |
| 43 14.5.1968 | | M | CES+ orient.mtDNA | negativno | U5a | Proband |
| 44 28.03.1986 | | Ž | WES+ orient.mtDNA | negativno | J1B (J1b1a1) | Oboleli rodak |
| 45 22.7.1948 | | Ž | CES+ orient. mtDNA | negativno | H13b | Proband |
| 46 14.01.1962 | | Ž | CES+ orient. mtDNA | negativno | H8c | Proband |
| 47 15.02.1977 | | M | CES+ orient. mtDNA | negativno | J1c | Proband |
| 48 12.11.1990 | | M | CES+ orient. mtDNA | negativno | U5a | Proband |
| 49 12.02.1968 | | Ž | CES+ orient. mtDNA | negativno | U5b | Proband |
| 50 30.03.1960 | | Ž | CES+ orient. mtDNA | negativno | J1b | Proband |
| 51 25.04.1943 | | Ž | WES+ orient.mtDNA | negativno | | Proband |
| 52 11.07.1980 | | Ž | CES+ orient. mtDNA | negativno | H | Proband |
| 53 08.05.1966 | | M | CES+ orient. mtDNA | negativno | H6a | Proband |
| 54 22.01.1988 | M | mtDNA | negativno | V13 | Proband | |
| 55 05.09.1970 | Ž | WES+ orient.mtDNA | negativno | U8b | Proband | |
| 56 22.03.1997 | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | W3b | Proband | |
| 57 27.10.1941 | Ž | WES+ orient.mtDNA | negativno | H2a | Proband | |
| 58 15.09.1973 | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | | Proband | |
| 59 24.02.1990 | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | J2a | Proband | |
| 60 20.04.1967. | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | | Proband | |
| 61 01.01.1963. | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | | Proband | |
| 62 11.05.1962. | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | | Proband | |
| NEGENETSKI UZROCI OPTIČKE ATROFIJE | 63 09.03.1959 | M | mtDNA | negativno | U5b | Proband |
| | 64 15.12.1962 | M | MLPA (3 mtDNA tipične) | negativno | - | Proband |
| | 65 14.09.1997 | M | mtDNA | negativno | H27f | Proband |
| | 66 16.03.1973 | Ž | CES+ orient. mtDNA | negativno | H5a | Proband |
| | 67 01.05.1968 | M | mtDNA | negativno | W3a | Proband |
| | 68 21.07.1973 | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | T2a | Proband |
| | 69 17.01.1966. | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | | Proband |
| UNILATERALNI SLUČAJEVI ILI POBOLJŠANJE | 70 23.12.1989 | M | MLPA (3 mtDNA tipične) | negativno | | Proband |
| | 71 29.05.1988 | M | mtDNA | negativno | K1c | Proband |
| | 72 05.10.1978. | M | MLPA (3 mtDNA tipične) | negativno | | Proband |
| | 73 15.12.1983. | Ž | MLPA (3 mtDNA tipične) | negativno | | Proband |
| | 74 13.11.1979. | M | MLPA (3 mtDNA tipične) | negativno | | Proband |
| | 75 23.03.1975 | Ž | CES+ orient. mtDNA | negativno | H1 | Proband |
| | 76 20.09.1960 | M | WES+ mtDNA | negativno | J1c | Proband |
| | 77 23.04.1993 | M | CES+ orient. mtDNA | negativno | T2b | Proband |
| | 78 22.09.2008 | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | U5b | Proband |
| | 79 09.02.1960 | M | WES+ orient.mtDNA | negativno | H7c | Proband |
| | 80 28.04.1989 | Ž | CES+ orient. mtDNA | negativno | H1b | Proband |
| | 81 17.04.1964 | M | CES+ orient. mtDNA | negativno | U5a | Proband |
| | 82 03.01.1987. | M | MLPA (3 mtDNA tipične) | negativno | | Proband |

Tabela 2. Prikaz mutacija kod LHON pacijenata: u prvoj grupi prikazano je 15 pacijenata s potvrđenom mtLHON mutacijom, nadalje 2 pacijenta s arLHON mutacijom te 6 pacijenata sa nepotvrđenim patološkim mutacijama, kod kojih smo obavili i funkcionalne analize mitohondrijske funkcije.

| | | POL | MUTACIJA |
|-------------------------------------|---------|------------|--------------------|
| mtLHON TRI TIPIČNE MUTACIJE u mtDNK | LHON 1 | M | MT-ND4:m.11778G>A |
| | LHON 2 | Ž | MT-ND4:m.11778G>A |
| | LHON 3 | M | MT-ND4:m.11778G>A |
| | LHON 4 | M | MT-ND6: m14484 T>C |
| | LHON 5 | M | MT-ND4:m.11778G>A |
| | LHON 6 | Ž | MT-ND4:m.11778G>A |
| | LHON 7 | M | MT-ND4:m.11778G>A |
| | LHON 8 | M | MT-ND1: m.3460G>A |
| | LHON 9 | Ž | MT-ND1: m.3460G>A |
| | LHON 10 | Ž | MT-ND1: m.3460G>A |
| | LHON 11 | Ž | MT-ND1: m.3460G>A |
| | LHON 12 | Ž | MT-ND1: m.3460G>A |
| | LHON 13 | M | MT-ND1: m.3460G>A |
| | LHON 14 | Ž | MT-ND1: m.3460G>A |
| | LHON 15 | Ž | MT-ND1: m.3460G>A |
| | LHON 16 | M | MT-ND1: m.3460G>A |
| arLHON MUTACIJE U DNAJC30 GENU | LHON 17 | M | DNAJC 30 152 A>G |
| | LHON 18 | M | DNAJC 30 152 A>G |
| NOVOIDENTIFIKOVANE PROMENE U MTDNK | LHON 19 | M | MT-ND5, m.13042G>T |
| | LHON 20 | M | MT-ND5, m.13042G>T |
| | LHON 21 | M | MT-ND4:m.11443A>C |
| | LHON 22 | M | MT-CYB 15309 T>C |
| | LHON 23 | Ž | MT-NDI:m.4130A>T |
| | LHON 24 | M | MT-ND6:m.14598T>C |

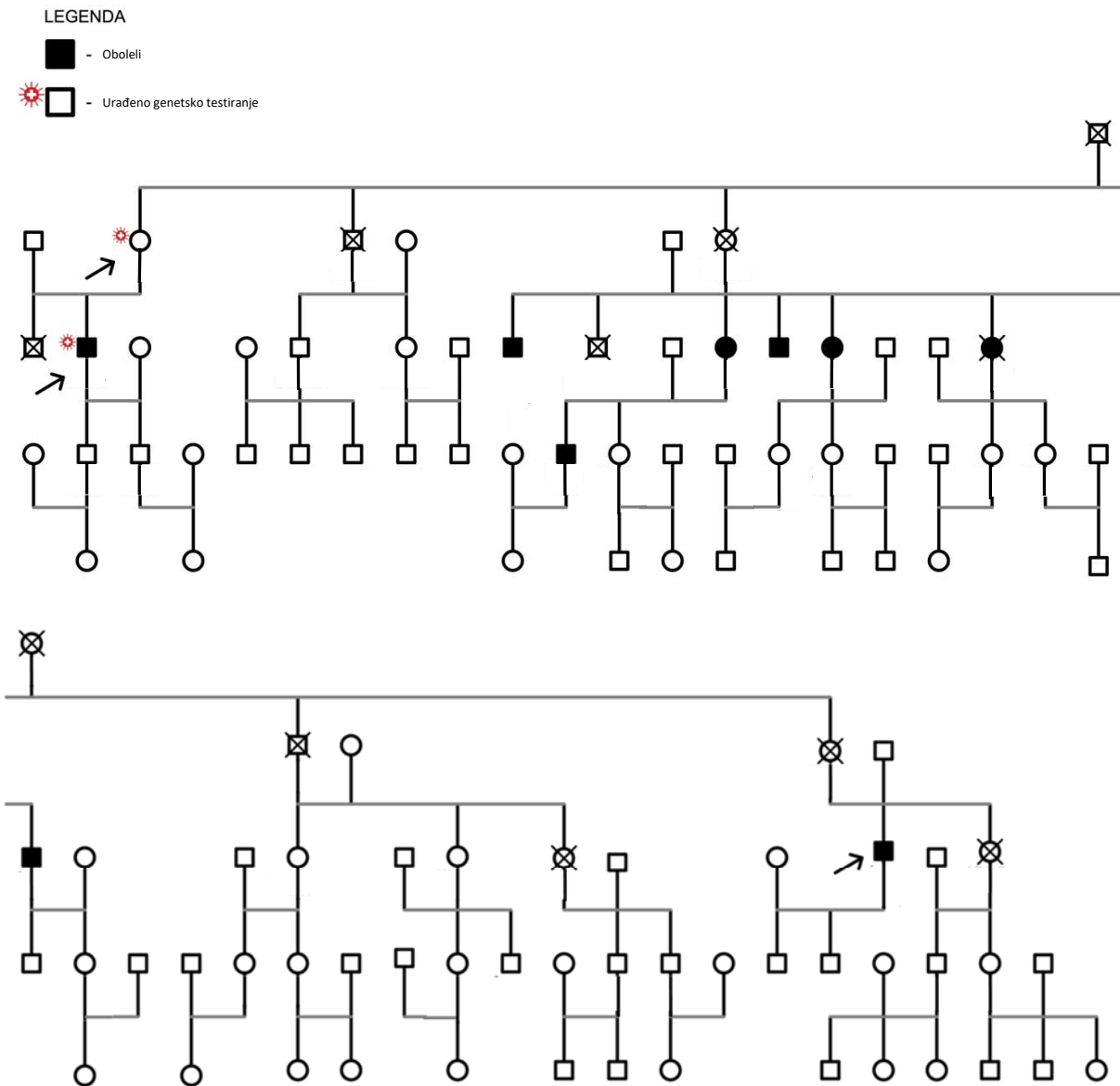
Testirano je i 16 rođaka pacijenata sa mutacijama koji su neboleli, i kod 12 njih je potvrđeno postojanje patogene mutacije (Tabela 3).

Tabela 3. Testirani rođaci pacijenata obolelih od LHON-a

| | | | | | |
|----------------------------|----|---|--------------------|----------------------|-------------------------|
| Rođaci obolelih pacijenata | 1 | ž | negativno | dobra vidna funkcija | majka pacijenta JK |
| | 2 | M | negativno | dobra vidna funkcija | brat pacijenta JK |
| | 3 | ž | negativno | dobra vidna funkcija | sestra pacijenta JK |
| | 4 | ž | negativno | dobra vidna funkcija | majka pacijenta MBT |
| | 5 | ž | MT-ND4:m.11778G>A | dobra vidna funkcija | majka pacijenta GJ |
| | 6 | ž | OPA1: c.2489G>A | dobra vidna funkcija | majka pacijenta JA |
| | 7 | ž | 15309T>C | dobra vidna funkcija | majka pacijenta KD |
| | 8 | ž | 15309T>C | dobra vidna funkcija | sestra pacijenta KD |
| | 9 | ž | 15309T>C | dobra vidna funkcija | sestra pacijenta KD |
| | 10 | ž | MT-ND5, m.13042G>T | dobra vidna funkcija | majka pacijenta MM |
| | 11 | ž | MT-ND5, m.13042G>T | dobra vidna funkcija | majka pacijenta RT |
| | 12 | M | MT-ND4:m.11778G>A | dobra vidna funkcija | sin pacijentkinje ŠPP |
| | 13 | M | MT-ND4:m.11778G>A | dobra vidna funkcija | sin pacijentkinje ŠPP |
| | 14 | ž | MT-ND4:m.11778G>A | dobra vidna funkcija | ćerka pacijentkinje ŠPP |
| | 15 | ž | MT-ND1:m.3700G>A | dobra vidna funkcija | sestra pacijenta VJ |
| | 16 | ž | MT-ND4:m.11778G>A | dobra vidna funkcija | ćerka pacijentkinje JK |

4.1.1.1 Tri velike LHON porodice

U nastavku prikazani su pedigrei 3 velike LHON porodice: Porodica I sa 9 obolelih članova i jednim potvrđenim asimptomatskim nosiocem mutacije 11778G> (Grafikon 1).

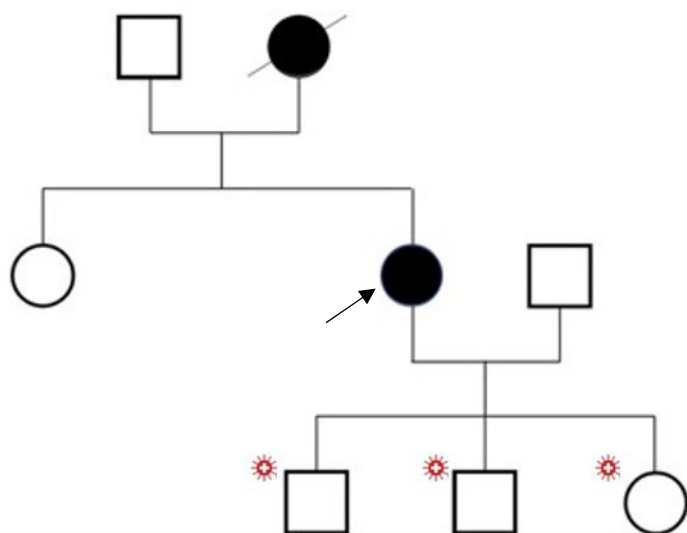


Grafikon 1. Porodično drvo Porodica I sa 9 obolelih članova i jednim potvrđenim asimptomatskim nosiocem mutacije 11778G>A. Proband i rođak su označeni strelicama

Porodica II sa istom mutacijom koju čine majke, dve ćerke (jedna nosilac mutacije, druga obolela) i troje dece (2 dečaka, jedna devojčica) potomci obolele ćerke (Grafikon 2). Kod obolele ćerke postojala je u jednom trenutku sumnja na pridruženu multiplu sklerozu (Hardingova bolest).

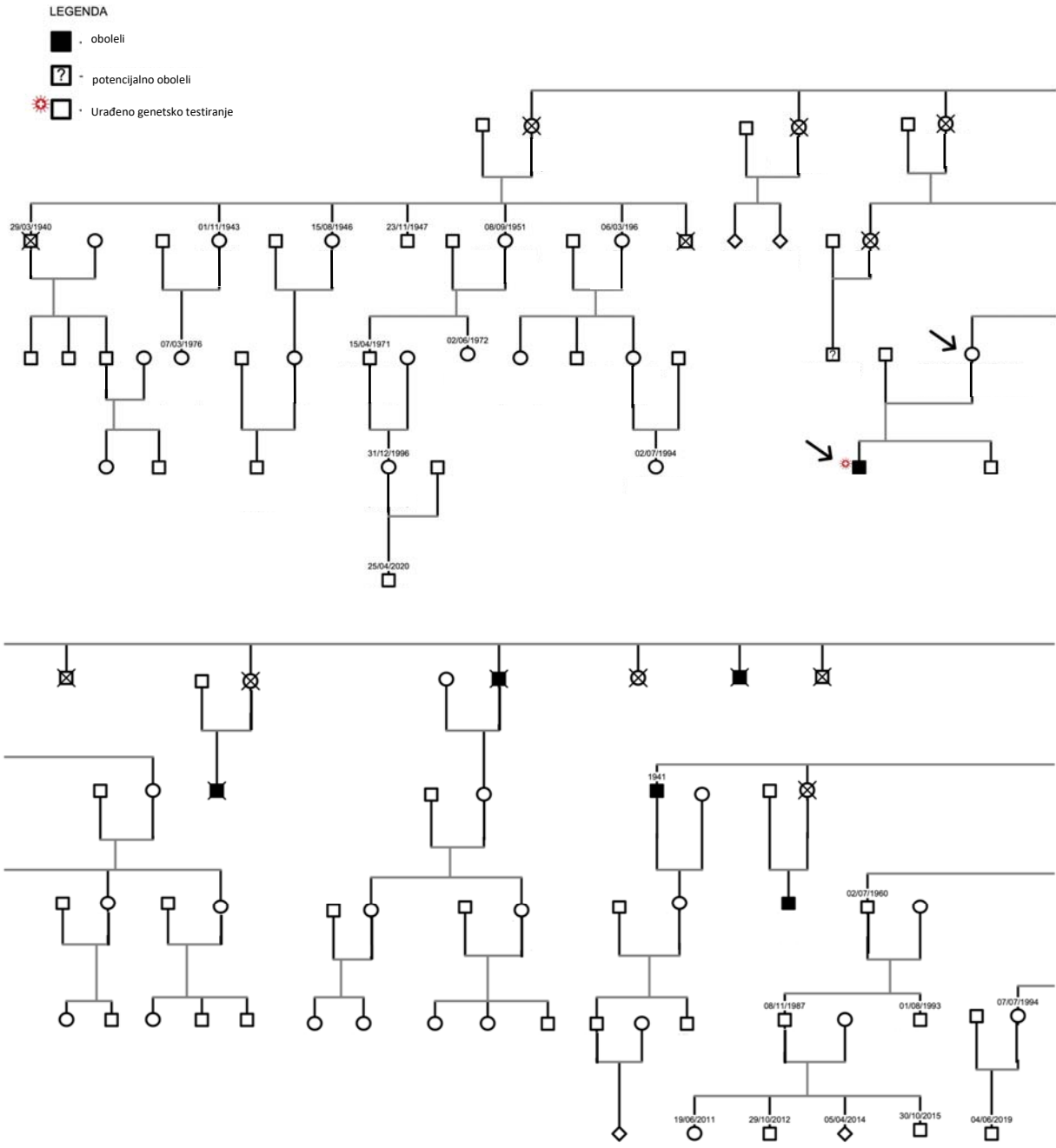
Legenda

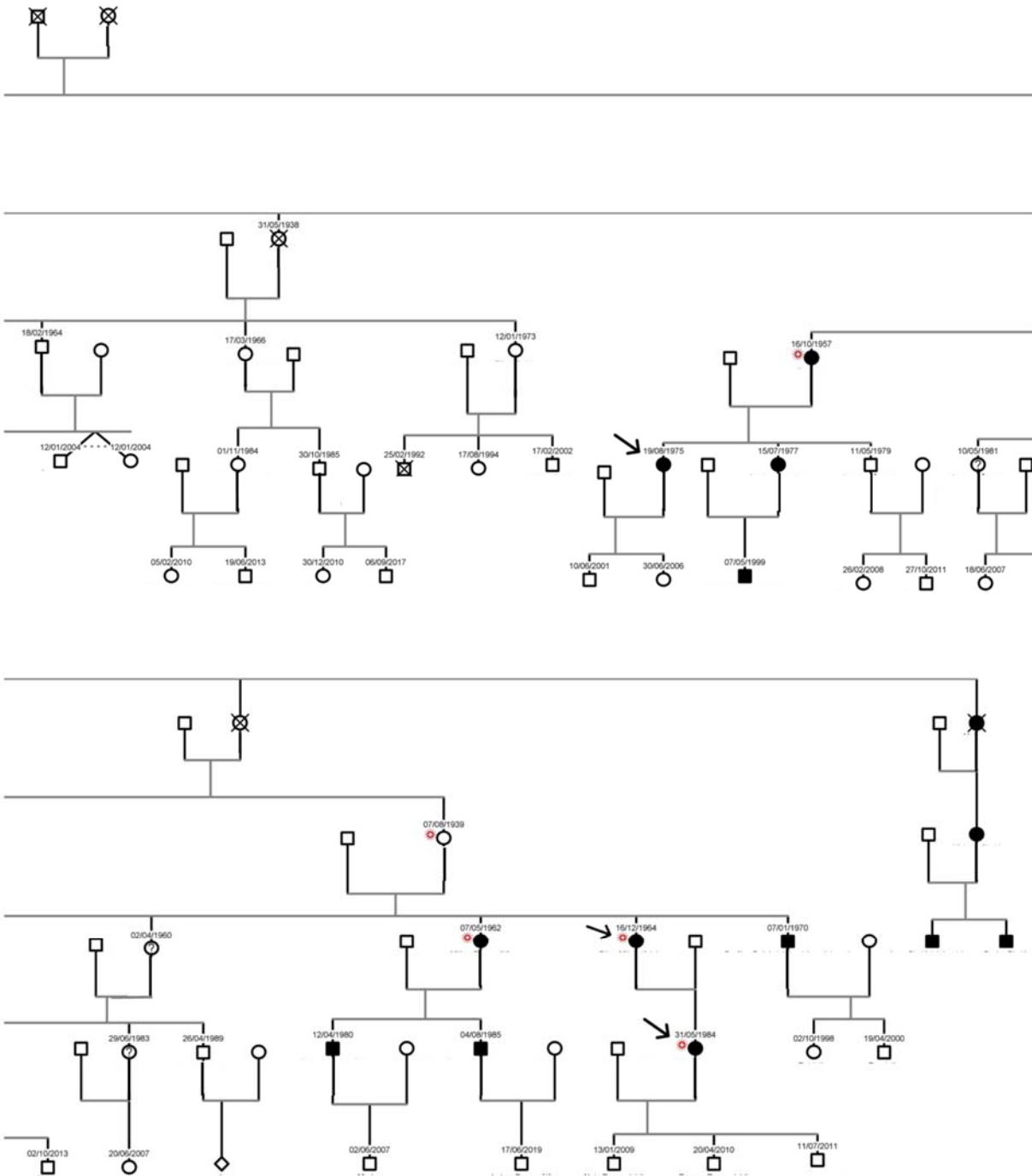
☀ - Nosioci mutacije



Grafikon 2. Porodično stablo pacijentkinje nosioca 11778 mutacije koja je potvrđena kod pacijentkinje, njene sestre i troje dece

Treću i najveću porodicu čini 20 obolelih članova i dva genetski potvrđena asimptomatska nosioca mutacije 3460G>A. U toku je genetsko testiranje svih članova porodice.

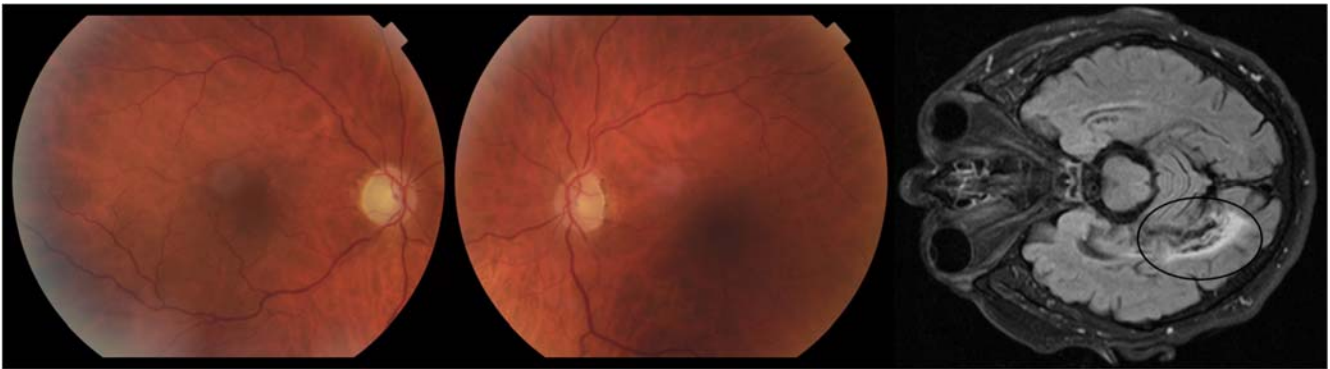




Grafikon 3. Porodica III koju čini 20 obolelih LHON pacijenata i dva potvrđena asimptomatska nosioca mutacije

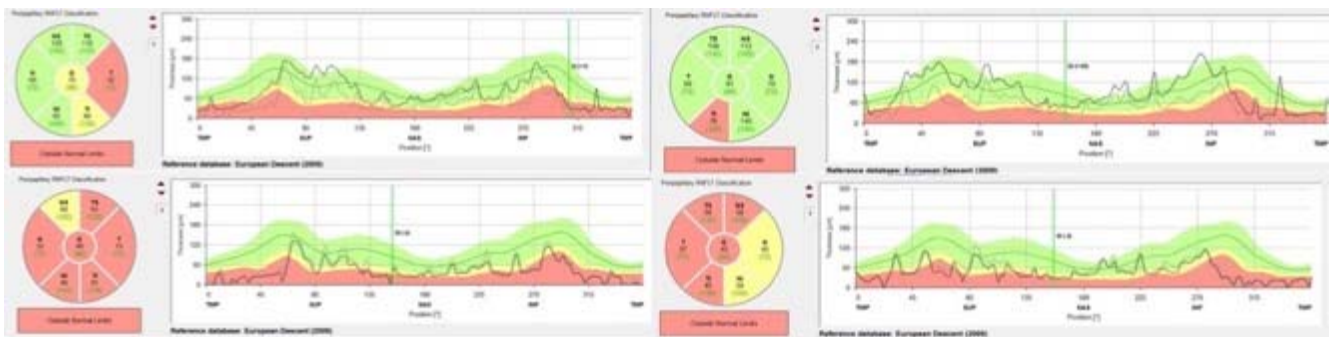
Kao pojedinačni primer izdvajamo neobičnu kliničku prezentaciju prvog pacijenta iz porodice III i koji je bio prvi pacijent otkriven iz te porodice. Zbog neobične prezentacije, kod njega se mislilo, da se radi o kortikalnom slepilu, dok LHON nije potvrđen genetskom analizom.

Prvi pacijent identifikovan kao LHON u ovoj porodici je pacijent koji je bio 57 godina star u momentu pada vida na oba oka. U momentu pregleda vidna oština je bila DO brojanje prstiju na dva metra, LO brojanje prstiju na jedan metar, postojalo je početno bledilo oba optička nerva (Slika 11), dok je MR pokazala leziju u okcipitalnom korteksu zbog čega je i postavljena dijagnoza kortikalnog slepila (Slika 11).



Slika 11. Fotografija fundusa i magnetna rezonanca pacijenta koji je prvi identifikovani pripadnik LHON porodice.

Međutim, lokalizacija lezije u okcipitalnom korteksu nije bila u skladu sa atrofijom optičkog nerva koja je bila prisutna kod pacijenta već na prvom pregledu i sa progresivnom atrofijom sloja peripapilarnih nervnih vlakana koja je registrovana kod pacijenta tokom perioda praćenja (Slika 11) zbog čega je pacijent testiran za LHON i utvrđeno je postojanje mutacije 11778G>A.



Slika 11. Leva strana slike prikazuje pacijentovo desno oko na početku bolesti (gornja slika) i nakon perioda praćenja koja pokazuje značajnu progresiju istanjenja peripapilarnog RNFL. Ista progresija primećena je i na levo oku (desna strana slike).

Detaljnou anamnezom utvrđeno je da je u porodici čak osam rođaka zakonski slepo, između ostalih i pacijent 14 godina ranije pregledan na našoj Klinici koji je bio 60 godina star u momentu

pojave LHON-a. Međutim, pošto je bio pušač i konzumirao alkohol (vlasnik vinograda) on je dijagnostikovao kao toksična neuropatija (alkoholno-nikotinska).

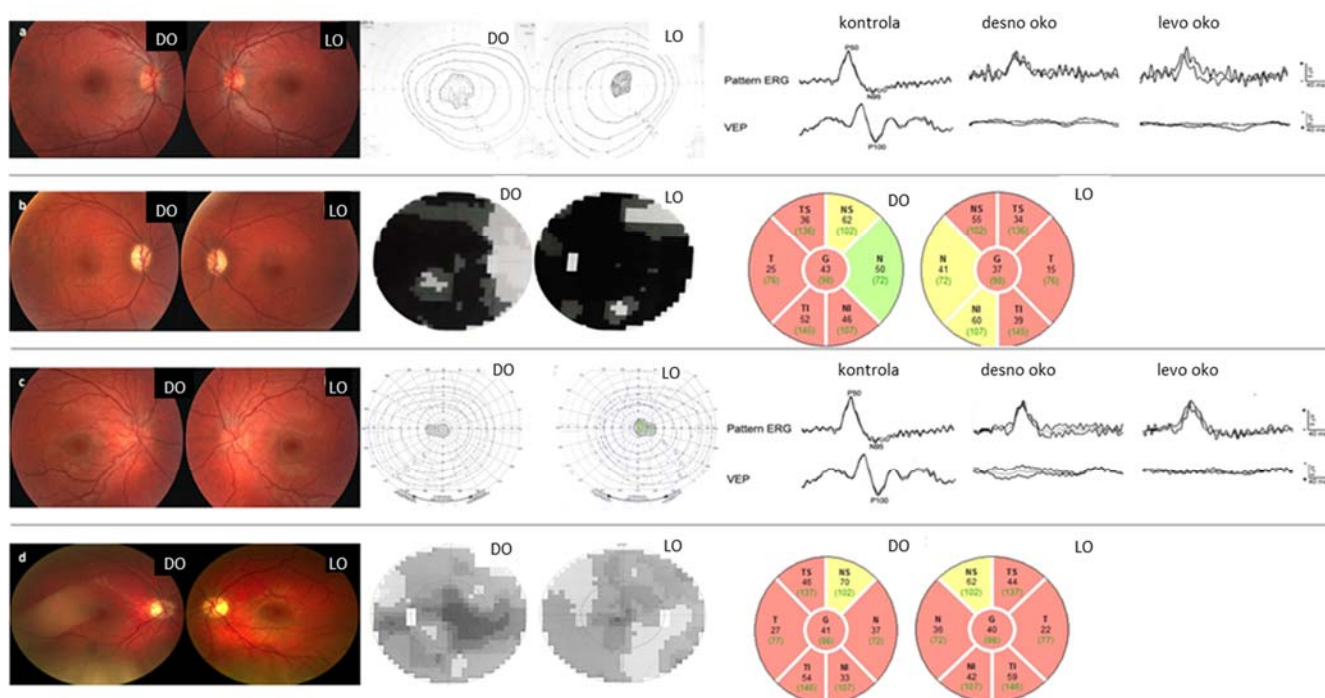
4.2 FENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA PACIJENATA SA ATIPIČNIM MUTACIJAMA

Pošto se radi o atipičnim mutacijama kod relativno malog broja pacijenata, u ovom delu predstavljamo detaljni fenotip pojedinačnih pacijenata.

4.2.1 Autozomno recesivni LHON

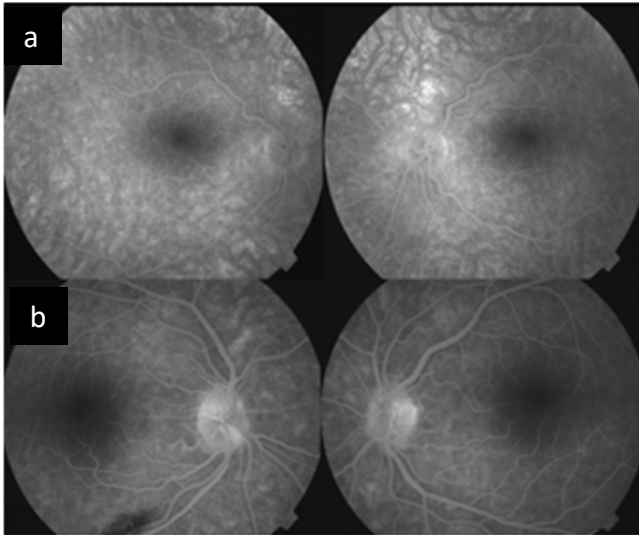
U okviru istraživanja identifikovana su i 2 pacijenta sa autozomno recesivnim LHON-om.

Prvi pacijent (označen kao LHON 17, Tabela 2) je primljen u našu bolnicu kao dečak od 17 godina u septembru 2007. godine zbog sekvencijalnog gubitka vidne oštine, prvo na desnom, a tri nedelje kasnije na levom oku. Gubitak vidne oštine na DO bio je praćen bolnim pokretima očiju. Po prijemu VO na desnom oku je bila brojane prstiju na 2m (cca. 0,03 Snellen), a na levom 0,6 (Snellen). Kolorni vid bio je relativno očuvan na njegovom LE 13/15, RE je bio 1/15 (Ishihara). Fundoskopija je otkrila hiperemične optičke disкове, bez izvijuganosti krvnih sudova i intraretinalno krvarenje na superiornoj temporalnoj arkadi desnog oka (Slika 12.a)



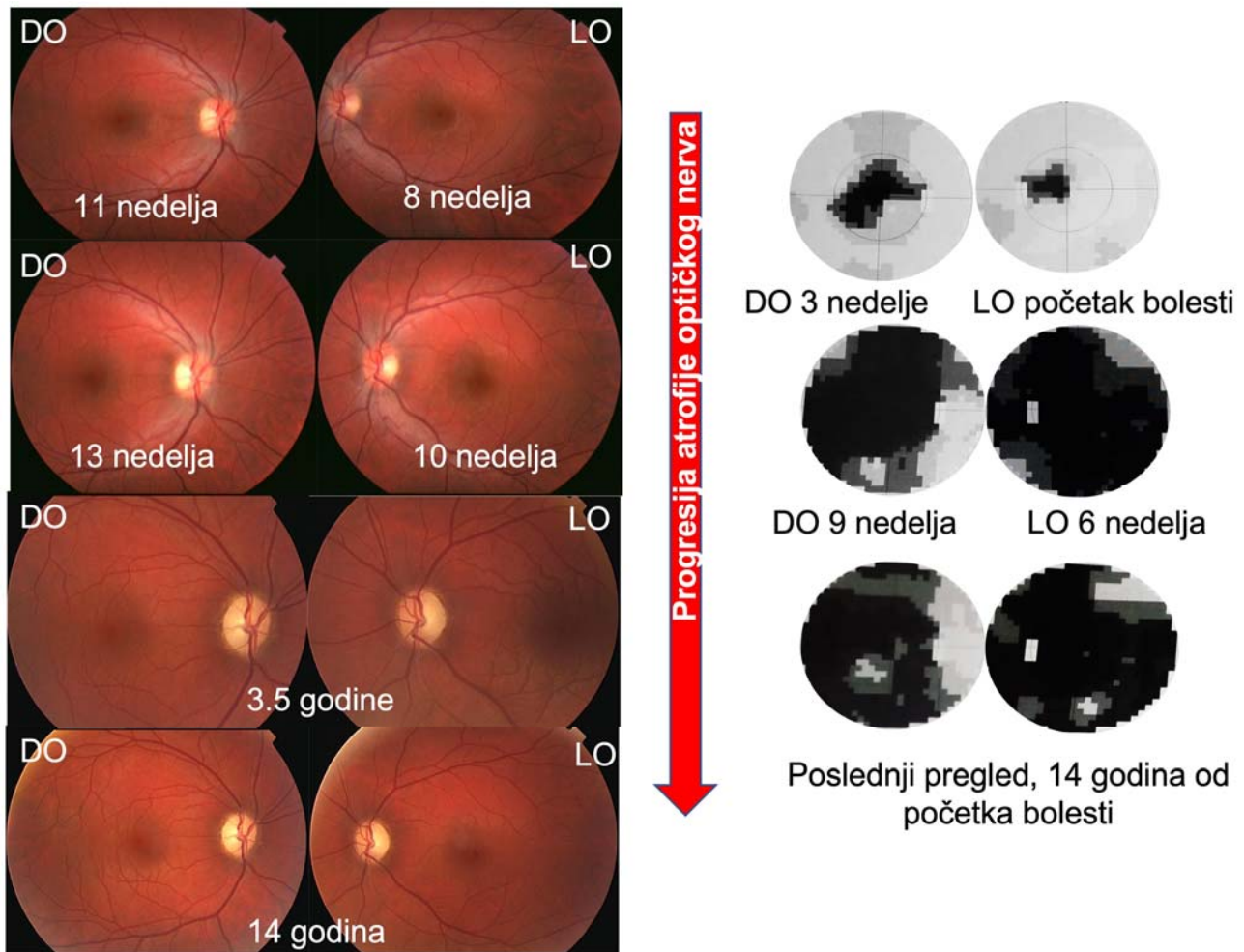
Slika 12. a) Fundoskopija, vidno polje i elektrofiziologija (PERG i VEP) pacijenta LHON 16 u akutnoj fazi bolesti; b) Fundoskopija, vidno polje i OCT PNO pacijenta LHON 16 u hroničnoj fazi bolesti; c) Fundoskopija, vidno polje i elektrofiziologija (PERG i VEP) pacijenta LHON 17 u akutnoj fazi bolesti; d) Fundoskopija, vidno polje i OCT PNO pacijenta LHON 17 u hroničnoj fazi bolesti

U vidnom polju je postojao centralni skotom koji se povećavao sa daljim smanjenjem vidne oštine. Elektrtofiziološke analize su pokazale normalan PERG i produženu latencu i smanjenu amplitude VEP P100 talas. U kasnim fazama floresceinske angiografije postojalo je bojenje PNO, ali bez curenja.



Slika 13. Fluoresceinska angiografija pacijenta LHON 16 u a) ranoj i b) kasnoj fazi sa bojenjem na papili na 5 i 11h (desno oko) i na 3h (levo oko)

Tokom narednih sedam dana njegova vidna oštrina na levom oku se pogoršavala do 0,3. Kontinuirani pad vidne funkcije nastavljen je tokom naredna 2,5 meseca kada je dostignuta najniža vidna oštrina na oku (NADIR) bilateralno 0,03 sa smanjenjem kolornog vida na 0/15 i 1/15. Sedam godina od početka bolesti, vidna funkcija je počela da se poboljšava pojavom malih fenestracija u centralnom skotomu oba oka i pacijent je dostigao stabilnih 0,1 Snellen bilateralno 14 godina nakon početka bolesti (Slika 14).

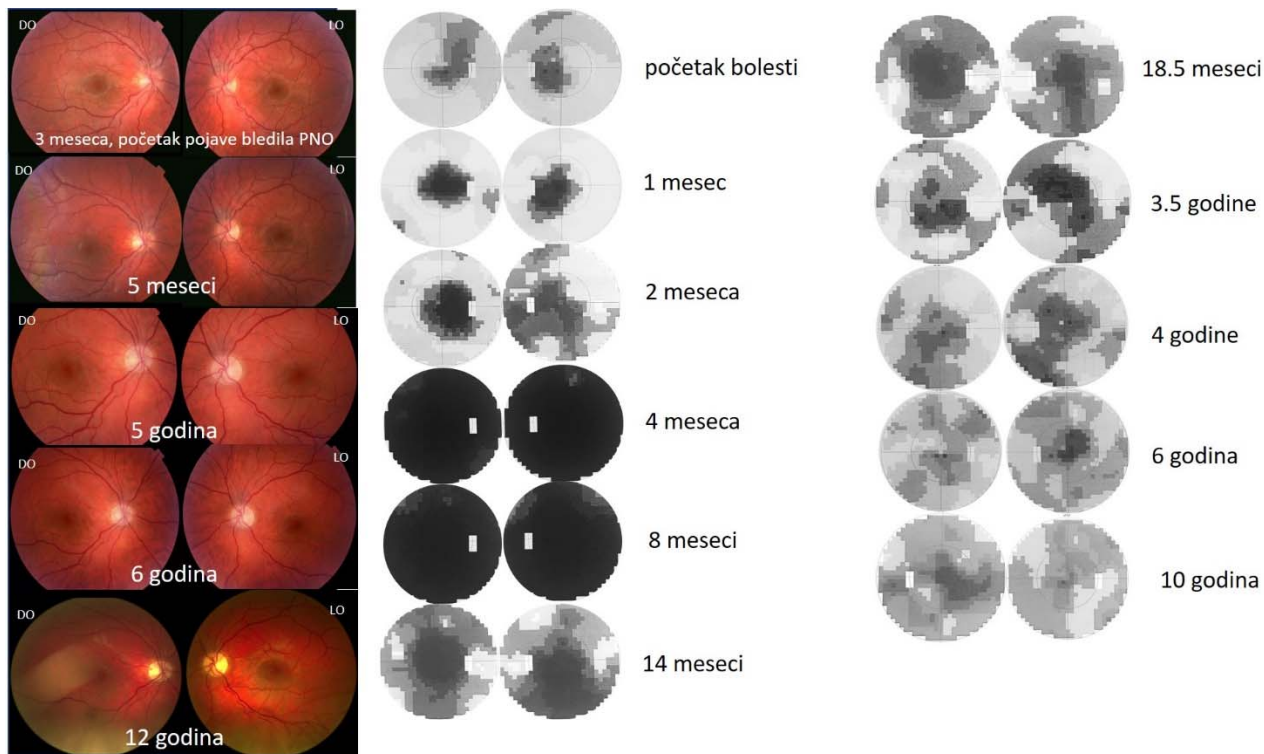


Slika 14. Progresija bledila (atrofije) papile na fundoskopiji pacijenta tokom perioda praćenja i smanjenjem skotoma u vidnom polju sa blagim poboljšanjem vidne oštine.

Drugi pacijent (označen kao LHON 18, Tabela 2) je 18-godišnji dečak koji je primljen u našu bolnicu u septembru 2009. godine zbog bilateralnog gubitka vidne oštine koji je trajao tri nedelje. Na prijemu, VO OD 0,2, OS 0,15 (Snellen), kolorni vid je, iznenađujuće, bio očuvan 15/15 (Ishihara).

Fundoskopija je bila patognomonična za LHON sa cirkumpapilarnom telangiektatičnom mikroangiopatijom, oticanjem sloja retinalnih nervnih vlakana (RNFL) – pseudoedem i tortuozičnom krvnih sudova bez curenja na fluoresceinskoj angiografiji (Slika 12c). Elektrofiziologija je pokazala smanjenje amplitude N95 talasa, kao i produženje latence i smanjenje amplitude VEP P100 talasa (Slika 12c). Tokom narednih 5 meseci njegova vidna oština se dodatno smanjila na pribl. 0,02 Snellen i skotomi vidnog polja su se uvećali. 14 meseci nakon početka bolesti, posle devet meseci zakonskog slepila, pojavile su se brojne fenestracije u skotomu vidnog polja i pacijentova vidna oština se poboljšala na 0,2. Iako se oština vida nije u potpunosti poboljšala

nakon dostizanja stabilnih 0,7, vidno polje se kontinuirano poboljšavalo tokom celokupnog perioda praćenja (Slika 15).



Slika 15. Progresija bledila (atrofije) papile na fundoskopiji pacijenta tokom perioda praćenje i smanjenjem skotoma u vidnom polju sa blagim poboljšanjem vidne oštine.

Kod oba pacijenta je urađeno genetsko testiranje za LHON. Prvo je urađena analiza prisustva 3 standardne mutacije, zatim je urađeno sekvenciranje sledeće generacije (NGS) mtDNK i zatim NGS kliničkog egzoma (panel za mutacije optičke atrofije poznate u tom trenutku) koji su svi bili negativni. Tokom 14 odnosno 12 godina oba pacijenta nisu imala potvrđenu dijagnozu, sve do nedavno, kada su ponovo testirani (sekvenciranje celokupnog egzoma), kada je i potvrđena recesivna homozigotna DNAJC 30 mutacija 152 A>G (p.Tir51Cis).

Oba naša pacijenta su imala poboljšanje vidne oštine koje je bilo skromno kod LHON 17 (počelo u 7. godini od početka bolesti i poboljšalo se na 0,1 tokom narednih 7 godina) i značajno kod LHON 18 (počelo u 14. mesecu od početka bolesti i nastavilo se naredne 2 godine da bi dostiglo stabilnih 0,7). Poboljšanje vidne oštine kod LHON 18 je praćeno potpunim oporavkom kolornog vida, dok kod LHON 17 pacijenta nije bilo poboljšanja. U periodu smanjenja vidne oštine (VO) došlo je do povećanja centralnog skotoma u vidnom polju. Sa 14 meseci pojavile su se prve fenestracije u vidnom polju i VO je počela da se poboljšava.

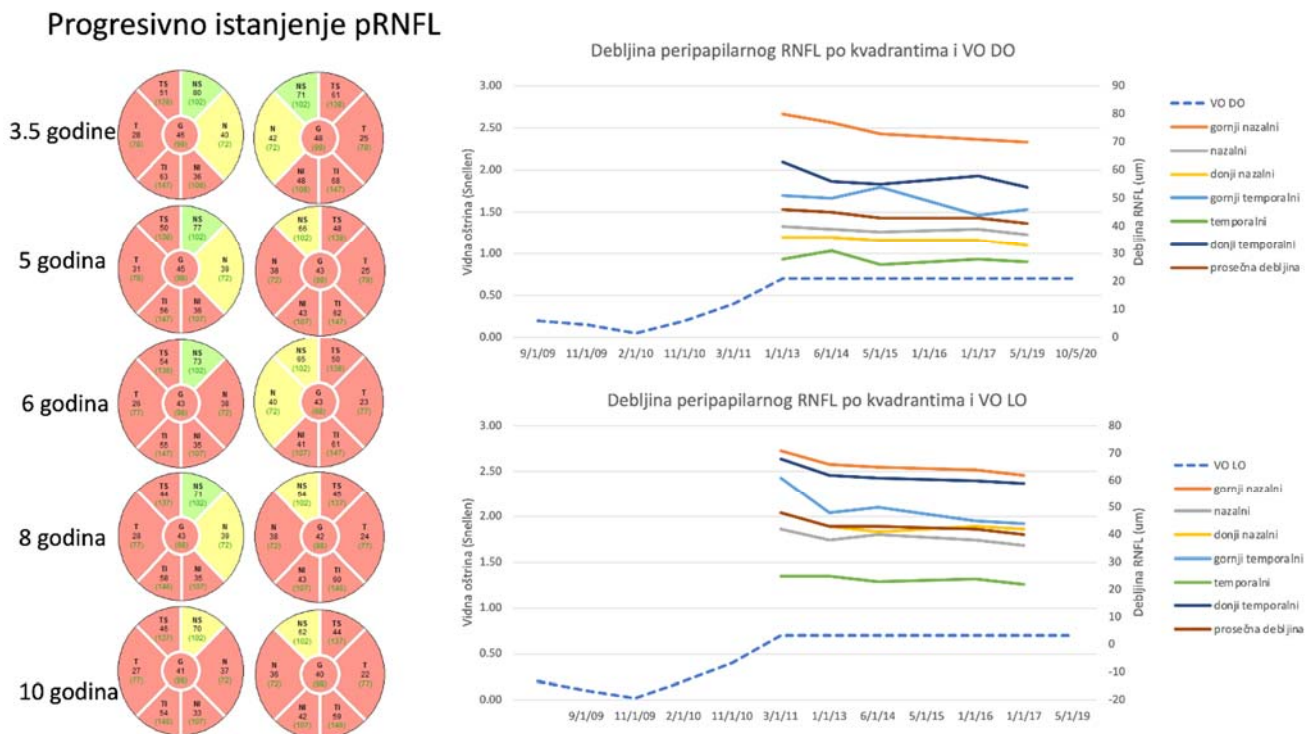
Debljina peripapilarnog RNFL se smanjivala tokom hronične faze kod oba pacijenta (Grafikon 4 i Grafikon 5). Kada smo uporedili debljinu RNFL između 3,5 i 12g kontrole, prvi pacijent je imao

nezatano prosečno smanjenje peripapilarne debljine RNFL sa 47,43 mm na 44,86 mm DO i sa 42,71 mm na 40.14 mm na LO. Procentualno, najveće istanjivanje između 3,5g i 12g kontrole primećeno je u inferiornom temporalnom delu optičkog diska 8,77% DO i 13,33% LO (Grafikon 5).



Grafikon 4. Progresivno istanjenje pRNFL kod LHON 17 tokom perioda praćenja

Čak i kod pacijenta sa značajnim poboljšanjem vidne funkcije i stabilnom oštrinom vida postojala je konstantna progresija istanjenja peripapilarnog RNFL koja je odgovarala vidljivoj progresiji bledila optičkog diska na fundusu (Grafikon 5)

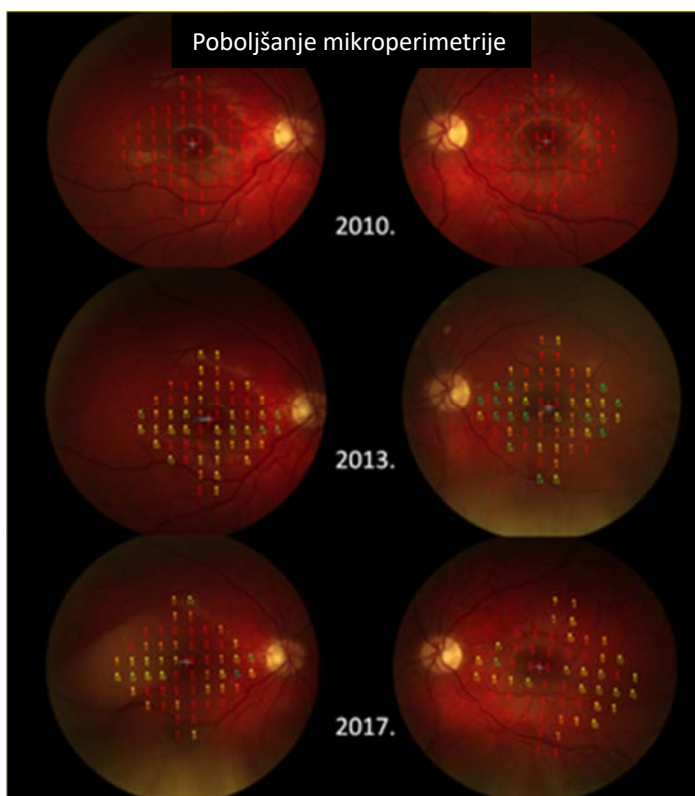


Grafikon 5. Progresivno istanjenje pRNFL kod LHON 18 tokom perioda praćenja

U poređenju sa kontrolama, kod oba pacijenta došlo je do statistički značajnog stanjivanja debljine peripapilarnog RNFL. Najveće stanjivanje je bilo prisutno u gornjim temporalnim, temporalnim i inferiornim temporalnim delovima i sa 3,5 i sa 12 godina. U slučaju 2 debljina peripapilarne RNFL se smanjila sa prosečnih 49,14 mm na 44 mm OD i 51,86 mm na 43,57 mm LE, za sve sektore, ali ovo smanjenje nije bilo statistički značajno ($p=0,54$, odnosno i $p=0,3$). Najveće stanjivanje je prisutno u inferiornom temporalnom kvadrantu desnog oka 14,29 % i gornjem temporalnom kvadrantu levog oka 27,87 %.

LHON 18 imao je značajno poboljšanje vidne funkcije što je potvrđeno mikroperimetrijom. Glavni rezultati mikroperimetrijskih analiza prikazani su na

Slika 16.



Prva mikroperimetrija urađena 14. meseci od početka bolesti, a u trenutku početka poboljšanja vidne oštrine, je pokazala potpuno odsustvo osetljivosti mrežnjače u svim tačkama. Drugi snimak napravljen 3,5 godine nakon početkaboolesti sa VO 0,7 Snellen pokazuje značajno poboljšanje MS (prosečna osetljivost, engl. *mean sensitivity*) (OD $6,3 \pm 4,6$ dB; opseg, 0-14 dB; OS $6,5 \pm 6,1$ dB; opseg 0-18 dB). Najveće poboljšanje MS primećeno je u temporalnim i nazalnim makularnim područjima. Na poslednjoj mikroperimetriji došlo je do sniženja MS u proseku OD $2 \pm 3,9$ dB i OS $1,75 \pm 6,3$ dB (OD $4,3 \pm 4,7$ dB, opseg 0-18 dB; OS $4,8 \pm 5,03$ dB, opseg 0-14 dB).

