

**OFERUJEMY:
NOWY I UŻYWANY SPRZĘT DLA
OKULISTÓW I OPTYKÓW**

- **AUTOREFRAKTOMETRY**
- **DIOPTRIMIERZE**
- **FOROPTERY**
- **KASETY OKULISTYCZNE, OPRAWKI PROBIERCZE**
- **LAMPY SZCZELINOWE, OFTALMOMETRY**
- **MIKROSKOPY OPERACYJNE**
- **OFTALMOMERY**
- **POŁOMIERZE KOMPUTEROWE**
- **RZUTNIKI TESTÓW**
- **STOLIKI POD URZĄDZENIA, TABORETY, FOTELE**
- **TABLICE OPTOTYPÓW, TESTY STEREO**
- **UNITY OKULISTYCZNE**
- ...

**REWELACYJNIE NISKIE CENY
SPECJALNE PROMOCJE
MOŻLIWOŚĆ ZAKUPU RATALNEGO**

CIESZYN:

Telefon:
033-8521016
033-8513630
033-8520526
w. 116

Fax:
033-8513631

AACHEN/NIEMCY:

Fax: **0049-241164224**
Tel.: **0049-1717107272**

WARSZAWA:

Tel./Fax:
022-8637007
Telefon:
0601-663834

**WKRÓTCE:
NOWE BIURO
W POZNANIU**

ZAPRASZAMY !



Prace pogładowe

Klinika Oczna 1999, 101 (5): 387-392
ISSN 0023-2157 Indeks 362 646

Zastosowanie osiągnięć biologii molekularnej w diagnostyce jaskry
The use of molecular biology achievements in glaucoma diagnosis

Małgorzata Seredyka-Burduk

Abstract: Glaucoma is the third leading cause of blindness in the world. The molecular basis of this disease is unknown, although it is likely to be genetically heterogeneous disorder that results from the interaction of multiple genes and environmental influences. Current achievements and new trends of molecular biology used in glaucoma diagnosis are presented.

Słowa kluczowe: jaskra, biologia molekularna, chromosom, gen, dziedziczenie, mikrosatelity

Key words: glaucoma, molecular biology, chromosome, gene, inheritance, microsatellites

Znajomość współczesnej genetyki jest nieodzowna do rozumienia procesów fizjologii i patologii człowieka, które stanowią podstawę praktyki lekarskiej. Wszystkie cechy danego organizmu powstają na podłożu informacji genetycznej, przekazanej przez organizmy rodzicielskie. Podczas rozwoju osobniczego i w czasie całego życia poszczególne obszary informacji genetycznej są odczytywane i zostają zrealizowane w postaci cech strukturalnych i czynnościowych. Mówi się o procesie wyrażania (ekspresji) cech, który podlega wpływom środowiska. Realizacja informacji genetycznej jest modyfikowana przez czynniki środowiska, dlatego też podstawę rozumienia procesów biologicznych stanowi znajomość mechanizmów przekazywania cech dziedzicznych i realizacji informacji genetycznej oraz interakcji między tymi mechanizmami i czynnikami środowiska.

Genetyczny zapis każdego organizmu zakodowany jest w DNA. Suma wszystkich kodujących i niekodujących sekwencji DNA, zawartych w haploidalnej komórce zwana jest genomem. Genom człowieka stanowią trzy miliardy par zasad o łącznej długości około 100 cm i masie 5 pg, podzielone na 23 jednostki organizacyj-

ne, zwane chromosomami. Każdy chromosom zawiera jeden odcinek dwuniciowego DNA, związany z białkami. W genomie człowieka znajduje się kilkadziesiąt tysięcy genów, które stanowią około 5% całego DNA. Większość z nich koduje białka, których struktura i wzajemne oddziaływania określają funkcję i charakter poszczególnych tkanek, organów i całego organizmu. Ogólny schemat procesu biosyntezy białka jest taki sam dla każdej formy żywej i przebiega według tych samych reguł. Kolejność aminokwasów (czyli ich sekwencja) oraz długość łańcucha polipeptydowego determinuje jego właściwości i funkcję. Dane o sekwencji aminokwasów w konkretnym białku przekazywane są ze struktury DNA przez mRNA (*messenger RNA*, czyli kwas rybonukleinowy informacyjny, stanowiący bezpośrednią matrycę syntezy polipeptydu) do miejsca biosyntezy, tj. rybosomów. Ostatni etap przekazu informacji genetycznej stanowi synteza łańcucha polipeptydowego (1, 2, 4, 14).

Poznanie anatomii genomu człowieka, czyli określenie sekwencji trzech miliardów par zasad zawartych w DNA, stanowi pierwszy krok do poznania struktury wszystkich białek, mechanizmów ich regulacji i współdziałania w komórce. Jest to obecnie główny, daleko sięgający cel współczesnej biologii i medycyny, realizowany w Programie Poznania Genomu Człowieka (*Human Genome Project*) zaproponowanym przez Renato Dulbecco. Osiągnięcie tego celu umożliwi dokładne poznanie molekularnych podstaw wielu groźnych chorób, za które są odpowiedzialne zmiany w pojedynczych genach

Z Kliniki Okulistycznej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. Józef Kaluźny

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
Lek. med. Małgorzata Seredyka-Burduk
ul. Kleniowa 2/9
85-436 Bydgoszcz

lub grupach genów. Według prognoz realizacja programu, tj. ustalenie całkowitej sekwencji nukleotydów w genomie człowieka, powinna nastąpić przed 2005 r. (1).

