

(47)

Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera – opis dwóch przypadków

Leber's hereditary optic neuropathy – two case reports

Małgorzata Mulak, Krystian Kiswa, Karolina Dembska, Marta Misiuk-Hojło

Katedra i Klinika Okulistyki Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Marta Misiuk-Hojło

Streszczenie:	<p>Cel: prezentacja 2 przypadków klinicznych LHON u spokrewnionych mężczyzn (kuzynowie, których matki były siostrami). Materiał i metody: obaj mężczyźni byli diagnozowani w Klinice Okulistyki i w Zakładzie Medycyny Molekularnej AM we Wrocławiu. Wyniki: pacjenci nie są posiadaczami żadnej z trzech najczęstszych mutacji odpowiedzialnych za dziedziczną neuropatię nerwu wzrokowego Lebera. Wnioski: może u nich występować jedna z rzadszych mutacji pierwotnych bądź też są posiadaczami jeszcze innej, nieopisananej dotąd mutacji dzikiej.</p>
Słowa kluczowe:	dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera, mtDNA, LHON.
Abstract:	<p>Aim: The aim of the article is to present 2 cases of LHON revealed in cousins (patients' mothers were sisters). Material and methods: They were both diagnosed in the Molecular Medicine Faculty and Department of Ophthalmology, Medical University of Wrocław. Results: Three of the most popular mutations characteristic for Leber's hereditary optic neuropathy were negative in both patients. Conclusion: The patients might have some rare, wild or unidentified mutations.</p>
Key words:	Leber's hereditary optic neuropathy, mtDNA, LHON.

Cel

Celem artykułu jest prezentacja 2 przypadków klinicznych LHON u spokrewnionych mężczyzn (kuzynowie, których matki były siostrami), diagnozowanych w Klinice Okulistyki i w Zakładzie Medycyny Molekularnej AM we Wrocławiu.

Patofizjologia i obraz kliniczny

Spośród chorób genetycznych dziedziczonych z DNA mitochondrialnym matki neuropatia nerwu wzrokowego Lebera (Leber's hereditary optic neuropathy – LHON) występuje najczęściej. Prowadzi ona do gwałtownej, bezbolesnej utraty centralnego widzenia, głównie u młodych mężczyzn, bez innych obciążeń chorobowych.

Postępująca utrata widzenia jest wynikiem wybiórczej degeneracji komórek zwojowych siatkówki w obrębie tarczy nerwu wzrokowego oraz ich aksonów. We wczesnej fazie procesy degeneracyjne obejmują drobne włókna pęczka tarczowo-plamkowego, bowiem właśnie one są najbardziej wrażliwe i łatwo ulegają uszkodzeniu. W okresie przedobjawowym, poprzedzającym nagłą utratę widzenia, często występują charakterystyczne zmiany w badaniu oftalmoskopowym: mikroangiopatie w obszarze okołotarczowym, krętość drobnych naczyń, a także obrzęk warstwy włókien nerwowych siatkówki (RNFL) (1). Należy jednak pamiętać, że opisane powyżej zmiany nie zawsze poprzedzają chorobę, z drugiej strony zaś, mogą być obserwowane również u osób zdrowych (20–30%).

Zazwyczaj w początkowych fazach stanu ostrego pacjent ma już ubytki w kwadrantach skroniowych warstwy włókien nerwowych, pierścień nerwowo-siatkówkowy w sektorach górnych i dolnych jest jeszcze prawidłowo zachowany. Postęp choroby doprowadza do atrofii nerwu wzrokowego w wyniku niszczenia włókien nerwowych we wszystkich kwadrantach. Warto pamiętać, że u 20–30% pacjentów w ostrej fazie choroby nie stwierdza się zmian w badaniu oftalmoskopowym (2).

Biologia

LHON to schorzenie spowodowane w głównej mierze zmianami zachodzącymi w DNA mitochondrialnym (mtDNA), czyli tak zwaną chorobą mitochondrialną. Mitochondria to organelle komórek eukariotycznych, które występują w nich w liczbie od kilku do kilkuset tysięcy. Są one odpowiedzialne za proces wytwarzania energii. W procesie fosforylacji oksydacyjnej uwalniana jest energia wykorzystana do syntezy wysokoenergetycznych cząsteczek ATP (adenozynotrójfosforanu). Mitochondria regulują też niektóre etapy cyklu życiowego komórki oraz współuczestniczą w procesach syntezy hemu, sterydów i energii cieplnej (3).

