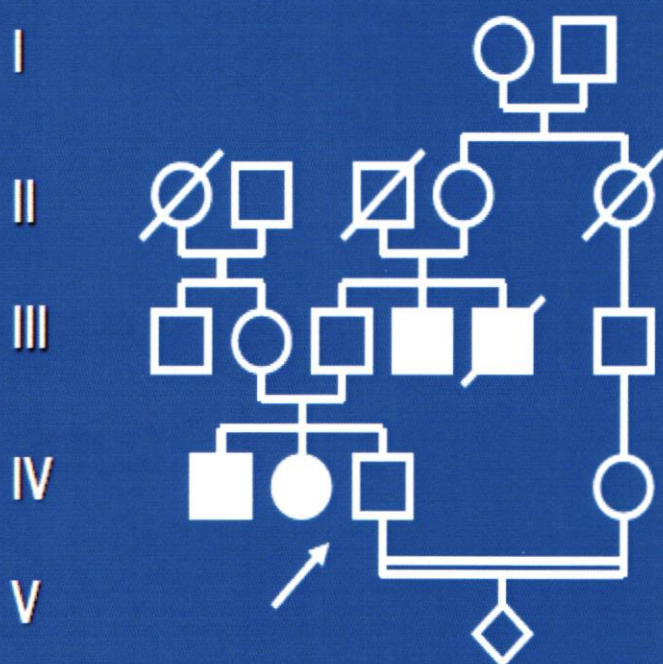


DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE

**Zavod za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagreb
Organiziraju**

**NOVOSTI U KLINIČKOJ GENETICI:
MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, TERAPIJA I
PREVENCIJA POJASNIH MIŠIĆNIH
DISTROFIJA (LGMD)**



Gost- predavač: Dr. J. Andoni URTIZBEREA, M.D.
Head, Summer School of Myology, Institut de Myologie
Hôpital de la Salpêtrière, 75651 PARIS Cedex - France
Praticien Hospitalier, MPR, Centre de Référence Neuromusculaire,
GNMH, Hôpital Marin – AHP, 64700 HENDAYE - France

Voditeljica tečaja: Prof.dr.sc.Nina Canki-Klain, dr.med.

NOVOSTI U KLINIČKOJ GENETICI:

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, TERAPIJA I PREVENCIJA POJASNIH MIŠIĆNIH DISTROFIJA (LGMD)

Urednica: Nina Canki-Klain

DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE

i

Zavod za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta

Sveučilišta u Zagrebu

Šalata 12, 10 000 Zagreb

Izdavač
DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU
HRVATSKE

Glavna urednica
Nina Canki-Klain

Grafička oprema naslovne stranice
Nina Canki-Klain
Računalni unos teksta: Astrid Milić

Tisak: Best copy d.o.o., Horvaćanska 31, Zagreb

Tekstovi nisu lektorirani ni recenzirani

NOVOSTI U KLINIČKOJ GENETICI: MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, TERAPIJA I PREVENCIJA POJASNIH MIŠIĆNIH DISTROFIJA (LGMD)

Priručno štivo

Poslijediplomski tečaj stjecanja znanja s provjerom

Povjerenstvo za medicinsku izobrazbu liječnika HLK kategoriziralo je i vrednovalo stručni skup u I. kategoriju i dodijelilo 18 bodova za aktivno i 15 bodova za pasivno sudjelovanje.

Organizator

**DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE
i**

**Zavod za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu**

Gost-predavač: Dr. J.Andoni URTIZBEREA, M.D.

Head, Summer School of Myology, Institut de Myologie

Hôpital de la Salpêtrière, 75651 PARIS Cedex-France

Praticien Hospitalier, MPR, Centre de Référence Neuromusculaire

GNMH, Hôpital Marin – APHP, 64700 HENDAYE - France

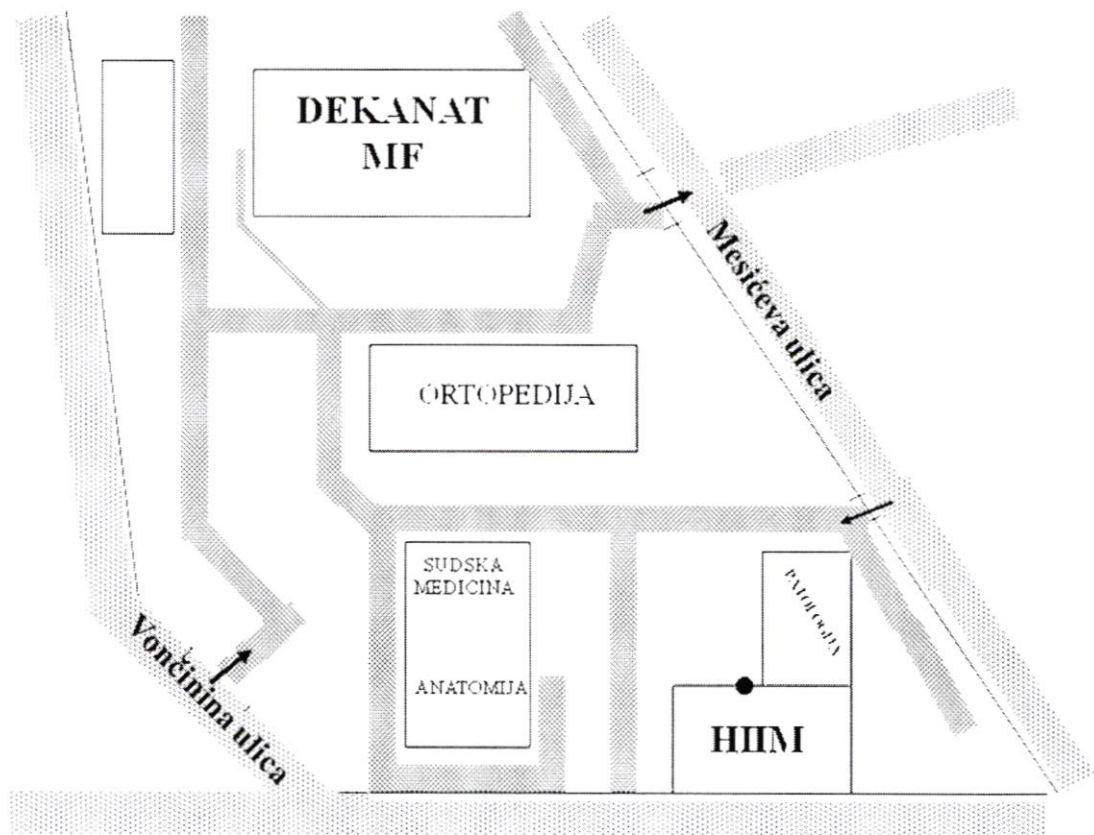
Voditelj tečaja

Prof.dr.sc. Nina Canki-Klain, dr.med.

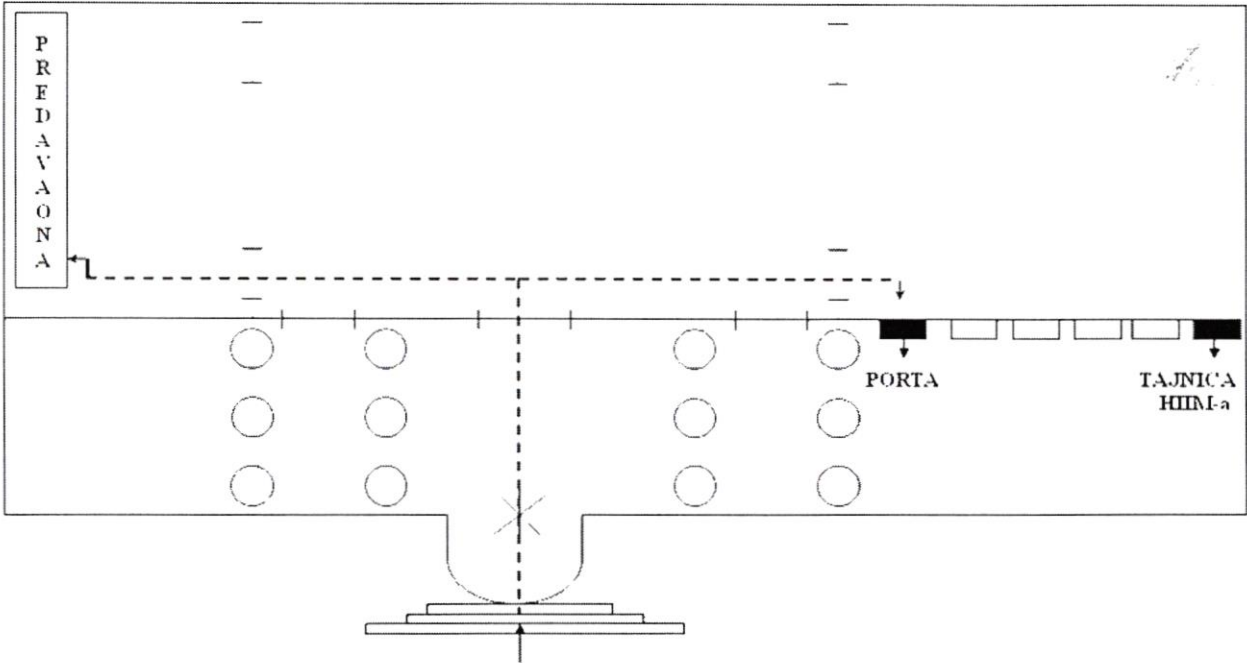
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Hrvatski institut za istraživanje mozga, Šalata 12, 10 000 Zagreb

Zagreb, 31.11.-01.12.2012.



Hrvatski institut za istraživanje mozga



SADRŽAJ

Program poslijediplomskog tečaja

Popis sudionika tečaja

POJASNE MIŠIĆNE DISTROFIJE (LGMD): DEFINICIJA, KLASIFIKACIJA I GENETIKA.....	14
	+ appendix
Nina Canki-Klain	
KLINIČKA SLIKA I DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA LGMD	15
Marija Žagar	
ULOGA NEUROLOGA U DIJAGNOSTICI, ZBRINJAVANJU I PRAĆENJU BOLESNIKA S POJASNIM MIŠIĆNIM DISTROFIJAMA.....	22
Davorka Vranješ	
ULOGA PATOLOGA U DIJAGNOSTICI LGMD	29
Karmelija Žarković i Antonija Jakovčević	
DIJAGNOSTIČKA I PROGNOСТИČKA VRIJEDNOST MAGNETSKE REZONANCIJE U ANALIZI LEZIJA MIŠIĆA BOLESNIKA S LGMD	37
Dražen Lovrić	
ŽIVJETI S POJASNOM MIŠIĆNOM DISTROFIJOM.....	48
Mirjana Janžek	
PSIHIČKI PROBLEM BOLESNIKA S OTEŽANOM POKRETLJIVOŠĆU (LGMD). ...	53
Nataša Jokić-Begić	
ULOGA PULMOLOGA U PRAĆENJU I LIJEČENJU BOLESNIKA S LGMD	60
Taida Alfirević-Ungarov	
ULOGA FIZIJATRA U REHABILITACIJI BOLESNIKA S LGMD.....	67
Ida Kovač	
KIRURŠKO LIJEČENJE BOLESNIKA S POJASNOM MIŠIĆNOM DISTROFIJOM ...	74
Tomislav Đapić	
CURRENT CHALLENGES IN LIMB GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHIES.....	75
J.Andoni Urtizberea	

KLINIČKA SLIKA I GENETIKA NAJČEŠĆIH LGMD U HRVATSKOJ.....	77
Nina Canki-Klain	
MOLEKULARNA OSNOVA I MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA LGMD	79
Astrid Milić	
PATIENTS' PRESENTATIONS WITH DISCUSSION	91
Biserka Kovač	91
Sanja Kovačić	103
Goran Krakar	105
GENETSKO SAVJETOVANJE, GENETSKO TESTIRANJE I PRENATALNA DIJAGNOSTIKA LGMD	106
Nina Canki-Klain	
VJEŽBE U LABORATORIJU	111
Astrid Milić	
SEMINAR IZ GENETIKE	117
Astrid Milić	
APPENDIX	128

PROGRAM

PETAK, 31.11.2012.

- 08.00-08.45 Registracija uz kavu**
- 08.45-09.00 Uvodna riječ voditelja**
- 09.00-09.30 Pojasne mišićne distrofije (LGMD): Definicija, klasifikacija, genetika**
Nina CANKI-KLAIN
- 09.30-10.00 Klinička slika i dif.dg.LGMD**
Marija ŽAGAR
- 10.00-10.30 Uloga neurologa u dijagnostici, zbrinjavanju i praćenju bolesnika s pojasnim mišićnim distrofijama**
Davorka VRANJEŠ
- 10.30-10.45 Rasprava**
- 10.45-11.00 Odmor**
- 11.00-11.30 Uloga patologa u dijagnostici LGMD**
Kamelija ŽARKOVIĆ i Antonija JAKOVČEVIĆ
- 11.30-12.00 Dijagnostička i prognostička vrijednost magnetske rezonancije u analizi lezija mišića bolesnika s LGMD**
Dražen LOVRIC
- 12.00-13.30 Ručak (Studentski restoran MF-a)**
- 13.30-13.45 Živjeti s pojasnom mišićnom distrofijom**
Mirjana JANŽEK
- 13.45-14.30 Psihički problemi bolesnika s otežanom pokretljivošću (LGMD)**
Nataša JOKIĆ-BEGIĆ
- 14.30-15.00 Uloga pulmologa u praćenju i liječenju bolesnika s LGMD**
Taida ALFIREVIĆ- UNGAROV
- 15.00-15.30 Uloga fizijatra u rehabilitaciji bolesnika s LGMD**
Ida KOVAČ

15.30-16.00 Kirurško liječenje bolesnika s pojasnom mišićnom distrofijom

Tomislav ĐAPIĆ

16.00- 16.30 Odmor

16.30-17.30 Current challenges in Limb Girdle Muscular Dystrophies'

J.Andoni URTIZBEREA

17.30-18.15 Klinička slika i genetika najčešćih LGMD u Hrvatskoj

Nina CANKI-KLAIN

18.15-19.00 Molekularna osnova i mol. dijagnostika LGMD

Astrid MILIĆ

19.00-19.30 Discussion/ Rasprava

SUBOTA, 1.12.2012.

Moderatori: J.Andoni URTIZBEREA i Nina CANKI-KLAIN

08.30-10.00 Patients' presentations with discussion

Nina CANKI-KLAIN, Biserka KOVAČ, Dražen LOVRIC, Marija ŽAGAR

10.00-10.30 Odmor

10.30-12.00 Prikazi slučajeva i rasprava

12.00-13.15 Ručak (Studentski restoran MF-a)

13.15-14.00 Genetsko savjetovanje, genetsko testiranje i prenatalna dijagnostika LGMD

Nina CANKI-KLAIN

14.00-15.30 Vježbe u laboratoriju

Astrid MILIĆ

15.30-17.00 Seminar iz genetike

Astrid MILIĆ

17.00-17.45 Pismeni test provjere znanja

17.45-18.30 Evaluacija tečaja i zaključna sjednica

POPIS SUDIONIKA

Taida Alfirević-Ungarov

Dr.med., spec. pulmolog
Specijalna bolnica za plućne bolesti
Rockefellerova 3, 10 000 Zagreb
Tel. 01- 4684400

Jelena Bošnjak

Dr.sc., dr.med.
Klinika za neurologiju, KBC Sestre milosrdnice
Vinogradska 29, 10 000 Zagreb
jelenabosnjak78@gmail.com

Nijaz Burgić

Dr.med., spec. fizikalne medicine i rehabilitacije
Specijalistička ordinacije fizikalne medicine i rehabilitacije Nijaz Burgić
E.Pascali 3a, 52 470 Umag
Tel. 052 702 238 / 098 367 033
Fax 052 702 204
e-mail: nijaz.burgic.@pu.t-com.hr

. Nina Canki-Klain

Prof.dr.sc., spec. pedijatar,
subspecijalist med. genetičar
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Hrvatski institut za istraživanje mozga
Šalata 12, 10 000 Zagreb
Tel. 01- 45 96 851
Mobitel 098 470 136
Fax: 01- 45 96 942
e-mail: nina.canki-klain@zg.t-com.hr
nina.canki-klain@mef.hr
ninacankiklain@gmail.com

Andreja Dekanić

Dr.sc.dr.med
Zavod za patologiju
MF Rijeka

Tomislav Đapić

Doc.dr.sc., prim.dr.med., spec.ortopedije s užom spec. iz dječje ortopedije
KBC Zagreb, Klinika za ortopediju

MF Sveučilišta u Zagrebu
Šalata 5, 10000 Zagreb
e-mail: tdapic@yahoo.com

Marija Ivica

Dr.med.
Klinika za neurologiju, KBC Sestre milosrdnice
Vinogradska 29, 10 000 Zagreb
marios_jendva@yahoo.com

Antonija Jakovčević

Dr.med., spec.patolog
KBC Zagreb, Klinika za patologiju i citologiju
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb
e-mail: antonia.jakovcevic@yahoo.com

Nataša Jokić-Begić

Prof.dr.sc., klinički psiholog
Filozofski fakultet, Odsjek za psihologiju, Sveučilište u Zagrebu
I. Lučića 3, 10 000 Zagreb
Tel. 01-6120089
e-mail: njbegic@fzg.hr

Biserka Kovač

Dr.sc., dr.med.spec. neurolog
OŽB Vukovar, Odjel za neurologiju
Županijska 35, 32000 Vukovar
Tel. 032-452 091
e-mail: biserka.kovac@os.t-com.hr

Ida Kovač

Prim. dr.sc., spec.fizijatar
Klinički zavod za rehabilitaciju i ortopedska pomagala,
KBC Zagreb
Božidarevićeva 11, 10 000 Zagreb
Tel.01-2362330
e-mail: idakovac@mail.inet.hr

Goran Krakar

Dr.med., spec.pedijatar
KB Sestre Milosrdnice
Klinika za dječje bolesti, Odjel neuropedijatrije
Klaićeva 16, 10 000 Zagreb
Mobitel: 091 4640957; 091/4600258
Fax: 01-4600160
e-mail: goran.krakar@kdb.hr

Dražen Lovrić

Dr.med., spec. radiolog
Poliklinika Sunce
Trnjanska cesta 108, 10 000 Zagreb
Mobitel: 099 8080469 ; 091 5143203
e-mail: drazenlovric3@gmail.com
drazen.lovric@zg.t-com.hr

Astrid Milić

Dr.sc., dipl.ing.med.biokemije
Galapagos istraživački centar
Prilaz baruna Filipovića 29, 10 000 Zagreb
e-mail: astridmilic@hotmail.com

Frane Paić

Dr.sc., dipl.ing.biol.
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za medicinsku biologiju
Šalata 3, 10000 Zagreb
Tel/ Mobitel:
Fax: 01-459 01 99
e-mail: frane.paic@mef.hr

Nino Sinčić

Dr.sc., dr.med.
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za medicinsku biologiju
Šalata 3, 10000 Zagreb
Tel/ Mobitel: 01-4566801; 091 563 35 21
Fax: 01-459 01 99
e-mail: nino.sincic@mef.hr

Aleksandra Šimić

Dr.med., spec. neurolog
OŽB Vukovar, Odjel za neurologiju
Županijska 35, 32 000 Vukovar
Mobitel: 091 56 61 270
e-mail: aleksandra.dr.simic@windowslive.com

J.Andoni Urtizberea

PhD, M.D.
Head, Summer School of Myology, Institut de Myologie
Hôpital de la Salpêtrière, 75651 PARIS Cedex-France
Praticien Hospitalier, MPR, Centre de Référence Neuromusculaire
GNMH, Hôpital Marin – AHP, 64700 HENDAYE – France
e-mail: ja.urtizberea@free.fr

Davorka Vranješ

Prim. mr. sc., spec.neurolog
KBC Zagreb, Klinika za neurologiju

MF Sveučilišta u Zagrebu
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb
Tel. 01-23 88 266; 091 54 038 93
e-mail: davorka.vranjes@zg.htnet.hr

Marija Žagar
Doc. dr. sc., spec.neurolog
KBC Zagreb, Klinika za neurologiju
MF Sveučilišta u Zagrebu
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb
Tel.
e-mail:

Karmelija Žarković
Prof. dr. sc., spec.patolog
KBC Zagreb, Klinika za patologiju i citologiju
MF Sveučilišta u Zagrebu
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb
Tel.
e-mail: <mailto:davorka.vranjes@zg.htnet.hr>

POJASNE MIŠIĆNE DISTROFIJE (LGMD): DEFINICIJA, KLASIFIKACIJA, GENETIKA

Nina CANKI-KLAIN

Hrvatski institut za istraživanje mozga i Katedra za medicinsku biologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Sažetak. Naziv pojasne mišićne distrofije potječe iz *engl.* limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) što je opisni naziv za mišićne distrofije koje su povijesno zajedno svrstane zbog kliničkih karakteristika koje pretežno zahvaćaju pojasni obruč t.j. muskulaturu zdjelice i ramena s pojavom u dječje ili rano odraslo životno doba, a razlikuju se od češćih mišićnih distrofija koje čine X-vezana DMD/BMD (distrofinopatije) i autosomno dominantna FSHD. LGMD predstavljaju različite bolesti mišića koje karakterizira slabost i propadanje pretežno proksimalnih mišića ramenog i zdjeličnog područja. Klinička slika i tijek bolesti značajno variraju ovisno o genetskom uzročniku, a moguće su velike individualne razlike unutar istog gena i mutacije. Obzirom na način nasljeđivanja, za sada poznamo rjeđu grupu (8 gena) s autosomno dominantnim i češću (16 gena) s autosomno recesivnim načinom nasljeđivanja. Dijagnostika LGMD se danas osniva na komplementarnom kliničkom, genetskom, proteinskom i DNA pristupu što je najučinkovitije u okviru specijaliziranih neuromišićnih centara za rijetke bolesti

Dodatni materijali dostupni na kraju knjige (Appendix)

KLINIČKA SLIKA I DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA LGMD

Marija ŽAGAR

Klinika za neurologiju, KBC Zagreb
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Miopatije su primarne bolesti mišića. Dijelimo ih na nasljedne (mišićne distrofije) i stečene miopatije.

Stečene miopatije mogu imati različite uzroke:

- Upalne (autoimune): miozitis, dermatomiozitis, „inclusion body“ miozitis
- Toksične: statini, steroidi, itd.
- Infektivne: paraziti
- Endokrinološke: hipotireoza

Tu su još metaboličke miopatije npr. glikogenske i lipidne miopatije, mitohondrijske miopatije, kongenitalne miopatije.

Ako se izuzmu rijetke distalne mišićne distrofije i distrofična miotonija tip I, miopatije se prezentiraju zahvaćanjem proksimalnih mišića, a kod nekih miopatija i drugih mišićnih skupina. Za neke miopatije postoji specifična distribucija zahvaćenosti mišića.

Termin **pojasna mišićna distrofija** (eng. limb girdle muscular dystrophy - LGMD) nije jedna bolest, ovaj termin uključuje različite poremećaje proksimalnih mišića, preciznije – mišića zdjeličnog i ramenog pojasa, koja uzrokuje razvoj slabosti i hipotrofije mišića zdjeličnog i ramenog pojasa. Kako je bolest progresivna, simptomi se šire i na ostale dijelove tijela.

Sinonimi za pojasnu mišićnu distrofiju (LGMD) su: proksimalna mišićna distrofija, pelvo-femoralna mišićna distrofija, Leyden-Moebius mišićna distrofija.

Simptomi i znaci bolesti:

Prvi simptomi su obično gegav hod koji je posljedica slabosti zdjeličnih mišića. Bolesnici se tuže na teže ustajanje iz sjedećeg položaja, teže dizanje iz čučnja, teži hod stepenicama.

Slabost u mišićima ramena dovodi do težeg rada s uzdignutim rukama, težeg odizanja ruku, teže nošenje tereta. Kod ovih vrsta mišićnih distrofija je svijest uredna, uglavnom nema bolova u mišićima osim u zglobovima zbog otežane pokretljivosti ili nepokretnosti.

Dob

- dob pojavljivanja simptoma varira obzirom na razne mutacije.
- dob početka može varirati i unutar iste obitelji s istom mutacijom.
- dob pojavljivanja LGMD je između 1- 50 godina, a neki mogu biti i asimptomatski.

Kliničke karakteristike LGMD:

- tipična distribucija zahvaćenih mišića: zdjelični i rameni pojas, simetrično

Walton i Natrass su još 1954.g. opisali LGMD. Glavne karakteristike su:

- javlja se u oba spola
- početak obično u kasnoj prvoj ili drugoj dekadi života (ali i u srednjoj životnoj dobi)
- nasljeđuje se obično autosomno recesivno, rjeđe autosomno dominantno
- zahvaćeni mišićni ramenog i zdjeličnog pojasa s različitom brzinom progresije
- teška nepokretnost unutar 20-30 godina
- mišićne pseudohipertrofije i/ili kontrakture nisu uobičaj

Walton 1964. godine sumira kliničke značajke LGMD:

- Javlja se u oba spola
- Početak obično u drugoj ili trećoj dekadi, ponekad u kasnoj prvoj dekadi ili u srednjoj životnoj dobi
- Način nasljeđivanja je obično autosomno recesivno, rjeđe autosomno dominantno
- Prvo zahvaća zdjelični ili rameni pojas, s progresijom u druge mišiće, vrijeme varijabilno
- Mišićne pseudohipertrofije listova i drugih mišića su u malom broju blesnika
- Abortivni oblici su rijetki, ali postoje
- Težina i brzina progresije variraju, dosegnu teški klinički nalaz nakon 20 godina
- Teško stanje u srednjoj životnoj dobi, kraći životni vijek

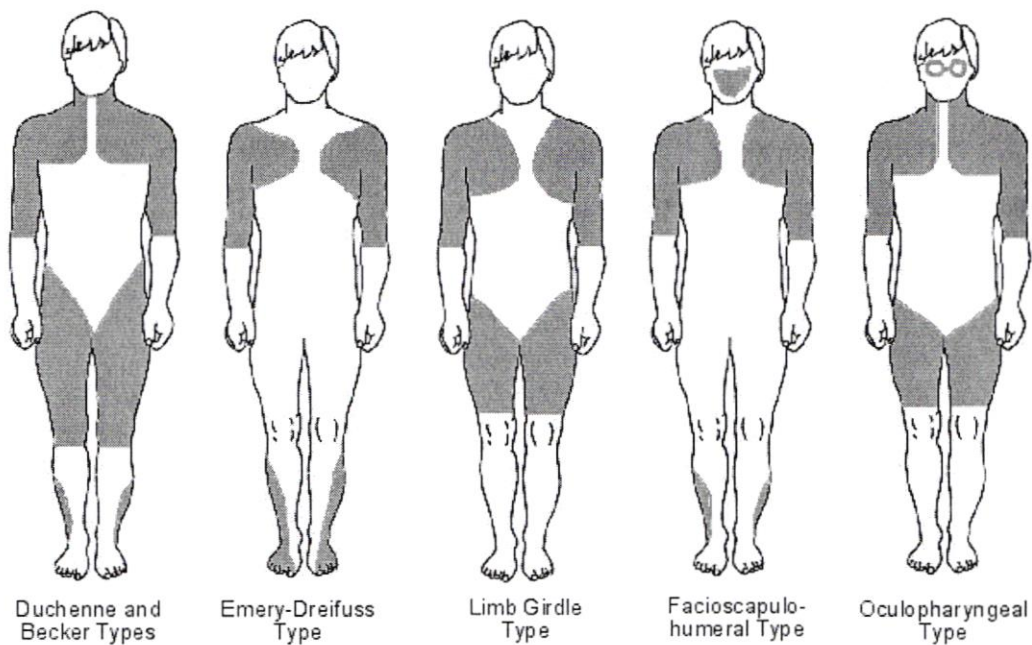
Kontrakture i skeletne abnormalnosti, ako se jave, su u kasnijoj fazi bolesti.

Morbiditet/mortalitet

- morbiditet i mortalitet variraju.
- Kod ranog početka je obično i tijek bolesti brzi.
- Bolesnici mogu postati vezani uz kolica i u tinejđerskoj dobi i umiru od respiratornih komplikacija
- Bolesnici sa sporo progresivnom LGMD mogu biti pokretni i više od 30 godina. Neki bolesnici s potvrđenom mutacijom mogu imati skoro normalni život.

LGMD se javlja kod svih rasa i u zemljama cijelog svijeta.

DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA



Slika 1. (s interneta) prikazuje razne vrste mišićnih distrofija koje zahvaćaju proksimalne mišiće

Distrofinopatije:

Kod distrofinopatija, naročito kod Duchene-ove distrofije se simptomi javljaju ranije. Zahvaćenost mišića je slična, ali su ovdje tipični hipertrofični listovi. CK je kod DMD i

BMD znatno viši. Oboljevaju muški, ali je potreban oprez kod Beckerove mišićne distrofije i ženskih nositelja!!!

Emery-Dreifuss MD:

Zbog ranih pojava kontraktura i smetnji srčane provodljivosti se rijetko zamjeni s LGMD.

Facioskapulo-humeralna MD

Zahvaćenost mišića lica se ne nalazi kod LGMD.

Okulofaringealna mišićna distrofija

Smetnje govora, gutanja, ptoza i oftalmoplegija se ne nalaze kod LGMD.

Miotonička distrofija tip II PROMM

Bolesnici imaju miotone fenomene, ali manje nego kod miotoničke distrofije tipa I. Tuže se na brži umor i slabost mišića. Početak može biti kasniji, a slabost blaže do umjerenog stupnja, uglavnom proksimalnih mišića. Ovdje je važna dobra EMG analiza, da se ciljano traže miotona izbijanja.

UPALNE AUTOIMUNE MIOPATIJE: polimiozitis, dermatomiozitis, „inclusion body“ miozitis

Polimiozitis (PM) je autoimuna upalna bolest mišića koja zahvaća proksimalne mišićne grupe. Anamneza je kraća nego kod nasljednih miopatija. Također su povišene vrijednosti CK, ali i ostali upalni parametri, posebno imunološki parametri. Ova bolest se može liječiti s kortikosteroidima i imunosupresivnim lijekovima. Osobe kod kojih nalaz biopsije ukazuje na miozitis, a ne reagiraju na imunosupresivnu terapiju treba pomisliti i na disferlinopatiju.

Dermatomiozitis (DM), uz zahvaćene uglavnom proksimalne mišiće ima i tipično crvenilo kože na licu, šakama i dijelovima tijela koji su više izloženi svjetlu. Potrebno je isključiti malignom, bolest je često paraneoplastička.

„Inclusion body“ miozitis je vrlo rijetka miopatija s inkluzijskim tjelešcima vidljivim i na elektronskom mikroskopu.

Tabela 1. Upalne miopatije: miozitis i dermatomiozitis

Razvoj kliničke slike	Tjedni-mjeseci
Distribucija	Proksimalni mišići, 30% faringealni
Osip	Da, osjetljiv na sunce
Dječja dob	Da, dermatomiozitis
Drugi organi	Intersticijska bolest pluća, aritmija
Pridružene bolesti	Malignitet, skleroderma
Imunoterapija	Dobar odgovor

U razlikovanju upalne brzo progresivne miopatije i sporije progresivnih miopatija može pomoći EMG analiza. Naime, kod upalnih miopatija, a ponekad i kod brzo progresivnih mišićnih distrofija tipa Duchene, može se uz miopatski uzorak naći i denervacijske potencijale kao npr fibrilacije i pozitivne valove.

BOLESTI NAKUPLJANJA. Pompeova bolest

Pompeova bolest ili glikogenoza tipa II je rijetka nasljedna, progresivna neuromišićna bolest koju uzrokuje nedostatak enzima α -glukozidaze, a očituje u dojenačkoj, dječjoj i odrasloj dobi. Pompeova bolest je autosomno recesivni nasljedni defekt sinteze enzima kisele alfa glukozidaze koji uzrokuje njegov nedostatak ili smanjenje aktivnosti. Manjak ili smanjena aktivnost lizosomskog enzima kisele alfa glukozidaze dovodi do nakupljanja glikogena u lizosomima različitih tkiva, ponajviše u mišićima skeletnog i dišnog sustava te srca.

Najčešći simptom Pompeove bolesti u odrasloj dobi je proksimalna mišićna slabost. Dijagnostika Pompeove bolesti je sada vrlo jednostavna i dostupna. Radi se tzv. „suha kap“ u Laboratoriju za metaboličke bolesti KBC Zagreb. Iako je ova bolest rijetka, važno ju je otkriti, jer se može liječiti nadomjesnom terapijom.

MIOPATIJE UZROKOVANE STATINIMA

Statini su danas jako upotrebljavani lijekovi koji snižavaju vrijednosti masnoća u krvi. Manji broj osoba može imati smetnje s mišićima; neki samo bolove, neki imaju i umjereno povišene

vrijesnosti CK, neki imaju slabost proksimalnih mišića, a vrlo rijetko se može javiti rabdomioliza s renalnom insuficijencijom.

Tabela br 2. Miopatija uzrokovana toksičnim djelovanjem statina:

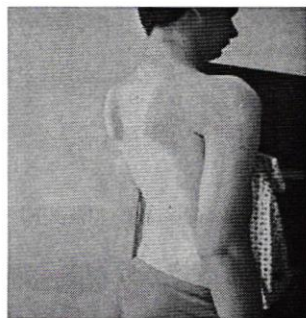
Miopatija	oštećenje mišića, mišićna napetost, slabost, povišen CK
Mialgija	bolovi u mišićima, CK normalan
Myositis	upalna miopatija, povišen CK
Rabdomioliza	sve naveden, teško oštećenje mišića, jako visok CK, renalna insuf.

Današnja podjela LGMD bazira se na kliničkim i molekularnim karakteristikama. Opisano je 5 autosomno dominantnih (LGMD1) i 15 autosomno recesivnih (LGMD2) oblika i otkrivaju se novi.

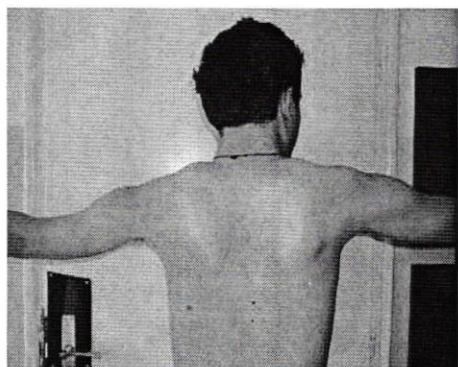
Teška klinička slika nalazi se kod Duchene-ove mišićne distrofije, sarkoglikanopatije (LGMD 1C,2D,2E,2F), kod nekih bolesnika s LGMD 2A

Umjerenija klinička slika nalazi se mišićne distrofije tipa Becker, LGMD 1G,

Slika 2. Kalpainopatija, prikaz bolesnika



Slika 3. Kalpainopatija, stariji brat



Literatura:

Eijiro Ozawa, Ikuya Nonaka. Limb girdle muscular dystrophy and related disorders. In: Katirji B, Kaminski HJ, Preston DC, Ruff RL, Shapiro EB, eds. Neuromuscular disorders in clinical practice. Boston, MA: Butterworth-Heinemann, 2002, pp. 1049-1072

Limb Girdle Muscular Dystrophy Medscape Reference emedicine.medscape.com/.../1170911-overview, 26 Mar 2012

MedlinePlus Encyclopedia Limb-girdle muscular dystrophies

Broglia L, Tentorio M, Cotelli MS, Mancuso M, Vielmi V, Gregorelli V, Padovani A, Filosto M. Limb-girdle muscular dystrophy-associated protein diseases. Neurologist. 2010 Nov;16(6):340-52. Review.

Abd TT, Jacobson TA. Statin-induced myopathy: a review and update. Expert Opin Drug Saf. 2011 May;10(3):373-87. Epub 2011 Feb 23. Review

Dimachkie MM, Barohn RJ. Idiopathic Inflammatory Myopathies. Ed. Pourmand R. In: Immune-Mediated Neuromuscular Diseases. Front Neurol Neurosci. Basel, Karger, 2009, vol 26, pp 126–146

Lacomis D, Electrodiagnostic approach to the patient with suspected myopathy Neurol Clin 2012;30:641-660

ULOGA NEUROLOGA U DIJAGNOSTICI, ZBRINJAVANJU I PRAĆENJU BOLESNIKA S POJASNIM MIŠIĆNIM DISTROFIJAMA

Davorka VRANJEŠ

Klinika za neurologiju, KBC Zagreb

Pojasne mišićne distrofije (LGMD) su heterogena skupina primarnih bolesti mišića sa dominantnim zahvaćanjem proksimalnih mišićnih skupina, dok su distalne mišićne skupine u ranoj fazi bolesti, facijalni te ekstraokularni mišići pošteđeni. Prevalencija bolesti se kreće između ovisno o različitim populacijama od 7-80 na 1.000. 000 stanovnika. Javljaju se kod oba spola, nasljeđuju se autosomno dominantno (LGMD 1) ili autosomno recesivno (LGMD 2), ali ima i sporadičnih slučajeva.

Walton i Nattaas 1954 god. izdvojili su pod nazivom pojasne mišićne distrofije odnosno Limb-Girdle MD, grupu primarnih bolesti mišića sa slijedećim karakteristikama:

1. javlja se kod oba spola,
2. u dobi između od 8 do 20 godine života (vrlo rijetko u srednjoj životnoj dobi),
3. nasljeđuju se autosomno recesivnim (puno rjeđi je autosomno dominantni tip nasljeđivanja).
4. prvenstveno zahvaćaju proksimalne mišićne skupine (mišiće ramenog obruča i zdjelice mišiće), brzina progresija mišićne slabosti varira, ali najčešće dovodi do teškog invaliditeta u dobi između 20 i 30 god. života.
5. nema pojave pseudohipertrofija ili kontraktura zglobova je rijetka a ako se javi to je u kasnijoj fazi bolesti

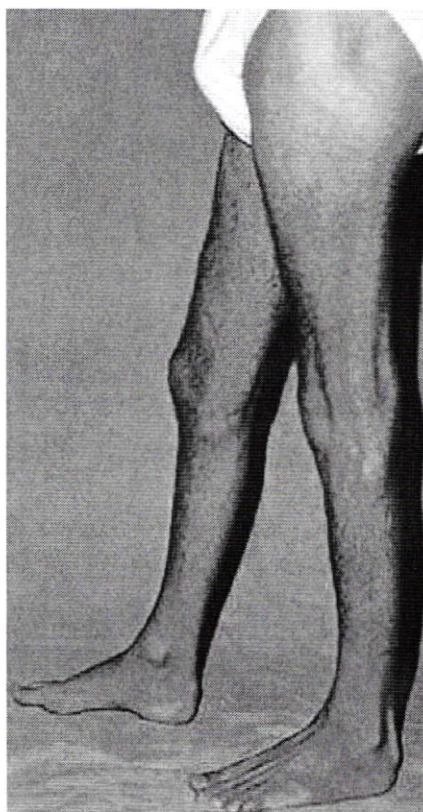
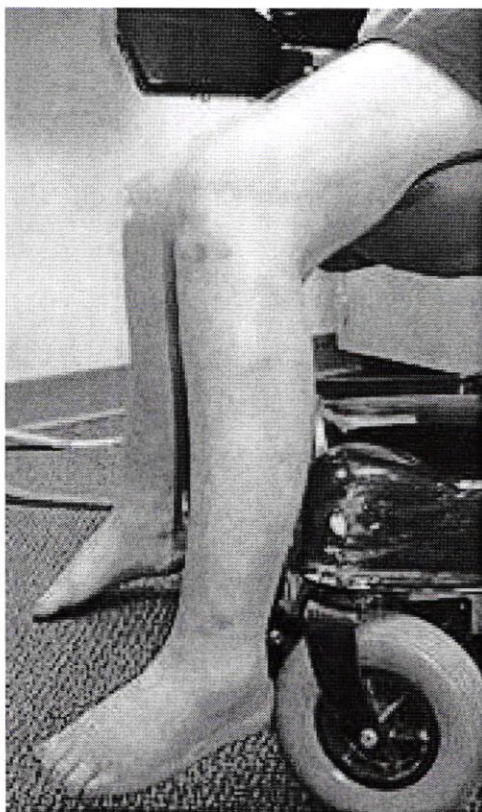
1995.god. Bushby i Beckmann uvode aktualnu klasifikaciju koja se zasniva na genskim lokusima.

To je genski vrlo heterogena grupa bolesti sličnih fenotipskih karakteristika. Dijeli se u dvije skupine prema tipu nasljeđivanja: tip 1 autosomno dominantni, tip 2 autosomno recesivni, te niz podtipova ovisno o genskim lokusima, te defektu proteina kojeg od kodira. Učestalost pojedinih tipova varira u različitim populacijama i etničkim skupinama. U našoj populaciji najčešća je LGDM 2 A kalpainopatija, a u Europi su još raširene LGMD 2B disferliniopatija, LGMD2(C-F) sarkoglikanopatije. Patofiziološki radi se o genskom poremećaju koji uzrokuje kodiranje defektnog proteina remeteći tako funkcije mišićne stanice. Takvi proteini su

locirani u sarkolemi, kontraktilnom aparatu mišićne stanice ili su sastojci enzima neophodnih za funkciju mišićne stanice.

Pojasne mišićne distrofije sa autosomno dominantnim načinom nasljeđivanja su rjeđe (oko 10% PMD). Javljaju se najčešće u adolescentnoj ili mlađoj odrasloj dobi, klinička slika je blaža, a spora progresija. To su LGMD1A (miotilin) LGMD1B lamin A/C LGMD1A kaveolin-3. Kod LGMD1B lamin A/C neophodno je znati da za česti razvoj kardiomiopatije sa poremećajem srčanog ritma te posljedičnim emboličkim incidentima i opasnosti od nagle smrti.