W okulistyce jedną z jednostek chorobowych, w której podstawy genetyczne dziedziczenia są dość dobrze poznane, jest jaskra. Pod tym pojęciem rozumie się grupę chorób, w których występują: zagłębienie i postępujący zanik tarczy nerwu wzrokowego, postępujące ubytki w polu widzenia i podwyższone lub nierazko prawidłowe ciśnienie śródgałkowe. Ponad 55% wszystkich przypadków jaskry stanowi jaskra pierwotna otwartego kąta (*primary open angle glaucoma* – POAG). Choroba ta dotyczy ponad 2% populacji po 45. roku życia, 3-4 razy częściej występuje u rasy czarnej. W Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej 15 milionów ludzi choruje na jaskrę i ponad połowa z nich nie jest świadoma obecności choroby (rocznie 12 tysięcy osób traci wzrok z powodu jaskry). Jaskra pierwotna otwartego kąta jest trzecią pod względem częstości przyczyną ślepoty na świecie (5,2 miliona ludzi niewidomych z powodu tego typu jaskry). Ze względu na wiek, w którym pojawiają się pierwsze objawy choroby, uporczywość przebiegu i sposób dziedziczenia, jaskrę pierwotną otwartego kąta dzieli się na jaskrę młodzieńczą (*juvenile open angle glaucoma* – JOAG) – mniej powszechną formę z uporczywymi zwyczajami ciśnienia śródgałkowego, ujawniającą się między 3. a 40. rokiem życia, i przewlekłą jaskrę otwartego kąta (*chronic open angle glaucoma* – COAG) – bardziej rozpowszechnioną formę o powolnym, podstępym przebiegu, ujawniającą się po 40. roku życia. Wielu autorów skłania się ku stwierdzeniu, że obydwie rodzaje jaskry stanowią kliniczną kontynuację, sztucznie podzieloną przez wiek, w którym pojawiają się pierwsze objawy choroby. Badania epidemiologiczne wykazują, iż czynniki genetyczne odgrywają ważną rolę w etiologii jaskry otwartego kąta. Ponad 50% przypadków tego typu jaskry ma tło genetyczne. U najbliższych krewnych osób z jaskrą pierwotną otwartego kąta wzrasta ryzyko rozwoju jaskry. Brak jednak dokładnej oceny zagrożenia. Ogólne ryzyko zachorowania rodzeństwa wynosi około 10%, a potomstwa – 4% (5, 9, 12). Do tej pory w literaturze polskiej pojawiło się kilka publikacji na temat dziedziczenia jaskry i jej rodzinnego występowania, niestety w żadnej z nich nie podano dokładnej lokalizacji genu, odpowiadającego za tę chorobę (3, 11).

Według Bazy Danych Genomu Ludzkiego gen odpowiedzialny za jaskrę oznacza się skrótem GLC (*glaucoma gene*). Liczby 1, 2, 3 przyporządkowują gen do określonego typu jaskry (1 – oznacza jaskrę otwartego kąta, 2 – jaskrę zamkniętego kąta, 3 – jaskrę wrodzoną), litery A, B, C oznaczają kolejność odkrycia danego genu w każdej podgrupie (A – pierwszy, B – drugi, C – trzeci) (12).

W ostatnich latach dokładnie poznano kilka miejsc w genomie człowieka odpowiedzialnych za jaskrę.

GLC 1A – gen ten zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu pierwszego w obszarze 1q23-q25. Odpowiedzialny jest za rzadką, lecz agresywną formę jaskry otwartego kąta (młodzieńczą i dorosłych), dziedziczącą się autosomalnie dominująco z wysoką penetracją genu. Jaskrę, uwarunkowaną obecnością tego genu, charakteryzują wysokie wartości ciśnienia śród-

gałkowego źle reagujące na leczenie zachowawcze, zwykle wymagające leczenia operacyjnego, oraz młody wiek ujawnienia się choroby (5-45. rok życia). Obecność genu GLC 1A stwierdzono podczas badań przeprowadzonych w kilkunastu rodzinach. W większości z nich potwierdzono związek genu z jaskrą młodzieńczą, ujawniającą się przed 20. rokiem życia. W jednej rodzinie, dokładnie opisanej przez Morissette'a i wsp. (9), gen odpowiadał za jaskrę młodzieńczą i jaskrę pierwotną otwartego kąta dorosłych. W rodzinie tej nosicielstwo genu GLC 1A ujawniło się szeroką różnorodnością fenotypową – od nosicielstwa bezobjawowego, przez nadciśnienie śródgałkowe, aż do jaskry młodzieńczej i wcześniej ujawniającej się pierwotnej jaskry otwartego kąta u dorosłych. Badaniom genetycznym poddano 128 członków rodziny. Analiza genomu pozwoliła stwierdzić charakterystyczny haplotyp złożony z 14 markerów mikrosatelitarnych. Gen zlokalizowany został między markerami D1S445 i D1S416/D1S480 chromosomu pierwszego i wykazywał średnią penetrację 70% (u osób do 19. r.ż. – 20%, od 20. do 39. r.ż. – 70% i powyżej 40. roku – 90%) (9).