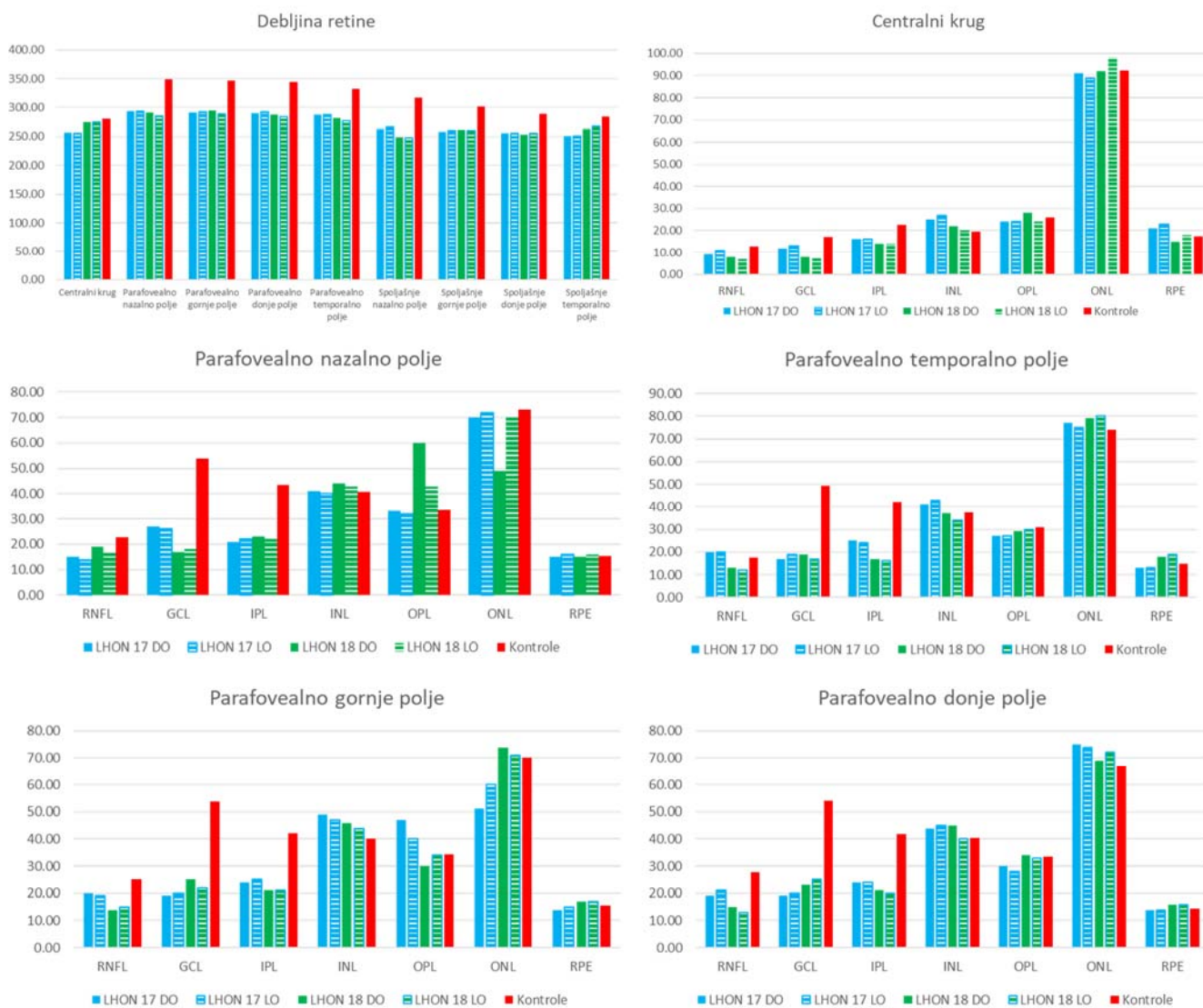
Slika 16. Mikroperimetrija pacijenta LHON 18 sa poboljšanjem vidne oštrine

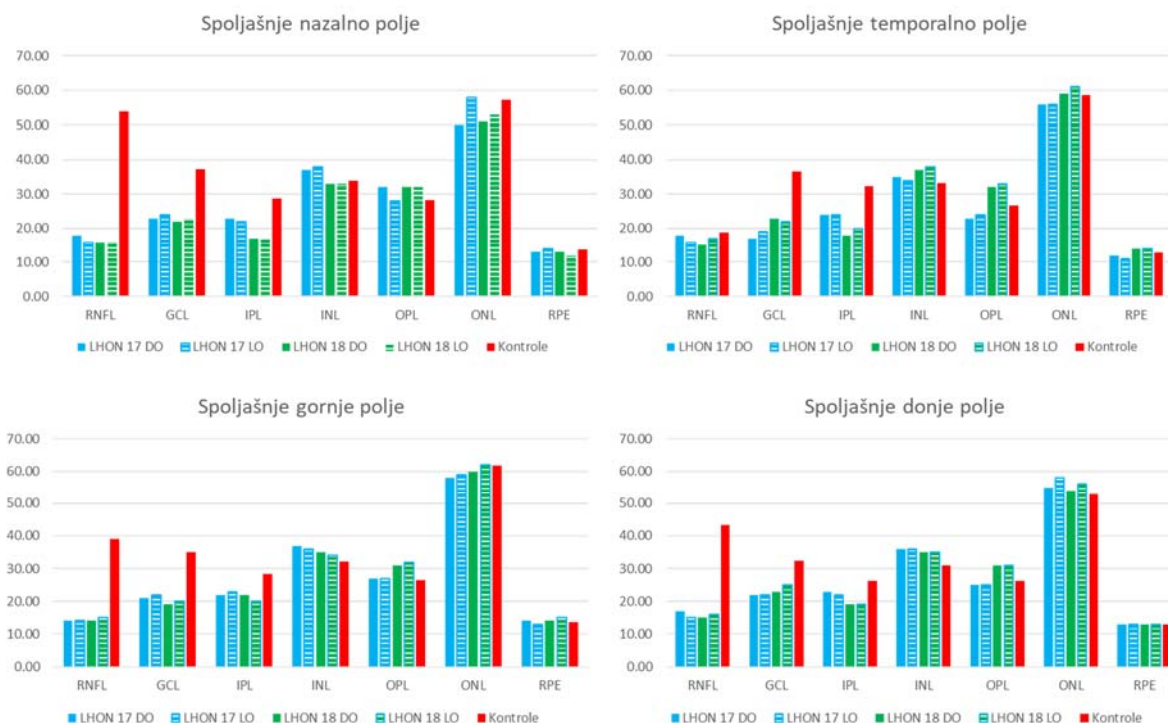
Prostorno, najbolju funkcionalnost su imali periferni regioni, posebno nazalna i temporalna makularna oblast, dok je najniža funkcija detektovana u superiornoj i inferiornoj parafovealnoj regiji (

Slika 16). Fiksacija je bila relativno stabilna i skoro centralna na sve tri kontrole (

Slika 16).

Rezultati analize segmentacije: Oba naša pacijenta su imala stanjivanje ukupne retine, RNFL, GCL i IPL u svim ETDRS kvadrantima u poređenju sa zdravim kontrolama, dok su spoljni slojevi retine bili dobro očuvani (čak deblji) u poređenju sa zdravim kontrolama (Grafikon 6).

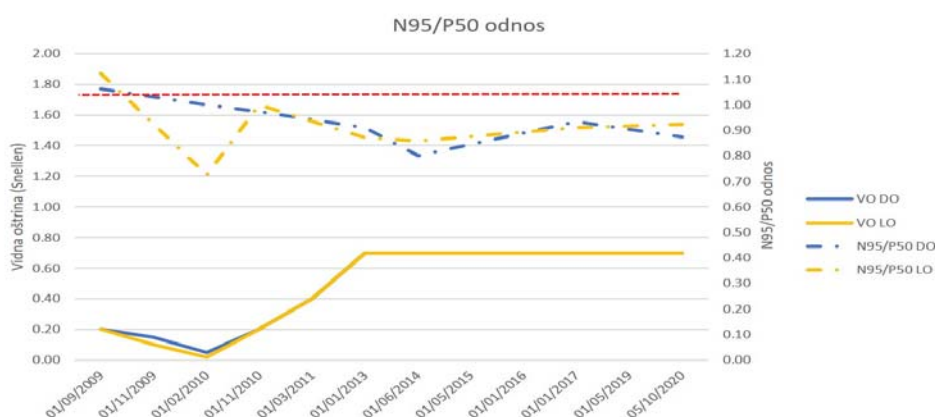
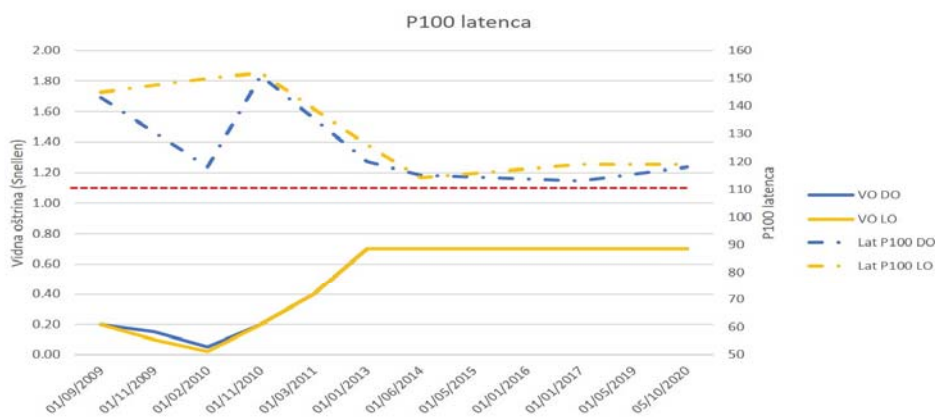
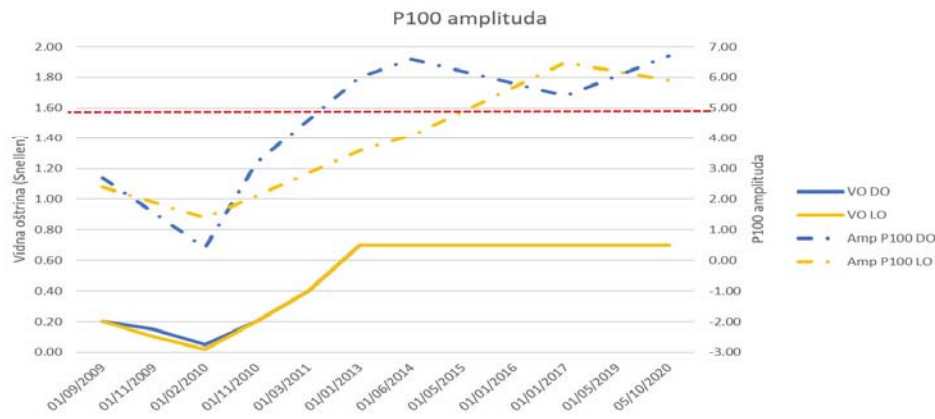
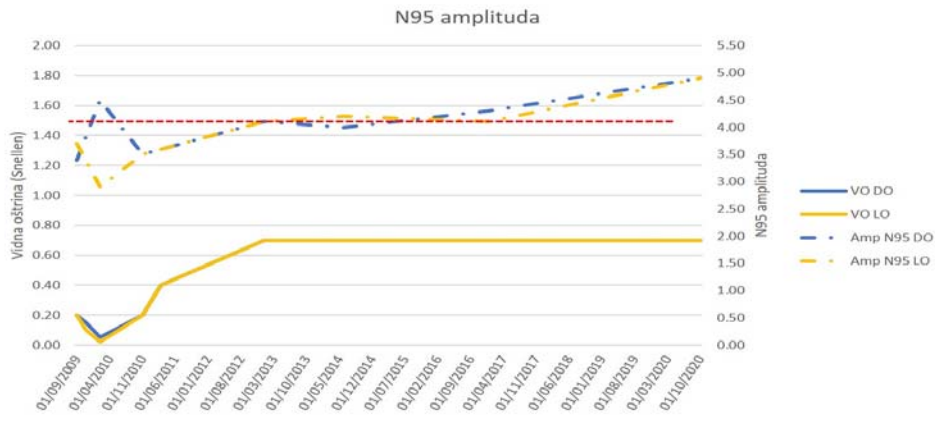




Grafikon 6. Debljina retinalnih slojeva kod LHON 17 i 18, kao i kontrola u različitim poljima ETDRS-a

Tokom praćenja, čak i uz poboljšanje vidne funkcije, nije došlo do značajnog poboljšanja debljine sloja mrežnjače ni u jednom od retinalnih kvadranta. Kod LHON 18 sa značajnim oporavkom od VO, takođe nije došlo do značajnog poboljšanja debljine sloja retine, čak ni u oblastima gde je došlo do značajnog funkcionalnog poboljšanja na osnovu mikroperimetrije (temporalni i nazalni ETDRS kvadranti).

Elektrofiziološki rezultati: Odloženi i smanjeni VEP P100 talas u akutnoj fazi bolesti bili su prisutni kod oba pacijenta. LHON 17 je imao normalan PERG tokom prve 4 godine bolesti, a zatim se amplituda N95 smanjila na 2,8 mV RE, 3,2 mV LE dok je VEP P100 talas postao nedetektabilan. S druge strane, LHON 18 je imao značajno poboljšanje amplitude N95 i P100, ali je latenca P100 talasa ostala produžena i odnos N95/P50 je ostao abnormalan (ispod 1) (Grafikon 7).



Grafikon 7. Elektrofiziološke karakteristike pacijenta LHON 18 tokom perioda praćenja

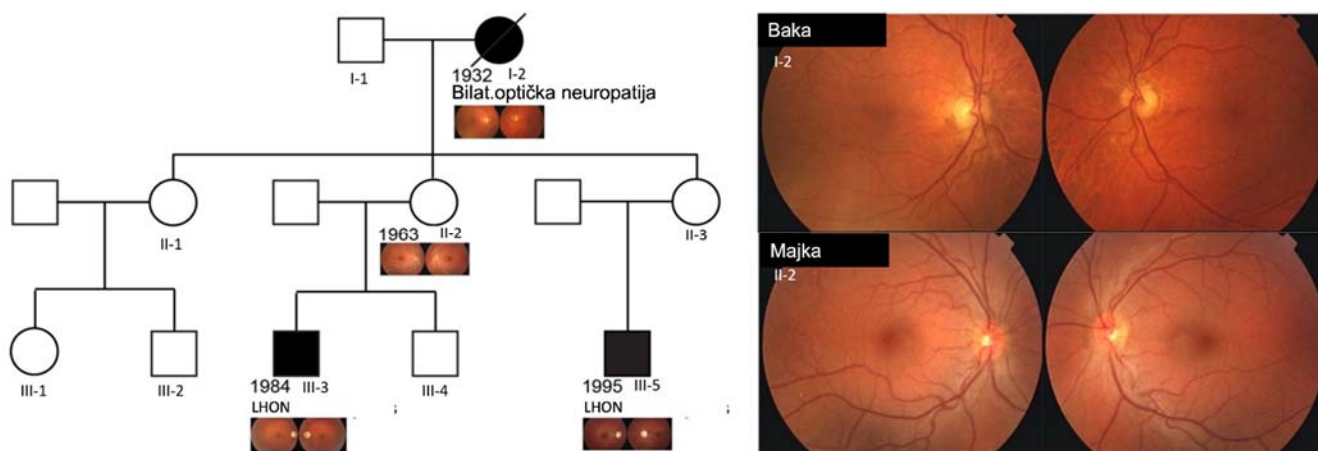
4.2.2 Fenotipska karakterizacija pacijenata sa novoidentifikovanim mutacijama (VUS) u mitohondrijskoj DNK (mtDNK)

Genetska analiza je identifikovala varijante nepoznatog značaja (VUS) koje su pronađene su kod 6 pacijenata i to: 2 varijante MT-ND5, m.13042G>T u homoplazmatskom stanju, MT-NDI:m.4130A>T, MT-CIB 15309 T>C obe u homoplazmatskom stanju, MT -ND4:m.11443A>C, 65% heteroplazmija, MT-ND6:m.14598T>C, heteroplazmija 22%.

4.2.2.1 Genotipska i fenotipska karakterizacija MT-ND5, m.13042G>T

LHON 19

Nova, homoplazmatska missens promena m.13042G>T (A236S) u *MT-ND5* genu, haplogrupa K1a1a1 potvrđena je kod dva pacijenta (označeni kao LHON 19 i 20, Tabela 2). Analiza segregacije dva rođaka koji nose mutaciju 13042G>T otkrila je prisustvo mutacije kod obe njihove majke (sestre, II-2 i II-3) i kod pacijentkinje III-1, koja je ćerka treće sestre II-1 (Slika 17). Pacijentkinja I-2, majka tri sestre, je imala lošu oštrinu vida zbog bilateralne optičke neuropatije u 58. godini života, ali nikada nije testirana pošto je preminula. Segregaciona analiza ove familije pokazuje jasan obrazac nasleđivanja koje je vezano za X hromozom.



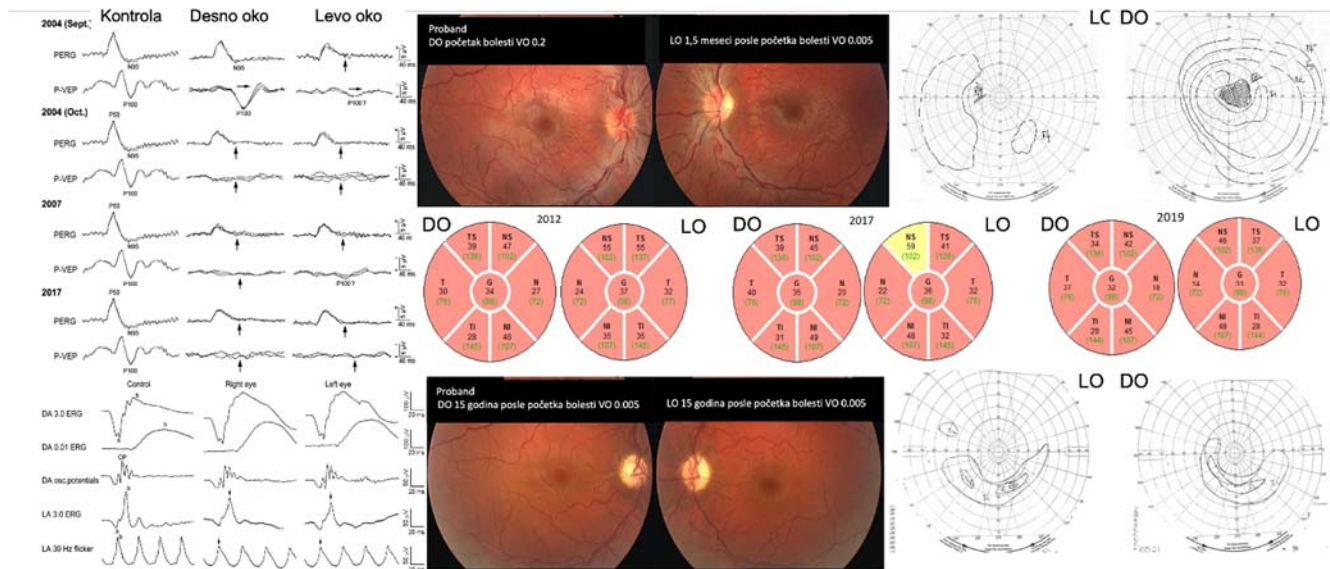
Slika 17. Porodično stablo mutacije 13042G>T sa 3 obolela člana (2 genetski potvrđena: proband Pacijent III-3 sa porodičnog stabla (LHON 19 Tabela 2) i Pacijent III-5 sa porodičnog stabla (LHON 20 Tabela 2) i tri nebolela nosioca mutacije (pacijenti II-2, II-3 i III-1)

Sekvenciranje celog egzoma kod ovih pacijenata nije otkrilo nikakve promene povezane sa optičkom atrofijom kod ovih pacijenata (Optic neuropathy PanelApp version 2.75).

U kohorti naših pacijenata ova mutacija je identifikovana kod 2 obolela pacijenta.

Proband, označen kao LHON 19 (Tabela 2), je dvadesetogodišnji muškarac koji je pretrpeo dubok, bilateralni sekvencijalni gubitak centralnog vida u intervalu od mesec i po dana, prvo na levom oku. Na prezentaciji je Snellenova oštrina vida na njegovom boljem desnom oku bila 0,2, a na levom oku,

pokret ruke (HM) na 30 cm (približno 0,005 Snellen) (11). U vidnom polju bili su prisutni bilateralni centralni skotomi (Slika 18). Pacijent je prijavio jake glavobolje pre gubitka vidne oštine. Pregledom fundusa utvrđena je hiperemija desnog optičkog diska sa peripapilarnim telangiektatičnim krvnim sudovima, vaskularna tortuoznost i otok sloja nervnih vlakana retine (RNFL) oko optičkog diska. Levi optički disk je bio bleđi sa vijugavim krvnim sudovima (Slika 18).



Slika 18. Elektrofiziologija, fundoskopija, vidno polje i OCT optičkog diska (debljina pRNFL) probanda LHON 19 u akutnoj i hroničnoj fazi bolesti.

Fluoresceinska angiografija nije pokazala curenje na optičkim diskovima. VEP P100 talas je bio produžene latence bilateralno i smanjene amplitude na levom oku. Amplituda PERG N95 talasa je i dalje bila u normalnom opsegu na desnom oku i značajno niža na levom oku (Slika 2. a) Fotografija fundusa desnog oka LHON pacijenta u subakutnoj fazi bolesti, 2 nedelje od početka, sa hiperemičnim optičkim diskom i tortuotičnim krvnim sudovima, centralnim skotomom u vidnom polju i bez curenja na fluoresceinskoj angiografiji b) U hroničnoj fazi bolesti vidi se atrofija i bledilo optičkog diska, sa gustim velikim centralnim skotomom u vidnom polju.

U proseku, posle 6 nedelja hiperemija i tortuoziitet se povlače, javlja se temporalno bledilo optičkog diska i dalja atrofije papile vidnog živca koja se dešava po precizno opisanom redosledu (83),(84). Na optičkoj koherentnoj tomografiji (OCT) u akutnoj fazi bolesti vidi se zadebljanje RNFL prvo u temporalnim i donjim, zatim u gornjim i nazalnim kvadrantima, da bi u hroničnoj fazi usledilo istanjenje (83). Mikroangiopatija koja se vidi u prvim nedeljama evolucije bolesti uglavnom nestaje sa progresijom atrofije optičkog nerva. Ovaj stadijum može da traje od nekoliko nedelja do 6 meseci i posle njega nastaje takozvani dinamički stadijum koji generalno traje 6 meseci do godinu dana od početka bolesti, kada počinje hronični stadijum koji predstavlja konačni ishod aktivne bolesti. U

dinamičkom stadijumu se dostiže NADIR vidna oštrina koja je zapravo najslabija vidna oštrina koju pacijent ostvari, ali RNFL i dalje može da bude otečen i da se prvo registruje normalizacija debljine, a kasnije dubok gubitak aksona i optička atrofija kao krajnji stadijum (38) (**Error! Not a valid bookmark self-reference.**b). Bolest je u većini slučajeva bilateralna ili asimetrična sa gubitkom vidne oštine prvo na jednom oku, pa zatim na drugom unutar nekoliko dana, nedelja ili meseci, a ponekad i više godina (85).

Nekoliko longitudinalnih studija LHON pacijenata je opisalo karakteristike promena peripapilarnog RNFL na OCT-u. Kod asimptomatskih nosilaca postoji značajno zadebljanje temporalnog RNFL u poređenju sa kontrolama i trend zadebljanja inferiornog segmenta (11). Ovo rano zadebljanje smatra se posledicom poremećaja aksoplazmatskog transport i verovatno predstavlja rani tj osnovni stres na nervna vlakna. U momentu početka bolesti, tipično postoji zadebljanje superiornog i inferiornog dela RNFL dok je temporalni kvadrant normalne debljine zbog početka atrofije (12). Ove promene odgovaraju pojavljivanju pseudoedema optičkog diska, hiperemiji i mikrovaskularnim promenama na pregledu fundusa. Posle tri meseca javlja se temporalno istanjenje, a kroz devet meseci registruje se superiorno i inferiorno istanjenje (13).

OCT makule pokazuje istanjenje unutrašnjeg makularnog prstena i spoljašnjeg nazalnog kvadranta u prvih tri meseca od oneta bolesti.

Ovo dalje progredira ka temporalnom delu tokom naredna tri meseca i do 12. meseca od početka bolesti postoji difuzno istanjenje makule sa prosečnom debljinom od 251 μm u poređenju sa prosečnom debljinom zdravih osoba koja iznosi 281 μm (14). GCL-IPL je izgleda još senzitivnija na rane promene kod LHONa. Mala longitudinalna studija 4 pacijenta pokazuje da je istanjenje GCL-IPL u nazalnom kvadrantu prisutno i pre početka simptoma. Tokom prva tri meseca od početka bolesti GCL-IPL istanjenje progredira na donji, superiorni i temporalni kvadrant sa difuznim istanjenjem prosečnog GCL-IPL na 63 μm 3 meseca od oneta. Ovo istanjenje se nastavlja do 57 μm 6 meseci posle početka, da bi se posle stabilizovalo (7) (Slika 3. OCT i grafički prikaz istanjenja GCL-IPL koje je procentualno najveće u prvih 6 meseci od početka bolesti posle čega nastupa period stabilnosti).

Radijalna peripapilarna kapilarna mreža je pogođena kod pacijenata sa LHONom što je potvrđeno OCT angiografijom (15-17). Studija koja je uključila 22 pacijenta u različitim stadijumima bolesti pokazala je da postoji isključenje kapilarne mreže u temporalnom peripapilarnom delu u ranom stadijumu bolesti da bi se kasnije to isključenje širilo inferiorno, superiorno pa sve do difuznog isključenja u hroničnim fazama bolesti. Vaskularne promene korespondiraju GC-IPL istanjenju, a prethode istanjenju RNFL (6).

Kod malog broja obolelih dolazi do spontanog oporavka vidne funkcije (56), koji se ogleda u smanjivanju ili fenestraciji centralnog skotoma, a rezultira u poboljšanju vidne oštine.

Veći procenat oporavka vidne funkcije je primećen kod m.14484T > C/MT-ND6 i DNAJC 30 mutacija koje imaju najbolju prognozu. Isto tako starost pacijenta u momentu nastanka bolesti, ukoliko se bolest javi u detinjstvu ima najbolju prognozu nezavisno od tipa mutacije (86). Bolest se najčešće javlja u mladosti nešto kasnije kod žena, ali su poznati slučajevi javljanja u ranom u detinjstvu (87), kao i u starosti (88), (89).

Barboni i saradnici(90) su u skorašnjem radu objavili da su dece starosti između 3 i 9 godina imala bolju vidnu oštrinu od onih koji su bili stariji od devet godina

Isto tako je kod dece mlađe od 9 godina srednja devijacija u rezultatima vidnog polja bila manja u poređenju sa decom starijom od devet godina. Srednja debljina sloja ganglijskih ćelija je bila viša u grupi dece starosti između 3 i 9 godina nego kod dece mlađe od 3 i starije od 9 godina. Ovi istraživači su takođe opisali četiri moguća obrasca gubitka vidne oštrine u dečjoj dobi:

Subakutni bilateralni (66.7%); Bilateralni sa podmuklim tokom (17.3%); unilateralni (11.1%); i subklinički bilateralni (4.9%). Majander i saradnici (87)su definisali tri moguća načina gubitka vidne oštrine:klasični akutni koji je bio najčešći, sporo progresivni i subakutni podmukli kod koga je bilo najduže vreme do postavljanja dijagnoze i iznosilo je čak 15 godina. Zbog opisanih unilateralnih slučajeva i slučajeva sa odloženom dijagnozom potrebno je da se svi slučajevi ambliopije u dečjem dobu detaljno dijagnostikuju u smislu LHON-a.

Kod nekih neurodegenerativnih mitohondrijskih oboljenja (Kearns-Sayre syndrome) javljaju se promene na endotelu rožnjače slične promenama kod Fuch's-ove endotelne distrofije u čijoj osnovi leži disfunkcija oksidativnog metabolizma (91). Endotel rožnjače kod LHON-a i drugih pacijenata sa genetskom mitohondrijskom disfunkcijom do sad nije ispitan.

4.2.3 Elektrofiziološke karakteristike LHON pacijenata

Elektrofiziološki modaliteti koji se najčešće koriste kod LHON-a za procenu funkcije retinalnih ganglijskih ćelija i vidnog puta su Patern elektroretinogram (PERG), Patern vidni evocirani potencijali (VEP), multifokalni VEP i fotopični negativni odgovori (PhNR). Najčešće se upotrebljavaju PERG i VEP. Internacionalni VEP i PERG stimulus podrazumevaju suprapragovne kontrastne stimulse po principu šahovske table koji može biti standardne veličine (12° x 15°) ili stimulus velikog polja (24° x 30°), dok psihofizika omogućuje merenje pragovne draži (Slika 4. Šematski prikaz polja (standardno i veliko) i njihovih projekcija na retini VEP-a i PERG-a

Patern elektroretinogram (PERG) potiče od unutrašnjih slojeva retine, omogućava procenu funkcije ganglijskih ćelija i sve više se koristi u proceni stanja prednjih delova vidnog puta(92,93) (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b).). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latenca P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćanje latence P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja

ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Normalan PERG se sastoji od prominentne pozitivne komponente P50 i veće kasnije negativne komponente N95. N95 komponenta potiče od RGC dok 30% P50 potiče od anteriornijih retinalnih struktura (93,94).

VEP sa preokretom uzorka beleži bioelektrične odgovore iz vidnog korteksa (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERG-a celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulus centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižen, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

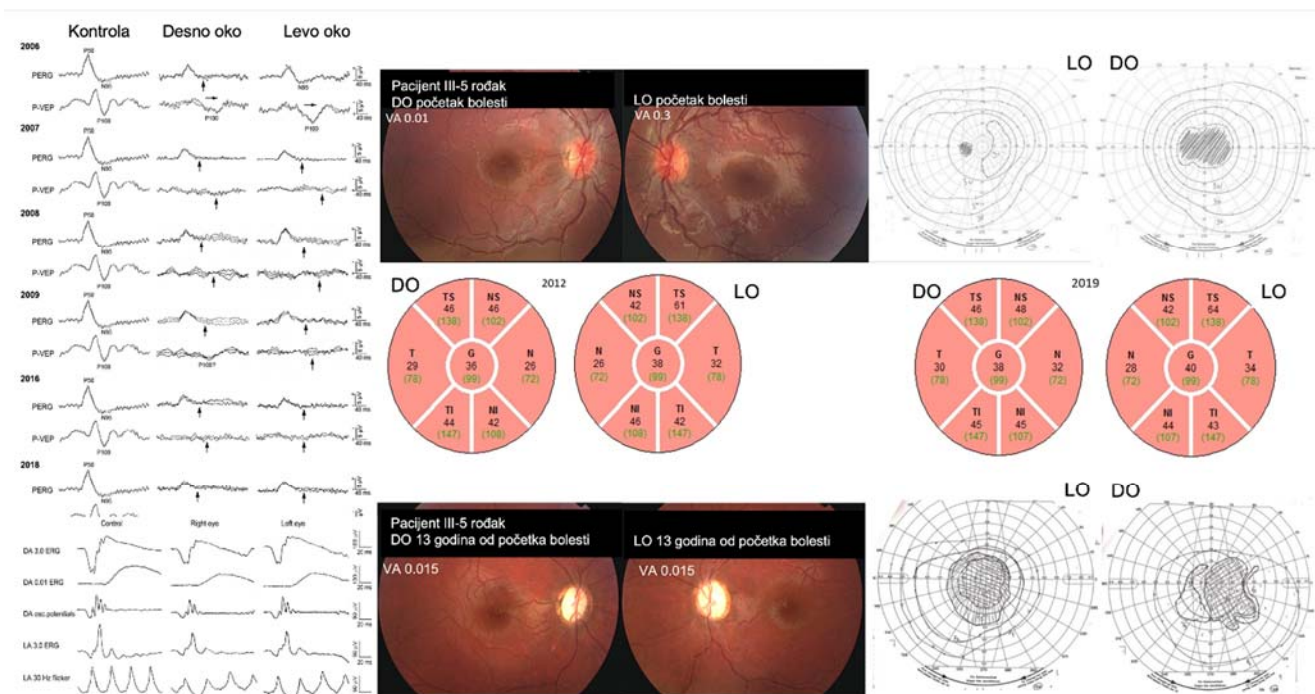
Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b.). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latenca P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćanje latence P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Variranjem prostornih frekvencija moguće je da se utvrdi preovlađujuću aktivaciju različitih neuronskih komponenti vidnog puta na osnovu veličine receptivnih polja mrežnjače, da se izazovu odgovori u kortikalnim oblastima u koje se signali dovode putem različitih populacija aksona sa promenljivom neuronskom provodljivošću (95). Korišćenjem polja 60° (prostorna učestalost sa većim poljima), aktiviraju se velika receptivna polja mrežnjače, čime se podstiču odgovori korteksa prenošeni velikim aksonima. Nasuprot tome, korišćenjem polja 15° (prostorna frekvencija sa manjim poljima), aktiviraju se prvenstveno manja receptivna polja mrežnjače i bioelektrički signal koji se dovodi do vizuelnog korteksa malim aksonima (96).).), u skladu sa boljom oštrinom vida na desnom oku.

LHON 20

Drugi pacijent je jedanaestogodišnji dečak, označen kao LHON 20 (Tabela 2), rođak po majci Probanda LHON 19 (pacijent je označen kao III-5 u porodičnom stablu) koji je 2 godine nakon LHON 19 doživeo bilateralni gubitak vidne oštrine. Na prezentaciji je oštrina vida bila brojanje prstiju CF na 2 m na desnom oku i 0,3 na levom oku, imao je smanjen vid za boje i bilateralni centralni skotom. Oftalmološki pregled je pokazao bilateralne hiperemične optičke diskove i vijugave krvne sudove (Slika 19).



Slika 19. Elektrofiziologija, fundoskopija, vidno polje i OCT optičkog diska (debljina pRNFL) pacijenta III-5 LHON 20 u akutnoj i hroničnoj fazi bolesti.

Fluoresceinska angiografija je pokazala cirkumpapilarnu teleangiektatičnu mikroangiopatiju sa odsustvom curenja. Elektrofiziološko testiranje u vreme akutne prezentacije pokazalo je smanjen PERG N95 na desnom oku i produženi VEP P100 na oba oka (Slika 19). U narednim mesecima je došlo do daljeg pogoršanja vidne funkcije i na kontroli 5 meseci od početka bolesti mu je VO obostrano bila mahanje ruke (HM) i oba optička diska su bila bleđa. PERG N95 amplituda je bila bilateralno smanjena, dok je VEP P100 talas bio smanjene amplitude i produžene latence (Slika 19). Lična anamneza je bila insignifikantna, sem klinički bezznačajne aortne stenozе koja mu je dijagnostikovana u desetoj godini života.

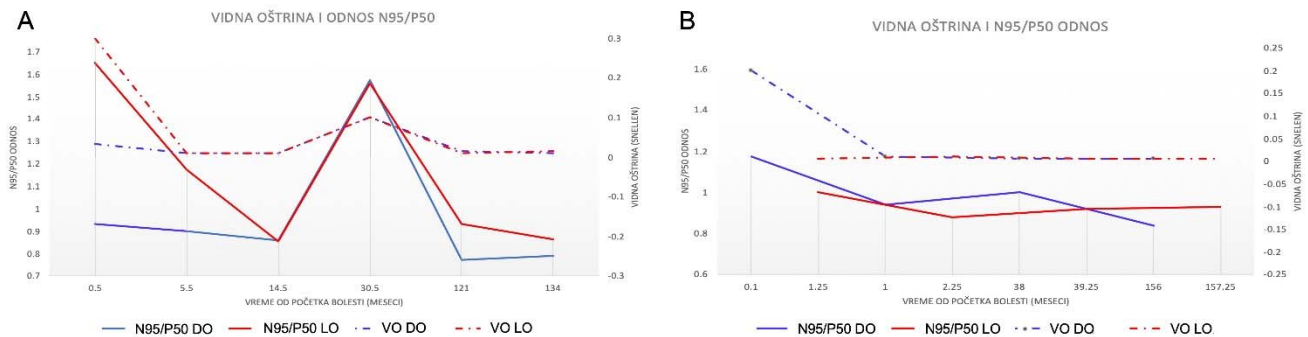
Majke oba pacijenta (inače sestre, Slika 17) su bile bez vidnih simptoma u dobi od 56, odnosno 59 godina, sa normalnim kliničkim karakteristikama. Ista mutacija je potvrđena i kod ćerke treće sestre koja je takođe bez vidljivih kliničkih karakteristika u ovom trenutku.

Baka po majci (I-2 slika 17) je u 58 godini života doživela bilateralni gubitak vidne oštine koji je bio praćen bilateralnom atrofijom optičkog nerva (Slika 17), koja u to vreme nije dijagnostikovana kao LHON. 14 godina kasnije njen unuk Proband imao je tipičnu optičku neuropatiju nalik LHON-u i tada se posumnjalo da je i ona imala LHON. Prilikom prvog pregleda u lokalnoj bolnici u dobi od 58 godina, njena VO je bila smanjena i diskovi optičkog nerva su bili bleđi, a neurološki pregled normalan. Nisu dostupni podaci o praćenju pošto je pacijentkinja preminula.

Tokom perioda praćenja (LHON 19 - 17 godina, LHON 20 - 15 godina) oštrina vida i vidna polja su ostali nepromenjeni. LHON 19 je 5 godina nakon početka bolesti započeo korištenje suplementalne terapije (idebenon). Subjektivno se njegova vidna oštrina privremeno poboljšala kada je počeo da koristi lek. Imao je “bljeskove svetlosti”, ponekad je mogao da vidi “mutnu ili peščanu” sliku. Objektivno, njegova oštrina vida i vidna polja ostali su nepromenjeni. Na poslednjoj kontroli oštrina vida LHON 19 bila je 0,015 bilateralno, a LHON 20 0,005 bilateralno, bez značajnog poboljšanja vidnih polja (Slika 18 i Slika 19).

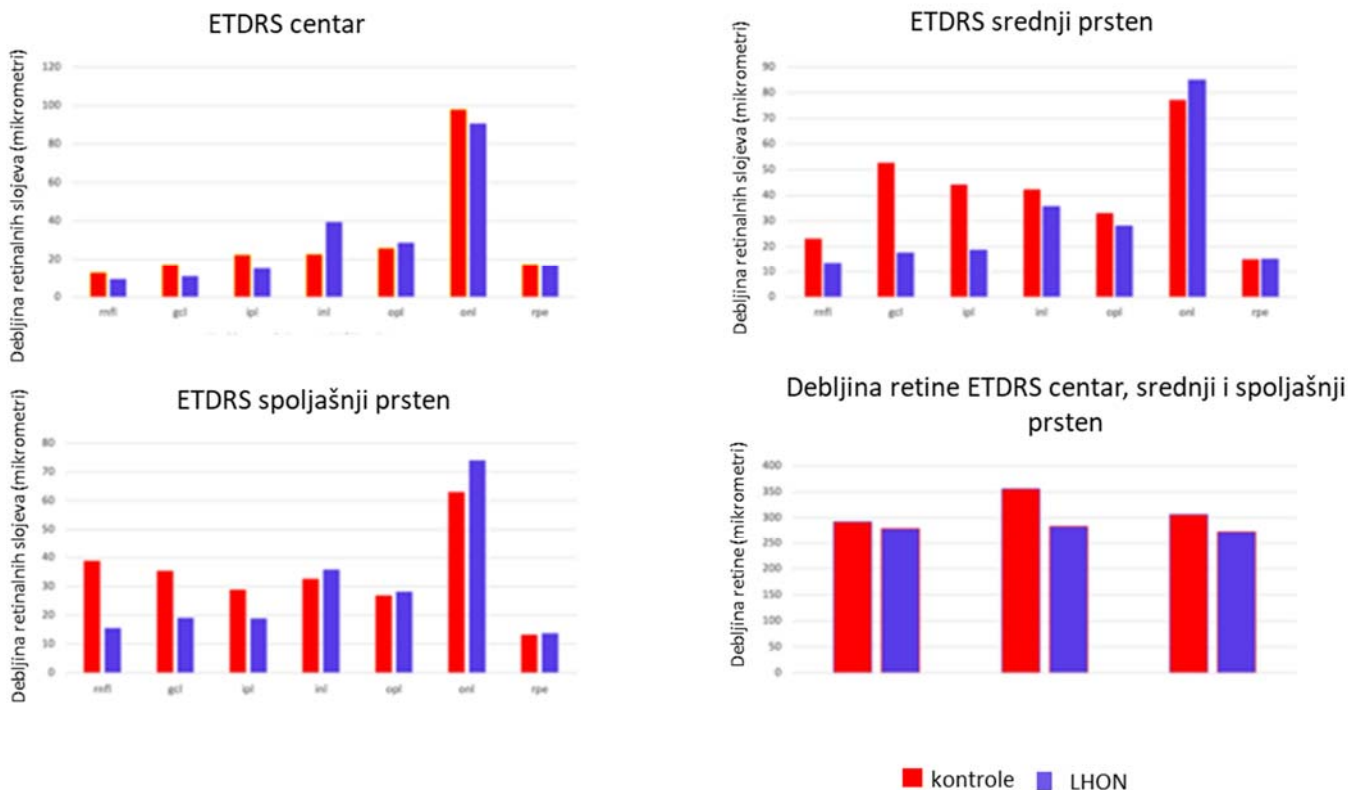
Naši pacijenti nisu imali neurološke simptome prilikom prvog pregleda niti tokom perioda praćenja, osim glavobolje kod LHON 19 pre gubitka vidne oštrine. MR glave je bio normalan, bez znakova demijelinizacije i ekspanzivnih procesa. Ni kod jednog pacijenta nije pronađena katarakta. Nije bilo znakova retinopatije na fundoskopiji ili OCT-u, međutim uočene su neke promene u odgovorima ERG u celom polju nakon 15 i 17 godina perioda praćenja u dobi od 26 i 37 godina. Oba pacijenta su imala bilateralno smanjene amplitude čepića (LHON 19 RE 89,4 i LE 89,1 %; LHON 20 RE 74. i LE 87,6 %) i odgovore 30 Hz (RLE 87,5 % LHON 19, 84,4 % LHON 20), dok je LHON 20 imao i niže amplitude odgovora štapića (RE 64,4% i LE 74,9%) i granične maksimalne odgovore na desnom oku. Svi rezultati su izraženi kao procenat smanjenja u odnosu na postavljenu donju granicu amplitude za zdravu populaciju.

Elektrofiziološka analiza je pokazala smanjen PERG N95 talas i skoro nedetektibilan VEP P100 talas kod oba pacijenta tokom celog perioda praćenja (Slike 24 i 25) LHON 19 je imao 4 PERG/VEP snimka tokom perioda praćenja/kontrole, dok je LHON 20 imao 6. Tokom prvih nekoliko meseci odnos N95/P50 se brzo smanjivao (što je odgovaralo smanjenju amplitude N95) kod LHON 19, dok je smanjenje odnosa bilo nešto sporije kod kod mlađeg rođaka LHON 20. Tokom perioda praćenja ovaj odnos je ostao van normalnog opsega, ispod 1,1, ali stabilan (Grafikon 8). Kod probanda 2 primećeno je blago poboljšanje vidne oštrine 2,5 godine nakon pojave bolesti, što je rezultiralo povećanjem odnosa N95/P50 (Grafikon 8).



Grafikon 8. Vidna oštrina i N95/P50 odnos kod LHON 19 i LHON 20

Tokom perioda praćenja, došlo je do značajnog istanjenja ukupne retine u predelu makule, sloja retinalnih nervnih vlakana (RNFL), sloja ganglijskih ćelija (GCL) i unutrašnjeg pleksiformnog sloja (IPL) u svim ETDRS kvadrantima (Grafikon 9).



Grafikon 9. Prikaz prosečne debljine retinalnih slojeva kod pacijenata LHON 19 i LHON 20 (plavi stubići) u poređenju sa normalnom populacijom (crveni stubići)

I kod ovih pacijenata primećena je relativna očuvanost GCC (GCL-IPL) u centru kao i kod pacijenata sa tipičnim mutacijama u mtDNK (145). Nažalost, nema podataka o segmentaciji slojeva retine u akutnoj fazi bolesti. Prvi dostupni podaci su 10 godina nakon početka za LHON 19 i 9 godina nakon početka za LHON 20. Od tada je debljina slojeva retine bila stabilna i nije se značajno menjala. Analiza peripapilarnog RNFL je pokazala značajno istanjenje u svim kvadrantima, naročito temporalno (Slika 2. a) Fotografija fundusa desnog oka LHON pacijenta u subakutnoj fazi bolesti, 2 nedelje od početka, sa hiperemičnim optičkim diskom i tortuotičnim krvnim sudovima, centralnim skotomom u vidnom polju i bez curenja na fluoresceinskoj angiografiji b) U hroničnoj fazi bolesti vidi se atrofija i bledilo optičkog diska, sa gustim velikim centralnim skotomom u vidnom polju.

U proseku, posle 6 nedelja hiperemija i tortuozitet se povlače, javlja se temporalno bledilo optičkog diska i dalja atrofije papile vidnog živca koja se dešava po precizno opisanom redosledu (83),(84).

Na optičkoj koherentnoj tomografiji (OCT) u akutnoj fazi bolesti vidi se zadebljanje RNFL prvo u temporalnim i donjim, zatim u gornjim i nazalnim kvadrantima, da bi u hroničnoj fazi usledilo istanjenje (83). Mikroangiopatija koja se vidi u prvim nedeljama evolucije bolesti uglavnom nestaje sa progresijom atrofije optičkog nerva. Ovaj stadijum može da traje od nekoliko nedelja do 6 meseci i posle njega nastaje takozvani dinamički stadijum koji generalno traje 6 meseci do godinu dana od početka bolesti, kada počinje hronični stadijum koji predstavlja konačni ishod aktivne bolesti. U dinamičkom stadijumu se dostiže NADIR vidna oštrina koja je zapravo najslabija vidna oštrina koju pacijent ostvari, ali RNFL i dalje može da bude otečen i da se prvo registruje normalizacija debljine, a kasnije dubok gubitak aksona i optička atrofija kao krajnji stadijum (38) (**Error! Not a valid bookmark self-reference.**b). Bolest je u većini slučajeva bilateralna ili asimetrična sa gubitkom vidne oštrine prvo na jednom oku, pa zatim na drugom unutar nekoliko dana, nedelja ili meseci, a ponekad i više godina (85).

Nekoliko longitudinalnih studija LHON pacijenata je opisalo karakteristike promena peripapilarnog RNFL na OCT-u. Kod asimptomatskih nosilaca postoji značajno zadebljanje temporalnog RNFL u poređenju sa kontrolama i trend zadebljanja inferiornog segmenta (11). Ovo rano zadebljanje smatra se posledicom poremećaja aksoplazmatskog transport i verovatno predstavlja rani tj osnovni stres na nervna vlakna. U momentu početka bolesti, tipično postoji zadebljanje superiornog i inferiornog dela RNFL dok je temporalni kvadrant normalne debljine zbog početka atrofije (12). Ove promene odgovaraju pojavljivanju pseudoedema optičkog diska, hiperemiji i mikrovaskularnim promenama na pregledu fundusa. Posle tri meseca javlja se temporalno istanjenje, a kroz devet meseci registruje se superiorno i inferiorno istanjenje (13).

OCT makule pokazuje istanjenje unutrašnjeg makularnog prstena i spoljašnjeg nazalnog kvadranta u prvih tri meseca od onseta bolesti.

Ovo dalje progredira ka temporalnom delu tokom naredna tri meseca i do 12. meseca od početka bolesti postoji difuzno istanjenje makule sa prosečnom debljinom od 251 μm u poređenju sa prosečnom debljinom zdravih osoba koja iznosi 281 μm (14). GCL-IPL je izgleda još senzitivnija na rane promene kod LHONa. Mala longitudinalna studija 4 pacijenta pokazuje da je istanjenje GCL-IPL u nazalnom kvadrantu prisutno i pre početka simptoma. Tokom prva tri meseca od početka bolesti GCL-IPL istanjenje progredira na donji, superiorni i temporalni kvadrant sa difuznim istanjenjem prosečnog GCL-IPL na 63 μm 3 meseca od onseta. Ovo istanjenje se nastavlja do 57 μm 6 meseci posle početka, da bi se posle stabilizovalo (7) (Slika 3. OCT i grafički prikaz istanjenja GCL-IPL koje je procentualno najveće u prvih 6 meseci od početka bolesti posle čega nastupa period stabilnosti).

Radijalna peripapilarna kapilarna mreža je pogođena kod pacijenata sa LHONom što je potvrđeno OCT angiografijom (15-17). Studija koja je uključila 22 pacijenta u različitim stadijumima bolesti pokazala je da postoji isključenje kapilarne mreže u temporalnom peripapilarnom delu u ranom

stadijumu bolesti da bi se kasnije to isključenje širilo inferiorno, superiorno pa sve do difuznog isključenja u hroničnim fazama bolesti. Vaskularne promene korespondiraju GC-IPL istanjenju, a prethode istanjenju RNFL (6).

Kod malog broja obolelih dolazi do spontanog oporavka vidne funkcije (56), koji se ogleda u smanjivanju ili fenestraciji centralnog skotoma, a rezultira u poboljšanju vidne oštrine.

Veći procenat oporavka vidne funkcije je primećen kod m.14484T > C/MT-ND6 i DNAJC 30 mutacija koje imaju najbolju prognozu. Isto tako starost pacijenta u momentu nastanka bolesti, ukoliko se bolest javi u detinjstvu ima najbolju prognozu nezavisno od tipa mutacije (86). Bolest se najčešće javlja u mladosti nešto kasnije kod žena, ali su poznati slučajevi javljanja u ranom u detinjstvu (87), kao i u starosti (88), (89).

Barboni i saradnici(90) su u skorašnjem radu objavili da su dece starosti između 3 i 9 godina imala bolju vidnu oštrinu od onih koji su bili stariji od devet godina

Isto tako je kod dece mlađe od 9 godina srednja devijacija u rezultatima vidnog polja bila manja u poređenju sa decom starijom od devet godina. Srednja debljina sloja ganglijskih ćelija je bila viša u grupi dece starosti između 3 i 9 godina nego kod dece mlađe od 3 i starije od 9 godina. Ovi istraživači su takođe opisali četiri moguća obrasca gubitka vidne oštrine u dečjoj dobi:

Subakutni bilateralni (66.7%); Bilateralni sa podmuklim tokom (17.3%); unilateralni (11.1%); i subklinički bilateralni (4.9%). Majander i saradnici (87)su definisali tri moguća načina gubitka vidne oštrine:klasični akutni koji je bio najčešći, sporo progresivni i subakutni podmukli kod koga je bilo najduže vreme do postavljanja dijagnoze i iznosilo je čak 15 godina. Zbog opisanih unilateralnih slučajeva i slučajeva sa odloženom dijagnozom potrebno je da se svi slučajevi ambliopije u dečjem dobu detaljno dijagnostikuju u smislu LHON-a.

Kod nekih neurodegenerativnih mitohondrijskih oboljenja (Kearns-Sayre syndrome) javljaju se promene na endotelu rožnjače slične promenama kod Fuch's-ove endotelne distrofije u čijoj osnovi leži disfunkcija oksidativnog metabolizma (91). Endotel rožnjače kod LHON-a i drugih pacijenata sa genetskom mitohondrijskom disfunkcijom do sad nije ispitan.

