

**Temat:** Współczesny obraz klasycznych metod diagnostycznych. Diagnostyka immunologiczna i molekularna .

**Zakres treści:**

Molekularne i immunologiczne metody wykrywania patogenów. Wykrywanie mutacji genowych. Medycyna molekularna.

**Zadania do analizy:**

*Karta pracy A*

1. Na podstawie filmu *Barwienie metodą Grama* wykonaj poniższe polecenia.

a) Zaznacz prawidłowe zakończenie zdania.

Metodą Grama barwi się

- A. wirusy.
- B. bakterie.
- C. grzyby.
- D. protisty.

b) Wyjaśnij, w jakim celu stosuje się barwienie metodą Grama.

.....  
.....

c) Wykreśl wyrazy w zdaniu tak, aby informacja dotycząca barwienia metodą Grama była prawdziwa.

Na kolor fioletowy barwią się bakterie *Gram-dodatnie* / *Gram-ujemne*. Są to bakterie o *grubej* / *cienkiej* ścianie komórkowej.

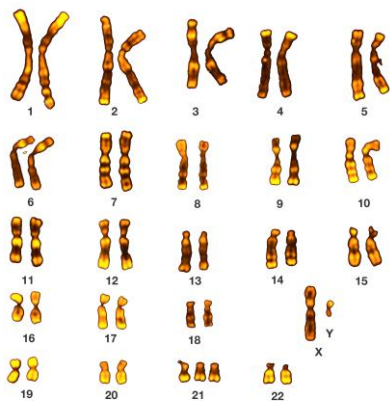
d) Wyjaśnij, dlaczego barwienie metodą Grama jest nadal stosowane w diagnostyce chorób bakteryjnych. Podaj dwie zalety tej metody.

.....  
.....

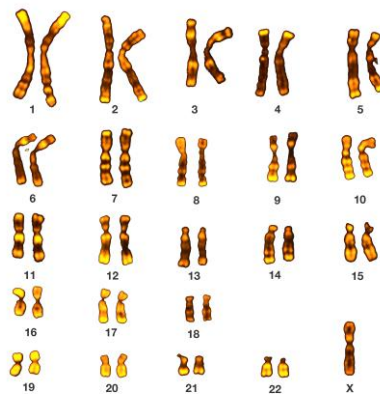
2. Poniżej umieszczono tekst dotyczący chromosomów oraz rysunki przedstawiające kariogramy.

W każdej komórce naszego ciała zawierającej jądro, oprócz komórek rozrodczych, znajdują się dwa zestawy chromosomów – jeden odziedziczony po matce, a drugi – po ojcu. Chromosomy w jednym zestawie mają swoje odpowiedniki w drugim zestawie. Mają one tę samą wielkość i kształt, znajdują się w nich także te same geny. Chromosomy podobne do siebie nazywamy chromosomami homologicznymi. Komórki z podwójnym zestawem chromosomów to komórki diploidalne, natomiast te z pojedynczym zestawem chromosomów to komórki haploidalne. Komórki budujące ciało człowieka są diploidalne. Każda z nich zawiera 23 pary, czyli 46 chromosomów.

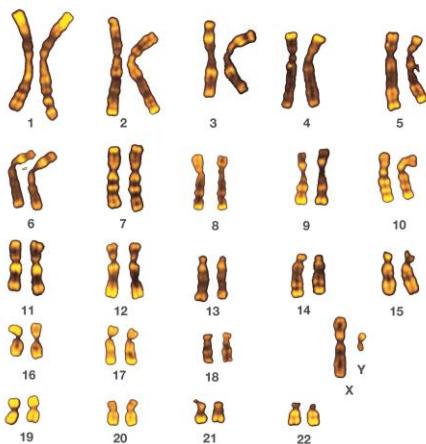
Wiele chorób genetycznych wiąże się ze zmianą ilości chromosomów. Mutacje związane ze zwielokrotnieniem liczby chromosomów lub ich utratą można wykryć metodą klasyczną, tworząc tzw. kariogram. Komórki, najczęściej limfocyty krwi, hoduje się in vitro. Za pomocą toksycznych związków chemicznych zatrzymuje się podziały hodowanych komórek w stadium, gdy chromosomy są najbardziej widoczne. Następnie komórki są utrwalane, barwione w formie preparatu na szkiełku mikroskopowym i poddawane analizie mikroskopowej.



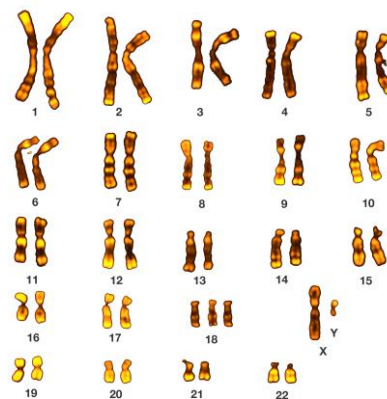
A.