PMD 2B (disferlinopatije) česte u Južnoj Americi. Uzrokovane su mutacijom gena koji kodira protein disferlin koji je sastojak stanične membrane. Klinički se prezentira: pojasni (LG) fenotip i distalna miopatija Miyoshi. Kod pojasnog oblika dominira slabost mišića zdjeličnog pojasa i m. quadriceps femoris, mišići ramenog obruča znatno kasnije. Slabost i atrofija m. gastrocnemius može biti dominantna. Kod distalne miopatije (Miyoshi) dominira slabost m. gastrocnemiusa i m. soleusa, te mišića podlaktica uz sačuvane mišićne šake. Slabost zahvaća zdjelične mišićne, mišićne ramenog obruča, trbušne stijenke, izražene hipertrofijom m. gastrocnemiusa, CK izuzetno visok. U jednoj obitelji mogu se naći oba oblika.



1. LGMD 2 b tip. Miyoshi miopatija Slika 2 LGMD 2 b. pojasni oblik sa atrofijom m.gastrocnemiusa (preuzeto sa interneta)

PMD 2C-F sarkoglikanopatije: Uzrokovane su mutacijom sarkoglikan gena što dovodi do nedostatka ili manjka sarkoglikan kompleksa. Sarkoglikan kompleks sastavljen od četiri pod jedinice α , β , $\beta\gamma$, δ .i sastojak je stanične membrane, a ima ulogu u održavanju mehaničke stabilnosti stanične membrane. Klinička slika i histopatološki nalaz sličan mišićnoj distrofiji tip Duchene. Slabost zahvaća zdjelične mišiće, mišiće ramenog obruča, trbušne stjenke, izražene hipertrofija m. gastrocnemiusa. Prisutne su boli u mišićima, bolni krampovi. Progresija mišićne slabosti je te je bolesnik nepokretan u dobi od 12- 16 god. Česta je i kardiomiopatija.

Pojasna mišićna distrofija tip 2A: je najčešća u našoj populaciji. To je autosomno recesivna nasljedna bolest mišića uzrokovana mutacijama gena koji kodira kalpain 3 (CAPN3). Gen je lociran na kromosomu 15-regiji 15q 15.1-q21. Karakterizira je veliki broj mutacija (oko 280). spektar mutacija prisutan u nekoj populaciji ovisan o njezinom etničkom i geografskom porijeklu. Kalpain 3- je nelizozomska kalcij ovisna neutralna cistein proteaza. Sastavljen je od jedne velike podjedinice i nalazi se gotovo isključivo u skeletnim mišićima. U mišićnoj stanici je lociran u miofibrilima i jezgri. Sastoji se od 821 aminokiseline molekularne težine 94k. Udružen je sa konektinom (ili titin) koji je jedan od glavnih sastojaka sarkomere.

Bolest se javlja u dobi od 3 do 30 godine života, najčešće između 10-20, nešto češće kod muškaraca. (3:1) Tijek progresivan i može se podijeliti na tri stadija.

I stadij: teškoće trčanja, u kliničkom nalazu prisutna je slabost m. gluteus max. i mišića bedra, dok je m. quadriceps femoris sačuvan kroz duže vrijeme. Postoji blaga hiperlordoza kralježnice uz slabost abdominalnih mišića.

II stadij: nemogućnost penjanja uz stepenice, ustajanja iz čučnja, slabost periskapularnih mišića.

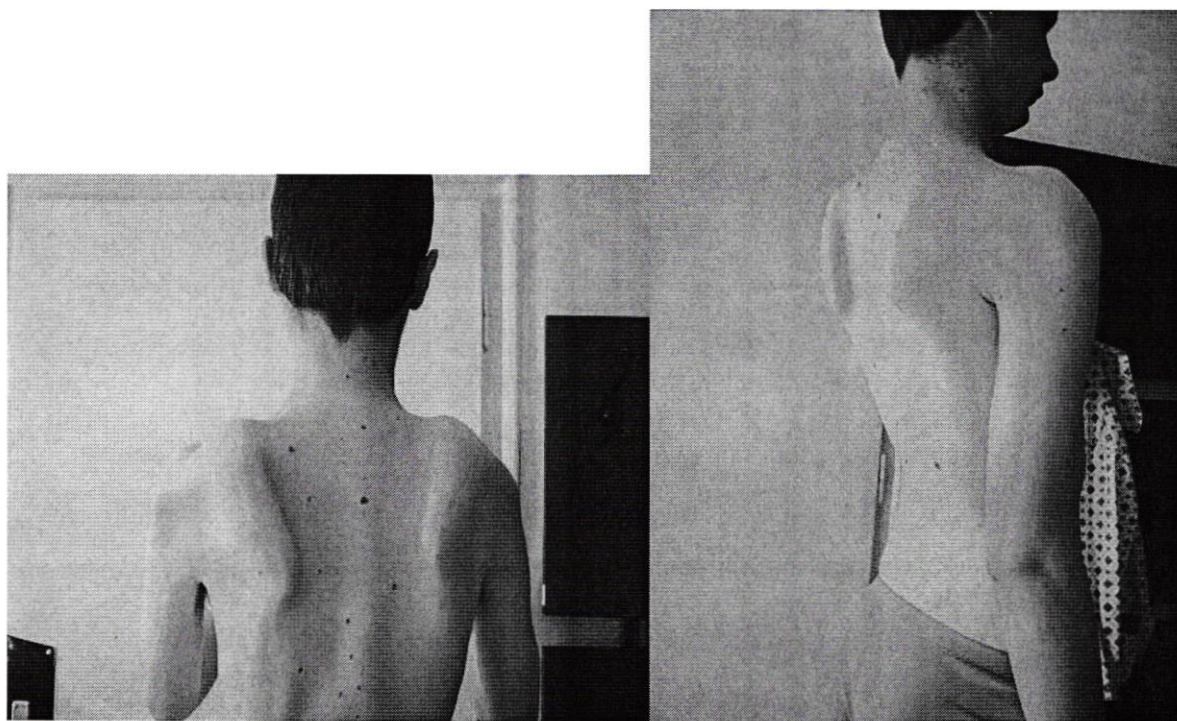
III stadij: slabost zahvaća m. quadriceps femoris i distalne mišiće skupine. Mišići ruku, posebno šaka su dugo pošteđeni, kao i mišići lica. Nemogućnost hoda javlja se u u dobi oko 30 godina. Česti je razvoj kontraktura zglobova kukova koljena i zglobova lakta. Nema zahvaćanja srčanog mišića. Intelaktualni razvoj sačuvan.

Uloga neurologa u dijagnostici pojasnih mišićnih distrofija

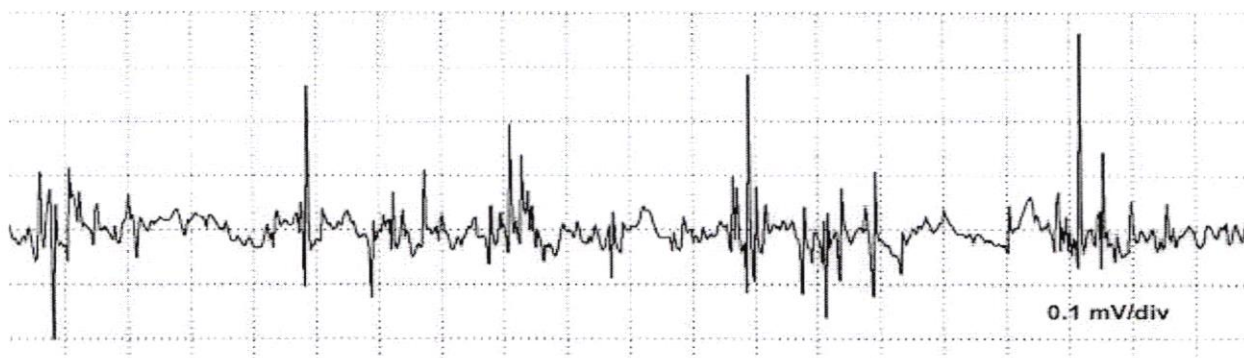
Bolesnik se javlja neurologu kada slabost proksimalnih mišićnih skupina udova koja se vrlo postupno razvija počinje ga ometati u svakodnevnim aktivnost kao što je penjanje uz stepenice, ustajanje iz čučnja, rad rukama podignutim iznad ramena. Neurologu je danas na raspolaganju niz biokemijskih testova, neurofizioloških tehnika, genska analiza te patohistološka obrada mišića svjetlosnim i elektronskim mikroskopom uz histokemijsku i imunohistokemijsku obradu. Pri izboru dijagnostičkog postupka se treba rukovoditi

dijagnostičkom procjenom temeljenoj opsežnoj anamnezi, obiteljskoj anamnezi s genealogijom te detaljnom kliničkom neurološkom pregledu i mišićnom statusu uzimajući pri tome u obzir poštenu primjenu agresivnih i skupih dijagnostičkih postupaka. Osnovni biokemijski parametar koji se određuje kod bolesti mišića je kreatinin kinaza. CK upućuje na akutno propadanje mišićnih vlakana i može pomoći otkrivanju bolesti mišića u pred kliničkoj fazi, ali nije specifičan. Kod primarnih bolesti mišića, ali i kod upalnih miopatija do 100x iznad normalne vrijednosti. Kliničko značenje ima povišenje CK od 2 - 3 puta iznad uredne vrijednosti, uz istovremeni porast blaži vrijednosti jetrenih enzima AST, ALT

EMNG je osnovna neurofiziološka tehnika u dijagnostici neuromuskularnih bolesti, pa tako i kod pojasnih miopatija. Detekcijskom EMG registrira se u zahvaćenim miopatski pseudointerferirajući inervacijski uzorak sa nisko voltažnim polifazičkim akcijskim potencijalima. Neurografija je uredna. EMNG obrada prvenstveno omogućuje dif. dg. prema neuropatijama i neuronopatijama (SMA).



Slika 2. Pojasna mišićna distrofija LGMD tip.2A.



Slika. 3 miopatski uzorak.

Radiološke tehnike kao što je MR kod nas se još uvijek manje koriste u obradi bolesnika s pojasnim miopatijama, iako je u nekim zemljama postala metoda izbora. Ovom tehnikom može se pokazati distribucija distrofičkih promjena na udovima, kao i stupanj oštećenja proširenost nekroze i masne degeneracije unutar mišića. Kako se radi o neinvazivnoj metodi postori mogućnost ponavljanja odnosno praćenja napredovanja procesa.

Patohistološka analiza bioptiranog mišića svjetlosnim i elektronskim mikroskopom te imunohistokemijskom analizom značajna je za postavljanje dijagnoze primarne bolesti mišića te dif. Dg nasuprot sekundarnih upalnih ili toksičnih miopatija. Imunohistokemijskim analizama istovremenim korištenjem različitih primarnih protutijela (distrofin, disferlin, kalpain 3, merozin, α i β sarkoglikan) može se utvrditi manjak pojedinih proteina uključenih ih u patologiju mišićnih distrofija te tako postaviti dijagnozu tipa pojasne mišićne distrofije. Neurolog postavlja indikaciju za izvođenje biopsije mišića te odabire mišić koji će biti bioptiran. Pravilan odabir mišića je bitan jer u atrofičan mišiću vlakna su zamijenjena vezivom i masnim tkivom dok u klinički urednom mišiću često se ne mogu detektirati specifične patološke promjene. Potrebno je napomenuti da je biopsija mišića za bolesnika neugodan i agresivni dijagnostički postupak.

Molekularna genetika i DNA analiza omogućuje decidirano postavljene dijagnoze tipa PMD što je cilj svakog dijagnostičkog postupka. Za bolesnika je to jednostavna metoda, ali je obzirom na gensku heterogenost i veliki broj pod tipova bolesti postupak često dugotrajan i nedostupan.

Kliničkim slikom pojasne mišićne slabosti kod odraslih bolesnika prezentira se i čitav niz sekundarnih bolesti mišića različitog uzroka koje je danas moguće liječiti (upalne miopatije) ili eliminacijom uzročnog faktora zaustaviti njihovu progresiju (toksične i jatrogene miopatije). Stoga bolesnik sa novo otkrivenom miopatijom pojasne distribucije i negativnom obiteljskom anamnezom u prvom redu treba biti obrađen s osvrtom na autoimune bolesti,

bolesti štitnjače i druge stečene bolesti odrasle dobi koje u okviru kliničke slike mogu imati miopatiju.

Kliničkom slikom pojasne mišićne slabosti prezentira se i adultni oblik M. Pompe. To multisistemska bolest uzrokovana manjkom ili nedostatkom lizozomskog enzima α glukosidaze (GAA, maltaze) zbog čega dolazi do nakupljanja glikogena u različitim tkivima posebno u skeletnim i glatkim mišićima, uzrokovana je mutacija gena α glukozidaze (GAA) na dugom kraku kromosoma 17. Spada u grupu metaboličkih miopatija, ali je potrebno u dijagnostički postupka obzirom to je za sada jedina primarna bolest mišića za koju postoji mogućnost liječenja- enzimska nadomjesna terapija (Myozyme). Potvrda dijagnoze Pompeove bolesti dobiva se vrlo jednostavno određivanjem aktivnosti enzima α glukozidaze iz uzorka pune krvi, kulture fibroblasta ili vrlo jednostavno tzv. suhe kapi krvi.

Uloga neurologa u praćenju i skrbi pojasnih mišićnih distrofija

Pojasne mišićne distrofije su još uvijek neizlječive bolesti progresivnog tijeka koje dovode do teškog invaliditeta već u ranoj životnoj dobi. Neurolog ima primarnu ulogu prepoznavanju simptoma bolesti, planiranju i provođenju dijagnostičkog postupka i postavljanju dijagnoze. Neurolog mora na prikladan način upoznati bolesnika sa prirodom i očekivanim tijekom njegove bolesti, a u suradnji sa kliničkim genetičarom načinom nasljeđivanja odnosno mogućnosti prijenosa bolesti na potomke.

Nakon postavljanja dijagnoze neurolog najčešće prati bolesnika niz godina. Liječenje je za sada simptomatsko i zahtjeva kompleksan rehabilitacijski tretman te timski pristup bolesniku, te se treba provoditi multidisciplinarno po psiho-socijalnom modelu s ciljem podizanje kvalitete života bolesnika. Tim se uz neurologa sastoji od fizijatra, psihoterapeuta, (psihijatra), okupacionog terapeuta, socijalnog radnika te stručnjaka za profesionalno usmjeravanje. Neurolog treba prepoznati moguće komplikacije bolesti u smislu zahvaćanja drugih organskih sustava te na vrijeme uputiti bolesnika odgovarajućim specijalistima-pulmologu, kardiologu, kirurgu ili psihijatru. Neophodna je dobro suradnja sa fizijatrom obzirom da fizikalna terapija i rehabilitacija ima osnovno značenje za usporavanje razvoja tjelesnog oštećenja i održavanje preostalih motoričkih sposobnosti bolesnika.

Obzirom da su bolesnici često osobe mlađe životne dobi neophodno je misliti o njihovoj što boljoj psihosocijalnoj integraciji za što danas postoje razne mogućnosti. U tome značenje imaju udruge bolesnika i članova njihovih obitelji u čijem rado volonterski sudjeluje i neurolog kroz rad na edukaciji bolesnika putem predavanja, savjetovališta, te druženjem s

bolesnicima na njihovim susretima, sudjelovanjem u organizaciji i boravku rehabilitacijsko okupacijskim kampovima odnosno ljetovališta.

Literatura:

1. Ozawa E, Nonaka I. Limb-Girdle Muscular Dystrophy and Related Disorders, in Katirji B, Kaminski HJ, Preston DC, Ruff DC Shapiro BE, Neuromuscular Disorder in Clinical Practice Butterworth Heineman, Boston 2002.
2. Fardeau M, Eymard B, Mignard C, et al. Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Islands and French metropolitan communities. Neuromusc Disord 1996;6:447-453.
3. Canki-Klain N, Milić A, Kovač B, Trlaja A, Grgičević D, Zurak N et al. Prevalence of 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. American Journal of Medical Genetics Part A, 2003;125A,2:152-158.
4. Hammans SR. Muscle Disease in
5. Amato Ar, Russel JA. Muscular dystrophies in Neuromuscular disorders McGraw Hill 2008.
6. Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) syndromes. Dostupno na neuromuscular.wustl.edu/

ULOGA PATOLOGA U DIJAGNOSTICI LGMD

Antonija JAKOVČEVIĆ i Kamelija ŽARKOVIĆ

Klinika za patologiju i citologiju, KBC Zagreb

Postupci pri dobivanju i obrada bioptičkog uzorka mišića

Biopsija mišića koja se radi u dijagnostici pojasnih mišićnih distrofija treba biti u korelaciji s kliničkim i anamnestičkim podacima te kliničkim i laboratorijskim nalazima. Biopsija mišića se radi u lokalnoj anesteziji te može biti otvorena biopsija ili biopsija iglom. Kod nas se radi otvorena biopsija. Na osnovi kliničke slike te distribucije mišićne slabosti kliničar određuje koji mišić bi bilo dobro bioptirati za morfološku analizu. Nije poželjno da se bioptira mišić koji je dosta zahvaćen bolešću te je prožet vezivnim i masnim tkivom kao niti onaj koji je malo zahvaćen patološkim procesom. U odabiru mišića za biopsiju uveliko pomaže ultrazvuk. Za adekvatnu patohistološku analizu potrebna su najmanje dva uzorka skeletnog mišića veličine oko 0,5x0,5 cm. Potrebno je paziti da se uzme dio mišića koji nije infiltriran anestetikom zbog posljedičnih arteficialnih oštećenja istog. Tkivo mišića se transportira do laboratorija na patologiju u zatvorenoj posudici u kojoj se nalazi gaza lagano navlažena fiziološkom otopinom da se spriječi sušenje. Poželjno je da se transport obavi odmah po biopsiji zbog enzimatske degradacije mišićnog tkiva. Jedan uzorak mišića se smrzne u izopentanu i rashladi u tekućem dušku na -160°C te se koristi za histokemijske i imunohistokemijske metode, dok se drugi fiksira u 10 % formaldehidu i dio preuzme za svjetlosno mikroskopsku, a mali dio za elektronsko-mikroskopsku analizu.

Sva histološka, histokemijska i imunohistokemijska bojanja vrše se na smrznutom materijalu. Fiksacija i uklapanje u parafin poremećuje arhitekturu mišićnih vlakana te na njemu nisu moguće enzimatske i metaboličke studije. Poprečni rezovi pružaju mnogo više informacija nego uzdužni rezovi kod svjetlosno mikroskopske analize.

Rutinsko histološko bojanje je hematoksilin i eozin (HE), dok su druga bitna histokemijska bojanja Gomori trichrome, PAS, Oil Red O, NADH, menadion, SDH i COX.

Pojasne mišićne distrofije

Pojasne mišićne distrofije (LGMD) su heterogena skupina mišićnih distrofija koje se nasljeđuju autosomno dominantno ili autosomno recesivno. Dominantni oblici se klasificiraju kao LGMD1, a recesivni kao LGMD2. Do sada je otkriveno 8 dominantnih i 16 recesivnih oblika uzrokovanih mutacijama u različitim genima.

Svi oblici pojasnih mišićnih distrofija su klinički karakterizirani progresivnim slabljenjem zdjelice i ramene muskulature. Muskulatura lica obično nije zahvaćena. Progresija i distribucija mišićne slabosti značajno varira između pojedinaca i genetskih podtipova. Koncentracija kreatinin kinaze u serumu je obično povećana.

Biopsija mišića pokazuje distrofične promjene s varijacijama u veličini mišićnih vlakana, nekrozom i regeneracijom, pukotinama i grananjem vlakana, internalizacijom jezgara i umnažanjem veziva te promjene same arhitekture. Često stupanj patohistoloških promjena ne korelira s kliničkom slikom.

Histološke promjene

Kad se gledaju promjene veličine vlakana ona mogu biti ovalnog oblika te pokazivati varijacije u veličini samih vlakana (Slika 1.). Hipertrofija vlakana je česta.

U longitudinalnim rezovima hipertrofična vlakna često pokazuju pukotine i izgledaju kao da se granaju. Kao i u većini mišićnih distrofija nalazi se predominacija vlakana tipa 1.

Promjene jezgri kao što su internalizacija i multiplost u nekim slučajevima mogu biti izraženi (Slika 2.). Promjene jezgre često su udružene s pukotinama u vlaknu (Slika 3.). Nakupine jezgara vide se u kroničnim slučajevima. Jezgre vlakana u regeneraciji mogu biti velike i vezikularne s prominentnim nukleolima.

Nekrotična i regenerirana mišićna vlakna često se vide u nakupinama ili pojedinačna. Fagocitoza je udružena s nekrozom. Upalne stanice su naročito karakteristika LGMD2B (disferlinopatije) te se može pogrešno dijagnosticirati kao miozitis.

Upalne stanice su rijetke u drugim oblicima pojasnih mišićnih distrofija, ali područja nekroze mogu se doimati celularna zbog regeneracije i prisutnosti mioblasta. Umnažanje endomizalnog veziva je uobičajeno, ali količina umnoženog veziva je varijabilna (Slika 4.).

Arhitekturalne promjene kao što su prstenasta i vrtložasta vlakana su česta pojava ali one nisu specifične za pojasne mišićne distrofije.

Sve opisane histološke promjene nisu specifične za pojasnu mišićnu distrofiju te se nalaze u širokom spektru mišićnih distrofija. Promjene u ekspresiji primarnog proteinskog defekta u nekim oblicima pojasne mišićne distrofije mogu se prikazati imunohistokemijskim bojanjem

dok ih se većina dijagnosticira ili potvrđuje genetskim testiranjem. Kad je dostupno rezultati imunohistokemije na mišiću trebali bi se potvrditi genetski.

Prikaz imunohistokemijske proteinske ekspresije je važan način za identifikaciju gena koji je najvjerojatnije defektan.

Imunohistokemijska analiza

Autosomno dominantne pojasne mišićne distrofije

LGMD1A (miotilinopatija): histologija mišićne biopsije pokazuje vlakna različite veličine s centralno smještenim jezgrama. Na imunohistokemiji normalan miotilin, a smanjen laminin. Komercijalni biokemijski testovi nisu dostupni.

LGMD1B: histologija mišićne biopsije pokazuje miopatske promjene. Biokemijsko testiranje nije dostupno.

LGMD1C (caveolinopatija): histologija mišićne biopsije pokazuje miopatske promjene. Caveolin-3 smanjen na imunoflorescenci i western blotting. Disferlin reduciran na imunohistokemiji i normalan na western blotting-u.

LGMD1D: histologija mišićne biopsije pokazuje miopatske promjene s endomisijalnom fibrozom i vakuolama. Biokemijsko testiranje nije dostupno.

LGMD1E: histologija mišićne biopsije pokazuje vlakna različite veličine te povećano endomizijalno vezivo. Biokemijsko testiranje nije dostupno.

LGMD1F: histologija mišićne biopsije pokazuje vlakna različite veličine te povećano endomizijalno vezivo. Biokemijsko i genetsko testiranje nije dostupno.

LGMD1G: histologija mišićne biopsije pokazuje vlakna različite veličine te nekrozu i vakuole. Biokemijsko i genetsko testiranje nije dostupno. Normalno imunohistokemijsko bojanje na distrofine, sarkoglikane, calpain i disferlin.

LGMD1H: histologija mišićne biopsije pokazuje miopatske promjene i subsarkolemlane nakupine mitohondrija. Biokemijsko i genetsko testiranje nije dostupno.

Autosomno recesivne forme pojasnih mišićnih distrofija

LGMD2D (Alfa-sarkoglikanopatija)

LGMD2E (Beta-sarkoglikanopatija)

LGMD2C (Gama –sarkoglikanopatija)

LGMD2F (Delta-sarkoglikanopatija)

Sve sarkoglikanopatije na histologiji mišićne biopsije pokazuju miopatske promjene. Postoje komercijalna protutjela za imunohistokemijsko bojanje. Na imunohistokemiji nalazimo

reducirano ili u potpunosti odsutno bojanje na sarkoglikanska protutijela. Jedno sarkoglikansko protutijelo (alfa-sarkoglikan) se koristi za otkrivanje kompletne ili parcijalne odsutnosti (Slika 5.).

LGMD2A (kalpainopatija) histologija mišićne biopsije pokazuje degeneraciju i regeneraciju vlakana, varijabilnost njihove veličine te endomisijalnu fibrozu. Biokemijsko testiranje koje se vrši je western blotting.

LGMD2B (disferlinopatije): histologija mišićne biopsije pokazuje uz distrofične promjene nalaz upalnih stanica. Na imunohistokemiji i western blottingu potpuna ili parcijalna odsutnost disferlina (Slika 6.). Western blotting za disferlin se smatra senzitivnim i specifičnim za potvrdu dijagnoze, dok je imunohistokemijsko bojanje senzitivno, ali nije specifično.

LGMD2G (telethoninopatija): histologija mišićne biopsije pokazuje miopatske promjene s vakuolama. Biokemijsko testiranje nije dostupno.

LGMD2H: histologija mišićne biopsije pokazuje varijacije u veličini vlakana s degeneracijom i regeneracijom, internalizacijom jezgara i endomizijalnom fibrozom. Biokemijsko testiranje nije dostupno.

LGMD2I: histologija mišićne biopsije pokazuje varijacije u veličini vlakana s prdominacijom tipa 1 te nekrotičnim i regeneriranim vlaknima. Biokemijski testovi imunohistokemija i western blotting za alfa- distroglikan. Na imunohistokemiji varijabilno odsustvo alfa-distroglikana.

LGMD2J: histologija mišićne biopsije pokazuje miopatske promjene. Biokemijski testovi nisu dostupni.

LGMD2K: histologija mišićne biopsije pokazuje blagu fibrozu, varijacije u veličini vlakana te nekrozu i regeneraciju. Hipertrofična vlakna s multiplim centralnim jezgrama. Na imunohistokemiji odsutnost bojanja na alfa distroglikan.

LGMD2L: histologija mišićne biopsije pokazuje miopatske ili distrofične promjene. Biokemijski testovi nisu dostupni.

LGMD2M, LGDM2N, LGMD2O : histologija mišićne biopsije pokazuje promjene za mišićnu distrofiju čest s upalnim infiltratom. Na imunohistokemiji smanjeno bojanje na alfa-distroglikan.

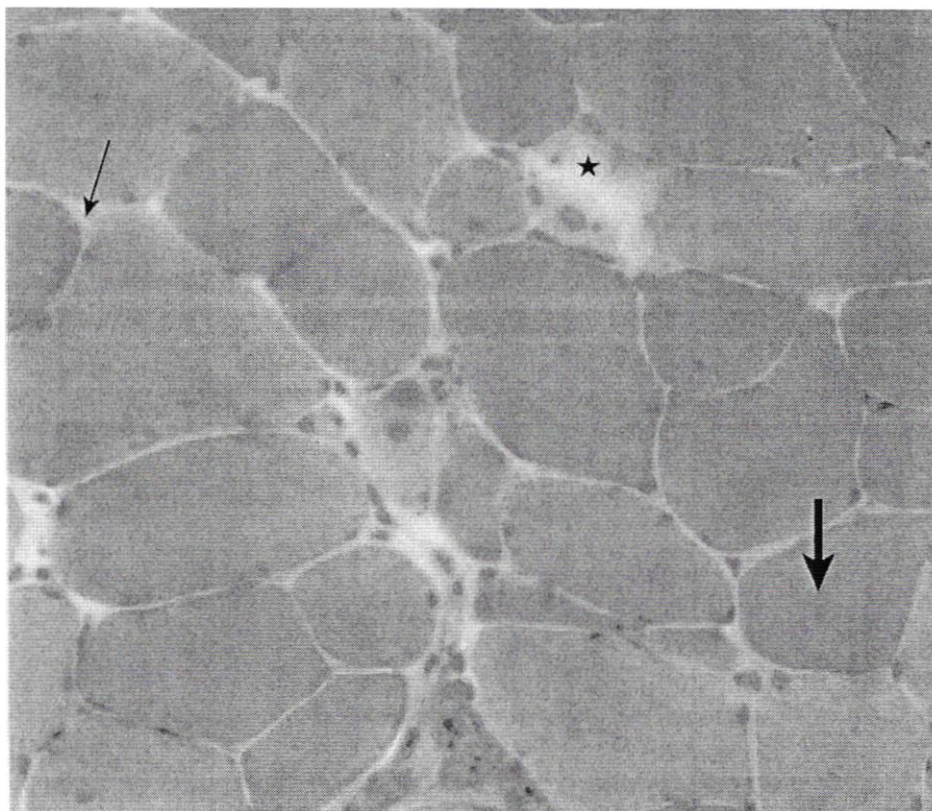
LGMD2Q: histologija na mišić pokazuje distrofične ili miopatske promjene. Biokemijski testovi nisu dostupni.

Elektronsko mikroskopska analiza

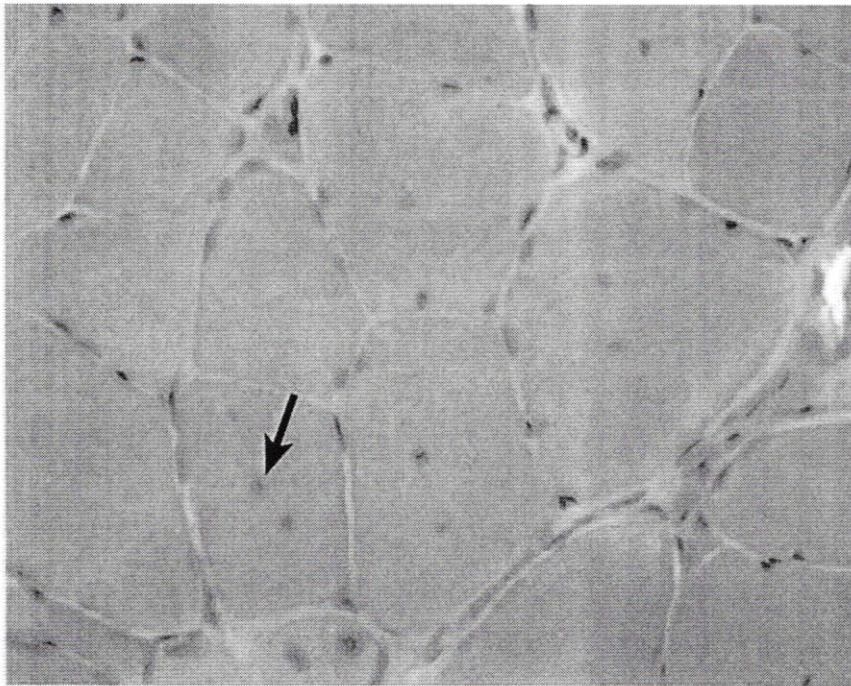
Ultrastrukturalna analiza nije specifična te se opisuju promjene koje se općenito mogu naći kod mišićnih distrofija. Može se naći zadebljanje bazalne membrane vlakna s pojavom kolagenih vlakana uz njenu unutarnju površinu. U nekim oblicima nalazi se filamentozna tijela uz umnožene mitohondrije i nabubreni sarkoplazmatski retikulum.

Razlikovanje između pojedinih oblika LGMD je važno u kliničkoj obradi i praćenju pojedinih pacijenata kao i u njihovom genetskom savjetovanju. Zlatni standard u dijagnostici pojasnih mišićnih distrofija je otkrivanje mutacije u određenom genu.

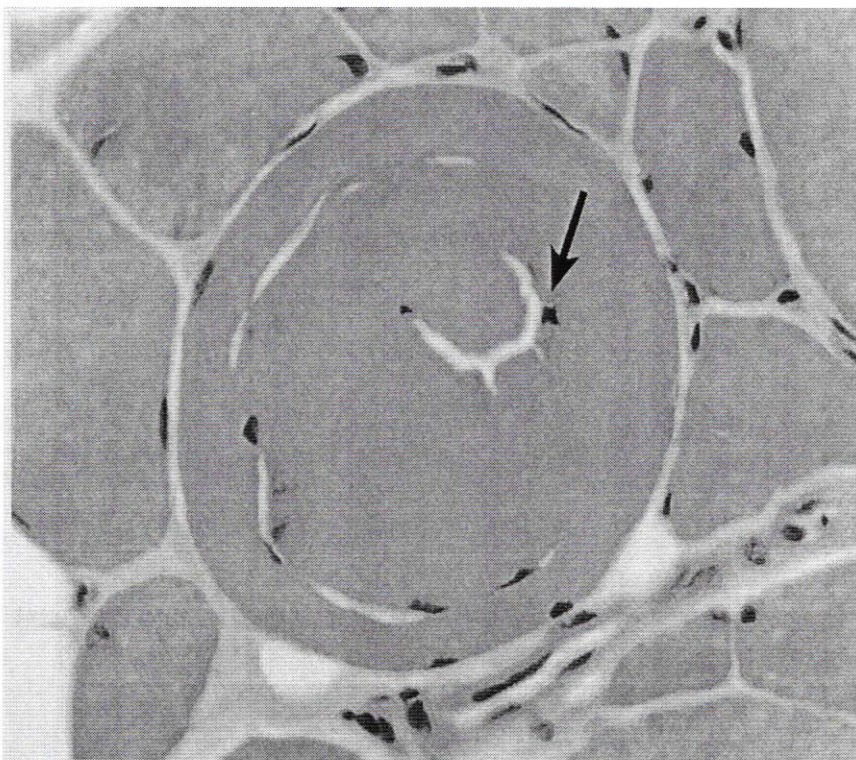
U dijagnostičkom procesu potrebna je korelacija kliničkih podataka, proteinskog testiranja i genetske analize.



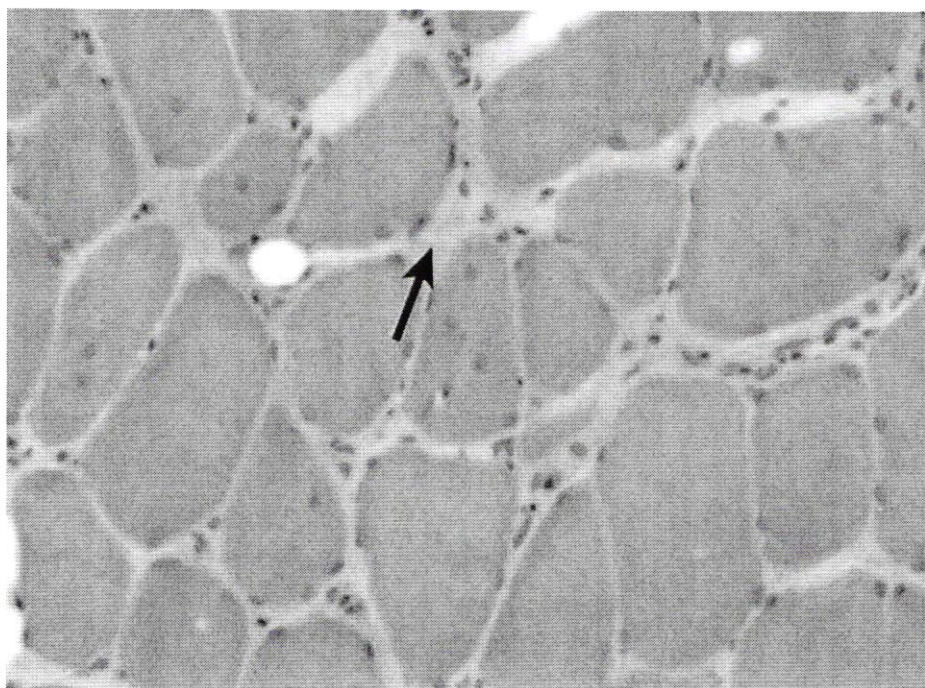
Slika 1. Varijabilnost veličine mišićnih vlakana s nekrozom (zvjezdica), internalizacijom jezgara (velika strelica) te blago umnoženo endomizijalno vezivo. (HE X 200)



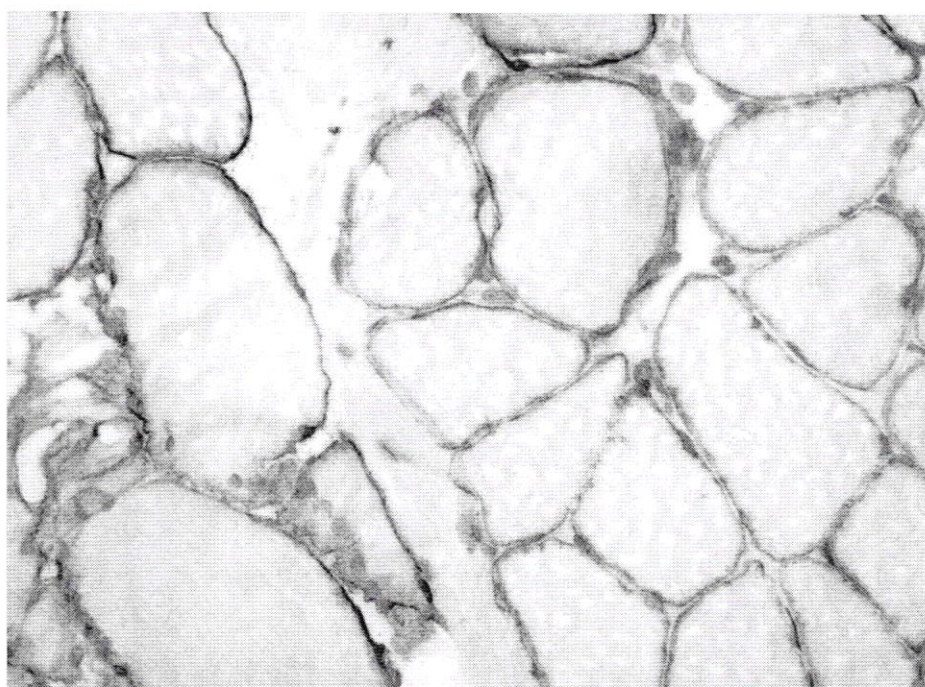
Slika 2. Različito velika mišićna vlakna s multiplim jezgrama (velika strelica) (HE x 400)



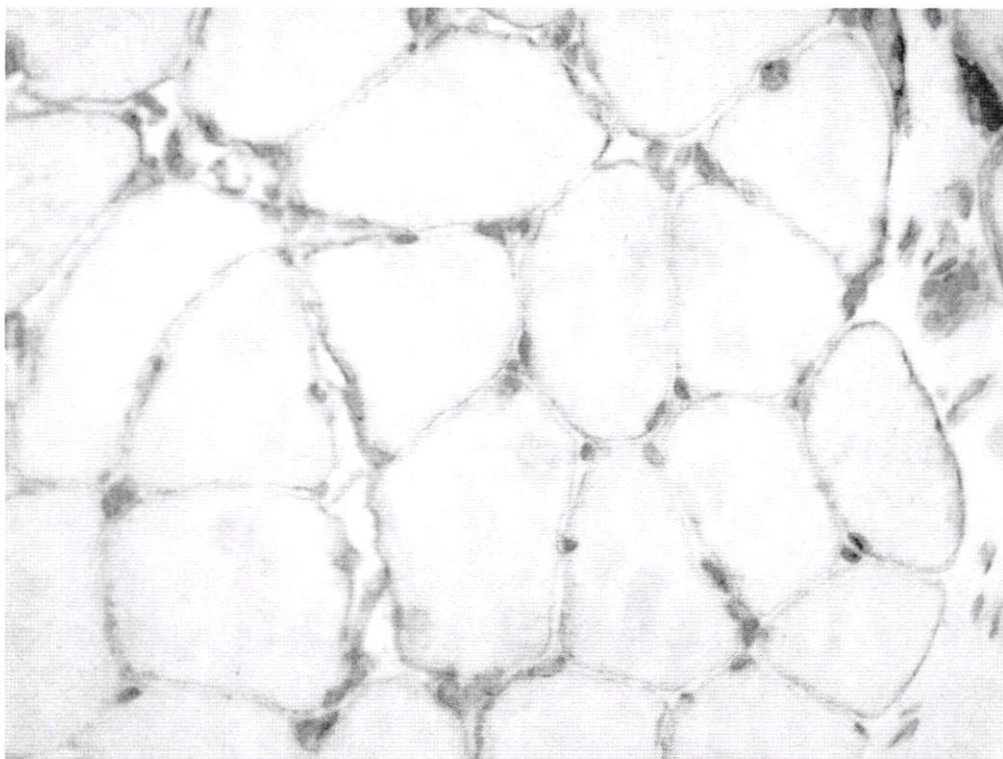
Slika 3. Ovalno, hipertrofično mišićno vlakno s internalizacijom jezgre udruženo s pukotinama. (HE x 400)



Slika 4. Umnoženo endomizijalno vezivo (velika strelica) između mišićnih vlakana varijabilne veličine. Internalizacija jezgara. (HE X 200)



Slika 5. Imunohistokemijsko bojanje na alfa-sarkoglikan gdje se vidi parcijalna odsutnost bojanja. (X 400)



Slika 6. Imunohistokemijsko bojanje na disferlin (hamlet) s parcijalnom odsutnosti boja

DIJAGNOSTIČKA I PROGNOСТИČKA VRIJEDNOST MAGNETSKE REZONANCIJE U ANALIZI LEZIJA MIŠIĆA BOLESNIKA S LGMD

Dražen LOVRIC

Poliklinika Sunce, Zagreb

Iako je mišićna biopsija još uvijek zlatni standard u dijagnozi nasljednih bolesti mišića, mišićno oslikavanje, osobito **magnetska rezonancija** je postala metoda izbora u dijagnostičkoj obradi pacijenata u smislu otkrivanja i kvantifikacije distrofičnih promjena za vrijeme kliničkog praćenja pacijenata sa nasljednim mišićnim bolestima.

Udno pojasna mišićna distrofija (LGMD) je uopćen termin koji je rezerviran za mišićne distrofije kod djece i odraslih kako bi ih se razlikovalo od puno učestalijih X vezanih distrofinopatija (Duchennove mišićne distrofije (DMD) i Beckerove mišićne distrofije (BMD).