4.2.4 Elektrofiziološke karakteristike LHON pacijenata

Elektrofiziološki modaliteti koji se najčešće koriste kod LHON-a za procenu funkcije retinalnih ganglijskih ćelija i vidnog puta su Patern elektroretinogram (PERG), Patern vidni evocirani potencijali (VEP), multifokalni VEP i fotopični negativni odgovori (PhNR). Najčešće se upotrebljavaju PERG i VEP. Internacionalni VEP i PERG stimulus podrazumevaju suprapragovne kontrastne stimulse po principu šahovske table koji može biti standardne veličine (12° x 15°) ili stimulus velikog polja (24° x 30°), dok psihofizika omogućuje merenje pragovne draži (Slika 4. Šematski prikaz polja (standardno i veliko) i njihovih projekcija na retini VEP-a i PERG-a

Patern elektroretinogram (PERG) potiče od unutrašnjih slojeva retine, omogućava procenu funkcije ganglijskih ćelija i sve više se koristi u proceni stanja prednjih delova vidnog puta(92,93) (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b)Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabiln. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabiln i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b)Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabiln. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b). Majander je dobila slične rezultate koji su kozistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latenca P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćenje latence P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Normalan PERG se sastoji od prominentne pozitivne komponente P50 i veće kasnije negativne komponente N95. N95 komponenta potiče od RGC dok 30% P50 potiče od anteriornijih retinalnih struktura (93,94).

VEP sa preokretom uzorka beleži bioelektrične odgovore iz vidnog korteksa (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa)

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovana PERG N95 (podignuta u nivo izolirane, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižen, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka

bolesti: redukovano PERG N95 (podignuto u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćivanje latencije P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Variranjem prostornih frekvencija moguće je da se utvrdi preovlađujuću aktivaciju različitih neuronskih komponenti vidnog puta na osnovu veličine receptivnih polja mrežnjače, da se izazovu odgovori u kortikalnim oblastima u koje se signali dovode putem različitih populacija aksona sa promenljivom neuronskom provodljivošću (95). Korišćenjem polja 60° (prostorna učestalost sa većim poljima), aktiviraju se velika receptivna polja mrežnjače, čime se podstiču odgovori korteksa prenošeni velikim aksonima. Nasuprot tome, korišćenjem polja 15° (prostorna frekvencija sa manjim poljima), aktiviraju se prvenstveno manja receptivna polja mrežnjače i bioelektrički signal koji se dovodi do vizuelnog korteksa malim aksonima (96).). i Slika 3. OCT i grafički prikaz istanjenja GCL-IPL koje je procentualno najveće u prvih 6 meseci od početka bolesti posle čega nastupa period stabilnosti.

Radialna peripapilarna kapilarna mreža je pogođena kod pacijenata sa LHONom što je potvrđeno OCT angiografijom (15-17). Studija koja je uključila 22 pacijenta u različitim stadijumima bolesti pokazala je da postoji isključenje kapilarne mreže u temporalnom peripapilarnom delu u ranom stadijumu bolesti da bi se kasnije to isključenje širilo inferiorno, superiorno pa sve do difuznog isključenja u hroničnim fazama bolesti. Vaskularne promene korespondiraju GC-IPL istanjenju, a prethode istanjenju RNFL (6).

Kod malog broja obolelih dolazi do spontanog oporavka vidne funkcije (56), koji se ogleda u smanjivanju ili fenestraciji centralnog skotoma, a rezultira u poboljšanju vidne oštrine.

Veći procenat oporavka vidne funkcije je primećen kod m.14484T > C/MT-ND6 i DNAJC30 mutacija koje imaju najbolju prognozu. Isto tako starost pacijenta u momentu nastanka bolesti, ukoliko se

bolest javi u detinjstvu ima najbolju prognozu nezavisno od tipa mutacije (86). Bolest se najčešće javlja u mladosti nešto kasnije kod žena, ali su poznati slučajevi javljanja u ranom u detinjstvu (87), kao i u starosti (88), (89).

Barboni i saradnici(90) su u skorašnjem radu objavili da su dece starosti između 3 i 9 godina imala bolju vidnu oštrinu od onih koji su bili stariji od devet godina

Isto tako je kod dece mlađe od 9 godina srednja devijacija u rezultatima vidnog polja bila manja u poređenju sa decom starijom od devet godina. Srednja debljina sloja ganglijskih ćelija je bila viša u grupi dece starosti između 3 i 9 godina nego kod dece mlađe od 3 i starije od 9 godina. Ovi istraživači su takođe opisali četiri moguća obrasca gubitka vidne oštrine u dečjoj dobi:

Subakutni bilateralni (66.7%); Bilateralni sa podmuklim tokom (17.3%); unilateralni (11.1%); i subklinički bilateralni (4.9%). Majander i saradnici (87) su definisali tri moguća načina gubitka vidne oštrine: klasični akutni koji je bio najčešći, sporo progresivni i subakutni podmukli kod koga je bilo najduže vreme do postavljanja dijagnoze i iznosilo je čak 15 godina. Zbog opisanih unilateralnih slučajeva i slučajeva sa odloženom dijagnozom potrebno je da se svi slučajevi ambliopije u dečjem dobu detaljno dijagnostikuju u smislu LHON-a.

Kod nekih neurodegenerativnih mitohondrijskih oboljenja (Kearns-Sayre syndrome) javljaju se promene na endotelu rožnjače slične promenama kod Fuch's-ove endotelne distrofije u čijoj osnovi leži disfunkcija oksidativnog metabolizma (91). Endotel rožnjače kod LHON-a i drugih pacijenata sa genetskom mitohondrijskom disfunkcijom do sad nije ispitan.

4.2.5 Elektrofiziološke karakteristike LHON pacijenata

Elektrofiziološki modaliteti koji se najčešće koriste kod LHON-a za procenu funkcije retinalnih ganglijskih ćelija i vidnog puta su Patern elektroretinogram (PERG), Patern vidni evocirani potencijali (VEP), multifokalni VEP i fotopični negativni odgovori (PhNR). Najčešće se upotrebljavaju PERG i VEP. Internacionalni VEP i PERG stimulus podrazumevaju suprapragovne kontrastne stimulse po principu šahovske table koji može biti standardne veličine ($12^\circ \times 15^\circ$) ili stimulus velikog polja ($24^\circ \times 30^\circ$), dok psihofizika omogućuje merenje pragovne draži (Slika 4. Šematski prikaz polja (standardno i veliko) i njihovih projekcija na retini VEP-a i PERG-a

Patern elektroretinogram (PERG) potiče od unutrašnjih slojeva retine, omogućava procenu funkcije ganglijskih ćelija i sve više se koristi u proceni stanja prednjih delova vidnog puta(92,93) (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99),

(100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjena amplituda (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižen, a VEP abnormalan (101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovani PERG N95 (podignut u nivo izolacije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHON pacijenata PhNR je smanjena amplituda (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b).). Majander je dobila slične rezultate koji su konzistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latencija P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćivanje latencija P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Normalan PERG se sastoji od prominentne

pozitivne komponente P50 i veće kasnije negativne komponente N95. N95 komponenta potiče od RGC dok 30% P50 potiče od anteriornijih retinalnih struktura (93,94).

VEP sa preokretom uzorka beleži bioelektrične odgovore iz vidnog korteksa (Slika 5. Prikaz porekla i normalnog izgleda PERG i VEP talasa

Elektrofiziološki znaci bolesti su produženje latence VEP P100 talasa, promena morfologije VEP-a i smanjenje N95/P50 odnosa često već u akutnoj fazi bolesti (59), (97) (Slika 6. Smanjenje amplitude N95 talasa i smanjenje odnosa N95/P50 (Autor Ana Fakin)

Mnogobrojne studije su pokazale da kod akutnog LHON-a postoji abnormalni kortikalni VEP odgovori koji se ogledaju u smanjenju amplitude produženju latence VEP P100 talasa (98), (99), (100), (101),(97) (Slika 7. Produženje latence i smanjenje amplitude P100 talasa kod LHON-a (Autor Ana Fakin.)

U akutnoj fazi bolesti preko 50% pacijenata ima abnormalnu amplitude PERG N 95 talasa (59) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

Fokalni PhNR koji koristi fleš stimuluse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

a), dok je posle više od dve godine kod gotovo svih pacijenata N95 talas snižena, a VEP abnormalan(101) (Slika 8. a) Elektrofiziološke karakteristike pacijenta dve nedelje od početka bolesti: redukovan PERG N95 (podignut u nivo izolinije, označeno crnom debelom strelicom), dok je PERG N95 na levom oku još uvek bio normalan. VEP P100 talas je bio redukovane amplitude na desnom oku i obostrano produžene latence. b) Posle 5 meseci oba optička diska su bila bleđa i atrofična, oba PERG N95 talasa abnormalna, dok VEP P100 nije bio detektabilan. Preuzeto od reference (59)

Fotopički negativni odgovori su komponenta ERGa celog polja koja potiče od retinalnih ganglijskih ćelija. Kod oko 60% LHONpacijenata PhNR je smanjene amplitude (102).

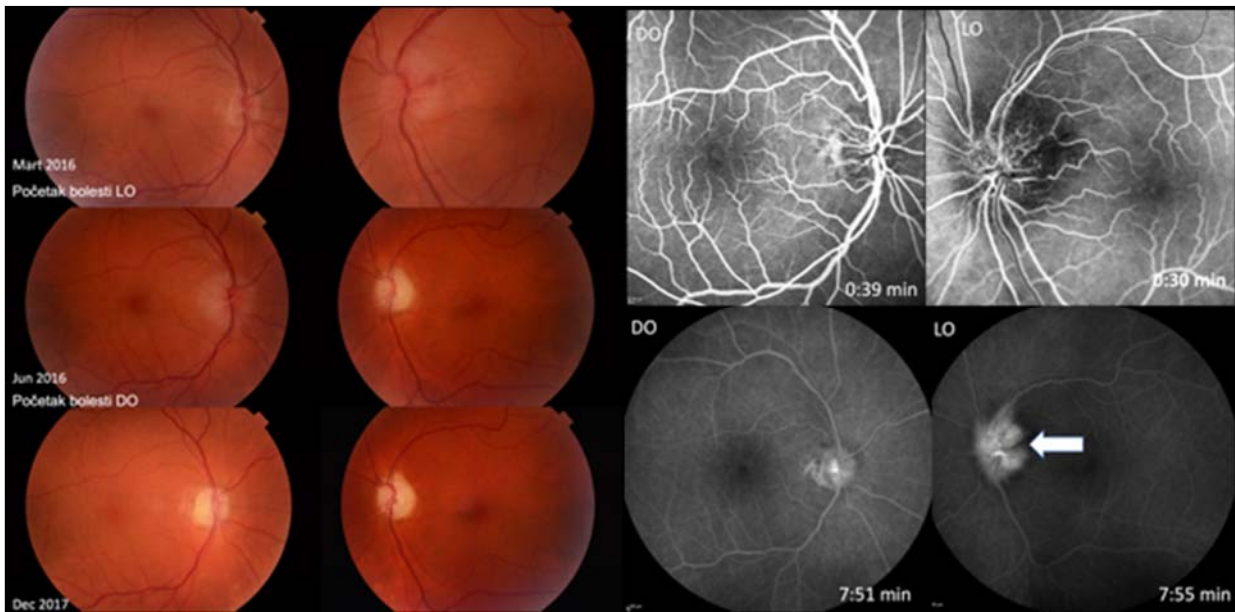
Fokalni PhNR koji koristi fleš stimulse centralne makularne regije je senzitivniji, ali generiše signale niže amplitude. Ovi testovi su važni zato što u određenom broju slučajeva VEP postaje nedetektabilan i stoga PERG može da igra važnu ulogu u praćenju funkcije RGC.

b).). Majander je dobila slične rezultate koji su kozistentni sa ranim zahvatanjem papilomakularnog snopa. Sa napretkom simptoma latenca P100 talasa se progresivno produžava (97)). P50 se koristi za procenu funkcije makule dok je redukcija N95:P50 sa očuvanjem amplitude P50 i skraćenje latence P50 karakteristika RGC disfunkcije (Holder, 2001, 2004), mada kod ozbiljnijih oštećenja ganglijskih ćelija i P50 može takođe da bude snižen.). Variranjem prostornih frekvencija moguće je da se utvrdi preovlađujuću aktivaciju različitih neuronskih komponenti vidnog puta na osnovu veličine receptivnih polja mrežnjače, da se izazovu odgovori u kortikalnim oblastima u koje se signali dovode putem različitih populacija aksona sa promenljivom neuronskom provodljivošću (95). Korišćenjem polja 60° (prostorna učestalost sa većim poljima), aktiviraju se velika receptivna polja mrežnjače, čime se podstiču odgovori korteksa prenošeni velikim aksonima. Nasuprot tome, korišćenjem polja 15° (prostorna frekvencija sa manjim poljima), aktiviraju se prvenstveno manja receptivna polja mrežnjače i bioelektrički signal koji se dovodi do vizuelnog korteksa malim aksonima (96).).).

4.2.5.1 Fenotipska karakterizacija MT -ND4:m.11443A>C promene

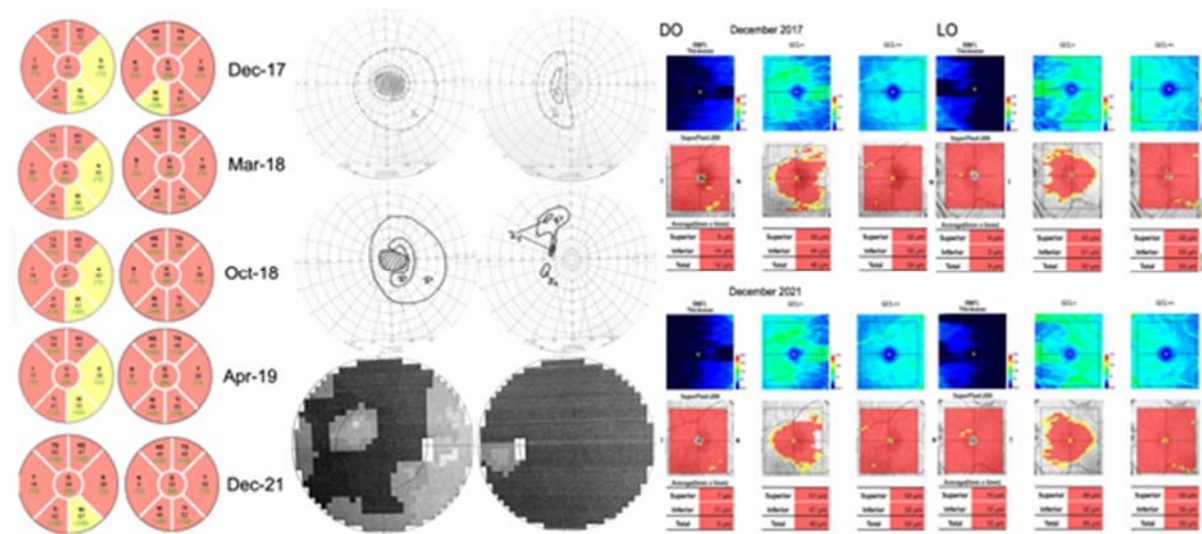
LHON 21

Muškarac star 53 godine, označen kao LHON 21 (Tabela 2), primljen je zbog gubitka vidne oštine na levom oku u martu 2016.godine. Njegova vidna oština (VO) je bila 1,0 na desnom oku i brojanje prstiju na 1,5 metara levo, vid za boje je bio 15/15 RE, 6/15 LE. Na fundoskopiji je levi optički disk bio edematozan, nejasno ograničen i značajno eleviran, dok je na desnom oku postojala blaga elevacija optičkog diska (Slika 20).



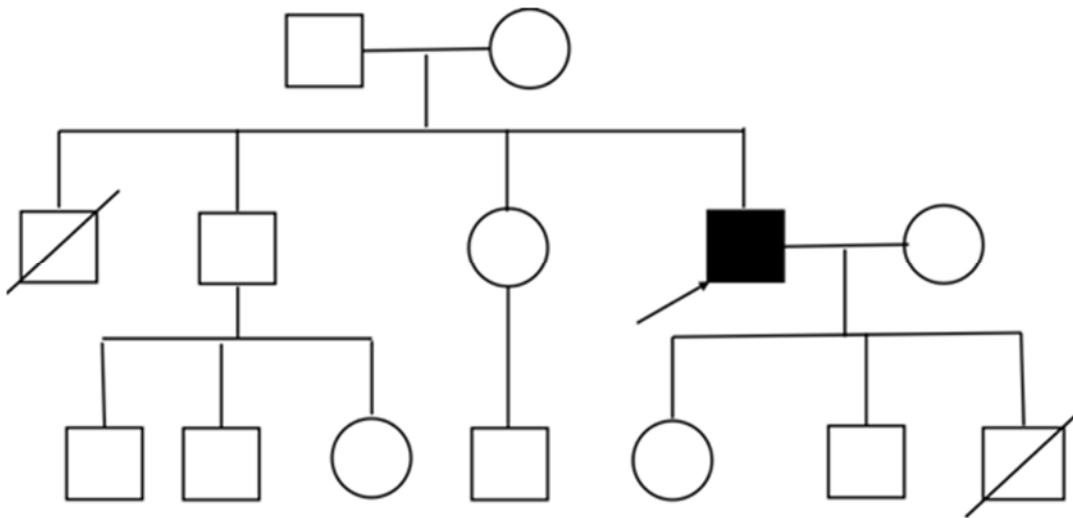
Slika 20. Fenotipske karakteristike pacijenta LHON 21 sa edemom vidnog živca i nespecifičnim curenjem na optičkom disku u kasnim fazama fluoresceinske angiografije

U vidnom polju levog oka postojao je centralni, temporalni i gornji ispad u vidnom polju (Grafikon 10). Na fluoresceinskoj angiografiji registrovano je curenje na optičkom disku u kasnim fazama angiograma nekarakteristično za LHON (Slika 20). U ličnoj anamnezi je naveo da mu su mu otac i majka imali srčane tegobe i moždani udar, kao i da mu jedan sin ima epilepsiju dok je drugi preminuo zbog iznenadnog prestanka rada srca u 24. godini života.



Grafikon 10. Progresivna atrofija peripapilarnog sloja nervnih vlakana i progresivno uvećavanje skotoma u vidnom polju, sa potpunom atrofijom GCL-IPL u makularnoj regiji

Pacijent je primio standardnu terapiju intravenskim kortikosteroidima tokom tri dana, ali bez poboljšanja. Prednja ishemijska arteritična optička neuropatija kao prezentacija gigantocelularnog arteritisa (GCA) je isključena, kao i drugi mogući uzroci edema optičkog diska (infektivni, toksični, inflamatorni). U junu 2016. godine pacijent izgubio VO na desnom oku sa istom prezentacijom kao i tri meseca ranije na levom. Genetska analiza (sekvenciranje mtDNK sledeće generacije) otkrila je varijantu nepoznatog značaja (VUS) MT-ND4:m.11443A>C, 65% heteroplazmije koja nije nađena u porodici (majka, sestra, brat Tabela 3) tako da se navedena promena može smatrati *de novo* mutacijom.



Grafikon 11. Porodično stablo pacijenta nosioca 11443A>C mutacije koja nije nađena ni kod jednog člana porodice što ukazuje na mogućnost deNovo mutacije

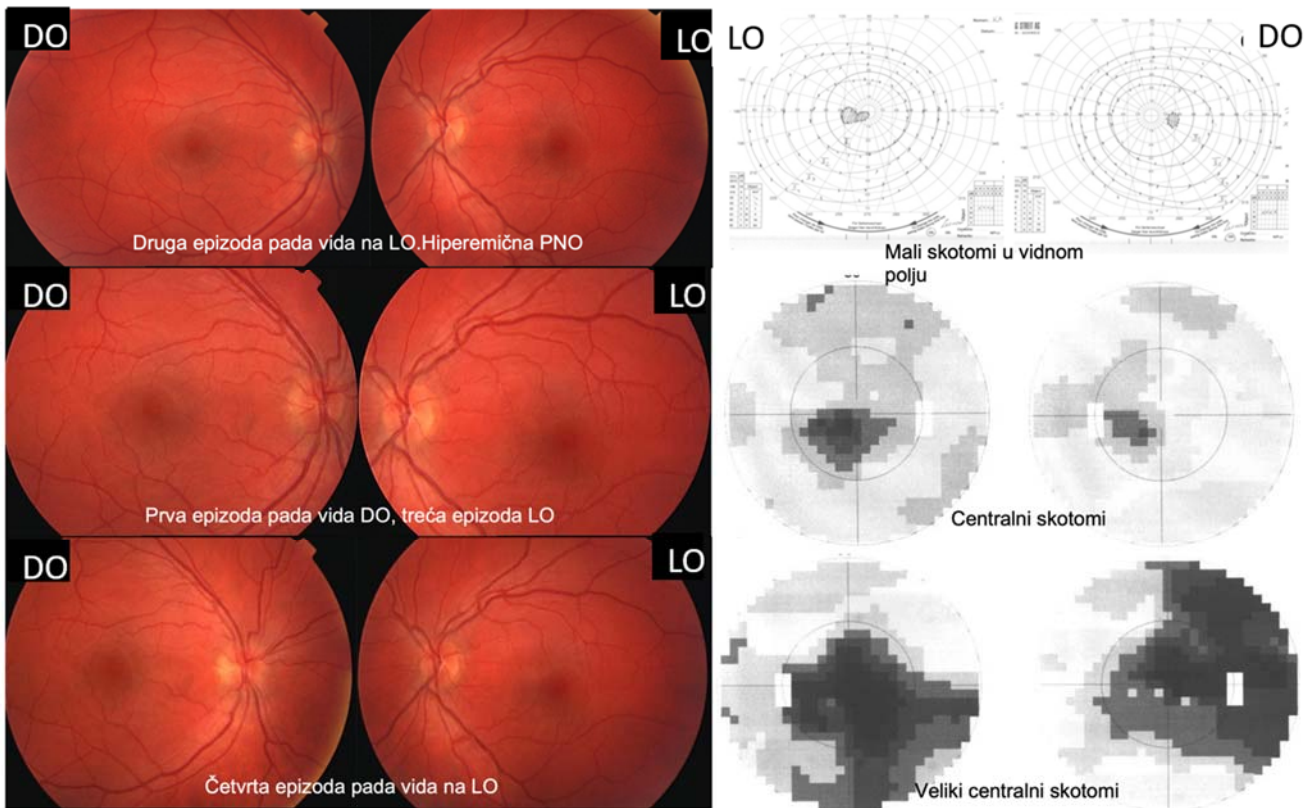
Tokom perioda praćenja njegova VO i kolorni vid su ostali su niski, praćeni gotovo potpunom atrofijom peripapilarnog RNFL i unutrašnje retine.

4.2.5.2 Fenotipske karakteristike MT-CYB 15309 T>C mutacije

LHON 22

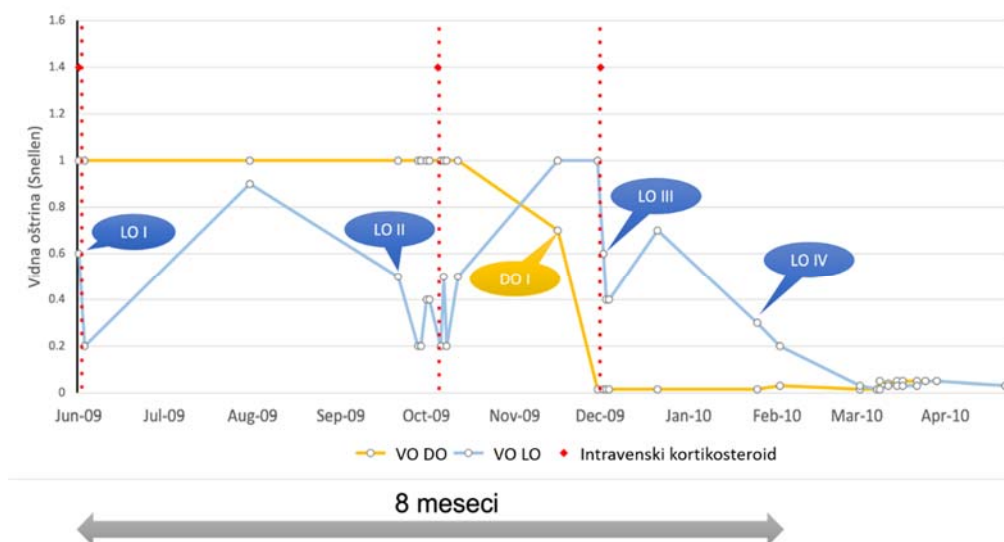
LHON 22 (Tabela 2) je 19-godišnji muškarac, inače zdrav primetio je loš vid na levom oku u junu 2009.

Pregledan je u lokalnoj bolnici, VA RE: 1.0 LE: 0.6. Uprkos primenjenoj trodnevnoj kortikosteroidnoj terapiji došlo je do pogoršanja VO levog oka na 0,2 Snellen, nakon čega je primenjena antibiotska terapija (sumnja na sinuzitis) posle čega je došlo do poboljšanja VO levog oka na 0,9 tokom narednih mesec dana, a kolorni vid na DO 15/15, LO 9/15 Ishihara. NMR glave i vratne kičme je bio u fiziološkim granicama.



Slika 21. Fundoskopija i vidno polje pacijenta LHON 22

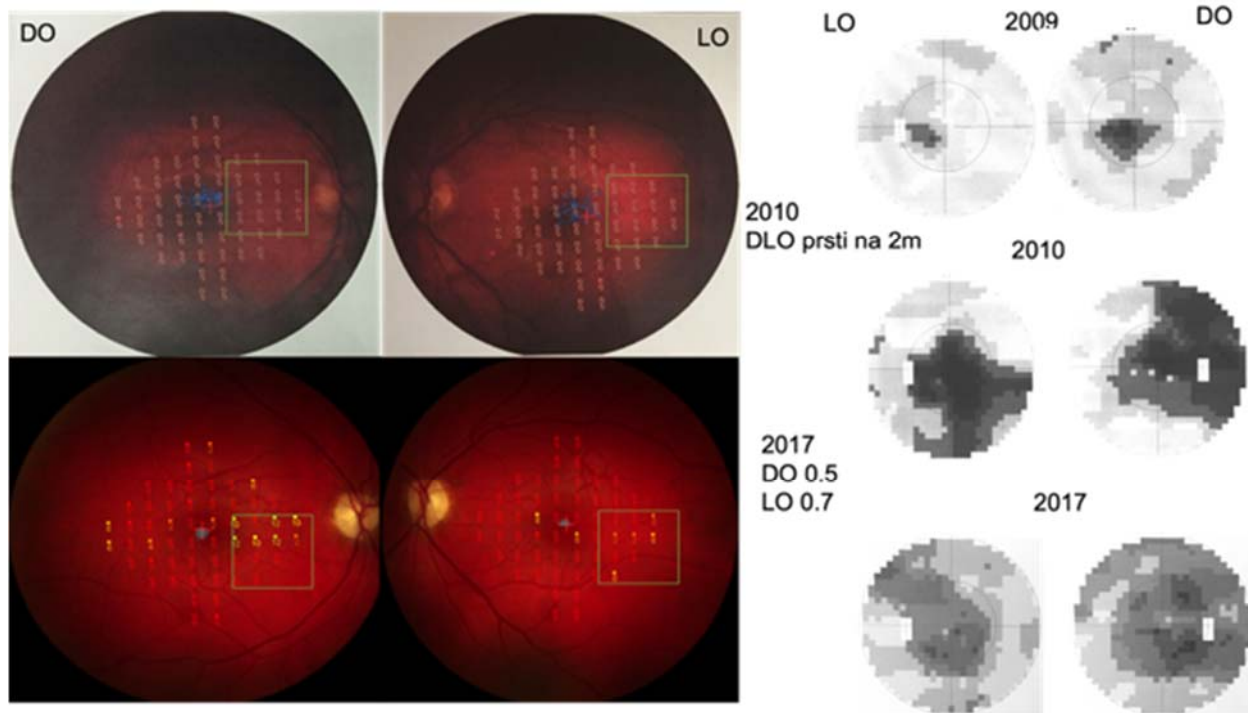
Tokom narednih sedam meseci pacijent je imao još 2 slične epizode pogoršanja i poboljšanja vidne oštine, sve dok 8 meseci od početka bolesti nije došlo do četvrtog pogoršanja vidne oštine levog oka, koje nije bilo praćeno poboljšanjem (Grafikon 12). Slične epizode nisu primećene na pacijentovom desnom oku kod koga je došlo do pogoršanja vidne funkcije 2,5 meseci od početka bolesti koje nije bilo praćeno poboljšanjem.



Grafikon 12. Tok bolesti kod pacijenta LHON 22 tokom prvih osam meseci od početka sa četiri epizode pogoršanja vidne oštine na levom oku

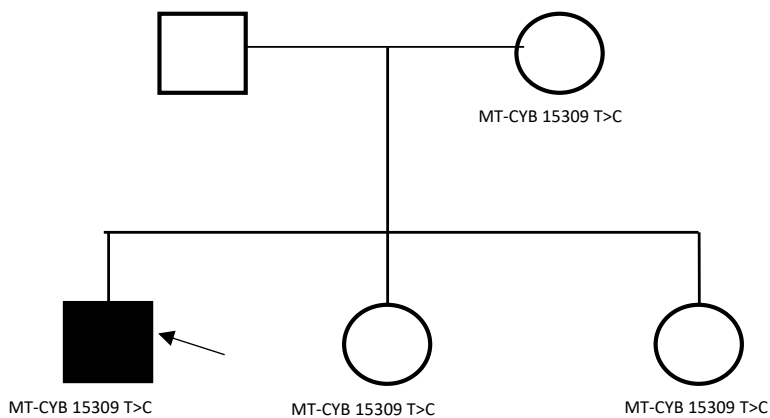
Elektrofiziologija je pokazala normalan N95 i P50 PERG na desnom, abnormalan na levom oku i abnormalan VEP 100 obostrano, ali je ubrzo došlo do daljeg pogoršanja na desnom oku i odnos N95/P50 je bio desno 0.78, a levo 0.89.

Pacijent je nakon 8 meseci dostigao svoju NADIR vidnu oštrinu DLO brojanje prstiju na 1m, ali tokom celog ovog perioda optički diskovi su bili hiperemični, tek kasnije je počelo da se pojavljuje temporalno bledilo (Slika 21, Grafikon 12). Mikroperimetrija urađena u ovom period pokazala je potpuno odsustvo senzitivnosti u makularnom predelu (Slika 22).



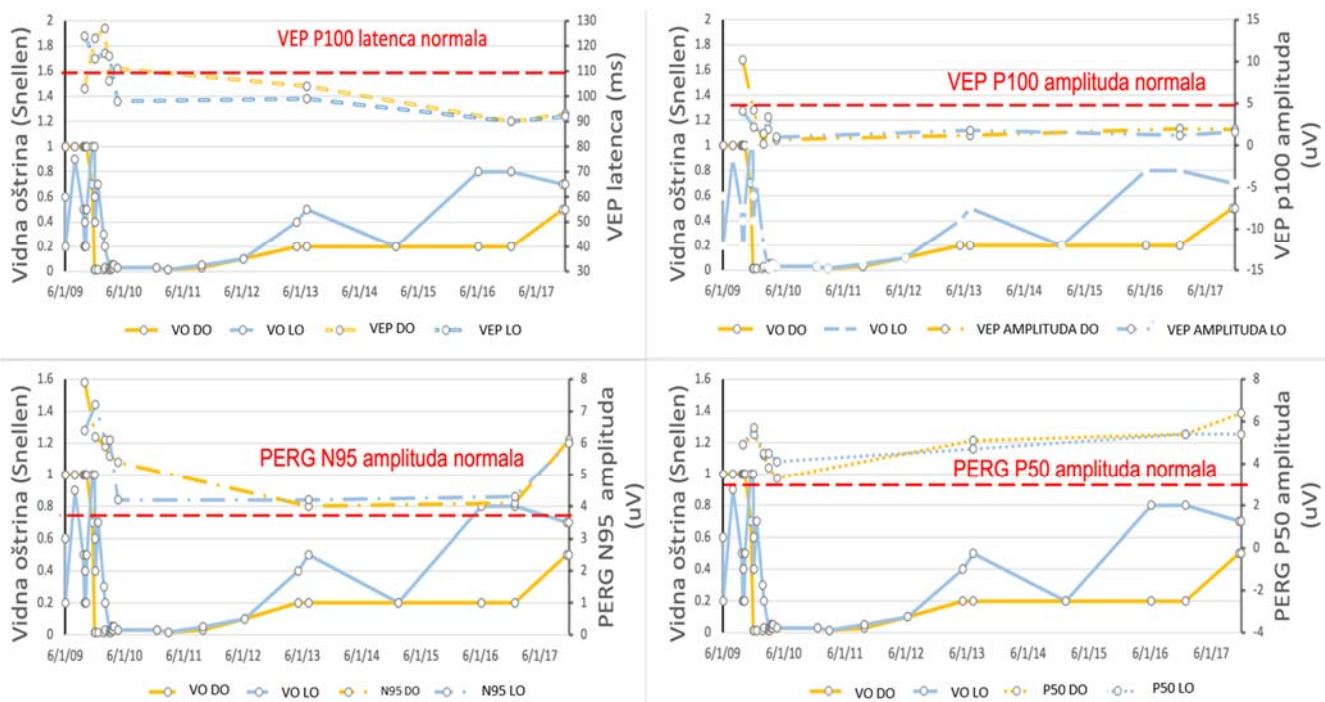
Slika 22. Mikroperimetrija i vidno polje pacijenta LHON 22 na početku bolesti i tokom perioda praćenja

Kod pacijenta je identifikovana varijanta nepoznatig značaja 15309T>C, segregaciona analiza je pokazala prisustvo iste varijante kod majke i kod obe sestre (Grafikon 13).



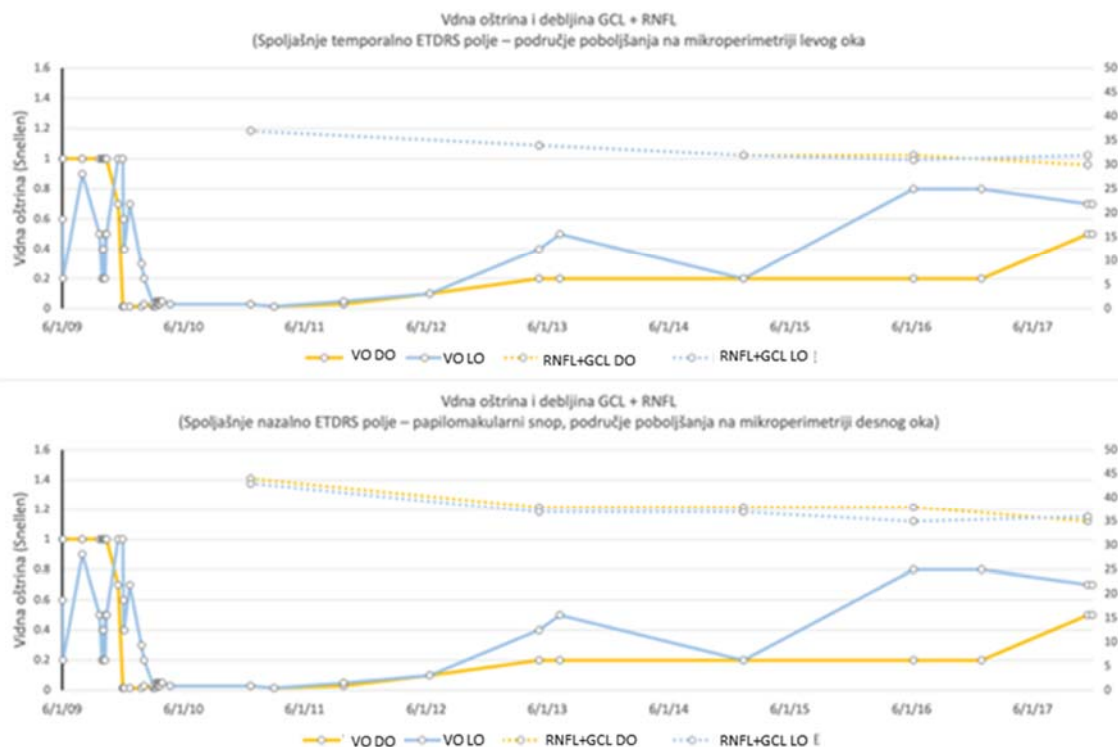
Grafikon 13. Proband i neboleli nosioci mutacije 15309T>C

Tokom naredne dve godine pacijent je bio legalno slepa osoba, ali je tada došlo do postepenog poboljšanja vidne oštine na DO 0.5, LO 0.7 tokom perioda od 5 godina sa značajnim smanjenjem centralnog skotoma i fenestracijama. Kolorni vid se nije popravio. Elektrofiziologija je pokazala skraćenje latence VEP P100 talasa, ali bez značajnog poboljšanja amplitude. Amplituda PERG N95 i P 50 talasa se popravila, verovatno kao posledica bolje fiksacije, ali je N95 talas i dalje ostao abnormalnog oblika, u nivou izolinije, a odnos N95/P50 ispod granica normale desno 0.95, a levo 1.11 (Grafikon 14).

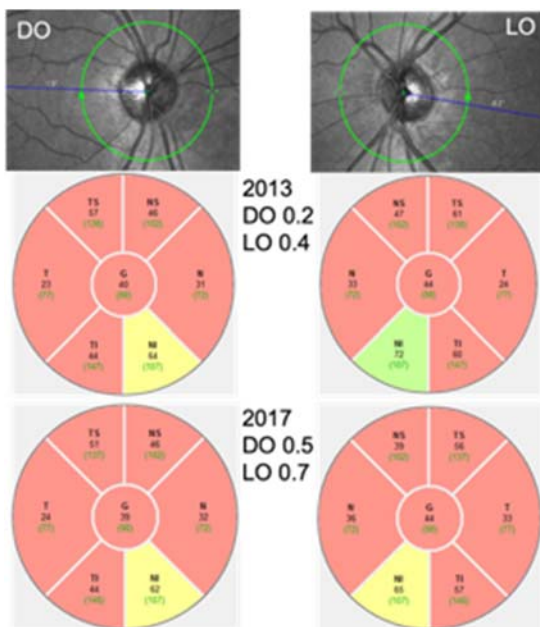


Grafikon 14. Promena elektrofizioloških karakteristika pacijenta LHON 22 u skladu sa poboljšanjem vidne oštine

Mikroperimetrija je pokazala značajno poboljšanje senzitivnosti na desnom oku u predelu koji odgovara papilomakularnom snopu, a na levom oku u temporalnom delu makule. Sa druge strane, segmentaciona analiza nije pokazala povećanje debljine GCL+RNFL čak ni u delovima u kojima je primećeno poboljšanje senzitivnosti na mikroperimetriji (Slika 22, Grafikon 15).



Grafikon 15. Debljina retinalnih slojeva u ETDRS poljima u kojima je registrovano poboljšanje retinalne funkcije mikroperimetrijom



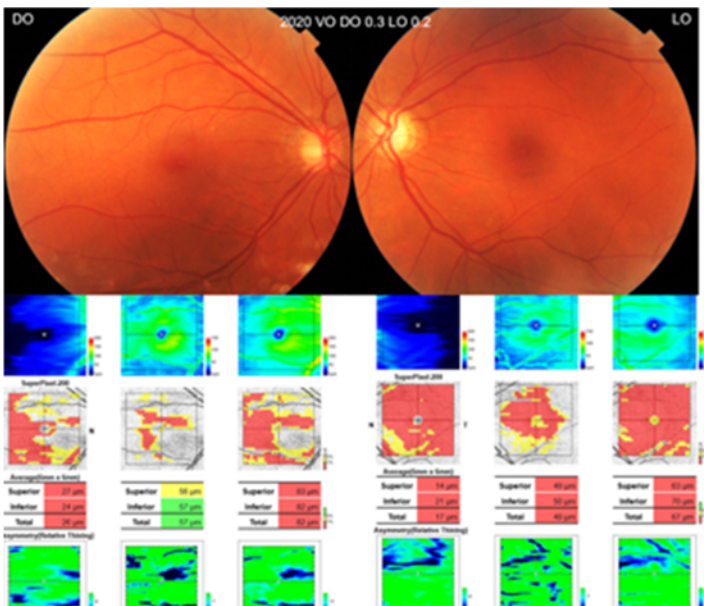
Peripapilarni RNFL je bio gotovo u potpunosti atrofičan u svim segmentima i tokom celog perioda praćenja postojala je spora, ali konstantna progresija istanjenja pRNFL uprkos poboljšanju vidne funkcije (Slika 23).

Slika 23. Atrofija peripapilarnog RNFL u svim segmentima

4.2.5.3 Fenotipska karakterizacija MT-NDI:m.4130A>T promene

LHON 23

Pacijentkinja označena kao LHON 23 (Tabela 2) je gospođa stara 59 godina, primljena na Kliniku zbog obostrane atrofije vidnih živaca. Na pregled se javila zbog bola u desnom oku. Šest meseci pre prijema je primetila pad vida na oba oka i od tad je imala dosta česte glavobolje. Navodila je takođe da je imala prolazne gubitke vida na levom oku. Na prijemu vidna oštrina na desnom oku je bila 0,4 Snellen, na levom 0,2, kolorni vid obostrano 4/15 Ishihara. Fundoskopija je pokazala obostrano blede papile, jasno ograničene (Slika 24).



Slika 24. Obostrana atrofija vidnih živaca na fundoskopiji i istanjenje sloja GCC na optičkoj koherentnoj tomografiji.

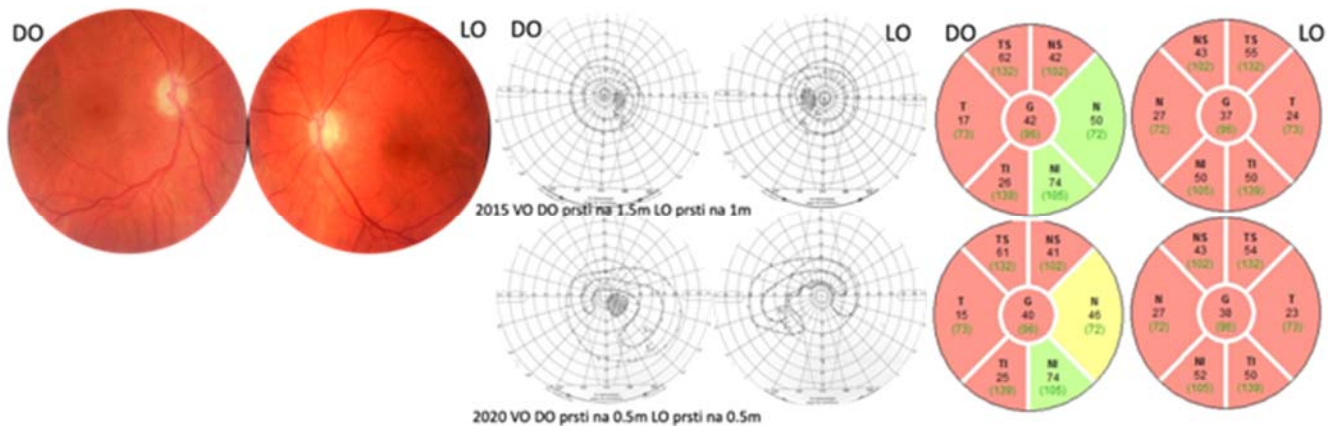
Elektrofiziološki nalaz je pokazao širi P100 VEP talas na desnom oku iako je amplituda i latenca bila normalna i normalan PERG N95 talas. Na levom oku je VEP bio niže amplitude i produžene latence, dok je N95 talas bio niže amplitude. U vidnom polju postojali su obostrano centralni skotomi i koncentrično suženje vidnog polja, a na OCT-u PNO atrofija peripapilarnog RNFL kao i istanjenje GCC u makuli sa relativnim očuvanjem centra. Tokom perioda praćenja dve godine došlo

je do pada vidne oštine na DO na 0,3 Snellen, dok je kolorni vid obostrano značajno pogoršan na 0/15 Ishihara. Genetska analiza je pokazala prisustvo varijante nepoznatog značaja (VUS) MT-NDI:m.4130A>T u mitohondrijskom genomu .

4.2.5.4 Fenotipska karakterizacija MT-ND6:m.14598T>C promene

LHON 24

Pacijent označen kao LHON 24 (Tabela 2), je gospodin star 54 godine koji je poslat od strane neurologa i prvi put pregledan 2015. godine. Pet godina pre prvog pregleda (u 49. godini života) je primetio nagli pad vida na oba oka (kao da je neko spustio roletne) i od tad se vid nije popravio. Gospodin boluje i leči se od Parkinsonove bolesti unazad 10 godina. Vidna oština na prvom pregledu, 5 godina nakon pada vida, bila je DO brojanje prstiju na 1.5 metara, LO brojanje prstiju na 1 metar, dok je kolorni vid bio 0/15 Ishihara obostrano. Papile su bile jasno ograničene, bele u celosti (Slika 25). Vidno polje je bilo koncentrično suženo sa velikom slepom mrljom, dok je peripapilarni RNFL bio u poptunosti atrofičan na levom oku, a na desnom je postojalo očuvanje nazalnog segmenta karakteristično za mitohondrijske neuropatije (Slika 25).



Slika 25. Fundoskopija, vidno polje i OCT vidnog živca pacijenta LHON 24 na prvom pregledu i tokom perioda praćenja

Obostrano je u makuli postojalo istanjenje GCC sa relativnim očuvanjem ETDRS centra. Elektrofiziologija je pokazala sniženu amplitudu N95 talasa, kao i sniženu amplitudu i produženu latencu VEP P100 talasa. Tokom perioda praćenja došlo je do dodatnog pogoršanja vidne oštine na oba oka DLO brojanje prstiju na 0.5m sa uvećanjem centralnog skotoma, postojala je diskretna progresija istanjenja pRNFL, a VEP P100 talas je postao nedetektabilan.

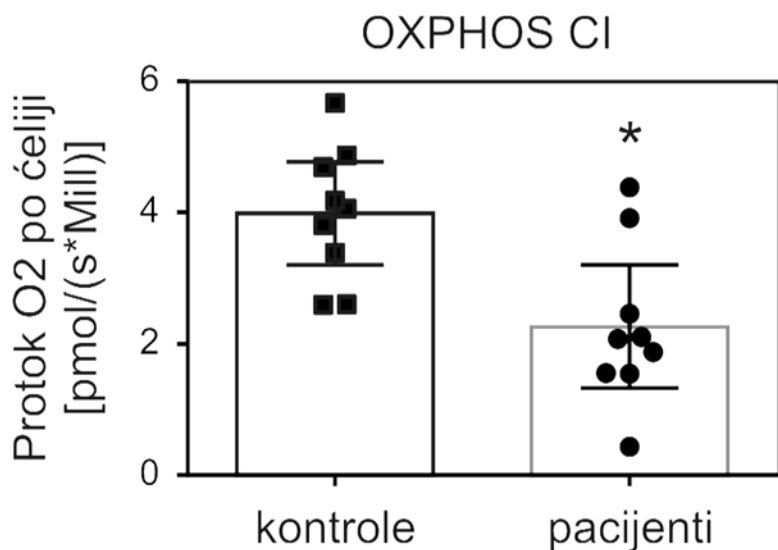
Kod poslednja dva pacijenta segregacija nije izvršena jer rođaci nisu bili voljni da urade genetsko testiranje.

4.3 REZULTATI ISPITIVANJA FUNKCIJE MITOHONDRIJA U MONONUKLEARNIM ĆELIJAMA PERIFERNE KRVI PACIJENATA SA NOVOIDENTIFIKOVANIM PROMENAMA U MITOHONDRIJALNOJ DNK

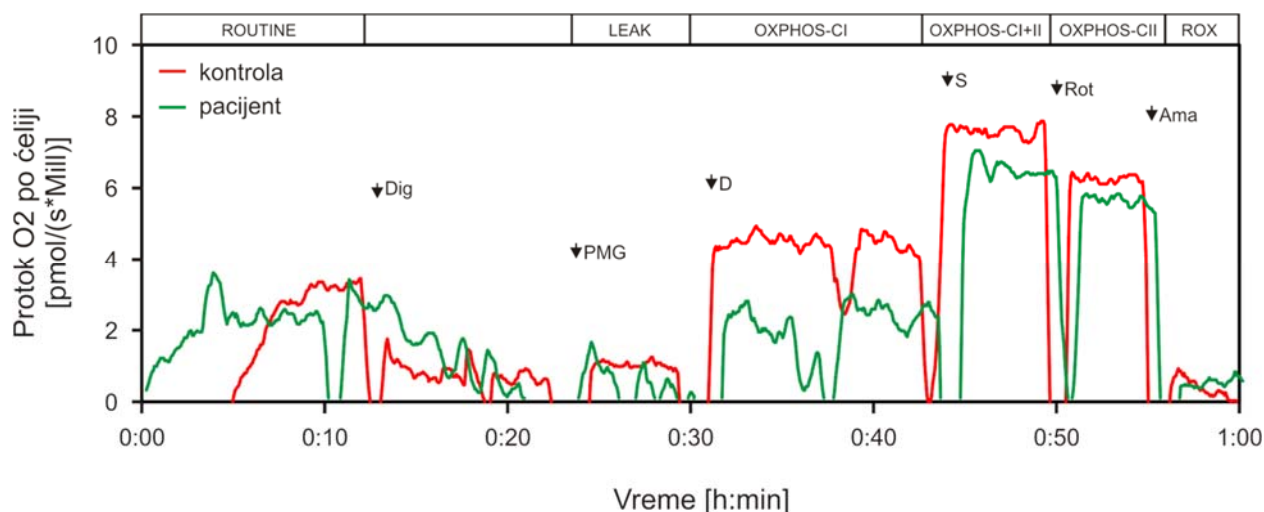
4.3.1 Ispitivanje respiracije u mononuklearnim ćelijama izolovanim iz krvi pacijenata sa LHON

Pokazatelji mitohondrijske funkcije u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNĀPK) kod pacijenata sa LHON kod kojih je utvrđeno prisustvo poznatih, ali i novootkrivenih mutacija, određeni su metodom respirometrije visoke rezolucije i upoređivani su sa rezultatima respirometrije u MNĀPK zdravih osoba odgovarajuće starosti i pola.

Analiza mitohondrijske respiracije je pokazala da je kapacitet oksidativne fosforilacije na nivou kompleksa I u MNĀPK pacijenata sa LHON bio značajno niži u poređenju sa kontrolom, što je potvrđeno i t-test-om (Grafikon 16 i Grafikon 17).

