

Prikaz bolesnika s Leberovom nasljednom optičkom neuropatijom

Mario Bradvica¹, Dinko Pavlinić², Jasenka Wagner², Ivanka Štenc Bradvica³

¹Klinički bolnički centar Osijek, Odjel za očne bolesti, Europske avenije 14-16, Osijek

²Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, DNA laboratorij, J. Huttlera 4, Osijek

³Klinički bolnički centar Osijek, Klinika za neurologiju, J. Huttlera 4, Osijek

Autor: Mario Bradvica

E-mail: mario.bradvica@vip.hr

Skraćeni naslov: Leberova bolest-prikaz slučaja

Prikaz bolesnika

UDK 616.89-008.43

Prispjelo: 16. studenoga 2011.

Leberova nasljedna optička neuropatija (Leber hereditary optic neuropathy-LHON) manifestira se bilateralnim akutnim ili subakutnim gubitkom centralnoga vida. LHON je povezan s nekoliko točkastih mutacija mitohondrijalne DNA i nasljeđuje se preko majke. Prikazujemo bolesnika u dobi od 44 godine kod kojeg se LHON manifestirao u 14. godini života. Bolesnikova dva brata, tri sestre i njihova djeca nisu razvili znakove bolesti. U dobi od 42 i 44 godine, klinički oftalmološki pregled potvrdio je postojanje LHON-a i posljedične atrofije vidnoga živca iako mitohondrijalne DNA mutacije LHON 3460 G>A, 11778 G>A i 14484 T>C nisu detektirane.

Ključne riječi: LHON, mutacija mitohondrijske DNK

Uvod

LHON se klinički manifestira kao akutni ili subakutni gubitak centralne vidne oštine. Gubitak vida jednoga oka obično je nakon nekoliko mjeseci ili godina popraćen gubitkom vida i drugoga oka. Tipičan nalaz na fundusu oka u akutnoj fazi jest peripapilarna mikroangiopatija te propadanje optičkoga živca s fokalnom degeneracijom retinalnih ganglija i centrocekalnim apsolutnim skotomom u vidnom polju. LHON se najčešće razvija u drugoj ili trećoj dekadi života, i to uglavnom kod muškaraca. LHON je prva bolest povezana s defektom mitohondrijalne DNA i prenosi se preko majke (1-7).

Mitohondriji su subcelularni organeli odgovorni za proizvodnju energije procesom aerobne respiracije, uglavnom u respiratornom lancu. Respiratorni lanac sastavljen je od pet enzimatskih multi-heteromernih kompleksa ugrađenih u unutrašnju membranu mitohondrija. Mitohondriji imaju svoju vlastitu mitohondrijalnu, 16.5 kB cirkularnu dvostruko lančanu (mt)DNA molekulu, koja se nasljeđuje preko majke. LHON je danas povezan s 33 točkaste mutacije mitohondrijalne DNA (8). Tri najčešće točkaste LHON mutacije jesu G3460A, G11778A i T14484C. Točkasta mutacija G3460A povezuje se s

funkcionalnim defektom ND1 podjedinice, G11778A s funkcionalnim defektom ND4 podjedinice i T14484C s funkcionalnim defektom ND6 podjedinice kompleksa i respiratornog lanca. Mutacija G11778A obično je homoplazmička te vrši ekspresiju samo mutirane mtDNA i ima lošu prognozu za pacijenta, dok je mutacija T14484C povezana s blagim oblikom oboljenja (1-7).

Materijal i metode:

Pacijent i obitelj

Pacijent je 44-godišnji muškarac kojem se LHON manifestirao u dobi od 14 godina. Pacijentova majka, dva brata, tri sestre, te djeca braće i sestara, sve zajedno 8 sinova i 4 kćeri, nisu pokazali kliničke znakove LHON-a. Pacijent je potpisao informirani pristanak za DNA analizu.

Oftalmološki pregledi

Učinjeno je ispitivanje centralne vidne oštine (VA), biomikroskopija prednjega segmenta oka i pregled fundusa indirektnom biomikroskopijom.