To je grupa klinički i genetski heterogenih bolesti koje zahvaćaju predominantno proksimalne mišiće udova.

Osnovna podjela MD:

Udno pojasna MD(LGMD):

- Distrofinopatije:
 - Duchenne MD
 - Becker MD
- Autosomno dominantne LGMD
 - LGMD 1A do 1C
- Autosomno recesivne LGMD
 - LGMD 2A do 2N

Kongenitalne MD (CMD):

- CMD bez malformacija mozga:
 - merosin deficit CMD
 - CMD
 - Ullrich miopatija
- CMD sa malformacijama mozga
 - Fukuyama CMD
 - mišićno-okularne-moždane CMD
 - Walker Warburg sindrom

Ostale MD:

- facioskapulohumeralna MD
- Emery Dreifuss MD
- okulofaringealna MD
- miotonička distrofija

Obzirom na heterogenost udno pojasnih MD u literaturi se nalazi nekoliko procjena prevalencija LGMD, a procjena prevalencije za sve oblike LGMD se kreće od 1/14500 do 1/123,000 [van der Kooi et al 1996, Urtasun et al 1998].

Pojedinci sa udno pojasnom mišićnom distrofijom uglavnom pokazuju slabost i gubitak mišićnog tkiva ograničenog na mišiće udova, izraženije proksimalno nego distalno. Proksimalno podrazumijeva slabost mišića bliže centru tijela uključujući rameni pojas, zdjelični pojas, gornji dio natkoljenica i nadlaktica. Distalno podrazumijeva slabost mišića dalje od centra tijela uključujući donji dio ruku, podlaktice i šake, te donji dio nogu, potkoljenice i stopala.

Biokemijskim testiranjem nakon mišićne biopsije može se odrediti subtipove udno pojasnih MD: sarkoglikanopatija, kalpainopatija i disferlinopatija...

Kod pacijenata s **LGMD**, kao i pacijenata s drugim mišićnim distrofijama nema poznate efikasne metode liječenja već je liječenje simptomatsko, ovisno o svakoj kliničkoj slici i specifičnom subtipu te se svodi na produžavanje duljine i kvalitete života.

Isto tako, još ne postoje objektivni i kvantitativni neinvazivni biomarkeri za procjenu težine i progresije mišićne degeneracije. Razvoj takvih biomarkera bi mogao poboljšati razumijevanje bolesti i istovremeno povećati mogućnost uspješnog i efektivnog terapijsko/terapeutskog pristupa.

Magnetska rezonancija

Magnetska rezonancija (MRI) je neinvazivna dijagnostička slikovna metoda koja za dobivanje slikovnog prikaza tijela koristi snažan magnet i radiovalove.

Glavni dio uređaja za magnetsku rezonanciju je magnet koji stvara magnetsko polje koje je i do 10000 puta jače od magnetskog polja Zemlje. Magnetsko polje usmjerava atome vodika u našem tijelu u istom određenom smjeru (slično kao što se igla kompasa okreće prema magnetskom polju Zemlje).

Drugi važan dio uređaja za magnetsku rezonanciju su radiofrekventne zavojnice. Radiofrekventne zavojnice šalju radiovalove prema atomima vodika u tijelu koji se zbog dobivene energije otklanjaju od prvotnog smjera u kojem su bili poredani u magnetskom polju te se snima količina energije radiovalova koja se oslobađa prilikom povratka atoma vodika u osnovno stanje. Različita tkiva daju različit signal te se na osnovu tog signala stvara dijagnostička slika.

Zbog visoke kontrastne rezolucije koja je bolja nego kod ultrazvuka i kompjuterske tomografije te obzirom da je neopasna za zdravlje jer ne koristi ionizirajuću energiju za stvaranje dijagnostičke slike, magnetska rezonancija je zadnjih godina postala metoda izbora u dijagnostičkoj obradi pacijenata u smislu otkrivanja i kvantifikacije distrofičnih promjena te za kliničko praćenje pacijenata sa nasljednim mišićnim bolestima što je, iako ponekad uz potrebnu sedaciju, izuzetno važno kod dijagnostičke obrade djece.

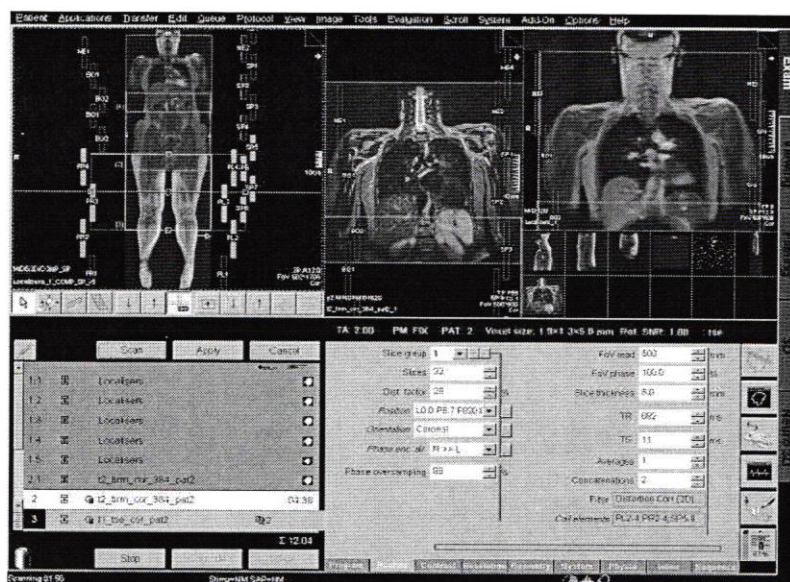
Razvoj protokola pretrage na magnetskoj rezonanciji

Od početka se u dijagnostici neuromuskularnih bolesti primjenjivalo multisekvencijsko oslikavanje najčešće u transverzalnoj ravnini i uz primjenu T1 mjerenih slika (T1-weighted spin echo) te T2 mjerenih slika (T2-weighted spin echo) ili STIR (short tau inversion recovery) sa debljinama slojeva od 5 mm do 10 mm te uz različite razmake između dva sloja kako bi se smanjila duljina pretrage.

Razvojem brzih protokola za oslikavanje cijelog tijela na magnetskoj rezonanciji osobito „whole-body muscles MRI“ osim ramenog obruča i kukova sada su nam za analizu dostupni i gornji ekstremiteti, paraspinalna muskulatura, trbušni zid te donji ekstremiteti.

Također, po potrebi se mogu dodati i presjeci tijela u ostalim ravninama (koronarnoj, sagitalnoj).

To nam olakšava analizu distrofičnih promjena pojedinih mišića te distribuciju zahvaćenih mišića gotovo cijelog tijela.



Slika 1. Priprema protokola na radnoj stanici za „whole-body MRI“ pacijenta

Distrofične promjene kao što su masna infiltracija i degeneracija te atrofija mišića na T1 mjenjenim slikama se prikazu porastom intenziteta signala zahvaćenog/ih mišića dok se upalne promjene kao što je mioedem, koji može biti prvi znak mišićne distrofije, prikazu povišenim intenzitetom signala mišića na T2 i STIR mjenjenim slikama.

Magnetska rezonancija u praćenju bolesnika sa kliničkom slikom LGMD

Magnetska rezonancija je visoko senzitivna no nisko specifična dijagnostička metoda te treba imati na umu da opisane distrofične promjene i mioedem pojedinačnog mišića koje prikažemo iako slijede neke karakteristike u distribuciji kod pojedinih LGMD ipak nisu apsolutno specifične za LGMD kao niti za druge mišićne distrofije.

Zbog toga se na uzorku distrofičnih promjena mišića i mišićnih skupina raznim semikvantitativnim i kvantitativnim metodama pokušava pronaći promjene koje bi bile specifične za pojedine tipove mišićnih distrofija.

Prikaz MRI karakteristika u distribuciji distrofičnih promjena kod pojedinih subtipova LGMD:

Distrofinopatije:

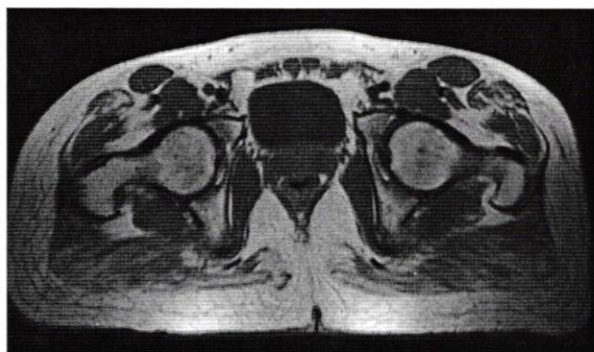
Duchennova/Bekerova mišićna distrofija (DMD/BMD)

X vezani način nasljeđivanja

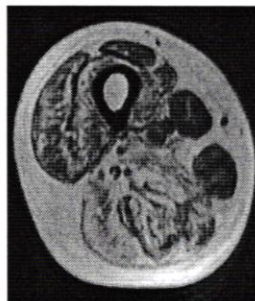
Predominantno zahvaćeni donji ekstremiteti, pseudohipertrofija mišića lista, deltoideusa.

Brza progresija mišićne slabosti u Duchenne-ovoj mišićnoj distrofiji, blaži simptomi kod BMD

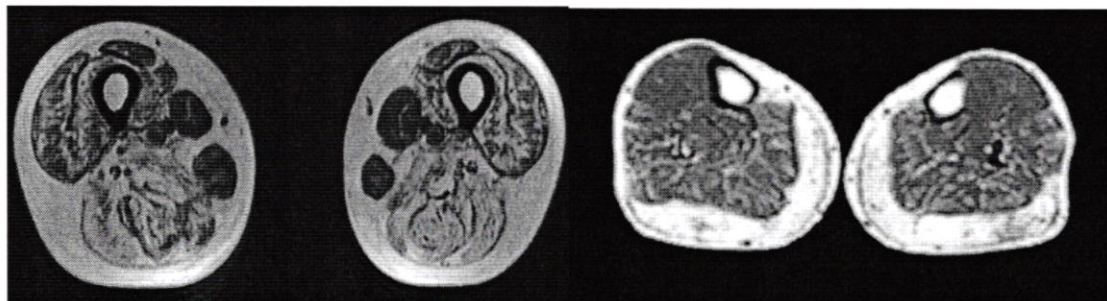
Slika 2.



Slika 3.



Slika 4.



Slika 2. Transverzalni presjek mišića zdjelice, dominantno zahvaćen m. gluteus maximus.

Slike 3. i 4. Presjek kroz natkoljenu i potkoljenu; natkoljenica: m. kvadriceps/aduktori, potkoljenica: obje glave m. Gastroknemijusa

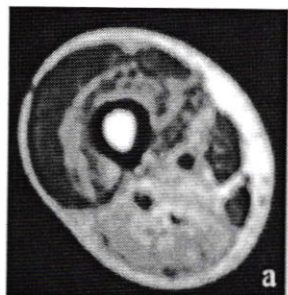
Autosomno recesivne LGMD:

Kalpainopatija (LGMD 2A)

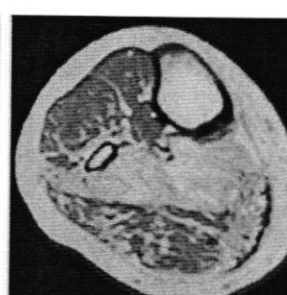
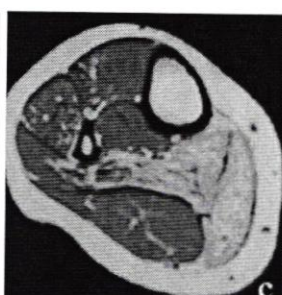
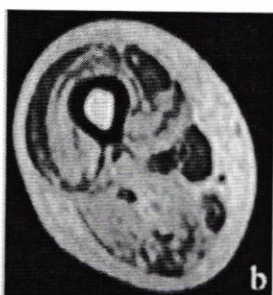
Najčešća autosomno recesivna udno pojasna mišićna distrofija, slična FSHD bez facijalne afekcije.

Kombinacija skapule alate, teške slabosti aduktora kuka i fleksora lakta, normalna respiratorna funkcija.

Slika 5.



Slika 6.



Slika 5. Transverzalni presjek mišića natkoljenice pokazuje zahvaćanje stražnje lože, m. vastus medialis i m. vastus intermedius, relativna pošteđa: m. sartorius, m. gracilis, m. vastus lateralis i m. rectus femoris.

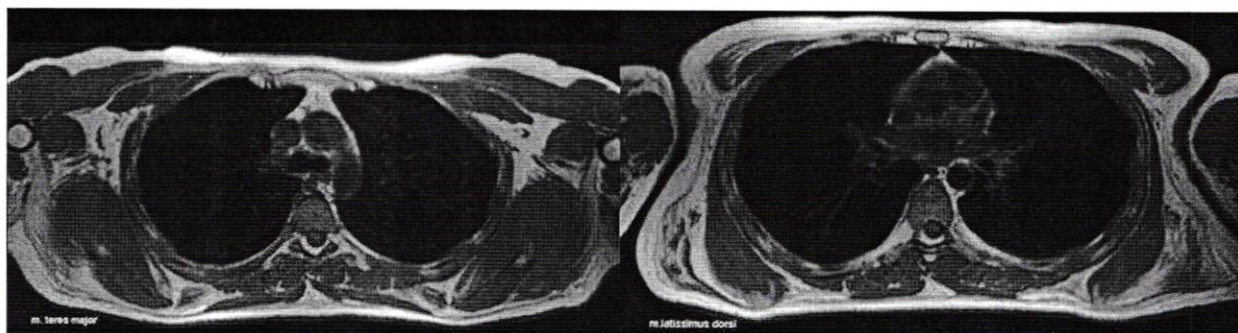
Slika 6. Transverzalni presjek lista pokazuje zahvaćanje medijalne glave m. gastroknemijusa (lateralna pošteđena) i nejednako zahvaćanje m. soleusa i peronealnih mišića.

Disferlinopatija (LGMD 2B, Miyoshi miopatija)

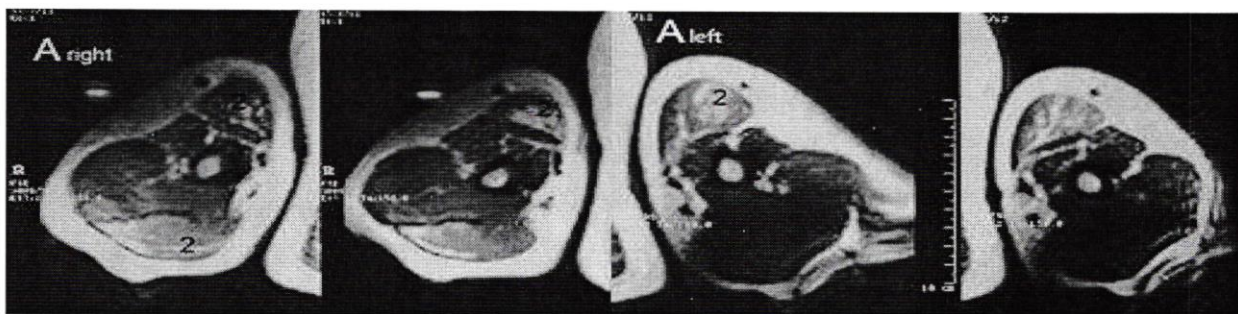
Kod disferlinopatija najčešći fenotip (25-35%) ima miješanu sliku sa slabošću proksimalnih i distalnih mišića. Karakterizirana je zahvaćanjem prednjeg i stražnjeg odjeljka natkoljenične muskulature i češće stražnjeg odjeljka potkoljenične muskulature dok su m. sartorius i m. gracilis pošteđeni.

Kod pacijenata s MM češće je zahvaćena muskulatura ramena i ruku te potkoljenica uz asimetriju u stupnju zahvaćenog mišića lijevo/desno.

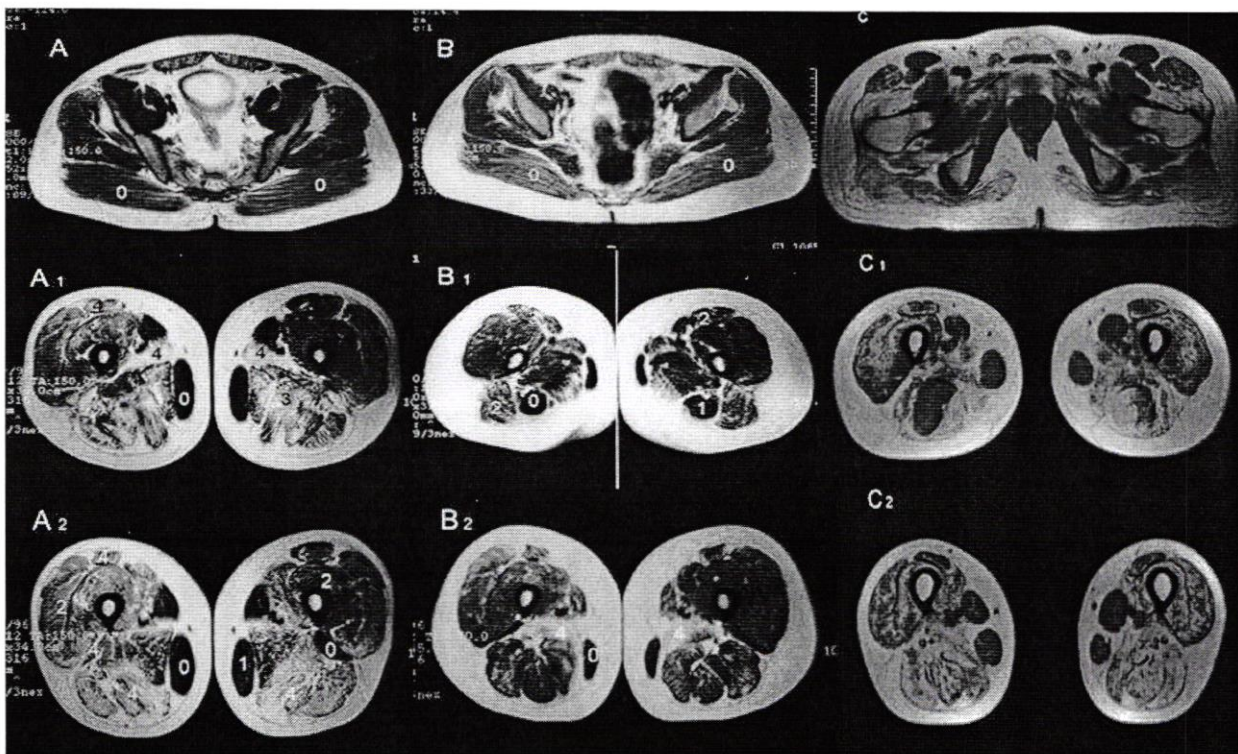
Slika 7.

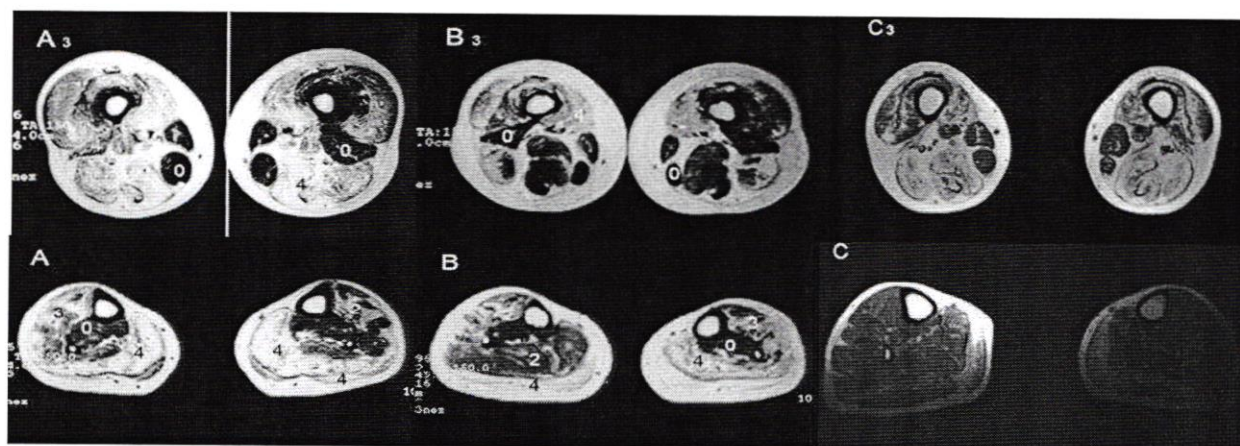


Slika 8.



Slika 9.



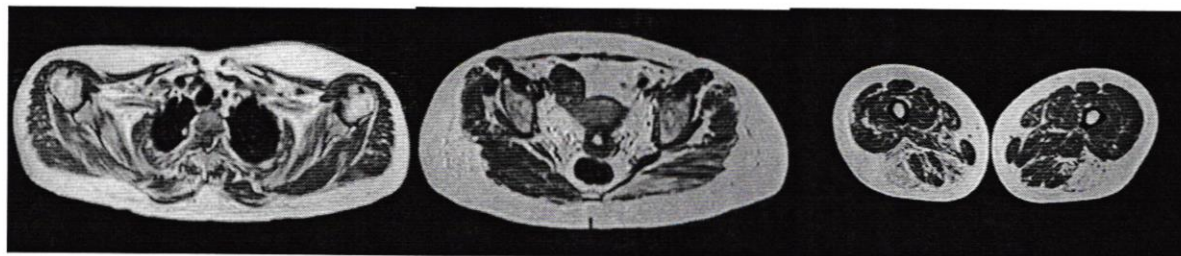


Sarkoglikanopatije (LGMD2C-LGMD2F)

Sarkoglikanopatije su česti uzroci udno pojasnih MD sa visokim udjelom teških slučajeva slično Duchenne MD no dosta je i slučajeva blažeg oblika sličnih Becker tipu MD

Za razliku od DMD češće je zahvaćena skupina hamstringa i abduktora kuka nego kvadriceps. Promjene zahvaćaju zdjelični i rameni pojas, skapula alata je češća u LGMD2C-2F nego u Duchenne MD.

Slika 10., 11. i 12



Potencijalna uloga magnetske rezonancije kao objektivnog biomarkera u FSHD

Progresiju bolesti i stupanj zahvaćenosti pojedinog mišića je teško evaluirati klinički te se od početka upotrebe magnetske rezonancije u dijagnostici mišićnih distrofija pokušava kvantificirati i objektivizirati distrofične promjene mišića i uzorak distribucije distrofičnih promjena zahvaćenih mišića i mišićnih skupina.

Zbog visoke senzitivnosti i kontrastne rezolucije magnetska rezonancija se pokazala kao izrazito uspješna i neopasana dijagnostička metoda za evaluaciju distrofičnih promjena mišića.

Recentne studije su pratile korelaciju između mišićne snage i stupnja hiperintenzivnog signala na T1 mjerenim slikama kao pokazatelja masne infiltracije mišića (kod FSHD i drugih distrofija).

Jednu od prvih takvih semikvantitativnih metoda predložio je **Mercuri et al. 2002.g.** sa svojom 4-stupanjskom skalom kod koje se prati stupanj masne infiltracije mišića.

Već je spomenuto da STIR sekvenca otkriva upalnu komponentu bolesti ranije viđenu samo kod biopsije mišića te je važan indikator početnih promjena kod mišićne distrofije pa tako i LGMD, i time objektivni biomarker.

Razvojem protokola za magnetske rezonancije cijelog tijela (whole-body MRI protocols) postalo nam je dostupno identificirati promjene u mišiću i kvantificirati stupanj distrofičnih promjena. Premda nalaz promjena na mišićima kod pacijenata sa mišićnim distrofijama nije uvijek specifičan uzorak i distribucija distrofičnih promjena mišića mogu suziti diferencijalnu dijagnozu i uputiti kliničara točnoj dijagnozi čak i prije invazivne dijagnostičke pretrage kao što je biopsija mišića.

Potencijalnu ulogu novijih MR tehnika kao što su MR perfuzija i MR difuzija te MR spektroskopija, mjerenje T2 relaksacijskog vremena, kvantifikacija mišićnog masnog tkiva upotrebom 3-point Dixon tehnikom tek treba vidjeti.

Literatura

- [1] Wren TA, Bluml S, Tseng-Ong L, Gilsanz V. Three-point technique of fat quantification of muscle tissue as a marker of disease progression in Duchenne muscular dystrophy: preliminary study; *AJR Am J Roentgenol.* 2008 Jan;190(1):W8-12
- [2] Craig M. Zaidman, Anne M. Connolly, Elizabeth C. Malkus, Julaine M. Florence, Alan Pestronk. Quantitative ultrasound using backscatter analysis in Duchenne and Becker muscular dystrophy; *Neuromuscular Disorders* 20 (2010) 805–809
- [3] Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul Disord.* 1991;1:19–29.
- [4] Padberg GW. Facioscapulohumeral disease. Leiden: Leiden University; 1982;.
- [5] Mercuri E, Lampe A, Allsop J, et al. Muscle MRI in Ullrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Neuromuscul Disord* 2005; 15(4): 303-10.

- [6] Upadhyaya M, Cooper DN. Introduction and overview of FSHD. In: Upadhyaya M, Cooper DN editor. FSHD facioscapulohumeral muscular dystrophy: clinical medicine and molecular cell biology. Abingdon: Garland/BIOS Scientific Publishers Limited;2004;p. 1–16.
- [7] E. Mercuri¹, S. Counsell², J. Allsop², H. Jungbluth¹, M. Kinali¹, G. Bonne³, K. Schwartz³, G. Bydder², V. Dubowitz¹, F. Muntoni¹. Selective Muscle Involvement on Magnetic Resonance Imaging in Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy; *Neuropediatrics* 2002; 33:10–14
- [8] Rose MR, Tawil R. Drug treatment for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;2:CD002276.
- [9] van der Kooi EL, de Leeuw GE, Vlak MH, Hendriks JC, Padberg GW, Vogels OJ. An unbiased and efficient computerised tomography method to quantify muscle and adipose tissue volume in neuromuscular patients. *Neurol Sci.* 2006;26:423–429.
- [10] Mercuri E, Pichiecchio A, Allsop J, Messina S, Pane M, Muntoni F. Muscle MRI in inherited neuromuscular disorders: past, present, and future. *J Magn Reson Imaging.* 2007;25:433–440.
- [11] Olsen DB, Gideon P, Jeppesen TD, Vissing J. Leg muscle involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy assessed by MRI. *J Neurol.* 2006;253:1437–1441.
- [12] Iosa M, Mazza C, Frusciante R, et al. Mobility assessment of patients with facioscapulohumeral dystrophy. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2007;22:1074–1082.
- [13] Ricci E, Galluzzi G, Deidda G, et al. Progress in the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy and correlation between the number of KpnI repeats at the 4q35 locus and clinical phenotype. *Ann Neurol.* 1999;45:751–757.
- [14] Eugenio Mercuria^{a,b}, Heinz Jungbluth^{a,c} and Francesco Muntoni^a. Muscle imaging in clinical practice: diagnostic value of muscle magnetic resonance imaging in inherited neuromuscular disorders
- [15] Klomp DW, Renema WK, van der GM, de Galan BE, Kentgens AP, Heerschap A. Sensitivity-enhanced ¹³C MR spectroscopy of the human brain at 3Tesla. *Magn Reson Med.* 2006;55:271–278.
- [16] Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1:307–310.
- [17] D'Antona G, Brocca L, Pansarasa O, Rinaldi C, Tupler R, Bottinelli R. Structural and functional alterations of muscle fibres in the novel mouse model of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Physiol.* 2007;584:997–1009.
- [18] Sookhoo S, Mackinnon I, Bushby K, Chinnery PF, Birchall D. MRI for the demonstration of subclinical muscle involvement in muscular dystrophy. *Clin Radiol.* 2007;62:160–165.
- [19] Tomasova SJ, Charvat F, Jarosova K, Vencovsky J. The role of MRI in the assessment of polymyositis and dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46:1174–1179.
- [20] Arahata K, Ishihara T, Fukunaga H, et al. Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve.* 1995;2:S56–S66.
- [21] Gong QY, Phoenix J, Kemp GJ, et al. Estimation of body composition in muscular dystrophy by MRI and stereology. *J Magn Reson Imaging.* 2000;12:467–475.
- [22] Kovanlikaya A, Mittelman SD, Ward A, Geffner ME, Dorey F, Gilsanz V. Obesity and fat quantification in lean tissues using three-point Dixon MR imaging. *Pediatr Radiol.* 2005;35:601–607.

- [23] Gold GE, Han E, Stainsby J, Wright G, Brittain J, Beaulieu C. Musculoskeletal MRI at 3.0T: relaxation times and image contrast. *AJR Am J Roentgenol.* 2004;183:343–351.
- [24] Olsen DB, Gideon P, Jeppesen TD, Vissing J. Leg muscle involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy assessed by MRI.
- [25] G C Liu, Y J Jong, C H Chiang, T S Jaw. Duchenne muscular dystrophy: MR grading system with functional correlation; *Radiology.* 1993;186:475-480
- [26] K. Kesper¹, C. Kornblum¹, J. Reimann¹, G. Lutterbey², R. Schröder^{3,4}, M. P. Wattjes². Pattern of skeletal muscle involvement in primary dysferlinopathies: a whole-body 3.0-T magnetic resonance imaging study; *Acta Neurol Scand* 2009; 120: 111–118 DOI.
- [27] Paradas C, Llauger J, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, De Luna N, Iturriaga C, Marquez C, Uson M, Hankiewicz K, Gallardo E, Illa I. Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology.* 2010 Jul 27;75(4):316-23. [PubMed].

ŽIVJETI S POJASNOM MIŠIĆNOM DISTROFIJOM

Mirjana JANŽEK



Rođena sam 1979. godine kao treće dijete u obitelji u kojoj mišićna distrofija nije bila strani pojam. Naime u obitelji su od iste bolesti bolovala moja dva strica, (jedan je umro prije 15 godina) kao i moj stariji brat. Kao žensko dijete obitelj je vjerovala, uz uvjeravanja doktora, da ja ne mogu oboljeti od mišićne distrofije. No, sa nekih 8 godina počeli su se javljati simptomi koji su sve više upućivali na mišićnu distrofiju i pobili tadašnju teoriju koju su doktori govorili mojim roditeljima. Naravno da je to bio još jedan šok za njih, ali ne toliko i za mene. Ja sam uvijek govorila da ću jednog dana biti kao i moj brat i mišićna distrofija kao bolest nije mi bila strana i zastrašujuća u to vrijeme. Naravno bila sam mala i nisam bila svjesna što ona točno znači. Nisam bila svjesna da to znači da će se moje djetinjstvo svesti na posjete bolnicama, raznim pregledima, medicinskim nepotrebnim zahvatima i odvajanje od svojih roditelja i braće po nekoliko tjedana kada to djeca najteže prihvaćaju. Roditelji su naravno htjeli probati sve što su mislili da bi moglo pomoći zaustaviti bolest. Vrijeme je prolazilo, bolest se sve više manifestirala, ja sam pohađala školu u svojem mjestu Gornje Jesenje (nedaleko od Krapine) i živjela djetinjstvo kao i svi moji vršnjaci, igranjem na igralištu, druženjem s prijateljima, pisanjem zadaće i pomaganjem u kućanskim poslovima. Tako je sve to bilo do završetka mog 6. razreda. Tada je postalo sve teže, sve teže sam se penjala uz brdo koje je vodilo do moje škole, sve teže sam svladavala stepenice i torbu na leđima i moji roditelji su odlučili da bi bilo bolje da svoje školovanje nastavim u Osnovnoj školi pri bolnici Krapinske toplice, gdje sam bila i smještena preko tjedna, uz svakodnevne vježbe i ostalu rehabilitaciju. Koliko se sjećam, a i po priči mojih roditelja, vrlo brzo sam se priviknula na novu sredinu i nove prijatelje, iako mi je bilo teško ostaviti dotadašnje školske prijatelje i otići u novu školu i maknuti se od svoje kuće.

Tijekom školovanja u Toplicama slijedile su opet i bolnice. Imala sam dvije operacije tetiva, svaku nogu posebno, kako bi se moje hodaње što više olakšalo i produžilo. Nakon operacija slijedili su i oporavci koji su trajali nekoliko mjeseci i nisu bili ugodni.

Školovanje sam nastavila u COO Dubrava u Zagrebu gdje sam upisala srednju ekonomsku školu. Veselila sam se odlasku u Zagreb jer sam to doživjela kao jednu pustolovinu, koja me vodi u neki novi svijet pun novih događaja i bila sam u pravu. Tada sam i odlučila da su završili moji boravci po bolnicama, da prestajem biti bolesnik i postajem tinejdžer kao i svako drugi u mojim godinama kojega zanimaju razne stvari, o čemu sam razgovarala sa roditeljima i oni su prihvatili moju odluku.

Od samog početka uključila sam se u skoro sve izvannastavne aktivnosti. Pjevala sam u zboru, bila dio novinarske sekcije, radijska voditeljica, sa svojim prijateljicama osnovala sam prvu plesnu grupu djevojaka u kolicima što nam je donijelo mnogo raznih nastupa, pa čak i izvan Hrvatske (Italija, Slovenija), kao i medijske nastupe što je



svima nama tada puno značilo i davalo nam je jedan poseban osjećaj. Za sve to bilo je potrebno mnogo odricanja svog slobodnog vremena, ali vrijedilo je, jer doživljaji koji su proizašli iz naših nastupa i sudjelovanja na raznim događajima ne mogu se zaboraviti i spadaju u jedan dio mog najdražeg vremena života. Uz sve te aktivnosti i školske obaveze rodila su se i prijateljstva koja su i danas neraskidiva i sa kojima sam doživjela puno dragocjenih i nezaboravnih trenutaka. Negdje u tom razdoblju, oko 15. g. života počela sam koristiti i kolica zbog sve težeg i nestabilnijeg hodaња. Ispočetka sam čak posuđivala kolica od prijateljica kada je to bilo moguće kako bi otišla na kavu sa prijateljima u slobodno vrijeme ili do grada, jer nisam mogla prijeći neku dužu relaciju i iskreno jedva sam čekala da dobijem svoja kolica jer sam bila svjesna da će mi ona poboljšati i olakšati kretanje. Tako je i bilo.

Naravno da su se događale i neke možda malo teže situacije s kojima sam se morala sama nositi i sama ih rješavati, ali smatram da upravo iz tog razloga što me moji roditelji nisu mogli stalno štititi i držati me u „zlatnom kavezu“ pomogli su mi da postanem samostalnija i neovisnija osoba koja je uvijek spremna na nove izazove i nove ciljeve.

Nakon što je to razdoblje mog života završilo vratila sam se kući i u početku nisam znala što ću raditi, kojim putovima će krenuti moj život, no znala sam da želim da bude nešto kroz što ću moći ispunjavati svoje ciljeve, želje i razvijati se bez obzira na moj invaliditet. Ono što mi

je jako teško palo bila je razdvojenost od mojih prijatelja, imala sam osjećaj da sam izgubila jedan dio sebe. Nakon skoro dvije godine provedene kod kuće, ja i moja tada, a i sada najbolja prijateljica odlučile smo otići zajedno živjeti u Zagreb. Bio je to pothvat za koji se ne bi mnogi odlučili, ali eto mi jesmo. Bio je to još jedan od mnogih izazova koje sam prihvatila i dokazala si da i ono naizgled nemoguće je moguće. Iznajmile smo mali stančić od 25 kvadrata, ona se bacila u potragu za poslom, a ja sam vrijeme provodila s prijateljima koji su također ostali u Zagrebu zbog studiranja i sl.

To je potrajalo oko godinu dana i tada smo odlučile da se ona treba useliti kod svog dugogodišnjeg dečka, a ja se vratiti kući u potragu za novim izazovima.

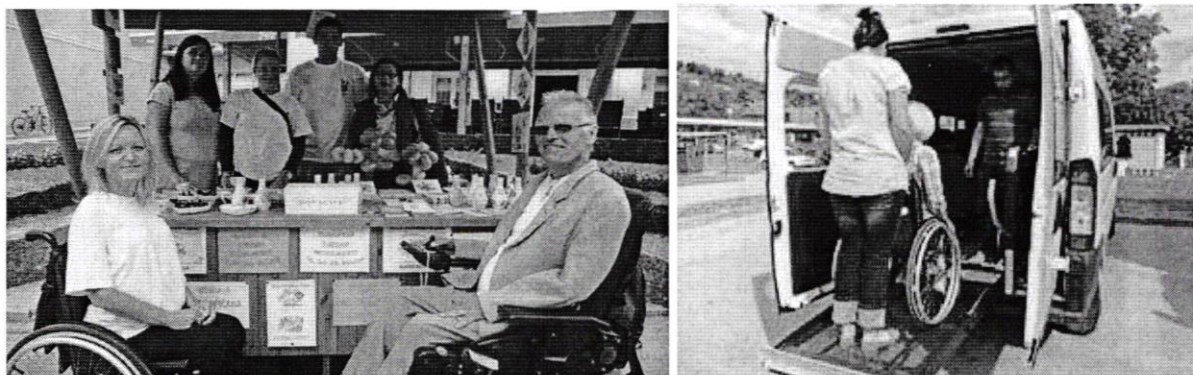
Ubrzo sam se uključila u Društvo distrofičara Zagreb, iz razloga što u našoj županiji nije bilo nikakve udruge u kojoj bi mogla biti aktivna. Niti u udruzi u Zagrebu nisam mogla biti previše aktivna zbog udaljenosti, ali posjećivala bi neke događaje zabavnog karaktera, išla na putovanja, posebno pamtim put u svetište Lurd i ljetna rehabilitacija. S vremenom sam se na poziv sadašnje predsjednice SDDH Marice Mirić uključila u SOIH mrežu žena s invaliditetom, koja se bavi SOS telefonom za žene s invaliditetom žrtve nasilja i osnaživanjem žena s invaliditetom za što veću ulogu u lokalnoj zajednici i samo-zastupanje, i to su bili moji ozbiljniji počeci uključivanja u pokret osoba s invaliditetom.

2007.g. gospođa Marica Mirić kao potpredsjednica SDDH pozvala nas je na sastanak na kojem je predloženo i usvojeno da se osnuje Udruga koja bi okupljala osobe koje boluju od mišićne distrofije na području KZZ. Predloženo je da ja preuzmem ulogu predsjednice udruge. Prihvatila sam taj prijedlog iako tada nisam niti bila svjesna što to sve donosi i da će to uvelike promijeniti moj život. U travnju 2007. godine osnovana je Udruga distrofičara Krapina i od tada počinje neko drugo poglavlje mog života.

Ispočetka sam bila možda i malo izgubljena, nisam znala odakle krenuti jer sam se u kratkom vremenu našla pred novim zadacima, ali i problemima kojih do tada nije bilo u mom životu i sa kojima nisam bila do tada previše upoznata. Bilo je i trenutaka kada sam se zapitala da li sam ja dovoljno snažna da vodim jednu takvu organizaciju i realiziram ciljeve koji se od mene očekuju. No shvativši da ljudi oko mene vjeruju u mene, da moja obitelj vjeruje u mene, moji prijatelji i članovi koji su zajedno sa mnom pokrenuli osnivanje udruge vjeruju u nas, bio mi je veliki vjetar u leđa i veliki motivator da napravimo nešto što će doprinosti u našoj kvaliteti življenja i senzibilizirati zajednicu o našim potrebama i mogućnostima, te da postanemo što uključeniji u aktivnosti zajednice.

Gledavši unatrag kroz proteklih pet godina jako sam ponosna na cijeli tim s kojim surađujem, a koji su isto osobe koje boluju od mišićne distrofije, jer smo napravili i više od očekivanog.

Jedan od glavnih ciljeva nam je pružanje izvaninstitucionalne potpore i socijalno uključivanje u društvenu zajednicu. Trenutno okupljamo 26 osoba koje boluju od mišićne distrofije ili srodnih neuromuskularnih oboljenja s područja Županije, od čega nas je skoro 90% posto u invalidskim kolicima. Zapošljavamo 12 osobnih asistenata, što znači da 12 naših članova koji svakodnevno ovise o tuđoj pomoći ima osobne asistente koji su ima na raspolaganju 4 sata na dan. I ja sam jedna od članova koja ima osobnu asistenticu, zove se Kristina Janžek i moja je prijateljica od djetinjstva. Ona svojim radom olakšava moj poslovni, ali i privatni život i u mnogim situacijama je upravo ona zamjena za moje ruke i noge. Kupili smo i opremili prilagođeno kombi vozilo za prijevoz osoba u kolicima bez transfera i osiguravamo svim članovima besplatan prijevoz kada i gdje je to njima potrebno, provodimo razne Kampanje kroz koje lobiramo za naše potrebe kao što su smanjenje barijera i sl., mnogim članovima pomogli smo kod nabavke ortopedskog pomagala koje ne pokriva HZZO, a koje je preskupo, organiziramo ljetnu rehabilitaciju, imamo kreativne radionice kao oblik radne i psihofizičke terapije, trenutno provodimo i rehabilitaciju u Udruzi pomoću uređaja Thera vital i Compex te niz ostalih aktivnosti.



Pokretanjem Udruge započelo je i moje daljnje učenje, usavršavanje i osnaživanje jer kroz aktivnosti udruge i aktivnosti srodnih organizacija prošla sam mnoge seminare, skupove, edukacije i tečajeve koji su mi pomogli i dalje pomažu u mom radu, upoznala sam mnoge nove osobe koje su svojim iskustvima i svojim znanjem dodatno utjecale na mene i moj rad. Sve to isto tako iziskuje puno mog vremena, ne postoji neradan dan, dostupna sam svima skoro 24 sata na dan ali sve se to zaboravlja kada su rezultati uspješni, kada čujete riječi zadovoljnog člana i kada to prepoznaje društvo i zajednica koja nas okružuje i vide se pomaci za koje smo i mi jednim dijelom zaslužni.