B.



C.



D.

a) Podpisz rysunek przedstawiający kariogram osoby zdrowej. Uzasadnij swój wybór jednym argumentem.

.....

b) Czy pozostałe kariogramy wskazują na to samo schorzenie genetyczne? Uzasadnij swoją odpowiedź.

.....

.....

3. Zaznacz zdania prawidłowo charakteryzujące przeciwciała.

- a) Przeciwciała są białkami krwi uczestniczącymi w niszczeniu patogenów, np. bakterii i wirusów.
- b) Przeciwciała są wytwarzane w czerwonym szpiku kostnym przez limfocyty T.
- c) Przeciwciała są specyficzne, tzn. rozpoznają jeden określony rodzaj antygeny i wiążą się z nim.
- d) Przeciwciała są wytwarzane jedynie w przypadku infekcji wirusowych.

### **Karta pracy B**

Przeczytaj poniższy tekst dotyczący przeciwciał monoklonalnych, a następnie odpowiedz na pytania.

*W latach 70. XX w. opracowano przełomową w medycynie metodę otrzymywania przeciwciał monoklonalnych.*

*Organizm człowieka dysponuje naturalnymi mechanizmami obronnymi. Jednym z nich jest wytwarzanie przeciwciał – specyficznych białek biorących udział w niszczeniu szkodliwych drobnoustrojów. Za produkcję przeciwciał odpowiadają komórki krwi – limfocyty B.*

*Wskutek kontaktu z antygenem limfocyt B wytwarza jeden specyficzny rodzaj przeciwciał, pasujący przestrzennie wyłącznie do tego jednego antygeny. Takie dopasowanie pozwala na wiązanie i unieszkodliwianie antygeny. Prawidłowe limfocyty B są śmiertelne, produkują przeciwciała tylko przez określony czas. Wyjątkiem są nowotwory typu szpiczaka, w których wypadku zmienione nowotworowo limfocyty B uzyskują nieśmiertelność. Jeśli dokona się połączenia prawidłowych limfocytów B z komórkami nowotworowymi, otrzyma się komórki nieśmiertelne, produkujące po kontakcie z antygenem przeciwciała o określonej specyficzności, czyli tzw. przeciwciała monoklonalne. Można je otrzymywać w hodowlach tkankowych lub w organizmach zwierząt, np. myszy.*

*Przeciwciała monoklonalne są stosowane w testach diagnostycznych. Za ich pomocą można wykryć obecność drobnoustrojów chorobotwórczych – wirusów, bakterii lub grzybów w materiale biologicznym. Metody opierające się na przeciwciałach monoklonalnych stosuje się standardowo m.in. w diagnostyce wirusa HIV. Tego typu testy służą również do wykrywania toksyn, leków, hormonów lub enzymów w płynach ustrojowych bądź w moczu oraz do określania ich stężeń. Przykładem mogą być testy na obecność narkotyków lub testy ciążowe.*

*Przeciwciała monoklonalne są również wykorzystywane w leczeniu chorób nowotworowych. Dotychczas znalazły zastosowanie m.in. w leczeniu zaawansowanego raka piersi oraz raka jelita grubego. Przeciwciała wiążą się z wybranymi receptorami na powierzchni komórek guza, co prowadzi do zablokowania przekazywania sygnału do ich wnętrza i w konsekwencji utrudnia podziały komórek nowotworowych. Metoda ta jest bardzo skuteczna i w porównaniu z chemioterapią lub radioterapią powoduje niewiele skutków ubocznych. Jest jednak bardzo droga.*

1. Wyjaśnij, w jakim celu podczas tworzenia przeciwciał monoklonalnych dokonuje się połączenia prawidłowych limfocytów B z komórkami nowotworowymi.

.....  
.....

2. Wymień czynniki chorobotwórcze, które można wykryć przy pomocy przeciwciał monoklonalnych.

.....  
.....  
.....

3. Czy testy diagnostyczne oparte na przeciwciałach monoklonalnych stosuje się wyłącznie w celu wykrycia choroby? Uzasadnij odpowiedź, podając jeden argument.

.....  
.....

4. Czy przeciwciała monoklonalne są wykorzystywane tylko w diagnostyce? Uzasadnij swoją odpowiedź.

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

5. Podaj nazwę metod diagnostycznych, do których stosuje się testy oparte na przeciwciałach.

.....

-----

Przeczytaj poniższy tekst dotyczący metody PCR, a następnie wykonaj polecenia.