Przyjmuje się, że więcej niż 3% przypadków pierwotnej jaskry otwartego kąta związane jest z mutacją w obszarze genu GLC 1A. Wniosek ten wysunął Sheffield na podstawie przeprowadzonych w 1996 r. badań na obecność jednego z trzech typów mutacji w genie GLC 1A, odpowiadającego za zmianę aminokwasu w łańcuchu polipeptydowym białka TIGR (*trabecular meshwork-induced glucocorticoid response*) – występującego w siateczce beleczkowana – odpowiedzialnego za utrudnienie odpływu cieczy wodnistej. Mutacja została stwierdzona u 13 niespokrewnionych osób spośród 330 chorych na jaskrę (co stanowi 3,9%). W dwóch przypadkach była to zamiana nukleotydu guaninowego na tyminowy w kodonie (czyli zestawie trzech kolejnych nukleotydów w łańcuchu kwasu nukleinowego, warunkującym włączenie określonego aminokwasu do określonego miejsca w łańcuchu polipeptydowym) 357 (zamiana glicyny na walinę w łańcuchu TIGR), w dziewięciu przypadkach obserwowano zmianę nukleotydu cytozynowego na tyminowy w kodonie 361 (wypadnięcie glutaminy z łańcucha TIGR), w pozostałych dwóch przypadkach dochodziło natomiast do wymiany nukleotydu tyminowego na cytozynowy w kodonie 430 (zamiana tyrozyny na histydynę w białku TIGR) (16). Obecność mutacji w obrębie genu GLC 1A stwierdzili także Mansergh i wsp. podczas badań przeprowadzonych w roku 1997 (7). Badali oni dwie rodziny – irlandzką i hiszpańską. W pierwszej z nich potwierdzili obecność nukleotydu adeninowego zamiast guaninowego w pozycji kodonu 367, co prowadziło do zamiany glicyny na argininę w łańcuchu TIGR, w drugiej zaś odnotowali zmianę nukleotydu guaninowego na tyminowy w kodonie 426, co powodowało zmianę waliny na feniloalaninę w łańcuchu białka TIGR (7). Dwie kolejne rodziny przebadali Michels-Rautenstrauss i wsp. Zidentyfikowali oni mutację w kodonie 370 i 367, co dawało zmianę odpowiednio proliny na leucynę i glicyny na argininę w łańcuchu TIGR (8). Obecność mutacji w obrębie omawianego genu stwierdzili także Kee i wsp. w rodzinie południowokoreańskiej (6). Zaobserwowali oni obecność mutacji w kodonie 334 (zamiana tyminy na

Tabela I: Rodzaje mutacji w obszarze występowania genu GLC 1A i ich następstwa w budowie białka TIGR
Table I: The types of mutation in GLC 1A gene region and their consequences in TIGR protein structure

Typ mutacji Type of mutation	Zmiana w genomie Change in genome	Lokalizacja zmiany w obszarze genu GLC 1A Location of change in GLC 1A gene region	Zmiana w budowie białka TIGR Change in TIGR protein structure
Tranzycja – zmiana zasady purynowej na purynową Transition – change of purine to purine	adenina-guanina adenine-guanine	kodon 367 codon 367	zamiana glicyny na argininę change of glycine to arginine
Tranzycja – zmiana zasady pirymidynowej na pirymidynową Transition – change of pyrimidine to pyrimidine	tymina-cytozyna thymine-cytosine cytozyna-tymina cytosine-thymine tymina-cytozyna thymine-cytosine	kodon 334 codon 334 kodon 361 codon 361 kodon 430 codon 430	zamiana proliny na serynę change of proline to serine usuniecie glutaminy removing of glutamine zamiana tyrozyny na histydynę change of tyrosine to histidine
Transwersja – zmiana zasady purynowej na pirymidynową Transversion – change of purine to pyrimidine	guanina-tymina guanine-thymine guanina-tymina guanine-thymine	kodon 357 codon 357 kodon 426 codon 426	zamiana glicyny na walinę change of glycine to valine zamiana waliny na feniloalaninę change of valine to phenylalanine

Tabela II: Lokalizacja genów odpowiedzialnych za jaskrę, jej rodzaj i sposób dziedziczenia (objaśnienia skrótów w tekście)
Table II: Location of glaucoma genes, glaucoma subtype and type of inheritance (comments of abbreviations in text)

Gen Gene	Lokalizacja (chromosom, ramię, zajmowany obszar) Location (chromosome, region)	Rodzaj jaskry Glaucoma subtype	Sposób dziedziczenia Type of mutation
GLC 1A	1q23-q25	JOAG/COAG	autosomalnie dominująco autosomal dominant
GLC 1B	2cen-q13	COAG	autosomalnie dominująco autosomal dominant
GLC 1C	3q21-q24	COAG	autosomalnie dominująco autosomal dominant
GLC 1E	10p15-p14	NTG	autosomalnie recesywnie autosomal recessive
GLC 3A	2p21	jaskra wrodzona congenital glaucoma	autosomalnie recesywnie autosomal recessive
GLC 3B	1p36	jaskra wrodzona congenital glaucoma	autosomalnie recesywnie autosomal recessive

cytozynę), dającej zamianę na serynę w białku TIGR (6).