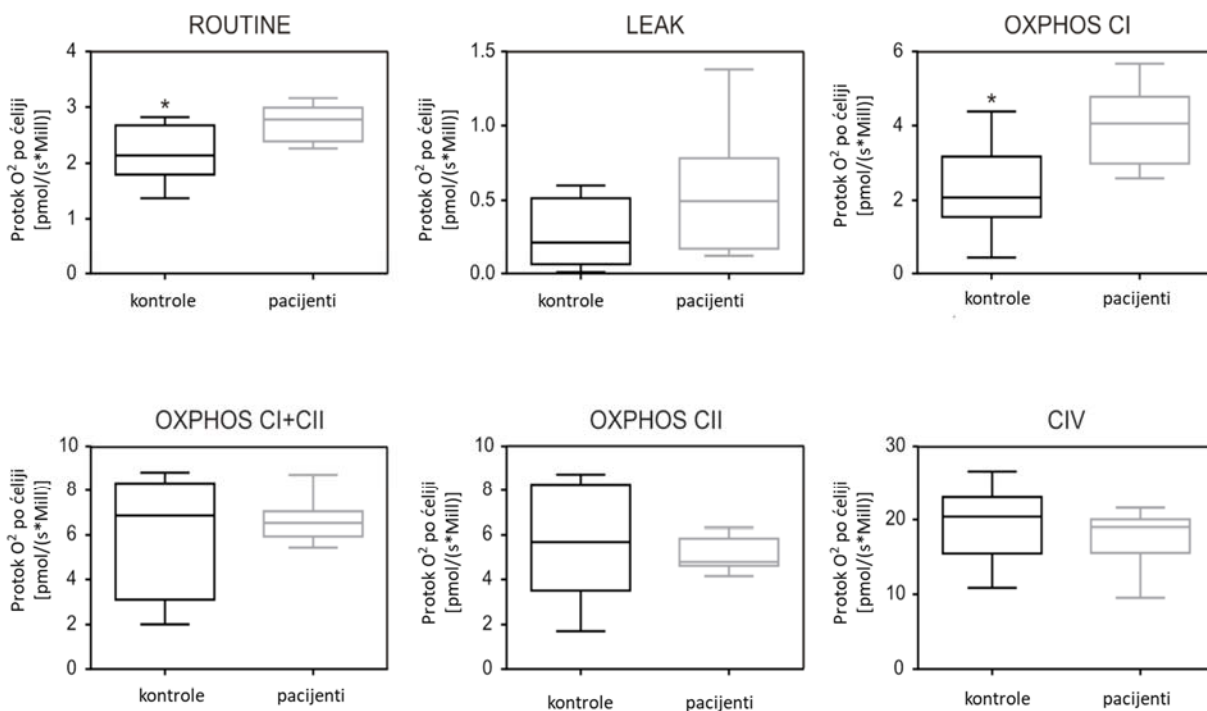


Grafikon 16. Kapacitet oksidativne fosforilacije na nivou kompleksa I je niži u MNĀPK LHON pacijenata u poređenju sa zdravim kontrolama. Kapacitet oksidativne fosforilacije na nivou kompleksa I - OXPPOS CI, koji predstavlja respiraciju u prisustvu supstrata kompleksa I i ADP-a, su prikazani kao aritmetička sredina \pm SD (* $p < 0.05$). ● - pacijenti sa promenama u mtDNK, ■ - kontrole



Grafikon 17. Uporedni reprezentativni prikaz respirometrije visoke rezolucije u MNĆPK izolovanim iz krvi pacijenta i kontrole. Dig - digitonin; P-piruvat, M – malat, G - glutamat; D - adenzin difosfat; S – sukcinat, Rot – rotenon, Ama - antimicin A.

Pored kapaciteta oksidativne fosforilacije na nivou kompleksa I, kvantifikovana je i mitohondrijska respiratorna funkcija u sledećim respiratornim stanjima: respiracija intaktnih ćelija, koja se bazira na oksidaciji endogenih supstrata (ROUTINE), respiracija koja nadomešćuje curenje protona (LEAK), kapacitet oksidativne fosforilacije na nivou kompleksa II (OXPHOS CII), kao i aditivni kapacitet oksidativne fosforilacije za komplekse I i II (OXPHOS CI+II) i funkcija kompleksa IV (IV). Međutim, uporedna analiza ovih respiratornih stanja, nije pokazala razliku između aktivnosti ostalih kompleksa u MNĆPK izolovanih iz krvi pacijenata sa LHON i kontrolnih uzoraka (Grafikon 18).

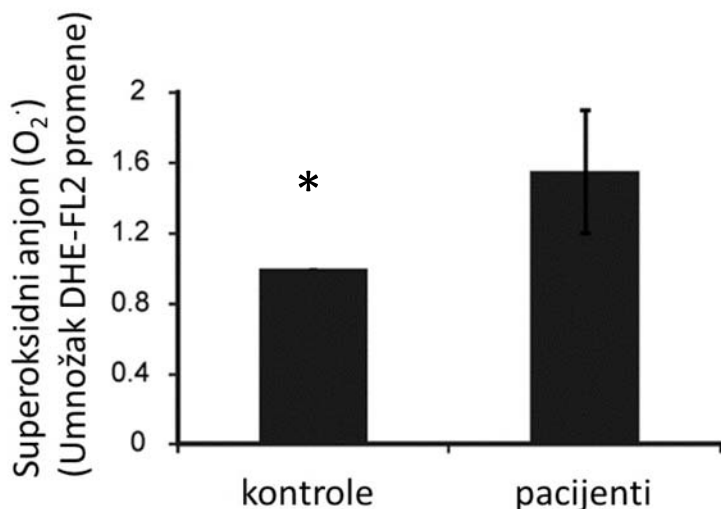


Grafikon 18. Mitohondrijalna respiracija u MNČPK izolovanih iz krvi pacijenata obolelih od LHON u poređenju sa zdravim kontrolama je snižena na nivou kompleksa I, ali ne i ostalih kompleksa lanca prenosilaca elektrona u mitohondrijama. Podaci respirometrije visoke rezolucije za stanja ROUTINE, LEAK, OXPHOS CI, OXPHOS CI+II, OXPHOS CII I CIV su prikazani kao $X \pm SD$, * $p < 0.05$.

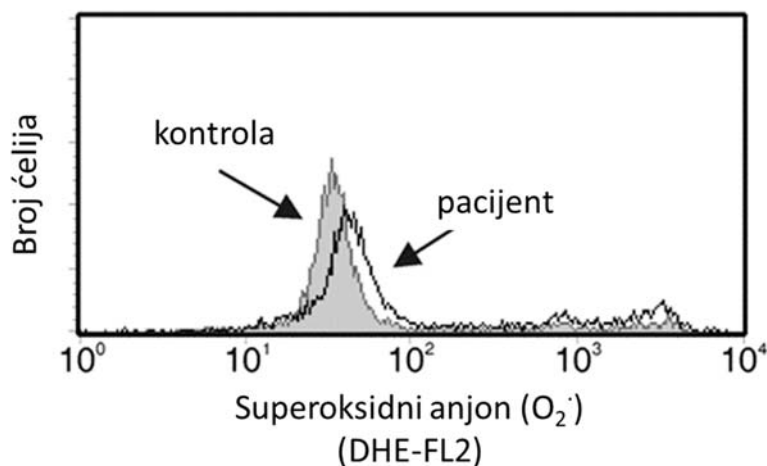
4.3.2 Ispitivanje produkcije superoksidnog anjona

Činjenica da je u MNČPK pokazana snižena respiratorna aktivnost na nivou kompleksa I lanca prenosilaca elektrona je ukazala na mogućnost da u mitohondrijama ovih ćelija može doći do tzv. "bega" elektrona i sledstvenog porasta produkcije superoksidnog anjona (O_2^-). Stoga je nivo produkcije superoksidnog anjona određen citofluorimetrijskom analizom MNČPK, nakon primene redoks-osetljivog fluorohroma dihidroetidijuma (DHE).

Utvrđeno je da u MNČPK izolovanim iz krvi LHON pacijenata postoji porast intenziteta DHE-zavisne fluorescence, što ukazuje na porast produkcije superoksidnog anjona u odnosu na kontrolu, kao što je predstavljeno na Grafikon 19 i Grafikon 20.



Grafikon 19. Produkcija superoksidnog anjona u MNČPK pacijenata sa LHON (n=7) i odgovarajućih kontrola (n=7). Čelije su obojene fluorohromom specifičnim za superoksid (DHE), a intenzitet crvene fluorescence (FL2) je izmeren protočnom citofluorimetrijom. Vrednosti dobijene za kontrole su svedene na jediničnu, u odnosu na koju je izražena vrednost dobijena kod LHON pacijenata. Rezultat je prikazan kao srednja vrednost kao $X \pm S.D.$ Uzorci su analizirani u duplikatu. (* $p < 0.05$)



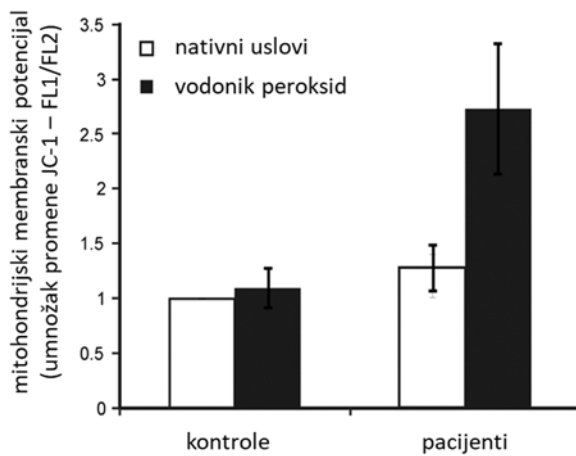
Grafikon 20. Reprezentativni histogram intenziteta crvene DHE fluorescence porekla superoksidnog anjona u MNČPK LHON pacijenta i odgovarajuće kontrole. Pomak u desno ukazuje na veći intenzitet fluorescence tj. intenzivniju produkciju superoksidnog anjona.

4.3.3 Ispitivanje polarizacije unutrašnje membrane mitohondrija kod LHON pacijenata

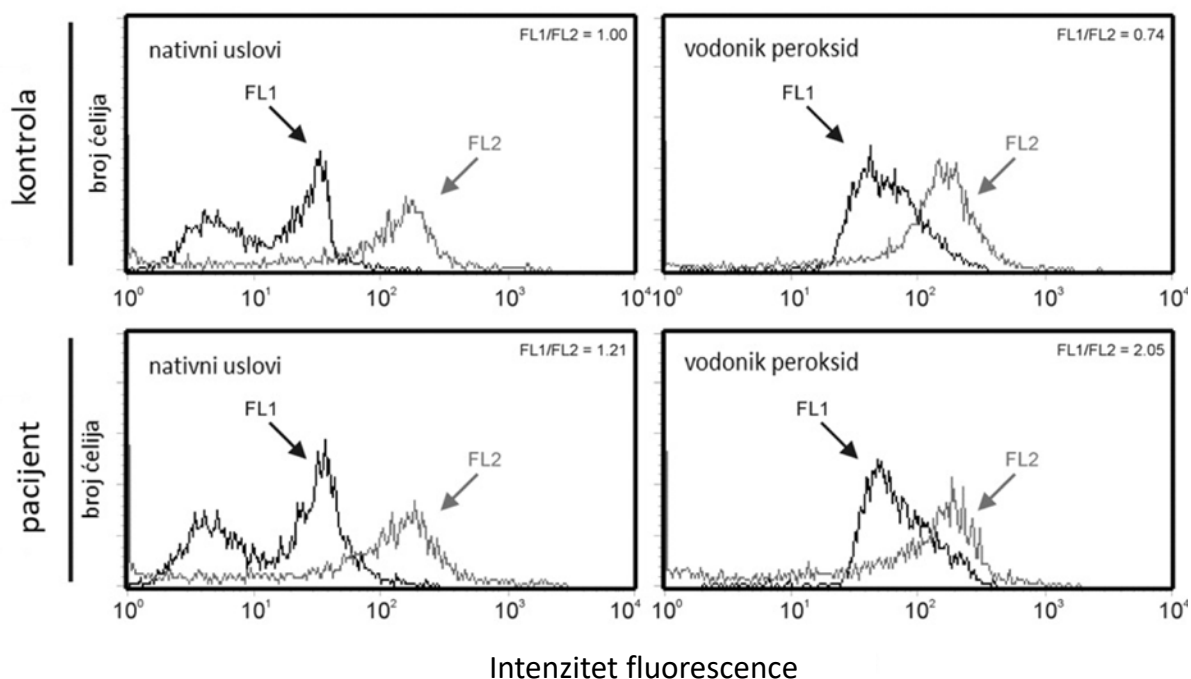
Kako su prethodne analize pokazale da u MNČPK pacijenata sa LHON postoji disfunkcija kompleksa I respiratornog lanca, kao i porast produkcije superoksidnog anjona, urađena je citofluorimetrijska analiza potencijala unutrašnje membrane mitohondrija, nakon primene katjonskog fluorohroma

JC-1. Pokazano je da u uzorcima MNČPK pacijenata sa LHON dolazi do blagog porasta odnosa intenziteta zelene (FL1) i crvene (FL2) fluorescence $FL1/FL2=1.27$, u odnosu na kontrolne uzorke u kojima je ovaj odnos sveden na jediničnu vrednost. Ovaj rezultat ukazuje na smanjenje potencijala unutrašnje membrane mitohondrija, odnosno određeni stepen depolarizacije.

U uslovima kada su MNČPK bile izložene delovanju prooksidansa H_2O_2 (u trajanju od 2 sata), uočen je trostruki porast odnosa intenziteta $FL1/FL2$ u ćelijama pacijenata u odnosu na kontrolne uzorke (Grafikon 21 i Grafikon 22).



Grafikon 21. Potencijal membrane mitohodrija u MNČPK LHON pacijenata ($n=6$) i odgovarajućih kontrola ($n=6$) u bazalnim uslovima i nakon izlaganja H_2O_2 (2h, $100 \mu M$). Ćelije su analizirane protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja fluorohromom JC-1. Potencijal membrane mitohondrija je određen kao $FL1/FL2$ odnos zelene (FL1) i crvene (FL2) fluorescence za svakog pacijenta u odnosu na njegovu kontrolu (za koju je odnos $FL1/FL2$ sveden na jediničnu vrednost). Rezultati su izraženi kao $X \pm SE$ za eksperimente urađene u duplikatu.



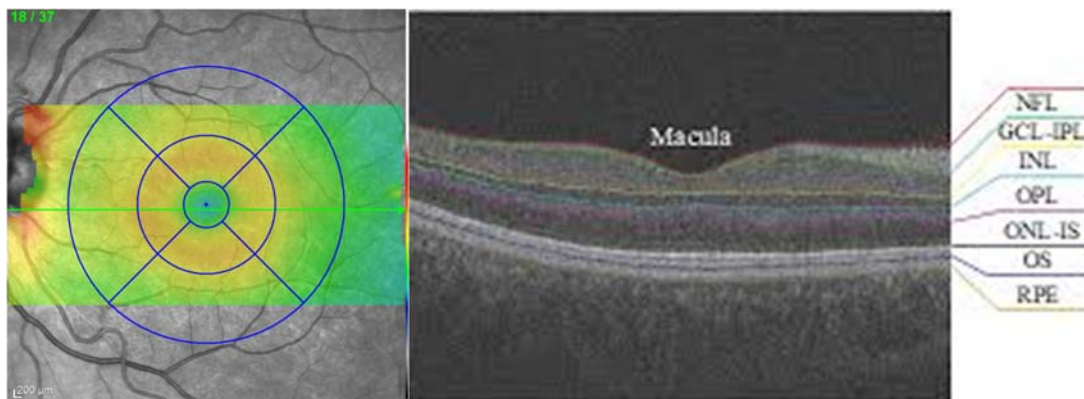
Grafikon 22. Reprezentativni histogrami analize JC-1 fluorescence u mitohondrijama MNČPK LHON pacijenta i odgovarajuće kontrole u bazalnim (nativnim) uslovima i nakon indukcije oksidativnog stresa vodonik peroksidom (2h, 100 μ M).

Dobijeni rezultati ukazuju da su MNČPK LHON pacijenata osetljivije na delovanje prooksidanasa u poređenju sa zdravim kontrolama. Mitohondrije kontrola su uspele da se izbore sa delovanjem prooksidansa peroksida, dok je isti uzrokovao depolarizaciju, skok FL1/FL2, mitohondrija LHON pacijenta.

Rezultati ispitivanja polarizacije unutrašnje membrane mitohondrija LHON pacijenata sa novootkrivenim promenama u mitohondrijskoj DNK, su ukazali da se njihove mitohondrije ponašaju identično kao i mitohondrije LHON pacijenata sa tipičnim mutacijama, što sugeriše smanjenu funkciju mitohondrija i, indirektno, na potencijalnu patogenost VUS.

4.4 **REZULTATI ANALIZE SEGMENTACIJE OPTIČKOM KOHERENTNOM TOMOGRAFIJOM**

Segmentaciona analiza slojeva retine u 8 ETDRS kvadrantata i u centru kod genetski potvrđenih LHON pacijenata i pacijenata sa LHON fenotipom (Slika 26), ali bez genetskog uzroka pada vidne oštine urađena je u svrhu identifikacije potencijalnih biomarkera LHON-a.



Slika 26. a) ETDRS polja overponirana preko funduskopskog nalaza (od centra: centralni krug, srednji prsten, spoljašnji prsten) b) slojevi makule koji su ispitivani u segmentacionoj analizi NFL-sloj retinalnih nervnih vlakana *eng. nerve fiber layer*; GCL-IPL sloj retinalnih ganglijskih ćelija-unutrašnji pleksiformni sloj *eng. ganglial cell layer-inner plexiform layer*; INL-unutrašnji nuklearni sloj *eng. inner nuclear layer*; OPL-spoljašnji pleksiformni sloj *eng. outer plexiform layer*; ONL-IS spoljašnji nuklearni sloj-unutrašnji segment fotoreceptora *eng. outer nuclear layer-inner segment*; OS-spoljašnji segment fotoreceptora *eng. outer segment*; RPE-retinalni pigmentni epitel *eng. retinal pigment epithelium*

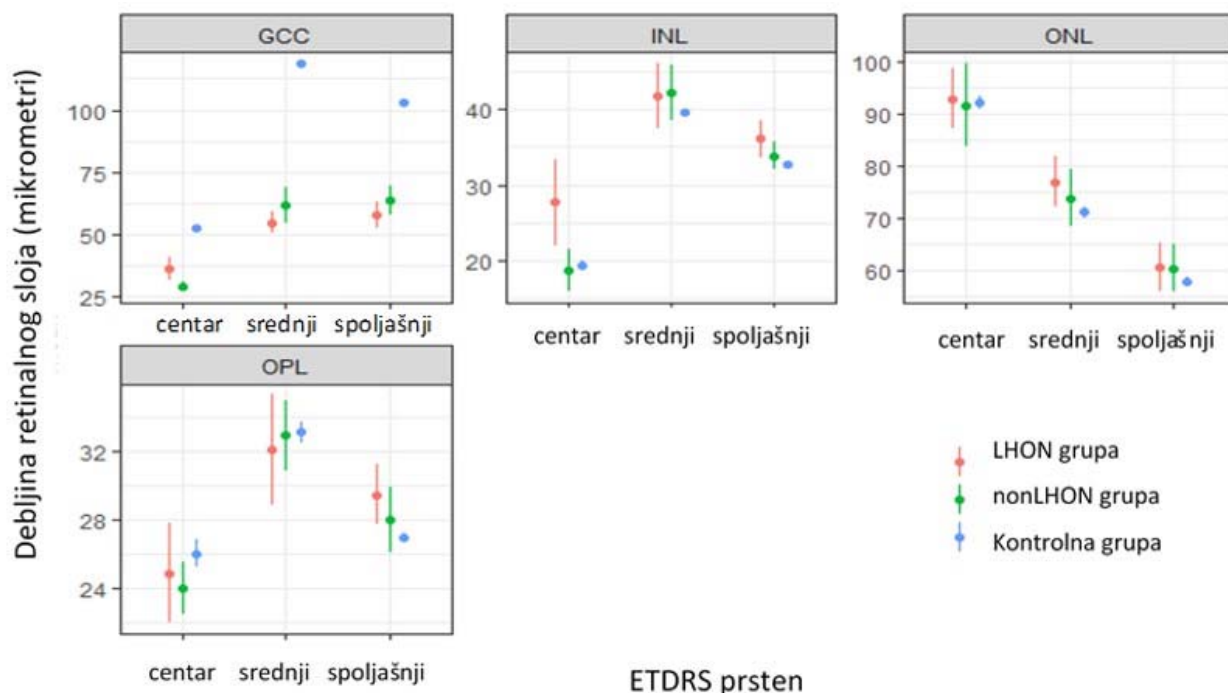
4.4.1 **Segmentaciona analiza debljine retinalnih slojeva optičkom koherentnom tomografijom**

Svrha segmentacione analize je bila da se uporedi debljina retinalnih slojeva u grupi pacijenata sa potvrđenom LHON mutacijom (LHON grupa) sa grupom pacijenata bez identifikovanog uzroka optičke atrofije (nonLHON) grupa, a u cilju utvrđivanja kliničkih biomarkera.

Segmentacionom analizom izmerena je debljina pojedinačnih slojeva retine kod 13 LHON pacijenata (24 uzorka oka) i 13 nonLHON pacijenata (23 oka). Četiri uzorka oka iz LHON i 3 uzorka oka iz nonLHON grupe nisu uključena u analizu zbog ambliopije i slabe mogućnosti fiksacije.

Debljina retine i razlike između kontrolne i LHON i kontrolne grupe i nonLHON su prikazane na Slici 48 dok su vrednosti predstavljene u Tabeli 4 Kompleks ganglijskih ćelija (RNFL, GCL, i IPL sloj) u LHON i nonLHON grupi su značajno tanji nego kod kontrola i u centru i u oba ETDRS prstena. INL je značajno deblji u centralnom krugu i spoljašnjem prstenu kod LHONa u poređenju sa kontrolama

(Tabela 1). Razlike u debljini spoljašnjih slojeva retine između LHON grupe i kontrola su bile značajne samo za spoljašnji prsten kod OPLa i srednji kod ONLa (Grafikon 23 i Tabela 4).



Grafikon 23. Prosečna debljina (i intervali poverenja 95 %) GCC kompleksa i različitih retinalnih slojeva u grupama pacijenata sa LHON, nonLHON i kontrolnoj grupi

Tabela 4. Poređenje prosečne razlike u debljini retine između kontrolne i LHON i nonLHON grupe korištenjem *Welch's t-testa* (*p-vrednosti*)

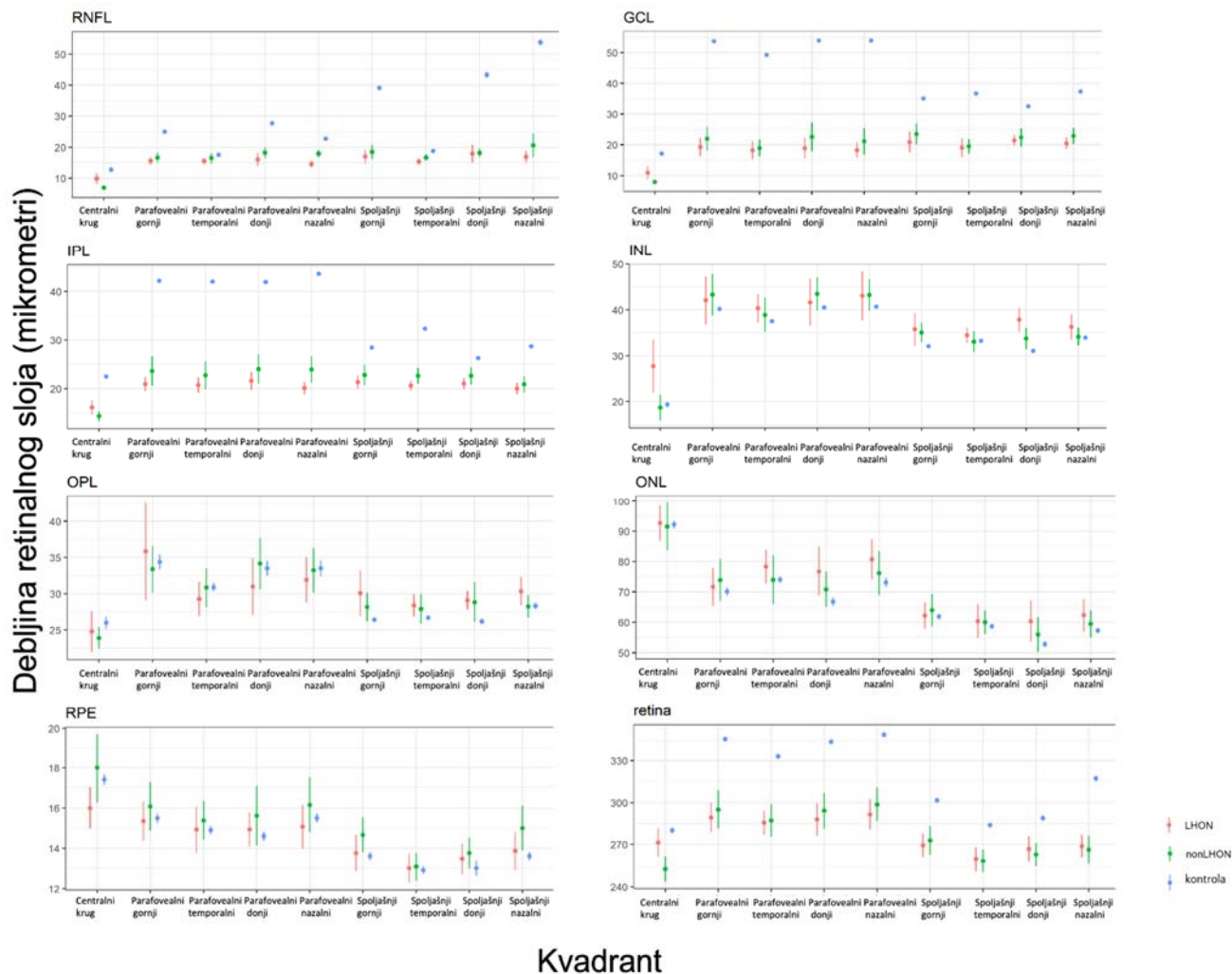
| | Kontrola vs LHON (korigovana p-vrednost) | | | Kontrola vs nonLHON (korigovana p-vrednost) | | |
|----------------|--|---------|------------|---|---------|------------|
| | ETDRS Prsten | | | ETDRS Prsten | | |
| Retinalni sloj | Centar | Srednji | Spoljašnji | Centar | Srednji | Spoljašnji |
| Retina | 0,101 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| GCC | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| INL | 0,234 | 1 | 0,275 | 1 | 1 | 1 |
| OPL | 1 | 1 | 0,245 | 0,454 | 0,846 | 0,257 |
| ONL | 1 | 0,5 | 1 | 1 | 1 | 1 |

4.4.1.1 Debljina retinalnih slojeva u svim ETDRS poljima

Dalje smo poredili debljinu svih retinalnih slojeva za svako ETDRS polje. Kao što je i očekivano debljina RNFL, GCL i IPL sloja je bila manja u obe grupe u poređenju sa kontrolama u svim ETDRS poljima (Grafikon 24).

RNFL je pokazao najveće istanjenje u nazalnom unutrašnjem i spoljašnjem ETDRS kvadrantu koja odgovara projekciji papilomakularnog snopa, dok je najmanje istanjenje u odnosu na kontrole primećeno temporalno. Istanjenje GCL je bilo podjednako u svim unutrašnjim i svim spoljašnjim ETDRS kvadrantima. Slično ujednačeno istanjenje je primećeno i za IPL za unutrašnje kvadrante, dok je kod spoljašnjih najmanje istanjenje primećeno u donjem kvadrantu. Sa druge strane INL je bio značajno deblji u obe grupe optičke atrofije u odnosu na kontrole u svim ETDRS prstenovima. OPL sloj je kod LHON pacijenata bio tanji u svim unutrašnjim ETDRS poljima sem u gornjem, a deblji u spoljašnjim ETDRS poljima dok je ONL bio deblji u svim ETDRS kvadrantima u obe grupe sa optičkom atrofiom nego kod kontrola naročito u donjem unutrašnjem i spoljašnjem kvadrantu. RPE je bio najdeblji u svim poljima u nonLHON grupi, dok su vrednosti kontrola i LHON pacijenata bile podjednake.

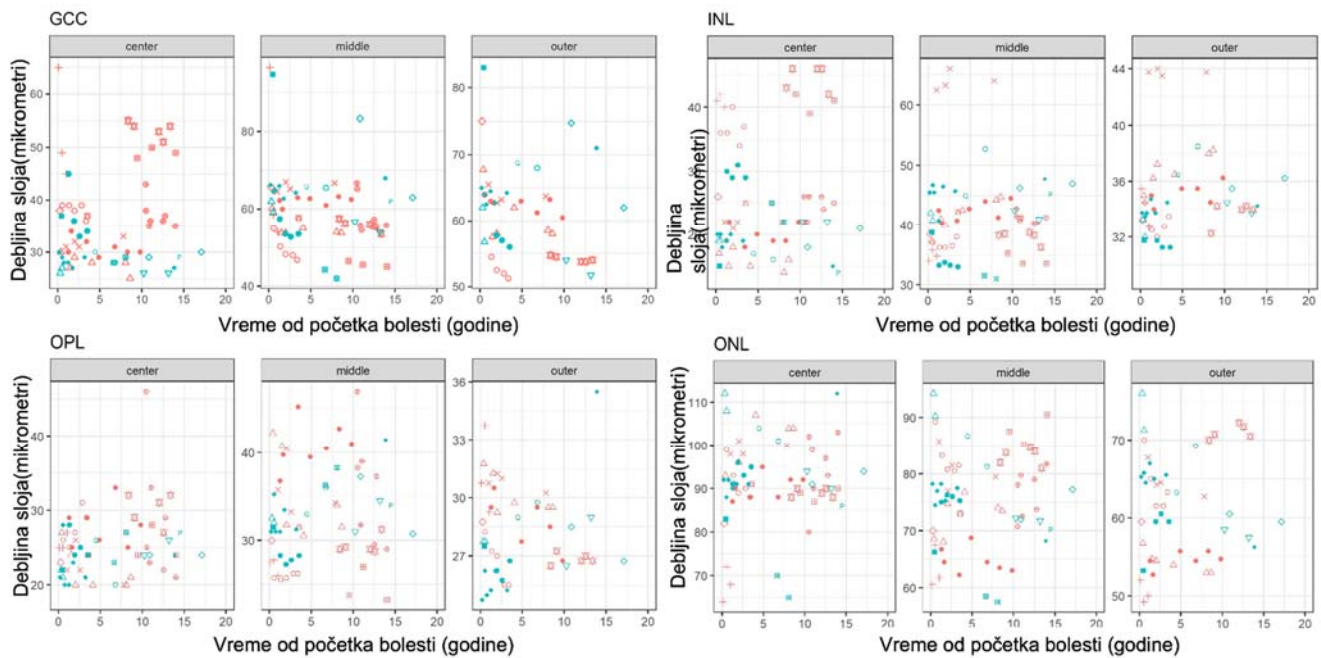
Celokupna debljina retine je u svim ETDRS kvadrantima bila veća kod kontrola nego obe grupe sa optičkom atrofiom. Najmanje istanjenje celokupne retine primećeno je u spoljašnjem donjem i spoljašnjem temporalnom kvadrantu.



Grafikon 24. Debljina svih slojeva retine u različitim kvadrantima ETDRS-a

4.4.1.2 Longitudinalna analiza

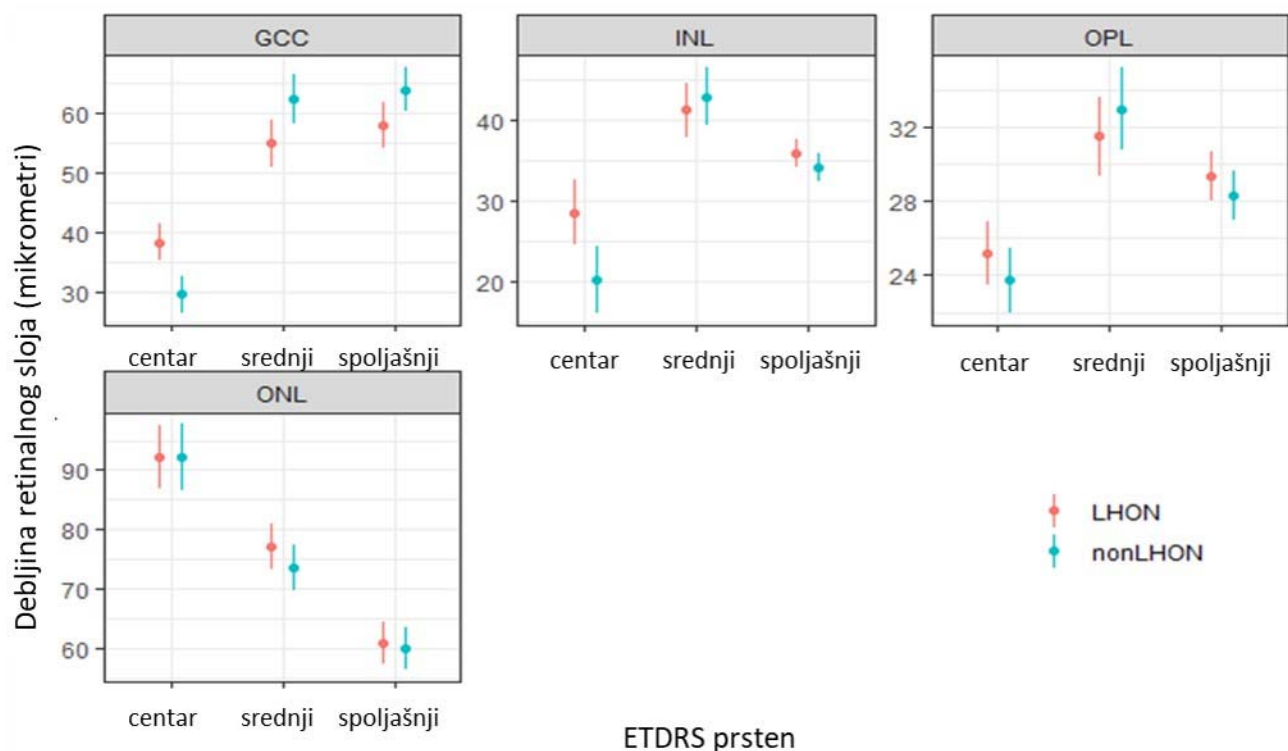
Longitudinalna analiza naše kohorte tokom perioda praćenja pokazala je zadebljanje GCC u LHON grupi u centralnom ETDRS krugu (Slika 50). Sličan trend nije primećen u nonLHON grupi gde je debljina ovih slojeva ostala ista ili se čak smanjila. Debljina ovih slojeva u srednjem i spoljašnjem ETDRS prstenu ostala je ista ili se smanjila tokom hronične faze u LHON grupi, dok je u nonLHON grupi sličan trend oporavka primećen u srednjem ETDR prstenu. Longitudinalana analiza ostalih slojeva makule je prikazana na Grafikon 25.



Grafikon 25. Longitudinalno praćenje promene debljine slojeva retine naših pacijenata kroz ceo period praćenja

4.4.1.3 Poređenje debljine slojeva retine između LHON i nonLHON grupe

Korišćenjem mešovitih modela, da bi analiza uključila oba oka, poredili smo debljinu retinalnih slojeva GCC, INL, OPL i ONL između LHON i nonLHON grupe za svaku kombinaciju retinalnih slojeva i prstenova. Rezultati su prikazani na Grafikon 26 i Tabela 5.

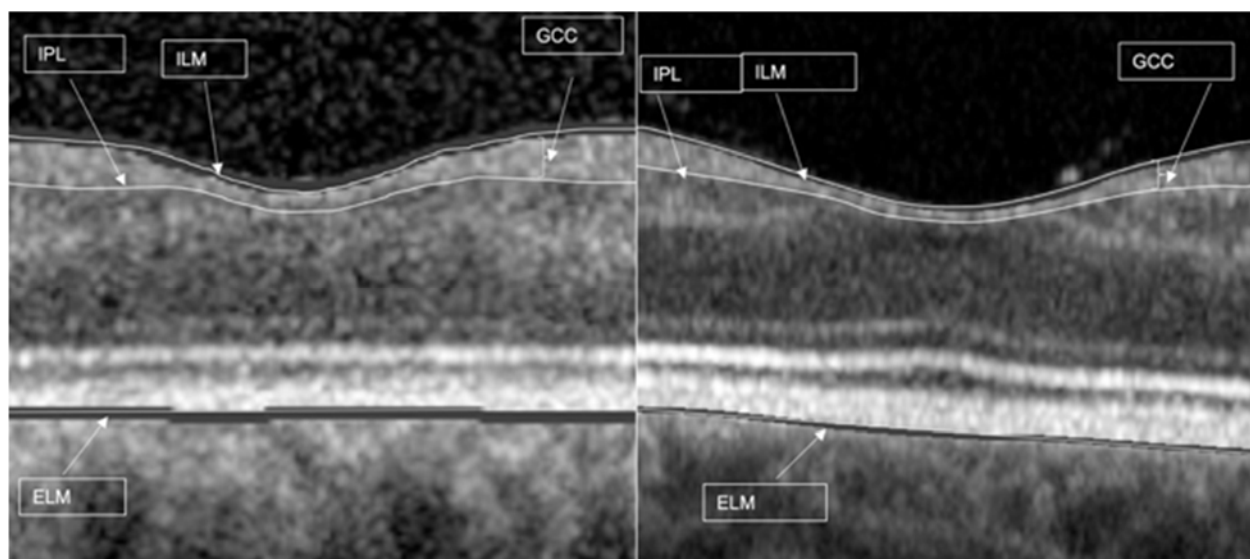


Grafikon 26. Vrednosti srednje debljine za različite retinalne slojeve za LHON i nonLHON grupu bazirana na kompletnom modelu koji uključuje ID pacijenta kao nasumični, a grupu dijagnoze kao fiksni faktor. (rezultati su prikazani kao srednja vrednost i 95% intervali poverenja)

Tabela 5. Debljina retinalnih slojeva u ETDRS centru

| Retinalni sloj | LHON | | | nonLHON | | |
|----------------|--------------|----------------------|-------------------------|--------------|----------------------|-------------------------|
| | ETDRS centar | ETDRS srednji prsten | ETDRS spoljašnji prsten | ETDRS centar | ETDRS srednji prsten | ETDRS spoljašnji prsten |
| GCC | 36,9 (3,1) | 54,9 (2,7) | 51,3 (2,7) | 29,1 (1,4) | 81,6 (4,3) | 63,3 (3,4) |
| INL | 27,7 (10) | 41,8 (7,3) | 36,1 (3,7) | 18,7 (4,6) | 42,2 (6) | 33,8 (2,7) |
| OPL | 24,8 (4,9) | 32 (5,6) | 29,4 (2,6) | 23,9 (2,5) | 32,9 (3,4) | 28 (2,9) |
| ONL | 92,7 (10,1) | 76,9 (8,4) | 60,5 (7) | 91,5 (13,1) | 73,7 (9) | 60,3 (6,6) |

Najveća razlika je u debljini slojeva između dve grupe pacijenata pronađena je u centralnom krugu gde je razlika bila statistički značajna za GCC i INL (Tabela 6).



Slika 27. Debljina GCC kod LHON pacijenta leva strana slike i nonLHON pacijenta koja pokazuje bolju očuvanost u ETDRS centru.

Ovi slojevi su bili deblji u LHON nego u nonLHON grupi (Grafikon 26 i Slika 27), ukazujući na bolju očuvanost ovih slojeva. Suprotno centralnom krugu gde je debljina GCC bila veća u LHON u poređenju sa nonLHON grupom, u srednjem i spoljašnjem prstenu je bila statistički značajno tanja kao što je prikazano u Tabela 6.

Tabela 6. Poređenje uklapanja osnovnog i punog modela korišćenjem testa odnosa verovatnoća između LHON i nonLHON grupe

| Retinalni sloj | Centar | | | Unutrašnji prsten | | | Spoljašnji prsten | | |
|----------------|----------------|-------|-----------------------|-------------------|-------|-----------------------|-------------------|-------|-----------------------|
| | X ² | p | Korigovana p-vrednost | X ² | p | Korigovana p-vrednost | X ² | p | Korigovana p-vrednost |
| GCC | 11,92 | 0,001 | 0,016 | 5,95 | 0,015 | 0,360 | 4,34 | 0,037 | 0,820 |
| INL | 7,3 | 0,007 | 0,200 | 0,45 | 0,503 | 1 | 1,82 | 0,177 | 1 |
| OPL | 1,4 | 0,237 | 1 | 0,86 | 0,354 | 1 | 1,12 | 0,289 | 1 |
| ONL | 0 | 0,988 | 1 | 1,64 | 0,201 | 1 | 0,1 | 0,754 | 1 |

4.4.1.4 Odnosi debljine sloja retine između centralnog kruga i srednjeg i spoljašnjeg ETDRS prstena

Rezultati koji su predstavljeni u **Tabela 7** pokazuju da je odnos između srednjeg prstena i centralnog kruga u debljinama RNFL, GCL, IPL i INL bio manji u LHON grupi u poređenju sa nonLHON grupom.

Odnos između spoljašnjeg prstena i centralnog kruga je takođe bio niži u LHON grupi (dodatna Tabela 6, Tabela 8) za RNFL, GCL, IPL i INL u poređenju sa nonLHON grupom. Za spoljašnje slojeve retine nije bilo razlike u odnosima između dve grupe.

Odnos između spoljašnjeg i srednjeg prstena bio je sličan između dve grupe (Tabela 7).

Tabela 7. Poređenje odnosa između različitih ETDRS prstenova LHON i nonLHON grupe korištenjem Welchovog t-testa

| Odnos ETDRS prstenova | Sloj | LHON srednja vrednost | Range | nonLHON srednja vrednost | Range | t-vrednost | p vrednost |
|-----------------------|--------|-----------------------|-----------|--------------------------|-----------|------------|--------------|
| srednjišnji/centar | retina | 1,07 | 0,92-1,24 | 1,16 | 1,00-1,27 | -2,68 | 0,014 |
| | GCC | 1,62 | 0,82-2,38 | 2,24 | 1,41-3,04 | -3,18 | 0,004 |
| | INL | 1,83 | 0,84-3,16 | 2,40 | 1,14-3,30 | -1,91 | 0,068 |
| | OPL | 1,35 | 0,91-1,85 | 1,39 | 1,10-1,80 | -0,36 | 0,725 |
| | ONL | 0,83 | 0,69-0,98 | 0,81 | 0,61-0,89 | 0,63 | 0,536 |
| spoljašnji/centar | retina | 0,99 | 0,85-1,07 | 1,05 | 0,97-1,13 | -2,01 | 0,065 |
| | GCC | 1,85 | 0,85-2,58 | 2,41 | 1,91-3,15 | -2,78 | 0,013 |
| | INL | 1,70 | 0,75-2,71 | 1,99 | 1,57-2,41 | -1,16 | 0,040 |
| | OPL | 1,20 | 0,83-1,54 | 1,20 | 0,93-1,49 | 0,01 | 0,582 |
| | ONL | 0,66 | 0,51-0,80 | 0,65 | 0,50-0,72 | 0,30 | 0,974 |
| spoljašnji/središnji | retina | 0,90 | 0,86-0,97 | 0,89 | 0,87-0,91 | 1,47 | 0,172 |
| | GCC | 1,05 | 0,92-1,25 | 1,01 | 0,81-1,18 | 0,24 | 0,810 |
| | INL | 0,83 | 0,68-0,88 | 0,78 | 0,72-0,82 | 2,28 | 0,040 |
| | OPL | 0,87 | 0,72-0,97 | 0,85 | 0,79-0,90 | 0,57 | 0,582 |
| | ONL | 0,80 | 0,74-0,85 | 0,80 | 0,73-0,85 | 0,03 | 0,974 |

4.4.2 Analiza karakteristika optičkog diska optičkom koherentnom tomografijom

4.4.2.1 Analiza debljine peripapilarnog RNFL (pRNFL)

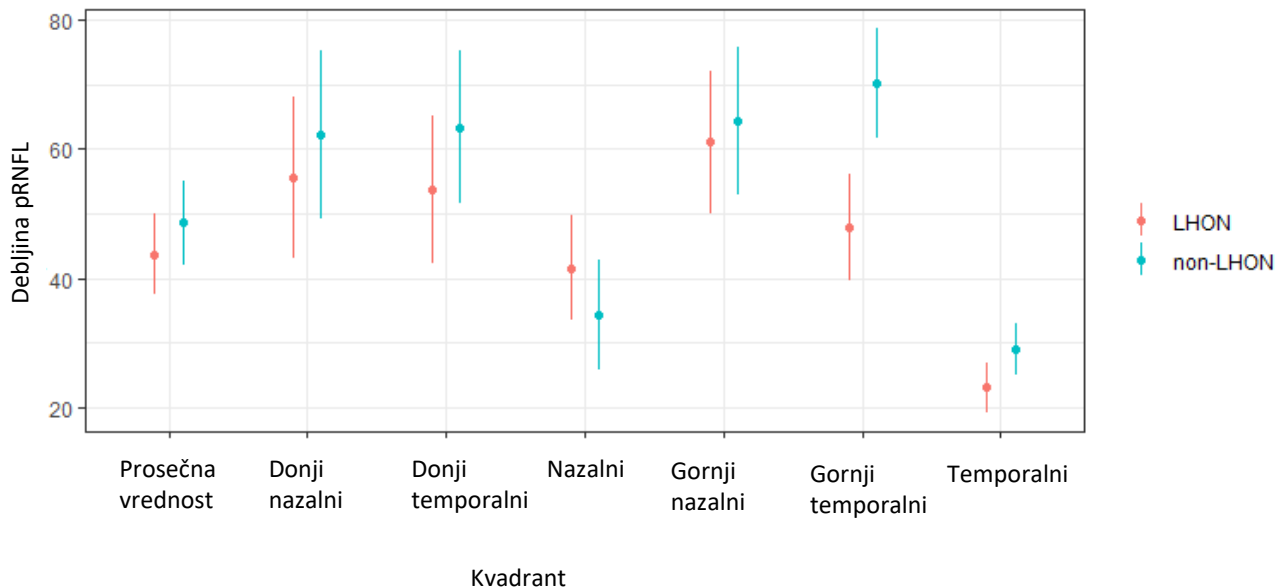
Debljina peripapilarnog RNFL u svim segmentima izmerena je i poređena između pacijenata sa potvrđenom LHON mutacijom (LHON grupa) i pacijenata bez identifikovanog uzroka optičke atrofije (nonLHON grupa).

Poređenje srednje debljine peripapilarnog RNFL između LHON i nonLHON grupe za svaki kvadrant urađeno je analizom mešanih modela. Rezultati su prikazani u Tabela 8 i na Slika 27.

Tabela 8. Poređenje uklapanja osnovnog i punog modela korišćenjem testa odnosa verovatnoće. Debljina peripapilarnog RNFL je bila statistički manja u temporalnom i gornjem temporalnom polju u LHON grupi u poređenju sa nonLHON grupom.

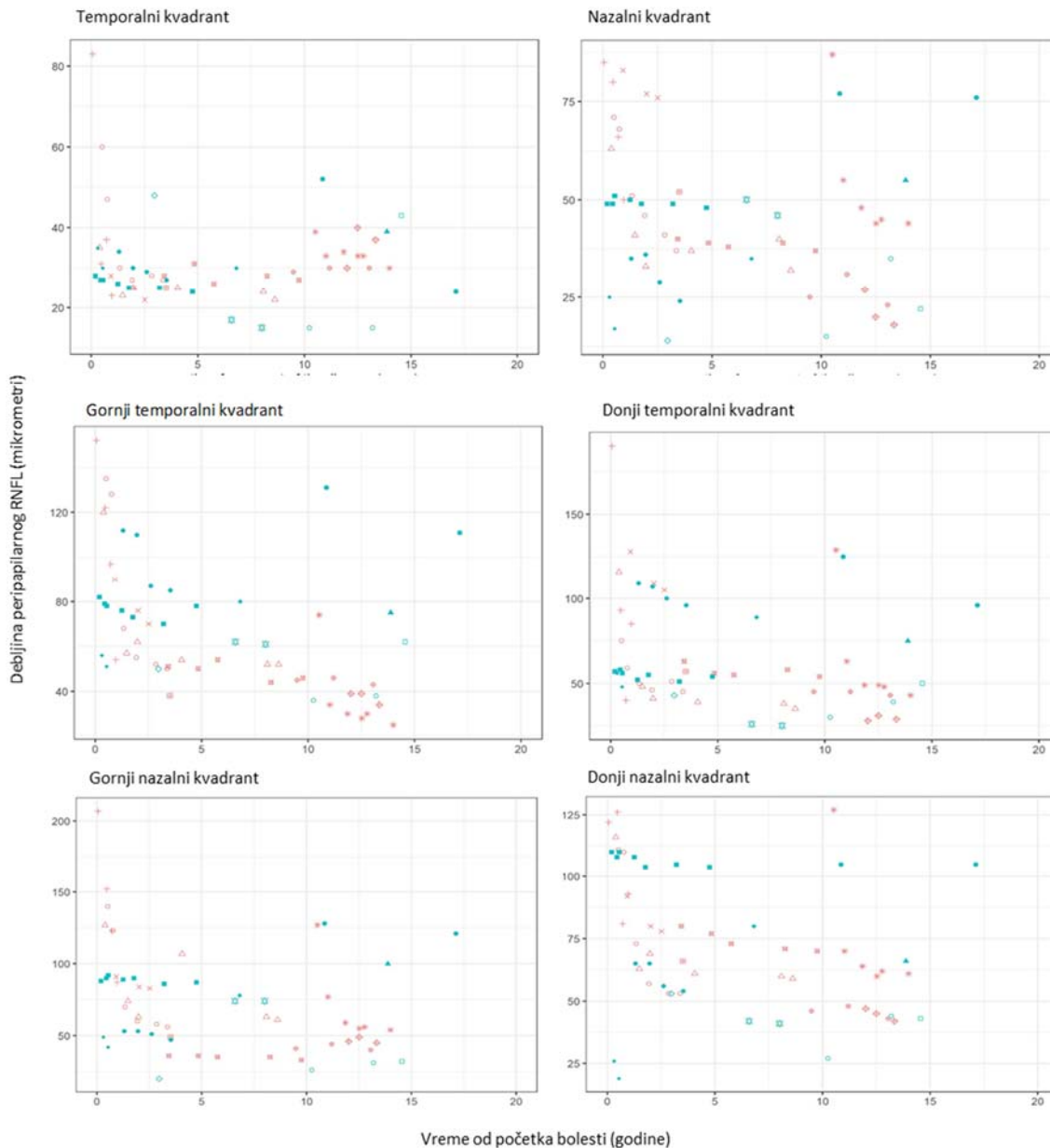
| Debljina peripapilarnog RNFL | χ^2 | df | p |
|-------------------------------|----------|----|-------|
| Prosek | 1,09 | 1 | 0,297 |
| Inferiorni nazalni segment | 0,53 | 1 | 0,468 |
| Inferiorni temporalni segment | 1,29 | 1 | 0,257 |
| Nazalni segment | 1,43 | 1 | 0,232 |
| Gornji nazalni segment | 0,16 | 1 | 0,687 |
| Gornji temporalni segment | 10,57 | 1 | 0,001 |
| Temporalni segment | 4,03 | 1 | 0,045 |

Peripapilarni RNFL je bio tanji u LHON grupi u poređenju sa nonLHON u skoro svim poljima, dok je razlika bila statistički značajna u temporalnom i gornjem temporalnom polju ($p=0,045$ i $p=0,001$). Sa druge strane srednja debljina nazalnog pRNFL je bila deblja kod LHON pacijenata, ali ta razlika nije bila statistički značajna.



Grafikon 27. Vrednosti prosečne debljine retine (i 95 % intervali poverenja) peripapilarnog RNFL u različitim segmentima bazirano na punom modelu koji uključuje ID pacijenta kao nasumični faktor i dijagnozu kao fiksni faktor

Longitudinalna analiza pRNFL od početka bolesti do poslednjeg pregleda je pokazala da u svim segmentima dolazi do konstantnog blagog istanjenja, sem u temporalnom kvadrantu gde dolazi do blagog zadebljanja koje počinje 10 godina posle početka bolesti (Grafikon 28.).