*W połowie lat 80. XX w. opracowano rewolucyjną metodę powielania DNA w probówce, nazwaną łańcuchową reakcją polimerazy (PCR). Dzięki niej jest możliwe powielanie w milionach kopii dowolnego fragmentu DNA o długości od kilkudziesięciu do kilku tysięcy nukleotydów. Metoda PCR polega na przeprowadzeniu wielu cykli syntezy DNA z wykorzystaniem syntetycznych starterów RNA i odpornej na wysokie temperatury polimerazy DNA, pochodzącej z termofilnych bakterii (część cyklu przebiega w wysokiej temperaturze).*

*Metoda PCR znalazła wiele zastosowań, m.in. w badaniach nad genomem, biotechnologii, kryminalistyce, ustalaniu pokrewieństwa pomiędzy osobnikami, diagnostyce chorób zakaźnych i genetycznych, paleontologii czy archeologii. W diagnostyce medycznej PCR pozwala wykryć obecność DNA (lub RNA) wirusowego lub bakteryjnego w materiale biologicznym pacjenta, zanim pojawią się u niego pierwsze objawy choroby. Jeśli w materiale biologicznym, np. w próbce krwi lub próbce płynu tkankowego, znajduje się DNA pochodzące z drobnoustroju chorobotwórczego, to podczas PCR jego fragmenty ulegną powieleniu, co można uwidocznić podczas elektroforezy. Jeśli pacjent jest zdrowy, łańcuchowa reakcja polimerazy nie zajdzie, nie otrzymamy więc produktów reakcji w postaci powielonych fragmentów DNA patogenu.*

*Metodę PCR stosuje m.in. we wczesnej diagnostyce AIDS. Badanie pozwala na wykrycie cząstek wirusa i umożliwia potwierdzenie zakażenia HIV już po 2–4 tygodniach od zakażenia, w czasie tzw. okienka serologicznego, kiedy we krwi nie ma jeszcze przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi. Otrzymanie wyniku ujemnego po trzech miesiącach od terminu potencjalnej infekcji wyklucza zakażenie wirusem HIV. Metoda PCR pozwala również na określenie ilości kopii wirusa we krwi, co ułatwia monitorowanie przebiegu zakażenia i zwiększa skuteczność leczenia AIDS.*

*Za pomocą PCR diagnozuje się także zakażenia innymi drobnoustrojami chorobotwórczymi, np. wirusem HPV (wirus brodawczaka ludzkiego, wywołujący m.in. raka szyjki macicy), wirusem HCV (wirus zapalenia wątroby typu C) lub bakterią *Borrelia burgdorferi* (bakteria wywołująca boreliozę).*

*W podobny sposób metodę PCR stosuje się do wykrywania w materiale genetycznym człowieka mutacji związanych z chorobami genetycznymi, takimi jak mukowiscydoza, anemia sierpowata czy talasemia.*

1. Wyjaśnij, na czym polega metoda PCR.

.....  
.....  
.....

2. Wymień trzy zastosowania metody PCR.

.....  
.....  
.....

3. Wyjaśnij przewagę metody PCR nad metodami immunologicznymi w diagnozowaniu zakażenia wirusem HIV.

.....  
.....  
.....

4. Wymień trzy (inne niż AIDS) choroby, które można zdiagnozować przy pomocy metody PCR.

.....  
.....  
.....

5. Napisz, do jakich metod diagnostycznych należy metoda PCR.

.....

---

## Karta pracy D

Przeczytaj poniższy tekst dotyczący białek rekombinowanych, a następnie wykonaj polecenia.

*Wiele chorób człowieka, m.in. cukrzyca i hemofilia, wiąże się z brakiem lub obniżeniem poziomu wytwarzania białek, niezbędnych do prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych. Cukrzyca typu I jest chorobą prowadzącą do całkowitego braku wytwarzania przez trzustkę białkowego hormonu insuliny. Insulina wychwytuje z krwi glukozę, która w wątrobie jest przekształcana w cukier zapasowy – glikogen. Jej brak powoduje wysokie stężenie glukozy we krwi, co prowadzi do poważnych zaburzeń metabolizmu, dlatego nieleczona cukrzyca jest chorobą śmiertelną.*

*Hemofilia to choroba polegająca na niewytwarzaniu przez organizm niektórych białkowych czynników krzepliwości krwi. Brak krzepliwości krwi pociąga za sobą niebezpieczeństwo wykrwawienia się, nawet w wyniku niewielkiego zranienia.*

*Zarówno cukrzyca, jak i hemofilia są chorobami nieuleczalnymi, które przez wiele wieków charakteryzowały się wysoką śmiertelnością. Przełom w leczeniu chorób metabolicznych przyniosła metoda rekombinowanego DNA, która pozwala na produkcję białek człowieka w organizmach bakterii, grzybów, roślin lub zwierząt. W tym celu do genomu wybranego organizmu wstawiany jest gen kodujący dane białko, np. insulinę człowieka. W wyniku modyfikacji organizm produkuje białko, którego naturalnie nie wytwarza, czyli białko rekombinowane.*