GLC 1B – gen ten zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu drugiego w obszarze 2 cen-q13 między markerami D2S2161 i D2S176. Odpowiada on za jaskrę pierwotną otwartego kąta z prawidłowym lub nieznacznie podwyższonym ciśnieniem śródgałkowym, dobrze reagującą na leczenie zachowawcze, ujawniającą się około 40. roku życia, dziedziczącą się autosomalnie dominująco. Obecność genu GLC 1B została potwierdzona w sześciu rodzinach, a charakterystyczny genom stwierdzono u 16 osób dotkniętych jaskrą. Prekursorem badań w tym obszarze genomu ludzkiego była Stoilova (12, 15).

GLC 1C – gen ten zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu trzeciego w obszarze 3q21-q24 między markerami D3S3637 a D3S1744. Gen ten koduje białko – endopeptydazę błonową (*membrane endopeptidase* – MME), której obecność stwierdzono w komórkach siateczki beleczkowana. Odpowiada on za pierwotną jaskrę otwartego kąta dorosłych, przebiegającą z wysokimi wartościami ciśnienia śródgał-

kowego, źle reagującymi na leczenie zachowawcze, dziedziczącą się autosomalnie dominująco. Do tej pory opisano tylko jeden przypadek rodziny, w której u 12 spośród 44 jej członków stwierdzono obecność genu GLC 1C (18).

Nie do końca jest wyjaśniony fakt, czy pacjenci z jaskrą pierwotną otwartego kąta nie przejawiają mutacji w trzech wyżej wymienionych miejscach genomu (GLC 1A, GLC 1B, GLC 1C), co potwierdzałoby obecność dziedziczenia wielogenowego, ujawniającego się lub nie – w zależności od wieku pacjenta i czynników środowiska.

GLC 1E – jest genem zlokalizowanym przez Sarfara i wsp. w chromosomie 10 w obszarze 10p15-p14 między markerami D10S527 i D10S506 (13). Odpowiada on za jaskrę z prawidłowym ciśnieniem śródgałkowym (*normal tension glaucoma* – NTG). Autorzy opisałi dokładną lokalizację tego genu po przebadaniu wielopokoleniowej rodziny brytyjskiej (13).

GLC 3A – gen zlokalizowany na ramieniu krótkim chromosomu drugiego w miejscu 2p21. Warunkuje on jaskrę wrodzoną, charakteryzującą się wysokimi wartościami

ciami ciśnienia śródgałkowego, dziedziczącą się autosomalnie recesywnie.

GLC 3B – gen ten mieści się na krótkim ramieniu chromosomu pierwszego w miejscu 1p36. Koduje jąskrę wrodzoną z wysokim ciśnieniem śródgałkowym, dziedziczącą się autosomalnie recesywnie.

Zbadano 19 rodzin (tureckich i kanadyjskich) w kierunku obecności genu *GLC 3A* i *GLC 3B*. U 11 rodzin stwierdzono obecność genu *GLC 3A*, a u czterech spośród ośmiu pozostałych – genu *GLC 3B*. Brak mutacji w miejscach genu *GLC 3A* i *GLC 3B* w czterech ostatnich rodzinach świadczy o istnieniu dodatkowego *locus* dla jaskry wrodzonej (12).

W 1996 r. Mears stwierdził obecność genu odpowiedzialnego za irydogonodysgenezę dziedziczącą się autosomalnie dominująco, charakteryzującą się niedorozwojem tęczówki, zaburzeniami kąta przesączania i jaskrą młodzieńczą. Gen ten zlokalizowano w chromosomie 6p25, w okolicy markera D6S477. Niewykluczone, że jego obecność można stwierdzić u części osób dotkniętych jaskrą otwartego lub zamkniętego kąta, u których nie znaleziono innych, wyżej wymienionych genów (wg 12).

Metodyka

Dokładna lokalizacja genów, również tych, które są odpowiedzialne za jaskrę, jest możliwa dzięki rozwojowi biologii molekularnej, który z kolei warunkowany jest jednocześnie dostępnością metod biochemicznych i genetycznych. Selekcja genetyczna umożliwia identyfikację genów, w których mutacje powodują specyficzną zmianę fenotypu, natomiast analiza biochemiczna tych mutantów pozwala na ich charakterystykę na poziomie molekularnym. W dalszej części pracy krótko scharakteryzowano najczęściej stosowane metody inżynierii genetycznej, które wykorzystuje się w diagnostyce molekularnej chorób warunkowanych genetycznie, w tym także jaskry.