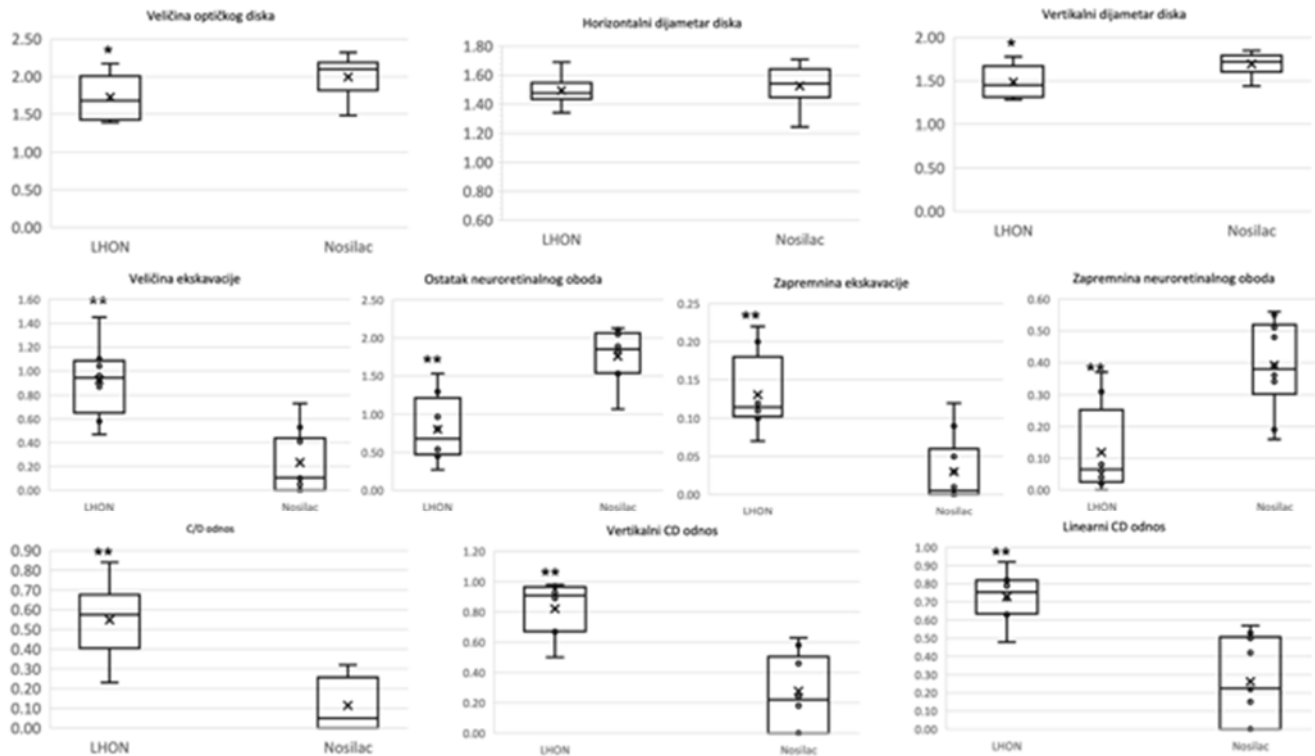


Grafikon 28. Longitudinalna analiza pRNFL promena u LHON i nonLHON grupi koje pokazuju zadebljanje u temporalnom kvadrantu 10 godina posle početka bolesti

4.4.2.2 Poređenje karakteristika optičkog diska LHON pacijenata i nebolelih nosilaca mutacije

Dodatno smo analizirali promene na optičkom nervu poređenjem karakteristika i izgleda optičkog nerva između nosilaca LHON mutacije koji nisu oboleli i LHON pacijenata (Grafikon 29.). Veličina

diska ($p=0,042$) i vertikalni dijametar ($p=0,007$) su bili veći kod neobolelih nosilaca, dok razlika u horizontalnom dijametru (iako prisutna) nije bila statistički značajna. C/D odnos, veličina i zapremina ekskavacije su bile statistički značajno veće ($p<0,001$) u grupi LHON pacijenata, dok su posledično ostatak i zapremina neuroretinalnog oboda bili visoko statistički značajno niži ($p<0,001$).



Grafikon 29. Karakteristike diska neobolelih nosilaca mtDNK mutacije u poređenju sa pacijentima koji su oboleli od LHON *statistiki značajno ($p<0,05$) **statistički visoko značajno ($p<0,001$)

Peripapilarni RNFL je kod nosilaca LHON mutacije bio deblji u svim segmentima. Procentualno je najveće zadebljanje bilo u nazalnom (27.63%) i donjem (22.37%) kvadrantu (Tabela 9).

Tabela 9. Debljina peripapilarnog RNFL kod pacijenata sa novoidentifikovanim prommenama u mtDNK (VUS) i procentualno zadebljanje u odnosu na kontrole

| Segment pRNFL | Temporalno | Nazalno | Gore | Dole |
|---------------|------------|---------|-------|-------|
| Kontrole | 77 | 72 | 119,5 | 126,5 |
| Nosioci | 78.2 | 91,9 | 140 | 154,8 |
| % zadebljanja | 1,56 | 27,63 | 17,15 | 22,37 |

4.4.2.3 Poređenje karakteristika optičkog diska LHON pacijenata i pacijenata sa mutacijama nepoznatog značaja

Poredili smo karakteristike optičkog diska i među pacijentima sa potvrđenim LHON i pacijentima sa promenama u mtDNK nepoznatog značaja. Statistički značajna razlika nije postojala niti u jednom parametru (Tabela 10).

Tabela 10. Karakteristike diska pacijenata sa VUS i potvrđenih LHON pacijenata

| | | Površina diska | Veličina ekskavacije | Ostatak oboda | C/D | Linearni CD odnos | Vertikalni CD odnos | Zapremnina ekskavacije | Zapremnina oboda | Horizontalni dijametar diska | Vertikalni dijametar diska |
|------------------|--------|----------------|----------------------|---------------|------|-------------------|---------------------|------------------------|------------------|------------------------------|----------------------------|
| Potvrđeni LHON | Prosek | 1,73 | 0,92 | 0,80 | 0,55 | 0,73 | 0,82 | 0,13 | 0,12 | 1,49 | 1,49 |
| | sd | 0,30 | 0,30 | 0,43 | 0,19 | 0,13 | 0,17 | 0,05 | 0,14 | 0,10 | 0,19 |
| Pacijenti sa VUS | Prosek | 1,82 | 0,82 | 1,00 | 0,46 | 0,60 | 0,66 | 0,13 | 0,19 | 1,51 | 1,59 |
| | sd | 0,29 | 0,55 | 0,64 | 0,29 | 0,34 | 0,36 | 0,19 | 0,24 | 0,17 | 0,13 |
| P vrednost | | 0,40 | 0,64 | 0,41 | 0,43 | 0,29 | 0,20 | 0,92 | 0,42 | 0,67 | 0,14 |

4.5 REZULTATI ODREĐIVANJA ELEKTROFIZIOLOŠKIH PARAMETARA

4.5.1 Rezultati analize fokalnog ERG (FERG), pattern ERG-a (PERG) i vizuelnih evociranih potencijala (VEP)

4.5.1.1 Poređenje elektrofizioloških karakteristika pacijenata sa LHON-om i pacijenata sa VUS u akutnoj i hroničnoj fazi bolesti

Kada smo poredili karakteristike pacijenata sa potvrđenom LHON mutacijom i pacijenata nosioca VUS utvrdili smo da postoji statistički značajna razlika u vrednostima svih elektrofizioloških parametara (Tabela 11). Po našem mišljenju razlika potiče od činjenice da je vreme od početka bolesti do snimanja bilo duže u LHON grupi (3.3 meseca) u odnosu na pacijente sa VUS (1.68 meseci).

Tabela 11. Razlika u elektrofiziološkim karakteristikama potvrđenih LHON pacijenata na početku bolesti (do 6 meseci)

| | | N95/P50 | LatP50 ms | AmpP50 μV | LatN95 ms | AmpN95 μV | LatP100 ms | AmpP100 μV | LatFERG Talas a ms | AmpFERG Talas a μV | LatFERG Talas b ms | AmpFERG talas b μV |
|-------------------|--------|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Potvrđeni LHON | Prosek | 1,05 | 45,38 | 4,19 | 101,75 | 4,30 | 129,33 | 1,13 | 15,38 | 43,09 | 38,88 | 135,90 |
| | SD | 0,23 | 3,25 | 0,88 | 7,52 | 1,00 | 17,53 | 0,89 | 3,25 | 14,61 | 3,14 | 33,01 |
| VUS | Prosek | 1,08 | 48,00 | 5,15 | 105,00 | 5,60 | 130,75 | 5,925 | 13,25 | 37,18 | 38,75 | 114,32 |
| | SD | 0,20 | 1,83 | 0,81 | 14,94 | 1,56 | 10,87 | 1,56 | 1,71 | 9,83 | 1,89 | 47,05 |
| | P | 0,83 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,003 | 0,65 | <0,001 | 0,002 |

U hroničnoj fazi ova razlika nije postojala. Nedetektabilan VEP je bio registrovan kod polovine (3/6) naših pacijenata sa VUS.

Tabela 12. Razlika u elektrofiziološkim karakteristikama potvrđenih LHON pacijenata u hroničnoj fazi bolesti (više od 12 meseci)

| | | N95/P50 | LatP50 ms | AmpP50 μV | LatN95 ms | AmpN95 μV | LatP100 ms | AmpP100 μV | LatFERG Talas a ms | AmpFERG Talas a μV | LatFERG Talas b ms | AmpFERG talas b μV |
|-------------------|--------|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| Potvrđeni LHON | Prosek | 1,00 | 48,38 | 4,39 | 100,00 | 4,31 | 124,00 | 2,41 | 18,00 | 42,81 | 41,50 | 133,76 |
| | SD | 0,12 | 3,85 | 0,92 | 8,52 | 0,64 | 14,28 | 2,61 | 1,07 | 17,40 | 2,73 | 32,57 |
| VUS | Prosek | 1,19 | 45,40 | 3,76 | 97,80 | 3,92 | 96,00 | 3,54 | 18,20 | 31,92 | 41,80 | 109,22 |
| | SD | 0,47 | 2,30 | 1,95 | 8,04 | 1,51 | 4,24 | 6,90 | 1,30 | 7,22 | 0,84 | 25,40 |
| | P | 0,29 | 0,23 | 0,50 | 0,38 | 0,64 | 0,17 | 0,72 | 0,93 | 0,52 | 0,90 | 0,43 |

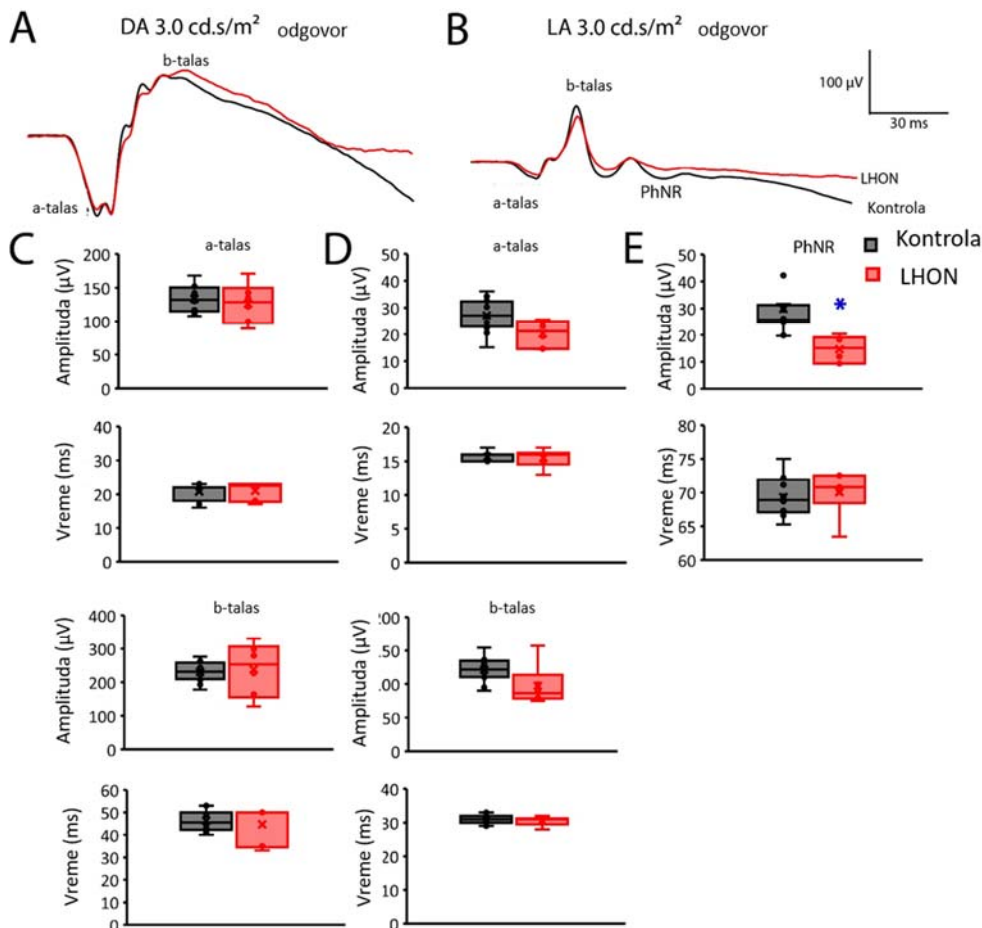
4.5.2 Elektretinogram celog polja (engl.full-field ERG)

4.5.2.1 Očuvanje ranih ERG komponenti i poremećaj PhNR

Analiza ERG-a celog polja (full-field ERG-a) je urađena kod 7 mladih pacijenata starosti 20 do 34 godine (prosečna starost = $28,4 \pm 5,6$; 5 muškaraca). Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima 12 zdravih dobrovoljaca (prosečna starost = $35,0 \pm 12,1$; 2 muškarca).

Fotopički i skotopični a-talasi i b-talasi bili su uporedivi između kontrolne grupe i LHON pacijenata (Grafikon 30). Nasuprot tome, PhNR je bio smanjen kod pacijenata sa LHON-om.

Kao što je prikazano na Grafikon 30C, amplitude skotopičnog 3 ERG a-talasa ($F_{(1,18)} = 0,736$; $p = 0,403$) i b-talasa ($F_{(1,18)} = 0,116$; $p = 0,738$) bile su slične između LHON pacijenti i kontrole, bez statistički značajnih razlika. Pored toga, latence su bile uporedive (a-talasi: $F_{(1,18)} = 0,193$; $p = 0,666$ i b-talasi: $F_{(1,18)} = 0,157$; $p = 0,697$). Grafikon 30D pokazuje da su i amplitude a-talasa i b-talasa fotopičnog 3 odgovora u proseku niže kod pacijenata sa LHON sa marginalnim (bez statističkog značaja) razlikama (a-talasi: $F_{(1,18)} = 3,864$; $p = 0,067$ i b-talasi: $F_{(1,18)} = 4,290$; $p = 0,054$) i latence (a-talasi: $F_{(1,18)} = 0,047$; $p = 0,830$ i b-talasi: $F_{(1,18)} = 0,585$; $p = 0,455$) bili su statistički slični za rane komponente (a- i b-talasi) fotopičnog odgovora (odgovor čepića). Nasuprot tome, PhNR (Grafikon 30E) je značajno smanjen ($F_{(1,18)} = 8,870$; $p = 0,009$) kod pacijenata sa LHON, dok su PhNR latence bile uporedive između grupa ($F_{(1,18)} = 0,307$; $p = 0,587$).



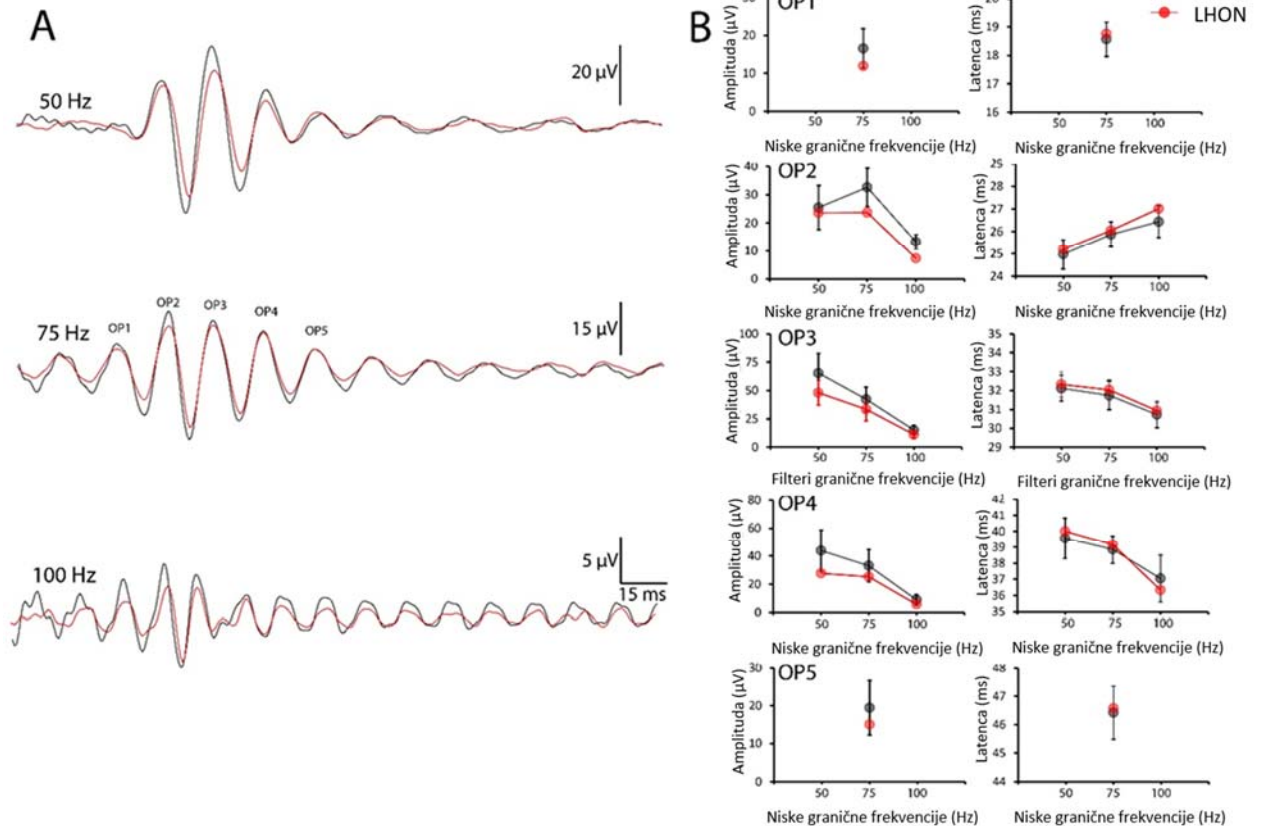
Grafikon 30. Komponente niskih frekvencija. Prosečni tragovi (A i B) i prosečna vrednost/medijana (box = IQR; whisker = minimalna i maksimalna vrednost) amplitude (gornji grafikoni) i implicitna vremena (donji grafikoni) kontrola (crno) i LHON pacijenata (crveno) za skotopični (DA) 3 ERG (A i C) i LA 3 ERG (B, D, i E). *signifikantna razlika ($p < 0,05$).

4.5.2.2 Oscilatorni potencijali

4.5.2.2.1 Smanjeni skotopični OP

Pet OP (OP1 – OP5) skotopičnih 3 ERG analizirano je u vremenskom domenu detekcijom najvišeg/najnižeg nivoa nakon primene propusnih filtera na graničnim frekvencijama od 50-300, 75-300 i 100-300 Hz. Grafikon 31A prikazuje prosečne snimke LHON pacijenata (prikazani crvenom linijom) u poređenju sa kontrolama (prikazani crnom linijom). OP amplitude i latence su nacrtane kao funkcija niskih graničnih frekvencija za sve analizirane OP. Pri graničnoj frekvenciji od 75 Hz svih pet OP jasno može detektovati, dok su na niskim graničnim frekvencijama 50 i 100 Hz OP1 i OP5 niži, a pored toga OP1 veoma zavisi od osnovne linije (Grafikon 31). Zbog toga su OP1 i OP5 upoređivani samo na niskoj graničnoj frekvenciji od 75 Hz. OP amplitude su se smanjivale kako se niska granična frekvencija povećavala, osim za OP2 jer je na graničnoj frekvenciji od 50 Hz to u osnovi prva oscilacija koja se može detektovati. Pored toga, OP latence su se povećala (OP2) i smanjile (OP3 i OP4) sa povećanjem niske granične frekvencije.

DA 3.0 cd.s/m² oscilatorni potencijali



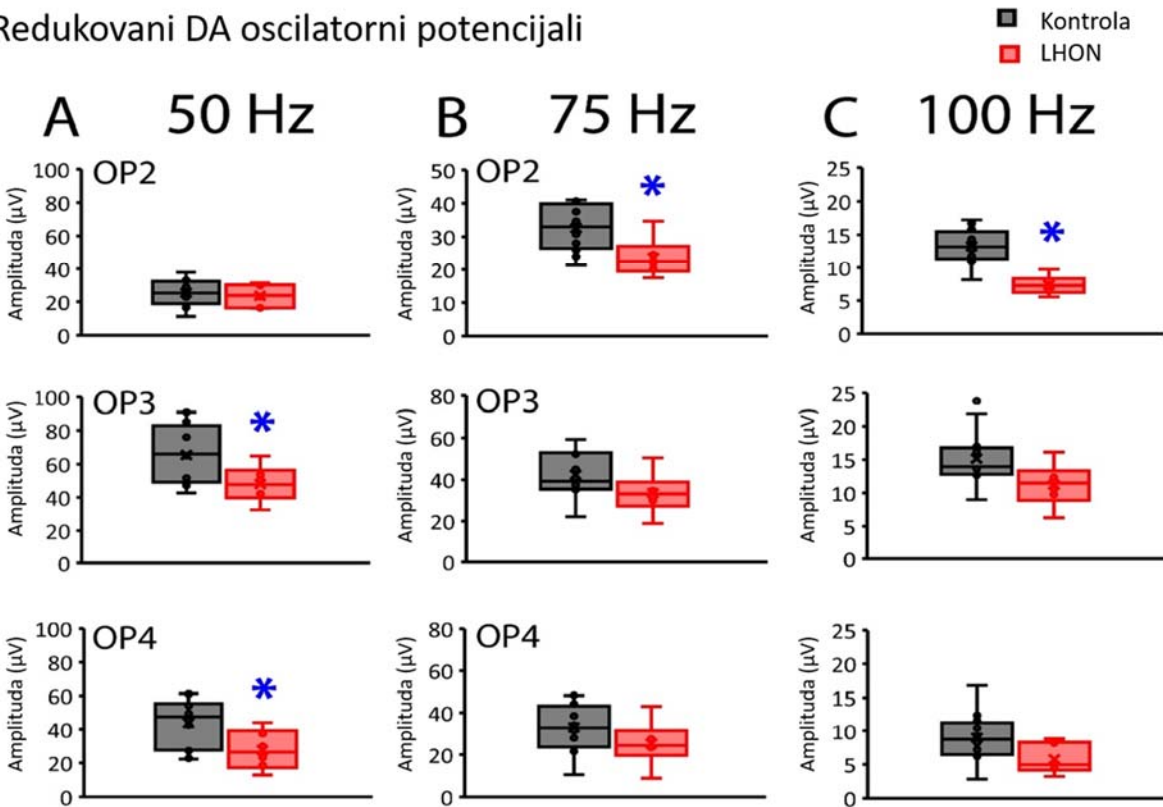
Grafikon 31. Oscilatorni potencijali skotopičnog ERG A) prosečni snimci LHON pacijenata (prikazani crvenom linijom) u poređenju sa kontrolama (prikazani crnom linijom). (B). Prikaz oscilatornih potencijala (OP1-OP5) filtriranih na različitim graničnim frekvencijama (50-100Hz)

Analiza varijanse je pokazala da su na niskim graničnim frekvencijama 50 Hz (Grafikon 32A), amplitude OP redukovane kod pacijenata sa LHONom u poređenju sa kontrolama. Prosečna amplituda OP4 je bila značajno snižena ($F_{(1,18)} = 5,164$, $p = 0,036$) dok su rani OP bili poredivi (OP2: $F_{(1,18)} = 0,085$, $p = 0,774$ i OP3: $F_{(1,18)} = 3,932$, $p = 0,064$). Latence su bile poredive i između kontrola i LHON pacijenata (OP2: $F_{(1,18)} = 0,400$, $p = 0,536$; OP3: $F_{(1,18)} = 0,668$, $p = 0,425$; OP4: $F_{(1,18)} = 1,131$, $p = 0,303$).

Za oscilatorne potencijale koji potiču od filtera granične frekvence 75 Hz (Grafikon 32B), kao što je preporučeno ISCEV standardima (142), pronađena je značajna redukcija amplitude OP2 ($F_{(1,18)} = 6,715$, $p = 0,019$) kod LHON pacijenata (Grafikon 32C) u poređenju sa kontrolama. Druge OP amplitude su bile uporedive među grupama (OP1: $F_{(1,18)} = 4,239$, $p = 0,055$; OP3: $F_{(1,18)} = 3,396$, $p = 0,083$; OP4: $F_{(1,18)} = 2,320$, $p = 0,146$; OP5: $F_{(1,18)} = 1,818$, $p = 0,195$) kao i OP latence ($F_{(1,18)} < 0,7$, $p > 0,4$).

Konačno, redukcijom nisko-frekventnih komponenti na graničnoj frekvenciji od 100 Hz (Grafikon 32), redukovana amplituda OP2 je takođe primećena kod LHON pacijenata ($F_{(1,18)} = 28,687$, $p < 0,001$). Kasniji OP su pokazali marginalnu (bez statističkog značaja) razliku između LHON pacijenata i kontrola (OP3: $F_{(1,18)} = 3,378$, $p = 0,084$ i OP4: $F_{(1,18)} = 3,401$, $p = 0,083$). Latence su kao i kod prethodnih graničnih frekvencija bile poredive među grupama ($F_{(1,18)} < 3,1$, $p > 0,1$).

Redukovani DA oscilatorni potencijali



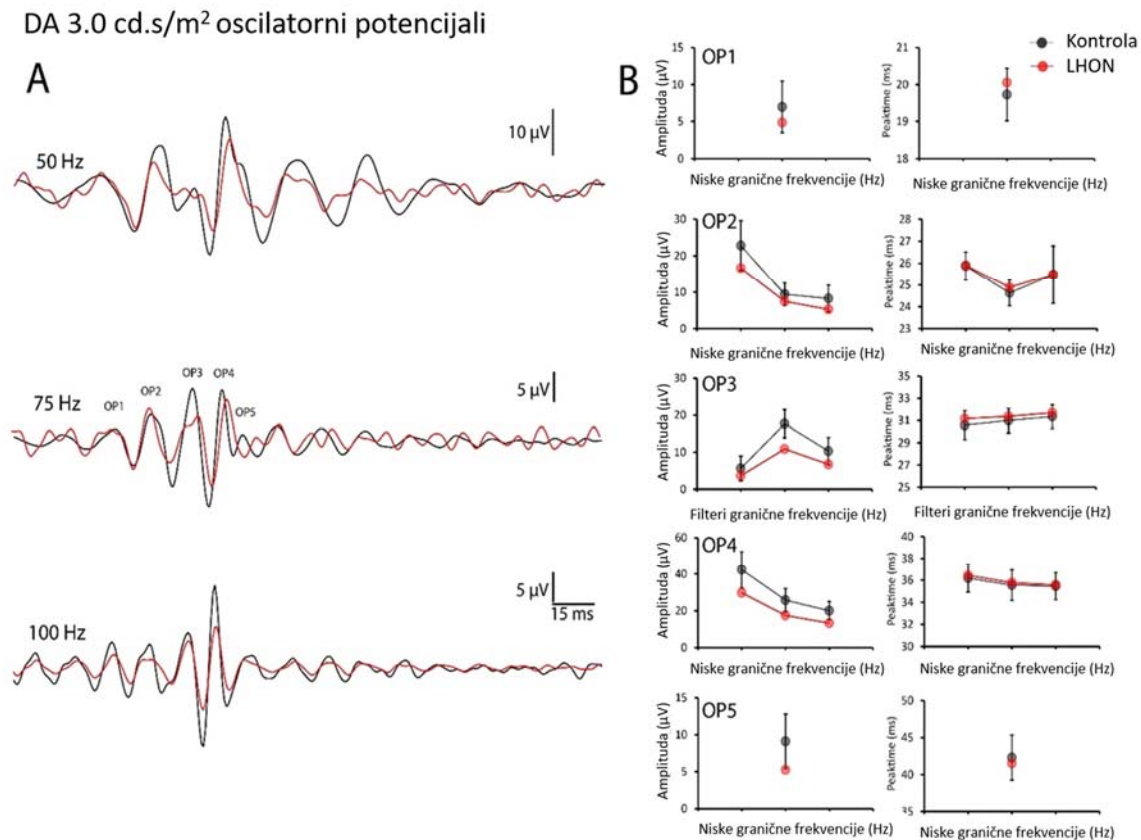
Grafikon 32. Poremećene komponente skotopičnog 3 ERG

4.5.2.2.2 Poremećaj kasnih fotopičnih OP kod LHON pacijenata

Kao i kod skotopičnog 3 ERG, pet OP (OP1 – OP5) fotopičnog (LA) 3 ERG su analizirani u vremenskom domenu sa detekcijom razlike između najviše (vrh) i najniže (udubljenje) tačke talasa nakon aplikacije filtera na 50-300, 75-300, i 100-300 Hz opsega graničnih frekvencija. OP1 i OP5 su analizirani samo na 75-300 opsegu frekvencija.

Talasnici filtriranih OP signala ekstrahovani iz originalnog LA 3 ERG prikazani su na Grafikon 33A, ali za razliku od DA 3 ERG, pojedinačni reprezentativni OP LA 3 ERG su prikazani za kontrole (crni tragovi) i LHON pacijente (crveni tragovi). Za LA OP korišćeni su pojedinačni signali, jer su jasnije predstavljali razlike u OP profilima od prosečnih tragova. Razlog je bio taj što bi velike varijacije u vršnim vremenima značajno umanjile OP pikove ako bi se grupisali pojedinačni odgovori.

OP amplitude i vršna vremena su nacrtani kao funkcija niskih graničnih frekvencija za sve analizirane OP (Grafikon 33B). Pri graničnoj frekvenciji od 75 Hz svih pet OP jasno može detektovati, dok na niskoj graničnoj frekvencije 50 i 100, OP1 i OP5 nisu jasni i pored toga OP1 veoma zavisi od osnovne linije. Zbog toga su OP1 i OP5 upoređeni samo na niskoj graničnoj frekvenciji od 75 Hz. Amplitude OP su se smanjivale kako se niska granična frekvencija povećavala, osim za OP3. Vršna vremena su bila relativno konstantna na tri granične frekvencije. LHON pacijenti (crveni simboli) pokazali su smanjene amplitude očiglednije za kasne OP.



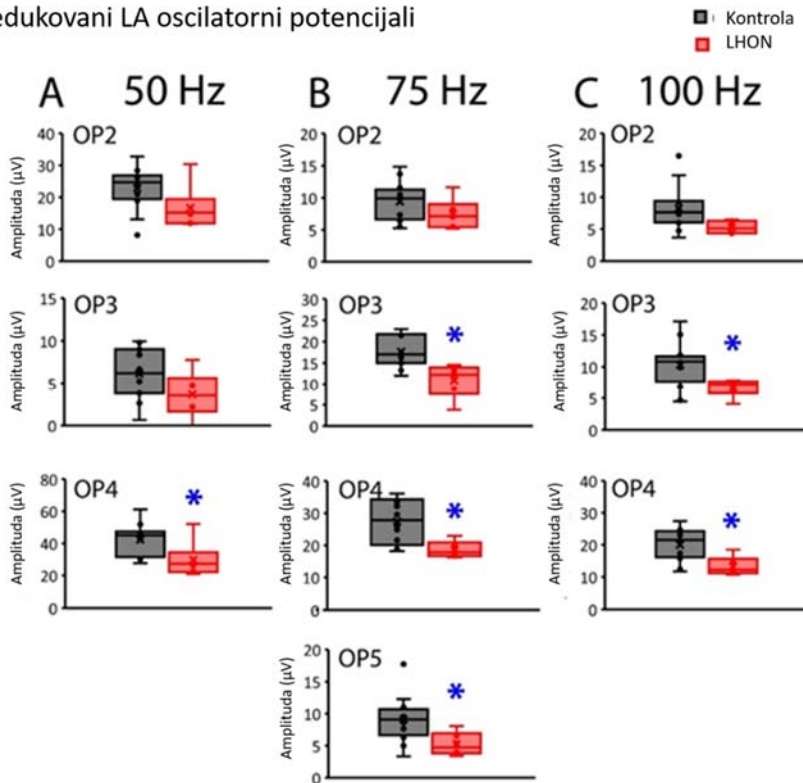
Grafikon 33. Oscilatorni potencijali fotopičnog 3 ERG-a: a) Talasni oblici filtriranih OP signala ekstrahovani iz originalnog LA 3 ERG za kontrole (crni tragovi) i LHON pacijente (crveni tragovi) b) Prikaz oscilatornih potencijala (OP1-OP5) filtriranih na različitim graničnim frekvencijama (50-100Hz)

Analiza varijanse fotopičnih OP je pokazala efekat grupisanja na svim graničnim frekvencijama (Grafikon 34). Na graničnoj frekvenci 50 Hz samo OP4 amplitude su bile značajno smanjene kod LHON pacijenata ($F(1,18) = 5,463$, $p = 0,032$) dok su rane OP amplitude i latence bile uporedive ($F(1,18) < 5,463$, $p > 0,109$). Podizanjem vrednosti graničnih frekvencija na 75 Hz, značajan fenomen grupisanja je primećen za OP3 ($F(1,18) = 12,073$, $p = 0,003$), OP4 ($F(1,18) = 9,616$, $p =$

0,006), and OP5 ($F(1,18) = 6,614, p = 0,020$), pokazujući značajno smanjene amplitude OP sa normalnim latencama ($F(1,18) < 2,43, p > 0,138$) kod LHON pacijenata u poređenju sa kontrolama.

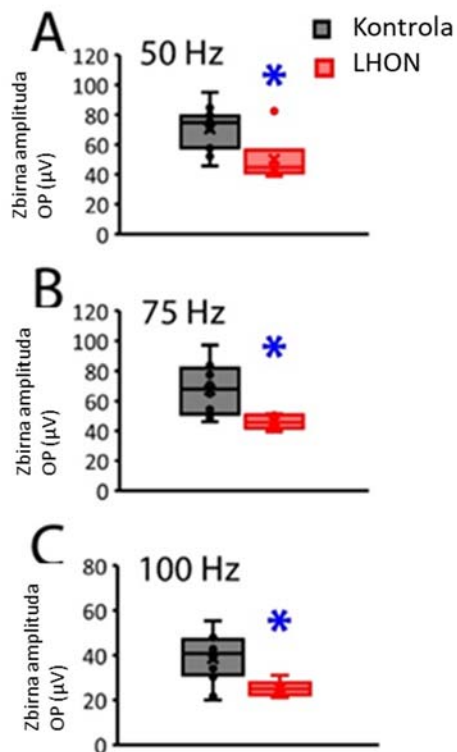
Na graničnoj frekvenciji 100, OP2 ($F(1,18) = 4,578, p = 0,047$), OP3 ($F(1,18) = 5,000, p = 0,039$), i OP4 ($F(1,18) = 7,798, p = 0,013$) su bili značajno sniženi kod LHON pacijenata u poređenju sa kontrolama dok su latence OP bile približno jednake ikod LHON pacijenata i kontrola ($F(1,18) < 0,245, p > 0,627$).

Redukovani LA oscilatorni potencijali



Grafikon 34. Poremećene komponente oscilatornih potencijala fotopičnog 3 ERG kod pacijenata s LHON.

Zbirna amplituda LA OP



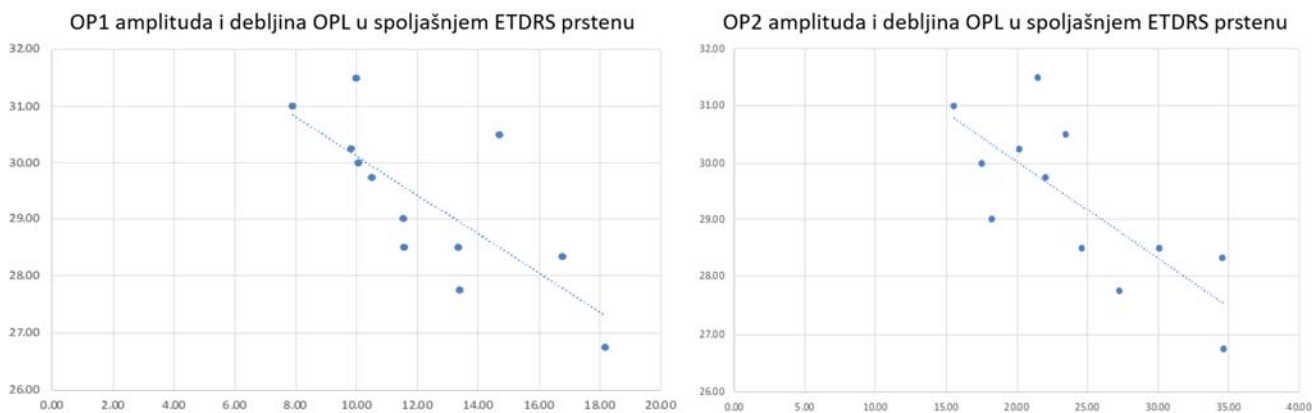
Dodatno, sumirane amplitude oscilatornih potencijala su izračunate sa 75 Hz graničnom frekvencijom (OP1+OP2+OP3+OP4+OP5) i na 50 Hz i 100 Hz cutoff frekvencijama (OP2+OP3+OP4). Figura 6 pokazuje da su sumirane amplitude bile redukovane kod LHON pacijenata. Na 50 Hz graničnoj frekvenciji (Grafikon 35A), sumirana amplituda je značajno niža za LHON pacijente u poređenju sa kontrolama ($F_{(1,18)} = 7,306$, $p = 0,015$). Na 75 Hz graničnoj frekvenciji (Grafikon 35B), razlika je još evidentnija ($F_{(1,18)} = 10,200$, $p = 0,005$). Slično, na 100 Hz cutoff frekvenciji takođe su bile značajno niže vrednosti kod LHON pacijenata u poređenju sa kontrolama ($F_{(1,18)} = 8,077$, $p = 0,011$).

Grafikon 35. Sumirane amplitude fotopičnih (LA) 3 ERG OP pokazuju sniženje kod LHON grupe.

4.5.3 Korelacije strukture i funkcije

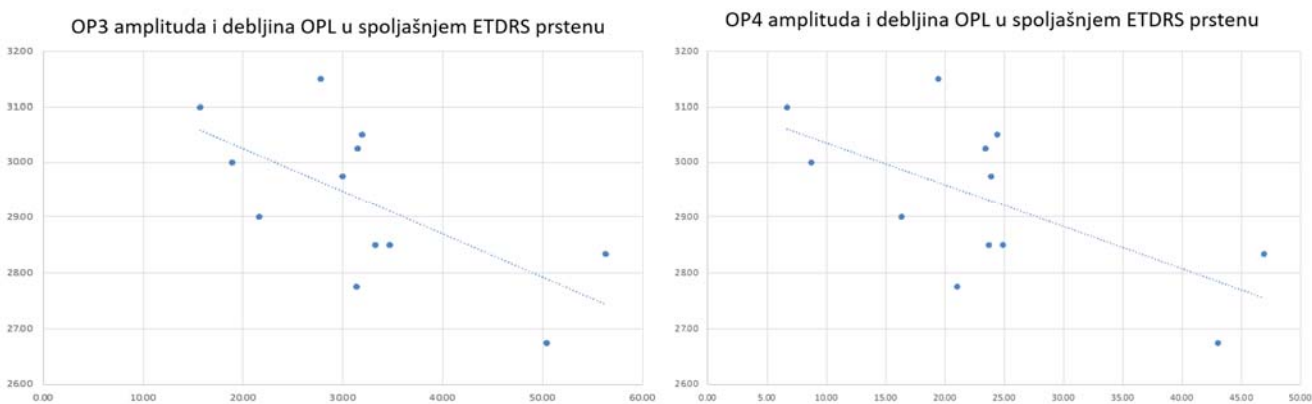
Kod sedam pacijenata (srednja starost $28,4 \pm 5,6$) sa genetski potvrđenim LHON uradili smo korelaciju debljine različitih slojeva retine (strukturne karakteristike LHON pacijenata) sa amplitudama i latencama oscilatornih potencijala (funkcionalne karakteristike).

Skotopični OP1 i OP2 filtrirani na 75 Hz cutoff frekvenciji pokazali su značajnu negativnu korelaciju sa debljinom spoljašnjeg pleksiformnog sloja (OPL) (Spearman koeficijent korelacije = $-0,747$; $p = 0,005$; Spearman koeficijent korelacije = $-0,766$; $p = 0,004$ za OP1 i OP2 redom) za spoljašnji ETDRS prsten (Grafikon 36).



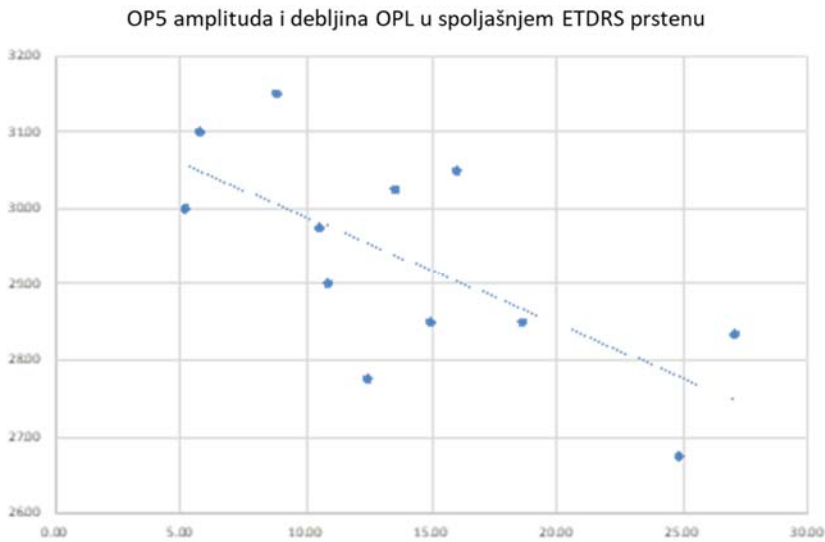
Grafikon 36. Prava korelacije debljine OPL u spoljašnjem ETDRS prstenu i amplituda skotopičnih OP1 i OP2 filtriranih na 75Hz graničnoj frekvenciji

OP3 i OP4 su pokazali značajnu negativnu korelaciju sa debljinom OPL u spoljašnjem ETDRS prstenu (Spearman koeficijent korelacije = $-0,645$; $p = 0,024$ i Spearman koeficijent korelacije = $-0,629$; $p = 0,028$) (Grafikon 37).



Grafikon 37. Prava korelacije debljine OPL u spoljašnjem ETDRS prstenu i amplituda skotopičnih OP3 i OP4 filtriranih na 75Hz graničnoj frekvenciji

Statistički značajna negativna povezanost je nađena i između amplitude skotopičnih OP5 i debljine OPL u spoljašnjem ETDRS prstenu (Spearman correlation = -0,685; p = 0,014) (Grafikon 38).

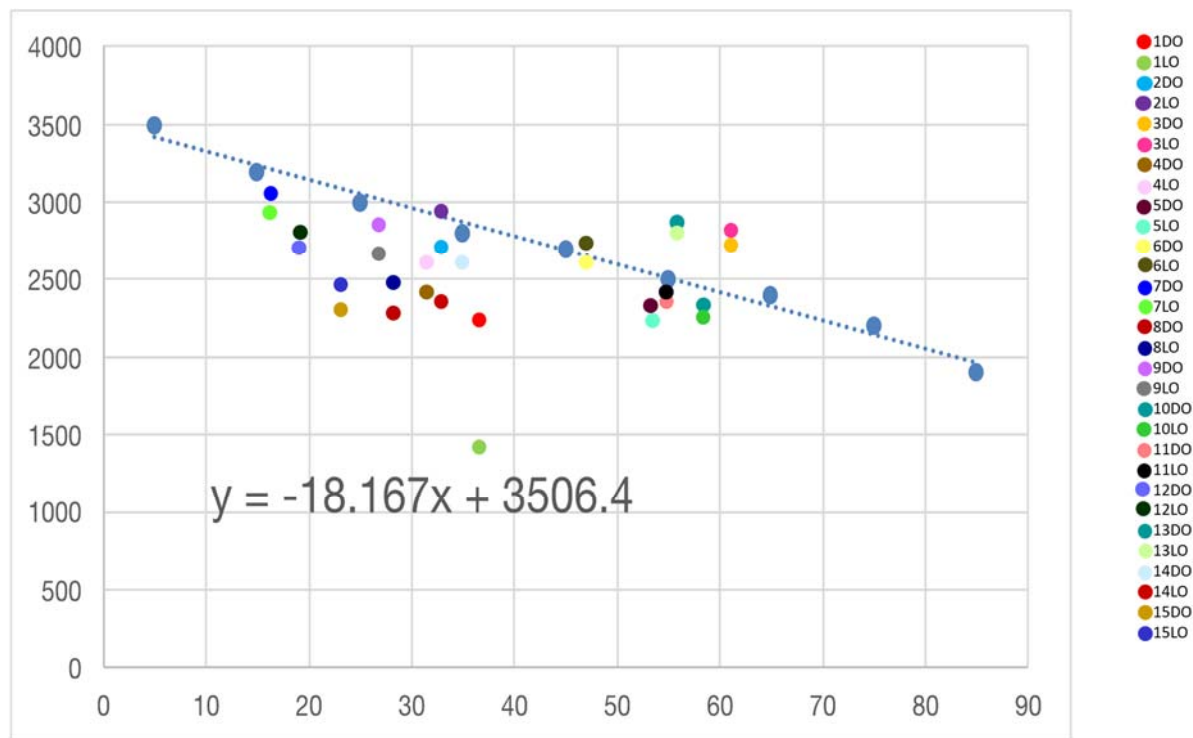


Grafikon 38. Prava korelacije debljine OPL u spoljašnjem ETDRS prstenu i amplitude skotopičnog OP5 filtriranog na 75Hz graničnoj frekvenciji

Korelacija između OP i drugih retinalnih slojeva, kao i fotopičnih PhNRs nije postojala

4.6 REZULTATI SPEKULARNA MIKROSKOPIJA

15 LHON pacijenata (30 očiju), 11 (73%) muškaraca, uključeno je u analizu. Prosečan normalan broj ćelija za tačnu godinu starosti pacijenta dobijen je pomoću jednačine prikazane na Grafikon 39



Grafikon 39. Broj endotelnih ćelija desnog i levog oka LHON pacijenata u odnosu na normative (plava linija). Jednačina upotrebljena za izračunavanje tačnog broja ćelija u momentu starosti za određenog pacijenta iz normativa

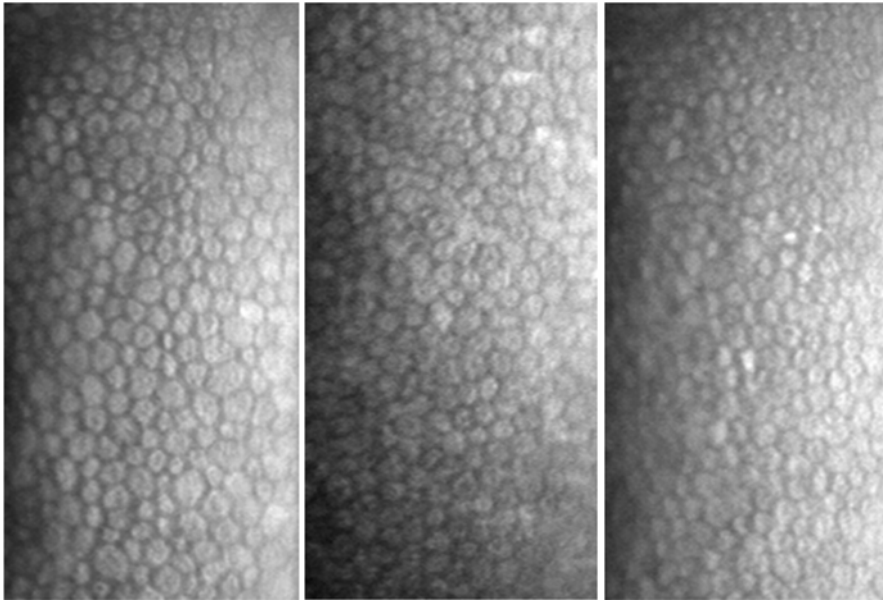
Rezultati analize su prikazani u na Grafikon 39 i u Tabela 13.

Tabela 13. Prosečne vrednosti broja ćelija LHON pacijenata i odstupanje u odnosu na normative koja je bila statistički značajna

| | Satarost u trenutku merenja | Oko | Broj ćelija mm/2 | Prosečan broj ćelija (mm-2) | Prosečan broj ćelija za starost (mm-2) | Ispod/iznad proseka (opseg 10 godina) | Ispod/iznad proseka (tačna godina merenja) |
|------------------|-----------------------------|-----|------------------|-----------------------------|--|---------------------------------------|--|
| 1 | 36,25 | DO | 1464 | 1866 | 2848 | -935 | -982 |
| | 36,25 | LO | 2267 | | | | |
| 2 | 33,83 | DO | 2666 | 2735 | 2892 | -66 | -157 |
| | 33,83 | LO | 2803 | | | | |
| 3 | 61,17 | DO | 2735 | 2766 | 2395 | 366 | 371 |
| | 61,17 | LO | 2797 | | | | |
| 4 | 32,25 | DO | 2457 | 2548 | 2921 | -252 | -373 |
| | 32,25 | LO | 2639 | | | | |
| 5 | 53,75 | DO | 2373 | 2356 | 2530 | -144 | -174 |
| | 53,75 | LO | 2339 | | | | |
| 6 | 47,00 | DO | 2609 | 2676 | 2653 | -25 | 23 |
| | 47,00 | LO | 2742 | | | | |
| 7 | 16,67 | DO | 3088 | 3002 | 3204 | -198 | -202 |
| | 16,67 | LO | 2916 | | | | |
| 8 | 28,42 | DO | 2391 | 2446 | 2990 | -555 | -545 |
| | 28,42 | LO | 2500 | | | | |
| 9 | 27,17 | DO | 2815 | 2723 | 3013 | -278 | -290 |
| | 27,17 | LO | 2630 | | | | |
| 10 | 59,58 | DO | 2425 | 2439 | 2424 | -61 | 15 |
| | 59,58 | LO | 2453 | | | | |
| 11 | 55,00 | DO | 2388 | 2451 | 2507 | -50 | -57 |
| | 55,00 | LO | 2513 | | | | |
| 12 | 19,50 | DO | 2667 | 2691 | 3152 | -509 | -461 |
| | 19,50 | LO | 2715 | | | | |
| 13 | 57,75 | DO | 2815 | 2812 | 2457 | 312 | 354 |
| | 57,75 | LO | 2808 | | | | |
| 14 | 34,08 | DO | 2670 | 2533 | 2887 | -268 | -355 |
| | 34,08 | LO | 2395 | | | | |
| 15 | 23,17 | DO | 2280 | 2375 | 3085 | -625 | -710 |
| | 23,17 | LO | 2470 | | | | |
| srednja vrednost | | | | | | | -236,2 |
| SD | | | | | | | 363,81 |
| p vrednosto | | | | | | | 0,025 |

Kod LHON pacijenata primećena je statistički značajno niža gustina endotelnih ćelija ($p=0.025$).

Iako razlika u polimorfizmu i polimegatzizmu nije bila statistički značajna, procenat ćelija veličine 500-600 kvadratnih mikrometara je veći kod LHON pacijenata (Slika 28).



Slika 28. Desna strana prikazuje endotel rožnjače LHON pacijenata, srednja slika prikazuje endotel nosioca mutacije, dok je sa leve strane prikazana rožnjača zdravog pacijenta istih godina.