U zadnje dvije godine postala sam i članica Predsjedništva SDDH što mi je omogućilo uključivanje u nove aktivnosti kao što su međunarodni skupovi i konferencije, pa sam tako u zadnjih godinu dana posjetila Beograd, Budimpeštu i Brisel, što je doprinijelo u mom razvoju

kao predsjednice Udruge, ali i u ispunjenju mojih osobnih ciljeva i želja, a to je proputovati svijet i upoznati ga što je više moguće.

Svaki novi dan daje mi priliku da steknem novo životno iskustvo, da se razvijam u poslovnom i privatnom pogledu, ali i da svoje životno iskustvo prenosim na druge.

Još uvijek živim u svom mjestu Gornje Jesenje u obiteljskoj kući sa svojim roditeljima, braćom, šogoricom i imam dvije prekrasne nećakinje i jednog nećaka sa kojima sam jako vezana i koji su moja velika radost. Imam dečka sa kojim sam pet godina u vezi, koji živi u Zagrebu i svoje slobodno vrijeme pokušavam provesti kod njega tako da često putujem na relaciji Gornje Jesenje – Zagreb. Imam prijatelje koji me ispunjavaju i imaju važnu ulogu u mojem životu sa kojima često izlazim na koncerte, u kina i sl. i bez kojih moj život ne bi bio tako ispunjen.



Cijeli moj život jedna je velika avantura, puna raznih događaja, i lijepih i manje lijepih, ali vrijedna svakog proživljenog dana i truditi ću se da tako bude i dalje.

PSIHIČKI PROBLEMI BOLESNIKA S OTEŽANOM POKRETLJIVOŠĆU (LGMD)

Nataša JOKIĆ-BEGIĆ

Odsjek za psihologiju, Filozofski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Pojasne mišićne distrofije (LGMD) su heterogena skupina primarnih bolesti mišića s dominantnim zahvaćanjem proksimalnih mišićnih skupina. Bolest se najčešće javlja između 10. i 20. godine, oko tri puta učestalije u muškaraca (Vranješ i Canki-Klain, 2009). Tijek bolesti je spor, ali progresivan. Započinje s nemogućnošću trčanja (Vranješ i Canki-Kalin, 2009), a u dobi oko tridesete godine bolesnici nisu u mogućnosti hodati. Mišići lica te ruku, posebice šaka, uglavnom nisu zahvaćeni (Griggs i sur., 1995, Harper, 1985, Stübgen i Stipp, 1997).

Bolesnici oboljeli od mišićne distrofije se suočavaju sa spoznajom o neizlječivosti bolesti, emocionalnom i tjelesnom boli te poremećajima u funkcioniranju u svakodnevnim životnim aktivnostima. Suočavanje s kroničnom bolešću je zahtijevan proces koji je određen individualnim čimbenicima (dobi u kojoj je postavljena dijagnoza, osobinama ličnosti, karakteristikama socijalne mreže oboljelog, vrsti i težini bolesti i slično). Ishod suočavanja s bolešću će gotovo u potpunosti odrediti kvalitetu života i praćenje liječničkih uputa. Stoga je važno da pristup bolesniku uključuje razumijevanje psihosocijalnih značajki oboljelih i njihovih obitelji.

Istraživanja koja se bave psihološkim posljedicama pojasne mišićne distrofije su rijetka. Istraživači se uglavnom bave patogenezom bolesti, a ukoliko se bave psihološkim posljedicama onda su u žarištu pažnje uglavnom djeca i njihove obitelji (Natterlund, 2001). Također je zamjetno da su veću istraživačku pažnju zaokupile psihosocijalne posljedice težih oblika mišićne distrofije, primjerice Duchenova distrofija (Grootenhuys i sur., 2007). Dosadašnja istraživanja su pokazala da se kod osoba oboljelih od mišićne distrofije često uočavaju različite emocionalne poteškoće (prvenstveno anksioznost, apatija, manjak energije i motivacije, socijalno izbjegavanje, pasivnost, nisko samopoštovanje, iritabilnost) i promjene u ličnosti (često izbjegavajuće, ovisne, opsesivno-kompulzivne i pasivno-agresivne crte

ličnosti). Neki autori smatraju da su te smetnje dio (obilježje) bolesti, ali ima puno dokaza da su odraz prilagodbe na kroničnu, progresivnu bolest (Grootenhuys i sur., 2007). Pacijenti s mišićnom distrofijom se suočavaju s otežanom pokretljivošću i ostalim tjelesnim ograničenjima. Osim toga, suočavaju se s financijskim i emocionalnim posljedicama bolesti (gubitak posla, smanjeni prihodi, sniženo samopoštovanje, moguć skraćeni životni vijek...) pa je često vrlo teško razjasniti porijeklo tih simptoma (koliko su povezani sa samom bolešću odnosno primarni, a koliko reflektiraju prilagodbu, odn. sekundarni).

Najčešće reakcije na priopćavanje dijagnoze razočaranje, agresija, očaj i tjeskoba (Natterlund, 2001; Ahlström i Sjöden, 1996; Brunnback, 1987; Faulkner i Kingston, 1998). Ljudi uglavnom s nevjericom prihvaćaju informaciju da boluju od nasljedne i progresivne bolesti. U jednom kvalitativnom istraživanju koje je obuhvatilo osobe koje boluju od različitih oblika mišićne distrofije nisu uočene razlike u prihvaćanju bolesti s obzirom na dijagnozu (Natterlund, 2001). S obzirom da se bolest dijagnosticira uglavnom u adolescenciji, potrebno je poznavanje karakteristika ovog razvojnog razdoblja kako bi se dijagnoza priopćila na što je moguće više prilagođen način. Djeca su nakon otkrivanja bolesti često ljuta na cijeli svijet, sažalijevaju sama sebe ili su u otporu spram činjenice da su bolesna. Zabrinutost, ljutnja i frustriranost uobičajeni su osjećaji na početku bolesti i treba ih razumjeti i dopustiti djetetu da ih izrazi. Reakcije su najčešće kratkotrajne i prolazne jer se djeca zbog svoje usmjerenosti na sadašnjost mnogo brže i lakše prilagođavaju bolesti nego roditelji. Zanimljivo je istraživanje koje su provele Nereo i Hintonova (2003). Primijenile su projektnu tehniku „Tri želje“ (od sudionika se traže tri želje koje bi želio ispuniti kada bi imao čarobni štapić) na dječacima oboljelim od Duchenove mišićne distrofije (n=74), njihovoj zdravoj braći (n=32) i zdravim dječacima (n=43). Protivno očekivanjima, dječje želje se nisu razlikovale niti su bile povezane s poteškoćama uzrokovanim bolešću oboljele djece.

Stav prema bolesti i reakcije djeteta velikim su dijelom određeni ponašanjem roditelja. Ako je roditelj tjeskoban, prestrašen, napet, povećava se doživljaj neugode u djeteta. Treba imati na umu da niti jedan roditelj nije psihički pripremljen imati bolesno dijete. Većina roditelja u procesu prilagodbe na bolest prolazi kroz nekoliko faza. Prva je faza stanje šoka, koju označava nedostatak emocija i neprihvatanje stvarnosti. Roditelji su uglavnom u stanju tjeskobe te nerijetko sumnjaju u točnost dijagnoze. To je posebno izraženo ako simptomi bolesti nisu izraženi ili se bolest nalazi u remisiji. Slijedeća moguća faza je faza odbijanja. Roditelji vjeruju da će se dijete izliječiti na neki drugi način i tada često traže savjete osoba koje se bave alternativnom medicinom, drugih bolesnika, znanaca. Ako im i ostali potvrde

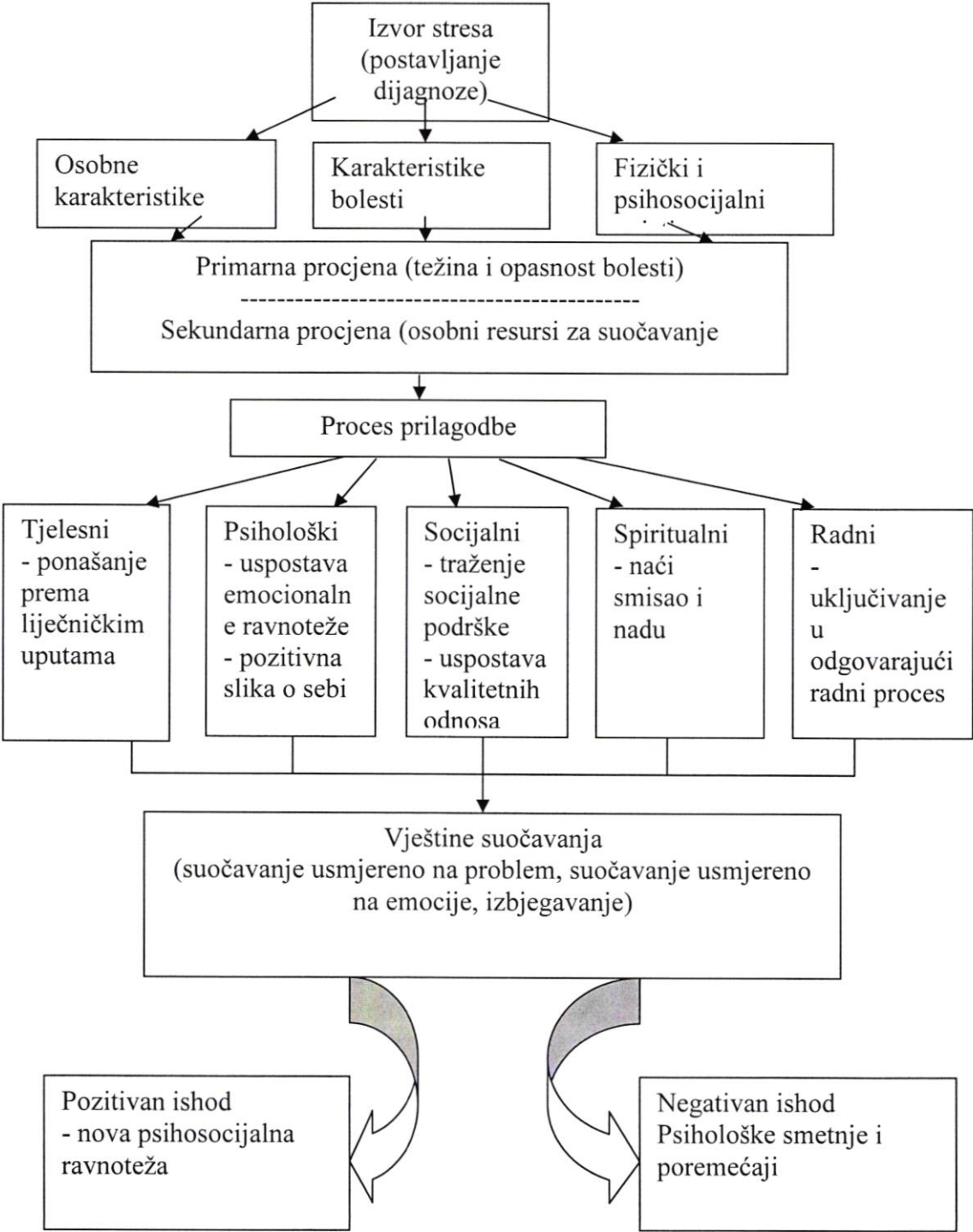
dijagnozu, roditelji nerijetko počinju osjećati srdžbu, krivnju, gubitak i depresiju. Preplavljeni su osjećajima tuge, mogu imati smetnje spavanja ili psihosomatske smetnje. Često se povlače, ne mogu se usredotočiti na posao i obveze, čini im se da više nikada neće biti sretni. Pritom mogu biti bijesni na sudbinu, jedno na drugo, dijete, medicinsko osoblje. Većina roditelja koji postanu depresivni nakon otkrivanja bolesti psihički se oporave nakon šest do devet mjeseci. Naposljetku slijedi posljednja faza prilagodbe koja uključuje promjenu načina života. Tada se roditelji konačno pomire sa djetetovom bolešću i usmjere se ka budućnosti. Utvrđeno je da način na koji liječnik reagira na te osjećaje i ponašanja utječe na sposobnost roditelja da apsorbiraju prvotni šok i da se počnu prilagođavati na djetetovu bolest (Grubić i sur., 2012). Prije svega, liječnik treba uvažavati različite načine suočavanja roditelja sa spoznajom o djetetovoj bolesti i pri tome dati primjerene informacije koje su usklađene s trenutnim emocionalnim stanjem roditelja. Ako je roditelju posebno teško i liječnik procijeni kako je prevladan emocionalnom reakcijom tada ga treba uputiti psihologu (Grubić i sur., 2012). Roditeljima uvijek treba ulijevati nadu, dati jasne upute kako postupati s djetetom, ohrabriti ih i osnažiti, te ih usmjeriti na sadašnjost (Grubić i sur., 2012). Napetost i zabrinutost roditelja najlakše se smanjuje dobrom edukacijom o bolesti što omogućava usvajanje definirane rutine te predvidljivost i sigurnost za dijete i roditelje.

Nakon prvotnog šoka, većina osoba se na aktivan način suočava s bolešću. Pokušava saznati što više informacija o bolesti i načinima pomoći, živi u sadašnjosti (Natterlund, 2001) i na taj način doprinosi zadržavanju subjektivne kvalitete života. Nätterlundova i suradnici (2000) su pratili oboljele odrasle osobe s različitim formama mišićne distrofijom tijekom 5 godina i utvrdili su da tijekom vremena dolazi do snižavanja kvalitete života (uglavnom na dimenzijama tjelesnog zdravlja) i zadovoljstva životom. Smanjuje se broj svakodnevnih aktivnosti što doprinosi emocionalnom distresu. Bihevioralne, emocionalne i kognitivne promjene pojačavaju i psihosocijalne probleme te otežavaju prilagodbu na svakodnevni život. Kod mišićnih distrofija koje sporije napreduju osobe imaju više vremena za prilagodbu pa su češće usmjerene na ono što mogu, nego na ono što ne mogu učiniti. Zanimljivo je da se bolesnici koji su „borbeno“ usmjereni prema svojoj bolesti lošije s njom nose i imaju nižu kvalitetu života (Ahlström, 1994). Ovaj nalaz je upravo suprotan od onog dobivenog na oboljelima od karcinoma (Lampic i sur., 1994). Nemogućnost prihvatanja i „pomirenja“ s bolešću u slučaju mišićne distrofije nije korisna strategija suočavanja, jer pridonosi lošijoj kvaliteti života. Istraživanja pokazuju da je kvaliteta života osoba oboljelih od različitih oblika mišićne distrofije nešto niža nego zdravih ispitanika (Antonini i sur., 2006;

Grootenhuis i sur., 2007). Do pada kvalitete života dolazi prije svega radi otežanja kretanja i tjelesne nesposobnosti (Antonini i sur., 2006). Problemi o kojima izvještavaju pacijenti s različitim vrstama mišićne distrofije su dominantno povezani s mobilnošću, transportiranjem i poslom (Nätterlund i sur., 1999.) Osim toga, dolazi do sužavanja socijalne mreže, te osjećaja da su na „teret drugima“. Do sužavanja broja osoba s kojima ostvaruju kvalitetno druženje dolazi i radi osjećaja umora i manjka energije. Boström i sur. (2004) su proveli kvalitativno istraživanje na 46 osoba s mišićnom distrofijom koje su praćene 10 godina. Gotovo svi su izvijestili o deterioraciji fizičkih kapaciteta – pokretljivost postaje sve ograničenija, pojačavaju se umor i slabost. Unatoč velikom distresu, nekoliko ispitanika je izvijestilo o poboljšanju psihološke prilagodbe tijekom vremena. Većini ispitanika budućnost se činila mračnom (ograničeni kapaciteti, ovisnost o drugima, pasivnost, institucionalizacija, nedostatak autonomije, ležanje u krevetu, nemogućnost brige o vlastitoj higijeni), no nekoliko ih se fokusiralo na sadašnjost i izbjegavalo je razmišljanje o budućnosti. Neki ispitanici izvijestili su da nisu bili svjesni psiholoških posljedica života s bolešću i činjenice da pomoć i podršku neće trebati samo za fizičke aspekte bolesti. U intervjuima su govorili o emocijama poput ljutnje, iritabilnosti, anksioznosti, panike, te sklonosti povlačenja u sebe. Dio ih se osjećao manje vrijednim radi nesposobnosti za rad, pa su sebe opisivali kao „bezvrijedne“, „ništavne“ i „beskorisne“. Prijateljstva s ljudima koji imaju slične probleme bila su izvor zadovoljstva i samopoštovanja. Što se tiče partnerskih odnosa, kod dijela ispitanika bolest je udaljila partnera, a kod drugog dijela ih je dodatno povezala. Posramljenost pred drugima je snažan izvor distresa – dok se bolest još ne vidi drugi ih „smatraju lijenima“, a kada se bolest počinje očitovati onda su predmet stigme i sažaljenja.

S obzirom na relativno mali broj istraživanja koja se bave psihičkim posljedicama pojasne mišićne distrofije ne možemo još donositi konačne zaključke o rizičnim i zaštitnim čimbenicima prilagodbe na bolest. Kako su kronične bolesti sve češće u populaciji, brojni su istraživači pokušali razumjeti prediktore uspješnog i neuspješnog suočavanja. Kao jedan od aktualno važećih modela suočavanja se ističe tzv. Integrativni model prilagodbe na kroničnu bolest (Slika 1.; Samson i Habib, 2008) koji može poslužiti kao konceptualni model razumijevanja prilagodbe na mišićnu distrofiju, te može predstavljati teorijski okvir za buduća interdisciplinarna istraživanja.

Slika 1. Integrativni model suočavanja s kroničnom bolešću (Samson i Habib, 2008).



Zaključno, može se reći kako se uviđa kronični nedostatak empirijski dobivenih spoznaja o psihološkim posljedicama pojasne mišićne distrofije. Dosadašnji nalazi govore kako je prilagodba bolesti individualna i ovisna o brojnim čimbenicima (osobnim, povezanim s bolešću i povezanim s okolinom). Ako dođe do nepovoljne prilagodbe tada se može očekivati da će se pojaviti smetnje u vidu anksioznosti, depresivnosti, moguće iritabilnosti i općenito snižene kvalitete života. Povoljnim ishodima doprinosi dobra socijalna podrška prije svega od ljudi koji trpe od istih poteškoća, orijentacija na sadašnjost, manje tjelesnih ograničenja, blaži tijek bolesti te prihvaćanje bolesti kroz informiranje i uključivanje u procese rehabilitacije koji pomažu olakšavanju tegoba.

Literatura

- Ahlström, G. (1994). Consequences of muscular dystrophy: Impairment, disability, coping and quality of life. (Dissertation) *Acta Universitatis Uppsaliensis*, 489, The Faculty of Medicine. The Centre for Caring Sciences, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Ahlström, G., Sjöden, P-O. (1996). Coping with illness-related problems and quality of life in adult individuals with Muscular dystrophy. *Journal of Psychosomatic Research*, 41 (4), 365-376.
- Antonini, G., Soscia, F., Giubilei, F., De Carolis, A., Gragnani, F., Morino, S., Ruberto, A., Tatarelli, R. (2006). Health-related quality of life in myotonic dystrophy type 1 and its relationship with cognitive and emotional functioning. *Journal of Rehabilitation Medicine*, 38, 181-5.
- Bostrom, K., Ahlstrom, G. (2004). Living with a chronic deteriorating disease: The trajectory with muscular dystrophy over ten years. *Disability and Rehabilitation*, 26(23), 1388-1398
- Brunnback, R.A. (1987). Disturbed personality and psychosocial adjustment in myotonic dystrophy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 46, 487-588.
- Faulkner, C.L., Kingston, H.M. (1998). Knowledge, views, and experience of 25 women with myotonic dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 35 (12), 1020-1025.
- Griggs, R.C., Mendell, J.R., Miller, R.G. (1995). *Evaluation and treatment of myopathies*, Philadelphia PA: F.A. Davis Company, 93-139.

- Grootenhuys, M.A., de Boone, J., van der Kooi A. (2007). Living with muscular dystrophy: health related quality of life consequences for children and adults. *Health and Quality of Life Outcomes*, 5, 31, doi:10.1186/1477-7525-5-31.
- Grubić, M., Ljubešić, M., Filipović Grčić, B. (2012). *Kako reći neželjenu vijest. Komunikacija zdravstvenih djelatnika i ostalih stručnjaka s roditeljima teško bolesne djece i djece s razvojnim rizicima i teškoćama u razvoju*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Harper, P.S. 1985. The Genetics of muscular dystrophies. *Progress in Medical Genetics*, 6, 53-90.
- Lampic, C., Wennberg, A., Schill, J-E., Glimelius, B., Brodin, O., Sjöden, P-O. (1994). Coping, psychosocial well-being and anxiety in cancer patients at follow-up visits. *Acta Oncologica*, 33 (8), 887-893.
- Natterlund B, Ahlstrom G. (1999). Problem-focused coping and satisfaction with activities of daily living in individuals with muscular dystrophy and postpolio syndrome. *Scandinavian Journal of Caring Sciences*, 13(1), 26-32.
- Nätterlund, B., Gunnarsson, L-G., Ahlstrom, G. (2000). Disability, Coping and Quality of Life in Individuals with Muscular Dystrophy: A Prospective Study over Five-Years. *Disability and Rehabilitation*, 22, 776-785.
- Nätterlund, B. (2001). Living with muscular dystrophy. Illness experience, activities of daily living, coping, quality of life and rehabilitation. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1025. 91 pp. Uppsala. ISBN 91-554-4997-2
- Nerreo, N.E., Hinton, V.J. (2003). Three wishes and Psychological Functioning in Boys with Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Developing Behavioral Pediatrics*, 24, 96-103.
- Samson, A., Siam, H. (2008). Adapting to major chronic illness: A proposal for a comprehensive task-model approach. *Patient Education and Counseling*, 70, 426-429
- Stübgen, J-P., Stipp, A. (1997). Limb Girdle muscular dystrophy: A prospective follow-up study of functional impairment. *Muscle & Nerv*, 4 (April), 453-460.
- Vranješ, D., Canki-Klain, N. (2009). Pojasne mišićne distrofije (LGMD) uz posebni osvrt na kalpaiopatije. *Neurologia Croatica*. 58(Suppl.3), 45-45

ULOGA PULMOLOGA U PRAĆENJU I LIJEČENJU BOLESNIKA S LGMD

Taida ALFIREVIĆ-UNGAROV

Specijalna bolnica za plućne bolesti, Zagreb

Pojasne mišićne distrofije (engl. limb girdle muscular dystrophy, LGMD) su genetski i klinički heterogena skupina progresivnih primarnih bolesti mišića s dominantnim zahvaćanjem proksimalne muskulature ramenog i zdjeličnog pojasa.

Bolest se javlja u oba spola, dob nastupa bolesti može varirati od prve do pedesete godine (najčešće između 10.-30. godine), a neki bolesnici mogu biti i asimptomatski. Rani nastup bolesti općenito uzrokuje bržu progresiju bolesti. U svojoj najtežoj formi simptomi LGMD 2C sličje Duchenne mišićnoj distrofiji, a sposobnost hoda bolesnici izgube od desete do dvanaeste godine života. Prema tipu nasljeđivanja dijele se na autosomno dominantni-tip 1 i autosomno recesivni-tip 2, te na niz podtipova ovisno o genetskim lokusima te defektu proteina koji kodira. Bolest se nasljeđuje uglavnom autosomno recesivno, a rijede autosomno dominantno (10%).

Komplikacije bolesti su kontrakture, skolioza, respiracijska insuficijencija, kardiomiopatije i kardijalne aritmije. Respiracijska insuficijencija, kardiomiopatije i kardijalne aritmije su najčešći uzroci smrtnosti bolesnika s LGMD. Stoga od trenutka dijagnosticiranja bolesti u tim koji skrbi o takvim bolesnicima uz genetičara i neurologa treba uključiti pulmologa, kardiologa, ortopeda, fizijatra i fizioterapeuta. Kako u ovom trenutku nema etiološke terapije kod bolesnika s LGMD, jedino terapijski postupci navedenih specijalista mogu poboljšati kvalitetu života i produžiti život tih bolesnika.

Kod LGMD osim progresivne slabosti muskulature ramenog i zdjeličnog pojasa može se javiti slabost respiracijske i srčane muskulature. Bulbarna muskulatura je kod LGMD rijetko zahvaćena, a zahvaćenost srčane muskulature je česta (50-60%) u autosomno dominantnom sindromu (LGMD 1A i 1B).

Većina bolesnika s LGMD razviju umjerenu slabost respiracijske muskulature uz urednu konstelaciju respiracijskih plinova, ali s obzirom na veliku varijabilnost kliničkih manifestacija očekivati je i ozbiljne plućne komplikacije (slika 1).

Slika 1.

Probability of developing respiratory failure in neuromuscular disease

Hight probability	Variabile probability	Lower probability
Duchenne muscular dystrophy	Limb girdle MD	Type III SMD
Type 1, intermediate SMD	Myopathies nemieline metabolic	Low thoracic spinal codre lesion
Merosin-negative CMD	Fascioscapulohumeralna MD	
Motor neurone disease/ALS		
Early onest scoliosis		
Spinal cord lesion above C6		

SMA:spinal muscle atrophy; CMD:congenital muscular dystrophy; ALS amiotrophyc lateral sclerosis; MD:muscular dystrophy

Plućne komplikacije bolesnika s neuromuskularnim bolestima (NMB) uključuju respiratorne infekcije, atelektaze i respiracijsku insuficijenciju (RI) kao najozbiljniju komplikacija.

Ako se razvije RI, uzroci, mehanizmi nastanka i kliničke manifestacije RI su iste neovisno o kojoj se NMB radi.

RI definiramo sniženim parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi ($\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$ i urednim ili povećanim parcijalnim tlakom ugljičnog dioksida arterijske krvi (PaCO_2). Parenhimske bolesti pluća uzrokuju dominantno hipoksemičku RI, dok kod NMB slabost respiracijske muskulature i posljedično zatajenje respiracijske pumpe uzrokuju hipoventilaciju pluća i hiperkapničku RI ($\text{PaCO}_2 > 45 \text{ mmHg}$).

Nemogućnost dostatne ventilacije pluća zbog slabosti inspiratorne muskulature, nemogućnost iskašljavanja ako je dominantno zahvaćena ekspiratorna muskulatura (rizik atelektaze i pneumonija), rizik od aspiracije hrane zbog slabosti bulbarne muskulature, te plućne komplikacije uzrokovane ovim stanjima su osnovni uzrok RI. U većine NMB slabost inspiratornih i ekspiratornih mišića je podjednaka i javlja se istovremeno. Kod nekih NMB prije su zahvaćeni ekspiratorni mišići, pa učestale respiratorne infekcije prethode nastanku alveolarne hipoventilacije i RI.

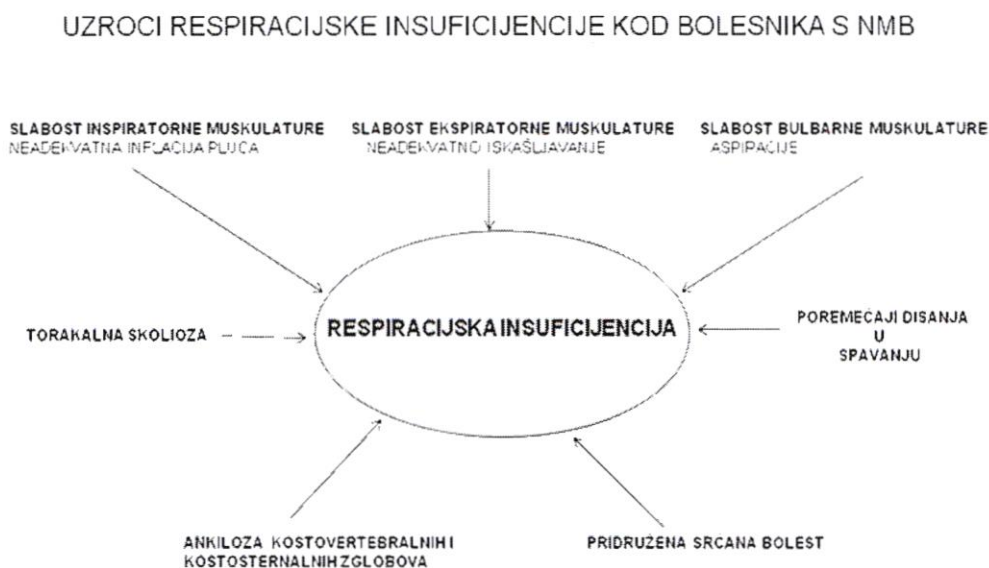
Izgleda da je zahvaćenost ekspiratorne muskulature kod bolesnika s LGMD dominantnija. Ako se slabost respiracijske i vertebralne muskulature javi prije kompletnog završetka rasta, sekundarno se javlja torakalna skolioza, koja dodatno pogoršava plućnu funkciju. Smanjena je popustljivost (compliance) prsnog koša (ovisno o Cobb-ovom kutu), a u blizini konveksnog dijela skoliotične kralježnice smanjena je ventilacija i klirens sekreta iz dišnih putova, što

dovodi do atalektaza, recidivirajućih upala i u konačnici fibroznih promjena preegzistentno zdravih pluća.

Kod bolesnika koji su vezani za kolica dolazi do niza strukturnih promjena mišićnoskeletnog sistema, pa tako zbog smanjene potrebe za većim dišnim radom dolazi i do ankiloze kostosternalnih i kostovertebralnih zglobova, što dodatno smanjuje popustljivost prsnog koša i pridonosi razvoju RI.

Razvoju RI pridonose kardiomiopatija i poremećaji disanja u spavanju. Poremećaji disanja u spavanju su česti u bolesnika s NMB i opisani su kod bolesnika kod Duchenn, miotoničke i limb girdle mišićne distrofije (slika 2.)

Slika 2.



RI se najprije javlja tijekom spavanja i može mjesecima i godinama prethoditi dnevnoj RI. Stoga dnevni poremećaj respiracijskih plinova arterijske krvi implicira kasnu i podmaklu slabost respiratornih mišića.

I kod zdravih ljudi tijekom spavanja smanjena je ventilacija pluća i promijenjen je tip disanja što dovodi do pada (ne klinički značajnog) PaO_2 i porasta PaCO_2 . Mogućnost bolesnika s NMB da odgovori na izmijenjeno fiziološko stanje tijekom spavanja ograničeno je njihovim kapacitetom ventilacije i slabosti respiratornih mišića. U REM fazi spavanja jedini aktivni

respiracijski mišić je dijafragma. Ako je u tijeku NMB slabošću zahvaćena dijafragma, upravo o stupnju slabosti dijafragme zavisi pojava i težina RI. Ako je snaga dijafragme očuvana, a slabošću su zahvaćeni mišići gornjih dišnih putova, nastaje opstruktivna apneja u spavanju.

Simptomi RI tijekom spavanja su česta buđenja tijekom noći, noćne more, noćno znojenje, bifrontalne jutarnje glavobolje, pretjerana dnevna pospanost, umor, razdražljivost i anoreksija. Ti su simptomi nekarakteristični, često se previde i ne povezuju se s RI. Stoga je potrebno da svi koji skrbe o bolesnicima s NMB znaju prepoznati rane simptome RI. Dispneja kao dominantni simptom RI najprije se javlja u naporu, što je često prekriveno slabom pokretljivošću bolesnika s NMB. Kada se dispneja pojavi u mirovanju to je već znak uznapredovale RI prisutne i tijekom dana.

Posljedice RI su policitemija (sklonost trombozi), plućna hipertenzija, hipertrofija desnog i lijevog srca, te konačno srčano popuštanje.

Procjena plućne funkcije kod bolesnika s NMB

Svaki pregled započinje iscrpnom anamnezom i fizikalnim pregledom (tip disanja, upotreba pomoćne muskulature, paradokso disanje). Posebno je potrebno pitati bolesnika o kvaliteti spavanja, noćnom znojenju, jutarnjim glavoboljama, dnevnoj pospanosti, umoru, razdražljivost i anoreksiji. Bolesnici koji nemaju značajno poremećenu plućnu funkciju, a imaju simptome koji upućuju na RI tijekom spavanja, kandidati su za cjelonoćnu polisomnografiju.

Tipična metoda za procjenu slabosti periferne muskulature, kao što je elektromiografija, teško se može primijeniti za procjenu slabosti respiracijske muskulature. Osnovna neinvazivna, reproducibilna i standardizirana metoda praćenja bolesnika s NMB je spirometrija. VC (vitalni kapacitet) je pokazatelj snage respiracijske muskulature. Tek kada je snaga respiracijske muskulature <50% predviđene, bilježi se pad VC. Pad VC iz sjedećeg u ležeći položaj za više od 25% upućuju na slabost dijafragme.

Mjerenje maksimalnog inspiratornog (MIP) i ekspiratornog tlaka (MEP) također je jednostavna metoda za ispitivanje snage inspiratornih i ekspiratornih mišića. MIP > od 80 cm H₂O kod muškaraca i > od 70% kod žena isključuje slabost respiracijskih mišića i ima veliku negativnu prediktivnu vrijednost.

Određivanje vršnog protoka pri manevru kašlja direktno korelira s mogućnosti iskašljavanja. Protok manji od 270 L/s ukazuje na neadekvatno iskašljavanje i potrebu za asistiranim iskašljavanjem.

Plinska analiza arterijske krvi determinira stupanj RI. Kako se RI najprije javlja tijekom spavanja, dnevne vrijednosti respiracijskih plinova mogu biti uredne unatoč RI tijekom spavanja. Dnevni poremećaj dišnih plinova arterijske krvi implicira kasno i teško oštećenje plućne funkcije.

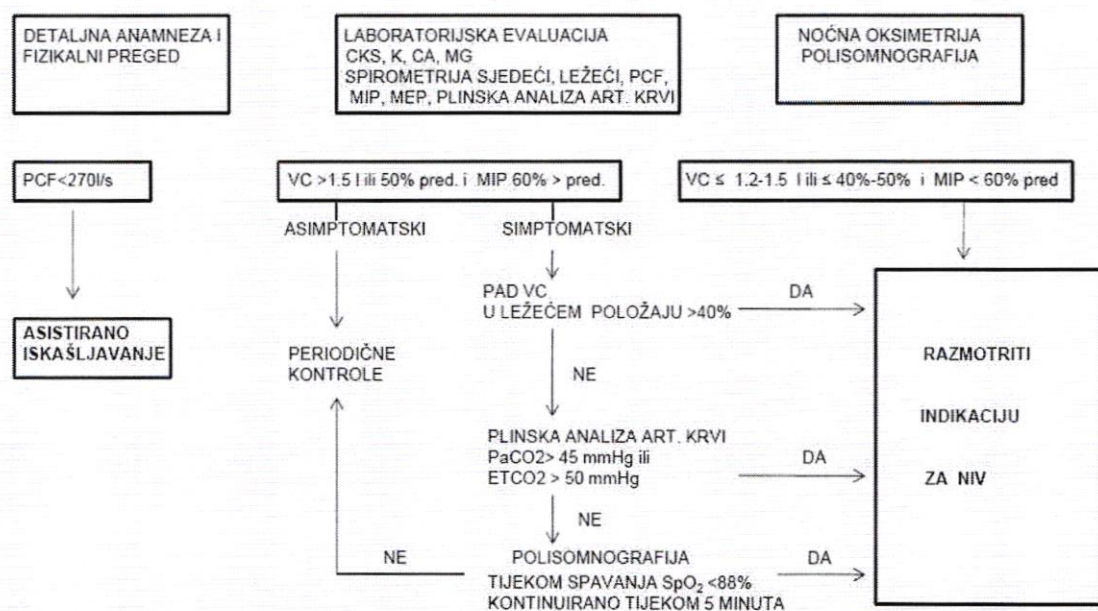
Liječenje RI

Liječenje RI kod bolesnika s intrizičnom bolesti pluća kao što su teofilin, inhalacijska terapija i dugotrajno liječenje kisikom, kod bolesnika s NMB ne samo da nije učinkovito već može biti i štetno. Liječenje RI kisikom kod bolesnika s NMB može biti opasno po život zbog dodatne retencije ugljičnog dioksida.

Terapijski postupci kod bolesnika s NMB ovise o simptomatologiji i vrijednostima parametara plućne funkcije (slika 3).

Slika 3.

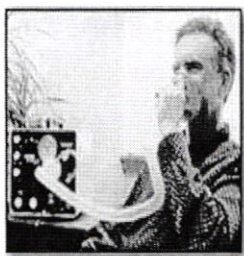
ALGORITAM PRAĆENJA BOLESNIKA S NMB



J Bras pneumol 2007;33:81-92

VC-vitalni kapacitet, MIP-maksimalni inspiratorni tlak, MEP-maksimalni ekspiratorni tlak, PCF-vršni protok pri manevru iskašljavanja, PaCO₂ –parcijalni tlak ugljičnog dioksida arterijske krvi, ETCO₂ ugljični dioksid na kraju izdaha, SpO₂ –saturacija krvi kisikom mjerena pulsom oksimetrom, NIV- neinvazivna ventilacija.

Respiratorna terapija uključuje asistirano iskašljavanje, neinvazivnu ventilaciju (NIV) ili invazivnu ventilaciju preko traheostome. Prednost ima NIV koji se u početku provodi tijekom noći, a kako RI napreduje i tijekom dana.



asistirano



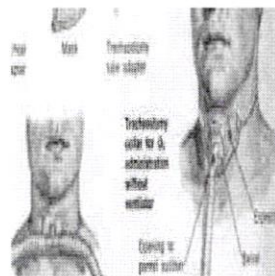
iskašljavanje



kućni respirator



neinvazivna ventilacija



invazivna ventilacija preko traheostome

Zaključak:

Plućne komplikacije bolesnika s NMB su oštećena ventilacija zbog slabosti respiracijske muskulature, neadekvatno iskašljavanje zbog slabosti ekspiratorne muskulature i rizik od aspiracija zbog slabosti bulbarne muskulature. Najteža komplikacija i najčešći uzrok smrti bolesnika s NMB je RI. Razvoj RI (najprije se javlja u spavanju) je podmukao, simptomi su nespecifični i često se previde.

Po dijagnostici NMB potrebno je uputiti bolesnika pulmologu. Provođenjem preventivnih mjera, periodičkim praćenjem, te pravovremenim terapijskim postupcima preveniramo teške kardiopulmonalne komplikacije, poboljšavamo kvalitetu života i produžujemo život bolesnika s NMB.

Literatura:

1. Van der Kooi AJ, Barth PG, Busch HF, de Haan R, Ginjaar HB, van Essen AJ, van Hooff LJ, Höweler CJ, Jennekens FG, Jongen P, Oosterhuis HJ, Padberg GW, Spaans F, Wintzen AR, Wokke JH, Bakker E, van Ommen GJ, Bolhuis PA, de Visser M. The clinical spectrum of limb girdle muscular dystrophy. A survey in The Netherlands. *Brain*. 1996;119 (Pt 5):1471-80.
2. Stübgen JP, RAS GJ, Schultz CM, Crowther G. Lung and respiratory muscle function in limb girdle muscular dystrophy. *Thorax* 1994;49:61-65.

3. Poppe M, Bourke J, Eagle M. et al. Cardiac and respiratory failure in limb-girdle muscular dystrophy 2I. *Ann Neurol* 2004;56:738- 741.
4. CRINER GJ, MARCHETTI N. Effects of neuromuscular diseases on ventilation, In FISHMAN AP, ELIAS JA, FISHMAN JA, GRIPPI MA, SENIOR RM, PACK AI (Eds) *Fishman's pulmonary diseases and disorders* (Mc Graw Hill, New York, 2008)
5. BENEDITT JO. The neuromuscular respiratory system: Physiology, pathophysiology, and a respiratory care approach to patients *Respir Care* 2006;51:829-837.
6. BUYSE B. Pulmonary manifestation of central neural, neuromuscular and osteo-articular chest wall disorders *Eur Respir Mon* 2006;34:262-289.
7. PERRIN C, UNTERBORN JN, AMBROSINO CD, HILL NS. Pulmonary complications of chronic neuromuscular diseases and their management *Muscle Nerve* 2004;29:5-27.
8. PIPER A. Sleep abnormalities associated with neuromuscular disease: pathophysiology and evaluation *Semin Respir Crit Care Med* 2002;23:211-219.
9. DePALO VA, McCOOL FD. Respiratory muscle evaluation of the patient with neuromuscular disease *Semin Respir Crit Care Med* 2002;23:201-209.
10. Gay P, Edmonds L. Severe hypercapnia after low flow oxygen therapy in patients with neuromuscular disease and diaphragmatic dysfunction. *Mayo Clin Proc* 1995; 70:327-330.
11. PASCHOAL IA, VILAALBA WO, PEREIRA MC. Chronic respiratory failure in patients with neuromuscular diseases: diagnosis and treatment *J Bras pneumol* 2007;33:81-92.

ULOGA FIZIJATRA U REHABILITACIJI BOLESNIKA S LGMD

Ida KOVAČ

Klinički zavod za rehabilitaciju i ortopedsku pomagala, KBC Zagreb

Uvod: Učinkovita rehabilitacija, usprkos činjenice da je većina mišićnih distrofija još uvijek bez etiološke etapije, može doprinjeti kvaliteti života bolesnika i postizanju njegove najveće fizičke i psihosocijalne neovisnost. Isto tako rehabilitacijom se može umanjiti sekundarni medicinski komorbiditet, prevenirati ili umanjiti fizičke deformacije te pomoći da se bolesnik integrira u društvo.