Przed przystąpieniem do badań konieczne jest wyizolowanie DNA z komórek. Najczęściej stosowaną metodą jest rozbicie błon komórkowych i jądrowych za pomocą detergentu, denaturacja i strawienie białek, usunięcie białek i innych zanieczyszczeń oraz zagezosczenie DNA. Warunkiem przeprowadzenia dokładnej analizy wyizolowanego DNA jest zwielokrotnienie jego ilości. Dane kombinacje nukleotydów, stanowiące sekwencje genów lub ich fragmentów, można klonować przez wprowadzenie ich do odpowiednich, szybko dzielących się komórek, w których ulegają replikacji z udziałem aparatu replikacji gospodarza. W metodzie tej interesującym nas fragment DNA zostaje połączony z DNA gospodarza, stanowiącym tzw. wektor (czyli fragment DNA o poznanej sekwencji), odpowiednio przygotowany do połączenia przez przecięcie go w specyficznym miejscu przez enzymy restrykcyjne (czyli endonukleazy, przecinające oba pasma DNA w swoich miejscach określonych sekwencją zasad). Jako wektorów używa się najczęściej plazmidów bakteryjnych (czyli małych kołowych cząsteczek dwupasmowego DNA, których naturalną funkcją jest zapewnienie komórce gospodarza odporności na antybiotyki) i liniowych fragmentów DNA bakteriofagów (czyli wirusów zarażają-

cych bakterie). Wykorzystanie plazmidów i DNA fagów pozwala powielić krótkie fragmenty DNA, długości do 45 000 par zasad (45 kpz). Do klonowania znacznie dłuższych odcinków DNA (100-1000 kpz) można wykorzystać tzw. sztuczne chromosomy drożdży (*yeast artificial chromosome* – YAC), zawierające oprócz interesującego nas – wprowadzonego w celu powielenia fragmentu DNA – sekwencji drożdżowych telomerów i centromerów (czyli składowych chromosomu), powodujących, że zachowują się one w komórkach drożdży jak normalne chromosomy. Zastosowanie kombinacji enzymów restrykcyjnych i różnych wektorów do klonowania pozwala na umieszczenie w wektorach całego genomu. Zbiór różnych klonów rekombinantów nazywa się biblioteką genomową. Biblioteka genomu ludzkiego, która zawiera 106 rekombinacyjnych fragmentów dużej długości, ma 99-proc. szansę być biblioteką kompletną. Wobec tego szansę na znalezienie pojedynczej kopii genu, także odpowiedzialnego za jaskrę, są bardzo duże (1, 4, 10, 17).

Obecnie, do powielenia materiału genetycznego z ilości pikogramowych do mikrogramowych najczęściej wykorzystuje się reakcję łańcuchową polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR), opracowaną i opisaną w 1984 r. przez Kary Mullisa. Na reakcję tę składają się trzy etapy. Pierwszy z nich to etap denaturacji, czyli rozdzielenia nici dwuniciowego DNA przez ogrzanie roztworu do temperatury 92-98°C. Drugi etap to hybridyzacja odcinków starterowych (prymarów) długości 20-30 nukleotydów, z fragmentami 3' sąsiadującymi z sekwencją, która ma ulec powieleniu – staje się to możliwe dzięki szybkiemu schłodzeniu roztworu do temperatury 37-70°C. Trzeci etap to elongacja, czyli synteza DNA z użyciem termostabilnej polimerazy, pochodzącej z bakterii *Thermophilus aquaticus*, w temperaturze jej optymalnego działania (70-74°C). Wymienione trzy etapy można powtarzać cyklicznie, zmieniając temperaturę mieszaniny reakcyjnej. Niewrażliwość polimerazy na temperaturę umożliwia przeprowadzenie reakcji w zamkniętych próbkach – po pierwszym cyklu nie dodaje się żadnych odczynników. Podstawową zaletą reakcji łańcuchowej polimerazy jest to, że wszystkie nowe cząsteczki DNA służą jako matryce w kolejnych cyklach. Taki DNA, zawierający jedynie sekwencję powielaną, „oskrzydloną” odcinkami starterowymi narasta więc w kolejnych cyklach wykładniczo – teoretycznie po n cyklach sekwencja zostaje powielona 2^n -krotnie (czyli np. po 20 cyklach – ok. milion razy). Poza tym do przeprowadzenia reakcji nie jest konieczna znajomość sekwencji fragmentu powielanego, a musi być znana jedynie sekwencja odcinków „oskrzydających”, czyli miejsc przyłączenia starterów, które są zwykle nieporównywalnie krótsze od interesującego nas fragmentu DNA (ma on zwykle długość 10 kpz). Dzięki dużej dokładności hybridyzacji w wysokiej temperaturze reakcja łańcuchowa polimerazy jest metodą bardzo specyficzną – jedynym DNA, który ulega powieleniu (amplifikacji), jest odcinek zawarty między parą starterów połączonych z wyjątkiem DNA. Ze względu na niezwykłą czułość dzięki metodzie tej można wykryć i powielić nawet pojedynczą cząsteczkę DNA, stanowiącą mniej niż milionową część całkowitego DNA (1, 10, 17).