Podstawy genetyczne

W każdym mitochondrium znajduje się od 2 do 10 cząsteczek kolistego dwuniciowego DNA o długości 16 569 par zasad, w których zapisane są informacje o 37 genach kodujących mię-

dzy innymi białka odpowiedzialne za reakcje redoks na poziomie mitochondrialnym (4).

Mutacje w mtDNA są znacznie częstsze niż w DNA jądrowym z powodu braku białek histonowych oraz dużego narażenia na wolne rodniki związane z ciągłymi niemal reakcjami utleniania i redukcji (5). Są to przeważnie mutacje punktowe, najczęściej delecje. Mogą one być przekazywane z pokolenia na pokolenie, chociaż zdarza się, że powstają *de novo*. Niekiedy są obecne tylko w pewnym odsetku mitochondriów (zjawisko heteroplazmii) – odsetek mitochondriów z daną mutacją może wynosić od 0% do 100%. Wartość ta ma istotne znaczenie, bowiem determinuje wystąpienie objawów klinicznych danego schorzenia; dla LHON wynosi ona około 80% (6).

mtDNA jest dziedziczony w linii żeńskiej, ponieważ przekazywane potomstwu mitochondria znajdują się w komórkach jajowych. Plemniki natomiast tracą mitochondria na wczesnych etapach embriogenezy (7). Oznacza to, że genom mitochondrialny wraz z ewentualnymi mutacjami przekazywany jest przez matkę.

Pomimo dziedziczenia mutacji przez potomstwo obojga płci LHON częściej występuje u mężczyzn, u nich także przebieg choroby jest znacznie cięższy niż u płci żeńskiej. Przypuszcza się, że poza czynnikami środowiskowymi, takimi jak palenie tytoniu, odpowiadać za to mogą zmiany w genomie pozamitochondrialnym, ponieważ przeważająca część białek obecnych w mitochondriach jest kodowana przez genom jądrowy. Zmiany w mtDNA mogą być wywołane przez defekty genów jądrowych odpowiedzialnych za strukturę tych białek czy regulację ich funkcji.

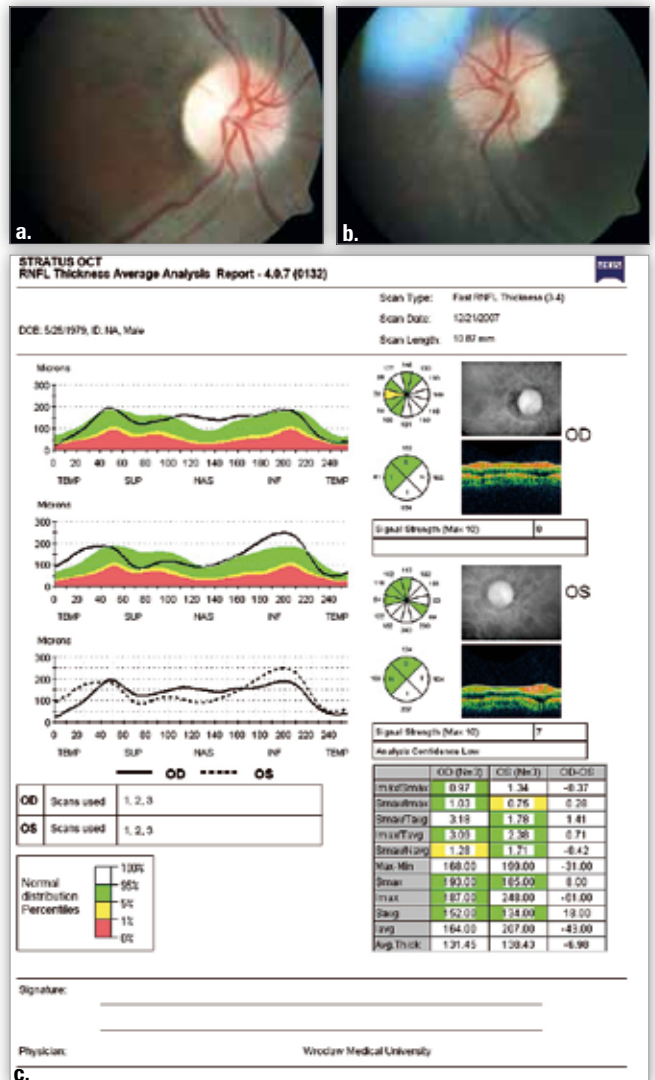
Obecnie znanych jest ponad 30 mutacji punktowych odpowiedzialnych za LHON. Wszystkie mutacje dotyczą genów kodujących białka, które biorą udział w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, z tego 3 najczęstsze mutacje (ponad 95% wszystkich przypadków LHON) dotyczą białek wchodzących w skład dehydrogenazy NADH. Są to (w kolejności występowania): MTND4*LHON1178A (69%), MTDN6*LHON14484C (14%) i MTDN1*LHON3460A (13%) (8). Różnią je częstość występowania, ciężkość uszkodzenia funkcji mitochondriów i – w konsekwencji – stopień upośledzenia widzenia.