TABLICA 1.

Početnice i sonde korištene u *Taqman* reakcijama, prikazane u smjeru 5' > 3'. Wt-alel divljeg tipa; Mt-mutirani alel. VIC i FAM – komercijalni nazivi fluorescentnih biljega

TABLE 1.

Primers and probes used in *Taqman* assays, shown in the 5' > 3' direction. Wt-wild type allele; Mt-mutated allele. VIC and FAM - commercial names of fluorescent markers

	3460 G>A	11778 G>A	14484 T>C
Uzvodna početnica/ Forward primer	CCCCTACGGGC TACTACAAC	TGCCTAGCAAACCTC AAACTACGAA	TCCTCAATAGCCATCGC TGTAGTAT
Nizvodna početnica/ Reverse primer	GGTAGATGTGG CGGGTTTTAGG	TGGGAGTAGAGTTT GAAGTCCTTGA	GTGGTCGGGTGTGTTA TTATTCTGA
WtSonda (VIC)/ Wt Probe (VIC)	TTCGCTGACGC CATAA	CTCACAGTCGCATC AT	AAAGACAACCATCATTC
MtSonda (FAM)/ Mt Probe (FAM)	TTCGCTGACACC ATAA	CTCACAGTCACATC AT	AAGACAACCACCATTC

DNA analiza (Taqman metoda)

Za testiranje pacijenta na LHON 3460 G>A, 11778 G>A i 14484 T>C mitohondrijalne DNA mutacije primijenjena je *Taqman* analiza. Kemijska metoda temeljena na *Taqman* sondama koristi fluorescirajuće sonde za detekciju specifičnih PCR produkata koji nastaju tijekom PCR reakcije. Fluorescirajuće oligonukleotidne sonde konstruirane su tako da im je na 5' kraju vezana fluorescentna "reporter" boja, a na 3' kraju "prigušivač" boja. Kada je sonda cjelovita, intenzitet emitirane fluorescencije od strane reporterske boje značajno je smanjen zbog blizine prigušivača, zahvaljujući fizikalnom efektu FRET-a (fluorescentnoga rezonantnog prijenosa energije). U slučaju kada je prisutna ciljna sekvenca, sonda se veže između mjesta za vezanje početnica i biva pocijepana 5'-nukleaznom aktivnošću DNA polimeraze tijekom

kom procesa produljenja lanca. Cijepanjem sonde dolazi do razdvajanja reporterske boje i prigušivača, čime se pojačava fluorescentni signal reporterske boje. Ujedno dolazi do odstranjivanja sonde što omogućava daljnje produžavanje početnice prema kraju DNA kalupa (9).

DNA je izolirana pomoću komercijalnih spin kolona *Dneasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Njemačka)*. Umnožavanje DNA i analiza rezultata učinjena je primjenom *ABI PRISM 7000 SDS* instrumenta (*Applied Biosystems Inc., SAD*). U Tablici 1. prikazane su sekvence korištenih klica i sonda.

Rezultati

Oftalmološki status bolesnika nije se mijenjao između 42. i 44. godine života, a za to vrijeme bolesnik nije bio

ni pod kakvom terapijom. Vidna oštrina desnoga oka na razini je pokreta ruke, a lijevog oka na razini nesigurnog osjeta svjetla. Biomikroskopijom uočavamo obostrano sporiju reakciju zjenica na svjetlo. Na fundusu oba oka nalaze se blijede atrofirane papile optičkih živaca, s ostalim dijelovima očne pozadine urednim za dob.

DNA analizom leukocita periferne krvi u pacijentovoj 42. godini života dokazano je prisustvo samo divljeg tipa DNA, odnosno nemutirane LHON 3460 G>A, 11778 G>A i 14484 T>C mtDNA. DNA analiza u pacijentovoj 44. godini života na uzorku periferne krvi i uzorku bukalne sluznice ponovno je dokazala samo nemutiranu LHON 3460 G>A, 11778 G>A i 14484 T>C mtDNA, kako u stanicama bukalne sluznice tako i u stanicama periferne krvi.