Powielony odcinek DNA, zawierający poszukiwaną sekwencję, należy poddać działaniu enzymów restrykcyjnych, które rozzinają go na specyficzne fragmenty. Mieszaninę fragmentów DNA nanosi się następnie na żel agarozowy lub poliakrylamidowy i poddaje działaniu pola elektrycznego prądu stałego. DNA dzięki ujemnemu ładunkowi wędruje do katody – małe fragmenty wędrują najszybciej (w odpowiednich rodzajach żelu można rozdzielić fragmenty DNA, których wielkość różni się tylko jednym nukleotydem na kilkaset wchodzących w ich skład!). Po odpowiednim czasie DNA denaturuje się łagodną alkalizacją i przenosi na filtr nitrocelulozowy w postaci dokładnej repliki układu prążków na żelu (metoda Southerna). Następnie DNA związane z nitrocelulozą poddaje się działaniu tzw. sond DNA (czyli określonych sekwencji nukleotydów, najczęściej otrzymywanych syntetycznie, znakowanych radioaktywnym fosforem ^{32}P), które hybridyzują z komplementarnymi fragmentami DNA, związanymi z filtrem. Filtr przenosi się potem na film rentgenowski, który po wywołaniu ujawnia swoiste prążki odpowiadające fragmentom DNA rozpoznanym przez sondy (a więc ustala sekwencję nukleotydów w badanym DNA) (10, 17).

Postęp w badaniach DNA nastąpił dzięki opracowaniu metod szybkiego sekwencjonowania. DNA można sekwencjonować przez chemiczne zrywanie łańcucha przy określonych zasadach (metoda Maxama-Gilberta) lub przez kontrolowaną terminację replikacji enzymatycznej (metoda „dideoksy” Sangera). W pierwszej z tych metod koniec 5'DNA znakuje się za pomocą kinazy polinukleotydowej, która przyłącza do tego końca ^{32}P przenoszony z określonym trójnukleotydem. Znakowany DNA jest następnie zrywany w miejscach występowania jednej z czterech zasad. W mieszaninie reakcyjnej, specyficznej ze względu na daną zasadę, każdy zerwany łańcuch daje radioaktywne fragmenty (rozciągające się od miejsca przyłączenia radioaktywnego markera do miejsca występowania tej zasady w łańcuchu), które elektroforetycznie są rozdzielane na żelu, co pozwala na odczytywanie autoradiogramów i ustalenie sekwencji zasad. W drugiej metodzie wykorzystuje się specjalne dideoksynukleotydy (będące analogami nukleotydów, nie zawierającymi grupy 3' hydroksylowej, a więc uniemożliwiającymi utworzenie kolejnego wiązania fosfodiesterowego), które kończą syntezę pasma DNA w miejscu swobodnego nukleotydu. Synteza ta odbywa się na oczyszczonej matrycy, będącej badanym kwasem nukleinowym. Jej efektem jest uzyskanie fragmentów DNA, reprezentujących zatrzymanie syntezy na każdym z czterech analogów. Po wprowadzeniu znaczników radioaktywnych w miejsce terminacji, mieszaninę fragmentów poddaje się elektroforezie i sekwencję badanego DNA odczytuje na autoradiogramie. Obecnie coraz częściej zamiast znaczników radioaktywnych stosuje się znaczniki fluorescencyjne, emitujące światło o danej barwie. Pozwala to wyeliminować odczynniki radioaktywne i zautomatyzować metodę (10, 17).

W warunkach naturalnych, podobnie jak w większości ludzkich struktur, występuje normalna zmienność sekwencji DNA, czyli polimorfizm. Zachodzi on z częstotnością 1 na każdym 500 nukleotydów, czyli około 107 razy na genom. Nie ulega wątpliwości, że zmienność

polega na mutacjach DNA. U osób zdrowych zmiany te zachodzą zwykle w niekodujących regionach DNA lub w miejscach, które nie wywołują zmian w funkcji kodowanego białka. Wystąpienie mutacji w regionach kodujących (w obszarach genów) zwykle daje zmiany w obrębie białek, a w następstwie odpowiada za wystąpienie choroby (także jaskry). Zmienność sekwencji DNA jest użytecznym narzędziem diagnostycznym, ponieważ mutacje zachodzące w obrębie miejsc restrykcyjnych (czyli rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne) zmieniają długość fragmentów restrykcyjnych – zjawisko to nosi nazwę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*restriction fragment length polymorphism* – RFLP) i dziedziczy się wg wzoru Mendla – a następnie ich położenie podczas elektroforezy na żelu. Wykorzystanie jednej z trzech opisanych wyżej metod umożliwia więc wykrycie mutacji, a co za tym idzie, metody te mogą być użyteczne do badania dziedziczenia wybranych genów. Analiza tego typu jest szczególnie cenna w porównaniu genetycznym (1, 4, 10, 17).