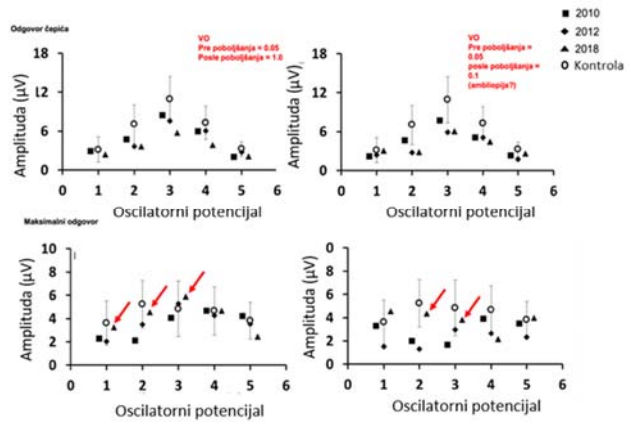
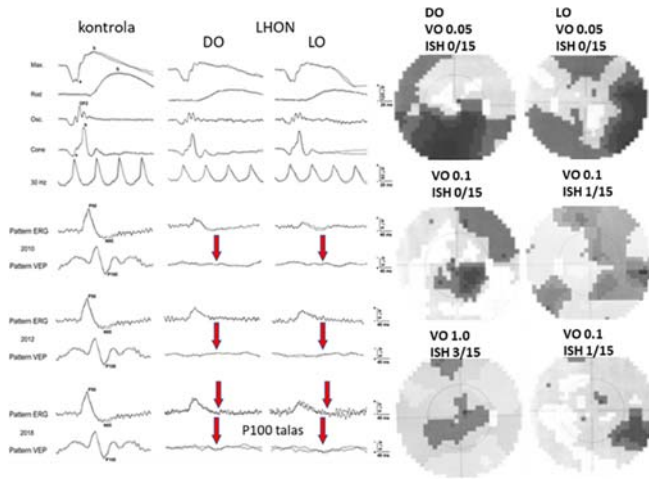
4.7 *PODGRUPE GENETSKI POTVRĐENIH LHON PACIJENATA SA SPECIFIČNIM KARAKTERISTIKAMA*

4.7.1 *Podgrupa LHON pacijenata sa poboljšanjem vidne oštrine*

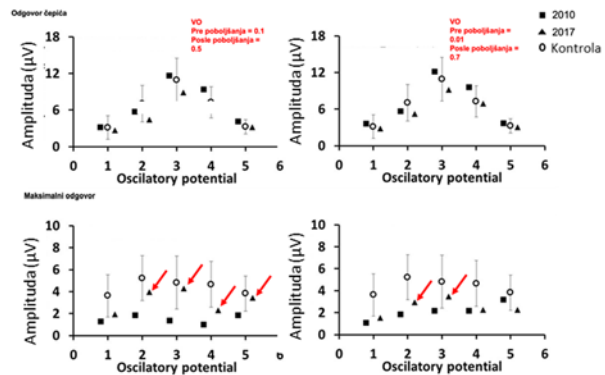
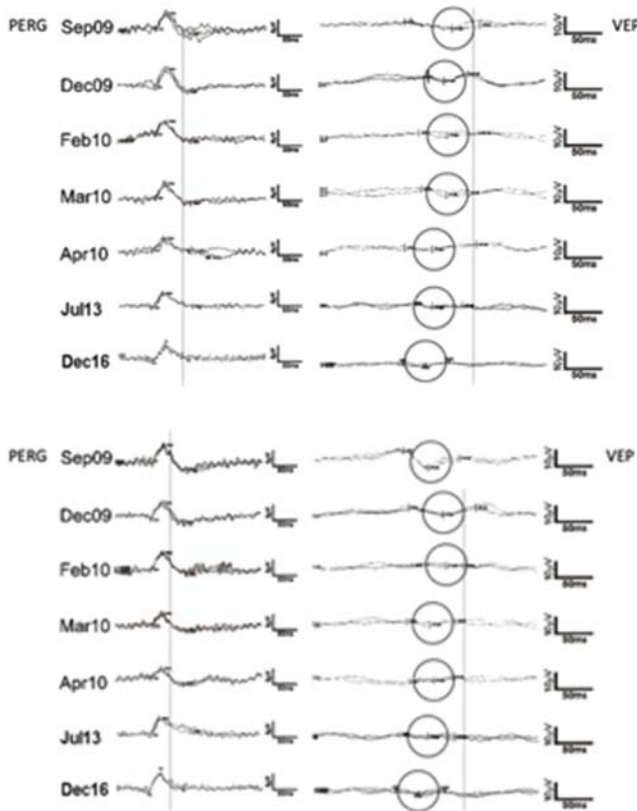
Kod 6 pacijenta (2 žene, 4 muškarca) koji su oboleli od LHON (mutacije MT-ND1: m.3460G>A homoplazmija, 2 DNAJC 30 152 A>G (p.Tyr51Cys), MT-ND6: m14484 T>C, p.Met64Val homoplazmija i MT-CYB 15309 T>C, 65% heteroplazmija) došlo je do poboljšanja vidne oštrine. Kod jedne žene i jednog muškarca došlo je do poboljšanja vidne oštrine samo na jednom oku i povezano je sa upotrebom Idebenona tako da su isključeni iz analize.

Prvi pacijent je nosilac 14484 mutacije i ambliop je na jednom oku od detinjstva označen kao LHON 4 (Tabela 2). Detaljne fenotipske karakteristike ovog pacijenta opisane su u delu za ambliopiju i na Grafikon 40. Drugi pacijent je nosilac retke mutacije MT-CYB 15309 T>C označen kao LHON 22. Detaljne fenotipske karakteristike ovog pacijenta opisane su u delu retkih mutacija i na Grafikon 41. Treći pacijent je nosilac mutacije u DNAJC30 genu označen kao LHON 18. Detaljne fenotipske karakteristike ovog pacijenta su prikazane u delu za autozomno recesivni LHON i na Grafikon 42. Četvrta pacijentkinja označena kao LHON 15 je vidnu oštrinu izgubila kada je bila stara dve godine posle čega je došlo do poboljšanja. U momentu prezentacije na Klinici (33 godine nakon početka bolesti) vidna oštrina obostrano je bila 0,6, imala je skotome u centralnom vidnom polju, istanjen peripapilarni RNFL i istanjenje unutrašnjih slojeva retine u makuli. Latenca N95 talasa je bila normalna kao i amplituda, ali je oblik talasa bio abnormalan, talas je bio u nivou izoelektrične linije

i N95/P50 odnos je bio niži od normale OD: 1,07, OS: 0,98. Longitudinalni podaci za ovu pacijentkinju nisu dostupni.

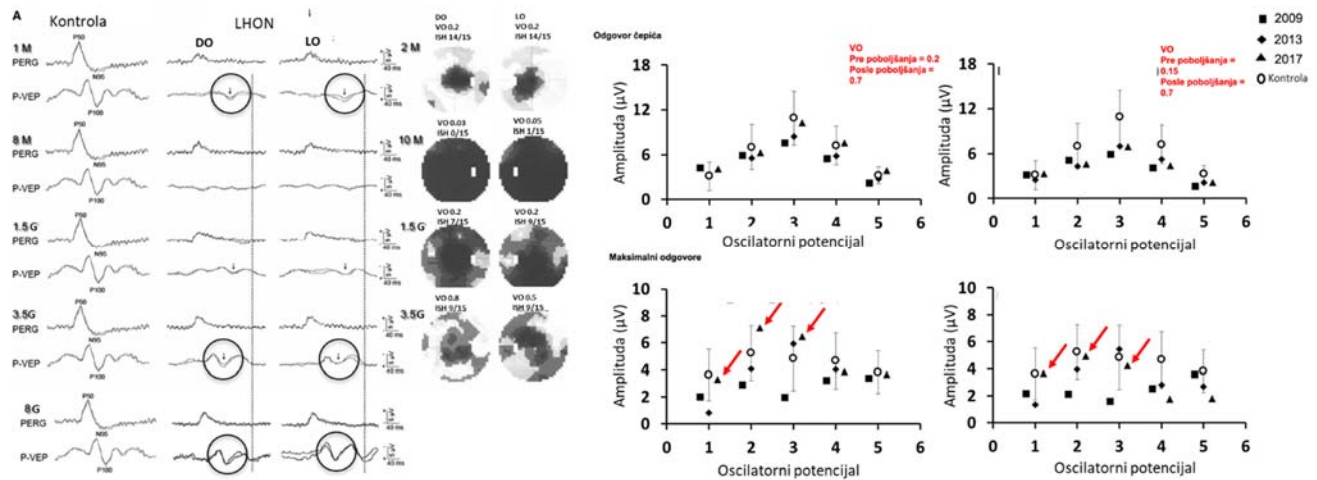


Grafikon 40. Pacijent sa poboljšanjem vidne oštine nosilac 14484 mutacije ambliop na levom oku. Tokom perioda praćenja ne dolazi do potpune normalizacije VEP-a ni PERG-a, ali dolazi do značajnog oporavka vidnih polja i amplitude OP2 i OP3.



Grafikon 41. Desno i levo oko drugog pacijenta sa poboljšanjem vidne oštine nosioca MT-CIB 15309 T>C mutacije. Tokom perioda praćenja nije došlo do poboljšanja amplitude PERG N95

talasa, ali je primećena normalizacija latence P 100 talasa i značajno poboljšanje amplitude OP2 i OP3



Grafikon 42. Treći pacijent sa poboljšanjem vidne oštine nosilac mutacije u DNAJC30 genu kod koga je došlo do poboljšanja i amplitude i latence VEP P100 talasa, dok je PERG N95 talas i dalje abnormalan

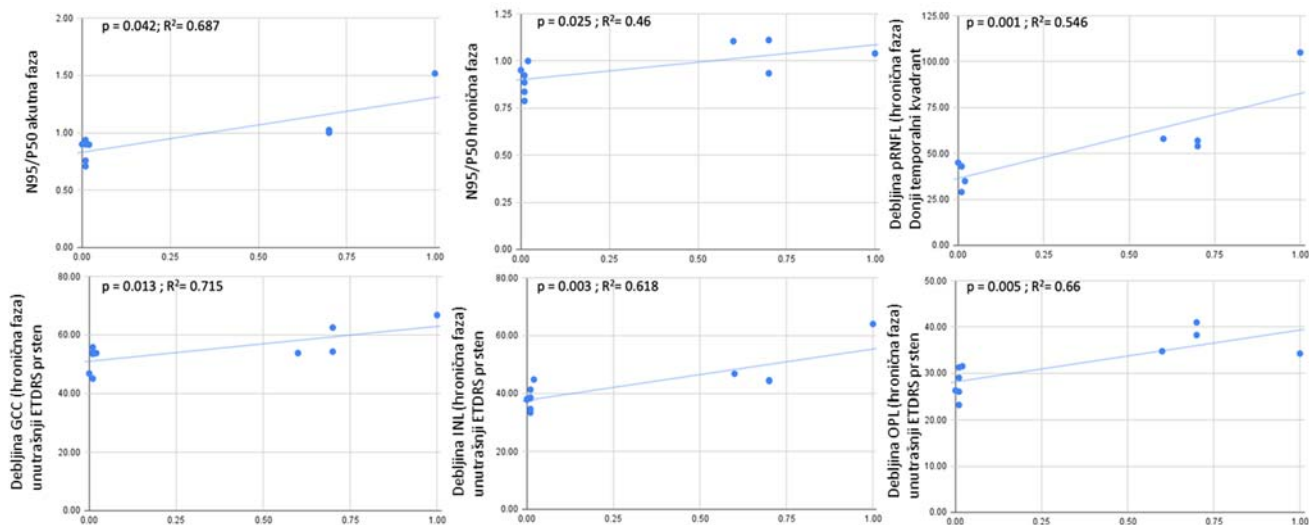
U akutnoj fazi bolesti N95/P50 je bio signifikantno niži u grupi pacijenata bez poboljšanja vidne oštine (grupa 1; $p=0,034$). Amplituda N95 talasa je bila redukovana u grupi 1 (3,37mV) dok je u grupi 2 bila normalna (4,37mV) iako ova razlika nije bila statistički signifikantna ($p=0,06$). Vidna oština je u akutnoj fazi takođe bila viša u grupi 2 sa graničnom signifikancom ($p=0,05$). U hroničnoj fazi postojala je značajna razlika u vidnoj oštini između grupa ($p<0,001$) sa prosečnom vidnom oštinom VO 0,75 Snellen u grupi 2. VEP P100 talas je bio nedetektabilan kod 4/6 pacijenata u grupi 1, dok su ostala dva pacijenta imala produžene latence i smanjene amplitude. U grupi 2, svi pacijenti su imali detektabilan VEP P100 talas, sa redukovanom amplitudom kod dva pacijenta i normalnom latencom samo kod jednog pacijenta.

N95/P50 odnos je bio signifikantno niži u grupi 1 sa granično nižom vrednosti amplitude N95 talasa ($p=0,02$).

Oporavak vidne oštine u grupi 2 je počeo između 12 i 24 meseca posle početka bolesti (prosek 17,33 meseca), dok je kod dva pacijenta koji su koristili Idebenon oporavak započeo 14 i 15 godina nakon početka bolesti. Oba ova pacijenta su imala redukciju latence VEP P100 talasa na normalne vrednosti na jednom oku, dok su amplitude ostale redukovane. PERG N95 talas je bio redukovano, na nivou izolacije i N95/P50 odnos je bio ispod 1.

Tokom perioda praćenja, u grupi pacijenata sa poboljšanjem vidne oštine došlo je i do poboljšanja vrednosti skotopičnih OP2 i OP3.

Segmentaciona analiza kod ovih pacijenata nije pokazala zadebljanje slojeva tokom perioda praćenja koje bi dalo strukturnu osnovu za popravak vidne oštine, ali je postojalo centralno očuvanje unutrašnje retine koje je primećeno kod svih LHON pacijenata. Debljina GCC je bila veća u unutrašnjem ETDRS prstenu u grupi dva ($p=0,049$), dok je debljina pRNFL takođe bila veća u svim segmentima sa statističkom signifikancom u donjem temporalnom segmentu ($p=0,034$). Debljina INL i OPL su takođe bile veće u grupi pacijenata sa oporavkom vidne oštine ($p=0,029$ i $p=0,002$). I strukturni i elektrofiziološki parametri su pokazali signifikantnu korelaciju sa vidnom oštinom nakon poboljšanja. Grafikon 43 sa najvećim stepenom korelacije između debljine inferiornog temporalnog pRNFL ($p=0,001$).



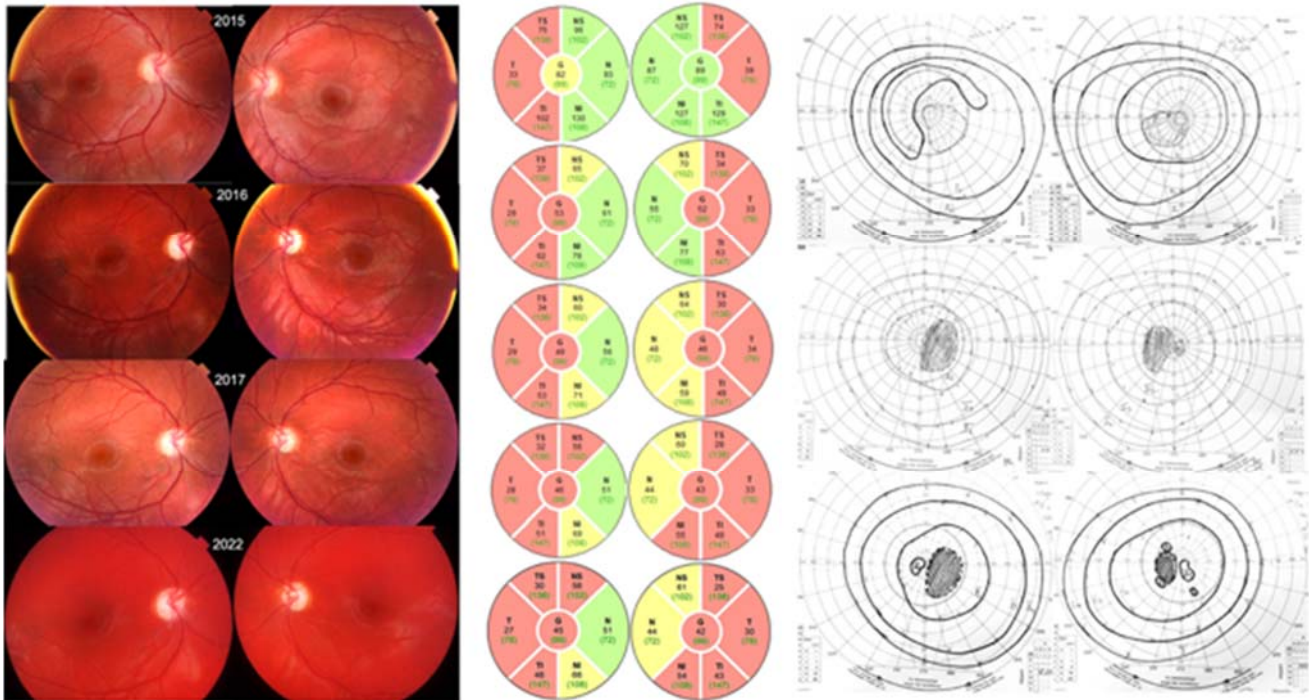
Grafikon 43. Krajnja vidna oština kod pacijenata sa funkcionalnim oporavkom pokazuje značajnu zavisnost od odnosa N95/P50 u akutnoj i hroničnoj fazi, kao i debljinom GCC, INL, OPL i inferiorno temporalnog pRNFL.

4.7.2 Podgrupa pacijenata sa monokularno lošom vidnom oštinom od detinjstva (LHON ili ambliopija)

U kohorti pacijenata obolelih od LHON koji su nosioci prethodno potvrđene LHON mutacije registrovana su tri pacijenta koja od detinjstva na jednom oku imaju slabu vidnu oštinu. Prema anamnestičkim podacima do pada vida na tom oku došlo je godinama pre pojave LHONa u kasnijoj životnoj dobi.

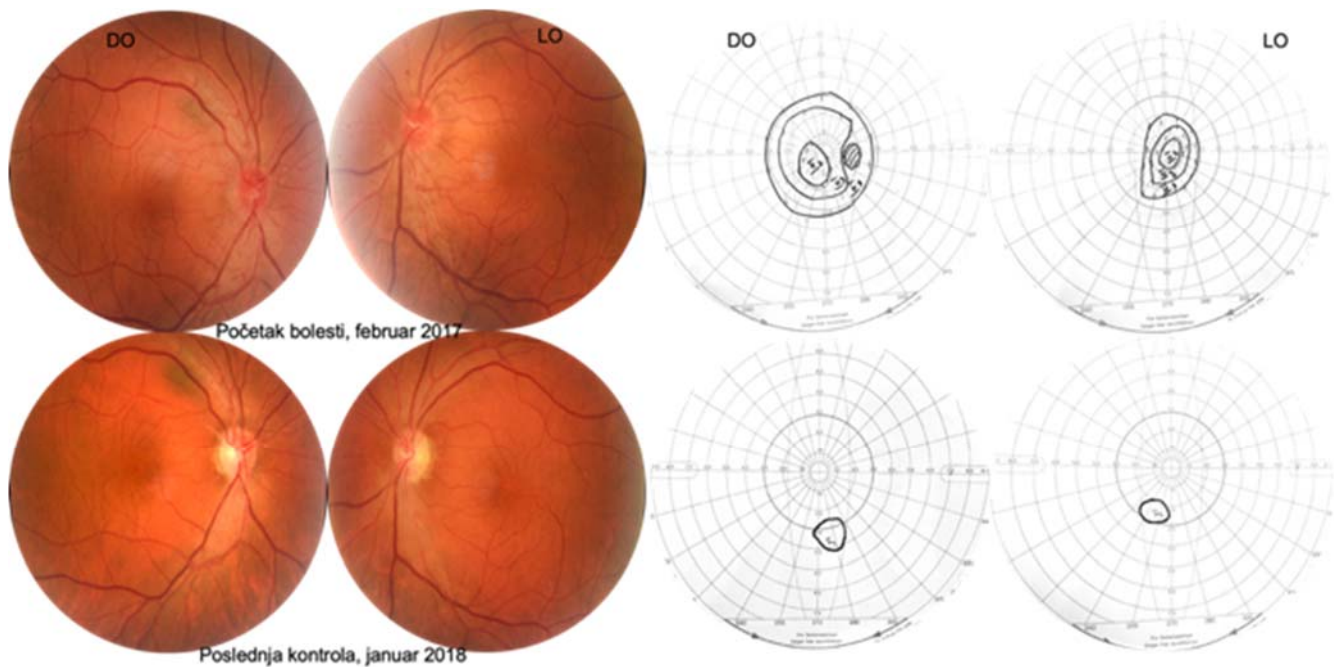
Prvi pacijent, označen kao LHON 16 (Tabela 2), bio je 17 godina star u momentu pada vidne oštine na levom, do tada zdravom oku. Na desnom oku je postavljena dijagnoza hiperopične ambliopije

koja nije odgovarala na standardnu terapiju okluzijom. Vidna oština je bila brojanje prstiju na 2 metra desno i brojanje prstiju na metar levo, a kolorni vid 0/15 na desnom i 1/15 na levom oku (Ishihara tablice) i postojao je centralni skotom u vidnom polju. Kliničke karakteristike su prikazane na Slika 29. Kod pacijenta je potvrđena retka, ranije publikovana mutacija MT-ND1:m.3700G>A.



Slika 29. U momentu pregleda (5 meseci od početka bolesti) na fundoskopiji se registruje početno bleđilo u temporalnom delu sa blago tortuotičnim krvnim sudovima. Tokom perioda praćenja papile su postale blede i atrofične sa potpunom atrofijom pRNFL i skotomima u vidnom polju. Peripapilarni RNFL je tokom celokupnog perioda praćenja pokazivao obostrano tendenciju progresije istanjenje u svim segmentima, manje nazalno nego temporalno.

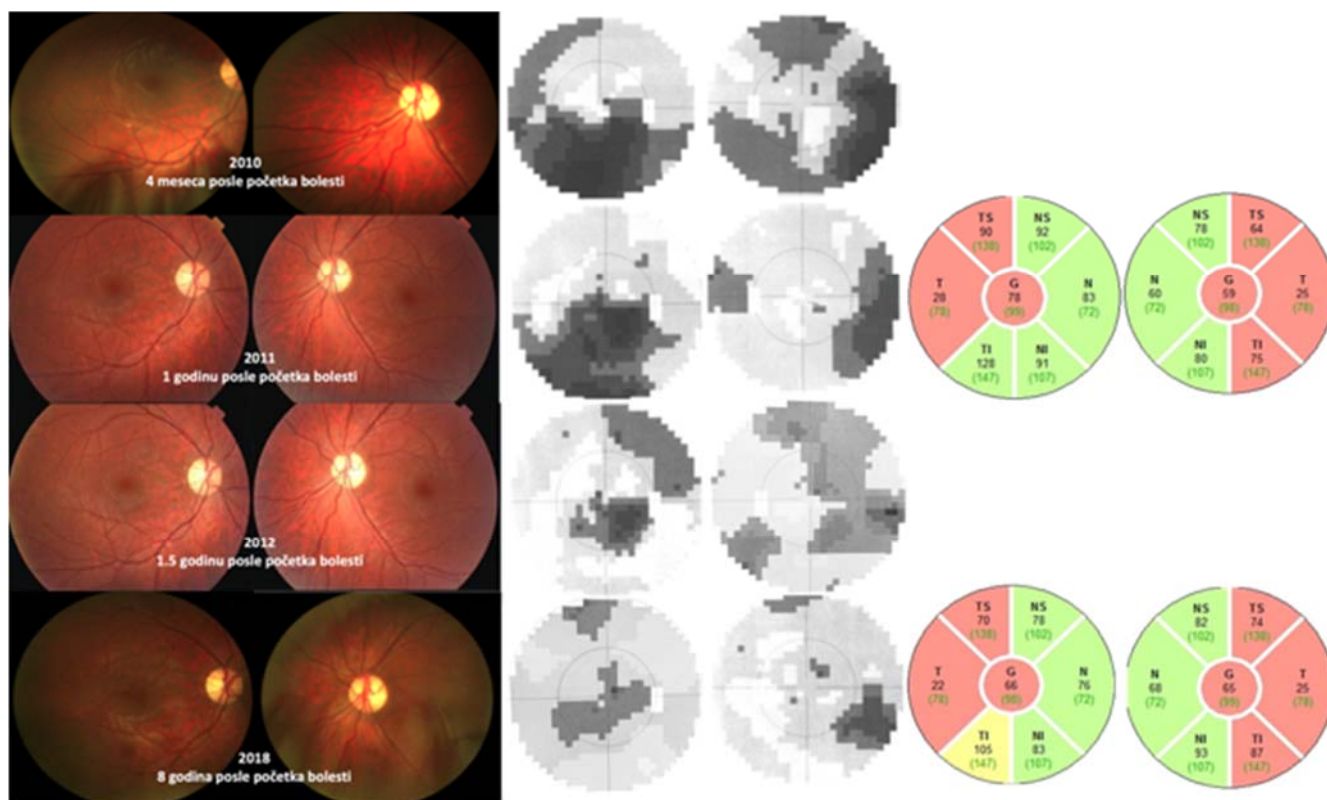
Drugi pacijent, označen kao LHON 5 (Tabela 2), je gospodin koji je bio 61 godina star u momentu pada vidne oštine na levom, do tada zdravom oku u januaru 2017. U detinjstvu je na desnom oku registrovana blaga hiperopija i moguće strabizam (navodi da je imao strabološku operaciju, bez dokumentacije) i na tom oku nije primetio promenu vidne funkcije. Vidna oština je bila brojanje prstiju na 2 metra obostrano, a kolorni vid 1/15 takođe obostrano (Ishihara tablice) i postojao je centralni skotom u vidnom polju. Fenotipske karakteristike pacijenta su prikazane na Slika 30. Kod pacijenta je potvrđena mutacija MT-ND4:m.11778G>A. Naveo je da je majka u starijoj životnoj dobi izgubila vid na oba oka zbog optičke atrofije.



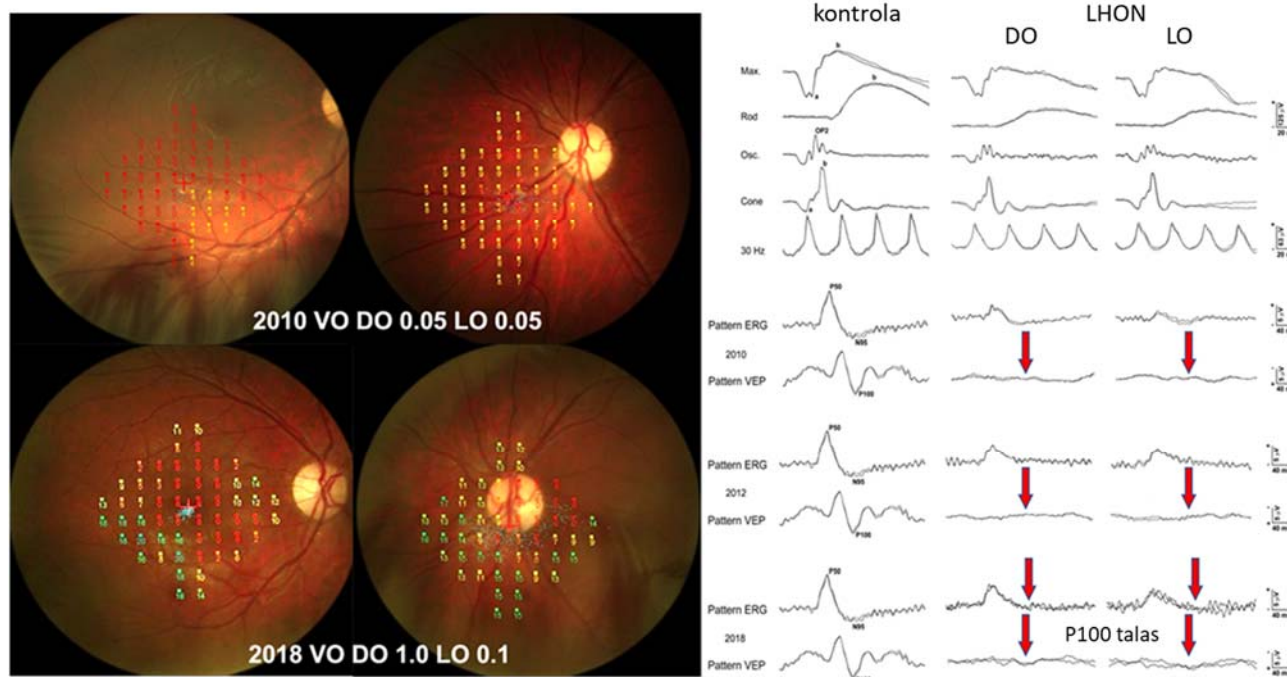
Slika 30. U momentu pregleda (dve nedelje od početka bolesti) na fundoskopiji su se videli obostrano hiperemični optički diskovi i tortuotični krvni sudovi, a vidno polje je bilo suženo. Tokom perioda praćenja došlo je do potpune atrofije vidnog živca i ostalo je samo malo ostrvo vida u vidnom polju

Treći pacijent, označen kao LHON 4, je muškarca koji je u 21. godini života (jun 2010) pretrpeo postepeni bezbolni gubitak vidne oštine na desnom oku u periodu od 2-3 nedelje. U detinjstvu je na levom oku postavljena dijagnoza strabizmične ambliopije i oko je bilo u konvergenciji. Genetski testovi potvrdili su dijagnozu LHON-tipične mutacije MT-ND6: m14484 T>C, p.Met64Val (homoplazmija), a u porodici su bila i dva rođaka sa majčine strane koji su imali sličnu epizodu gubitka vida, a zatim i poboljšanja u mlađem uzrastu.

Na prijemu, oština vida na prethodno normalnom, desnom oku je bila brojanje prstiju na 3 m, dok je na levom, slabovidom, bila brojanje prstiju na 2,5 m. Kolorni vid meren Ishihara tablicama bio je 1/15 na oba oka. Kliničke karakteristike pacijenta su prikazane na Slikama 72 i 73. Kod ovog pacijenta je godinu i po dana počeo oporavak vidne oštine koji se nastavio u periodu od 6 godina i dostigao 1.0 Snelle. Oporavak vidne oštine bio je praćen nepotpunim oporavkom kolornog vida, smanjenjem skotoma u vidnom polju (Slika 31), oporavkom senzitivnosti retine na mikroperimetriji i poboljšanjem elektrofizioloških rezultata (Slika 32).



Slika 31. Fundus fotografija, vidno polje i peripapilarni RNFL pacijenta LHON 4



Slika 32. Mikroperimetrija i elektrofiziološke karakteristike pacijenta LHON 16

Naši pacijenti nisu primetili promenu vidne funkcije na oku koje je navodno bilo ambliopno. Slabovido i LHON oko su pokazali slične elektrofiziološke karakteristike. Kod pacijenata kod kojih nije došlo do poboljšanja vidne oštine u hroničnoj fazi bolesti VEP je postao nedetektibilan na oba oka, a prosečna vrednost vrednost latence svih merenja bila je diskretno veća na ambliopnom oku, dok je amplituda bila identična. PERG N95 talas je kod oba ova pacijenta imao veću vrednost amplitude Kod pacijenta kod koga je došlo do popravka vidne oštine latenca N95 talasa je bila duža, a amplituda veća na ambliopnom oku i za amplitudu P50 ($p=0.015$) čije su vrednosti bile više na LHON oku verovatno kao posledica bolje fiksacije. Peripapilarni RNFL je pokazivao progresivno istanjenje podjednako na oba oka. I kod pacijenta sa poboljšanjem vidne oštine primećen je isti trend progresije istanjenja pRNFL što znači, da se vid može popraviti i bez strukturnog oporavka ili čak uz strukturno istanjenje vlakana vidnog živca.

5 DISKUSIJA

Mitohondrijske bolesti su heterogena grupa kliničkih manifestacija koje karakteriše disfunkcija oksidativne fosforilacije. Tačna procena učestalosti ovih poremećaja nije jednostavna, zbog velike varijabilnosti starosti obolelih u momentu javljanja bolesti, ali se smatraju najčešćim patologijama među grupom urođenih grešaka metabolizma (36). Prvi dokazi o oftalmološkim bolestima povezanim sa mtDNK mutacijama datiraju iz 1988. godine kada su Wallace i saradnici pronašli tačkastu mutaciju u genu koji kodira subjedinicu 4 kompleksa I u porodici sa Leberovom naslednom optičkom neuropatijom (LHON) (30). Sada je poznato da više od 90% simptomatskih LHON slučajeva nastaje kao posledica jedne od tri tipične mutacije, dok je za do 10% slučajeva LHON-a odgovorna neka od atipičnih, retkih mutacija koje su uglavnom prisutne u pojedinačnim slučajevima ili porodicama (56). Ipak neke populacije imaju značajno viši broj broj atipičnih mutacija kao na primer populacija Slovenije gde procenat retkih mutacija iznosi 15% (146).

U kliničkom okruženju određivanje tipa optičke neuropatije samo na osnovu kliničkog fenotipa nije dovoljno, pa genetsko testiranje predstavlja izuzetno značajan resurs u postavljanju precizne dijagnoze. U velikom broju slučajeva klinička slika može biti slična i, nakon isključivanja svih poznatih uzroka, može se pojaviti dilema da li se radi o atipičnoj mitohondrijskoj patološkoj varijanti koja izaziva LHON, ili optičkoj neuropatiji uzrokovanoj još neotkrivenim genetskim poremećajem koji može ili ne mora da utiče na funkciju mitohondrija. Takav primer je nedavno opisana mutacija DNAJC30 u nuklearnom genomu koja dovodi do nastanka LHON-a (61). Otkriće patogene LHON mutacije koja se nasleđuje autozomno recesivno i definisanje autozomalno recesivnog LHON-a (arLHON) kao posebnog entiteta pomoglo je da se objasni veliki broj do sada nerazjašnjenih slučajeva LHON fenotipa (61).

Međutim, ponekad i genetsko testiranje ne daje jasnu potvrdu ove dijagnoze. Takvi slučajevi jasnog LHON fenotipa, a bez identifikovanog genetskog uzroka predstavljaju dijagnostički izazov. Stoga je ova studija imala za cilj da utvrdi da li kod optičkih neuropatija koje nastaju kao posledica mitohondrijalne disfunkcije poznatog genetskog uzroka mogu postojati neke suptilne razlike u fenotipskoj ekspresiji, u poređenju sa sličnim kliničkim slučajevima bez genetskih indikacija LHON-a (59). Koliko nam je poznato, takvo poređenje dosada nikada nije rađeno. Takođe, cilj nam je bio i da identifikujemo eventualne biomarkere bolesti, kao i eventualnog spontanog poboljšanja. Takođe smo želeli analizirati fenotip pacijenata sa novootkrivenim promenama u mitohondrijskoj DNK kao i da ispitamo patogenost tih promena testovima mitohondrijske funkcije.

Genetsko istraživanje u okviru ove teze identifikovalo je patogenu varijantu kod 18 pacijenata (15 nosilaca tipične mutacije, 2 autozomno recesivna LHON pacijenta i 1 pacijenta sa atipičnom ranije publikovanom mutacijom) i 6 pacijenata sa do sada nepublikovanim promenama u mtDNK (Tabela 1). Detaljno genetsko istraživanje u okviru ove teze dovelo je do otkrića tri velike LHON porodice sa ukupno 31 obolelim članom i velikim brojem nosilaca mutacija što je dalje omogućilo adekvatno genetsko savetovanje naročito mlađih nosilaca. Činjenica da su dva člana iz velike LHON porodice

dijagnostikovana kao toksična ambliopija i kortikalno slepilo, ukazuje na velike diferencijalno dijagnostičke poteškoće sa kojima se suočavamo naročito u hroničnoj fazi LHON-a (sve optičke atrofije imaju sličan klinički izgled) i na to da se mogućnost LHON-a ne može isključiti bez obzira na stariju životnu dob pacijenta u trenutku nastanka bolesti.

Fenotipske karakteristike pacijenata sa novootkrivenim promenama u mtDNK su bile gotovo identične fenotipu LHON pacijenata koji su nosioci jedne od tri tipične mutacije uz nekoliko neuobičajenih karakteristika koje su odvojeno prikazane. U okviru ove teze predstavljena je i detaljna fenotipska analiza porodice kod koje je identifikovana retka mutacija m.13042G>T (A236S) u ND5 genu, sa tri člana obolela od Leberove hereditarne optičke neuropatije i tri neobolela srodnika. Dve predstavljene obolele osobe su imale dubok gubitak vida u ranoj dobi (11 i 20 godina), dok je njihova baka, prema podacima lokalne bolnice, imala kasnu prezentaciju u 58. godini života. Gubitak vida karakterisao je centrocekalni skotom, abnormalan PERG N95 i VEP i stanjivanje nervnih vlakana retine na OCT. Tokom perioda praćenja nije bilo poboljšanja vidne funkcije (oštrina vida, vidno polje, elektrofizioloških karakteristika ili OCT).

Identifikovana homoplazmatska mtDNK mutacija m.13042G>T (A236S) u ND5 genu je verovatno patogeno jer je to jedina nesinonimna, homoplazmatska mutacija u probandovoj mtDNK i odgovorna je za promenu aminokiseline A236Ser u invarijantnoj poziciji visoko konzerviranog domena ND5 subjedinice G1 gena kompleksa I. ND5 A236S promena mtDNK još nije prijavljena u dostupnim bazama mitohondrijske DNK (Mitomap baza podataka <http://www.mitomap.org/>), niti je bila prisutna u slovenačkoj populaciji u velikom broju kontrolnih mtDNK, uključujući mnoge koje pripadaju istoj haplogrupi K (slovenačka DNK baza podataka sa preko 7000 genoma). Segregacija je potvrdila istu mutaciju u homoplazmatskom stanju kod majke probanda (LHON 19) i majke pacijenta III-5 (LHON 20), kao i kod ćerke treće sestre III-2 (Slika 17) koje su trenutno bez simptoma. Majka sestara je bila slabovidna, ali mutacija nije potvrđena. Fenotip naših pacijenata bio je predominantno povezan sa okularnim karakteristikama bez dodatnih sistemskih smetnji (pacijenti su imali normalan NMR i nisu postojale nikakve sistemske promene sem stenoze aorte koja je postojala kod LHON 20).

Slična mutacija sa promenom aminokiseline G13042T/ND5 mtDNK A236T i različitom haplogrupom (H) je prijavljena i dokazano je patogena (potvrđena je disfunkcija mitohondrija skeletnih mišića, o čemu svedoči konstantno povećanje nivoa mlečne kiseline u serumu i proliferacija mitohondrija u biopsiji mišića) u italijanskoj porodici sa neurološkim i vizuelnim simptomima (147).

Postoji jasna razlika u kliničkim karakteristikama između naših pacijenata i ranije prijavljene italijanske porodice: početak bolesti u italijanskoj porodici je u kasnijoj životnoj dobi i povezan je sa dobrom oštrinom vida navodno nakon operacije katarakte (147) Najupadljivija razlika između italijanskih i naših pacijenata je prisustvo neuroloških karakteristika. Italijanska porodica imala je

inflamatorne promene u arahnoidnom uzorku i promene na MRI mozga koje nisu nađene kod naših pacijenata (147). Neobični simptomi su postojali kod LHON 19 u vidu jakih glavobolja i svetlećih fenomena u vidu bliceva kratko vreme pre gubitka vidne oštine. Slične glavobolje su opisane kod jednog pacijenta u italijanskoj porodici (147). Retko LHON pacijenti prijavljuju da su videli svetlosne fenomene u vidu sevanja, različitih boja, osećaj ošamućenosti, glavobolje, Uhtofov fenomen i slično(148). Naši pacijenti nisu imali druge neurološke simptome. Pored optičke neuropatije, dve obolele osobe u italijanskoj porodici i neki od nebolelih nosilaca imali su kataraktu i retinopatiju koju karakterišu žućkaste tačke raspoređene u perifernoj i centralnoj retini. Naši pacijenti nisu imali retinopatiju na osnovu kliničkih nalaza niti u OCT-u, ali su uočene blage promene u odgovorima ERG-a celog polja. Slično smanjenje odgovora čepića je takođe primećeno i u brazilskoj porodici sa LHON-om (149). Katarakta nije bila prisutna ni kod naših pacijenata, ni kod njihovih majki. Iako Majander i sar. (87) Barboni i sar. (150) prijavljuju bolji ishod ako se LHON javi u ranom uzrastu sa stopom spontanog oporavka vida i konačnom najbolje korigovanom vidnom oštrinom (BCVA), kod našeg pacijenta sa početkom bolesti u ranoj životnoj (11 godina), vidna oštrina se nije popravila.

Postoji nekoliko mogućih objašnjenja za tako različite fenotipove u italijanskoj porodici sa sličnom mutacijom na istom nukleotidu: prvo, različite promene aminokiselina su mogle modifikovati strukturu proteina i posledično funkciju i metabolizam mitohondrija na manje povoljan način. Zbog toga je analiziran i efekat mutacije *in silico*, poređenjem uticaja Ala236Ser varijante sa prethodno publikovanom patogenom varijantom koja deluje na istu reziduu Ala236Thr. Analiza EBI's VarSite kompjuterskim programom je pokazala da Ala236Ser varijanta se predviđa kao rezultat zamene aminokiseline alanina serinom, uz manju očekivanu promenu hidrofobnost i naelektrisanja punjenja (151). Ovo je upadljivo slično prethodno objavljenom očekivanom uticaju patogene zamene na ovu aminokiselinu (147). Pored toga, teorijska predviđanja dobijena korišćenjem APOGEE ukazuju na to da se obe varijante predviđaju kao patogene (152).

Druga mogućnost je homoplazmija prisutna kod naših pacijenata. Iako je mutacija u italijanskoj porodici bila heteroplazmična, ozbiljniji fenotipovi bili povezani sa višim stepenom heteroplazmije. Takođe postoji mogućnost da su polimorfizmi unutar haplogrupe promenili penetrantnost predstavljene G13042T mtDNK mutacije. Kod evropskih pacijenata sa LHON-om je potvrđeno da haplogrupe J2, J1 i K povećavaju rizik od slepila kod pacijenata sa m.11778G>A, m.14484T>C odnosno m.3460G>A, a haplogrupa H ima protektivnu ulogu kod LHON pacijenta sa m.11778G>A mutacijom (65). Ostaje pitanje da li haplogrupe imaju isti uticaj i na sekundarne mutacije.

Prikazana promena spada u grupu takozvanih jakih mutacija sa snažnim patogenim efektom. Barboni i saradnici su prijavili lošije funkcionalne ishode kod dece sa m.3460G>A/MT-ND1(p.A52T) patogenom varijantom (86). Ova patogene varijanta utiče na transport elektrona napadajući direktno redoks aktivnost CI smanjujući formiranje hinola i nishodni transfer elektrona i pumpanje protona što dovodi do povećane produkcije slobodnih radikala (153). Mutacije u ND4 i

ND6 (druge dve najčešće mutacije m.11778G>A/*MT-ND4* i m.14484T>C/*MT-ND6*) utiču na translokaciju protona preko unutrašnje membrane mitohondrija i na efikasnost čuvanja energije, ali ne utiču direktno na transport elektrona (153), (154). Slično patogenim varijantama u ND1 genu, i patogene varijante u ND5 genu (kao mutacija G13042T/ND5) takođe deluje direktno na transport elektrona menjajući kvinon-vezujuće mesto na ND5 subjedinici.

Druga zanimljiva identifikovana promena je bila MT -ND4:m.11443A>C kod 61-godišnjeg pacijenta. Ispoljavanje patogene varijante je bilo u kasnijoj životnoj dobi, a mutacija nije potvrđena ni kod jednog drugog člana porodice (testirani majka i brat) i postojale su izvesne kliničke specifičnosti u smislu curenja na fluoresceinskoj angiografiji koje je nekarakteristično za LHON. Ova patogene varijanta je bila prisutna u heteroplazmiji 65% što je dovoljno da ispolji svoj patogeni efekat.

Iako se najveći procent LHON slučajeva manifestuje u ranoj mladosti, opisani su i slučajevi u znatno starijoj dobi (88). Smatra se da je kod pojave LHON-a u kasnijoj životnoj dobi preovlađujući uticaj faktora sredine i da se, bez štetnog uticaja ovih faktora, patogeni efekat mutacije nikada ne bi ni ispoljio o čemu svedoči i činjenica da je kod ovog pacijenta funkcija kompleksa I bila izuzetno loša. Interesantna je i činjenica da mutacija nije potvrđena kod majke i brata, što ovu mutaciju čini *de novo* mutacijom što je dosta retko publikovano u literaturi (155), (156). Takođe, ostaje i pitanje registrovanog curenja na fluoresceinskoj angiografiji. Postoji nekoliko prikaza curenja na optičkom disku na fluoresceinskoj angiografiji kod LHON pacijenata u literaturi. (157), (158). Wakakura je prikazao interesantan slučaj pacijenta kod koga je došlo do razvoja LHON-a kao posledica optičkog neuritisa (159), dok je Hsu prikazao slučaj pacijenta koji je zbog curenja na FA pogrešno dijagnostikovao kao optički neuritis (158). Chuman je takođe prikazao slučaj LHON pacijenta kod koga su pored curenja na optičkom disku registrovane i MRI promene na optičkom nervu (160), ali pacijent, slično našem pacijentu, nije reagovao na kortikosteroidnu terapiju i nisu detektovana antitela koja bi ukazala na bilo koju formu optičkog neuritisa.

Mutacija MT-CIB 15309 T>C (heteroplazmija 65%) je takođe okarakterisana neobičnim tokom bolesti kod našeg pacijenta koji je podrazumevao 4 epizode smanjenja i poboljšanja vidne oštrine na jednom oku pre konačnog dostizanja NADIR vidne oštrine (najlošije vidne oštrine u toku bolesti). Pacijent je tokom 2 godine bio legalno slep da bi mu se nakon tog vremena vidna oštrina popravila i ostala stabilna tokom celog perioda praćenja. Koliko nam je poznato, sličan slučaj nije opisan u dostupnoj literaturi. Postoji nekoliko opisanih slučajeva LHON plus bolesti sa padovima i spontanim poboljšanjima vidne oštrine (161). U ovim slučajevima poboljšanje vidne oštrine nikada nije potpuno i svaki sledeći napad vodi ka sve dubljem padu vidne oštrine. Kod našeg pacijenta nisu postojale promene na magnetnoj rezonanci u smislu demijelinizacionih promena I isključene su svi ostali mogući uzroci.

Ponekad dolazi i do kombinacija koje ukazuju mogućnost sistemske disfunkcije mitohondrija. Takav primer je bila pacijentkinja nosilac mutacije MT-ND1:m.4130A>T je doživela pad vida i gubitak kolornog vida u kasnoj životnoj dobi, a pacijent nosilac MT-ND6:m.14598T>C mutacije je imao nizak stepen heteroplazmije (22%) i pridruženu Parkinsonovu bolest.

Da bismo potvrdili patogenost novootkrivenih promena urađeni su testovi mitohondrijske funkcije.

Genetika LHON a i njen uticaj na OXPHOS i homeostazu mitohondrija su detaljno istraženi (55). Uglavnom je LHON prouzrokovan tačkastim mutacijama u mitohondrijskom genomu koji kodiraju subjediničnu kompleksa I respiratornog lanca mitohondrija. Ovo dovodi do oštećenja fluksa elektrona u respiratornom lancu, što redukuje respiraciju kompleksa I i aktivnost OXPHOS i povećava produkciju slobodnih radikala (ROS) (18). Pored pojačane produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), pokazano je da postoji i pojačana mitofagija u fibroblastima LHON pacijenata (19). Kod LHON pacijenata dolazi do smanjenja ukupne mase mitohondrija u odnosu na neobolele nosioce (17), i u nekom trenutku RGC gube sposobnost da kompenzuju redoks disbalans u ćeliji, povećan nivoa slobodnih radikala i oksidativnih oštećenja. Ovi mehanizmi mogu da dovedu do disfunkcije osetljivih RGC u akutnoj fazi LHON-a i posledične apoptoze velikog broja tako oštećenih ćelija (18). Gubitak RGC u LHON'u je praćen i demijelinizacijom pošteđenih aksona u optičkom nervu i dodatnog ograničavanja njihove sposobnosti sprovođenja signala (17).

Zbog jedinstvenih osobina mitohondrija, mitohondrijske bolesti mogu nastati usled promena u mtDNK, ali s obzirom da ove organele značajno zavise i od ekspresije određenih gena u nDNK, mitohondrijski poremećaji mogu biti uzrokovani mutacijama u oba genoma.

U ovom radu su ispitivani pokazatelji mitohondrijske funkcije u MNČPK pacijenata sa tipičnim mutacijama mtDNK, kao i kod pacijanata sa novootkrivenim mutacijama, u poređenju sa MNČPK zdravih kontrola odgovarajućeg pola i starosti. Mutacije koje deluju na bilo kom delu lanca prenosilaca elektrona lanca dovode do značajnih poremećaja funkcije kompleksa I, koja se može registrovati respirometrijom visoke rezolucije (162,163). Naime, usled smanjene respiracije na nivou kompleksa I, dolazi do pada sinteza ATP-a oksidativnom fosforilacijom, što može nepovoljno uticati na energetske status ćelije, uz snižen nivo ćelijskog ATP-a. U našem istraživanju, pokazali smo da je respiratorna funkcija na nivou kompleksa I u MNČPK pacijenata sa LHON bila značajno niža u poređenju sa respiratornom funkcijom u MNČPK odgovarajućih kontrola, što je u skladu sa istraživanjima u kojima je pokazano da kod LHON pacijenata postoji smanjena respiratorna funkcija koja se odražava u smanjenoj aktivnosti kompleksa I. Naime, Peveralli i saradnici su pokazali da postoji donekle redukovana aktivnost kompleksa I kod 5 novih verovatno patogenih varijanti, ali potrošnja kiseonika u ćelijama nije bila smanjena (164). U nekoliko različitih studija nisu pokazani značajni poremećaji funkcije respiratornog lanca (165–167). Angebault i saradnici su pokazali smanjenu aktivnost kompleksa I kod LHON pacijenata koja se poboljšava upotrebom

Idebenona (168). U našem istraživanju, uporedna analiza respiratornih stanja, koja su pokazatelj respiracije na nivou ostalih komponenti respiratornog lanca, pojedinačno (C II i CIV) i sveukupno, nije pokazala razliku između aktivnosti ostalih kompleksa u MNČPK izolovanih iz krvi pacijenata sa LHON i kontrolnih uzoraka. Međutim, vrlo je značajno da je naše istraživanje pokazalo da se pad respiratorne funkcije na nivou kompleksa I može pratiti u MNČPK pacijenata, što navodi na mogućnost korišćenja ove analize kao dodatnog biomarkera u diferencijalnoj dijagnozi. Uz to, posebno je značajno što analiza respiratorne funkcije nije pokazala razliku između uzoraka sa tipičnom LHON mutacijama i uzoraka sa novootkrijenim mutacijama, navodeći na mogućnost da bi karakterizacija funkcije mitohondrija mogla da ima određeni značaj u proceni patogenosti novootkriivenih mutacija.

Grupa istraživača je pokazala da kod pacijenata sa LHON postoji značajno povećanje produkcije ROS i snižen potencijal unutrašnje mitohondrijske membrane, što ukazuje na depolarizaciju (169). Lipidi membrane su posebno osetljivi na dejstvo ROS zbog prisustva dvostrukih veza. U proteinima SH grupe cisteina ili metionina su osetljive na delovanje ROS, koji mogu dovesti od njihove oksidacije, dok ostaci tirozina mogu biti podvrgnuti nitrozilaciji reaktivnim jedinjenjima azota čiji je metabolizam povezan sa ROS. Mitohondrije su takođe veoma osetljive na oksidativna oštećenja zbog prisustva metala u protetskim grupama lanca prenosilaca elektrona, a ceo OXPHOS sistem je osetljiv na dejstvo vodonik-peroksida. Limfociti pacijenata sa LHON-om tretirani oksidacionim sredstvom 2 deoksi-D-ribozom pokazali su značajan porast procenta apoptotičnih ćelija u odnosu na kontrole (170), dok je na miševima dokazano da inokulacija ribozima koja smanjuje mRNK za MnSOD i nivo proteina dovodi do gubitka aksona i mijelina u optičkom nervu, koji su glavna karakteristike optičkih nerava pacijenata sa LHON-om dokazana na obdukcijama (171).