Przypadek 1.

Mężczyzna 30-letni, niepalący, bez obciążeń internistycznych, u którego od 3 miesięcy postępuje pogorszenie wzroku najpierw w oku prawym, a następnie w oku lewym, został przyjęty do kliniki okulistycznej w celu przeprowadzenia diagnostyki.

Ostrość wzroku w OP – lp z 2,0 m, OL – 0,1 knp. Oftalmoskopowo stwierdzono obustronnie obrzęk tarczy nerwu II, potwierdzony w badaniu USG, współistniejący ze zblednięciem tarczy w sektorach skroniowych. W badaniu pola widzenia: OP – mroczki bezwzględne, w kwadrantach skroniowych w zakresie 0–15°, oraz niecharakterystyczne mroczki względne obwodowo w kwadrantach: górnym nosowym i dolnym skroniowym. W OL – pojedyncze mroczki występujące paracentralnie od dołu i nosa. Badanie OCT RNFL wykazało prawidłową grubość warstwy włókien nerwowych we wszystkich kwadrantach. W angiografii fluoresceinowej i badaniu TK głowy – bez odchyień od normy. Ze względu na charakter zmian wykonano dodatkowo badania elektrofizjologiczne: wzrokowe potencjały wywołane (VEP) oraz elektretinogram typu pattern (PERG). We wzrokowych potencjałach wywołanych obserwowano

wydłużenie latencji fali P100 oraz zaburzenie morfologii odpowiedzi, natomiast PERG w OP był na granicy normy, a w OL prawidłowy. Ponieważ badania elektrofizjologiczne nie mają rozstrzygającego znaczenia w rozpoznaniu LHON, dodatkowo wykonano badania genetyczne (ryc. 1.).



Ryc. 1. Pacjent 1.: obrzęk warstwy włókien nerwowych oraz teleangiektazje w obszarze około tarczowym – a., zblednięcie tarczy nerwu wzrokowego w sektorach skroniowych i teleangiektazje nacyniowe na tarczy – b., w badaniu OCT prawidłowa grubość warstwy włókien nerwowych we wszystkich kwadrantach – c.

Fig. 1. Patient 1.: retinal nerve fibre layer edema with peripapillary teleangiectasia – a., temporal disc pallor and teleangiectases blood vessels on the disc – b., RNFL in all quadrants within normal limits – c.

Przypadek 2.

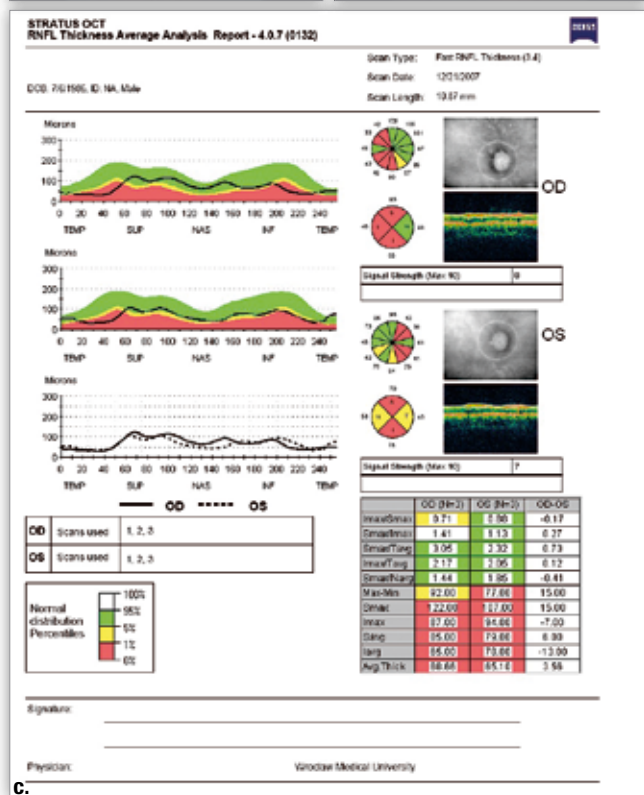
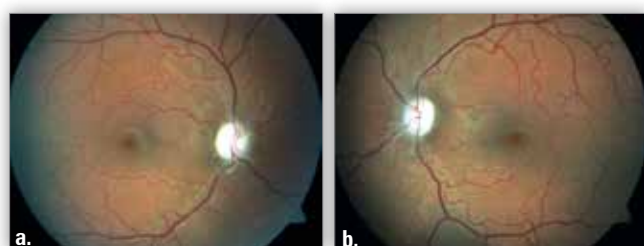
Pacjent 24-letni (kuzyn wcześniej przedstawionego mężczyzny), u którego pogorszenie ostrości wzroku obojga oczu było postępujące, diagnozowany okulistycznie w trybie ambulatoryjnym oraz neurologicznie w trybie hospitalizacji, został skierowany do kliniki okulistyki w celu poszerzenia diagnostyki.