Poza zmiennością sekwencji DNA w genomie człowieka stwierdzono obecność zmienności tzw. minisatelitów (*variable number of tandem repeats* – VNTR), które zawierają od kilku do kilkuset powtórzeń podstawowego motywu, zawierającego wspólny element w postaci 10-16-nukleotydowego fragmentu. Znaczy to, że dane *locus* minisatelitów może występować w jednej z kilkuset form. Jednoczesne badanie kilku takich loci dla danego osobnika pozwala na uzyskanie charakterystycznego tylko dla niego obrazu, jako że możliwych kombinacji alleli są miliony. Ze względu na nierównomierne rozproszenie minisatelitów w całym genomie, ich wysoki polimorfizm nie może być w dużym stopniu wykorzystany przy konstruowaniu map genetycznych i wykrywaniu mutacji. Prawie idealnymi markerami do konstruowania takich map o dużej rozdzielczości są mikrosatelity (*short tandem repeats* – STR) – znacznie krótsze i częściej występujące w genomie niż minisatelity, a zarazem równomiernie rozproszone w chromosomach (średnio co 6 kpz). Mikrosatelity to krótkie sekwencje zawierające od 10 do 50 powtórzeń stałego motywu długości 1-6 par zasad (rzadko zajmujące obszar większy niż 100 par zasad). Obecnie prowadzone są bardzo intensywne badania nad częstotnością występowania poszczególnych typów mikrosatelitów w genomie człowieka. Badanie zmian liczby powtórzeń danej sekwencji mikrosatelitów w określonym *locus* genomu jest wykorzystywane w diagnostyce wielu chorób, także jaskry. W analizie minisatelitów i mikrosatelitów najczęściej wykorzystuje się metodę hybridyzacji ze znakowanymi sondami DNA, zwaną techniką ASO (*allele specific oligonucleotide*), pozwalającą na wykrywanie różnych postaci alleli (1).

Podsumowanie

W najbliższym czasie można spodziewać się wdrożenia diagnostyki molekularnej do badań rutynowych w jaskrze. Wydaje się to uzasadnione ze względu na fakt, iż wiele przypadków jaskry jest rozpoznawanych zbyt późno, w okresie, w którym uszkodzenie ostrości wzroku i pola widzenia jest nieodwracalne. Identyfikacja genu, odpowiedzialnego za wystąpienie choroby

Małgorzata Seredyka-Burdak

umożliwi wcześniejsze wykrycie predyspozycji do zachorowania u członków rodziny, co pomoże zapobiec istotnej utracie widzenia przez wcześniejsze włączenie leczenia, a w przyszłości, prawdopodobnie, zastosowanie terapii genowej.

Piśmiennictwo

1. Barciszewski J., Łastowski K., Twardowski T.: *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*. Sorus, Poznań, 1996, t. 1 i 2, 55-81, 271-305, 431-453.
2. Boczkowski K.: *Zarys genetyki medycznej*. PZWL, Warszawa, 1990.
3. Chrzanowska-Szrednicka K.: *Aspekty genetyczne i rokowanie w jaskrze wrodzonej późnej*. Klin. Oczna, 1985, 87, 414-416.
4. Drewa G.: *Podstawy genetyki*. Volumed, Wrocław, 1995.
5. Kański J.: *Okulistyka kliniczna*. Urban&Partner, Wrocław, 1997, 233-285.
6. Kee C., Ahn B.H.: *TIGR gene in primary open-angle glaucoma and steroid-induced glaucoma*. Korean J. Ophthalmol., 1997, 11, 75-78.
7. Mansergh F.C., Kenna P.F., Ayuso C., Kiang A.S., Humphries P., Farrar G.J.: *Novel mutations in the TIGR gene in early and late onset open angle glaucoma*. Hum. Mutat., 1998, 11, 244-251.
8. Michels-Rautenstrauss K.G., Mardin C.Y., Budde W.M., Liehr T., Polansky J., Nguyen T., Timmerman V., Van Broeckhoven C., Naumann G.O., Pfeiffer R.A., Rautenstrauss B.W.: *Juvenile open angle glaucoma: fine mapping of the TIGR gene to 1q24.3-q25.2 and mutation analysis*. Hum. Genet., 1998, 102, 103-106.
9. Morissette J., Cote G., Anctil J.L., Plante M., Amyot M., Heon E., Trope G.E., Weissenbach J., Raymond V.: *A common gene for juvenile and adult-onset primary open-angle glaucomas confined on chromosome 1q*. Am. J. Hum. Genet., 1995, 56, 1431-1442.
10. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: *Biochemia Harpera*. PZWL, Warszawa, 1995, 415-549.
11. Popielarz A.: *Rodzinne występowanie jaskry prostej*. Klin. Oczna, 1994, 96, 174-175.
12. Raymond V.: *Molecular genetics of the glaucomas: mapping of the first five "GLC" loci*. Am. J. Hum. Genet., 1997, 60, 272-277.
13. Sarfarazi M., Child A., Stoilova D., Brice G., Desai T., Trifan O.C., Poinoosawmy D., Crick R.P.: *Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region*. Am. J. Hum. Genet., 1998, 62, 641-652.
14. Schuler G.D. i wsp.: *A gene map of the human genome*. Science, 1996, 274, 540-546.
15. Stoilova D., Child A., Trifan O.C., Crick R.P., Coakes R.L., Sarfarazi M.: *Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region*. Genomics, 1996, 36, 142-150.
16. Stone E.M., Sheffield V.C. i wsp.: *Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma*. Science, 1997, 275, 668-670.
17. Stryer L.: *Biochemia*. PWN, Warszawa, 1997, 76-153.
18. Wirtz M.K., Samples J.R., Kramer P.L., Rust K., Topinka J.R., Yount J., Koler R.D., Acott T.S.: *Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q*. Am. J. Hum. Genet., 1997, 60, 296-304.