Pojasne mišićne distrofije (LGMD) su genski vrlo heterogena skupina bolesti sličnih fenotipskih karakteristika, sa primarnim bolestima mišića koje se javljaju u oba spola, ali učestalije u muškaraca (3:1). Javlja u dobi od 3. do 30.god. života, najčešće između 10. i 20. godine. LGMD tip 1 nasljeđuju se autosomno dominantno, a tip 2 autosomno recesivno. Učestalija je pojavnost tipa 2, a najraširenije su LGMD2A kalpainopatija, LGMD2B disferlinopatija i LGMD2(C-F) sarkoglikanopatije. U kliničkoj slici je dominantno zahvaćanje proksimalnih mišićnih skupina ekstremiteta, zdjelice i ramenog obruča, dok su distalne mišićne skupine manje zahvaćene a facijalni te ekstraokularni mišići pošteđeni. Kliničku sliku karakterizira raznolikost u stupnju zahvaćenosti distrofičnih mišića, i to čak i kod članova iste obitelji. Progresija bolesti je umjereno teška ali može dovesti do teške onesposobljenosti, gubitka samostalne pokretljivosti pa i do smrti. Neki oblici pojasne distrofije LGMD kod mladih osoba imaju dramatični tijek dok drugi imaju tako sporo progresivan tijek da se uočavaju tek u kasnijoj životnoj dobi (Nigro).

U prvom stadiju, bolest se očituje teškoćama bolesnika kod trčanja, a u kliničkom nalazu dominira slabost m. gluteus maksimusa i mišića bedra dok je m. kvadriceps femoris relativno duže vrijeme sačuvan. Izražena je i slabost abdominalnih mišića, a česta je umjerena hiperlordoza. Zbog slabosti mišića zdjeličnog pojasa bolesnik ima tipičan gegav hod, poteškoće kod izvođenja čučnjeva i podizanja sa poda pa se uspravlja hvatajući se za vlastita koljena (Gowersov znak. Razvija se i slabost periskapularnih mišića sa skapulom alatom. Pseudohipertrofija listova je rijetka.

U kasnijoj fazi, radi progresije slabosti zdjeljeno natkoljениčnih mišića dolazi do daljnjih poteškoća do nemogućnosti penjanja uz stepenice i ustajanja iz čučnja pa se bolesnik ne može uspraviti bez pomoći druge osobe ili i prihvaćanja za okolne predmete. Progresijom bolesti i mišićne slabosti, uključujući i m. kvadriceps femoris (a manje i distalnih mišićnih skupina), bolesnici sve teže hodaju a u dobi oko tridesete godine često gube mogućnost samostalnog hodanja. Neki bolesnici s LGMD pak imaju bolju dugoročnu prognozu i očuvanu pokretljivost do starije dobi.

Osim mišićne slabosti, česti je razvoj kontraktura i to na kukovima, koljenima ili na laktovima dok se na kralježnici može biti ograničena pokretljivost po tipu „rigid spine“ (npr. kod kongenitalne mišićne distrofije (SEPN1), LGMD 2A, Emery-Dreifuss MD: 1 (Emerin; variant); 2 (Lamin A/C)). Tipičan je fenotip bolesnika sa LGMD slika osobe sa pojačana lumbalnom lordozom i reklinacijom trupa uz nagnutu, antekliniranu zdjelicu sa širom bazom oslonca radi abdukcije i fleksije kukova, često sa hodom na prstima. Na gornjim udovima je radi slabosti ramenom pojasu otežana abdukcija do onemogućenog podizanje ruku iznad horizontale. Radi selektivne slabosti pjeдинih mišića u ramenom pojasu izražena je slika tzv. padajućih ramena ili skapula alata ili ramena poput onih kod facioskapulohumoralne distrofije. Mišići šaka su relativno dugo sačuvane snage kao i manipulativnost šaka. Pseudohipetrofija nije karakterističan znak za zahvaćene mišiće.

Medicinska rehabilitacija se provodi metodama fizioterapije, radne terapije, primjenom pomagala, a ponekad i kirurški. Primjena medicinske rehabilitacije bi trebala dio kompleksnog, holističkog rehabilitacijskog tretmana, multimodalnog i interdisciplinarnog i multidisciplinarnog pristupa, a provođenog po bio-psiho-socijalnom modelu. Psihosocijalna i profesionalna rehabilitacija mora biti dio kompletnog rehabilitacijskog tretmana. Ciljani postupci fizioterapije su temeljeni na dobrom poznavanju kliničkih simptoma i funkcionalnog statusa bolesnika koji su različiti za različite NM bolesti ali su i, načelno, slični, obzirom na stadij bolesti tj: 1. stadij održanog samostalnog hodanja, 2. stadij- otežanog hoda uz povremenu primjenu invalidskih kolica te 3. Stadij trajne pokretljivosti pomoću invalidskih kolica ili nepokretnosti bolesnika.

Specifični ciljevi fizioterapije kod bolesnika sa neuromuskularnim bolestima su: 1. poboljšati/ zadržati/ usporiti gubitak mišićne snage, 2.spriječiti/ smanjiti kontrakture, 3. razvijati/ poboljšati/ produžiti pokretljivost bolesnika, 4.povećati fizičke mogućnosti i neovisnost u aktivnostima svakodnevnog života i radnih aktivnosti, 5. provoditi edukaciju bolesnika i obitelji te 6. poboljšati kvalitetu društvenog života.

Medicinska rehabilitacija je još uvijek pretežno simptomatska . Ipak, primjena različitih oblika terapije koji uključuju fizioterapiju, prvenstveno kineziterapiju (vježbe pokretljivosti zglobova i vježbe za snaženje mišića), zajedno sa primjenom ortoza i/ili kirurškim intervencijama, moguće je produžiti samostalno kretanje bolesnika. Pokretljivosti bolesnika i postizanju što veće neovisnosti bolesnika, danas značajno doprinosi i primjena raznih tehničkih pomagala, baziranih na kompjuterskoj tehnologiji (kolica i vozila za kretanje, liftova i slično).

Većina bolesnika s LGMD se rehabilitira kroz poliklinički oblik. Postupak započinje upućivanjem bolesnika fizijatru koji se usmjereno bavi problematikom neuromuskularnih bolesti ito na preporuku neuropedijatra ili neurologa, koji postavljaju dijagnozu LGMD. Kliničkim pregledom fizijatar čini procjenu aktualnog kliničkog stanja na temelju anamneze, dijagnoze, detaljnog neurološkog pregleda i statusa muskuloskeletnog sustava s procjenom distribucije i stupnja mišićne slabosti, pokretljivosti zglobova, statusa kralježnice, skapula alata te analize mobilnosti kao i patobiomehanike hoda. Nakon kliničkog pregleda fizijatra, fizioterapeut iz „neuro tima“ provodi funkcionalna mjerenja kojima se objektivizira funkcionalni status bolesnika: procjena mišićne snage (manuelnim mišićnim testom i dinamometrijski), mjerenje pokretljivosti zglobova (goniometrijski), mjerenje brzine hodanja, procjene funkcionalnih mogućnosti bolesnika klasifikacijom po Vignosu i Archibaldu te pp. analize ravnoteže na kompjuteriziranoj stabilometrijskoj platformi. Nakon uvida u učinjena mjerenja, planira se program rehabilitacije, primarno fizioterapije i radne terapije te pp. indicira primjena pomagala. Kineziterapija se planira i provodi individualno, za svakog bolesnika ponaosob, na temelju funkcionalne evaluacije i učinjenih mjerenja. Pritom se provodi i edukaciju bolesnika i pp. roditelja koje se osposobljavaju za provedbu vježbi. Kod bolesnika s NM bolestima u Zavodu se provodi primjena pomagala, posebno ortopedске obučе, pomagala za kretanje (štaka, hodalica, kolica) te ortoza (AFO ili KAFO) sa prethodnim testiranjem. U suradnji sa ortopedima kirurzima indiciraju se i postoperativno rehabilitiraju bolesnici nakon korektivnih zahvata kontraktura ili skolioze.

Poliklinička, timska provedba rehabilitacije i fizikalne terapije u Zavodu se provodi već duži niz godina. Dobro pokretni NM bolesnici provode intermitetntno polikliničku fizioterapiju, sa redovitim kontrolama radi evaluacije statusa i uspješnosti vježbi koje, u međuvremenu, bolesnici samostalno provode nakon edukacije u Zavodu. Za bolesnike koji su teže pokretni ili samostalno nepokretni, fizijatar daje preporuku za obavljanje kineziterapije u kući

bolesnika, uz fizioterapeuta. Za ostale bolesnike iz različitih krajeva Hrvatske u dogovoru sa bolesnikom odabire se opcija koja će omogućiti što bolju realizaciju planiranog reha programa, pri čemu je vrlo važna dostupnost / nedostupnost fizioterapijskih ustanova. U ruralnim sredinama one često nisu dostupne pa roditelji samostalno provode vježbe s djetetom stoga provodimo njihovu edukaciju u Zavodu uz „osvježavanje“ znanja i uvođenja novih vježbi koje prate promjene kliničkog statusa, vezano uz kontrolne preglede fizijatra svakih 6 mjeseci. Važnu nadopunu kontinuiranoj kineziterapiji čini stacionarna rehabilitacija za koju nadležni fizijatar daje prijedlog na temelju kliničke i funkcionalne evaluacije Barthelovim testom. Tijekom svih faza rehabilitacije, nužno je pružati i psihološku podršku bolesniku i obitelji, osobito u fazama pogoršanja bolesti. Kontrolni klinički pregledi, sa procjenom mišićne snage i funkcionalnom evaluacijom se provodi barem jednom godišnje.

Tretman mišićne slabosti se provodi kineziterapijom. Načela kineziterapije kod pojasnih MD ista su kao i kod ostalih miopatija. Kineziterapija obuhvaća vježbe snage i izdržljivosti za skeletnu muskulaturu, posebno zdjeličnog pojasa i trupa, ramenog pojasa, dorzifleksora stopala te vježbe istezanja. Već od početka terapije, kod bolesnika s LGMD posebna se pažnja posvećuje snaženju zdjeličnonatkoljenične muskulature. Značajna je i kineziterapija koja se provodi radi poboljšanja pokretljivosti ramena tj. glenohumeralnog zgloba kao i poboljšanja snage muskulature ramenog pojasa. Kod početnog stadija su vježbe aktivne, sa ili bez otpora, a kod težih pareza, aktivno potpomognute i pasivne. Drugi, vrlo značajni dio kineziterapijskog programa su vježbe istezanja kao i vježbe disanja. Bolesnika treba educirati i poticati da usvoji kontinuirano, svakodnevno provođenje vježbi kao redovnu naviku i dio življenja.

Kod bolesnika s miopatijom, postoji oprez i strah od mogućih oštećenja mišića neadekvatno doziranom kineziterapijom pa je intenzitet i trajanje vježbi potrebno dobro planirati. Stanje mišića može se pratiti kliničkom pojavom krampa a biokemijski sa mjerenjima kreatinin kinaze, mioglobulinurije (Reimann J 2000). Učinak kineziterapije je ovisan o početnoj mišićnoj snazi na početku treninga, a najbolji su učinci kineziterapije kod mlađe djece i kod bolesnika sa slabije progresivnim miopatijama, te su bolji što je početna snaga mišića očuvanija dok kod vrlo slabih bolesnika nema očekivanog pozitivnog učinka vježbi. Aerobne vježbe (šetnja, vožnja bicikla, vježbe u vodi) mogu doprinjeti funkcionalnom oporavku i većoj neovisnosti bolesnika u aktivnostima svakodnevnog života. - Kod bolesnika s NM B koji više nisu sposobni za aktivne vježbe, potrebno je redovito provođenje aktivno asistiranih i pasivnih

vježbi kojima se održava integritet zglobova i mekih tkiva, usporava progresija kontraktura, poboljšava cirkulacija i pozitivno djeluje na smanjenje bolova (Lewis 2007).

Kontraktura zglobova nogu kod bolesnika s LGMD (najčešće fleksijskih na kukovima i koljenima uz skraćanja Ahilovih tetiva) u kombinaciji s slabošću zdjelice muskulature (ekstenzora kuka) i natkoljeničnih mišića, uzroci su progresivnih poteškoća u hodu. Slabost mišića udružena sa kontrakturama zglobova nogu otežava stajanje i hod, izaziva umor radi pojačanih napora pri hodu, provocira nestabilnost te sklonost padanju, do mogućeg gubitka samostalnog hodanja. Kompenzatorne modifikacije u posturi (prominencija trbuha uz hiperlordozu) dovode do dodatnog pogoršanja kontraktura. Kod Emery Dreiffus miopatije karakteristične su fleksijske kontraktura laktova.

Fizioterapijski tretman kontraktura ovisi o stadiju bolesti i uznapređovalosti kontraktura. Za prevenciju ili tretman umjerenih kontraktura, provode se aktivne vježbe i pasivne vježbe istezanja zglobova nogu. Prije početka vježbi istezanja poželjna je primjena termoterapije (krioterapije ili oprezna primjena topline). Primjena ortoza tijekom noći, hodanje i stajanje bolesnika (samostalno ili u stalku za vertikalizaciju) po barem nekoliko sati dnevno, kao i potprbrušno ležanje vrlo su korisne metode u tretmanu ili prevenciji kontraktura.

U kasnijoj, uznapređovaloj fazi bolesti kada kontraktura postaju fiksirane, a fizioterapija više nema učinka, postavlja se indikacija za operativnu korekciju kontraktura. Kada se korekcija kontraktura provodi op. zahvatima na mekim okozglobnim strukturama, tj. kod tenotomija postoperacijski se provodi imobilizacija plastičnim ortozama u trajanju do 6 tjedana uz ranu vertikalizaciju i intenzivnu rehabilitaciju (kineziterapiju). Kod op. zahvata na koštanim strukturama, zahtjevi za imobilizaciju su rigorozniji. Noviji klinički stavovi o operacijskom tretmanu kontraktura smatraju da je kirurško liječenje kontraktura indicirano samo kod određenih bolesnika, na temelju strogo individualne procjene za svakog bolesnika. Fizioterapija ima svoje mjesto u postoperacijskom tretmanu i kod drugih kirurških zahvata koji se provode radi ublažavanja deformacija muskuloskeletnog sustava kao npr. kod stabilizacija skapula (torakoskapularne fuzije) ili korekcije skolioze, sa izdašnom spondilodezom. Sa vježbama disanja se započinje odmah nakon operacije dok se intenzivnija kineziterapija provodi uz placet operatera nakon postignute stabilizacije.

O učinkovitosti vježbi kod LGMD postoji mali broj studija. Analiza turskih autora izvjestila o dobrom učinku vježbi disanja kod bolesnika s LGMD i Backerovom distrofijom na poboljšanje respiratornog kapaciteta (Bönnemann CG).

Primjena ortoza radi slabosti dorzalnih fleksora stopala odnosno pareze stopala korisna je primjena ortoza za stabilizaciju stopala i gležnjava (AFO - Ankle Foot orthosis) koje poboljšavaju stabilnost i preveniraju padove kod osoba s parezoma stopala. Rjeđe se koristi KAFO ortoze kod slabosti natkoljениčnih mišića. Odluka o eventualnoj primjeni ortoza je dosta delikatna jer se u želji da se poboljša stabilnost nogu mora izbjeći situacija da primjenom ortoza narušimo kompenzacijske posturalne mehanizme, što bi moglo dovesti do gubitka mogućnosti stajanja i hodanja.

Kada je radi slabosti i/ili kontraktura samostalni hod bolesnika više nije siguran ili moguć indicira se primjena pomagala za kretanje u rasponu od štaka, hodalice ili invalidskih kolica.

Fizikalna terapija i radna terapija kao i primjena raznih suvremenih tehničko-rehabilitacijskih pomagala te adaptacija stambene i radne okoline bolesnika, pomoći će i olakšati bolesniku sa LGMD koji ima brojna funkcionalna onesposobljenja, obavljanje aktivnosti svakodnevnog života, radnih i okupacijskih sadržaja, komunikaciju i mobilnost te omogućiti bolju kvalitetu življenja i psihosocijalnu reintegraciju.

Literatura:

1. Nigro V, Aurino S, Piluso G. Limb girdle muscular dystrophies: update on genetic diagnosis and therapeutic approaches. *Curr Opin Neurol.* Oct 2011;24(5):429-36.
2. Brussock CN, Haley SM, Munsat TL, Berhardt DB. Measurement of Isometric Force in Children with and without Duchenne's Muscular Dystrophy. *Phys Ther* 1992; 72 (2): 105- 113.
3. Aitkens SG, Lord AF, Bernauer E et al. Relationship of manual muscle testing to objective strength measurements. *Muscle Nerve* 1989; 12: 173-177.
4. Grimby G. Neuromuscular Disease U : Fletcher GF, Banja J, Jann BB . Rehabilitation medicine . Contemporary clinical perspectives. Lea andn Fabiger 1992; 103-122.
5. Taylor R.G, JS Lieberman. Rehabilitation of the Patient With Diseases Afecting the Motor Unit U: DeLisa JA ed. Rehabilitation medicine: Principles and Practice, Sec.Ed., J.B.Lippincott Company Philadelphia , 1993; 811- 820.
6. Kovač I. Rehabilitacija i fizikalna medicina bolesnika s neuromuskularnim bolestima. Izdavač: Savez društava distrofičara Hrvatske. Tisak EDOK Samobor, 2004.
7. Edwards S. Neurological Physiotherapy. A problem– solving approach. Second edition. Churchill Livingstone. Edinburg. Harcourt Publishers Limited , 2002.

8. Katalinic OM, Harvey LA, Herbert RD, et al. Stretch for the treatment and prevention of contractures. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;9:CD007455.
9. Fowler WM Jr. Management of musculoskeletal complications in neuromuscular diseases: weakness and the role of exercises. *Phys Med Rehabil* 1988; 2: 489- 507.
10. DeLateur BJ, Giaconi RM. Effect on maximal strength of submaximal exercise Duchenne muscular dystrophy . *Am J Phys Med* 1979; 58: 26-36.
11. Drory VE, Goltsman E, Reznik JG, Mosek A, Korczyn AD. The value of muscle exercise in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 2001; 191:133-7.
12. Lewis M, Rushanan S. The role of physical therapy and occupational therapy in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurorehabil* 2007; 22: 451-61.
13. Bönnemann CG, Modi R, Noguchi S, et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet*. Nov 1995;11(3):266-73.
14. Rideau Y, Duport G, Delaubier A, Guillou C, Bach J, Bianchi C, Forst R, Nigro G, Politano L, Riccio E. Correction precoce des inegalites musculaires dans la myopathie- analyse internationale. U : Les maladies neuromusculaires. De la genetique a la readaptation ur. Pellisier J, Urtizberea J A. Masson Paris , 1996: 156-170.
15. Manzur AY, Hyde SA, Rodillo E, et al. A randomized controlled trial of early surgery in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1992; 2: 379-87.
16. Kovač Ida. Rehabilitacija djece s živčanomišićnim bolestima U: Nina Barišić i suradnici. *Pedijatrijska neurologija. Medicinska naklada- Zagreb, Biblioteka Sveučilišni udžbenici i priručnici*, Zagreb 2009; 933-943.

KIRURŠKO LIJEČENJE BOLESNIKA S POJASNOM MIŠIĆNOM DISTROFIJOM

Tomislav ĐAPIĆ

Klinika za ortopediju, KBC Zagreb i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Pojasne mišićne distrofije su heterogena skupina bolesti. Nasljeđuju se autosomno dominantno i autosomno recesivno. Fentotipska obilježja pojasnih mišićnih distrofija je vrlo slična proksimalnim spinalnim mišićnim atrofijama a pojavljuju se u oba spola od djetinjstva do mladosti. Manifestiraju se najprije u području zdjeličnog obruča a zatim ramenom. Pojačava se lumbalna lordoza uz inklinaciju zdjelice a zatim „krilaste lopatice“, navedena nestabilnost lopatica može onemogućavati antefleksiju i abdukciju ruku uz gegav hod sa trupom prema nazad i često vanjskom rotacijom donjih ekstremiteta, fleksijskom kontrakturom koljena uz ekvinus stopala, ponekad se razvija uz lordozu i spondilolisteza i skolioza. Osnova“ neuzročne“ terapije je kineziterapija kojom se usporava progresija kontraktura čiji je uzrok fibroza mišića i prilagodba u kinematičkom lancu. Ortoze za ekstremitete i kralježnicu su u pravilu neučinkovite. Uputreba noćnih ortoza koje usporavaju razvoj kontraktura je kontraverzna. Pri indiciranju kirurško ortopedskog liječenja treba imati na umu daje dio kontraktura prilagodba na slabost mišića u kinemastičkom lancu. Korekcija lumbalne lordoze spondilodezom može dovesti do prestanka hodanja, isto vrijedi i za operaciju skolioze. Pri rješavanju kontraktura i ekvinusa stopala treba što kraća imobilizacija. Izrazito nestabilne lopatice se mogu stabilizirati skapulotorakalnom artrodezom. Kod bolesnika koji su prestali hodati a razvijaju progresivnu neuromuskularnu skoliozu uz kosinu zdjelice koja ugrožava pluća indicirano je ukočenje kralježnice-spondilodeza u koju ponekad treba uključiti i zdjelicu u fuzionu masu. Navedeni zahvati spondilodeza i skapulotorakalna artrodeza nose povećanu mogućnost ozbiljnih komplikacija.

CURRENT CHALLENGES IN LIMB GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHIES

J.Andoni URTIZBEREA

Head, Summer School of Myology, Institut de Myologie
Hôpital de la Salpêtrière, 75651 PARIS Cedex-France
Praticien Hospitalier, MPR, Centre de Référence Neuromusculaire
GNMH, Hôpital Marin – APHP, 64700 HENDAYE – France

LGMD represent a heterogeneous group of inherited muscular dystrophies whose initial descriptions date back to the nineteenth century. They share in common a dystrophic histological pattern, raised serum CK levels, and an involvement of proximal muscles of both lower and upper limbs. **Autosomal recessive LGMDs** (LGMD 2A to 2O) are the most frequent ones (90 % of overall LGMD patients). **LGMD 2A** is caused by mutations in the calpain-3, an enzymatic protein whose precise function is not elucidated yet. Various clusters with founder effect have been reported including in Croatia. **LGMD 2B** is allelic to Miyoshi myopathy, a recessive form of distal myopathy, and is caused by mutations in the gene encoding dysferlin, a transmembrane protein playing a key-role in membrane-repair mechanisms. **LGMD 2C, 2D, 2E and 2F** are due to mutations in one of the four sarcoglycans (alpha-, beta-, gamma and delta- respectively). LGMD 2D is universal. LGMD 2C is particularly prevalent in the Mediterranean area and in the Gypsy community. LGMD 2E, originally discovered in the Amish community, is also ubiquitous. **LGMD 2G** (telethonin-deficiency) and **LGMD 2H** (TRIM32-deficiency) remain extremely rare despite repeated efforts to find out more families/cases. With the exception of **LGMD2J** (titin) and **LGMD 2L** (anoctamin-5), the most recently described forms of recessive LGMDs (**2K, 2M, 2N, 2O**) are caused by genes already involved in various subtypes of congenital muscular dystrophies (alphadystroglycanopathies, notably).

Autosomal dominant forms of LGMD are much rarer. Among them, **LGMD 1B** is due to mutations in the lamin A/C gene and overlaps with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and many other allelic disorders (the so-called laminopathies). **LGMD 1C** is related to a defective gene encoding caveolin-3, a membrane protein, and is increasingly involved in dominant LGMDs. **LGMD 1A** turned out to be allelic to another set of myofibrillar myopathies namely

the myotilinopathies. More recently, **LGMD 1D** and **LGMD 1E** were elucidated as desminopathy on the one hand and a DNJB6 deficiency on the other hand.

Searching for mutations in these numerous genes remains challenging. The clinical assessment and pathological findings often provide clues to target the genetic studies. However and despite these advances, a significant number of LGMD cases remain unclassified. A whole genome sequencing approach would be particularly appropriate in this group of conditions.

KLINIČKA SLIKA I GENETIKA NAJČEŠĆIH LGMD U HRVATSKOJ

CLINICAL, GENETIC AND EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF PREVALENT AUTOSOMAL RECESSIVE LIMB GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHIES (LGMD2) IN CROATIA

Nina CANKI-KLAIN

Hrvatski institut za istraživanje mozga i Katedra za medicinsku biologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies (LGMD2) form a group of muscle diseases presenting great clinical and genetic heterogeneity making an etiologic diagnosis very difficult and clinically in majority of patients impossible. Here we report results concerning LGMD2 obtained during 10-years long prospective study on clinical, genetic and epidemiological aspects of muscular dystrophies (MDs) in Croatia. Specific diagnostic strategy was used to speed genetic study up. Emphasis was on: 1. Clinical assessment with CK, EMG; muscle CT or IRM and ECG; 2. Genealogical study with intensive search for secondary cases discovered through a detailed and systematic examination of parents, children and/ or sibs, when necessary; Search for consanguinity; Geographical origine of parents. From the very beginning selection of families with at least two patients; 3. Indirect or direct molecular analysis. The study showed that calpainopathy (LGMD2A) was the prevalent LGMD2. Analysis of 36 apparently unrelated families with 52 patients discovered eight different *CAPN3* mutations: 550delA, R541W, P82L, delFWSAL, R49H, Y537X, 2242C>T and 1696G>A including 95% of *CAPN3* chromosomes in the studied population. 550delA was the most frequent mutation found on 53/72 (73, 3%) chromosomes. Other seven mutations ranged from 8, 3% to 1, and 3%. In 33 of 36 families, two *CAPN3* alleles were identified. In remaining 3 families with only one known *CAPN3* allele, 550delA was present in 2 of 6, and P82L in one of alleles. The second, most common LGMD2 seems to be type 2I caused by mutation in *FKRP*. Direct analysis of only one mutation (C826A) allowed us to identify six unrelated families. One of six homozygous C826A probands was in addition heterozygote for 550delA. Dysferlinopathy was found in three patients from two unrelated, informative families. Diagnosis was based on clinical features (LGMD2B / MM), haplotype analysis and non-invasive monocyte Western blotting. Molecular analysis finally confirmed diagnosis discovering two novel *DYSF* mutations. Surprisingly, we haven't identified any sarcoglycanopathy, probably because of sampling bias (small number of children) and limited methodology (lack of muscle biopsy and WB of different proteins). Because of high frequency of healthy 550delA heterozygotes (1 in 133) and C826A heterozygotes (1 in 404) in our general

population, we need to know both allele to confirm the diagnosis of LGMD type 2A and 2I. In conclusion knowledge of the mutation spectrum occurring in the *CAPN3* should help in the design of efficient mutation-screening strategies for calpainopathies in our country. Concerning study of natural history of any LGMD2, both alleles should be known. Moreover, the follow up of genetically homogenous patients' groups using well defined, but as simple as possible protocols would be advisable.

Keywords: LGMD2, clinical characteristics, genetics, epidemiology, Croatia

Supported in part by Ministry of Science and Technology Republic of Croatia research grand 108-0000000-3435

Invited presentation at THE 9th BALKAN CONGRESS OF MEDICAL GENETICS, 15-17 September 2011, Timisoara, ROMANIA

MOLEKULARNA OSNOVA I MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA LGMD

Astrid MILIĆ

Galapagos istraživački centar, Zagreb

Pojasne mišićne distrofije (*engl.* limb girdle muscular dystrophies, LGMD) predstavljaju klinički i genetički heterogenu skupinu neuromuskularnih oboljenja. Međusobno se razlikuju po načinu nasljeđivanja, težini bolesti, dobi početka bolesti, te grupama mišića koje su primarno zahvaćene distrofičnim procesom.

Pojasne mišićne distrofije se, prema načinu nasljeđivanja, dijele na dvije velike skupine, pri čemu se distrofije tipa 1 nasljeđuju autosomno dominantno, a one koje ubrajamo u tip 2 autosomno recesivno. Trenutno je u literaturi opisano 8 podtipova dominantnih, odnosno 16 podtipova autosomno recesivnih pojasnih mišićnih distrofija.

U daljnjem će tekstu u više detalja biti opisana molekularna osnova i dijagnostika tri podtipa recesivnih pojasnih mišićnih distrofija: LGMD2A, LGMD2B i LGMD2I.

Pojasna mišićna distrofija tip 2A (LGMD2A)

Molekularna osnova

Mutacije u CAPN3 genu (OMIM#114240) uzrok su nastanka pojasne mišićne distrofije tip 2A ili kalpainopatije. Spomenuti gen kodira kalpain3, mišićno specifični protein iz obitelji kalpaina.

LGMD2A smatra se najčešćim oblikom autosomno recesivnih pojasnih mišićnih distrofija, pri čemu učestalost varira od 10-50% u određenim regijama/populacijama (Fanin i sur., 2003).

CAPN3 gen smješten je na dugom kraku kromosoma 15 u području 15q15.1-q21.1. Veličine je 45 kb i sadrži 24 kodirajuće jedinice (Richard i sur., 1995).

CAPN3 gen sadrži i tri specifična slijeda, NS, IS1 i IS2. Oni odgovaraju istoimenim specifičnim slijedovima u kalpainu 3, po kojima ga razlikujemo od ostalih članova kalpainske obitelji proteina. Sva tri slijeda omeđena su intronima, a unutar jednog (IS2) nalazi

se kratki slijed koji prepisan u odgovarajući peptidni slijed omogućava ulazak kalpaina 3 u jezgru.

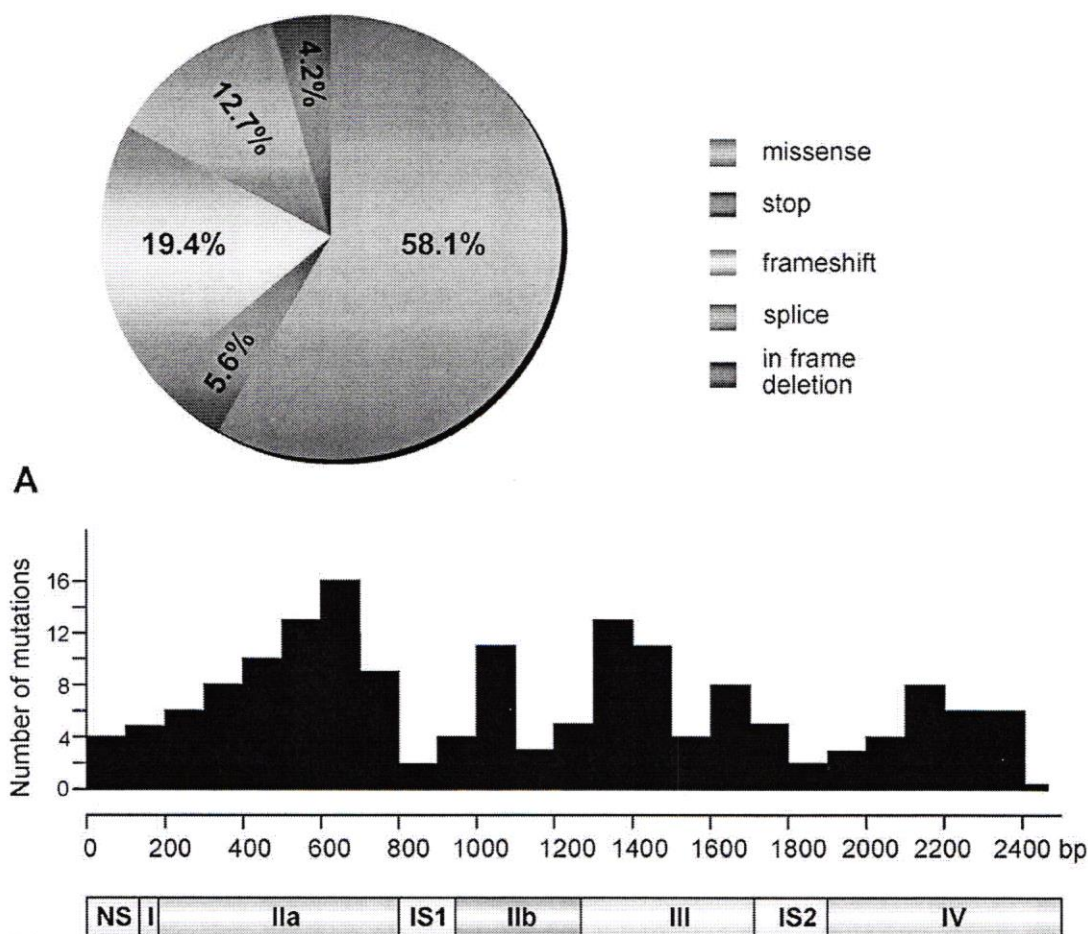
Trenutno je opisano oko 300 različitih CAPN3 mutacija u bolesnika iz različitih geografskih područja. Kao što je prikazano na slici 1., identificirane su gotovo sve vrste mutacija, od čega većina (>50%) otpada na točkaste mutacije. Mutacije su raspoređene uzduž cijelog gena i općenito je prihvaćeno da ne postoje mjesta na kojima se mutacije učestalije pojavljuju (tzv. "hot spot"). Međutim, Kramerova i sur. (2007) su drugačijim prikazom mutacija (slika 1) ukazali da ipak postoje mjesta u kojima se mutacije češće pojavljuju. To su mjesta koja odgovaraju područjima domena IIa, IIb i III. Za razliku od toga specifični slijedovi NS, a pogotovo IS1 i IS2 su mjesta sa manje identificiranih mutacija (tzv. "cold spot").

Ako se izuzmu izolirane populacije u kojima je učestalost pojedinih mutacija veća, generalno se može reći da CAPN3 mutacije ne pokazuju veću učestalost pojavljivanja u različitim populacijama, te je spektar mutacija u svakoj od njih drugačiji što predstavlja svojevrsni dijagnostički izazov. Ipak, pregledom baze podataka CAPN3 mutacija uočljivo je da dvije mutacije pokazuju veću učestalost: 550delA i 2362_2363delinsTCATCT.

Za nas je posebno zanimljiva prva mutacija, a zbog činjenice da je riječ o najčešćoj mutaciji u LGMD2A obitelji iz Hrvatske (Canki-Klain i sur., 2004). Ista je mutacija opisana kao najčešća u još nekoliko, većinom slavenskih populacija (Fanin i sur., 2005; Chrobakova i sur. 2004; Pogoda i sur., 2000; Todorova i sur., 2003; Meznaric i sur., 2002). Osim spomenute najčešće mutacije, u hrvatskih LGMD2A obitelji otkriveno je još 5 mutacija: R541W, P82L, delFWSAL, R49H, Y537X. Dok se 550delA javlja sa učestlošću od 74%, preostalih je 5 mutacija zastupljeno sa svega 2-9%. Ukupno svih 6 mutacija obuhvaća 95% CAPN3 kromosoma (Milic i Canki-Klain, 2005).

CAPN3 gen kodira kalpain3, proteolitički enzim koji se ubraja u proteinsku obitelj kalpaina. Za razliku od najopisanijih kalpaina 1 i 2 koji su ubikvitarni, glavno je obilježje kalpaina3 da je riječ o mišićno specifičnom članu kalpainke obitelji proteina.

Točna uloga kalpaina3 u stanici nije poznata, no činjenica da spomenuti enzim ima širok spektar substrata govori u prilog da je kalpain3 uključen u niz različitih i važnih fizioloških procesa. Neki od tih procesa su apoptoza, diferencijacija mišićnih stanica, stvaranje sarkomere, regulacija citoskeletona, itd (Baghdiguian i sur., 1999; Taveau i sur., 2003.; Kramerova i sur., 2005).



Slika 1. Raspodjela CAPN3 mutacija u genu/proteinu (preuzeto iz Kramerova i sur., 2007)

Molekularna dijagnostika

Za bolje usmjeravanje diferencijalne dijagnostike kalpainopatija, indirektna genska analiza (tj. analiza genske povezanosti), kao i proteinska analiza mogu biti korisni pristupi. No, valja napomenuti da indirektna analiza ne govori o kakvoj se mutaciji radi i gdje je ona smještena, te podrazumjeva istovremenu analizu više članova obitelji uz dobro odabrane (intra)genske markere. Metodološki, indirektna genska analiza uključuje lančanu reakciju polimeraze za svaki od minimalno 3-5 markera, potom razdvajanje PCR produkata elektroforezom u poliakrilamidnom gelu, te na kraju vizualizaciju DNA fragmenata najčešće bojanjem gela srebrom.

Protienska analiza kalpaina3 iz mišićnog tkiva je moguća i relativno često korišten dijagnostički pristup, no nije uvijek pouzdana jer su opisani slučajevi sekundarnog smajnjnja izraženosti kalpaina3, a koji se javljaju u nekih drugih podtipova pojasnih mišićnih distrofija,

poput LGMD2J, koji nastaje uslijed mutacija u genu za titin koji ulazi u interakcije sa kalpainom3.

Direktna genska analiza je zbog veličine gena dugotrajan i složen proces identifikacije novih mutacija. Podrazumjeva umnažanje cijelog CAPN3 gena (u nekoliko lančanih reakcija polimerazom), a potom detaljno sekvencioniranje dobivenih produkata. No kada je spektar mutacija unutar neke populacije poznat, kao što je slučaj u našoj populaciji, onda se vrlo brzo korištenjem jednostavnih DNA tehnika poput PCR-a, RFLP-a može analizirati svaki novi DNA uzorak i potvrditi klinički postavljena dijagnoza.

Pojasna mišićna distrofija tip 2B (LGMD2B)

Molekularna osnova

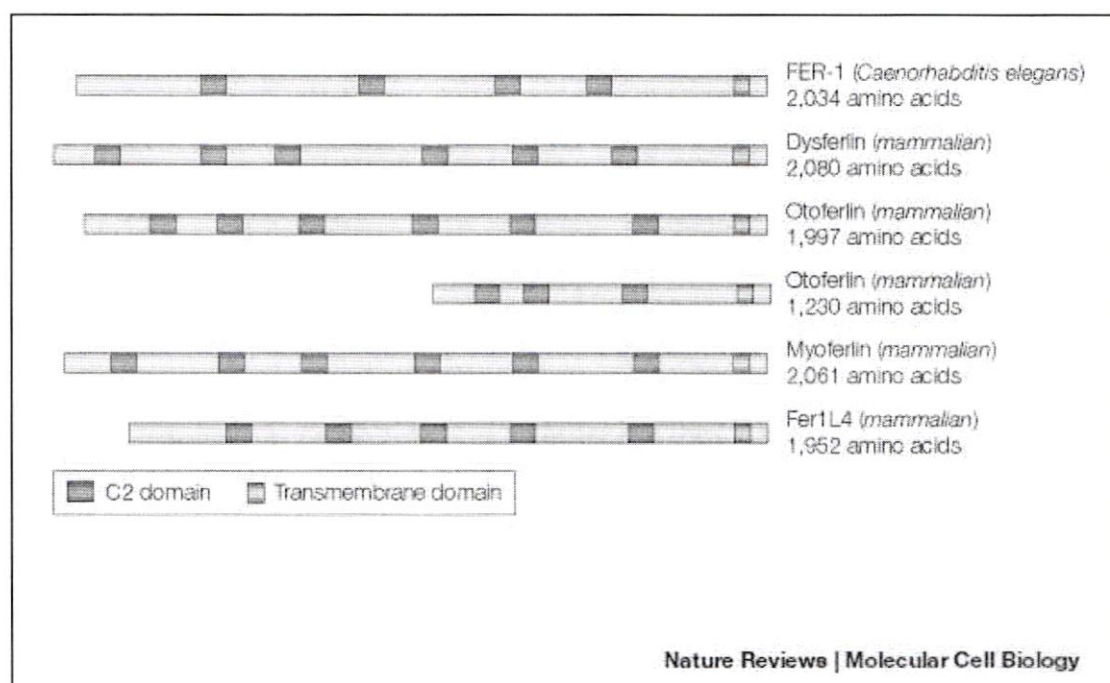
Pojasna mišićna distrofija tip 2B (LGMD2B) uzrokovana je mutacijama u DYSF genu (OMIM#603009) koji kodira protein disferlin (Bashir i sur., 1998). Stoga ovaj podtip LGMD ubrajamo i u tzv. disferlinopatije. Riječ je o skupini autosomno recesivnih mišićnih distrofija u koje uz LGMD2B ubrajamo i Miyoshi miopatiju (Liu i sur., 1998), a koje karakterizira degeneracija i slabost proksimalnih i/ili distalnih mišića ekstremiteta što je posljedica djelomične ili potpune odsutnosti disferlina (Bushby, 1999).

DYSF gen smješten je na kraćem kraku kromosoma 2 u području 2p13, a obuhvaća područje od oko 150kb raspodjeljeno na 55 kodirajuće regije, odnosno egzone.

Trenutno je opisano više od 300 varijanti DNA slijeda u DYSF genu koje uključuju i mutacije kao i nepatogene polimorfizme. Većinom je riječ o točkastim mutacijama, tj. promjenama slijeda jednog nukleotida, odnosno malim insercijama/delecijama (Leiden Muscular Dystrophy pages database: www.dmd.nl). DYSF mutacije raspoređene su uzduž cijele dužine gena i uglavnom je riječ o tzv. "privatnim" mutacijama koje se ne pojavljuju većom učestalošću unutar neke populacije (Liu i sur., 1998 ; Aoki i sur., 2001).

DYSF gen kodira disferlin, transmembranski protein koji se ubraja u ferline, tj. proteinsku obitelj čiji naziv potječe od fer-1 faktora spermatogeneze u *C.elegans*, a s kojim humani ferlini, pa tako i disferlin, dijele određeni stupanj homologije. Disferlin je dominantno izražen u skeletnom i srčanom mišiću, u kojima je lokaliziran na plazma membrani mišićnih vlakana. Uz to, disferlin nalazimo i u krvi, točnije monocitima, mozgu, plućima i placenti (Bashir i sur, 1998; Liu i sur., 1998; Anderson LV i sur., 1999; Vandre i sur., 2007). Glavna strukturna

karakteristika ferlina je posjedovanje transmembranske domene kao i nekoliko C2 domena (od 4 do 7, pri čemu disferlin ima 7) koje su uključene u različite biološke procese (slika 2; Lek i sur., 2010). Iako još uvijek nije razjašnjena uloga disferlina u stanici niti kako njegov djelomični ili potpuni nedostatak dovodi do distrofičnog procesa, najnoviji podaci iz literature ukazuju da bi disferlin imao ulogu u procesu popravka mišićnih vlakana, kao i u procesu diferencijacije mioblasta, T-tubulogenezi, fagocitozi monocita, odnosno mišićnoj regeneraciji (Bansal i sur., 2003 & 2004; Han i sur., 2007; De Luna i sur., 2006; Klinge i sur., 2007; Nagaraju i sur., 2008; Chiu i sur., 2009).