*Produkcja insuliny na skalę przemysłową odbywa się m.in. w komórkach drożdży. Gen człowieka kodujący insulinę wprowadza się do genomu drożdży za pomocą specjalnego wektora (nośnika), po uprzednim usunięciu ściany komórkowej grzyba.*

*Nie wszystkie białka człowieka można łatwo wytwarzać w komórkach bakterii lub drożdży. Czynniki krzepliwości krwi (podawany jako lek osobom chorym na hemofilię) produkowany jest w komórkach ssaków.*

1. Wyjaśnij pojęcie *białko rekombinowane*.

.....  
.....  
.....

2. Podaj przykłady chorób, które mogą być leczone za pomocą białek rekombinowanych.

.....  
.....  
.....  
.....

3. Napisz, w jaki sposób otrzymuje się rekombinowaną insulinę.

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

4. Czy za pomocą białek rekombinowanych można całkowicie wyleczyć choroby takie, jak cukrzyca lub hemofilia? Uzasadnij swoją odpowiedź.

.....  
.....

5. Napisz, jaka gałąź medycyny zajmuje się terapią chorób przy pomocy białek rekombinowanych.

.....

---

**Karta pracy E**

Przeczytaj poniższy tekst dotyczący terapii genowej, a następnie wykonaj polecenia.

*Medycyna molekularna jest dziedziną bardzo wszechstronną, opierającą się na osiągnięciach biologii molekularnej. Dzięki metodom medycyny molekularnej można nie tylko zdiagnozować chorobę, ale również prognozować jej przebieg u konkretnej osoby. Metody te pozwalają badać indywidualne różnice genetyczne pomiędzy patogenami oraz ustalać stopień zjadliwości patogenów, czyli zdolności do wywołania choroby. Podobnie bada się wersje genów u pacjenta, gdyż mogą one wpływać na skuteczność danego leku. Stanowi to podstawę indywidualnego doboru najskuteczniejszej metody leczenia.*

Jedną z gałęzi medycyny molekularnej jest terapia genowa. Polega ona na wprowadzeniu do komórek prawidłowej wersji genu, którego zmutowana wersja jest odpowiedzialna za rozwój choroby. Prawidłowa wersja genu ulega w komórkach chorego ekspresji, dzięki czemu powstaje funkcjonalne białko, którego brakowało u chorego. Terapia genowa może być również skuteczna w terapii nowotworów, „naprawiając” zaburzenia cyklu komórkowego, występujące w komórkach nowotworowych. Produkty ekspresji wprowadzonych wersji genów hamują niekontrolowane podziały i wzrost komórek guza lub powodują śmierć nieprawidłowych komórek.

Geny można wprowadzać do organizmu chorego w dwojaki sposób. W tzw. terapii ex vivo pobiera się komórki pacjenta (np. komórki macierzyste krwi i szpiku kostnego), do których, za pomocą wektora (nośnika), wprowadza się prawidłową wersję genu. Tak zmodyfikowane komórki wszczepia się z powrotem pacjentowi. Natomiast w terapii in vivo, wektor niosący prawidłową wersję genu zostaje podany bezpośrednio do organizmu chorego. W terapii genowej najczęściej stosowane są wektory wirusowe. W tym celu wykorzystuje się zmodyfikowane cząstki wirusów, które są zdolne do infekowania komórek lecz pozbawione własnych genów, które odpowiadają za ich chorobotwórcze właściwości. Jednym z zagrożeń wynikających z zastosowanej metody terapii genowej jest fakt, że prawidłowy gen może zostać wprowadzony w przypadkowe miejsce w genomie, powodując uszkodzenie innego genu,

a w wyniku tego np. rozwój nowotworu.

W chwili obecnej prowadzone są liczne badania nad zastosowaniem terapii genowej w leczeniu chorób genetycznych i autoimmunologicznych oraz nowotworowych. Pierwsze sukcesy dotyczą takich chorób, jak m.in.: wrodzona ślepota Lebera, przewlekła białaczka szpikowa, hemofilia czy choroba Parkinsona.

1. Napisz, dlaczego metodę leczenia powinno się dobierać indywidualnie dla każdego pacjenta.

.....  
.....  
.....

2. Opisz krótko, na czym polega terapia genowa.

.....  
.....  
.....

Podaj cztery przykłady chorób, które będą prawdopodobnie leczone metodą terapii genowej.

.....  
.....  
.....

3. Wyjaśnij, na czym polegają niebezpieczeństwa związane ze stosowaniem terapii genowej.

.....  
.....  
.....

4. Napisz, jaka gałąź medycyny zajmuje się terapią genową.

.....