Praca wpłynęła do Redakcji 9 października 1998 r. (709)

Prace poglądowe

Klinika Oczna 1999, 101 (5): 393-396
ISSN 0023-2157 Indeks 362 646

Leczenie farmakologiczne w jaskrze wrodzonej u małych dzieci

Pharmacotherapy of congenital glaucoma in young children

Bronisława Koraszewska-Matuszewska

Abstract: The aim of congenital glaucoma treatment is to preserve visual function of children's eyes. There are three forms of congenital glaucoma: primary congenital glaucoma of infants, children and the youth, glaucoma in dysgenesis of anterior segment of the eyeballs and glaucoma in congenital systemic diseases. Pharmacotherapy is indicated during preparation for surgical treatment, as an adjunct following surgical procedures and as a protection of retinal and optic nerve function. Carbonic anhydrase inhibitors, hyperosmotic agents, sympathomimetic drugs, parasymphomimetic drugs, prostaglandins may be used. Dopamine antagonists, calcium channel blockers, serotonin antagonists are indicated as a protection of retinal cells and optic nerve function. The most widely used are carbonic anhydrase inhibitors and β -blocker: betaxolol. Antiglaucoma drugs have proven to be efficacious in treating children with congenital glaucoma but they have several serious side effects. Therefore, pharmacotherapy may be used only periodically. The main treatment of congenital glaucoma is surgical treatment.

Słowa kluczowe: jaskra wrodzona, inhibitory anhidrazy węglanowej, leczenie farmakologiczne jaskry wrodzonej, leki hiperosmotyczne, β -bloker, sympatykomimetyki, parasympatykomimetyki, prostaglandyny, antagoniści dopaminy, leki blokujące kanał wapniowy, antagoniści receptorów serotoninowych

Key words: congenital glaucoma, carbonic anhydrase inhibitors, pharmacological treatment in congenital glaucoma, hyperosmotic agents, β -blockers, sympathomimetic drugs, parasymphomimetic drugs, prostaglandins, dopamine antagonists, calcium channel blockers, serotoninine antagonists

Jaskra wrodzona jest schorzeniem, w którym podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe (cw) jest spowodowane uszkodzeniami budowy gałki ocznej, powstałymi w życiu płodowym. Może być ono przyczyną zaniku nerwu wzrokowego, rozciągnięcia powłok gałki oraz wywołania jej wtórnych zmian, a przede wszystkim ślepoty (16, 22, 28, 31).

Najczęściej występuje jako pierwotna jaskra wrodzona, w której nieprawidłowości anatomiczne dotyczą dróg odpływu cieczy wodnistej (2), rzadziej ma miejsce w wadach rozwojowych oka i zespołach wad układowych (16, 19, 33).

Pierwotna jaskra wrodzona u dzieci może być rozpoznawana w okresie od urodzenia do 2. roku życia (33), przy czym do 5. dnia życia jako jaskra noworodków, do 6. miesiąca życia jako jaskra niemowląt (22). Jeśli występuje między 3. a 10. rokiem życia, jest nazywana pierwotną jaskrą dziecięcą, zaś między 10. a 35. rokiem życia – pierwotną jaskrą młodzieńczą (33).

W jaskrze wrodzonej podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe wywołane jest zaburzeniami anatomicznej budowy gałki ocznej, dlatego w celu usunięcia przyczyny jaskry powinno stosować się leczenie chirurgiczne (16, 19, 22, 31, 33). Terapia jaskry musi być bowiem dostosowana do jej przyczyn i prowadzona w taki sposób, aby zachowane zostało widzenie.

Leczenie farmakologiczne w jaskrze wrodzonej najczęściej jest stosowane w okresie przygotowywania pacjenta do operacji. Podawanie leków bywa również konieczne po zabiegach chirurgicznych i w okresach między operacjami (16, 19, 20, 22, 31). Terapia zachowawcza

Z Katedry i Kliniki Okulistyki Dziecięcej Śląskiej AM w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. Bronisława Koraszewska-Matuszewska

Adres do korespondencji (Reprint requests to):
Prof. dr hab. Bronisława Koraszewska-Matuszewska
ul. Zwirki i Wigury 15
40-063 Katowice