Slika 2. Strukturne karakteristike disferlina i ostalih proteina iz obitelji ferlina (preuzeto iz McNeil P and Kirchhausen T, 2005)

Molekularna dijagnostika

S obzirom na prije navedene karakteristike DYSF gena i proteina, postoji nekoliko pristupa u molekularnoj dijagnostici LGMD2B. Iako direktna genska analiza predstavlja jedinu točnu i definitivnu dijagnozu LGMD2B, pretraživanje cijelog gena za uzročnim mutacijama vrlo je skupo, predugo i u potpunosti nepraktično za rutinske dijagnostičke laboratorije. S druge strane indirektna genska analiza, tj. analiza genske povezanosti ne daje uvid o tome kakva je mutacija prisutna unutar neke obitelji, ali može dati dobre smjernice za daljnje dijagnostičke postupke. Nadalje, proteinska se analiza u slučaju LGMD2B pokazala pouzdanom tehnikom

za diferencijalnu dijagnozu, a ponajprije zbog izraženosti disferlina u monocitima i činjenice da za analizu nije nužno potrebno raditi bolnu i pacijentima neugodnu biopsiju mišića.

Na temelju svih navedenih činjenica, kao i višegodišnjeg iskustva sa hrvatskim LGMD2B obiteljima razvijena je specifična dijagnostička strategija koja uključuje analizu genske povezanosti, koju u slučaju dobivene povezanosti nadalje slijedi proteinska analiza u monocitima dobivenim iz uzorka pune krvi. Na kraju, u slučaju pozitivnog rezultata proteinske analize, detaljno se analizira DYSF gen u cilju identifikacije uzročnih mutacija (Milić i sur, 2011).

U prethodnom odjeljku teksta ukratko je navedeno što indirektna, odnosno direktna genska analiza podrazumijevaju u metodološkom smislu, dok je više detalja dostupno u tekstu seminara.

Postupak proteinske analize disferlina iz pune krvi uključuje nekoliko koraka:

- izolaciju monocita iz pune krvi
- lizu monocita
- razdvajanje proteina lizata monocita SDS-PAGE tehnikom elektroforeze
- prijenos razdvojenih proteina na membranu (*engl.* western blotting)
- identifikacija disferlina korištenjem specifičnih primarnih protutijela

Svi navedeni koraci u više su detalja opisani u tekstu vježbi.

Pojasna mišićna distrofija tip 2I (LGMD2I)

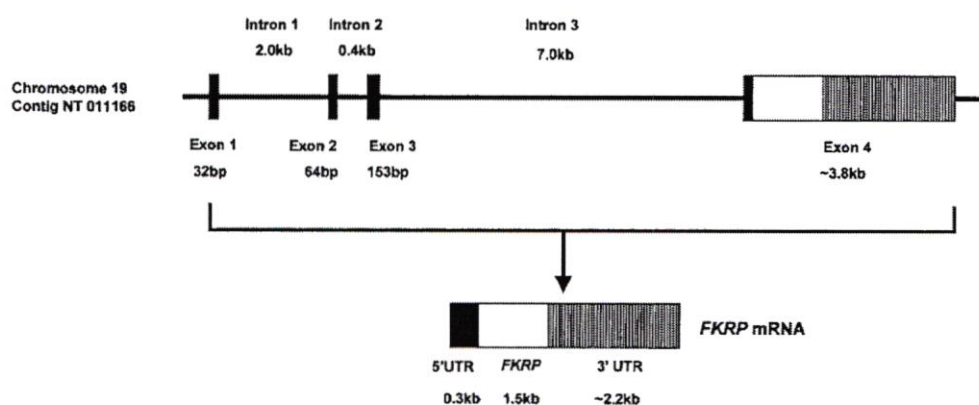
Molekularna osnova

Pojasna mišićna distrofija tip 2I (LGMD2I) jedna je od 16 autosomno recesivnih pojasnih mišićnih distrofija, ali je i jedna od nekoliko bolesti koje se ubrajaju u grupu tzv. distroglikanopatija, tj. bolesti koje nastaju kao posljedica onemogućene glikozilacije α -distroglikana (α -DG) (Muntoni i sur., 2008). LGMD2I se u literaturi može pronaći i pod nazivom/kraticom MDDGC5 (*engl.* muscular dystrophy-dysglycanopathy, limb girdle, type C5; OMIM #607155).

Pojasna mišićna distrofija tip 2I nastaje kao posljedica mutacija u FKRP genu koji kodira istoimeni FKRP protein, tj. fukutinu srodni protein (*engl.* fukutin related protein; OMIM #606596) (Brockington i sur., 2001a). Uz LGMD2I, mutacije u FKRP genu uzrok su i kongenitalne mišićne distrofije tip 1C s ili bez mentalne retardacije (MDC1C,

OMIM#606612; *engl.* muscular dystrophy-dystroglycanopathy, limb girdle, type B5, MDDGB5) (Brockington i sur., 2001b), odnosno kongenitalne mišićne distrofije koja uključuje abnormalnosti očiju i mozga (*engl.* muscular dystrophy-dystroglycanopathy, congenital with brain and eye anomalies, type A5, MDDGA5, OMIM#613153) koja uključuje Walker-Warburg sindrom-tešku kongenitalnu formu sa abnormalnostima mozga i očiju, kao i nešto lakšu formu koja se u literaturi može naći i pod nazivom muscle-eye-brain bolest (Brockington i sur., 2001b).

FKRP gen smješten je na kromosomu 19 (19q13.3) i veličine je 12 kb. Sadrži 4 egzona, no samo je posljednji, egzon 4, kodirajuća regija čije prepisivanje rezultira istoimenim, FKRP, proteinom (slika 3; Brockington i sur., 2001a).



Slika 3. Organizacija FKRP gena (preuzeto iz Brockington i sur., 2001a)

Trenutno je okarakterizirano više od 70 različitih FKRP mutacija. Među njima, 826C>A (Leu276Ile) predstavlja najčešću mutaciju u više različitih populacija, posebice onih iz zapadne i sjeverne Europe. Spomenutu mutaciju prvi je opisao Brockington i sur. (2001a) i to na uzorku od 17 obitelji u kojih je spomenuta mutacija nađena u oboljelih iz 15 obitelji. Mutacija c.826C>A potom je opisana u populaciji Njemačke gdje je identificirano 20 LGMD2I bolesnika iz 19 nesrodnih LGMD2I obitelji pri čemu su svi oboljeli bili ili homozigoti ili složeni heterozigoti za c.826C>A mutaciju (Walter i sur., 2004). U Italiji je opisano 20 oboljelih iz 13 različitih obitelji. Mutacija 826C>A je i u ovoj populaciji dosta česta i čini 35% mutiranih kromosoma (Boito i sur., 2005). Sveen i sur. (2006) objavili su da LGMD2I čini 38% danskih LGMD slučajeva, od čega su svih 38 danskih LGMD2I pacijenata bili ili homozigoti ili složeni heterozigoti za c.826C>A mutaciju. Nedavno su objavljeni i rezultati istraživanja u Norveškoj gdje je identificirano 88 oboljelih iz 69 obitelji. Pronađeno

je 7 različitih FKRP mutacija, pri čemu c.826C>A u homozigotnom obliku u 77 oboljelih (Strenslund i sur., 2011). Osim u Europi, c.826C>A opisana je i u Brazilu gdje je identificirano 13 LGMD2I obitelji (10% svih LGMD2 obitelji u Brazilu). Mutacija c.826C>A pronađena je u 30% mutiranih LGMD2I alela (de Paula i sur, 2003). Isto tako, Frosk i sur. (2005) pronašli su da je LGMD2I drugi tip LGMD po učestalosti u Huterita-sjevernoameričkoj populaciji europskog porijekla, gdje je upravo homozigotnost c.826C>A uzrok nastanka ove distrofije. Ovdje je važno i zanimljivo spomenuti da preliminarni rezultati istraživanja prvih LGMD2I obitelji iz Hrvatske upućuju da je c.826C>A najčešća mutacija i u našoj populaciji.

FKRP protein veličine je 495 aminokiselina i predominantno je izražen u skeletnim mišićima, placenti i srcu dok je u ostalim tkivima izraženost vrlo slaba. Fukutinu srodni protein je, poput fukutina, transmembranski protein koji sadrži i neke dodatne motive poput DxD motiva koji sugeriraju da je FKRP glikozil transferaza. Iako je riječ o pretpostavci, smatra se da FKRP doista tako i djeluje u stanici, a tome u prilog ide saznanje da i kongenitalne forme mišićnih distrofija i LGMD2I karakterizira sekundarno smanjenje glikozilacije alfa-distroglikana (Hewitt, 2009).

Molekularna dijagnostika LGMD2I

S obzirom na činjenicu da je FKRP gen relativno mali, identifikacija novih mutacija nije previše zahtjevnja, te je riječ o relativno brzom i kratkom postupku. Direktna genska analiza podrazumijeva, nakon izolacije DNA, umnažanje egzona 4 lančanom reakcijom polimeraze čiji se produkt potom podrgava sekvencioniranju i identifikaciji novih mutacija. Kao i u slučaju LGMD2A, poznavanje mutacija u određenoj populaciji omogućava razvijanje brzih dijagnostičkih testova za njihovo otkrivanje u novih pacijenata i obitelji.

Prethodnica direktnoj genskoj analizi može biti analiza genske povezanosti (*engl.* linkage analiza), koja može dati korisne smjernice za nastavak dijagnostičkog procesa direktnom genskom analizom.

LITERATURA:

1. Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet*, 1999, 8:855-861

2. Aoki M, Liu J, Richard I, Bashir R, Britton S, Keers SM et al. Genomic organization of dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology*, 2001, 57:271-278
3. Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N et al. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B/NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med*, 1999, 5:503-511
4. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy, *Nature*, 2003, 423:168-172
5. Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol*, 2004, 14:206-213
6. Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet*, 1998, 20:37-42
7. Boito CA, Melacini P, Vianello A, Prandini P, Gavassini BF, Bagattin A et al. Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch Neurol*, 2005, 62:1894-99
8. Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA et al. Mutations in fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet*, 2001a, 10:2851-2859
9. Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA et al. Mutations in fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin α 2 deficiency and abnormal glycosylation of α -dystroglycan. *Am J Hum Genet*, 2001b, 69:1198-1209
10. Bushby KM. Making sense of limb girdle muscular dystrophies. *Brain*, 1999, 122:1403-1420
11. Canki-Klain N, Milić A, Kovač B et al. Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Am J Med Genet*, 2004, 125A: 152-156.
12. Chiu YH, Hornsey MA, Klinge L, Jørgensen LH, Laval SH, Charlton R et al. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, 2009, 18:1976-1989

13. Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, Vondracek P, Marikova T, Mazanec R, et al. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord*, 2004, 14:659-665
14. De Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, de la Torre C, Rojas-García R et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation «in vitro». *J Biol Chem*, 2006, 281:17092-17098
15. De Paula F, Vieira N, Starling A, Yamamoto LU, Lima B, De Cassia Pavanello R et al. Asymptomatic carriers for homozygous novel mutations in the FKRP gene: the other ebd of the spectrum. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11:923-30
16. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Angelini C. The frequency of limb girdle muscular dystrophy 2A in northeastern Italy. *Neuromuscul Disord*, 2005, 15:218-224
17. Frosk P, Greenberg CR, Tennese AA, Lamont R, Nylen E, Hirst C et al. The Most Common Mutation in FKRP Causing Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2I (LGMD2I) May Have Occured Only Once and Is Present in Hutterites and Other Populations. *Human Mutation*, 2005, 25:38-44
18. Han R, Campbell KP. Dysferlin and muscle membrane repair. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19:409-416
19. Hewitt JE. Abnormal glycosylation of dystroglycan in human genetic disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1792:853-861
20. Klinge L, Laval S, Keers S, Haldane F, Straub V, Barresi R et al. From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB J*, 2007, 21:1768-1776
21. Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G, Spencer MJ. Calpain 3 participates in muscle remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet*, 2005, 14:2125-2134
22. Kramerova I, Beckmann JS, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A). *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1772:128-144
23. Lek A, Lek M, North KN, Cooper ST. Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10:231-247
24. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1998, 20:31-36

25. McNeil P and Kirchhausen T. An emergency response team for membrane repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6:499-505
26. Meznaric-Petrusa MM, Zidar J, Zupancic N, Fanin M, Angelini C, Piluso G, et al. Clinical, molecular and genetic features of calpainopathy in Slovenia. *Neuromuscul Disord*, 2002, 12:731
27. Milić A, Canki-Klain N. Calpainopathy (LGMD2A) in Croatia: molecular and haplotype analysis. *Croat Med J*, 2005, 46: 657-663
28. Milic A, Malnar M, Canki-Klain N. Non-invasive protein analysis in first dysferlinopathy Croatian families. *Trans Neurosci*, 2011, 2:241-245
29. Muntoni F, Torelli S, Brockington M. Muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Neurotherapeutics*, 2008, 5:627-632
30. Nagaraju K, Rawat R, Veszelszky E, Thapliyal R, Kesari A, Sparks S et al. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol*, 2008, 172:774-785
31. OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
32. Pogoda TV, Krakhmaleva IN, Lipatova NA, Shakhovskaya NI, Shishkin SS, Limborska SA. High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD2 patients from Russia. *Hum Mutat*, 2000, 15:295
33. Richard I, Broux O, Allamand V, Fougere F, Chiannikulchai N, Bourg N et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, 1995, 81:27-40
34. Stensland E, Lindal S, Jonsrud C, Torbergesen T, Bindoff LA, Rasmussen M. Prevalence, mutation spectrum and phenotypic variability in Norwegian patients with limb girdle muscular dystrophy 2I. *Neuromusc Disord*, 2011, 21:41-46
35. Sveen ML, Schwartz M, Vissing J. High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb-girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol*, 2006, 59:808-15
36. Taveau M, Bourg N, Sillon G, Roudaut C, Bartoli M, Richard I. Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol*, 2003, 23:9127-9135
37. Todorova A, Georgieva B, Tournev I, Kremensky I. LGMD 2A in Bulgarian patients- mutations and polymorphisms in CAPN3 gene. *Eur J Hum Genet*,+. 2003, 11 Suppl 1:206,P669

38. Vandre DD, Ackerman WE, Kniss DA, Tewari AK, Mori M, Takizawa T. Dysferlin in expressed in human placenta but does not associate with caveolin. Biol Reprod, 2007, 77:533-542
39. Walter MC, Petersen JA, Stucka R, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M et al. FKRP (826C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. J Med Gen, 2004, 41:e50

PATIENTS' PRESENTATIONS WITH DISCUSSION

Progresivna udno- pojasna slabost u ekstremitetima: velika poteškoća za bolesnika , odgovornost i izazov za liječnika

Biserka Kovač

Odjel za neurologiju , OŽB Vukovar

Bolesnikova spoznaja o nemogućnosti izvođenja svakodnevnih rutinskih aktivnosti zbog progresivnog razvoja slabosti u mišićima nogu i rukuga dovodi liječniku od kojeg očekuje razumijevanje, tumačenje razloga njegovih smetnji, prognozu i informaciju o mogućnosti izlječenja. Sve se to događa već kod prvog pregleda. Liječnikov prvi korak je odvajanje dovoljno vremena za razgovor i pregled bolesnika s ciljem uspostavljanja odnosa povjerenja. Svjestan je da će stečeno povjerenje održati ukoliko upotrijebi sveraspoložive i suvremene tehnike u pregledu, dijagnostici i praćenju takvih bolesnika. Pri tome su od neprocjenjive koristi sva dosadašnja znanja i iskustva navedena u opisima takvih i sličnih bolesnika s hereditarnim bolestima mišića.

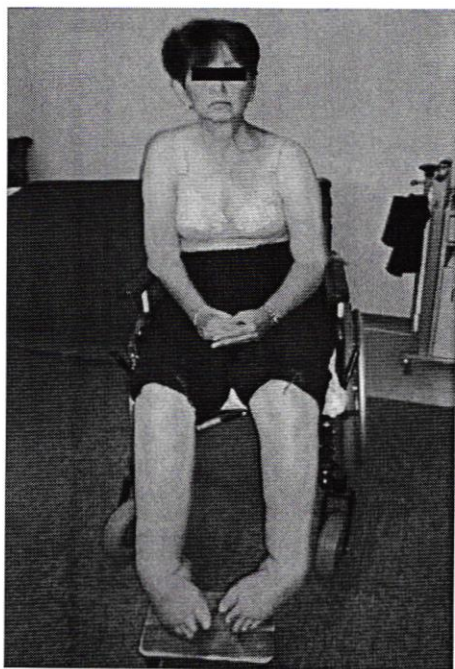
Konkretno, ukoliko postoji sumnja da se kod bolesnika radi o hereditarnoj udno pojasnoj mišićnoj distrofiji, liječnik započinje nejednostavan posao u postavljanju točne dijagnoze bolesti svjestan da se radi o kliničkim entitetima u kojih se početak, napredovanje, distribucija mišićne slabosti i gubitka mišićne mase mogu znatno razlikovati među pojedincima i genetskim podtipovima.

Upravo prikazom tri bolesnika s postupno napredujućom udno-pojasnom slabošću skeletne muskulature ekstremiteta želimo ukazati na varijabilnost izražaja kliničkih karakteristika bolesti, a nekima od prikazanih bolesnika omogućiti pravi put do postavljanja točne dijagnoze.

U Domu za stare i nemoćne osobe žive M.P. u dobi od 63 godine i F.M. u dobi od 72 godine. Obje boluju od progresivne mišićne distrofije udno-pojasnog tipa. M.P. je u Domu 26 godina, od mišićne distrofije boluje 50 godina, a F.M. je u Domu 19 godina, od mišićne distrofije boluje već gotovo 60 godina. One imaju značajne sličnosti u kliničkom izražaju bolesti i to prema nastanku simptoma bolesti, progresiji mišićnih slabosti, u obje postoji pojava bolesti u članova bliže obitelji. Detaljnim pregledom se ipak uočavaju razlike u distribuciji udno-

pojasnih mišićnih slabosti, izražajnosti mišićnih atrofija, koštanih deformiteta i stupnju pokretljivosti ekstremiteta i trupa.

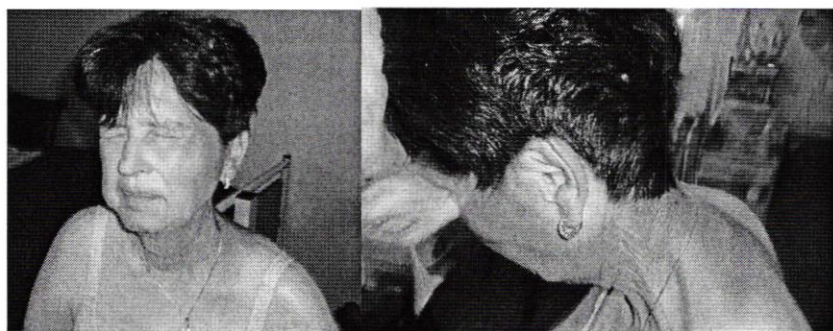
Bolesnica M.P. (rođena 1949. godine) je zamijetila svoje prve smetnje u trinaestoj godini života u vidu otežanog ustajanja iz čučnja do te mjere da se morala pomagati rukama. Istovremeno je kod trčanja osjećala jaku bol u preponi zbog čega je prestala trčati. Odveli su ju liječniku misleći da nešto s njezinom nogama nije u redu. Dijagnozu mišićne distrofije joj je postavio osječki ortoped dr Marojević kojega se tadašnji bolesnici rado sjećaju jer ih je u to vrijeme, kada se nije baš puno znalo o mišićnim distrofijama razuvjerio da nema potrebe podvrgavati se nepotrebnim operacijskim zahvatima, a niti kupovati razne skupe i neučinkovite lijekove objasnivši im prirodu njihove postupno napredujuće bolesti mišića. Osnovnu školu je završila boraveći u bolnicama i rehabilitacijskim ustanovama. Kroz nekoliko mjeseci liječila se lijekom pod nazivom „Stanoplex“ (anabolički androgeni steroid), ali nije bilo očekivanog povećanja mišićne mase i snage, nego naprotiv, bolest je postepeno napredovala. Dok je mogla samostalno hodati provodila je stacionarna rehabilitacijska liječenja, međutim u 27-oj godini je slabost mišića zdjeličnog pojasa i nogu toliko napredovala da više nije mogla samostalno hodati i od tada je u invalidskim kolicima (sl.1). Od tada ima i postepeno napredujuću slabost u rukama prvenstveno u ramenima.



Slika 1. Bolesnica s razvijenom kliničkom slikom udno-pojasne mišićne distrofije (kalpainopatija)

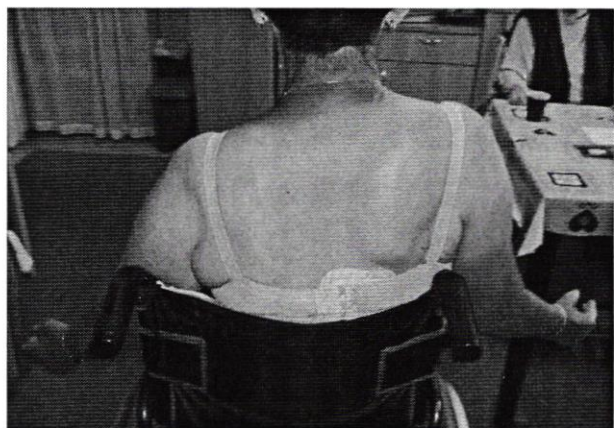
Bolesnica M.P. je od konca trećeg desetljeća svog života potpuno ovisna o tuđoj pomoći. U njezinoj obitelji postoji još jedna bolesnica koja ima udno pojasnu mišićnu distrofiju. Ona je unuka od majčine sestre gospođe M.P. Ima 54 godine, potpuno je nepokretna s tim da je u invalidskim kolicima od 28. godine. M.P. nema bolove u mišićima, ne žali se na smetnje disanja. Povremeno ima osjećaj lupanja srca, žali se na zamor kod dugotrajnog sjedenja i depresivno raspoloženje.

U kliničkom nalazu na mišićima lica nema vidljive slabosti niti hipotrofije voljne muskulature. Postoji blaža hipotrofija stražnje muskulature vrata, koja je moguće inaktivitetna kao posljedica višegodišnje neaktivnosti aksijalne muskulature trupa uz klinički jasnu slabost odizanja glave kod ustajanja iz ležećeg položaja. Vidljiv je i asimetričan položaj ramena vjerojatno usljed skoliotičkog položaja kralješnice mada je i cijela lijeva ruka nešto slabija od desne (slika2.).

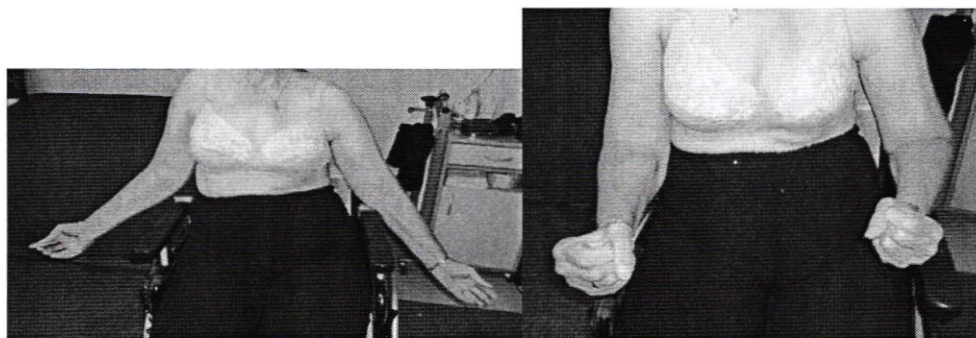


Slika 2. Mišići lica su dobre snage i tonusa dok postoji blaža hipotrofija stražnje skupine muskulature vrata

Izrazita je slabost muskulature ramenog pojasa uz hipotrofiju mišića, izražena je skapula alata, i uz vidljivu asimetriju (slika 3.), a opseg pokreta reduciran je i u podlakticama i šakama, dok je u ramenima i nadlakticama bez voljne pokretljivosti (sl. 4).

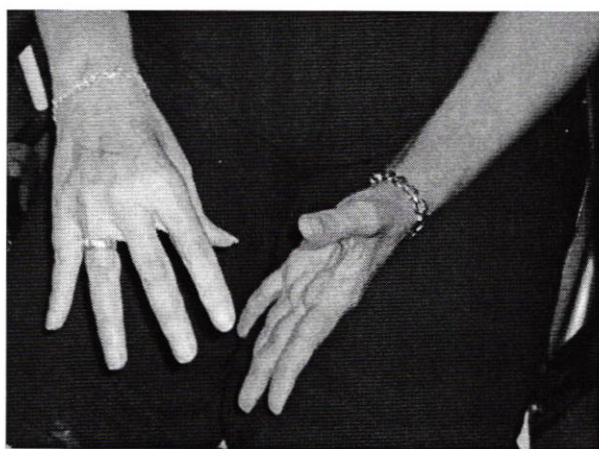


Slika 3. Scapulae alatae s asimetrijom netipičnom za kalpainopatiju (LMGD 2A)



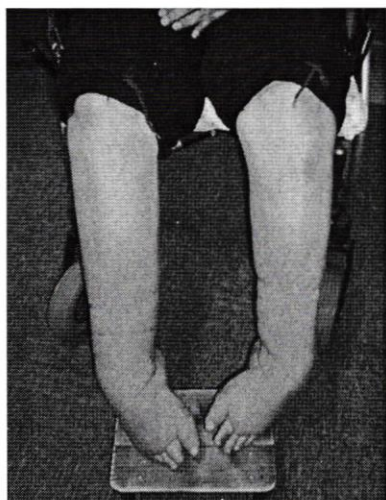
Slika 4. Pokretljivost u bolesnika s poodmaklom LMGD je oskudna i na podlakticama i šakama

Izražena je hipotrofija i podlaktica i malih mišića šaka (sl.5). Bolesnica se može služiti rukama kod jela, premda postoji oslabljen stisak šaka, te reducirana pokretljivost podlaktica.



Slika 5. U poodmaklom stadiju LGMD2A je izražena hipotrofija i distalne muskulature ruku

Donji ekstremiteti bolesnice M.P. su potpuno nepokretni, uslijed inaktivnosti i edematozmi, uz vrlo izražene kontraktуре osobito na stopalima (sl.6.) Na potkoljenicama je uz edem izražena ipseudohipertrofija mišića lista (sl.7.)



Slika 6. U bolesnika s LMGD na nogama su izražene kontraktуре



Slika 7. Pseudohipertrofija mišića lista u bolesnice s LMGD

Bolesnica M.P. ima u laboratorijskim nalazima potpuno uredne vrijednosti KKS, u biokemijskim parametrima registrirane su nešto povišene vrijednosti GGT/42/, dok je vrijednost CK (kreatinfosfokinaze) uredna /86/. 1999. godine nakon pregleda neurogenetičarke s velikim iskustvom iz područja hereditarnih miopatija, prof.N.Canki-Klainpostavljena je klinička dijagnoza udno pojasne mišićne distrofije tipa 2A. Bolesnica je potom testirana u inozemstvu (Francuska) na kalpainopatiju. Nalaz je pokazao pozitivan rezultat, bolesnica M.P je homozigot za mutaciju 551 del A u kalpain genu (CALP3). To je ujedno i najčešća mutacija u Hrvatskoj u bolesnika s LGMD 2A.

Bolesnica F.M. rođena 1940. god. u malom mjestu na hrvatskom otoku. Imala je dva brata N.M. (rođen 1935. god.) i I.M. (rođen 1937. god.) koji su također bolovali od udno pojasnog oblika progresivne mišićne distrofije. Oba su umrla od infarkta srca u 71. godini, a mišićna im je slabost udno pojasne distribucije započela u kasnijoj životnoj dobi. Stariji od braće, N.M. je bio po zanimanju tokar, radio administrativni posao. Imao je 15 godina radnog stažakada je zbog slabosti u nogama i rukama morao u invalidsku mirovinu. U dobi od 65 godina je morao koristiti invalidska kolica. Kod drugog brata I.M. bolest je nastupila u dobi od 30 godina, postepeno je napredovala tako da je bio nepokretan tek u dobi od 68 godina.

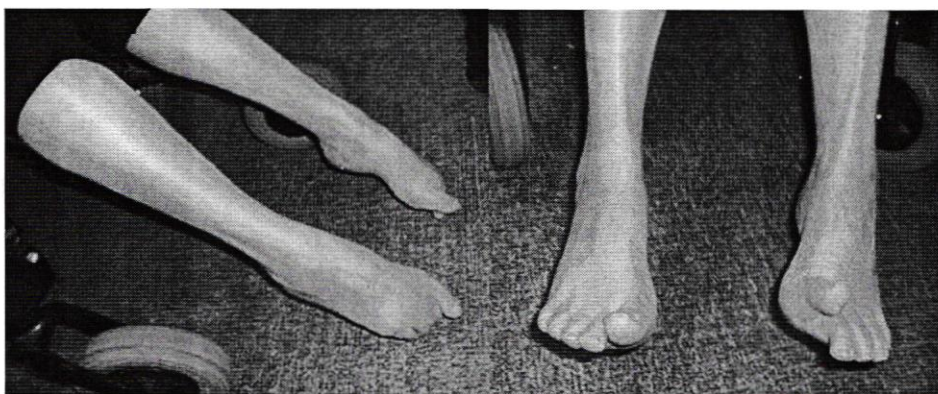
F.M. je zamijetila slabost u nogama još u dobi ranijeg djetinjstva (nakon treće godine života), u trinaestoj je slabost bila izrazitija, u 16. godini se zbog slabosti u nogama nije mogla popeti u tramvaj. Od 37. godine ne može samostalno hodati i koristi invalidska kolica, a od sredine trećeg desetljeća ima i slabost u rukama u području ramena i nadlaktica.

U neurološkom statusu kod bolesnice F.M. na gornjim ekstremitetima je izražena teška slabost mišića ramenog pojasa, nadlaktica, djelomice i slabost podlaktica (sl.8. i 9.).



Slike 8. i 9. Hipotrofija mišića ramenog pojasa, nadlaktica, slabost proksimalne muskulature ruku i izražene simetrične krilate skapule u bolesnice s udno-pojasnom mišićnom distrofijom

Bolesnica F.M. se u kolicima pokreće uz pomoć nogu, odizanjem stopala u manjoj mjeri i potkoljenica iako ima izraženu i manju kontrakturu Ahilovih tetiva. Muskulatura potkoljenica je hipotrofična bez izražene pseudohipertrofije mišića listova. Mišićno tetivni refleksi su na nogama odsutni, a na rukama su simetrično oslabljeni (sl.10. i sl.11.)



Slike 10. i 11. Hipotrofija malih mišića stopala i potkoljenica uz očuvanu pokretljivost distalne muskulature nogu te manje izraženu kontrakturu Ahilovih tetiva u bolesnice s LGMD

F.M. ima uredne laboratorijske nalaze kompletne krvne slike, te biokemijskih parametara. Vrijednost kreatinfosfokinaze je uredna (67- gornja granica 153). U elektromiografskom nalazu postoji miopatski uzorak u prorjeđenom uzorku akcijskih potencijala distalne muskulature ruku a na mišićima ramena i natkoljenice, uzorak od jednog polifazičnog akcijskog potencijala niske amplitude i ubrzane frekvencije izbijanja. Bolesnica je testirana samo na 551delA u mutaciju na kalpain genu, nalaz je bio negativan. Budući da način nasljeđivanja i klinička slika bolesnice govore za kalpainopatiju genetska analiza je nastavljena s do sada još nepotvrđenim rezultatom.

Bolesnica F.M. ima rano nastale simptome progresivne mišićne distrofije, koji su i sporije napredovali u usporedbi s prethodno opisanom bolesnicom. Kod F.M. LGMD ima nešto blaži klinički oblik koji joj omogućava osim manju pokretljivost i pokretanje u kolicima s nogama i služenje rukama u jednostavnijim aktivnostima (sl.12.)

Tegoba sa srcem nema kao niti poteškoća s disanjem.



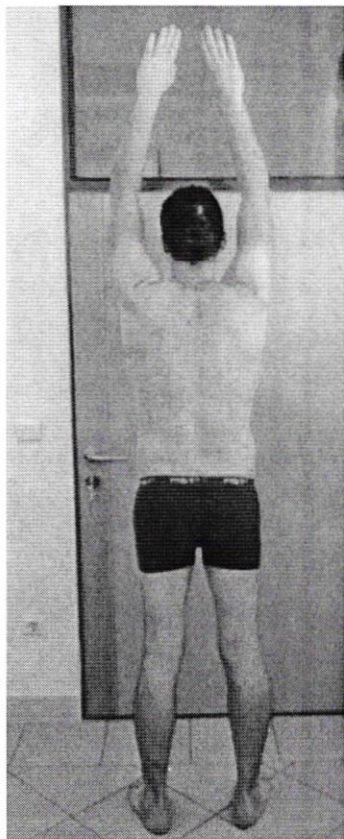
Sl. 12. Bolesnica s poodmaklim stupnjem LGMD ima očuvanu pokretljivost distalne muskulature ruku

Bolesnik M.U. je rođen 1981. godine, a upućen je neurologu u dobi od 18 godina kad su na rutinskom laboratorijskom pregledu kod novačenja za vojsku otkrivene povišene vrijednosti kreatinfosfokinaze (CPK- 3228) što je bilo 21 puta više no što je gornja granica normalne vrijednosti. Imao je povišene vrijednosti transaminaza AST 138, ALT 80, LDH 461, aldolaza 80,6 (ref. vrijednost do 3,1); u DKS je bila izražena blaža eozinofilija 8%. Bolesnik je tada bio bez ikakvih simptoma; nije imao povišenu tjelesnu temperaturu, nije imao slabost niti bolove u mišićima, znatnijih ograničenja pokretljivosti, elektromioneurografski nalaz je bio uredan.

Usljedile su pregledi uz kontrole laboratorijskih vrijednosti po infektologu i imunologu zbog sumnje na polimiozitis. Nalazile su se kontinuirano povišene vrijednosti CPK i do 6860, kao i povišene vrijednosti AST, ALT, LDH do 2 puta više od gornje granice normalnih vrijednosti. Opsežnom imunološkom i infektološkom obradom nije nađen infektivni niti imunološki čimbenik koji bi govorio u prilog polimiositisa. Tada je učinjena i UZV jetre, te obrada štitnjače koji su bili uredni. U dobi od 19 godina zamjećuje se blaža slabost proksimalne muskulature nogu, asimetričan položaj skapula, a ponovljeni elektromiografski nalaz uputi na miopatski uzorak upravo u ispitivanim mišićima natkoljenice i nadlaktice i oba ramena. Bolesnik se uputi u neurogenetsku ambulantu prof.dr.sc.N.Canki-Klain koja postavlja sumnju na udno pojasnu mišićnu distrofiju tipa 2B-disferlinopatiju. Tada je učinjen i CT mišića koji je uputio na selektivno zahvaćanje mišića proksimalnog dijela donjih ekstremiteta distrofičnim procesom: m. rectus femoralis i m. vastus medialis, te na djelomično zahvaćanje m. gastrocnemius uz poštedu mišića ramenog pojasa.

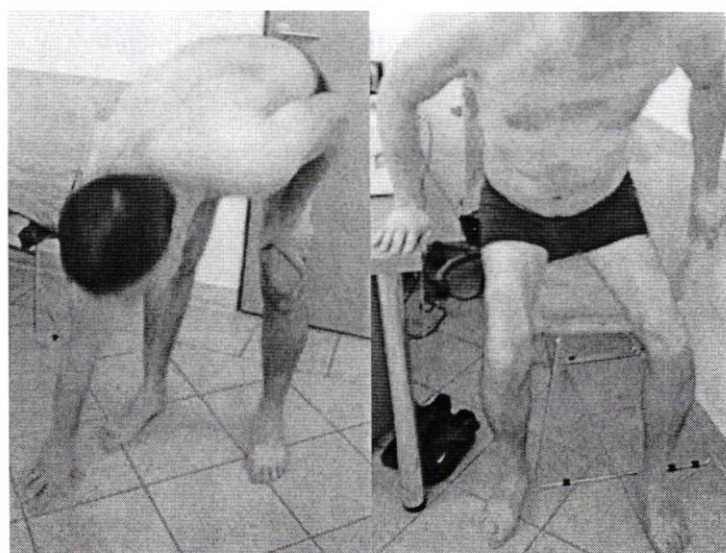
Prema heteroanamnestičkim podacima se saznaje da u obitelji bolesnika M.U. nije bilo sličnih bolesti, da se on u dobi od 6 godina znao tužiti na bol u mišićima natkoljenica kad je dolazio s kupanja. U dobi od 14 godina se nije mogao uspjeti na konopac, trčao sporije od svojih vršnjaka u dobi od 16 godina. U 21. godini je zamijetio pojačanu zamorljivost kod penjanja stepenicama, povremeno su mu „propadala koljena“. Vrijednosti kreatinfosfokinaze su se u daljnjem tijeku bolesti smanjivale, ali su još uvijek značajno povišene i do 6 puta, a porast ovisi o bolesnikovoj fizičkoj aktivnosti. Pregled srca; klinički, rentgenološki, elektrofiziološki i UZV je pokazao uredan nalaz kao i nalaz spirometrije.

Progresivna mišićna bolest u mladog bolesnika polagano napreduje tako da se sada u dobi od 31 godine žali na slabost u nogama, bolove u leđima kod dugotrajnog stajanja. Nema tegoba s rukama (sl.13.).



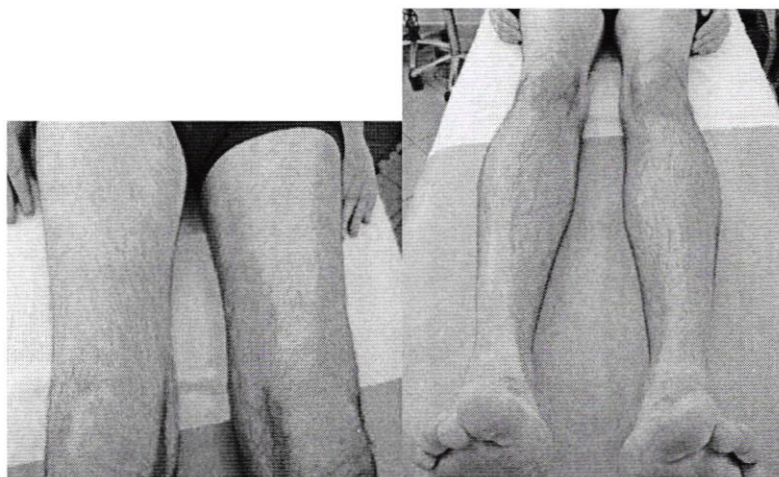
Sl.13. Potpuni opseg pokreta rukama u bolesnika s LGMD s hipotrofijom m. biceps femoris i slabošću predominantno proksimalne muskulature donjih ekstremiteta.

Izrazitiji simptomi mišićne slabosti su se očitovali u dobi od 22 godine; nemogućnost ustajanja iz čučnja ili iz sjedećeg položaja bez pomoći ruku (sl.14. i 15.).



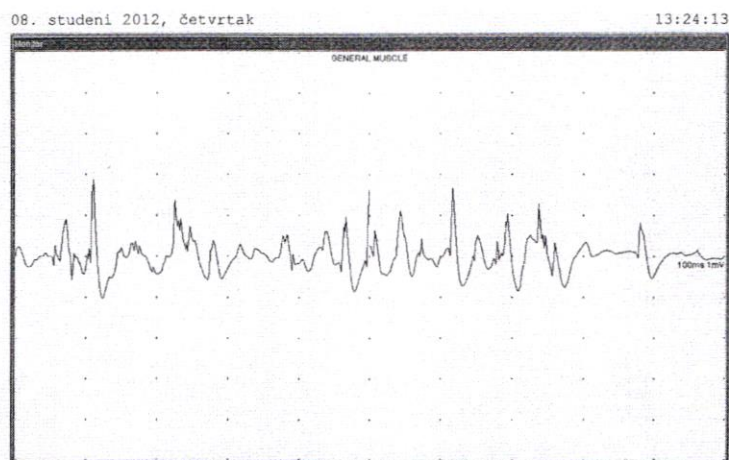
Slika 14. i 15. Slabost proksimalnemuskualture nogu (Gowersov znak) u bolesnika s LGMD

Slabost muskulature natkoljenica je izrazita, blago asimetrična (sl.16.), ima se utisak pseudohipertrofije mišića potkoljenica koja je zapravo relativna (sl.17.) .



Slika 16. i 17. Hipotrofijam.quadricepsfemoris (blago asimetrična) uz relativnu hipertrofiju muskulature potkoljenica u bolesnika s LGMD

Elektromiografski nalaz na muskulaturi natkoljenice pokazuje miopatski uzorak u prorjeđenominervacijskom obrascu shodno slabijoj snazi m. quadricepsfemoris tijekom voljne aktivacije (sl. 18.).