W pierwszym badaniu okulistycznym, wykonanym w trybie ostrego dyżuru (13.02.07) stwierdzono obustronny obrzęk tarczy nerwu wzrokowego i poszerzone oraz kręte naczynia żyłne.

W badaniu TK obraz mózgowia i przestrzeni płynowych wewnątrzczaszkowych w granicach normy.

W trakcie przyjmowania na oddział neurologiczny (23.10.2007) pacjent liczył palce z odległości 10–15 cm. Nie stwierdzono zaburzeń gałkorokowych i oczopląsu. Nie stwierdzono ewidentnych niedowładów kończynowych ani zaburzeń zorności; objawy piramidowe, oponowe i próba Romberga były ujemne. Badanie MR głowy nie wykazało podejrzanych zmian demielinizacyjnych mózgowia. Zapis EEG był w normie. Kompletny obraz mógł odpowiadać przebytemu obustronnemu zapaleniu nerwu wzrokowego.

Podczas badania w klinice okulistyki (21.12.2007) stwierdzono: ostrość wzroku OPL na poziomie ruchów ręki przed okiem. Oftalmoskopowo – obustronny obrzęk tarczy nerwu wzrokowego. Tarcze bledsze w kwadrantach skroniowych. W USG – tarcze nerwu wzrokowego nieznacznie uniesione,



Ryc. 2. Pacjent 2.: zblednięcie tarczy nerwu wzrokowego głównie w kwadrantach skroniowych – a., zblednięcie tarczy nerwu wzrokowego głównie w kwadrantach skroniowych – b., w obrazie OCT obniżenie grubości warstwy włókien nerwowych w obojgu oczach z wyjątkiem kwadrantu nosowego oka prawego – c.

Fig. 2. Patient 2.: Disc pallor mainly in temporal quadrant – a., disc pallor mainly in temporal quadrant – b., decreased RNFL values in both eyes in all quadrants except for nasal quadrant in the right eye – c.

bez druz. W badaniu OCT RNFL w OP uszkodzenie włókien w 3 kwadrantach, grubość warstwy włókien nerwowych w części nosowej prawidłowa. W OL uszkodzenie włókien od góry i dołu z jednoczesnym zagrożeniem w sektorach nosowym i skroniowym. WPW trudne do oceny, odpowiedź na poziomie szumów. PERG obustronnie prawidłowe. Diagnostykę poszerzono, przeprowadzając badania genetyczne (ryc. 2.).

Obu pacjentów zbadano na okoliczność występowania trzech wyżej wspomnianych mutacji mtDNA – badania przeprowadzono w Zakładzie Techniki Molekularnych Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Materiał i metody

Materiał do badania stanowiły limfocyty uzyskane z krwi obwodowej poprzez odwirowanie w gradiencie Gradisolu L. Całkowite RNA izolowano z osadu limfocytów za pomocą zestawu E.Z.N.A.® Total RNA Kit (Omega Bio-tek) zgodnie z zaleceniami producenta. Syntezę cDNA przeprowadzono, używając losowych starterów (random primers) i zestawu TaqMan Reverse Transcription Reagents (Roche). Następnie cDNA użyto jako matrycy do reakcji PCR, w której z udziałem specyficznych starterów amplifikowano fragmenty genów zawierających miejsca polimorficzne.