LHON hibridi dobijeni iz ćelijske linije neuronskog prekursora Ntera 2/D1 (NT2) pokazali su veću proizvodnju ROS u odnosu na kontrole samo nakon diferencijacije u zrele neuronske ćelije, što ukazuje na to da bi LHON mutacije mogle zahtevati diferencirano neuronsko okruženje kako bi se izazvao oksidativni stres (172). Falabela i saradnici su pokazali povećanu produkciju reaktivnih kiseoničnih i reaktivnih azotnih jedinjenja u mononuklearima LHON pacijenata (173). Kako je poznato da povećana produkcija ROS i oksidativni stres imaju ključnu ulogu u degeneraciji optičkog nerva, a da je kompleks I najvažniji izvor superoksidnog anjona u mitohondrijama, stoga je kao jedan od pokazatelja mitohondrijalne funkcije u ovom radu ispitivana i produkcija superoksidnog anjona.

Mononuklearne ćelije periferne krvi LHON pacijenata uključenih u ovu studiju imale su značajno višu produkciju superoksidnog anjona u odnosu na kontrolne uzorke, što je bilo karakteristično i za pacijente zsa poznatim, kao i za one sa novootkrivenim mutacijama.

Kako su prethodne analize pokazale da u MNČPK pacijenata sa LHON postoji disfunkcija kompleksa I respiratornog lanca, kao i porast produkcije superoksidnog anjona, urađena je citofluorimetrijska

analiza potencijala unutrašnje membrane mitohondrija, nakon bojenja katjonskim fluorohromom JC-1. Pokazano je da u uzorcima MNČPK pacijenata sa LHON pada potencijal unutrašnje membrane mitohondrija, odnosno dolazi do određenog stepena depolarizacije, koje se uočava čak i u nativnim uslovima. Međutim, porast depolarizacije postaje izražen u uslovima kada su MNČPK izložene delovanju prooksidansa H_2O_2 , kada je uočen veći porast odnosa intenziteta zelene i crvene fluorescence (FL1/FL2) u MNČPK pacijenata u odnosu na kontrolne. U tim uslovima, mitohondrije LHON pacijenata pokazuju značajno višu produkciju ROS u odnosu na zdrave kontrole, što ukazuje da su MNČPK pacijenata osetljivije na oksidativni stres u poređenju sa zdravim kontrolama.

MNČPK pacijenata sa promenama u mtDNK nepoznatog značaja su imali sniženu funkciju kompleksa I, povećanu produkciju ROS i povećanu depolarizaciju membrana u poređenju sa zdravim kontrolama i približno jednake karakteristike kao i polimorfonukleari pacijenata sa tipičnim LHON mutacijama. Ovakav rezultat ukazuje na patogenost novoidentifikovanih promena i omogućuje reklasifikaciju VUS u verovatno patogene ili patogene.

Genetski negativni slučajevi pacijenata sa tipičnim LHON fenotipom predstavljaju veliki dijagnostički problem. Zato je identifikacija biomarkera koji će da pomognu u lakšoj diferencijaciji genetski potvrđenog LHON-a u hroničnoj fazi bolesti (kada ga je fundoskopski nemoguće razlikovati) od drugih optičkih atrofija (nonLHON grupa) od krucijalnog značaja. Identifikacija potencijalnih biomarkera vršena je uz pomoć OCT-a (u području makule i oko optičkog diska) i pomoću elektrofiziologije.

Segmentacionom OCT analizom poređena je debljina svih slojeva retine prema ETDRS prstenovima i poljima u hroničnoj fazi kod LHON pacijenata (LHON grupa) i pacijenata sa tipičnim LHON fenotipom, bez genetske potvrde bolesti (nonLHON grupa).

Kod obe grupe pacijenata potvrđeno je značajno istanjenje slojeva unutrašnje retine (kompleks ganglijskih ćelija, GCC) u svim ETDRS prstenovima.

U centralnom krugu primećeno je značajno istanjenje slojeva unutrašnje retine (kompleks ganglijskih ćelija, GCC) koje je bilo veće u nonLHON grupi što gugeriše da kod LHON pacijenata postoji bolje očuvanje unutrašnje retine u centralnom krugu. Za razliku od centralnog ETDRS kruga, srednji i spoljašnji prsten su pokazali veće stanjivanje GCC sloja u LHON grupi. Srednji prsten odgovara oblasti parafovealne retine koja ima 2 ili više RGC slojeva koji opadaju do jednog sloja kada se produže do periferne zone (spoljni ETDRS prsten) (177) Liu i sar. (178) su nedavno opisali da je fovea bila deblja i dubina fovealne jame plića kod pacijenata koji nisu bili pogođeni i kod pacijenata sa LHON u poređenju sa normalnom populacijom. Ovo je nekako u skladu sa zapažanjima u našoj studiji i moglo bi korespondirati sa relativnim očuvanjem RNFL, GCL i IPL u centralnom ETDRS krugu. Takva studija do sada nije bila urađena.

Stoga, uticaj mitohondrijalne disfunkcije na apoptozu ganglijskih ćelija retine i degeneraciju aksona može imati drugačiji gradijent od centra ka periferiji kod mitohondrijskih nego kod

nemitohondrijalnih bolesti. Pored toga, odnos debljine slojeva mrežnjače između srednjeg prstena i centralnog kruga bio je značajno niži u LHON grupi nego u neLHON grupi, što ukazuje na drugačiji obrazac degradacije mrežnjače kod LHON-a i drugih tipova optičke atrofije i verovatno pruža novi orijentacioni klinički biomarker za diferencijaciju između dva entiteta. Još jedno zanimljivo zapažanje u našim kohortama bilo je da je INL bio deblji u obe grupe optičke atrofije u poređenju sa kontrolama. LHON pacijenti su specifično imali deblji INL u svim ETDRS poljima od nonLHON grupe, posebno u centralnom krugu, gde je ova razlika bila značajna. Deblji INL kod LHON-a su prvi opisali Carbonelli i saradnici (179) koji su sugerisali da to može biti posledica makularnih mikrocista. Međutim, Majander i sar. (97) su pronašli deblji INL i kod pacijenata bez mikrocista. U našoj studiji samo jedan pacijent (pacijent sa mutacijom 14484) je imao mikrociste makule, pa se čini da ova karakteristika nije odgovorna za razliku u debljini INL već da je deblji INL jedna od karakteristika hronične optičke atrofije. Iznenadujuće je videti povećanu debljinu INL-a u retini pacijenata sa LHON-om. Normalan INL se sastoji od približno 52% konusnih bipolarnih ćelija, 9% štapićastih bipolarnih ćelija, 18% amakrinih ćelija, 14% horizontalnih ćelija i 18% Milerovih ćelija (180). Deblji INL može biti posledica povećanja prostora u kombinaciji sa smanjenjem debljina RNFL i GCL-IPL, međutim obrasci debljina GCC i INL između naših studijskih grupa nisu bili isti. LHON grupa je imala deblji i GCC i INL u centru. Čini se da je neki drugačiji proces adaptacije uključen u LHON što dovodi do boljeg očuvanja INL i GCC u centralnoj retini.

Takođe, OPL je bio deblji u spoljašnjem ETDRS prstenu u obe grupe sa optičkom atrofijom u poređenju sa zdravim kontrolama. Srednja debljina ONL-a je takođe bila veća u svim prstenovima u obe grupe, ali je razlika bila značajna samo u LHON grupi. Carbonelli i sar. (179) i Majander i sar. (97) su takođe primetili zadebljanje INL, OPL-ONL u LHON-u, posebno ako su prisutne makularne mikrociste. Cesareo i saradnici (181) su takođe prijavili deblji ONL i OPL kod pacijenata sa DOA bez mikrocista i predložili da je ovo zadebljanje povezano sa kompenzatornim ponašanjem Milerovih ćelija koje normalno regulišu funkciju neurona čišćenjem citotoksina i glutamata, proizvodeći neurotrofne faktore, i pomažući doslednu obradu informacija na neuronskom nivou. Međutim, ovo ne objašnjava razlike koje smo pronašli između LHON i neLHON grupe u našoj studiji. Cesareo i sar. (181) nisu prijavili statistički značajnu razliku u debljini retinalnog pigmentnog epitela i spoljašnjih slojeva retine u poređenju sa kontrolama, a slične rezultate su dobijeni i kod naših pacijenata.

I kod pacijenata sa arLHON-om debljina unutrašnjih slojeva retine (RNFL, GCL i IPL), posebno GCL, bila je smanjena u svim ETDRS kvadrantima sa najboljom očuvanošću u centralnom krugu i u temporalnim ETDRS kvadrantima. Kao i kod mtLHON, INL sloj je bio deblji u svim kvadrantima kod LHON pacijenata nego kod zdravih kontrola.

U akutnoj fazi LHON-a kao posledica disfunkcije aksoplazmatskog transporta dolazi do zadebljanja peripapilarnog RNFL odnosno pseudoedema, a zatim 3–6 meseci od početka bolesti dolazi do istanjenja pRNFL prvo u temporalnom delu koji odgovara papilomakularnom snopu. Ovo ukazuje

na činjenicu da dolazi do postepene rezolucije pseudoedema pRNFL i da počinje atrofija optičkog nerva (182). Wang je takođe uočio da 6-9 meseci od početka bolesti dolazi do značajnog istanjenja superiornog, inferiornog, temporalnog i prosečnog pRNFL. U njihovoj studiji veće istanjenje je bilo prisutno u inferiornom nego u superiornom kvadrantu što ukazuje na to da ganglijske ćelije čiji se aksoni završavaju u inferiornom delu optičkog nerva bivaju ranije zahvaćeni (182). Statistički značajno istanjenje svih kvadranta pRNFL uočeno je 9–12 meseci od početka bolesti. Istanjenje pRNFL se dešavalo po tačno određenom redosledu gde je prvo došlo do istanjenja temporalnog, zatim donjeg, gornjeg in a kraju nazalnog pRNFL. Interesantna opservacija ove studije vezana je za hroničnu fazu LHON-a. Ovi istraživači su prijavili da se istanjivanje pRNFL nastavlja u pojedinim kvadrantima čak i nakon 60 meseci od početka bolesti sa značajnom razlikom u poređenju sa 12-24 meseca. Stanton et al. takođe su prijavili peripapilarno stanjivanje RNFL-a u hroničnoj fazi u svojoj kohorti pacijenata koji imaju mutaciju DNAJC 30 (61).

Najveća razlika u debljini pRNFL-a u gornjem temporalnom polju između LHON i nonLHON grupe u našoj studiji je u skladu sa nalazima Wang i sar. (182) koji sugerišu da je istanjivanje gornjih kvadranta pRNFL kod LHON pacijenata posledica odumiranja takozvanih uspavanigh ćelija (oštećene, ali funkcionalne RGC ćelije) čiji se aksoni završavaju upravo u gornjoj polovini optičkog nerva. Na osnovu ovih zapažanja i naših rezultata smatramo da bi lokalizacija uspavanih RGC mogla da bude upravo u ETDRS centru koji je bolje očuvan kod LHON pacijenata, a da bi projekcija aksona ovih ćelija mogla da bude upravo u gornjim kvadrantima optičkog nerva. Ova zapažanja identifikuju nove strukturne biomarkere LHON-a, kao i strukturnu osnovu za slučajeve spontanog poboljšanja koji su primećeni kod izvesnog broja LHON pacijenata, ali ne i kod pacijenata sa drugim optičkim neuropatijama.

Barboni i saradnici (83), kao i Asand i sa (183) su pokazali da je nazalni pRNFL relativno očuvan kod pacijenata sa DOA i LHON, a u skorašnjem istraživanju Volframov sindrom je redefinisano kao nemitohondrijska bolest upravo po karakterističnom značajnom istanjenju pRNFL u nazalnom kvadrantu (116). Oni sugerišu da je relativno očuvanje pRNFL nazalnog polja karakteristično za mitohondrijalne bolesti. Sličan obrazac je primećen i kod jednog pacijenta sa Volframovim sindromom iz naše kohorte koji je imao jednako ili značajnije istanjenje nazalnog dela pRNFL u odnosu na temporalni. Naši rezultati su potvrdili da kod LHON pacijenata postoji očuvanje nazalnog pRNFL u poređenju sa nonLHON grupom, iako razlika nije bila značajna što ukazuje na različit obrazac istanjivanja pRNFL kod mitohondrijskih i nemitohondrijskih bolesti i definiše novi biomarker LHON-a a to je relativno očuvanje nazalnog pRNFL. Takođe, longitudinalna analiza je pokazala da posle 10 godina počinje izvesno zadebljanje pRNFL-a u temporalnom polju samo u LHON grupi. Ovo polje pRNFL je delimično sastavljeno od nervnih vlakana RGC-a iz centralnog ETDRS kruga i u skladu je sa manjim istanjenjem RNFL-a u centralnom prstenu koje je takođe primećeno u našoj kohorti. Kontinuirano istanjivanje RNFL-a u superiornom temporalnom polju čak i nakon pet godina od početka bolesti, relativno očuvanje nazalnog RNFL-a i do određenog

stepena oporavak temporalnog pRNFL-a mogu biti karakteristike hroničnog LHON-a. Slično zapažanje za pacijente sa mitohondrijalnom optičkom atrofijom objavili su i drugi istraživači. Mashima i sar. (99) sugerišu da bi snopovi nervnih vlakana na temporalnoj strani fovee mogli imati veći potencijal oporavka svoje funkcije nakon početka LHON-a nego oni na nazalnoj strani. Zbog veće prostorne gustine, dendrijska polja patuljastih i parasol ganglijskih ćelija u nazalnom kvadrantu su manja od polja ćelija u temporalnom, gornjem i donjem kvadrantu. Međutim, korelacija debljine makule sa oštrinom vida nije jasna. Moster i sar. (184) pišu da je svaki mikron stanjivanja GCL povezan sa gubitkom vida od 0,05 logMAR, dok Zhang i sar. (185) nisu opisali značajnu korelaciju između BCVA i debljine makule kod pacijenata sa LHON-om. Čak i uz značajno poboljšanje vidne oštrine, prosečna debljina makule nastavlja da se smanjuje što ukazuje da nema direktne veze sa vizuelnom funkcijom (185). U skladu sa ovim, nismo našli značajnu funkcionalnu razliku između grupa ni u oštrini vida ni u elektrofiziološkom nalazu

Oba naša pacijenta sa DNAJC30 mutacijom i svi pacijenti sa novootkrivenim promenama u mtDNK su imali kontinuirano stanjivanje RNFL tokom perioda praćenja što je u skladu sa rezultatima LHON pacijenata kao i sa rezultatima dosadašnjih studija.

Smatra se da osnovne elektrofiziološke karakteristike LHON pacijenata potiču od oštećenja retinalnih ganglijskih ćelija. Zbog toga je PERG koji potiče od retinalnih ganglijskih ćelija, standardni ERG protokol koji se preporučuje za karakterisanje disfunkcije unutrašnjih retinalnih slojeva LHON pacijenata (186). Barboni i sar. su pokazali da su aksoni malog kalibra u papilomakularnom snopu prvi oštećeni u akutnoj fazi bolesti i da se oštećenje dalje širi na ostatak aksona unutar optičkog nerva sa napretkom atrofije optikusa (83). Carelli i sar. su takođe sugerisali da je papilomakularni snop glavna meta u ranim fazama degenerativnog procesa LHON-a (187). U kasnijoj fazi bolesti histopatološke studija opisuju neinflamatornu degeneraciju retinalnih ganglijskih ćelija zajedno sa degeneracijom i demijelinizacijom njihovih aksona (188). Postoje studije koje ističu vezu između disfunkcije oksidativne fosforilacije retinalnih ganglijskih ćelija i ekspresije gena koje su uključene u metabolizam mijelina (189). Efikasnost aksonskog transporta i zdravlje aksona su povezani sa stanjem mijelinizacije i prometa mijelina. Postoji hipoteza od narušenom prometu mijelina kod LHON pacijenata e koja objašnjava da postoji kritičan prag deficita mitohondrija i kada se on postigne nastupa masivni sinhronizovani talas ćelijske smrti i akutna simptomatska faza bolesti (189). Ipak, tačan uzrok i mehanizam oštećenja ostaje nepoznat (190).

U mnogobrojnim studijama je pokazano da se kod LHON pacijenata javlja poremećaj PERG-a i VEP-a. Holder je objavio analizu 48 očiju sa hereditarnim optičkim atrofijama koje uključuju i LHON koja je pokazala da većina očiju (71%) ima i smanjenu amplitudu PERG N95 talasa i produženu latencu VEP P100 talasa (191). Ostale oči su imale ili snižen PERG N95 (17 %), ili produženu latencu VEP P100 (8 %) ili ni jedno (4 %), ali podaci vezano za dužinu trajanja bolesti nisu prikazani (191). Mesec dana od početka bolesti, Shibata i saradnici (190) su pokazali odsustvo

PERG N95 i atenuaciju VEP P100 kod jednog pacijenta mesec dana nakon početka bolesti. Riordan-Eva i sar. (157) su prijavili abnormalan PERG N95 kod 5 LHON pacijenata i normalan kod dva. Iako je VEP P100 u najvećem broju slučajeva abnormalan već na samom početku bolesti, abnormalnost VEP-a ipak može da se pojavi i kasnije. Dorfman i sar. (192) su prikazali slučaj dva brata koji su imali normalan VEP P100 talas mesec dana posle početka bolesti, da bi kasnije došlo do sniženja amplitude i produženja latence.

U radu Jarc Vidmar i sar. je objavljeno da samo 50% pacijenata u akutnoj fazi bolesti ima abnormalnu amplitudu PERG N95 talasa, dok je VEP P100 talas bio abnormalan kod svih pacijenata (59). Kod svih pacijenata sa normalnim PERG N95 diskovi optičkog nerva su bili hiperemični bez bledila što sugeriše da je većina ganglijskih ćelija bila je još uvek vijabilna. Među očima sa abnormalnim PERG N95, 57 % je imalo već vidljivo temporalnu bledilo optičkog diska što sugeriše na značajan gubitak ganglijskih ćelija, dok kod 43% pacijenta bledilo diska nije bilo vidljivo što zapravo ukazuje na mali gubitak ili samo disfunkciju ganglijskih ćelija. Ovo ukazuje na činjenicu da elektrofiziološke metode mogu da se koriste za procenu rezidualne funkcije retinalnih ganglijskih ćelija tokom akutne faze LHON i da rezultati elektrofiziološkog ispitivanja mogu da se koriste kao objektivni biomarkeri u kliničkim studijama.

U hroničnoj fazi bolesti Jarc Vidmar i saradnici (59) su pokazali redukovan PERG N95 i abnormalan VEP (sniženu amplitudu ili produženu latencu) kod svih očiju. Slično tome, studija 11 LHON pacijenata u hroničnoj fazi bolesti je pokazala da je VEP ili nedetektibilan ili jako snižene amplitude i produžene latence (193). U našoj kohorti pacijenata u hroničnoj fazi LHON, VEP P100 talas postao je nedetektabilan kod 7/13 pacijenata (63,63% medijana 42 meseca nakon početka) ili kod 7/9 ukoliko se izuzmu pacijenti sa poboljšanjem vidne oštine i kolornog vida. Sa druge strane, u kohorti pacijenata sa optičkom atrofijom, ali bez identifikovanog genetskog uzroka VEP P100 talas je bio nedetektabilan kod 2/13 (18,18%, medijana 48 meseci nakon početka). N95 je bio abnormalnog oblika kod svih LHON pacijenata, kao i kod pacijenata sa optičkom atrofijom bez identifikovanog genetskog uzroka, a N95/P50 odnos snižen. Slično smanjene amplitude PERG N95/P50 u većini slučajeva kod LHON obolelih su prijavili Zaccardi i saradnici (101).

Oscilatorni potencijali reflektuju interakcije između bipolarnih, amakrinih i ganglijskih ćelija unutrašnje retine (194). Smatra se da su oscilatorni potencijali porekla unutrašnje retine (INL i IPL) gde je specifična lokalizacija amakrinih ćelija koje predstavljaju uglavnom negativni modulatorni povratni odgovor amakrinih ćelija ganglijskim i bipolarnim ćelijama (195,196). Retinalne alteracije prouzrokovane LHON-om se takođe reflektuju u oscilatornim potencijalima (OP) celog polja skotopičnog (DA) i fotopičnog (LA) ERG-a. Interesnatno, u našoj kohorti razlike u fotopičnim oscilatornim potencijalima su postale evidentnije kada su filtracijom uklonjene sporije komponente.

ERG celog polja kod LHON pacijenata je većini studija opisan kao normalan, mada je u nekim istraživanjima pokazano da fotopični b-talas može da bude blago izmenjen (197–199). Sa druge strane, PhNR se pokazao kao efikasan u detekciji alteracija RGC kod LHON pacijenata i danas smatra funkcionalnim biomarkerom LHON-a (200–202). Velika brazilska kohorta LHON pacijenata koji su praćeni tokom dugog niza godina pokazala je da je PhNR pouzdan parameter za detekciju akutnog i subkliničkog gubitka RGC kod obolelih LHON pacijenata i nosioca (201) i ovaj klinički profil je konzistentan nezavisno od vrste mutacije (200). Naši rezultati su potvrdili ovu pretpostavku pokazujući značajnu redukciju PhNR sa pretpostavkom da postoji sačuvan ili relativno sačuvan mehanizam fotoreceptor-bipolarna ćelija (spoljašnja retina), što je pokazano normalnim a- i b-talasom u skotopičnim odgovorima i granično normalnim fotopičnim odgovorima. Prikazani podaci jasno pokazuju da je PhNR značajno redukovan kod LHON pacijenata nevezano od oporavka vidne oštine i da kod pacijenata sa oporavkom vidne oštine tokom longitudinalnog praćenja ne dolazi do oporavka PhNR.

Oscilatorni potencijali ERG-a celog polja su nisko-voltažne električne oscilacije visoke frekvence koje se konzistentno pojavljuju u rastućim fazama b-talasa (203–206). Analiza skotopičnih oscilatornih potencijala je prema preporukama ISCEV-a (207) filtriranjem (~75 – 300 Hz) signala dobijenih standardnim (3.0 cd.s/m^2) skotopičnim full-field ERG. Skotopični oscilatorni potencijali su osetljivi na retinalne promene prouzrokovane npr. dijabetesom (208) i glaukomom (209), kao i drugim stanjima koji utiču na mehanizme unutrašnje retine (210). Individualni oscilatorni potencijali su generisani različitim retinalnim mehanizmima na koje utiču jačina fleša i stanje adaptacije (205,206,210–213).

U našoj grupi pacijenata razlike u skotopičnim OP između kontrola i grupa su nađene za sumu skotopičnih oscilatornih potencijala (sum DA OP). Poređenje pojedinačnih OP pokazalo je da su samo OP2 poremećeni kod LHON pacijenata. Studije su pokazale da su skotopični OP izmenjeni kod pacijenata sa dijabetesom, a bez vidljivih znakova dijabetične retinopatije (214), sa jasnom korelacijom OP nižih amplitudama sa vaskularnim promenama (215). Mikrovaskularne promene se smatraju patogenom karakteristikom i potencijalnim biomarkerom kod LHON pacijenata (216). Imajući u vidu da i kod dijabetesa postoje mikrovaskularne promene moguće je upravo na ovaj način objasniti činjenicu da su kod naših pacijenata bili izmenjene amplitude skotopičnih OP2. Koreliranjem debljine pojedinačnih retinalnih slojeva i vrednosti amplitude OP dobili smo značajnu korelaciju između svih skotopičnih oscilatornih potencijala i debljine OPL sa najjačom korelacijom prisutnom za OP1 i OP2. O poreklu OP debatuje se već nekoliko decada (213,217–219), a rane opservacije su ukazivale da potiču iz retinalnih interneurona (205). Postoji mogućnost da niže OP amplitude nađene kod LHON pacijenata predstavljaju funkcionalne promene amakrinih ćelija, kao što je to slučaj kod pacijenata sa autozomno/dominantnom optičkom atrofijom (220), mada se pri analizi OP promena kod LHON pacijenata ne sme isključiti ni direktan uticaj disfunkcije

retinalnih ganglijskih ćelija (217). Isto tako, na osnovu rezultata korelacije oscilatornih potencijala i slojeva retine, OPL može da bude potencijalni generator oscilatornih potencijala.

Fotopični OP su bili signifikantno redukovani kod LHON pacijenata, a razlike među grupama su bile očiglednije sa aplikacijom filtera viših frekvencija (100 Hz). Ne postoje standardne preporuke za filtriranje OP iz signala fotopičnog ERG-a iako su oni klinički relevantni. Na primer redukovani ili odsutan LA OP2 je primećen kod hereditarnih naslednih retinalnih stanja koja utiču na prenošenje signala između fotoreceptora i bipolarnih ćelija (221). Kod pacijenata sa kongenitalnim stacionarnim noćnim slepilom, LA OP2 i OP3 su odsutni dok je OP4 bio očuvan (222). Ova otkrića ukazuju na poreklo ranih OP distalnije od ganglijskih ćelija (222), a proksimalnije (unutrašnja retina) od generatora OP4. Ovo potvrđuje ranije tvrdnje da kod LHON koji primarno utiče na retinalne ganglijske ćelije, abnormalnost OP4 je prominentnija od promena u brzim komponentama koje potiču iz distalnih delova i odslikavaju disfunkciju spoljašnje retine. DA OP2 amplitude su bile redukovane kod LHON pacijenata (32.6 versus 24.3 μ V, standardna devijacija oko 6 u obe grupe) i ova alteracija nije refletovala ozbiljnost fenotipa. Ipak, ERG defekti LHON pacijenata ukazuju na disfunkciju retinalnih ganglijskih ćelija koja se potvrđuje abnormalnim PhNR-om i PERG odgovorima, kao promenjenim odgovorima unutrašnjih retinalnih komponenti na multifokalnom ERG (223). Svi ovi nalazi ukazuju na retinalne abnormalnosti porekla čepića. Prikazani podaci dalje doprinose evaluaciji puteva čepića kod LHON pacijenata ukazujući na alteracije fotopičkih OP. Ove abnormalnosti su specifično nađene kada su primenjeni filteri koji omogućuju da se dobiju OP signali koji su manje pod uticajem sporih ERG komponenti (224). Iako se full-field ERG uglavnom koristi za detektovanje patogenih promena izazvanih bolestima koje utiču na fotoreceptore i njihove veze sa postreceptorskim ćelijama, oscilatorni potencijali dobijeni iz full-field ERG mogu dodatno da objasne vidnu disfunkciju prouzrokovanu bolestima unutrašnje retine. Trenutne teorije ukazuju na činjenicu da su nervna vlakna retinalnih ganglijskih ćelija blizu fovee visoko zavisna od energetske zaliha koje obezbeđuju mitohondrije. Velike količine mitohondrija postoje u nemijelinizovanim početnim delovima vlakana retinalnih ganglijskih ćelija, anteriorno od lamine kribroze (225). Retinalne ganglijske ćelije porekla papilomakularnog snopa odgovorne su za oštrinu vida i diskriminaciju boja i zahtevaju veliku količinu energije za funkcionisanje. Zbog toga je vid porekla ovih ćelija pod visokim rizikom kod pacijenata sa mitohondrijalnom disfunkcijom (226) što može da utiče na mehanizme unutrašnje retine kao što su oni koji zavise od integriteta bipolarnih i amakrinih ćelija i što donosi novi pogled na patologiju retine kod pacijenata sa LHON-om.

Pacijenti sa nedavno otkrivenim oblikom arLHON su pokazali jednake elektrofiziološke karakteristike kao i pacijenti sa mtLHON-om. U akutnoj fazi kod jednog pacijenta, LHON 18, došlo je do smanjenja PERG N95 talasa što je u skladu sa ranije objavljenim podacima (59). Smanjenje amplitude PERG N95 kod LHON 17 nije bilo prisutno u akutnoj fazi (tokom prvih 4 meseca bolesti). U hroničnoj fazi kod ovog pacijenta je došlo do smanjenja amplitude N95 kao i amplitude P100

talasa koji bio nedetektabilan u 3,5 godine od početka bolesti. Parisi i saradnici su izvestili o produženoj latenci i smanjenoj amplitude VEP P100 koji je ostao nepromenjen tokom perioda praćenja kod većine pacijenata u njihovoj kohorti tokom prve godine bolesti (227). U prikazanom slučaju VEP P100 je takođe ostao produžen i značajno smanjen tokom prve godine. Sa poboljšanjem VA, latenca VEP P100 je počela da se smanjuje i amplituda se poboljšavala. Zbog nedovoljno dostupnih podataka u literaturi za dugotrajno praćenje pacijenata sa arLHON-om, nismo u mogućnosti da uporedimo naše podatke. Pacijent 2 kod koga je postojalo poboljšanjem VO imao je poboljšanje amplitude talasa N95 i P100 na poslednjoj kontroli, 12 godina od početka bolesti. P100 latenca je ostala produžena, a odnos N95/P50 snižen.

Patološka stanja rožnjače poput Fuksove endotelne distrofije i keratokonusa su povezana sa mihohondrijskom disfunkcijom i povećanom produkcijom slobodnih radikala na nivou endotelne ćelije rožnjače (228). U skorije vreme je pokazano da kod nekih genetskih stanja prouzrokovanih mutacijama u mitohondrijskoj DNK poput Kerns Sayre sindroma postoji takođe evidentna kornealna patologija koja se ogleda upravo u pojavi corneae guttate i Fuchsove endotelne distrofije (229–231). Zato se postavlja pitanje da li je i kod drugih bolesti koje su povezane sa mitohondrijskom patologijom prisutna mitohondrijalna disfunkcija i u drugim ćelijama, a ne samo ganglijskim ćelijama retine kao što je do sada mišljeno. Naši rezultati spekuliraju mikroskopije kod 15 pacijenata sa LHON-om su pokazali da postoji statistički značajno smanjenje broja endotelne ćelije u odnosu na prikazane normative za populaciju odgovarajuće starosti što ukazuje da i kod ovih pacijenata postoji izvesni stepen disfunkcije koji klinički nije evidentan.

Kod 6 pacijenata iz naše kohorte primećen je oporavak vidne funkcije različitog stepena. Spontano poboljšanje vidne oštine obično se dešava u roku od godinu dana od početka bolesti, ali se može desiti i decenijama kasnije (232). Najveću stopu delimičnog oporavka od 37-58% imaju pacijenti sa 14484 mutacijom (55,155), kao i pacijenti sa arLHON. Tipično se sa poboljšanjem vidne oštine javlja malo ostrvo vida unutar centralnog defekta vidnog polja (111,233). Raniji uzrast (mlađi od 12 godina), subakutni vremenski tok gubitka vida i veći optički disk su povezani sa boljom vidnom prognozom (81).

Sve osobe su imale gubitak vida sa centrocekalnim skotomom, abnormalni PERG N95 i VEP P100 talas i stanjivanje nervnih vlakana retine na OCT. Tri pacijenta su bili nosioci tri različite tipične mutacije, dva pacijenta su imali arLHON, a jedan pacijent VUS čija je patogenost potvrđena testovima funkcije mitohondrija. Kod pacijenata sa značajnim oporavkom vidne oštine prvi znaci oporavka su se javili u period od 14 do 24 meseca. Pacijentkinja sa 11778 mutacijom je nakon 25 meseci od početka bolesti imala prve znake poboljšanja vidne oštine, ali se tokom 15 godina vidna oština menjala i varirala od brojanja prstiju na 1m do 0,2 koliko je bila na poslednjem pregledu.

Kod pacijenta sa arLHON i sa skromnim oporavkom vidne funkcije, prvi znaci oporavka su se javili 7 godina nakon početka bolesti nastavili tokom narednih 7 godina.

Potpuni oporavak vidne oštine, ali bez oporavka kolornog vida postignut je kod jednog pacijenta, nosioca mutacije 14484 koja se najčešće povezuje sa oporavkom vidne oštine kod mtLHON (prijavljeni procenti u literaturi su od 37 do 65%). Mutacije u DNAJC30 genu takođe imaju bolju vidnu prognozu (61) sa klinički reevantnim poboljšanjem u 50% netretiranih i 80% tretiranih pacijenata.

Oporavak vidne oštine kod jednog arLHON pacijenta iz naše kohorte bio je praćen potpunim oporavkom kolornog vida.

Vreme poboljšanja vidne oštine pokazano u literaturi kod lečenih arLHON pacijenata je $13,0 \pm 10,4$ nelečenih pacijenata sa arLHON je $30,3 \pm 25,8$ meseci (61), dok kod mtLHON je $17,2 \pm 7,8$ kod pacijenata tretiranih Idebentonom i $27,7 \pm 22,5$ meseci kod netretiranih (234). Poboljšanje vidne oštine kod naših pacijenata sa arLHON počelo je u 84. (pacijent tretiram idebentonom u kasnoj hroničnoj fazi) i 14. mesecu.

Vreme početka bolesti se kod arLHON dešava ranije (srednja vrednost $19,9 \pm 7,9$ godina) u poređenju sa mtLHON (srednja vrednost $30,7 \pm 15,0$ godina). Oba naša pacijenta su imala dubok pad vidne oštine u starosti 17 i 18 (srednja vrednost 17.5).

Takođe, prijavljeno srednje vreme između početka bolesti na dva oka je 7 dana kod arLHON sa čak 46.7% pacijenata sa bilateralnim početkom bolesti.

Elektrofiziološki znaci poboljšanja u dostupnoj literaturi su kontradiktorni. Jedna studija je prijavila oporavak PERG i VEP kod LHON pacijenata sa oporavkom vidne funkcije(191), dok druga studija nije prijavila promenu ni VEP ni PERG (98).

Jedan od naših pacijenata sa oporavkom vidne funkcije je pokazao konstrikciju centralnog skotoma sa razvojem centralnog ostrva vida, takođe je imao i poboljšanje VEP P100 što amplitude i latence, bez poboljšanja PERG N95 amplitude. Drugi pacijent koji je pokazao poboljšanje vidne oštine i vidnog polja nije imao nikakvo poboljšanje PERG ili VEP što pokazuje da se vidna oština može poboljšati i sa relativno malim brojem reaktivisanih ganglijskih ćelija odnosno aksona koje ne mogu da se detektuju PERGom ili VEPom.

Kod svih naših pacijenata sa poboljšanjem vidne oštine došlo je do porasta vrednosti N95 amplitude, ali je ovaj talas i dalje bio nepravilnog oblika u nivou izolacije, a odnos N95/P50 je bio abnormalan, tačnije ispod 1.1 što ukazuje na još uvek prisutnu disfunkciju ganglijskih ćelija (9). Ipak, vrednost ovog parametra je bila statistički značajno različita (viša) u odnosu na pacijente bez oporavka vidne funkcije($p=0.02$) što nam ukazuje na potencijalni elektrofiziološki biomarker oporavka, a poboljšanje amplitude N95 tokom perioda praćenja može odgovarati učenom funkcionalnom poboljšanju. Isto tako i amplituda P100 talasa je bila značajno viša kod pacijenata sa poboljšanjem vidne oštine. U grupi bez poboljšanja vidne oštine kod polovine očiju VEP P100 talas postao nedetektabilan tokom vremena, dok je to bio slučaj sa samo 1/10 očiju sa

poboljšanjem vidne oštine. Pacijenti sa poboljšanjem vidne oštine kod kojih postoji longitudinalno praćenje pokazuju tendenciju skraćivanja latence P100 talasa (normalizacija samo kod jednog pacijenta) i normalizaciju amplitude.

Strukturni znaci poboljšanja ispitivani su u mnogobrojnim studijama. Barboni i saradnici su uporedili debljinu sloja retinalnih nervnih vlakana u svim kvadrantima kod LHON pacijenata sa poboljšanjem vidne oštine. Zaključili su da pacijenti sa LHON-om sa oporavkom vidne oštine pokazuju jaču povezanost debljine RNFL-a sa očuvanjem vidnog polja nego sa konačnom oštrinom vida i da poboljšanje vidne oštine može biti posledica ponovnog dobijanja funkcije neurona verovatno remijelinizacijom.

Mashima i saradnici (99) su sugerisali da bi za oporavak vidne oštine mogli da budu odgovorni snopovi nervnih vlakana na temporalnoj strani fovee koji imaju veći potencijal za oporavak svoje funkcije. Moster i dr. (184) sugerišu da je svaki mikron stanjivanja GCL povezan sa gubitkom vida od 0,05 logMAR, dok Zhang i sar. (185) nisu opisali značajnu korelaciju između BCVA i debljine makule kod pacijenata sa LHON-om. Čak i uz značajno poboljšanje vidne oštine, ne povećava se prosečna debljina makule niti pRNFL što ukazuje da nema postoji direktna veza oporavka strukture retine sa vizuelnom funkcijom (185). Sa druge strane, Boreli i saradnici su prijavili da je značajno istanjenje gornjeg i temporalnog parafovealnog regiona povezano sa slabijom vidnom prognozom kod LHON pacijenata kod pacijenata koji su tretirani idebenonom (150). U našoj studiji u hroničnoj fazi bolesti postojala je značajna razlika u debljini GCC u unutrašnjem ETDRS prstenu koje odgovara parafovealnim segmentima koji su navedeni kod Borelija i saradnika. Ovo sugeriše da je manje inicijalno propadanje GCC povezano sa boljom vidnom prognozom. Sa druge strane postojalo je i značajno zadebljanje INL i OPL u istom prstenu kod pacijenata sa očuvanjem vidne oštine.

Mehanizam oporavka vidne funkcije je još uvek neobjašnjen. Jedna teorija je da postoji podtip vijabilnih, ali neaktivnih retinalnih ganglijskih ćelija tzv „sleeping cells“ (235). Oporavak funkcije aksona ganglijskih ćelija može da bude rezultat remijelinizacije prethodno delimično demijelinizovanih pošteđenih aksona (225) ili rezolucije peripapilarnog edema i blokade aksoplazmatskog transporta što je potvrđeno ubrzanjem provođenja primećenom kod pacijenata sa poboljšanjem vidne oštine u ovoj studiji. Postmortalna analiza slojeva nervnih vlakana kod pacijenata sa LHON-om pokazala je znake demijelinizacije koji bi mogli biti uzročnici razvoja bolesti (187).

Wang i sar. (182) su sugerisali da u LHON-u postoje uspavane RGC koji polako umiru tokom prvih pet godina bolesti. Sa druge strane u kohorti pacijenata sa poboljšanjem u odnosu na pacijente bez poboljšanja postojala je značajna očuvanost donjeg temporalnog peripapilarnog RNFL. Na osnovu naših rezultata smatramo da bi očuvanje donjeg temporalnog segmenta moglo da bude strukturni biomarker oporavka kod LHON-a.

Longitudinalno praćenje pacijenata sa poboljšanjem vidne oštine u našoj studiji je pokazalo oporavak amplitude OP2 i OP3. Isto tako primećena je i značajna negativna korelacija između debljine OPL i amplitude OP2 kod LHON pacijenata. Ovo nam ukazuje na mogućnost remodelacije retine kao mehanizma opotavka vidne funkcije, koji je opisan kod bolesti fotoreceptora (236–239). Poznato je da bolesti poput AMD i RP koje rezultuju u gubitku fotoreceptorskog inputa u neuralnu retinu započinje kaskadu događaja koji zauvek menjaju neuralne retinalne structure i profile farmakološkog odgovora retinalnih neurona i njihove povezanosti. Remodeling retine se dešava u svim formama degeneracije i smatra se pravom deaferencijacijom neuralne retine koja prolazi kroz tri faze strukturne i funkcionalne revizije. Tokom prve faze remodelovanja u bolestima retine koje pošteđuju čepiće dolazi do delokalizacije rodopsina od unutrašnjih segmenaa fotoreceptora do ćelijskih membrana koje se u unutrašnji nuklearni sloj i sloj ganglijskih ćelija retine (240) Molekularne alteracije ekspresije glutamatskih receptora dendrita bipolarnih ćelija menja farmakološki odgovor bipolarnih ćelija iz “uključeno” (engl. *on*) u “isključeno (engl. *off*)” (241). Ovo se dešava pre smrti fotoreceptora. U fazi 2 remodelovanja dolazi do smrti fotoreceptora i ablacije fotoreceptorskih ćelija. Milerove ćelije hipertrofiraju i kolabiraju u odsustvu bipolarnih ćelija i fotoreceptora i stvaraju zatvarač koji izoluje neuralnu retinu od RPE i horioideje (236). Bipolarne ćelije su u drugoj fazi potpuno deaferentovane, ne samo fiziološki, kroz eliminaciju glutamatskih receptora u spoljašnjem pleksiformnom sloju, nego i anatomski, kroz fizičku retrakciju dendrita bipolarnih ćelija koje rezultuje u promenjenoj morfologiji bipolarnih ćelija. Druge retinalne promene koje se dešavaju u drugoj fazi podrazumevaju anomalno klijanje, koje se često spaja u strukture koje se nazivaju mikroneuromi, uz doprinose ne samo bipolarnih ćelija već i drugih klasa neuronskih ćelija, uključujući amakrine i horizontalne ćelije i do ekstenzije procesa u IPL (241). Faza tri je karakterisana perzistentnim remodelovanjem koje dalje preispituje fundamentalnu topologiju retine bidirekcionom migracijom neurona preko vertikalne ose retine, koja je dokazana migracijom preživelih bipolarnih i amakrinih ćelija u sloj ganglijskih ćelija (237). Isto tako migracija ganglijskih ćelija u INL je primećena u mnogim degenerativnim bolestima (239,242–244). Evolucija procesa svih tipova neurona se nastavlja u fazi tri, sa formiranja fascikulusa, koji mogu da idu u skupovima i prelaze velike distance unutar neuralne retine (>100 mikrona), dok se drugi spajaju formirajući petlje ili snopove novih neuropila nazvanih mikroneuromi (239), koji se formiraju izvan normalne laminacije unutrašnjeg pleksiformnog sloja (236,239,243,245). Postoji mogućnost da se kod pacijenata sa LHON dešava strukturno remodelovanje retine prouzrokovana propadanjem ganglijskih ćelija, koje bi išla u suprotnom smeru u odnosu na opisanou remodelovanje kod bolesti prouzrokovanih propadanjem fotoreceptora, mada su za potvrđivanje ovih pretpostavki neophodni histopatološke analize slojeva retine.

Kohorta pacijenata obuhvaćenih tezom je uključila i tri pacijenta koji su od ranog detinjstva slabovidni na jedno oko. U slučaju slabovidnih očiju i LHON-a, teško je proceniti koji je tačan uzrok gubitka vida kod pacijenata. Postavlja se pitanje da li je slabovidost zapravo LHON koji se javio u

detinjstvu na jednom oku, a zatim godinama kasnije na drugom ili je u pitanju bio istovremeni pad vida na oba oka, ali, zbog već prethodno niske oštine vida na slabovidim očima, pacijenti ne primećuju promene. Kod jednog od tri prikazana pacijenta kod koga je došlo do oporavka vidne oštine, oština vida na slabovidom oku se u momentu javljanja LHONa blago smanjila, a zatim poboljšala što podržava drugu teoriju. Isto tako je ambliopno oko imalo isti obrazac produženja latence i smanjenja amplitude VEP P100 talasa kao i u tom trenutku zahvaćeno desno oko. Takođe, došlo je i do poboljšanje fiksacije i osetljivosti prikazano na mikroperimetriji kao i kod desnog oka na kome se vidna funkcija poboljšala.

Druga mogućnost o kojoj se govori je da je LHON u ranom detinjstvu pogodio ambliopno oko tako da se oština vida na tom oku nikada nije razvila. LHON sa početkom u detinjstvu je retkost (manje od 10% kod dece mlađe od 12 godina) i obično ima bolju prognozu (11). Skorašnja publikacija Barbonija i saradnika sugerisala je novu podelu LHONa sa početkom u detinjstvu na osnovu prezentacije i kliničkog toka bolesti: subakutni bilateralni (66.7%), podmukli bilateralni (17.3%), unilateralni (11.1%), i subklinički bilateralni (4.9%)(90). Takođe su precizirali da je vidna prognoza najbolja kod pacijenata starosti između 3 i 9 godina sa najvećom inicijalnom debljinom sloja ganglijskih ćelija.

Barboni i saradnici su prijavili pet slučajeva jednostranog LHON-a koji se desio kod dece pre pete godine (86) Ohdane i saradnici su prikayali slučaj bilateralnog LHON-a sa razlikom u početku bolesti između dva oka od 18 godina (85). Kao i kod našeg pacijenta, na obolelom oku se takođe razvio konvergentni strabizam i došlo je do blage atrofije optičkog diska kao i promena u vidnom polju i kolornom vidu. Ne znamo tačno vreme kada je prvi napad na ambliopnim očima naših pacijenata teoretski mogao da se desi, ali u slučaju pacijenta sa konvergentnim strabizmom, to je moralo biti pre pete godine (konvergentni strabizam se dešava ako je oština vida na jednom oku niska pre pete godine, dok u kasnijoj dobi razvija se divergentni strabizam) pa bi najkraće moguće vreme između početka bolesti na dva oka bilo 16 godina (85). Kod pacijenta koji je od LHON oboleo u starijem životnom dobu, potencijalno vreme između zahvatanja dva oka bilo bi preko 50 godina što je veoma neobično jer 97% obolelih ima zahvaćenost drugog oka u roku od jedne godine (9,56). Ovu vremensku distance između zahvatanja dva oka Ohden objašnjava mogućim prisustvom većeg broja kopija mutirane mtDNK u jednom optičkom nervu ili činjenicom da je ekspresija mitohondrija u drugom oku povećana nakon napada na prvo (93).Comez i saradnici (232) su uporedili karakteristike optičkog diska kod ambliopičnih i neambliopičnih očiju i otkrili da ambliopija ne utiče na glavu optičkog nerva ili debljinu RNFL-a. Dva od tri pacijenta iz naše kohorte su imala početno bledilo optičkog nerva na ambliopnom oku u trenutku LHON epizode na do tada zdravom oku, što nije u skladu sa nalazima fundoskopije karakterističnim za ambliopiju i više naginje ranom napadu LHON-a (232)ili sekvencijalnom početku koji je prvo zahvatio ambliopno oko. Sa druge strane treći pacijent je pokazao karakterističnu hiperemiju diska, tortuoзитet krvnih sudova i pseudoedem koji su bili identični na oba oka. Zbog različitog ispoljavanja bolesti koji može

značajno da odstupa od standardnog načina prezentacije LHON-a, potrebno je da se pri svakom pregledu deteta sa suspektnom abliopijom urade dodatna ispitivanja naročito ako je prisutno bledilo papile vidnog živca da bi se isključila mogućnost LHON-a.

6 ZAKLJUČCI

Ovo istraživanje je dovelo do sledećih zaključaka:

Genetskim ispitivanjem koje je deo ove teze identifikovano je 5 novih promena u mitohondrijskoj DNK (varijante nepoznatog značaja - VUS) i jedan novi gen u nDNK, a koji su potencijalno povezani sa nastankom optičke atrofije.

Pacijenti sa novim promenama u mtDNK su imali slične fenotipske karakteristike kao pacijenti sa jednom od tri tipične LHON mutacije.

Kapacitet oksidativne fosforilacije na nivou kompleksa I u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa LHON bioje značajno niži u odnosu na kontrolne uzorke zdravih ispitanika, uz porast produkcije superoksidnog anjona i depolarizaciju unutrašnje membrane mitohondrija u uslovima oksidativnog stresa.

Mononuklearne ćelije periferne krvi pacijenata sa novootkrivenim promenama u mtDNK su pokazale iste karakteristike kao i MNČPK pacijenata sa tipičnim LHON mutacijama, što ukazuje na patogenost novoidentifikovanih promena i omogućuje klasifikaciju ovih varijanti nepoznatog značaja (VUS) kao verovatno patogenih.

U odnosu na nonLHON pacijente postoji jasno očuvanje unutrašnjih retinalnih slojeva i superiornog temporalnog peripapilarnog RNFL, kao i blago zadebljanje ovih slojeva posle deset godina trajanja bolesti. Relativno očuvanje GCC u centru ETDRS predstavlja potencijalni strukturni biomarker LHON-a I strukturni temelj za poboljšanje vidne funkcije kod nekih pacijenata sa LHON.

Autozomno recesivni LHON pokazuje slične karakteristike kao i mtLHON, ali sa relativno boljom funkcijom kompleksa I i boljom dugoročnom prognozom

Iako PERG i VEP predstavljaju zlatni standard u procesu fenotipske karakterizacije pacijenata sa LHON, full-field ERG može da se koristi u svakodnevnoj kliničkoj praksi prilikom pregleda pacijenata s optičkim neuropatijama u procesu diferencijalne dijagnoze. Skotopični OP2 i fotopični oscilatorni potencijali full-field ERG na visokim frekvencijama filtriranja su potencijalni novi retinalni biomarker LHON-a.

Spontano poboljšanje vidne oštine je povezano sa debljim GCC u unutrašnjem ETDRS prstenu i debljim donjim temporalnim segmentom peripapilarnog RNFL. Poboljšanje amplitude i latence P100 talasa, amplitude N95 talasa i N95/P50 odnosa su glavne funkcionalne karakteristike spontanog poboljšanja vidne oštine, a poboljšanje OP2 amplitude sugeriše postojanje remodelovanja u unutrašnjoj retini.

Kada smo suočeni sa unilateralnim slabim vidom, naročito ukoliko postoji optička atrofija na tom oku, ne treba isključiti mogućnost LHON-a u ranom detinjstvu kao uzroka slabog vida i zahvatanje drugog oka decenijama kasnije.

7 LITERATURA

1. Rimessi A, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. The versatility of mitochondrial calcium signals: From stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2008 Jul;1777(7-8):808-16.
2. Distler AM, Kerner J, Hoppel CL. Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes. *PROTEOMICS.* 2008 Oct;8(19):4066-82.
3. Houtkooper RH, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Aug;65(16):2493-506.
4. Benard G, Rossignol R. Ultrastructure of the Mitochondrion and Its Bearing on Function and Bioenergetics. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Aug;10(8):1313-42.
5. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 2000 Jul;25(7):319-24.
6. Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2006 May;1763(5-6):542-8.
7. Saccone C, Gissi C, Lanave C, Larizza A, Pesole G, Reyes A. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene.* 2000 Dec;261(1):153-9.
8. Wallace DC. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu Rev Genet.* 2005 Dec 1;39(1):359-407.
9. DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol.* 2013 Aug;9(8):429-44.
10. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N Engl J Med.* 2003 Jun 26;348(26):2656-68.
11. Schon EA, DiMauro S. Mitochondrial Mutations: Genotype to Phenotype. In: Chadwick DJ, Goode J, editors. *Novartis Foundation Symposia* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2008 [cited 2022 Jun 8]. p. 214-33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470725207.ch15>
12. Carelli V, Achilli A, Valentino ML, Rengo C, Semino O, Pala M, et al. Haplogroup Effects and Recombination of Mitochondrial DNA: Novel Clues from the Analysis of Leber Hereditary Optic Neuropathy Pedigrees. *Am J Hum Genet.* 2006 Apr;78(4):564-74.