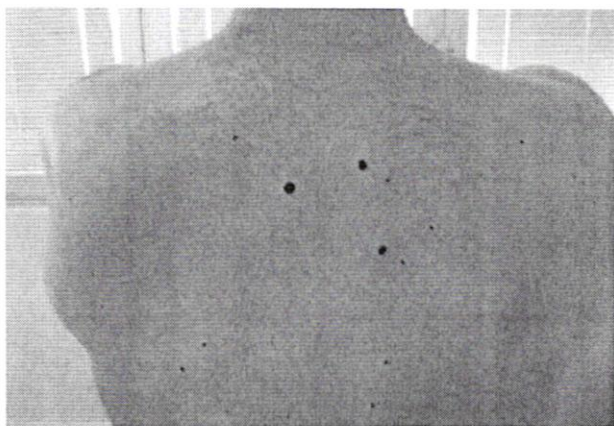
Slika 18. Miopatski uzorak u nalazu detekcijske elektromiografije m.quadricepsfemoris u bolesnika s LGMD

U dobi od 30 godina u bolesnika se razvila i slabost distalne muskulature potkoljenica uz otežan hod na petama (sl.19.)



Slike 19. i20. Mišićna slabost na potkoljenicama u bolesnika s LMGD može biti selektivna: hod na petama je nemoguć, na prstima je uredan

U kliničkom statusu kod bolesnika M.U. uočava se gegav hod, a na muskulaturi ramenog pojasa je izražena tek diskretna hipotrofija, diskretna je hipotofija pektoralne muskulature, krilaste skapule su naznačene obostrano (sl. 21.). Muskulatura lica je uredna.



Slika 21. Blaža hipotrofija muskulature ramenog pojasa i skapule alatae uz bolesnika s LGMD

S ciljem postavljanja dijagnozegenetičkog podtipa kod novootkrivenih mladih bolesnika s kliničkom slikom LGMD potrebno je uključiti iskusne i visoko specijalizirane stručnjake iz područja hereditarnih mišićnih bolesti. S idejom postavljanja dijagnoze LGMD tip 2B – disferlinopatije prof.Canki-Klain analizirala je disferlin iz monocita periferne krvi bolesnika

M.U. Pozitivan nalaz disferlina u M.U. prema njezinom mišljenju, ne isključuje postojanje genske mutacije (na kratkom kraku kromosoma 2 /2p12-14p/). To je teško dokazati budući da se radi o velikom genu čijesekvencioniranje je vrlo zahtjevno i radi se u malom broju laboratorija u inozemstvu. Učinjen je MR mišića obih natkoljenica na kojem su vidljive atrofične promjene uz masnu infiltraciju gotovo svih mišića do distalne trećine natkoljenica te asimetrija u zahvaćanju m. semitendinosusa. Na MR mišića ramenog obruča je masna infiltracija m.teres major i m. latisimusdorsi. Vrijednosti kreatinfosfokinaze u serumu su 800 (gornja granica 177) i nakon 13 godina praćenja bolesnika je konstantno višestruko povišena. Za sada se bolesnik M.U. liječi provođenjem mjera fizikalne rehabilitacije koje mu uvelike pomažu pri održavanju mišićne snage i kondicije. Nadamo se da ćemo kod njega i mnogih mladih bolesnika s hereditarnim mišićnim bolestima stjecanjem kliničkog iskustva i uvjeta za molekularnu dijagnozu doći do mogućnosti ispravka genetskog deficita i zaustavljanja distrofičnog procesa.

Sanja Kovačić, Odjel neurologije OB Zabok, Zabok

Diferencijalna dijagnoza udno-pojasnih mišićnih distrofija – Prikaz slučaja

Uvodni dio

Diferencijalna dijagnoza udno-pojasnih mišićnih distrofija uključuje poremećaje u kojima je slabost proksimalnih mišića udova, poglavito nogu, glavna klinička odrednica. Ono što čini postavljanje ispravne dijagnoze teškim jest da je slabost mišića proksimalne muskulature karakteristika velikog broja nasljednih i stečenih miopatija. Osim toga, laboratorijski nalazi udno-pojasnih mišićnih distrofija nisu specifični i mogu se naći i u mnogim drugim vrstama mišićnih distrofija. Također, veliki broj autosomno recesivnih obrazaca nasljeđivanja se može na prvi pogled zamijeniti s izoliranim kliničkim slučajevima. U prvom redu klinički dolaze u obzir Duchenne i Becker mišićne distrofije, potom možda manje, no svakako važne Emery-Dreifuss i facioskapulohumeralne mišićne distrofije. Mnoge kongenitalne miopatije, kao centronuklearna miopatija, nemalinska miopatija, bolest središnje srži, dezminska miopatija te miopatija tubulanih agregata mogu se prezentirati slabošću proksimalne muskulature u djetinjstvu ili odrasloj životnoj dobi. Pažljiva histokemijska pretraga uzorka mišića će pomoći u postavljanju dijagnoze kongenitalne miopatije i njene vrste.

U nekim slučajevima može biti teško razlikovati spinalne mišićne atrofije od mišićnih distrofija. U prvom redu Kugelberg-Welander mišićna spinalna atrofija može nalikovati na udno-pojasnu mišićnu distrofiju. Međutim, prisutnost fascikulacija, generalizirana mišićna slabost, normalni serumski enzimi i karakterističan elektromiografski nalaz mogu pomoći u dijagnozi.

Osim izuzeća drugih vrsta mišićnih distrofija, u terapijskom smislu je vrlo važno u isključiti polimiozitis i dermatomiozitis. U većini slučajeva, specifični klinički i laboratorijski nalazi mogu identificirati upalnu mišićnu bolest. Miopatija i miozitis kao dio sistemskog lupusa se tipično manifestiraju upravo slabošću proksimalne muskulature te, ako se promatra mišićna slabost kao izolirani klinički sindrom bez uvida u ostale kliničke značajke, ponekad se može zamijeniti s udno-pojasnim distrofijama. Miozitis inkluzijskih tijela je upalna miopatija koja se može zamijeniti s udno-pojasnom mišićnom distrofijom. Tipično zahvaća distalnu muskulaturu, no može se javiti i u proksimalnoj muskulaturi udova. Karakterističan patohistološki nalaz potvrđuje dijagnozu miozitisa.

Isto tako, pojedine endokrine i toksične miopatije čine potencijalno izlječivu skupinu bolesnika koja se također može zamijeniti s udno-pojasnim distrofijama. Miopatija kao posljedica liječenja klorokinom ili miopatija uzrokovana lijekovima za snižavanje kolesterola mogu se zamijeniti s udno-pojasnim distrofijama, no, pojavljuju se u starijoj životnoj dobi što je za manifestaciju nasljednih bolesti mišića iznimno. Zbog sve većeg korištenja kortikosteroida u liječenju, danas je u epidemiološkom smislu važna miopatija uzrokovana steroidima koja, ne samo da se može zamijeniti s udno-pojasnim distrofijama, nego se ponekad teško razlikuje od miopatije kao dio sistemskog lupusa u bolesnika koji se uobičajeno liječe kortikosteroidima.

Glikogenoze i lipidne miopatije mogu se također prezentirati slabošću proksimalne muskulature u raznim dobnim skupinama, no obično se mogu razlikovati od udno-pojasnih distrofija histološkim i biokemijskim pretragama uzorka mišića.

Mitohondrijske miopatije predstavljaju veliku i heterogenu grupu oboljenja koja može imati različite morfološke i biokemijske karakteristike. Iako neke od njih mogu podsjećati na udno-pojasne mišićne distrofije, mnogi mitohondrijski sindromi su multisistemijski u prezentaciji što olakšava diferencijalnu dijagnozu.

Prikaz bolesnika

Bolesnica, 49 godina, unatrag godinu dana je razvila simetričnu slabost i atrofiju zdjelčnih mišića i proksimalnih mišića nogu.

Unatrag nekoliko godina se u bolesnice prati teška mitralna insuficijencija. Unatrag dvije godine se bolesnica liječila imunosupresivima zbog verificirane imunotrombocitopenije.

Unatrag nešto više od godinu dana je zbog teške mitralne insuficijencije implantirana umjetna mehanička valvula. Bolesnica je naknadno na antikoagulantnoj terapiji. Nekoliko mjeseci nakon operacijskog zahvata bolesnica je zaprimljena na odjel interne medicine zbog visoke temperature (više od 39 C), zimice i tresavice praćeno bolovima u nogama uz negativnu epidemiološku anamnezu. Učinjena kardiološka obrada je verificirala perikardni izljev te je bolesnici empirijski uveden u terapiju kloksacilin i gentamicin, a potom, nakon što nije postignut zadovoljavajući klinički odgovor, vankomicin. Svi nalazi učinjenih mikrobioloških kultura su bili negativni. U nalazima učinjenim u vrijeme boravka na odjelu interne medicine se navodi porast serumskog kreatinina što je shvaćeno kao nefrotoksično djelovanje gentamicina. Bolesnica je potom zbog perikardnog izljeva, odnosno perikarditisa koji je shvaćen kao autoimuni premještena u kliniku za kardiologiju gdje je liječena kortikosteroidima tijekom nekoliko mjeseci. Nakon nekoliko mjeseci bolesnica zamjećuje slabost i gubitak mišićne mase mišića zdjelice i natkoljenice do stupnja teške pokretnosti uz pomoć dvije štake. Bolesnica ne može izvesti čučanj, ne može se obuvati. Navedena mišićna slabost je shvaćena kao miopatija uzrokovana steroidima te su kortikosteroidi izuzeti iz terapije, na što ne dolazi do kliničkog poboljšanja. Od patoloških laboratorijskih nalaza bolesnice izdvaja se uredan nalaz kreatin kinaze, povišen nalaz laktat-dehidrogenaze, ubrzana sedimentacija, povišen CRP, laboratorijski znaci oštećenja funkcije jetre i bubrega. Elektromioneurografski nalaz upućuje na miopatske promjene u oba gluteusa, obje natkoljenice, blaže u obje nadlaktice. Osim navedenog kliničkog entiteta, prema anamnezi, kliničkom nalazu, tijeku bolesti i učinjenoj obradi dolaze u obzir i druge bolesti koji se prezentiraju slabošću proksimalnih mišića, u prvom redu autoimune miopatije.

Goran Krakar, dr.med.spec.ped.

**, Klinka za dječje bolesti Zagreb, Klinika za pedijatriju, Zavod za dječju neurologiju,
Klaićeva 16, 10000 Zagreb**

Prikaz slučaja 1

Naš pacijent je dječak, sada u dobi 12 godina, s molekularno postavljenom dijagnozom pojasne mišićne distrofije (LGMD tip 2A), odnosno kalpainopatije. U dobi 1,5 godine su prvi puta slučajno otkrivene povišene vrijednosti kreatin kinaze (CK), koje su potom u više navrata kretale od 3600-10000 U/L. Rani razvojni miljekazi su opisani kao uredni. Prve tegobe u smislu proksimalne mišićne slabosti na nogama su započele u dobi 7 godina s postupnom progresijom tegoba. Tada učinjenom dijagnostičkom obradom ne postavi se etiološka dijagnoza, a biopsija mišića pokaže nalaz upalne miopatije s eozinofilnim infiltratom te je po konzultaciji imunoreumatologa postavljena dijagnoza eozinofilnog polimiozitisa i započeta kortikosteroidna terapija. Kako ne dolazi do poboljšanja, a postupno se razvio i obrazac pojasne mišićne distrofije uz kontrakturu skočnog zgloba, prekine se kortikosteroidna terapija te nastavi dijagnostička obrada. Učinjeni se molekularna analiza na mutaciju kalpain3 (CAPN3) gena, te je dokazana mutacija 550delA/550delA. Sada uz donje ekstremitete ima i slabost proksimalne muskulature gornjih ekstremiteta te ramenog obruča, skapule alate, izraženu lumbalnu lordozu, nemogućnost hoda na petama. Kardiološka i pulmološka obrada su uredni. Redovno provodi fizikalnu terapiju kod kuće, uz praćenje fizijatra. Naš pacijent je primjer varijabilnog fenotipa kod LGMD 2A, s mogućim početkom tegoba od dječje do odrasle dobi, te kako dijagnozu ne treba postavljati samo na temelju patohistološke dijagnoze, nego u korelaciji s kliničkom slikom.

Prikaz slučaja 2

Our patient is a boy at the age of 7 years, second child of healthy parents, with normal early development and motor milestones. He was always a quiet boy and less physically active. First symptoms appeared at the age of 6 years with proximal muscle weakness that became more prominent during the year. Initial neuromuscular work-up showed elevated CK levels about 5000-6000 U/L, CK-MB normal, negative mPCR DMD/BMD test, and normal MR of lumbosacral spine. He was referred to our Clinic for additional diagnostic of neuromuscular disease. He has proximal muscle weakness, pronounced quadriceps weakness, scapular weakness and winging, mild calf hypertrophy and lumbar hyperlordosis, no facial weakness. Cardiology and pulmonology work-up is normal. Electromyography showed myopathic potentials. Muscle biopsy of m. vastuslateralis showed: fiber size variation, increased endomysial connective tissue, degeneration and regeneration of muscle fibers, myopathic grouping of degenerating and regenerating muscle fibers. Dystrophin staining is variable and reduced but not absent. Unfortunately sarcoglycan staining is not available at our laboratory. Reduced dystrophin staining would argue for Becker phenotype. But we believe that intermediate and even closer to Duchenne-like course of disease, in previously normal patient history, fast development of proximal muscle weakness and early scapular winging, with myopathic muscle pathology are strong arguments to consider sarcoglycanopathy (LGMD 2C-F).

GENETSKO SAVJETOVANJE, GENETSKO TESTIRANJE I PRENATALNA DIJAGNOSTIKA LGMD

Nina CANKI-KLAIN

Hrvatski institut za istraživanje mozga i Katedra za medicinsku biologiju
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

GENETSKO SAVJETOVANJE

Genetsko savjetovanje (1-4) je specijalizirani medicinski postupak koji u sebi sadrži racionalni i emocionalni dio, a obuhvaća proces komunikacije između liječnika-savjetnika i osobe ili para koji traži savjet u vezi pojave ili ponavljanja genetskog oštećenja u obitelji. Racionalni dio se odnosi na informaciju o prirodi, težini, prognozi, etiologiji, vjerojatnosti nastanka i mogućnostima sprečavanja pojave određene bolesti. Emocionalni dio vodi računa o psihološkom stanju osobe koja treba razumjeti saopćenje kako bi mogla donijeti odluku koja će biti najbolja za nju. Posebna pažnja je posvećena emocionalnom aspektu genetskog savjetovanja što zahtijeva od genetskog savjetnika poznavanje tzv. procesa svladavanja teškoća pacijenta „Coping process“ (5):

1. Šok i poricanje
2. Tjeskoba
3. Gnjev i krivnja
4. Depresija
5. Psihička homeostaza

Nedovoljan broj educiranih medicinskih genetičara, uz neobično nagli i sve složeniji razvoj metoda koje omogućuju postavljanje točne etiološke dijagnoze idući od stanica blastociste do klinički još zdrave osobe koja nosi smrtonosan gen za više ili manje tešku bolest nalažu multidisciplinarni timski pristup stručnjaka različitih profila od liječnika specijalista, raznovrsnih znanstvenika do kliničkih psihologa i djelatnika socijalne skrbi. Posebno je potrebno naglasiti neophodnost bolje informiranosti liječnika specijalista u primarnoj zaštiti kao i medicinskih sestara i babica koji se uglavnom prvi susreću s osobom koja bi trebala dobiti genetsku informaciju.

Osnovni preduvjet za genetsko savjetovanje je poznavanje točne etiološke dijagnoze. U slučaju LGMD to je nerijetko najveći problem. Osim poznavanja načina nasljeđivanja (rjeđe autosomno dominantno 10% i češće autosomno recesivno 90%), potrebno je voditi računa i o nekim drugim fenomenima poput penetrantnosti dominantnih gena, varijabilnosti kliničke slike unutar iste i različitih obitelji te posebno misliti na mogućnost de novo nastalih mutacija čija učestalost u slučaju dosad otkrivena pet gena: *MYOT*, *LMNA*, *CAV3*, *DES* i *DNAJB6* nije poznata. Na recesivu bolest treba posumnjati ako su roditelji u srodstvu ili iz istoga kraja te ako postoji još koji bolesnik u obitelji ili kraju odakle potječu roditelji. U svakom slučaju, najprije treba misliti na najčešće tipove bolesti t.j. na LGMD2A, LGMD2I, LLGMD2Bi 2L. Ako se i posumnja na uzročni gen od velike pomoći je poznavanje najčešćih mutacija u populaciji ispitanika. Zbog svega navedenog najbolje je uputiti osobu koja traži savjet u specijalizirano savjetovalište za živčanomišićne boleti

U slučaju LGMD postoji više načina kojima se može doći do dijagnoze i o čemu je prethodno bilo više govora. Neophodno je potrebno što ranije postaviti dijagnozu kako bi se što bolje zbrinulo bolesnika i kako bi roditelji dobili pravilnu informaciju o riziku

Biopsija mišića i analiza proteina iz zamrznutog mišića (-70°C) je vrlo korisna , ali nije definitivna . Konačna dijagnoza bi trebala biti molekularna.

U slučaju češćih autosomnih recesivnih LGMD npr.LGMD2A. moguće je testirati partnere/partnerice bolesnika/bolesnica na prisutnost najčešćih mutacija u našoj populaciji i tako svesti na zanemarujući rizik ponavljanja bolesti u obitelji

Težina mnogih od tih bolesti i nada u nove obećavajuće terapijske pristupe nalažu što ranije otkrivanje njihovog točnog genetskog uzroka, što je preduvjet za:

- Sprječavanje komplikacija
- Točniju prognozu bolesti
- Djelotvorno liječenje
- Prevenciju

genetskim savjetovanjem: koje bi trebalo odrediti rizik ponavljanja i koje su mogućnost izbora (prenatalna ili preinplantacijska dijagnostika, heterologna inseminacija, donatorstvo oocite, adopcija, trajna kontracepcija itd)

:Percepcija rizika

Bez obzira kako se iskazuje rizik u postocima ili relativno, par tu brojčanu točnost „prevodi“ u prihvatljiv ili neprihvatljiv rizik. Svi liječnici s iskustvom genetskog savjetovanja znaju da je u istovjetnoj situaciji percepcija dva para ili osobe različita. Izuzevši intelektualnu i sociokulturnu razinu pacijenata, određeni čimbenici mijenjaju percepciju rizika. Ovdje treba spomenuti:

- Težinu bolesti i način na koji ju prihvaća okolina
- Mogući terapijski vidici i nadanje koje u njih daje obitelj
- Broj zdrave i /ili bolesne djece koju već ima par
- Mogućnost prenatalne dijagnostike

Ovisno o tome što su proživjeli i ovisno o vlastitoj percepciji rizika, par će trebati donijeti odluku da li da ima ili nema dijete. Nije rijetko da parovi traže od liječnika direktivan stav, istinski savjet. Međutim, genetski savjetnik mora dati najiscrpniju i najsuvremeniju informaciju, ali bez utjecanja na odluku.

GENETSKO SAVJETOVANJE I GENETSKO TESTIRANJE

Kako bi se osiguralo, da genetsko testiranje bude što djelotvornije i izvedeno na što primjereniji način po najvišim standardima, potrebno ga je smatrati sveobuhvatnim procesom, a ne jednostavnim laboratorijskim postupkom. Taj se proces sastoji iz tri jednako važna dijela:

- 1.Priprema, informacija i privola
- 2.Laboratorijska analiza
- 3.Objašnjenje rezultata i pomoć (medicinska,psihološka, socijalna)

Pojedine od navedenih faza mogu različito dugo trajati, što ovisi o težini bolesti i metodama koje nam omogućuju potvrdu ili isključenje.

Što je genetski test i zašto se genetsko testiranje razlikuje od ostalih medicinskih testova?

Genetski test je analiza nekog specifičnog gena, njegovog produkta ili funkcije, ili neka druga analiza na razini DNK ili kromosoma, koja ima za cilj da otkrije ili isključi neko oštećenje

koje je vjerojatno povezano s određenim genetskim poremećajem. Genetski test se razlikuje od ostalih vrsta medicinskih testova budući da ne izaziva iste emocionalne, etičke i socijalne probleme poput drugih medicinskih testova zbog niže navedenih razloga:

1. Zloraba genetike u prošlosti
2. Mogućnost otkrivanja genetskog uzroka bolesti iz bilo kojeg tkiva i u bilo koje doba od trenutka začeća bez obzira na prisutnost ili odsutnost kliničkih simptoma.
3. Društvene implikacije

Privola nakon informacije o testu

Prethodno navedeni razlozi objašnjavaju zašto je prije svakog genetskog testiranja potrebno informirati potencijalnog ispitanika o koristi i štetnim posljedicama testiranja. Očito je, da važnost shvaćanja informacije ovisi o vrsti bolesti i stanju ispitanika (bolesnik, potencijalni bolesnik jer u obitelji postoji bolest, "znatiželjna" osoba, itd). Osim toga potrebno je voditi računa, da upotrebom iste tehnologije tj. isti test može biti "dijagnostički", "presimptomatski" ili "prediktivan"(predviđajući). Ako se ne razumiju osnovne razlike među tim testovima može doći do ozbiljnih posljedica.

- Dijagnostički genetski test je test koji se izvodi na bolesniku koji na osnovi kliničke slike boluje ili bi mogao bolovati od određene genetske bolesti koja se ispituje. Naglasak je na znacima bolesti koji su prisutni sada u momentu ispitivanja, a ne da li će se pojaviti jednom u budućnosti.
- Prediktivan genetski test se odnosi na osobe koje su obično zdrave, ili na bolesnike koji imaju simptome koji se ne odnose na bolest koja se testira. Međutim naziv prediktivan genetski test je bolje upotrebljavati za slučajeve u kojima je rizik za pojavu bolesti znatno povećan ili smanjen u odnosu na opću populaciju, ali bez bilo kakvog stupnja sigurnosti da će doći do bolesti.
- Presimptomatski genetski test bi se trebao upotrebljavati za slučajeve u kojima će abnormalni rezultat testa imati za posljedicu gotovo neizbježan nastanak bolesti u nekom kasnijem periodu života.

Literatura:

1. Canki N. Genetski nasvet. Medicinski razgledi 1979; 18:291-301.

2. Canki. N. Genetika u reprodukciji. In: Šulović V, Berić B, Dražančić A, Andolšek L eds. Porodiljstvo. 9th ed. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga, 1990:135-152.
3. Canki-Klain N. Genetika i psihološka medicina. In : E Klain et al. ed. Psihološka medicina. Golden Marketing, Zagreb, 1999, 421-429.
4. Canki-Klain N. Što je genetsko savjetovanje? u Praktički aspekti genetskog savjetovanja, priručno štivo, Poslijediplomski tečaj stjecanja znanja s provjerom, Zagreb, 05-06.7.2007.

VJEŽBE U LABORATORIJU

Astrid MILIĆ

Galapagos istraživački centar, Zagreb

Proteinska analiza jedan je od pristupa u dijagnostici pojasnih mišićnih distrofija. Istovremena analiza više proteina čini ovaj pristup često prvim dijagnostičkim izborom, a s ciljem brze potvrde klinički postavljene dijagnoze. To je posebice korisno kada je na temelju kliničke slike teško odrediti podtip pojasne mišićne distrofije ili kada je analiza odgovarajućeg gena dugotrajna.

Rezultat proteinske analize očitava se kao prisustvo (normalno stanje) ili smanjenje/nedostatak proteina (patološko stanje).

Analiza proteina podrazumjeva korištenje slijedećih metoda:

- **denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza**
(*engl.* sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)
- **prijenos elektroforetski razdvojenih proteina na membranu**
(*engl.* Western blotting)
- **inkubacija prenesenih proteina s odgovarajućim protutijelima**

Gore navedenim metodama prethodi priprema uzoraka za SDS-PAGE, što u slučaju korištenja mišićnog tkiva podrazumjeva smrzavanje mišića dobivenog biopsijom, te potom homogenizaciju mišićnog tkiva. U slučaju disferlina (LGMD2B) izvor proteina mogu biti i monociti iz pune krvi, pa u tom slučaju priprema uzorka uključuje razdvajanje limfocita i monocita od ostalih krvnih stanica, potom daljnje razdvajanje monocita, te na kraju njihovu lizu.

Analiza proteina iz mišićnog tkiva

Priprema proteinskog uzorka za analizu, a nakon obavljene mišićne biopsije, uključuje:

- **smrzavanje mišića**
- **homogenizaciju mišićnog tkiva**

Smrzavanje mišića

Smrzavanje mišića prvi je i jedan od najvažnijih koraka u analizi proteina mišićnog tkiva. Nepravilno smrzavanje dovodi do razgradnje proteina, te se rezultat dobiven za takav mišić ne može interpretirati na pravilan način.

Pravilno smrzavanje za potrebe Western blot analize znači da se mišić odmah nakon biopsije stavlja u termootpornu epruvetu i uranja u posudu sa tekućim dušikom. Poslije tridesetak sekundi, koliko je potrebno za smrzavanje mišića, epruveta se izvadi iz tekućeg dušika i do analize pohranjuje na -80°C.

Homogenizacija mišićnog tkiva

Homogenizacija se izvodi neposredno prije elektroforeze proteina, a sastoji se od dodavanja 20 volumena pufera za homogenizaciju izvaganom mišiću. Korištenjem homogenizatora uzorak mišića homogenizira se 2-3 puta po 5 sekundi. Dobivena smjesa se potom zagrijava 5 minuta na 95°C, te centrifugira 5 minuta. Po završenom centrifugiranju nadtalog koji sadrži proteine odvađa se od taloga i koristi u daljnjoj analizi.

Uz mišić ispitanika, uvijek je poželjno pripremiti i kontrolni uzorak, tj. mišić osobe za koju se pouzdano zna da ne boluje od mišićne distrofije.

Analiza proteina iz uzorka pune krvi

Priprema proteinskog uzorka za analizu iz pune krvi uključuje:

- izolaciju monocita iz periferne krvi
- lizu monocitnih stanica

Izolacija monocita iz periferne krvi

Za izolaciju monocita iz pune krvi koristi se brza i jednostavna metoda centrifugiranja u gradijentu gustoće fikola. Ova metoda uključuje nadslojavanje krvi sa fikolom i centrifugiranje, a temelji se na razlici u gustoći između mononuklearnih stanica (limfociti i monociti) i ostalih krvnih stanica/elementa. Nakon centrifugiranja na dnu epruvete zaostati će granulociti i eritrociti (veća gustoća od fikola), dok će prvi sloj (prsten) iznad fikola biti upravo sloj mononuklearnih stanica.

Dobiveni sloj mononuklearnih stanica se prenosi u čistu epruvetu i koristi u daljnjoj analizi. S obzirom na mali postotak monocita, u odnosu na limfocite, poželjno je razdvojiti ove dvije

vrste stanica i proteinsku analizu nastaviti isključivo sa monocitima. Za razdvajanje limfocita i monocita može se koristiti nekoliko pristupa, među kojima je najbolje korištenje tzv. magnetskih kuglica. U tom postupku mononuklearne stanice inkubiraju se sa CD14-magnetskim kuglicama koje će se vezati za monocite, a s obzirom da je CD14 specifičan marker za monocite. Propuštanjem suspenzije mononuklearnih stanica na magnetskoj koloni uz magnet će ostati vezani isključivo monociti sa vezanim CD14-magnetskim kuglicama, dok će limfociti nesmetano proći kolonu.

Liza mononuklearnih stanica

Pročišćeni monociti nadalje se inkubiraju s odgovarajućeg puferom za lizu, a potom centrifugiraju pod istim uvjetima kao uzorci mišićnog tkiva. Dobiveni nadtalog sadrži proteine spremne za daljnju analizu.

Uz krv ispitanika, uvijek je poželjno pripremiti i kontrolni uzorak, tj. izolirati i potom lizirati monocite iz krvi osobe za koju se pouzdano zna da ne boluje od mišićne distrofije.

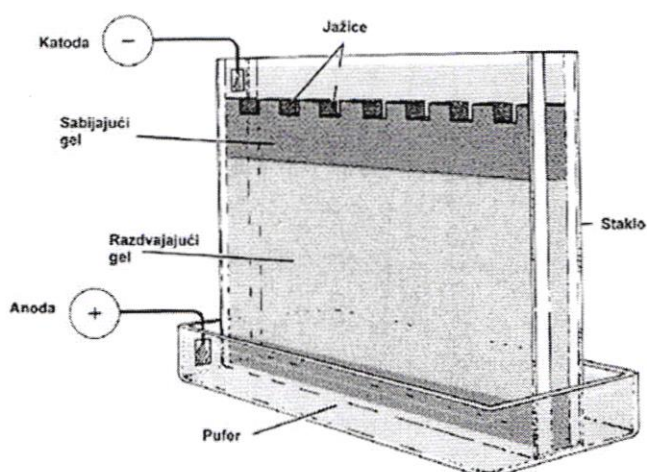
Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

SDS-PAGE je denaturirajuća elektroforeza koja se provodi u poliakrilamidnom gelu. Riječ je o relativno jednostavnoj i brzom metodi kojom se proteini razdvajaju na temelju svoje molekulske mase, a neovisno o naboju i konformaciji molekule. Natrij dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecylsulphate, SDS) je detergent koji vezujući se na protein razbija njegovu kvarternu strukturu i proteinskoj molekuli daje višestruki negativni naboj. Količina vezanog natrij dodecil sulfata proporcionalna je molekulskoj masi proteina, a neovisna o aminokiselinskom slijedu. To znači i da je ukupan negativan naboj proteina proporcionalan njegovoj veličini, na osnovu koje će se proteini razdvajati tijekom elektroforeze.

Razdvajanje SDS-proteinskih kompleksa provodi se u poliakrilamidnom gelu koji nastaje umreženjem akrilamida i N,N'-metilenbisakrilamida. Umreženjem se stvaraju pore za prolaz SDS-proteinskih kompleksa, a njihova veličina (ovisna o gustoći, tj. postotnosti gela) odabire se prema veličinama proteina koje želimo razdvojiti. Kako kod proteina mišićnog tkiva postoji velika razlika u molekularnoj masi razdvajajući gel mora biti gradijentni (gradijent gustoće gela, najčešće 4-7%), a da bi se svi spomenuti proteini mogli dovoljno razdvojiti.

Otopina za izradu gela izlijeva se između dva vertikalno postavljena stakla. Umetanjem češlja između dva stakla nakon polimerizacije zaostaju tzv. jažice, tj. udubine u koje se nanosi određeni volumen proteinskog uzorka. Za postizanje što boljeg razdvajanja proteina koristi se tzv. *diskontinuirana* elektroforeza, u kojoj se poliakrilamidni gel sastoji od gornjeg sabijajućeg i donjeg razdvajajućeg gela (slika 1). U sabijajućem gelu dolazi do koncentriranja tj. sabijanja proteina u tanki sloj, a ulaskom u donji, razdvajajući gel, proteini se razdvajaju na osnovu svoje veličine.

SDS-proteinski kompleksi su negativnog naboja, pa putuju prema anodi i zbog prije navedenih karakteristika gela njihova je pokretljivost, tj. udaljenost koju prijeđu u određenom vremenu obrnuto proporcionalna $\log_{10}$ njihove molekulske mase. Ta činjenica omogućava da se korištenjem proteina poznate molekulske mase (tzv. standardi) može odrediti (ili provjeriti) molekulska masa svakog proteina iz našeg uzorka.



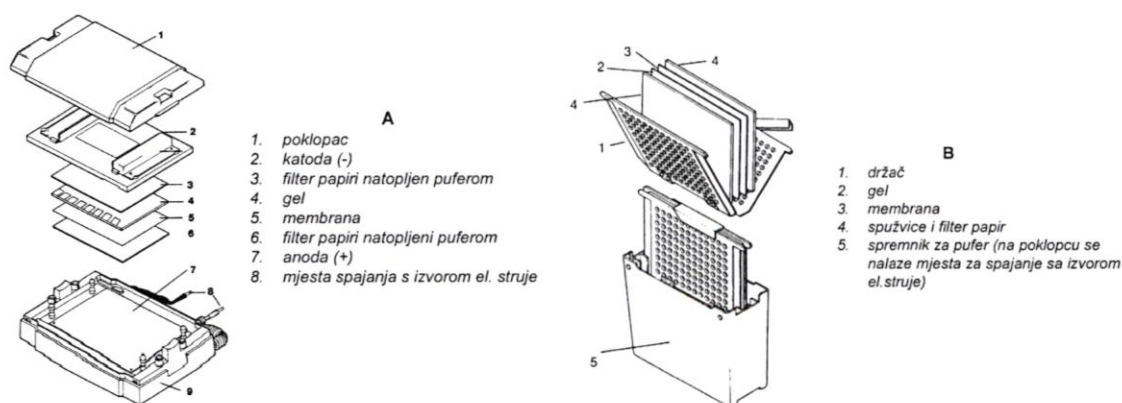
Slika 1. Prikaz aparature za denaturirajuću poliakrilamidnu gel elektroforezu

Prijenos proteina na membranu (*engl.* western blotting)

Western blot analiza je postupak prijenosa elektroforetski razdvojenih proteina sa poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu, najlonsku ili polivinilidendifluoridnu (PVDF) membranu. Prijenos se može odvijati u aparaturi za polusuhi ili mokri prijenos na membranu (slika 2).

Bez obzira na tip prijenosa na membranu, eksperimentalni dio podrazumjeva slaganje tzv. «sendviča» u kojem se poliakrilamidni gel i membrana nalaze između filter papira. Dno sendviča čini određeni broj filter papira, zatim membrana, poliakrilamidni gel, te ponovno isti

broj filter papira. Položaj sendviča u aparaturi, u odnosu na elektrode, mora biti takav da omogući da negativno nabijeni proteini sa gela prijeđu na membranu. Trajanje prijenosa ovisi o veličinama proteina koje analiziramo, pa je tako kod proteina uključenih u nastanak različitih tipova mišićnih distrofija potrebno odrediti optimalno vrijeme za prijenos i malih (npr. α - i γ -sarkoglikan) i velikih proteina (npr. disferlin).



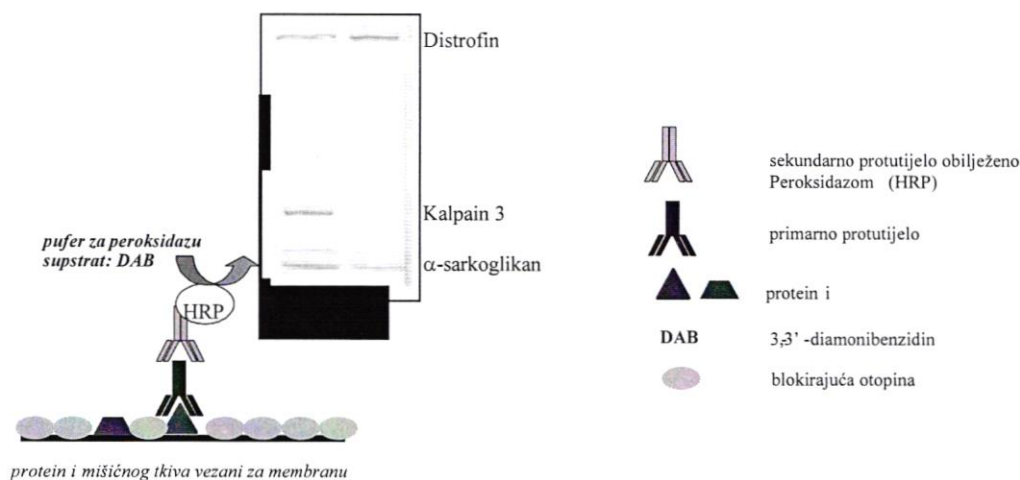
Slika 2. Prikaz aparature za prijenos elektroforetski razdvojenih proteina s gela na membranu A. Polusuhi prijenos; B. Mokri prijenos proteina na membranu

Za provjeru uspješnosti prijenosa na membranu koristi se Coomassie Brilliant Blue boja pri čemu se eventualno zaostali proteini na gelu oboje plavo. Ovo bojanje je ujedno i način detekcije najzastupljenijeg proteina u mišićnom tkivu, miozina. Usporedba količine miozina u kontrolnom uzorku i uzorku mišića koji ispitujeemo je ujedno provjera da li je mišić dobro smrznut. Uslijed nepravilnog smrzavanja dolazi do razgradnje proteina što se uočava smanjenjem količine miozina, te rezultat dobiven za takav uzorak nije moguće interpretirati. Važno je spomenuti da smanjenje količine miozina može biti i posljedica uznapredovale mišićne distrofije, pa je i tada nemoguće interpretirati dobiveni rezultat.

Inkubacija s specifičnim protutijelima

Nakon završenog prijenosa proteini su vezani za površinu membrane, te se inkubiraju sa specifičnim primarnim protutijelima (jedno ili više njih), a u nastavku i sa sekundarnim protutijelom. Uvjete inkubacije (trajanje, temperatura) propisuje proizvođač protutijela.

Sekundarno protutijelo je najčešće obilježeno enzimom peroksidazom ili alkalnom fosfatazom, pa se nakon inkubacije na membranu nanosi otopina koja sadrži pufer i supstrat za odgovarajući enzim. Jedan od mogućih načina detekcije je da na mjestima reakcije enzima i susprata proteini postaju vidljivi kao ljubičasto (alkalna fosfataza) ili smeđe (peroksidaza) obojene vrpce (slika 3).



Slika 3. Prikaz postupka inkubacije membrane sa protutijelima i krajnja detekcija proteina sa enzimskim supstratom. U prikazu je sekundarno protutijelo obilježeno peroksidazom, pa su vrpce protein iz mišićnog tkiva smeđe boje.

SEMINAR IZ GENETIKE

Direktna i indirektna genska analiza u dijagnostici pojasnih mišićnih distrofija

Astrid MILIĆ

Galapagos istraživački centar, Zagreb

Klinički postavljenu dijagnozu pojasne mišićne distrofije moguće je, osim proteinske analize, potvrditi i analizom određenog gena korištenjem različitih DNA metoda. Pritom, genska analiza može biti direktna ili indirektna. Potrebno je naglasiti da je direktna molekularna analiza mutacija definitivna dijagnoza.

Direktna genska analiza

Direktna genska analiza podrazumjeva analizu određenog gena na prisutnost mutacije koja je već poznata unutar populacije ispitanika ili ju tek treba otkriti. U drugom slučaju, analiza podrazumjeva umnažanje svakog pojedinog dijela gena lančanom reakcijom polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR), te potom DNA sekvencioniranje svakog PCR produkta. Kada je poznat smještaj i tip mutacija, za njihovo otkrivanje u novih pacijenata koriste se jednostavnije metode detekcije kao što su:

- **lančana reakcija polimerazom**,
- **alel-specifični PCR** (engl. allele specific polymerase chain reaction, ASA-PCR), te
- **cijepanje DNA restrikcijskim enzimima** (engl. restriction fragment lenght polymorphism, RFLP).

Lančana reakcija polimerazom brza je i specifična metoda *in vitro* sinteze nukleinskih kiselina kojom se specifični odsječak DNA može umnožiti u velikom broju kopija. Preduvjet umnažanja je poznavanje nukleotidnog slijeda regije koju želimo umnožiti, jer to omogućava odabir pravih oligonukleotidnih početnica. Reakcijska smjesa sadržava genomsku DNA, par oligonukleotidnih početnica, smjesu sva četiri deoksiribonukleotida, PCR pufer i Taq DNA polimerazu. Reakcija umnažanja izvodi se u stroju za lančanu reakciju polimerazom, a uvjeti

pod kojima se reakcija odvija ovisi o karakteristikama regije koju želimo umnožiti. Općenito, jedan reakcijski ciklus se dijeli na tri dijela: denaturaciju (razdvajanje DNA lanaca), lijepljenje početnica (engl. *annealing*) i sintezu DNA. Trajanje svakog dijela, temperatura na kojoj će se svaki dio odvijati, te broj reakcijskih ciklusa ovisi o regiji koja se umnožava. Nakon završetka reakcije, uspješnost reakcije, tj. provjera produkata najčešće se provodi elektroforezom u agaroznom gelu.

Alel specifična lančana reakcija polimerazom omogućava brzu i direktnu detekciju točkastih mutacija. To se postiže korištenjem dva para oligonukleotidnih početnica, tzv. vanjskih i unutarnjih početnica. Vanjske početnice umnažaju regiju koja je njima omeđena (kao kod klasičnog PCR-a). Jedna unutarnja početnica ima normalan slijed nukleotida, dok druga ima slijed "mutirane" DNA. Ovisno o svojstvu ispitivane DNA (normalna ili mutirana) ovisiti će da li će se i koja će se od unutarnjih početnica vezati za DNA i umnažati određenu regiju. Alel specifični PCR je, u usporedbi sa klasičnim PCR-om, brža metoda jer je provjerom rezultata alel specifičnog PCR-a elektroforezom u agaroznom gelu odmah moguće detektirati prisutnost mutacije.

RFLP metoda temelji se na korištenju restrikcijskih endonukleaza, bakterijskih enzima koji cijepaju molekulu DNA ukoliko sadrži odgovarajući nukleotidni slijed, specifičan za svaki enzim. Osnova ove metode je činjenica da mutacija može stvoriti novo restrikcijsko mjesto za određenu endonukleazu, odnosno ukloniti do tada postojeće mjesto djelovanja restrikcijskog enzima. RFLP metoda podrazumjeva inkubaciju PCR produkta sa enzimom i odgovarajućim puferom pod uvjetima (trajanje, temperatura) koji su optimalni za korišteni enzim.