Diskusija

Prikazan je pacijent iz Hrvatske kod kojega se Leberova bolest razvila u 14. godini života. Takva je pojava LHON-a u djetinjstvu već i ranije opisana u literaturi (10). U ovoj obitelji varijabilna klinička pojava LHON-a, koja je zahvatila jednoga od trojice braće, u skladu je s literaturnim podacima da se LHON manifestira u 25-50% muških srodnika (4, 5). Pacijentova majka, dva brata, tri sestre i njihovo 12-ero djece nisu razvili kliničke znakove LHON-a pa niti DNA analiza kod njih nije rađena. Ženski srodnici uglavnom ne bivaju zahvaćeni klinički manifestnim oblikom LHON-a (11), što je uočeno i u toj obitelji. Djeca braće i sestara također nisu razvili klinički oblik bolesti budući da se LHON prenosi po ženskoj rodbinskoj liniji (1-7).

Analiza tri najčešće mitohondrijalne DNA mutacije odgovorne za nastanak LHON-a (3460 G>A, 11778 G>A i 14484 T>C) nije dokazala prisustvo mutiranih alela niti u pacijentovoj 42. niti u 44. godini. Pacijent u međuvremenu nije primao nikakvu terapiju i nije uočeno klinički objektivno ili subjektivno poboljšanje stanja. Daljnja analiza drugih, manje učestalih, točkastih mitohondrijalnih DNA mutacija, potencijalno odgovornih za razvoj LHON-a, mogla bi dati jasniji uvid u molekularno-patofiziološki mehanizam nastanka te bolesti.

LITERATURA

1. Zeviani M, Antozzi C. Mitochondrial disorders. *Mol Hum Reprod.* 1997;3(2): 133-48.
2. Bauer MF, Gempel K, Hofmann S, Jaksch M, Philbrook C, Gerbitz KD. Mitochondrial disorders. A diagnostic challenge in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37:855-76.
3. Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion.* 2001;1:3-31.
4. Chinnery PF. Inheritance of mitochondrial disorders. *Mitochondrion.* 2002;2:149-55.
5. Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet.* 2002;39:162-9.
6. Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain.* 2004;127:2153-72.
7. Schapira AHV. Mitochondrial diseases. *Lancet.* 2006;368:70-82.
8. Man PYW, Griffiths PG, Chinnery PF. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30:81-114.
9. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenching probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.* 1995; 4:357-62.
10. Barboni P, Savini G, Valentino ML, La Morgia C, Bellusci C, De Negri AM, Sadun F, QCarta A, Carbonelli M, Sadun AA, Carelli V. Leber's hereditary optic neuropathy with childhood onset. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:5303-9.
11. Martin-Kleiner I, Gabrilovac J, Bradvica M, Vidović T, Cerovski B, Fumić K, Boranić M. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) associated with mitochondrial DNA point mutation G11778A in two Croatian families. *Coll Antropol.* 2006;30:171-4.

A CASE REPORT OF A LHON PATIENT

Mario Bradvica¹, Dinko Pavlinić², Jasenka Wagner², Ivanka Štenc Bradvica³

¹University Hospital Centre Osijek, Department of Ophthalmology, Europske avenije 14-16, Osijek
²J. J. Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek, DNA Laboratory, J. Huttlera 4, Osijek

³University Hospital Centre Osijek, Clinic for Neurology, J. Huttlera 4, Osijek

Correspondence to: Mario Bradvica

E-mail: mario.bradvica@vip.hr

Case report

ABSTRACT

Leber's hereditary optic neuroretinopathy (LHON) is manifested by bilateral acute or subacute loss of the central vision. LHON is linked to several point mutations of the mitochondrial DNA and is maternally inherited. The patient is a male, 44 years old, who manifested LHON at the age of 14. The patient's two brothers, three sisters, and their children have no signs of LHON. Ophthalmic examination confirmed LHON at the age of 42 and 44, while LHON 3460 G>A, 11778 G>A and 14484 T>C mitochondrial DNA mutations have not been detected.

Key words: LHON, mitochondrial DNA mutation