13. Shoubridge EA, Wai T. Mitochondrial DNA and the Mammalian Oocyte. In: Current Topics in Developmental Biology [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2022 Jun 3]. p. 87–111. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0070215306770041>
14. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, et al. Mitochondrial diseases. Nat Rev Dis Primer. 2016 Dec 22;2(1):16080.
15. Baracca A, Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baruzzi A, Schapira AHV, et al. Severe Impairment of Complex I-Driven Adenosine Triphosphate Synthesis in Leber Hereditary Optic Neuropathy Cybrids. Arch Neurol. 2005 May 1;62(5):730.
16. Lee H mo, Das TK, Rousseau DL, Mills D, Ferguson-Miller S, Gennis RB. Mutations in the Putative H-Channel in the Cytochrome *c* Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* Show That This Channel Is Not Important for Proton Conduction but Reveal Modulation of the Properties of Heme *a*. Biochemistry. 2000 Mar 1;39(11):2989–96.
17. Lenaz G, Genova ML. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. Am J Physiol-Cell Physiol. 2007 Apr;292(4):C1221–39.
18. Ludwig B, Bender E, Arnold S, Hüttemann M, Lee I, Kadenbach B. Cytochrome *c* Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation. ChemBioChem. 2001 Jun 1;2(6):392–403.
19. Palmieri F. Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg. 2008 Jul;1777(7–8):564–78.
20. Rimessi A, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R. The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. Biochim Biophys Acta. 2008 Jul-Aug;1777(7-8):808-16.
21. Acín-Pérez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernández-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Bruno C, et al. Respiratory Complex III Is Required to Maintain Complex I in Mammalian Mitochondria. Mol Cell. 2004 Mar;13(6):805–15.
22. Schäfer E, Dencher NA, Vonck J, Parcej DN. Three-Dimensional Structure of the Respiratory Chain Supercomplex I₁ III₂ IV₁ from Bovine Heart Mitochondria. Biochemistry. 2007 Nov 1;46(44):12579–85.
23. Schägger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U. Significance of Respirasomes for the Assembly/Stability of Human Respiratory Chain Complex I. J Biol Chem. 2004 Aug;279(35):36349–53.

24. Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*. 2004 Sep 1;382(2):511–7.
25. Chan DC. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell*. 2006 Jun;125(7):1241–52.
26. Fato R, Bergamini C, Bortolus M, Maniero AL, Leoni S, Ohnishi T, et al. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg*. 2009 May;1787(5):384–92.
27. Brandt U, Kerscher S, Dröse S, Zwicker K, Zickermann V. Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism? *FEBS Lett*. 2003 Jun 12;545(1):9–17.
28. Lenaz G, Baracca A, Fato R, Genova ML, Solaini G. Mitochondrial Complex I: structure, function, and implications in neurodegeneration. *Ital J Biochem*. 2006 Dec;55(3–4):232–53.
29. Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, et al. Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Aging. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Apr;959(1):199–213.
30. Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, et al. Mitochondrial DNA Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Science*. 1988 Dec 9;242(4884):1427–30.
31. Moura ALA, Nagy BV, La Morgia C, Barboni P, Oliveira AGF, Salomão SR, et al. The Pupil Light Reflex in Leber's Hereditary Optic Neuropathy: Evidence for Preservation of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2013 Jul 2;54(7):4471.
32. Wallace DC. Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annu Rev Biochem*. 2007 Jun 7;76(1):781–821.
33. Graff C, Bui TH, Larsson NG. Mitochondrial diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2002 Oct;16(5):715–28.
34. Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-All Z, et al. Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2006 Aug;32(4):359–73.
35. Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 2003 Mar 15;370(3):751–62.

36. Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet.* 2001 May;2(5):342–52.
37. Terluk MR, Kapphahn RJ, Soukup LM, Gong H, Gallardo C, Montezuma SR, et al. Investigating Mitochondria as a Target for Treating Age-Related Macular Degeneration. *J Neurosci.* 2015 May 6;35(18):7304–11.
38. Zeviani M, Carelli V. Mitochondrial Retinopathies. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 25;23(1):210.
39. Levin LA. Mechanisms of retinal ganglion specific-cell death in Leber hereditary optic neuropathy. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2007;105:379–91.
40. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res.* 2004 Jan;23(1):53–89.
41. Provencio I, Rollag MD, Castrucci AM. Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature.* 2002 Jan;415(6871):493–493.
42. Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci.* 2008 Jan;31(1):27–36.
43. Do MTH, Kang SH, Xue T, Zhong H, Liao HW, Bergles DE, et al. Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells. *Nature.* 2009 Jan;457(7227):281–7.
44. Allen AE, Storchi R, Martial FP, Petersen RS, Montemurro MA, Brown TM, et al. Melanopsin-Driven Light Adaptation in Mouse Vision. *Curr Biol.* 2014 Nov;24(21):2481–90.
45. Hannibal J, Kankipati L, Strang CE, Peterson BB, Dacey D, Gamlin PD. Central projections of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the macaque monkey: Central projections of intrinsically photosensitive RGCs in macaque. *J Comp Neurol.* 2014 Jul 1;522(10):Spc1–Spc1.
46. Zaidi FH, Hull JT, Peirson SN, Wulff K, Aeschbach D, Gooley JJ, et al. Short-Wavelength Light Sensitivity of Circadian, Pupillary, and Visual Awareness in Humans Lacking an Outer Retina. *Curr Biol.* 2007 Dec;17(24):2122–8.
47. Horiguchi H, Winawer J, Dougherty RF, Wandell BA. Human trichromacy revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jan 15;110(3):E260-269.
48. Erickson RP. Leber's optic atrophy, a possible example of maternal inheritance. *Am J Hum Genet.* 1972 May;24(3):348–9.

49. VON GRAEFE A. Ein ungewöhnlicher Fall von hereditäre Amaurose. 1958. 4:266–8.
50. Man PYW. Mitochondrial DNA haplogroup distribution within Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *J Med Genet*. 2004 Apr 1;41(4):e41–e41.
51. Imai Y, Moriwaki D. A probable case of cytoplasmic inheritance in man: A critique of leber's disease. *J Genet*. 1936 Oct;33(2):163–7.
52. Van Senus AHC. Leber's disease in the Netherlands. *Doc Ophthalmol*. 1963 Jan;17(1):1–162.
53. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The Epidemiology of Leber Hereditary Optic Neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*. 2016 Jun;98(6):1271.
54. Mascialino B, Leinonen M, Meier T. Meta-analysis of the prevalence of Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations in Europe. *Eur J Ophthalmol*. 2012 May;22(3):461–5.
55. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet*. 2008 Mar 18;46(3):145–58.
56. Newman NJ. Hereditary Optic Neuropathies: From the Mitochondria to the Optic Nerve. *Am J Ophthalmol*. 2005 Sep;140(3):517.e1-517.e9.
57. Valentino ML, Barboni P, Ghelli A, Bucchi L, Rengo C, Achilli A, et al. The ND1 gene of complex I is a mutational hot spot for Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol*. 2004 Nov;56(5):631–41.
58. Achilli A, Iommarini L, Olivieri A, Pala M, Hooshiar Kashani B, Reynier P, et al. Rare Primary Mitochondrial DNA Mutations and Probable Synergistic Variants in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. Chan SSL, editor. *PLoS ONE*. 2012 Aug 3;7(8):e42242.
59. Jarc-Vidmar M, Tajnik M, Breclj J, Fakin A, Sustar M, Najj M, et al. Clinical and electrophysiology findings in Slovene patients with Leber hereditary optic neuropathy. *Doc Ophthalmol*. 2015 Jun;130(3):179–87.
60. Gerber S, Ding MG, Gérard X, Zwicker K, Zanlonghi X, Rio M, et al. Compound heterozygosity for severe and hypomorphic *NDUFS2* mutations cause non-syndromic LHON-like optic neuropathy. *J Med Genet*. 2017 May;54(5):346–56.
61. Stenton SL, Sheremet NL, Catarino CB, Andreeva NA, Assouline Z, Barboni P, et al. Impaired complex I repair causes recessive Leber's hereditary optic neuropathy. *J Clin Invest*. 2021 Mar 15;131(6):e138267.

62. Ji Y, Jia X, Li S, Xiao X, Guo X, Zhang Q. Evaluation of the X-linked modifier loci for Leber hereditary optic neuropathy with the G11778A mutation in Chinese. *Mol Vis*. 2010 Mar 11;16:416–24.
63. Giordano C, Iommarini L, Giordano L, Maresca A, Pisano A, Valentino ML, et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2014 Feb;137(2):335–53.
64. Caporali L, Maresca A, Capristo M, Del Dotto V, Tagliavini F, Valentino ML, et al. Incomplete penetrance in mitochondrial optic neuropathies. *Mitochondrion*. 2017 Sep;36:130–7.
65. Hudson G, Carelli V, Spruijt L, Gerards M, Mowbray C, Achilli A, et al. Clinical Expression of Leber Hereditary Optic Neuropathy Is Affected by the Mitochondrial DNA–Haplogroup Background. *Am J Hum Genet*. 2007 Aug;81(2):228–33.
66. Jiang P, Jin X, Peng Y, Wang M, Liu H, Liu X, et al. The exome sequencing identified the mutation in YARS2 encoding the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase as a nuclear modifier for the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet*. 2016 Feb 1;25(3):584–96.
67. Jacobi FK, Leo-Kottler B, Mittelviehhaus K, Zrenner E, Meyer J, Pusch CM, et al. Segregation Patterns and Heteroplasmy Prevalence in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. 2001;42(6):7.
68. Hudson G, Keers S, Yu-Wai-Man P, Griffiths P, Huoponen K, Savontaus ML, et al. Identification of an X-chromosomal locus and haplotype modulating the phenotype of a mitochondrial DNA disorder. *Am J Hum Genet*. 2005 Dec;77(6):1086–91.
69. Shankar SP, Fingert JH, Carelli V, Valentino ML, King TM, Daiger SP, et al. Evidence for a Novel X-Linked Modifier Locus for Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ophthalmic Genet*. 2008 Jan;29(1):17–24.
70. Yen M, Wang A, Wei Y. Leber's hereditary optic neuropathy: A multifactorial disease. *Prog Retin Eye Res*. 2006 Jul;25(4):381–96.
71. Carelli V. Optic nerve degeneration and mitochondrial dysfunction: genetic and acquired optic neuropathies. *Neurochem Int*. 2002 May;40(6):573–84.
72. Carelli V, d'Adamo P, Valentino ML, La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Caporali L, et al. Parsing the differences in affected with LHON: genetic versus environmental triggers of disease conversion. *Brain*. 2016 Mar;139(3):e17–e17.

73. Danielson SR, Wong A, Carelli V, Martinuzzi A, Schapira AHV, Cortopassi GA. Cells Bearing Mutations Causing Leber's Hereditary Optic Neuropathy Are Sensitized to Fas-induced Apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 Feb;277(8):5810–5.
74. Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M. Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy cybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and Endonuclease G. *Apoptosis*. 2005 Oct;10(5):997–1007.
75. Giordano C, Montopoli M, Perli E, Orlandi M, Fantin M, Ross-Cisneros FN, et al. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2011 Jan;134(1):220–34.
76. Giordano L, Deceglie S, d'Adamo P, Valentino ML, La Morgia C, Fracasso F, et al. Cigarette toxicity triggers Leber's hereditary optic neuropathy by affecting mtDNA copy number, oxidative phosphorylation and ROS detoxification pathways. *Cell Death Dis*. 2015 Dec 17;6:e2021.
77. Sadun AA, Win PH, Ross-Cisneros FN, Walker SO, Carelli V. Leber's hereditary optic neuropathy differentially affects smaller axons in the optic nerve. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2000;98:223–32; discussion 232-235.
78. Wang D, Liu HL, Du YY, Yuan J, Li X, Tian Z, et al. Characterisation of thickness changes in the peripapillary retinal nerve fibre layer in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol*. 2021 Aug;105(8):1166–71.
79. La Morgia C, Carelli V, Sadun AA. Retina and melanopsin neurons. In: *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2021 [cited 2022 Aug 21]. p. 315–29. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128199756000200>
80. Carelli V, Carbonelli M, de Coo IF, Kawasaki A, Klopstock T, Lagrèze WA, et al. International Consensus Statement on the Clinical and Therapeutic Management of Leber Hereditary Optic Neuropathy. *J Neuroophthalmol*. 2017 Dec;37(4):371–81.
81. Savini G, Barboni P, Valentino M, Montagna P, Cortelli P, Denegri A, et al. Retinal nerve fiber layer evaluation by optical coherence tomography in unaffected carriers with Leber's hereditary optic neuropathy mutations. *Ophthalmology*. 2005 Jan;112(1):127–31.
82. Balducci N, Cascavilla ML, Ciardella A, La Morgia C, Triolo G, Parisi V, et al. Peripapillary vessel density changes in Leber's hereditary optic neuropathy: a new biomarker. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2018 Dec;46(9):1055–62.

83. Barboni P, Carbonelli M, Savini G, Ramos C do VF, Carta A, Berezovsky A, et al. Natural History of Leber's Hereditary Optic Neuropathy: Longitudinal Analysis of the Retinal Nerve Fiber Layer by Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*. 2010 Mar;117(3):623–7.
84. Hwang TJ, Karanjia R, Moraes-Filho MN, Gale J, Tran JS, Chu ER, et al. Natural History of Conversion of Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Ophthalmology*. 2017 Jun;124(6):843–50.
85. Ohden KL, Tang PH, Lilley CC, Lee MS. Atypical Leber Hereditary Optic Neuropathy: 18 Year Interval Between Eyes. *J Neuroophthalmol*. 2016 Sep;36(3):304–304.
86. Barboni P, Savini G, Valentino ML, La Morgia C, Bellusci C, De Negri AM, et al. Leber's Hereditary Optic Neuropathy with Childhood Onset. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2006 Dec 1;47(12):5303.
87. Majander A, Bowman R, Poulton J, Antcliff RJ, Reddy MA, Michaelides M, et al. Childhood-onset Leber hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol*. 2017 Nov;101(11):1505–9.
88. Yu-Wai-Man P, Bateman DE, Hudson G, Griffiths PG, Chinnery PF. Leber Hereditary Optic Neuropathy Presenting in a 75-Year-Old Man. *J Neuroophthalmol*. 2008 Jun;28(2):155.
89. Dimitriadis K, Leonhardt M, Yu-Wai-Man P, Kirkman MA, Korsten A, De Coo IF, et al. Leber's hereditary optic neuropathy with late disease onset: clinical and molecular characteristics of 20 patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2014 Dec;9(1):158.
90. Barboni P, La Morgia C, Cascavilla ML, Hong EH, Battista M, Majander A, et al. Childhood-Onset Leber Hereditary Optic Neuropathy—Clinical and Prognostic Insights. *Am J Ophthalmol*. 2023 May;249:99–107.
91. Kim J, Medsinge A, Chauhan B, Wiest C, Scanga H, Monaghan R, et al. Coenzyme Q10 in the Treatment of Corneal Edema in Kearns-Sayre: Is There an Application in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy? *Cornea*. 2016 Sep;35(9):1250–4.
92. Rütther K, Ehlich P, Philipp A, Eckstein A, Zrenner E. Prognostic value of the pattern electroretinogram in cases of tumors affecting the optic pathway. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 1998 Apr;236(4):259–63.
93. Holder GE. Significance of abnormal pattern electroretinography in anterior visual pathway dysfunction. *Br J Ophthalmol*. 1987 Mar 1;71(3):166–71.

94. Ryan S, Arden GB. Electrophysiological discrimination between retinal and optic nerve disorders. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol*. 1988 Apr;68(3-4):247-55.
95. Harter MR, White CT. Evoked cortical responses to checkerboard patterns: Effect of check-size as a function of visual acuity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1970 Jan;28(1):48-54.
96. Jones R, Keck MJ. Visual evoked response as a function of grating spatial frequency. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1978 Jul;17(7):652-9.
97. Majander A, Robson AG, João C, Holder GE, Chinnery PF, Moore AT, et al. The pattern of retinal ganglion cell dysfunction in Leber hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion*. 2017 Sep;36:138-49.
98. Hrynychak PK, Spafford MM. Visual Recovery in a Patient with Leber Hereditary Optic Neuropathy and the 14484 Mutation: *Optom Vis Sci*. 1994 Oct;71(10):604-12.
99. Mashima Y. Macular Nerve Fibers Temporal to Fovea May Have a Greater Potential to Recover Function in Patients With Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Jpn J Ophthalmol*. 2002 Dec;46(6):660-7.
100. Sharkawi E, Oleszczuk JD, Holder GE, Raina J. Clinical and electrophysiological recovery in Leber hereditary optic neuropathy with G3460A mutation. *Doc Ophthalmol*. 2012 Aug;125(1):71-4.
101. Ziccardi L, Sadun F, De Negri AM, Barboni P, Savini G, Borrelli E, et al. Retinal Function and Neural Conduction Along the Visual Pathways in Affected and Unaffected Carriers With Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2013 Oct 21;54(10):6893.
102. Miyata K, Nakamura M, Kondo M, Lin J, Ueno S, Miyake Y, et al. Reduction of Oscillatory Potentials and Photopic Negative Response in Patients with Autosomal Dominant Optic Atrophy with *OPA1* Mutations. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2007 Feb 1;48(2):820.
103. Sharkawi E, Oleszczuk JD, Holder GE, Raina J. Clinical and electrophysiological recovery in Leber hereditary optic neuropathy with G3460A mutation. *Doc Ophthalmol*. 2012 Aug;125(1):71-4.
104. Ugalde C, Vogel R, Huijbens R, van den Heuvel B, Smeitink J, Nijtmans L. Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved

modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet.* 2004 Oct 15;13(20):2461–72.

105. Lodi R. Phosphorus MR spectroscopy shows a tissue specific in vivo distribution of biochemical expression of the G3460A mutation in Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002 Jun 1;72(6):805–7.
106. Ghelli A, Porcelli AM, Zanna C, Martinuzzi A, Carelli V, Rugolo M. Protection against Oxidant-Induced Apoptosis by Exogenous Glutathione in Leber Hereditary Optic Neuropathy Cybrids. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2008 Feb 1;49(2):671.
107. Borrás C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med.* 2003 Mar;34(5):546–52.
108. Braganza A, Annarapu GK, Shiva S. Blood-based bioenergetics: An emerging translational and clinical tool. *Mol Aspects Med.* 2020 Feb;71:100835.
109. Kramer PA, Ravi S, Chacko B, Johnson MS, Darley-Usmar VM. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Biol.* 2014;2:206–10.
110. Nikoskelainen EK, Marttila RJ, Huoponen K, Juvonen V, Lamminen T, Sonninen P, et al. Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1995 Aug 1;59(2):160–4.
111. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies – Disease mechanisms and therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res.* 2011 Mar;30(2):81–114.
112. Saracchi E, DiFrancesco JC, Brighina L, Marzorati L, Curtò NA, Lamperti C, et al. A case of Leber hereditary optic neuropathy plus dystonia caused by G14459A mitochondrial mutation. *Neurol Sci.* 2013 Mar;34(3):407–8.
113. Morgia CL, Achilli A, Iommarini L, Barboni P, Pala M, Olivieri A, et al. Rare mtDNA variants in Leber hereditary optic neuropathy families with recurrence of myoclonus. *Neurology.* 2008 Mar 4;70(10):762–70.
114. Bargiela D, Chinnery PF. Mitochondria in neuroinflammation – Multiple sclerosis (MS), leber hereditary optic neuropathy (LHON) and LHON-MS. *Neurosci Lett.* 2019 Sep;710:132932.

115. Harding AE, Sweeney MG, Miller DH, Mumford CJ, Kellar-Wood H, Menard D, et al. OCCURRENCE OF A MULTIPLE SCLEROSIS-LIKE ILLNESS IN WOMEN WHO HAVE A LEBER'S HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY MITOCHONDRIAL DNA MUTATION. *Brain*. 1992;115(4):979–89.
116. Barboni P, Amore G, Cascavilla ML, Battista M, Frontino G, Romagnoli M, et al. The pattern of retinal ganglion cell loss in Wolfram syndrome is distinct from mitochondrial optic neuropathies. *Am J Ophthalmol*. 2022 Apr;S0002939422001192.
117. Lenaers G, Neutzner A, Le Dantec Y, Jüschke C, Xiao T, Decembrini S, et al. Dominant optic atrophy: Culprit mitochondria in the optic nerve. *Prog Retin Eye Res*. 2021 Jul;83:100935.
118. Ferré M, Amati-Bonneau P, Tourmen Y, Malthièry Y, Reynier P. *eOPA1* : An online database for *OPA1* mutations: *eOPA1* DATABASE. *Hum Mutat*. 2005 May;25(5):423–8.
119. Rapoport Y, Lavin PJM. Nutritional Optic Neuropathy Caused by Copper Deficiency After Bariatric Surgery. *J Neuroophthalmol*. 2016 Jun;36(2):178–81.
120. González-martín-moro J, Castro-rebollo M, Contreras I, Pérez-sarriegui A. Subclinical thinning of macular ganglion cell layer in Leber optic neuropathy carriers. *Clin Exp Optom*. 2018 May 1;101(3):406–11.
121. Zekonyte U, Bacman SR, Smith J, Shoop W, Pereira CV, Tomberlin G, et al. Mitochondrial targeted meganuclease as a platform to eliminate mutant mtDNA in vivo. *Nat Commun*. 2021 Dec;12(1):3210.
122. Catarino CB, von Livonius B, Priglinger C, Banik R, Matloob S, Tamhankar MA, et al. Real-World Clinical Experience With Idebenone in the Treatment of Leber Hereditary Optic Neuropathy. *J Neuroophthalmol*. 2020 Dec;40(4):558–65.
123. Bacman SR, Gammage PA, Minczuk M, Moraes CT. Manipulation of mitochondrial genes and mtDNA heteroplasmy. In: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2022 Aug 26]. p. 441–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X19301591>
124. Gueven N, Ravishankar P, Eri R, Rybalka E. Idebenone: When an antioxidant is not an antioxidant. *Redox Biol*. 2021 Jan;38:101812.
125. Vignal C, Uretsky S, Fitoussi S, Galy A, Blouin L, Girmens JF, et al. Safety of rAAV2/2-ND4 Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ophthalmology*. 2018 Jun;125(6):945–7.

126. Newman NJ, Yu-Wai-Man P, Carelli V, Moster ML, Biousse V, Vignal-Clermont C, et al. Efficacy and Safety of Intravitreal Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy Treated within 6 Months of Disease Onset. *Ophthalmology*. 2021 May;128(5):649–60.
127. Yu-Wai-Man P, Newman NJ, Carelli V, Moster ML, Biousse V, Sadun AA, et al. Bilateral visual improvement with unilateral gene therapy injection for Leber hereditary optic neuropathy. *Sci Transl Med*. 2020 Dec 9;12(573):eaaz7423.
128. Sugisaka E, Ohde H, Shinoda K, Mashima Y. Clinical Case Notes: Woman with atypical unilateral Leber's hereditary optic neuropathy with visual improvement. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2007 Dec 18;35(9):868–70.
129. Hsu T, Wang A, Yen M, Liu J. Leber's hereditary optic neuropathy masquerading as optic neuritis with spontaneous visual recovery. *Clin Exp Optom*. 2014 Jan 1;97(1):84–6.
130. Newman NJ, Lott MT, Wallace DC. The Clinical Characteristics of Pedigrees of Leber's Hereditary Optic Neuropathy With the 11778 Mutation. *Am J Ophthalmol*. 1991 Jun;111(6):750–62.
131. Smith JL, Hoyt WF, Susac JO. Ocular Fundus in Acute Leber Optic Neuropathy. *Arch Ophthalmol*. 1973 Nov 1;90(5):349–54.
132. Amaral-Fernandes MS, Marcondes AM, do Amor Divino Miranda PM, Maciel-Guerra AT, Sartorato EL. Mutations for Leber hereditary optic neuropathy in patients with alcohol and tobacco optic neuropathy. *Mol Vis*. 2011;17:3175–9.
133. Schouten JP. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):57e–57.
134. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jan;42(D1):D980–5.
135. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011 May;43(5):491–8.
136. San Lucas FA, Wang G, Scheet P, Peng B. Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with *variant tools*. *Bioinformatics*. 2012 Feb 1;28(3):421–2.

137. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep 1;38(16):e164–e164.
138. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP v2.0: A Database of Human Non-synonymous SNVs and Their Functional Predictions and Annotations. *Hum Mutat.* 2013 Sep;34(9):E2393–402.
139. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3. *Fly (Austin).* 2012 Apr;6(2):80–92.
140. Davydov EV, Goode DL, Sirota M, Cooper GM, Sidow A, Batzoglou S. Identifying a High Fraction of the Human Genome to be under Selective Constraint Using GERP++. Wasserman WW, editor. *PLoS Comput Biol.* 2010 Dec 2;6(12):e1001025.
141. Bach M, Brigell MG, Hawlina M, Holder GE, Johnson MA, McCulloch DL, et al. ISCEV standard for clinical pattern electroretinography (PERG): 2012 update. *Doc Ophthalmol.* 2013 Feb;126(1):1–7.
142. McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, Hamilton R, Holder GE, Tzekov R, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). *Doc Ophthalmol.* 2015 Feb;130(1):1–12.
143. International Society for Clinical Electrophysiology of Vision, Odom JV, Bach M, Brigell M, Holder GE, McCulloch DL, et al. ISCEV standard for clinical visual evoked potentials: (2016 update). *Doc Ophthalmol.* 2016 Aug;133(1):1–9.
144. Theunissen TEJ, Nguyen M, Kamps R, Hendrickx AT, Sallevelt SCEH, Gottschalk RWH, et al. Whole Exome Sequencing Is the Preferred Strategy to Identify the Genetic Defect in Patients With a Probable or Possible Mitochondrial Cause. *Front Genet.* 2018 Oct 12;9:400.
145. Petrovic Pajic S, Lapajne L, Vratinar B, Fakin A, Jarc-Vidmar M, Sustar Habjan M, et al. The Relative Preservation of the Central Retinal Layers in Leber Hereditary Optic Neuropathy. *J Clin Med.* 2022 Oct 13;11(20):6045.
146. Rok Šega, Jan Burgar, Ana Fakin, Sanja Petrović Pajić, Marija Volk, Marko Hawlina, et al. Leber's hereditary optic neuropathy – a review and prevalence analysis in the Slovenian population. *Slov Med J [Internet].* 2022 Oct 31 [cited 2023 Feb 3];91(9–10). Available from: <https://vestnik.szdz.si/index.php/ZdravVest/article/view/3234>
147. Valentino ML. The 13042G->A/ND5 mutation in mtDNA is pathogenic and can be associated also with a prevalent ocular phenotype. *J Med Genet.* 2005 Nov 18;43(7):e38–e38.

148. Riordan-Eva P, Harding AE. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. *J Med Genet.* 1995 Feb 1;32(2):81–7.
149. Salomão SR, Berezovsky A, Andrade RE, Belfort Jr. R, Carelli V, Sadun AA. Visual Electrophysiologic Findings in Patients From an Extensive Brazilian Family with Leber's Hereditary Optic Neuropathy Visual electrophysiology in LHON. *Doc Ophthalmol.* 2004 Mar;108(2):147–55.
150. Borrelli E, Berni A, Cascavilla ML, Barresi C, Battista M, Lari G, et al. Visual Outcomes and Optical Coherence Tomography Biomarkers of Vision Improvement in Patients With Leber Hereditary Optic Neuropathy Treated With Idebenone. *Am J Ophthalmol.* 2023 Mar;247:35–41.
151. Laskowski RA, Stephenson JD, Sillitoe I, Orengo CA, Thornton JM. VarSite: Disease variants and protein structure. *Protein Sci.* 2020 Jan;29(1):111–9.
152. Castellana S, Fusilli C, Mazzoccoli G, Biagini T, Capocéfalo D, Carella M, et al. High-confidence assessment of functional impact of human mitochondrial non-synonymous genome variations by APOGEE. Bromberg Y, editor. *PLOS Comput Biol.* 2017 Jun 22;13(6):e1005628.
153. Musiani F, Rigobello L, Iommarini L, Carelli V, Degli Esposti M, Ghelli AM. New Insights on Rotenone Resistance of Complex I Induced by the m.11778G>A/MT-ND4 Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Molecules.* 2022 Feb 16;27(4):1341.
154. Blok MJ, Spruijt L, de Coo IFM, Schoonderwoerd K, Hendrickx A, Smeets HJ. Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease. *J Med Genet.* 2007 Apr 1;44(4):e74–e74.
155. Man PYW, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The Epidemiology of Leber Hereditary Optic Neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet.* 2003;7.
156. Achilli A, Iommarini L, Olivieri A, Pala M, Hooshiar Kashani B, Reynier P, et al. Rare Primary Mitochondrial DNA Mutations and Probable Synergistic Variants in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. Chan SSL, editor. *PLoS ONE.* 2012 Aug 3;7(8):e42242.
157. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Costa JD, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain.* 1995;118(2):319–37.
158. Hsu T, Wang A, Yen M, Liu J. Leber's hereditary optic neuropathy masquerading as optic neuritis with spontaneous visual recovery. *Clin Exp Optom.* 2014 Jan 1;97(1):84–6.

159. Wakakura M, Mogi A, Ichibe Y, Okada K, Hasebe H. Leber's hereditary optic neuropathy triggered by optic neuritis. *Neuro-Ophthalmol*. 1996 Jan;16(6):337–41.
160. Chuman H. Atypical Clinical and Neuroimaging Findings in Leber's Hereditary Optic Neuropathy: a Case Report. *JOJ Ophthalmol* [Internet]. 2018 May 31 [cited 2022 May 26];6(5). Available from: <https://juniperpublishers.com/jojo/JOJO.MS.ID.555698.php>
161. Pfeffer G, Burke A, Yu-Wai-Man P, Compston DAS, Chinnery PF. Clinical features of MS associated with Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations. *Neurology*. 2013 Dec 10;81(24):2073–81.
162. Bonnet C, Augustin S, Ellouze S, Bénit P, Bouaita A, Rustin P, et al. The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2008 Oct;1783(10):1707–17.
163. Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Verny C, et al. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol*. 2008 Jun;63(6):794–8.
164. Peverelli L, Catania A, Marchet S, Ciasca P, Cammarata G, Melzi L, et al. Leber's Hereditary Optic Neuropathy: A Report on Novel mtDNA Pathogenic Variants. *Front Neurol*. 2021 Jun 9;12:657317.
165. Brown MD, Trounce IA, Jun AS, Allen JC, Wallace DC. 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 Dec;275(51):39831–6.
166. Hofhaus G, Johns DR, Hurko O, Attardi G, Chomyn A. Respiration and Growth Defects in Transmitochondrial Cell Lines Carrying the 11778 Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *J Biol Chem*. 1996 May;271(22):13155–61.
167. Cock HR, Cooper JM, Schapira AH. The 14484 ND6 mtDNA mutation in Leber hereditary optic neuropathy does not affect fibroblast complex I activity. *Am J Hum Genet*. 1995 Dec;57(6):1501–2.
168. Angebault C, Gueguen N, Desquirit-Dumas V, Chevrollier A, Guillet V, Verny C, et al. Idebenone increases mitochondrial complex I activity in fibroblasts from LHON patients while producing contradictory effects on respiration. *BMC Res Notes*. 2011 Dec;4(1):557.

169. Invernizzi F, D'Amato I, Jensen PB, Ravaglia S, Zeviani M, Tiranti V. Microscale oxygraphy reveals OXPHOS impairment in MRC mutant cells. *Mitochondrion*. 2012 Mar;12(2):328–35.
170. Battisti C. Cell response to oxidative stress induced apoptosis in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Dec 1;75(12):1731–6.
171. Qi X, Lewin AS, Hauswirth WW, Guy J. Optic Neuropathy Induced by Reductions in Mitochondrial Superoxide Dismutase. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2003 Mar 1;44(3):1088.
172. Wong A. Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells. *Hum Mol Genet*. 2002 Feb 1;11(4):431–8.
173. Falabella M, Forte E, Magnifico MC, Santini P, Arese M, Giuffrè A, et al. Evidence for Detrimental Cross Interactions between Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Leber's Hereditary Optic Neuropathy Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–9.
174. Wang Q, Wei WB, Wang YX, Yan YN, Yang JY, Zhou WJ, et al. Thickness of individual layers at the macula and associated factors: the Beijing Eye Study 2011. *BMC Ophthalmol*. 2020 Dec;20(1):49.
175. Liu XT. Foveal pit morphological changes in asymptomatic carriers of the G11778A mutation with Leber's hereditary optic neuropathy. *Int J Ophthalmol*. 2020 May 18;13(5):766–72.
176. Carbonelli M, La Morgia C, Savini G, Cascavilla ML, Borrelli E, Chicani F, et al. Macular Microcysts in Mitochondrial Optic Neuropathies: Prevalence and Retinal Layer Thickness Measurements. Frishman L, editor. *PLOS ONE*. 2015 Jun 5;10(6):e0127906.
177. Masri RA, Weltzien F, Purushothuman S, Lee SCS, Martin PR, Grünert U. Composition of the Inner Nuclear Layer in Human Retina. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2021 Jul 14;62(9):22.
178. Cesareo M, Ciuffoletti E, Martucci A, Sebastiani J, Sorge RP, Lamantea E, et al. Assessment of the retinal posterior pole in dominant optic atrophy by spectral-domain optical coherence tomography and microperimetry. Bhattacharya S, editor. *PLOS ONE*. 2017 Mar 30;12(3):e0174560.
179. Wang D, Liu HL, Du YY, Yuan J, Li X, Tian Z, et al. Characterisation of thickness changes in the peripapillary retinal nerve fibre layer in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol*. 2021 Aug;105(8):1166–71.

180. Asanad S, Tian JJ, Frousiakis S, Jiang JP, Kogachi K, Felix CM, et al. Optical Coherence Tomography of the Retinal Ganglion Cell Complex in Leber's Hereditary Optic Neuropathy and Dominant Optic Atrophy. *Curr Eye Res.* 2019 Jun 3;44(6):638–44.
181. Moster SJ, Moster ML, Scannell Bryan M, Sergott RC. Retinal Ganglion Cell and Inner Plexiform Layer Loss Correlate with Visual Acuity Loss in LHON: A Longitudinal, Segmentation OCT Analysis. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2016 Jul 26;57(8):3872.
182. Zhang Y, Huang H, Wei S, Gong Y, Li H, Dai Y, et al. Characterization of macular thickness changes in Leber's hereditary optic neuropathy by optical coherence tomography. *BMC Ophthalmol.* 2014 Dec;14(1):105.
183. Robson AG, Nilsson J, Li S, Jalali S, Fulton AB, Tormene AP, et al. ISCEV guide to visual electrodiagnostic procedures. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 2018 Feb;136(1):1–26.
184. Carelli V, La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Optic neuropathies: the tip of the neurodegeneration iceberg. *Hum Mol Genet.* 2017 Oct 1;26(R2):R139–50.
185. Kwittken J, Barest HD. The neuropathology of hereditary optic atrophy (Leber's disease); the first complete anatomic study. *Am J Pathol.* 1958 Feb;34(1):185–207.
186. Cortopassi G, Danielson S, Alemi M, Zhan SS, Tong W, Carelli V, et al. Mitochondrial disease activates transcripts of the unfolded protein response and cell cycle and inhibits vesicular secretion and oligodendrocyte-specific transcripts. *Mitochondrion.* 2006 Aug;6(4):161–75.
187. Shibata K, Shibagaki Y, Nagai C, Iwata M. Visual evoked potentials and electroretinograms in an early stage of Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol.* 1999 Sep 22;246(9):847–9.
188. Holder GE. The pattern electroretinogram in anterior visual pathway dysfunction and its relationship to the pattern visual evoked potential: A personal clinical review of 743 eyes. *Eye.* 1997 Nov;11(6):924–34.
189. Dorfman LJ, Nikoskelainen E, Rosenthal AR, Sogg RL. Visual evoked potentials in Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann Neurol.* 1977 Jun;1(6):565–8.
190. Mondelli M, Rossi A, Scarpini C, Dotti MT, Federico A. BAEP changes in Leber's hereditary optic atrophy: further confirmation of multisystem involvement. *Acta Neurol Scand.* 2009 Jan 29;81(4):349–53.
191. Wachtmeister L, Dowling JE. The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978 Dec;17(12):1176–88.

192. Wachtmeister L. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res.* 1998 Oct;17(4):485–521.
193. Van Der Torren K, Mulder P. Comparison of the second and third oscillatory potentials with oscillatory potential power in early diabetic retinopathy. *Doc Ophthalmol.* 1993 Jun;83(2):111–8.
194. Howell N. Leber hereditary optic neuropathy: mitochondrial mutations and degeneration of the optic nerve. *Vision Res.* 1997 Dec;37(24):3495–507.
195. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da Costa J, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain J Neurol.* 1995 Apr;118 (Pt 2):319–37.
196. Salomão SR, Berezovsky A, Andrade RE, Belfort R, Carelli V, Sadun AA. Visual electrophysiologic findings in patients from an extensive Brazilian family with Leber's hereditary optic neuropathy. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 2004 Mar;108(2):147–55.
197. Botelho GIS, Salomão SR, Tengan CH, Karanjia R, Moura FV, Rocha DM, et al. Impaired Ganglion Cell Function Objectively Assessed by the Photopic Negative Response in Affected and Asymptomatic Members From Brazilian Families With Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Front Neurol.* 2020;11:628014.
198. Karanjia R, Berezovsky A, Sacai PY, Cavascan NN, Liu HY, Nazarali S, et al. The Photopic Negative Response: An Objective Measure of Retinal Ganglion Cell Function in Patients With Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 May 1;58(6):BIO300–6.
199. Majander A, Robson AG, João C, Holder GE, Chinnery PF, Moore AT, et al. The pattern of retinal ganglion cell dysfunction in Leber hereditary optic neuropathy. *Mitochondrion.* 2017 Sep;36:138–49.
200. Cobb W, Morton HB. The human retinogram in response to high-intensity flashes. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1952 Nov;4(4):547–56.
201. King-Smith PE, Loffing DH, Jones R. Rod and cone ERGs and their oscillatory potentials. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986 Feb;27(2):270–3.
202. Lachapelle P. The human suprathreshold photopic oscillatory potentials: method of analysis and clinical application. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 1994;88(1):1–25.

203. Wachtmeister L. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res.* 1998 Oct;17(4):485–521.
204. Robson AG, Frishman LJ, Grigg J, Hamilton R, Jeffrey BG, Kondo M, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2022 update). *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 2022 May 5;
205. Tzekov R, Arden GB. The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol.* 1999 Aug;44(1):53–60.
206. Gur M, Zeevi YY, Bielik M, Neumann E. Changes in the oscillatory potentials of the electroretinogram in glaucoma. *Curr Eye Res.* 1987 Mar;6(3):457–66.
207. Speros P, Price J. Oscillatory potentials. History, techniques and potential use in the evaluation of disturbances of retinal circulation. *Surv Ophthalmol.* 1981 Feb;25(4):237–52.
208. Lachapelle P. Evidence for an intensity-coding oscillatory potential in the human electroretinogram. *Vision Res.* 1991;31(5):767–74.
209. Lachapelle P, Benoit J, Little JM, Faubert J. The diagnostic use of the second oscillatory potential in clinical electroretinography. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 1989 Dec;73(4):327–36.
210. Wachtmeister L. Basic research and clinical aspects of the oscillatory potentials of the electroretinogram. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 1987 Jun;66(3):187–94.
211. Coupland SG. A comparison of oscillatory potential and pattern electroretinogram measures in diabetic retinopathy. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 1987 Jun;66(3):207–18.
212. Midena E, Torresin T, Longhin E, Midena G, Pilotto E, Frizziero L. Early Microvascular and Oscillatory Potentials Changes in Human Diabetic Retina: Amacrine Cells and the Intraretinal Neurovascular Crosstalk. *J Clin Med.* 2021 Sep 7;10(18):4035.
213. Balducci N, Cascavilla ML, Ciardella A, La Morgia C, Triolo G, Parisi V, et al. Peripapillary vessel density changes in Leber’s hereditary optic neuropathy: a new biomarker. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2018 Dec;46(9):1055–62.
214. Ogden TE. The oscillatory waves of the primate electroretinogram. *Vision Res.* 1973 Jun;13(6):1059–74.

215. Peachey NS, Alexander KR, Derlacki DJ, Bobak P, Fishman GA. Effects of light adaptation on the response characteristics of human oscillatory potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1991 Jan;78(1):27–34.
216. Wachtmeister L, Dowling JE. The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1978 Dec;17(12):1176–88.
217. Miyata K, Nakamura M, Kondo M, Lin J, Ueno S, Miyake Y, et al. Reduction of oscillatory potentials and photopic negative response in patients with autosomal dominant optic atrophy with OPA1 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Feb;48(2):820–4.
218. Fitzgerald KM, Cibis GW, Giambrone SA, Harris DJ. Retinal signal transmission in Duchenne muscular dystrophy: evidence for dysfunction in the photoreceptor/depolarizing bipolar cell pathway. *J Clin Invest.* 1994 Jun;93(6):2425–30.
219. Lachapelle P, Little JM, Polomeno RC. The photopic electroretinogram in congenital stationary night blindness with myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983 Apr;24(4):442–50.
220. Kurtenbach A, Leo-Kottler B, Zrenner E. Inner retinal contributions to the multifocal electroretinogram: patients with Leber’s hereditary optic neuropathy (LHON). Multifocal ERG in patients with LHON. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 2004 May;108(3):231–40.
221. Gao M, Barboni MTS, Ventura DF, Nagy BV. Effects of fixed cutoff filtering on dark- and light-adapted ERG components and the application of variable cutoff filter. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol.* 2022 Jun;144(3):191–202.
222. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res.* 2004 Jan;23(1):53–89.
223. Sadun AA, La Morgia C, Carelli V. Mitochondrial optic neuropathies: our travels from bench to bedside and back again. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2013 Oct;41(7):702–12.
224. Parisi V, Ziccardi L, Sadun F, De Negri AM, La Morgia C, Barbano L, et al. Functional Changes of Retinal Ganglion Cells and Visual Pathways in Patients with Chronic Leber’s Hereditary Optic Neuropathy during One Year of Follow-up. *Ophthalmology.* 2019 Jul;126(7):1033–44.
225. Vallabh NA, Romano V, Willoughby CE. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in corneal disease. *Mitochondrion.* 2017 Sep;36:103–13.

226. Ortiz A, Arias J, Cárdenas P, Villamil J, Peralta M, Escaf LC, et al. Macular findings in Spectral Domain Optical Coherence Tomography and OCT Angiography in a patient with Kearns–Sayre syndrome. *Int J Retina Vitreol*. 2017 Dec;3(1):24.
227. Finsterer J, Zarrouk-Mahjoub S. Corneal Involvement in Kearns–Sayre Syndrome Responsive to Coenzyme-Q? *Cornea*. 2016 Dec;35(12):e39.
228. Dudakova L, Skalicka P, Davidson AE, Sadan AN, Chylova M, Jahnova H, et al. Should Patients with Kearns-Sayre Syndrome and Corneal Endothelial Failure Be Genotyped for a TCF4 Trinucleotide Repeat, Commonly Associated with Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy? *Genes*. 2021 Nov 29;12(12):1918.
229. Taşkıran Çömez A, Şanal Ulu E, Ekim Y. Retina and Optic Disc Characteristics in Amblyopic and Non-amblyopic Eyes of Patients with Myopic or Hyperopic Anisometropia. *Türk Oftalmol Derg*. 2017 Jan 17;47(1):28–33.
230. Yu-Wai-Man P, Votruba M, Moore AT, Chinnery PF. Treatment strategies for inherited optic neuropathies: past, present and future. *Eye*. 2014 May;28(5):521–37.
231. Carelli V, La Morgia C, Valentino ML, Rizzo G, Carbonelli M, De Negri AM, et al. Idebenone Treatment In Leber’s Hereditary Optic Neuropathy. *Brain*. 2011 Sep 1;134(9):e188–e188.
232. Acaroğlu G, Kansu T, Doğulu ÇF. Visual Recovery Patterns in Children with Leber’s Hereditary Optic Neuropathy. *Int Ophthalmol*. 2001;24(6):349–55.
233. Jones BW, Marc RE. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res*. 2005 Aug;81(2):123–37.
234. Jones BW, Kondo M, Terasaki H, Lin Y, McCall M, Marc RE. Retinal remodeling. *Jpn J Ophthalmol*. 2012 Jul;56(4):289–306.
235. Jones BW, Watt CB, Marc RE. Retinal remodelling. *Clin Exp Optom*. 2005 Sep 1;88(5):282–91.
236. Jones BW, Watt CB, Frederick JM, Baehr W, Chen CK, Levine EM, et al. Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations. *J Comp Neurol*. 2003 Sep 8;464(1):1–16.
237. Milam AH, Li ZY, Fariss RN. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*. 1998 Apr;17(2):175–205.

238. Jones BW, Kondo M, Terasaki H, Watt CB, Rapp K, Anderson J, et al. Retinal remodeling in the Tg P347L rabbit, a large-eye model of retinal degeneration. *J Comp Neurol*. 2011 Oct 1;519(14):2713–33.
239. Marc RE, Jones BW, Anderson JR, Kinard K, Marshak DW, Wilson JH, et al. Neural Reprogramming in Retinal Degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2007 Jul 1;48(7):3364.
240. Jones BW, Watt CB, Marc RE. Retinal remodelling. *Clin Exp Optom*. 2005 Sep 1;88(5):282–91.
241. Marc RE, Jones BW. Retinal Remodeling in Inherited Photoreceptor Degenerations. *Mol Neurobiol*. 2003;28(2):139–48.
242. Jones BW, Marc RE, Watt CB, Vaughan DK, Organisciak DT. Neural Plasticity Revealed by Light-Induced Photoreceptor Lesions. In: Hollyfield JG, Anderson RE, LaVail MM, editors. *Retinal Degenerative Diseases* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2006 [cited 2023 Jan 12]. p. 405–10. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 572). Available from: http://link.springer.com/10.1007/0-387-32442-9_57

Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Petrovic Pajic S, Sustar Habjan M, Breclj J, Fakin A, Volk M, Maver A. Leber Hereditary Optic Neuropathy in a Family of Carriers of MT-ND5/13042G>T (A236S) Novel Variant. *Journal of Neuro-Ophthalmology* 2023;00:1–7. doi: 10.1097/WNO.0000000000001820. **M21 IF 4.415**

Petrovic Pajic S, Jarc-Vidmar M, Fakin A, Sustar Habjan M, Breclj J, Volk M, Maver A, Peterlin B, Hawlina M. Case report: Long-term follow-up of two patients with LHON caused by DNAJC30:c.152G>A pathogenic variant-case series. *Front Neurol.* 2022;28;13:1003046. **M22 IF 4,086**

Petrovic Pajic S, Lapajne L, Vratinar B, Fakin A, Jarc-Vidmar M, Sustar Habjan M, Volk M, Maver A, Peterlin B, Hawlina M. The Relative Preservation of the Central Retinal Layers in Leber Hereditary Optic Neuropathy. *J Clin Med.* 2022;11(20):6045. **M22 IF 4,964**

Petrović Pajić S, Hawlina M, Marković I. Leber hereditary optic neuropathy genotype, phenotype, and biochemical characteristics. *Medicinski pomladak.* 2024;74:2 DOI 10.5937/mp75-44775

Šega R, Burgar J, Fakin A, **Petrović Pajić S**, Volk M, Hawlina M, Glavač D, Jarc-Vidmar M. Leber's hereditary optic neuropathy – a review and prevalence analysis in the Slovenian population. *ZdravVestn [Internet].* 2022 1-4.

Biografija

Dr. Sanja M. Petrović Pajić je rođena 22.12.1982. godine u Karlovcu, Republika Hrvatska. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu završila je školske 2007/2008.godine sa prosečnom ocenom 9,20. Specijalističke akademske studije iz oblasti oftalmologije upisala je školske 2008/2009. godine na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, a završni rad "Poređenje određivanja vidne oštine Snellen-ovom i ETDRS tablicom kod pacijenata sa kataraktom, pre i post-operativno " je odbranila 2010. godine pod mentorstvom prof. dr Milenka Stojkovića.

Od oktobra 2009. godine zaposlena je na Klinici za očne bolesti, Univerzitetskog Kliničkog Centra Srbije najpre kao klinički lekar, a potom kao specijalizant. Specijalizaciju iz oftalmologije je upisala aprila 2011, a specijalistički ispit iz oftalmologije je položila aprila 2015. godine sa odličnom ocenom. Po završetku specijalizacije je kao dobitnik stipendije Međunarodnog veća za oftalmologiju boravila na hirurškom usavršavanju u Ljubljani tokom godinu i 3 meseca gde je i započela izradu doktorske teze, a potom i na Moorfields eye Clinic kao dobitnik stipendije Udruženja oftalmologa Evrope.

Dr Petrović Pajić je trenutno zaposlena na Klinici za očne bolesti, Univerzitetskog Kliničkog Centra Srbije na odeljenju vitreoretinalne hirurgije.

Doktorske studije iz molekularne medicine upisala je školske 2017/2018. Godine. Njen istraživački rad je fokusiran na nasledne optičke neuropatije, sa posebnim naglaskom na identifikaciju potencijalnih kliničkih biomarkera Leberove Hereditarne Optičke neuropatije . Kroz saradnju sa timovima genetičara iz Ljubljane i biohemijskim naučnicima sa Univerziteta u Beogradu njeno istraživanje je fokusirano na genetsku karakterizaciju optičkih neuropatija otkrivanjem novih uzročnih mutacija i gena, kao i predikciju njihove patogenosti kroz testove mitohondrijalne funkcije.

Dr Petrović Pajić je autor i koautor 60 radova i izvoda u zbornicima međunarodnih i nacionalnih kongresa, od čega je 14 radova publikovano u celosti u časopisima sa JCR liste. Rad proistekao iz ove doktorske disertacije nagrađen je drugom nagradom za najbolji naučnoistraživački rad iz oblasti oftalmologije 2022. godine na teritoriji Centralne i Istočne Evrope na međunarodnom takmičenju International Medis awards.

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сања Петровић Пајић

Број индекса 2017/5121

Изјављујем

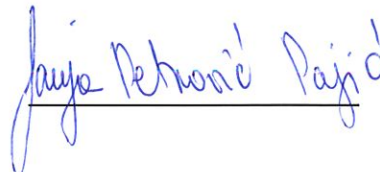
да је докторска дисертација под насловом

ИСПИТИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ПРОМЕНА У МИТОХОНДРИЈСКОМ ГЕНОМУ СА ФЕНОТИПСКИМ
КАРАКТЕРИСТИКАМА ПАЦИЈЕНАТА СА ЛЕБЕРОВОМ ХЕРЕДИТАРНОМ ОПТИЧКОМ НЕУРОПАТИЈОМ

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 26.6.2023.



Сања Петровић Пајић

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Петровић Пајић

Број индекса 2017/5121

Студијски програм Молекуларна медицина

Наслов рада ИСПИТИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ПРОМЕНА У МИТОХОНДРИЈСКОМ ГЕНОМУ СА ФЕНОТИПСКИМ КАРАКТЕРИСТИКАМА ПАЦИЈЕНАТА СА ЛЕБЕРОВОМ ХЕРЕДИТАРНОМ ОПТИЧКОМ НЕУРОПАТИЈОМ

Ментор Проф. др Иванка Мрковић

Коментор Prof. dr Marko Hawlina

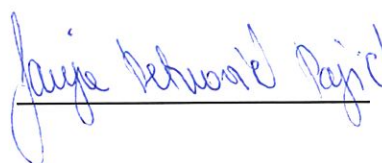
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 26.6.2023.



образац изјаве о коришћењу

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ ПОВЕЗАНОСТИ ПРОМЕНА У МИТОХОНДРИЈСКОМ ГЕНОМУ СА ФЕНОТИПСКИМ
КАРАКТЕРИСТИКАМА ПАЦИЈЕНАТА СА ЛЕБЕРОВОМ ХЕРЕДИТАРНОМ ОПТИЧКОМ НЕУРОПАТИЈОМ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 26.6.2023.