Wykorzystanie cDNA jako matrycy zamiast mtDNA miało na celu wyeliminowanie dużej liczby pseudogenów, które mogłyby zafalszować ostateczny wynik badania (9).

Miejsca polimorficzne typu SNP (single nucleotide polymorphism) w genach *MT-ND1*, *MT-ND4* i *MT-ND6* były analizowane metodą SNaPshot (Applied Biosystems). Startery do reakcji SNaPshot zaprojektowano tak, aby wiązały się z komplementarną sekwencją sąsiadującą z miejscem polimorficznym (tab. I).

Gen/ Gene	Sekwencja starterowa/ Primer sequences
<i>MT-ND1</i> 3460 G→A	Forward 5`-GGCTACTACAACCCCTCGCTGA-3` Reverse 5`-AGCGATGGTGAGAGCTAAGGTC-3` SNaPshot 5`-CTTGGTGAAGATTTTATGGC-3`
<i>MT-ND4</i> 11778 G→A	Forward 5`-ATTATAACAAGCTCCACTGCTACG-3` Reverse 5`-AAGTCCTTGAGAGAGGATTATGATGC-3` SNaPshot 5`-ACTCAAACACGACGCACTCACAGT-3`
<i>MT-ND6</i> 14484 T→C	Forward 5`-GCCATCGCTGTAGTATATCCAAAGACAACC-3` Reverse 5`-AATAGTCCTGTGGTGATTTGGAGGATCAGG-3` SNaPshot 5`-TAGTTTTTTAATTTATTTAGGGGGAATGA-3`

Tab. I. Sekwencje starterów, za pomocą których amplifikowano miejsca polimorficzne poszczególnych genów.

Tab. I. Specific primers used for amplification of three polymorphic sites in mitochondrial genes.

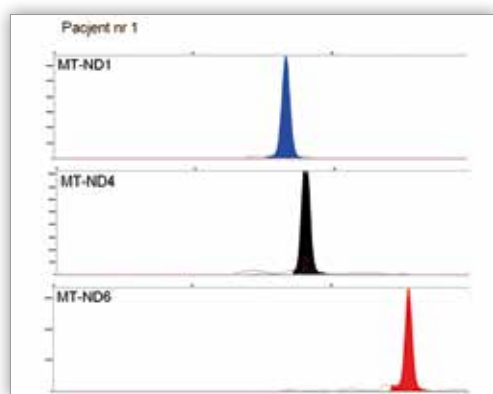
Wyniki

Metoda SNaPshot umożliwia identyfikację genotypów dziedzicznych, heterozygotycznych i mutacyjnych w genach *MT-ND1*, *MT-ND4* i *MT-ND6*. Wykryte allele pokazano w postaci pików na elektroforogramie (ryc. 3.).

U omawianych pacjentów stwierdzono brak mutacji w trzech badanych polimorfizmach, wykazano obecność pojedynczego pików o odpowiedniej wielkości:

MT-ND1 – niebieski pik w pozycji 22 pz, *MT-ND4* – pik czarny w pozycji 29 pz,

MT-ND6 – pik czerwony w pozycji 30 pz.



Ryc. 3. Elektroforogram trzech mitochondrialnych polimorfizmów. Pacjent nr 1.

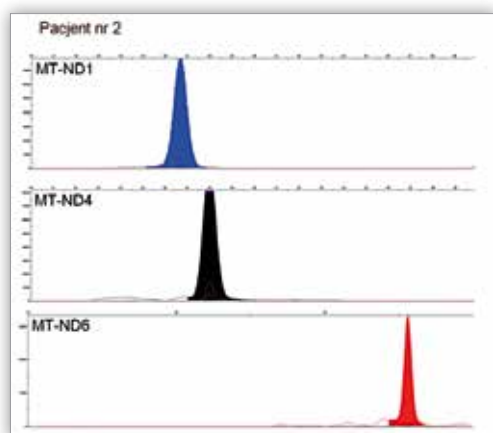
Fig. 3. Example of electropherogram for three mitochondrial polymorphisms. Patient no 1.

Elektroforogram trzech mitochondrialnych polimorfizmów genotypowanych metodą SNaPshot (ryc. 4.). Określenie alleli oparte jest na wielkości starterów i kolorach pików uwarunkowanych znakowanym fluorescencyjnie dideoksynukleotydem (ddNTP), tzw. terminatorem, włączanym podczas reakcji wydłużania startera.

MT-ND1: pik niebieski odpowiada guaninie – G, homozygota typu dzikiego (GG);

MT-ND4: pik czarny odpowiada cytozynie – C, homozygota typu dzikiego (CC);

MT-ND6: pik czerwony odpowiada tyminie – T, homozygota typu dzikiego (TT).



Ryc. 4. Elektroforogram trzech mitochondrialnych polimorfizmów. Pacjent nr 2.

Fig. 4. Example of electropherogram for three mitochondrial polymorphisms. Patient no 2.

Wnioski

Obaj badani pacjenci nie są posiadaczami żadnej z trzech najczęstszych mutacji odpowiedzialnych za dziedziczną neuropatię nerwu wzrokowego Lebera. Może u nich występować jedna z rzadszych mutacji pierwotnych (lista najczęstszych mutacji dostępna na stronie: <http://www.mitomap.org/MITOMAP/MutationsLHON>) bądź też są posiadaczami nieopisananej, jak dotąd, mutacji dzikiej.

Wyżej przedstawiony przypadek jest przykładem na to, że podejmowane obecnie próby leczenia schorzeń narządu wzroku za pomocą terapii genowej w przypadku LHON mogą

nie nastąpić szybko. Powodem jest niejednorodność zmian genetycznych, które obejmują bardzo dużą liczbę mutacji zarówno w genomie mitochondrialnym, jak i jądrowym.

Dziedziczna neuropatia nerwu wzrokowego Lebera to ciężka dystrofia siatkówki, która prowadzi do znacznego obniżenia ostrości wzroku. Najczęściej występuje u młodych mężczyzn (średnio w wieku od 16 do 40 lat) z dodatnim wywiadem chorobowym w linii żeńskiej. Do stopniowego obniżenia ostrości wzroku mogą dołączać się ruchy gałek ocznych z przewagą jednej fazy. Objawy choroby w wielu aspektach mogą imitować zapalenie nerwu wzrokowego, z którym należy je różnicować. Badaniem potwierdzającym LHON w tych przypadkach jest obecność mutacji w mitochondrialnym DNA. Klinicznie za rozpoznaniem neuropatii Lebera przemawiają: początek choroby w młodym wieku (średnia wieku 16 lat w porównaniu ze średnią 30 lat w przypadku zapalenia nerwu wzrokowego), czas trwania okresu pogorszenia widzenia powyżej 2 tygodni, mroczek centralny w polu widzenia, a także dodatni wywiad rodzinny. Należy jednak pamiętać o możliwości negatywnego wyniku badania u pacjentów z typową manifestacją choroby (9).

Piśmiennictwo:

1. Savini G., Barboni P., Valentino M.L.: *Nerve Fiber Layer Evaluation by Optical Coherence Tomography in Unaffected Carriers with Leber's Hereditary Optic Neuropathy Mutations*. Ophthalmology, 2005 Jan; Volume 112, Number 1: 127–131.
2. Kanamori A., Nakamura M., Matsui N.: *Optical coherence tomography detects characteristic retinal nerve fiber layer thickness corresponding to band atrophy of the optic discs*. Ophthalmology. 2005 Nov; 112(11): 2055–2056; author reply 2056–2057.
3. McBride H.M., Neuspiel M., Wasiak S.: *Mitochondria: more than just a powerhouse*. Curr. Biol. 2006; 16(14): R551.
4. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J. i wsp.: *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature 2006; 290: 457–465.
5. Richter C., Park J.W., Ames B.N.: *Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85(17): 6465–6467.
6. Chinnery P.F., Andrews R.M., Turnbull D.M., Howell N.N.: *Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation?* Am. J. Med. Genet. 2001; 98(3): 235–243.
7. Cummins J.M., Wakayama T., Yanagimachi R.: *Fate of micro-injected sperm components in the mouse oocyte and embryo*. Zygote 1997; 5: 301–308.
8. Huoponen K.: *Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings*. Neurogenetics 2001; 3(3): 119–125.
9. Lestienne P., Bataillé N.: *Mitochondrial DNA alterations and genetic diseases: a review*. Biomed. Pharmacother. 1994; 48(5-6): 199–214.

Praca wpłynęła do Redakcji 15.02.2010 r. (1197)
Zakwalifikowano do druku 15.07.2013 r.

Adres do korespondencji (Reprint requests to):

dr n. med. Małgorzata Mulak
Katedra i Klinika Okulistyki AM we Wrocławiu
ul. Borowska 213
50-556 Wrocław
e-mail: xbangera@tlen.pl