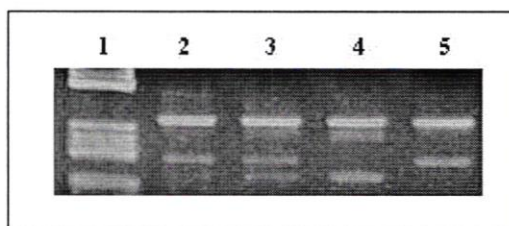
Primjeri direktne genske analize:

Dijagnostika pojasne mišićne distrofije tip 2A (kalpainopatije): analiza CAPN3 gena

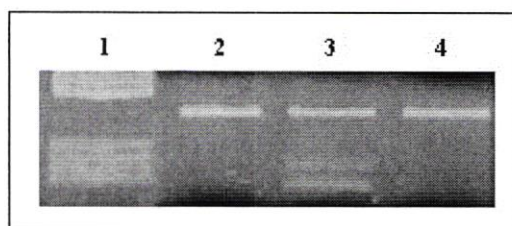
Pojasna mišićna distrofija tip 2A (LGMD2A) je autosomno recesivna mišićna bolest uzrokovana mutacijama u *CAPN3* genu koji kodira kalpain 3. Danas je poznato više od 300 *CAPN3* mutacija rasprostranjenih uzduž cijelog gena. *CAPN3* mutacije prisutne u nekoj populaciji ovisi o njezinom geografskom i etničkom porijeklu.

Upotrebom specifične strategije i direktne genske analize hrvatskih LGMD2A obitelji pronađeno je 6 različitih *CAPN3* mutacija u našoj populaciji kojima se otkriva oko 95% patoloških *CAPN3* kromosoma. Za njihovo brzo otkrivanje koristimo prije spomenute metode

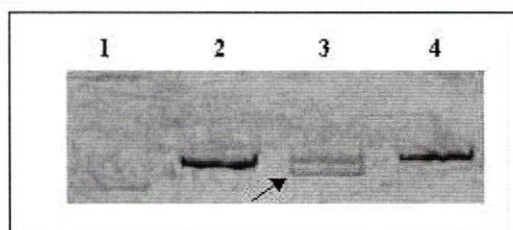
(PCR, ASA-PCR, RFLP), uz provjeru svih navedenih reakcija elektroforezom u agaroznom ili poliakrilamidnom gelu (slike 1-3).



Slika 1. Određivanje 550delA mutacije alel specifičnom lančanom reakcijom polimerazom. Prikaz agaroznog gela u kojem su DNA fragmenti vizualizirani etidij bromidom. Stupac 1: biljeg molekularne mase; stupac 2: kontrola divlji tip DNA (wt/wt)- gornja vrpca odgovara regiji umnoženoj vanjskim početnicama, a donja je umnožena jednom vanjskom i “normalnom” unutarnjom početnicom; stupac 3: kontrola heterozigot za ispitivanu mutaciju; stupac 4: kontrola homozigot za ispitivanu mutaciju – gornja vrpca odgovara regiji umnoženoj vanjskim početnicama, a donja je umnožena pomoću “mutirane” početnice; stupac 5: gledajući kontrole može se zaključiti da ovaj uzorak ne nosi analiziranu mutaciju, tj. da je wt / wt.



Slika 2. Određivanje R541W mutacije (stvara restrikcijsko mjesto) lančanom reakcijom polimerazom i inkubacijom sa restrikcijskim enzimom. Prikaz agaroznog gela u kojem su DNA fragmenti vizualizirani etidij bromidom. Stupac 1: biljeg molekularne mase; stupac 2: kontrola divlji tip DNA (wt/wt)- detektirana vrpca odgovara nepocijepanom PCR produktu; stupac 3: kontrola heterozigot za ispitivanu mutaciju - uz gornju vrpcu prisutne su i dvije donje vrpce koje nastaju cijepanjem PCR produkta zbog prisutnosti mutacije; stupac 4: gledajući kontrole može se zaključiti da je riječ o divljem tipu DNA (wt/wt) za analiziranu mutaciju.



Slika 3. Određivanje 15bp delecije (delFWSAL) lančanom reakcijom polimerazom. Prikaz nativnog poliakrilamidnog gela u kojem su DNA fragmenti vidljivi nakon bojanja gela srebrom. Stupac 1: biljeg molekularne mase; stupac 2: kontrola za divlji tip DNA (wt/wt)- oba alela imaju normalnu veličinu; stupac 3: kontrola heterozigot za ispitivanu mutaciju- uz “normalnu” vrpcu, prisutna je i “mutirana” vrpca smanjena za 15

pb zbog prisutnosti delecije (označena strelicom); stupac 4: prema kontrolama može se zaključiti da uzorak u stupcu 3 odgovara normalnoj DNA.

Indirektna genska analiza

Analiza genetske povezanosti (*engl.* linkage analysis) je indirektna metoda genske analize koja predstavlja vrlo koristan dijagnostički pristup u slučajevima kada je direktna genska analiza dugotrajna i zahtjevana (najčešće zbog veličine gena), a proteinska analiza nije moguća (npr. zbog nepostojanja specifičnih protutijela).

Glavni preduvjet za korištenje analize genetske povezanosti u dijagnostičke svrhe istovremena je analiza najmanje dvije generacije, gdje je obavezno uz bolesnika sa sigurnom kliničkom dijagnozom i po mogućnosti potvrđenom molekularnom ili proteinskom dijagnozom potrebno analizirati i zdravog brata ili sestru kako bi se odredio kromosom (faza) koji nosi mutirani gen. Osim u dijagnostičke svrhe, analiza genske povezanosti može poslužiti u istraživanju starosti i porijekla određene genske mutacije. Točnije, usporedba haplotipa osoba koje nose istu mutaciju na nekom kromosomu može u slučaju istih haplotipa ukazati na isto porijeklo i postojanje tzv. efekta osnivača (*engl.* founder effect).

Analiza genske povezanosti temelji se na praćenju nasljeđivanja biljega, a to su najčešće mikrosatelitni markeri. Mikrosateliti su jedan od tri tipa uzastopno ponavljajućih DNA slijedova čija veličina osnovne jedinice (2-5 nukleotida), te broj ponavljanja može biti vrlo varijabilan u općoj populaciji. Analizom članova jedne obitelji može se pratiti njihovo nasljeđivanje. Pritom, mikrosatelitni markeri moraju biti smješteni s obje strane i što bliže genu koji se ispituje, da bi se izbjegao proces rekombinacije, tj. crossing-over i da bi se njihovom analizom i praćenjem njihovog nasljeđivanja moglo pratiti nasljeđivanje određene bolesti u obitelji.

Za izvođenje analize genetske povezanosti potrebno je poznavati mikrosatelitne markere koje ćemo koristiti u analizi. Poznavanje markera podrazumjeva poznavanje njihovog smještaja na određenom kromosomu, posebice u odnosu na smještaj gena od interesa. Osim njihovog smještaja bitno je znati da li su jedinice ponavljanja dva-, tri- ili četirinukleotidi kako bi se tome prilagodila metoda razdvajanja DNA fragmenata (elektroforeza DNA u poliakrilamidnom gelu). Vrlo važan podatak predstavlja i poznavanje broja jedinica ponavljanja, odnosno poznavanje konačne veličine DNA fragmenta za svaki analizirani marker. Svi navedeni podaci o mikrosatelitnim markerima dobiveni su analizama velikog broja humanih DNA uzoraka i dostupni su u literaturi i na internetu (www.gdb.org;

www.cephb.fr). Uobičajeno se prilikom analize genske povezanosti koristi 4-5 mikrosatelitnih markera koji se nalaze što bliže mjestu gena od interesa.

Metode koje koristimo prilikom analize genske povezanosti su:

- **lančana reakcija polimerazom i**
- **elektroforeza DNA u poliakrilamidnom gelu** (*engl.* DNA polyacrylamide gel electrophoresis, DNA PAGE).

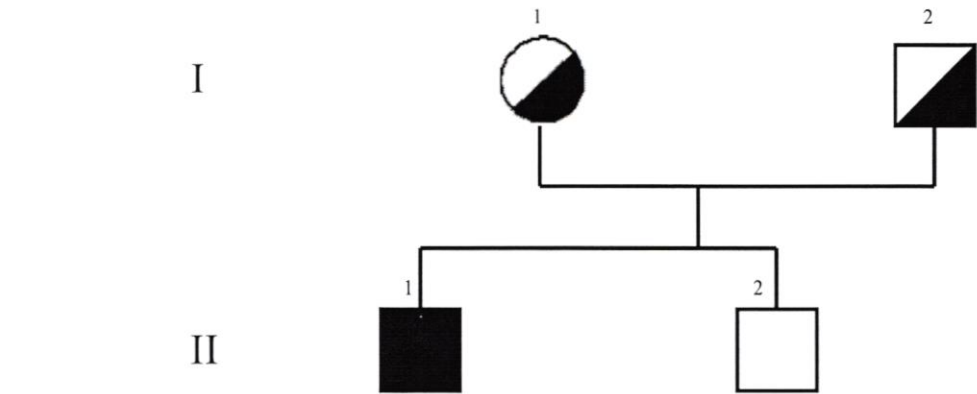
Lančanom reakcijom polimeraze svaki se marker umnoži uz pomoć pravilno izabranih oligonukleotidnih početnica. Dobiveni DNA fragmenti se potom razdvoje u poliakrilamidnom gelu. Karakteristike poliakrilamidnog gela i uvjeti elektroforeze moraju biti takvi da omoguće razdvajanje 2 DNA fragmenata u svakom ispitivanom uzorku (jedan alel naslijeđen od majke, drugi od oca) koji se eventualno razlikuju u svega 2, 3 ili 4 bazna para. Na istom gelu moguće je analizirati i više od jednog markera, ovisno o njihovim veličinama. Nakon završene elektroforeze, poliakrilamidni gel se oboji srebrom pri čemu postanu vidljivi DNA fragmenti ili se rezultati očitaju kompjuterski ako je korišten DNA sekvenator. Veličine DNA vrpce «očitaju» se za svaki analizirani uzorak, odnosno za svaki analizirani mikrosatelitni marker. «Očitanim» veličinama mikrosatelitnih markera dogovorno se pridruži odgovarajući jednoznačenasti broj poznat iz literature. Takav način obilježavanja veličina mikrosatelitnih markera koristi se radi lakšeg pisanja haplotipa i mogućnosti usporedbe rezultata između različitih laboratorija. Tek kada su «očitani» rezultati DNA elektroforeze za svaki pojedini marker, može se pristupiti konstruiranju haplotipa. Točnije, rezultati za svaki marker poredaju se jedan ispod drugog prema redoslijedu markera na kromosomu i pritom dobiveni niz brojeva predstavlja haplotip ispitivanog uzorka za korištene mikrosatelitne markere. Opisani način izvođenja analize genske povezanosti prikazan je u primjeru koji slijedi.

Primjeri indirektne genske analize:

Dijagnostika pojasne mišićne distrofije tip 2B (disferlinopatija):

U indirektnoj genskoj analizi LGMD2B koriste se 4 mikrosatelitna markera: D2S2113, Cy172-H32, 104-sat i D2S291. Navedeni su prema svom smještaju na kromosomu 2 (od telomere prema centromeri), pri čemu su marker Cy172-H32 i 104-sat intragenski markeri.

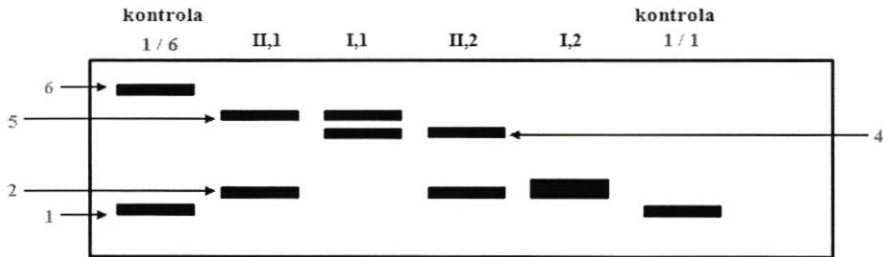
Na osnovu rezultata dobivenih za svaki pojedini marker, identifikirani su haplotipovi za svakog pojedinog člana obitelji, te konačni rezultati ukazuju na postojanje povezanosti za LGMD2B .



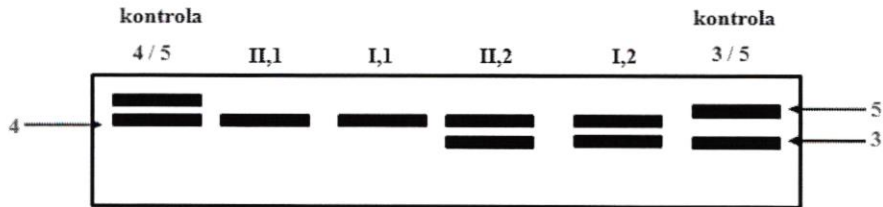
D2S2113



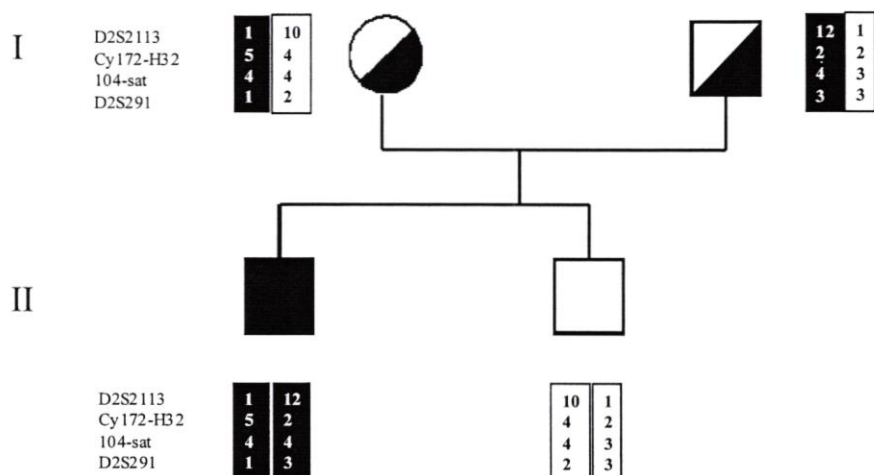
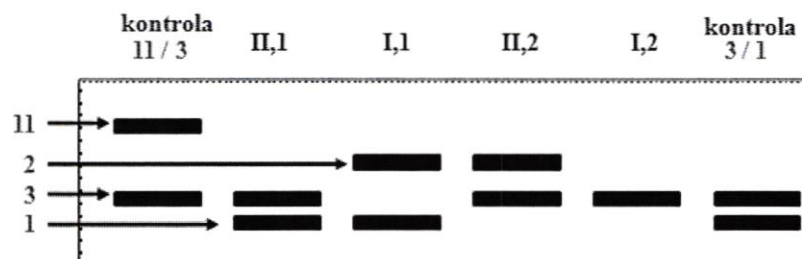
Cy172-H32



104-sat



D2S291



Zadatak 1: Direktna genska analiza LGMD2A-mutacija R49H

R49H mutacija smještena je u egzonu 1 CAPN3 gena. Riječ je o mutaciji u kojoj je jedan nukleotid zamjenjen drugim: CGC > CAC. Na proteinskoj razini aminokiselina arginin (kodirana trinukleotidom CGC) zamjenjena je histidinom (kodirana trinukleotidom CAC).

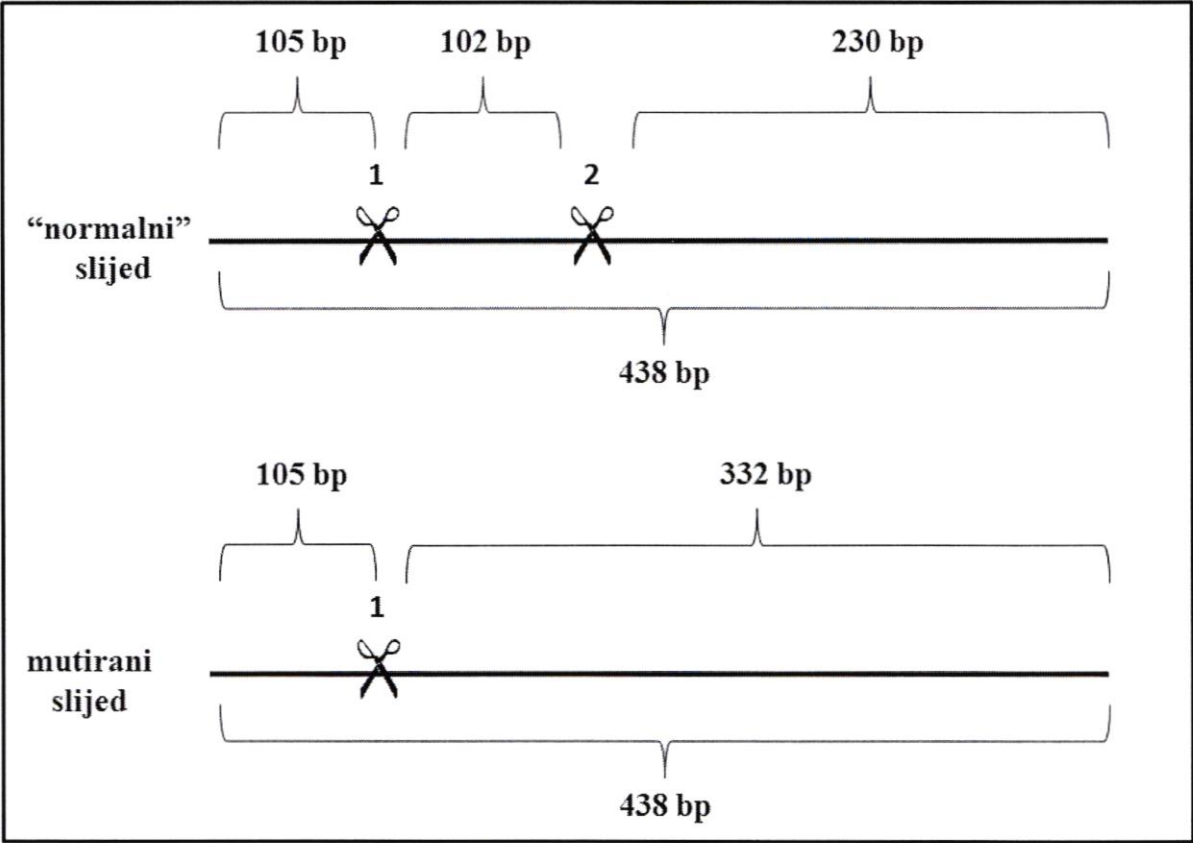
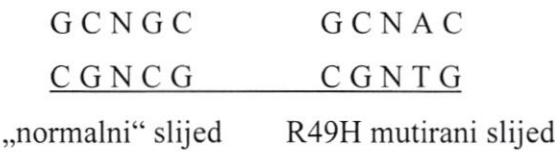
Dijagnostika R49H mutacije osniva se na kombinaciji lančane eakcije polimeraze (PCR), te potom cijepanja PCR produkta specifičnim restrikcijskim enzimom *ItaI*.

Veličina PCR produkta iznosi 438bp.

Unutar umnoženog slijeda postoje dva restrikcijska mjesta za *ItaI* enzim:

1. prisutno i u mutiranom i u „normalnom“ slijedu

2. prisutno samo u „normalnom“ slijedu; prisutnost R49H mutacije „briše“ ovo restrikcijsko mjesto



Slika 4. DNA fragmenti koji nastaju nakon cijepanja PCR produkta *ItaiI* enzimom

Na osnovu navednih podataka, kao i onih na slici 4. odredite veličine DNA fragmenata koje možemo pronaći u:

- zdravog homozigota (wt/wt)
- zdravog heterozigota (R49H/wt)
- bolesnog homozigota (R49H/R49H)

	wt/wt	R49H/wt	R49H/R49H
438bp			

332bp

230bp

105bp

102bp

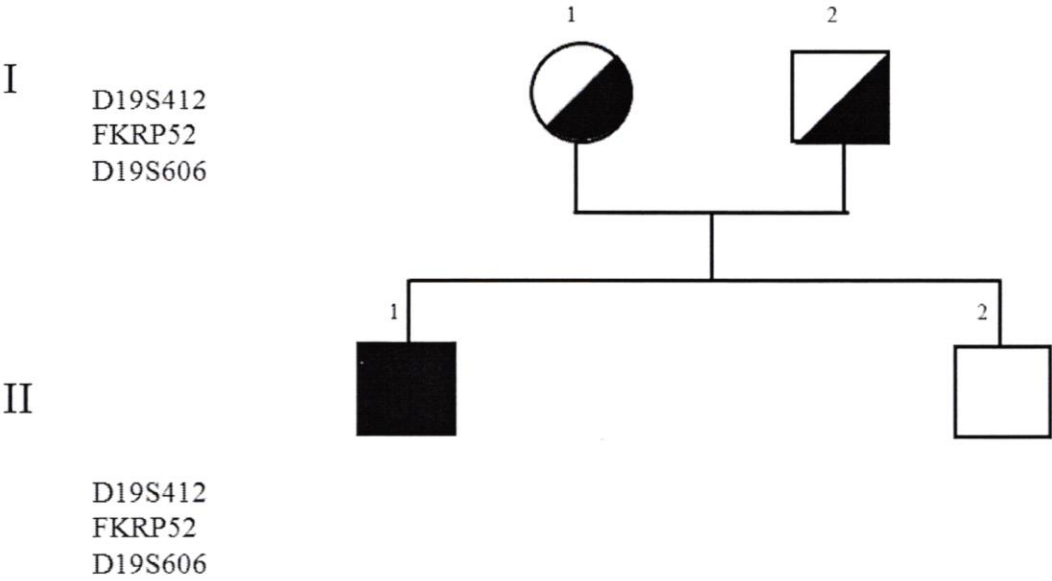
Zadatak 2: Indirektna genska analiza LGMD2I

Pojasna mišićna distrofija tip 2I (LGMD2I) je autosomna recesivna bolest uzrokovana mutacijama u FKRP genu koji kodira istoimeni, FKRP protein.

U haplotip analizi za LGMD2I korištena su 3 mikrosatelitna markera smještena u neposrednoj blizini, odnosno unutar FKRP gena, a ovdje nabrojena od smjera centromere prema telomeri: **D19S412, fkrp52 i D19S606.**

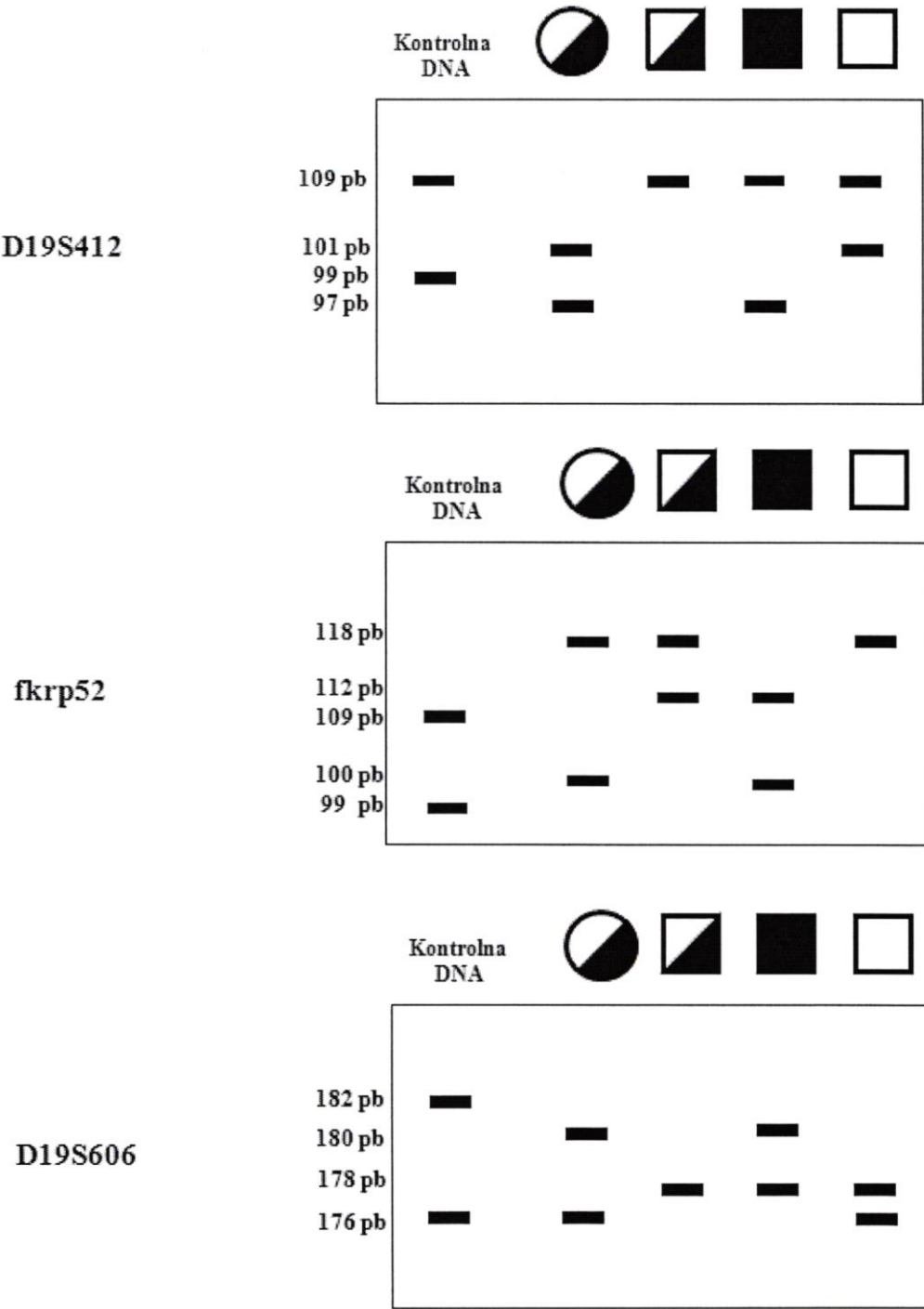
Na slici 5. prikazana je obitelj za koju treba pomoću haplotip analize potvrditi ili opovrgnuti sumnju da je drugo dijete (II-2) boluju od LGMD2I.

ZADATAK JE «OČITATI» REZULTATE ZA SVAKI MARKER, ODREDITI HAPLOTIP ZA SVAKOG ČLANA OBITELJI, TE NA TEMELJU DOBIVENIH HAPLOTIPA ODREDITI DA LI POSTOJI MOGUĆNOST DA DRUGO DIJETE (II,2) BOLUJE OD LGMD2I!



Slika 5.

Rezultati:



APPENDIX

POJASNE MIŠIĆNE DISTROFIJE (LGMD): Definicija, klasifikacija, genetika

Nina CANKI-KLAIN
nina.canki-klain@mef.hr

MEDICINSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
Hrvatski institut za istraživanje mozga
Katedra za medicinsku biologiju

Sažetak. Naziv pojasne mišićne distrofije potječe iz *engl.* limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) što je opisni naziv za mišićne distrofije koje su povijesno zajedno svrstane zbog kliničkih karakteristika koje pretežno zahvaćaju pojasni obruč t.j. muskulaturu zdjelice i ramena s pojavom u dječje ili rano odraslo životno doba, a razlikuju se od češćih mišićnih distrofija koje čine X-vezana DMD/BMD (distrofinopatije) i autosomno dominantna FSHD. LGMD predstavljaju različite bolesti mišića koje karakterizira slabost i propadanje pretežno proksimalnih mišića ramenog i zdjeličnog područja. Klinička slika i tijek bolesti značajno variraju ovisno o genetskom uzročniku, a moguće su velike individualne razlike unutar istog gena i mutacije. Obzirom na način nasljeđivanja, za sada poznamo rjeđu grupu (8 gena) s autosomno dominantnim i češću (16 gena) s autosomno recesivnim načinom nasljeđivanja. Dijagnostika LGMD se danas osniva na komplementarnom kliničkom, genetskom, proteinskom i DNA pristupu što je najučinkovitije u okviru specijaliziranih neuromišićnih centara za rijetke bolesti.

POJASNE MIŠIĆNE DISTROFIJE Limb Girdle Muscular Dystrophies (LGMD)

- Opisni naziv za mišićne distrofije koje su povijesno zajedno svrstane zbog kliničkih karakteristika koje pretežno zahvaćaju pojasni obruč t.j. muskulaturu zdjelice i ramena
- S pojavom u dječje ili odraslo životno doba
- Razlikuju se od češćih mišićnih distrofija koje čine
 - X-vezana DMD/BMD (distrofinopatije) i
 - autosomno dominantna FSHD.

- Predstavljaju različite bolesti mišića koje karakterizira slabost i propadanje pretežno proksimalnih mišića ramenog i zdjeličnog područja.
- Histološki distrofičan proces (nekroza-regeneracija)
- Klinička slika i tijek bolesti značajno variraju ovisno o genetskom uzročniku, a moguće su velike individualne razlike unutar istog gena i mutacije.
- Obzirom na način nasljeđivanja postoji rjeđa grupa (8 gena) s autosomno dominantnim i češća (16 gena) s autosomno recesivnim načinom nasljeđivanja

Osnovne karakteristike LGMD

- Početak u prvim dekadama života
- Simptomi mišićne slabosti u ramenom i /ili zdjeličnom obruču
- Relativno polagan tijek, koji ipak može dovesti do teškog trajnog invaliditeta i često do preuranjenog kraja
- Autosoman recesivan (AR) način nasljeđivanja

Klasifikacija

1884. Erb uveo naziv
 “Dystrophia muscularis
 progressiva”

Erb (1891) prvi pokušao
 klasificirati mišićne distrofije
 Smatrao da se ne radi o jednoj bolesti već o
 grupi poremećaja

ERBOVA KLASIFIKACIJA (1891) PROGRESIVNE MIŠIĆNE DISTROFIJE		
OPIS god.	BOLEST	GLAVNI SIMPTOMI
1868	Duchenneova MD "Paralysie musculaire pseudohypertrophique ou myo-sclérosique"	- Početak u djetinjstvu - Progresivna mišićna slabost - Značajno povećani listovi
1884	Landouzyjeva i Dejerineova "Myopathie atrophique progressive"	- Početak u djetinjstvu ili adolescenciji - Pretežna slabost mišića lica i ramena
1884	Erbov "Juvenile Form" des progressiven Muskeltrophie	- Početak u adolescenciji - Pošteđa lica i selektivna slabost proksimalnih mišića

KLASIFIKACIJA PROGRESIVNIH MIŠIĆNIH DISTROFIJA (PMD)	
Nastavak	
• Bell, J.1943	Klasifikacija PMD na osnovi kliničke slike i načina genetskog nasljeđivanja: XR, AD, AR
• Levison,H.1951	Predlaže naziv pojasnje mišićne distrofije (Limb-Girdle-Muscular Dystrophy (LGMD) za AR oblike PMD
• Walton,J.N. , Natrass, F.J. 1954	Predlažu da se zadrže tri velike skupine PMD: - XR-za Duchenneov opis (DMD) - AD- za miopatiju koju su opisali Landouzy i Dejeurine → facioscapulohumeralna mišićna distofija - AR-za LGMD (Walton &Natrass su smatrali da većina slučajeva LGMD otpada na oblik koji je opisan kao Erbov "mladenački oblik" PMD

GENETIKA LGMD

- Otkriće distrofinskog gena (strategija obrnute genetike) i njegovog oštećenog proteina u DMD/BMD otvorilo je novi put razjašnjenju drugih mišićnih distrofija
- Identifikacija skupina bolesnika iz zajednica s visokim srodstvom (amiši, menoniti, obitelji iz Tunisa, otoka Reunion) i AR MD koje su odgovarale postavljenim kriterijima Waltona i Natrassa (1954)
- Primjena analize genetskog povezivanja na te obitelji (genetski homogene i informativne) imale su za posljedicu:
 - Identificiranje mnogih različitih lokusa
 - Otkriće genetske heterogenosti

Nagli razvoj našeg razumijevanja molekularnih mehanizama mnogih od tih bolesti velikim dijelom dugujemo napretku molekularne tehnologije od 80. i poč. 90. god. prošlog stoljeća.

NAJZNAČAJNIJA GENETSKA OTKRIĆA ZA RAZUMIJEVANJE I DIJAGNOTIKU LGMD

1. Identifikacija distrofinskog gena
2. Otkriće proteina vezanih za distrofin (DAP)
3. Projekt humanog genoma

1. Otkriće distrofinskog gena i njegovog oštećenog proteina u DMD/BMD bolesnika

bilo je odlučujuće u dva pogleda:

- Pokazalo je moć strategije pozicijskog kloniranja
- Dalo novo dijagnostičko sredstvo-analizu proteina

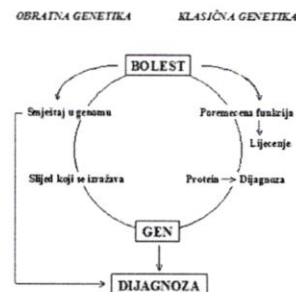
POZICIJSKO KLONIRANJE

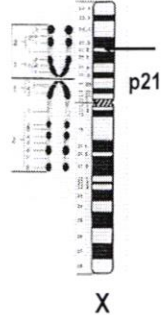
označava postupak koji ima za cilj identifikaciju gena ,čija funkcija i produkt nisu poznati, a sastoji se od:

1. Smještaja gena na određeni kromosom
2. Molekularne analize odgovarajućeg genomskog područja (Collins, 1992)

U slučaju DMD nisu bili poznati niti funkcija niti produkt gena. Zbog toga je trebalo najprije smjestiti gen na određeno područje na X kromosomu. Po načinu nasljeđivanja se znalo da se radi o X kromosomu, ali nije bilo znano gdje: dugi ili kratak krak, regija, pruga, itd. Zatim se na osnovi te informacije uz pomoć raznih metoda molekularne biologije trebalo identificirati traženi gen. Takav pristup kojim se geni kloniraju na osnovi istraživanja genoma, a ne produkta gena najprije se nazivao inverzna, reverzna ili obrnuta genetika

Kasnije je naziv zamijenjen novim točnijim i opisnim terminom **pozicijsko kloniranje** (Collins F. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. Nature Genet. 1992; 1:3-6) .





SMJEŠTAJ DMD gena –prvi korak u pozicijskom kloniranju DMD

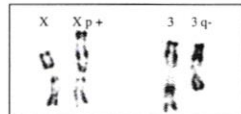
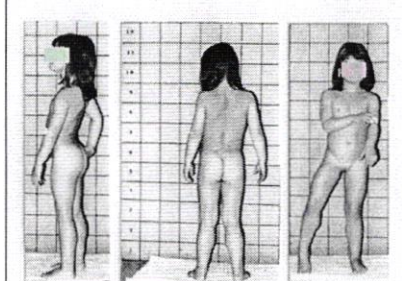


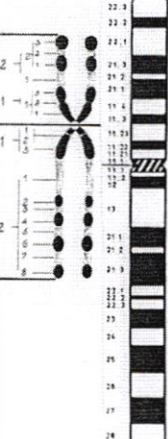
VerellenDumoulin C Lindenbaum R Canki N

t (X;21) (p21)) t (X;1) (p1106 or 21) t (X;3) (p21;q13)

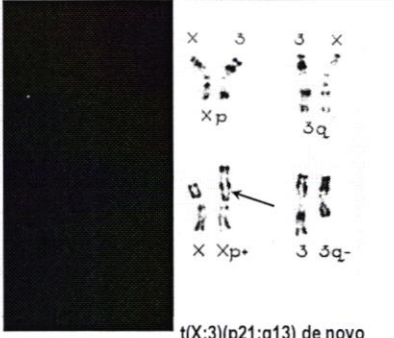
Hum Genet, 1984 J Med Genet, 1979 Ann Genet, 1979

t(X;3)(p21;q13) de novo



GANKI Nina, DUTRILLAUX B., TIVADAR Ivica. — Dystrophie musculaire de Duchenne chez une petite fille porteuse d'une translocation t(X;3) (p21;q13) de novo. Ann. Génét., 1979, 22, n° 1, 35-39.



t(X;3)(p21;q13) de novo

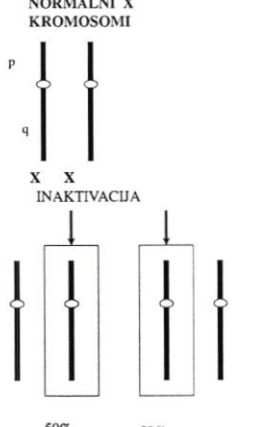
Montaža normalnih i preinačenih kromosoma 3 i X upotrebom RBA* pruga (R-pruge nakon obrade BrdU-om i bojanja narančastim akridinom).



A. Kasna replikacija (t.j. inaktivnost) normalnog X kromosoma.

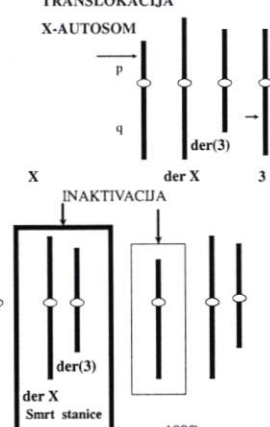
B i C. Kasna replikacija translociranog X kromosoma i širenje "kasnog" izgleda na translocirani dio kromosoma 3

NORMALNI X KROMOSOMI



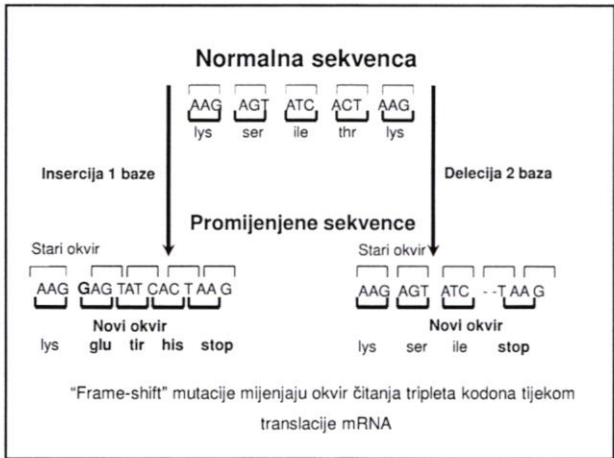
50% 50%

TRANSLOKACIJA X-AUTOSOM

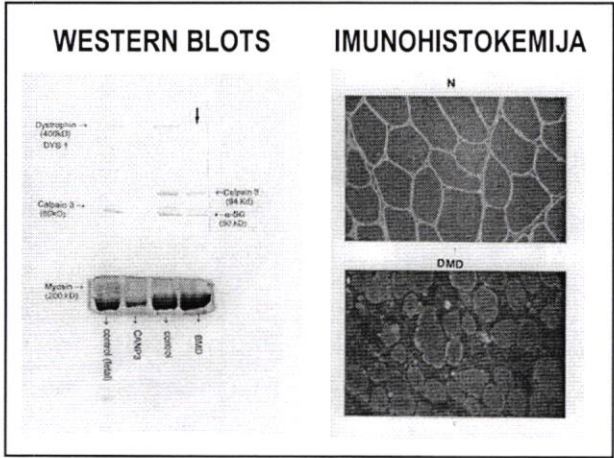


100%

Prekretnicu u razumijevanju nastanka i međusobnog razlikovanja mišićnih distrofija predstavlja otkriće i kloniranje najvećeg poznatog gena u čovjeka - distrofina(Monaco i sur.1986)



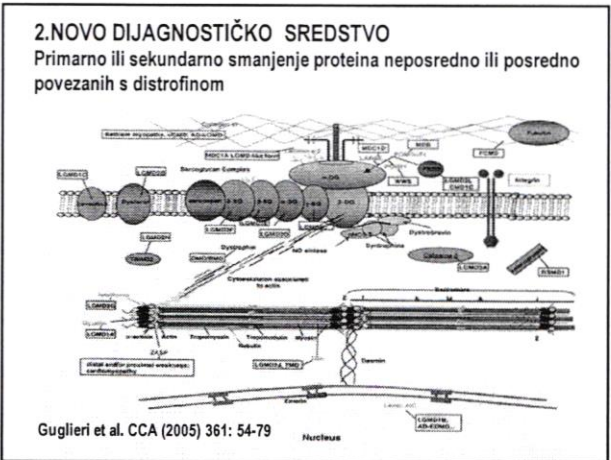
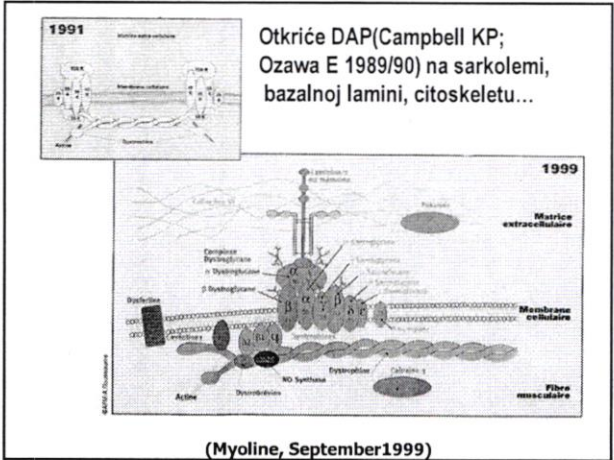
Uvođenje specifične pretrage distrofina u kliničku praksu je pokazalo, da 10-15% bolesnika s dg. LGMD ima zapravo distrofinopatiju. Naime, pretraga je otkrila među muškim bolesnicima potvrdu Duchenneove i Beckerove mišićne distrofije (DMD/BMD) te potvrdu manifestnih nositeljica DMD/BMD gena među bolesnicama s dijagnozom LGMD (Hoffman i sur. 1989)



Otkriće distrofinskog gena i njegovog oštećenog proteina u DMD/BMD

od epohalnog je značenja:

1. Moć strategije pozicijskog kloniranja u identifikaciji gena općenito
2. Novi pristup dijagnostici-proteinsku analizu (primarni ili sekundarni nedostatak ili smanjenje proteina koji su direktno ili indirektno povezani s distrofinom)

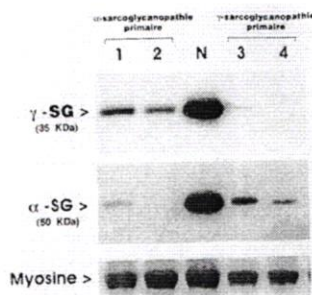


NOVA DIJAGNOSTIČKA SREDSTVA

2. Proteinska analiza (primarno ili sekundarno smanjenje

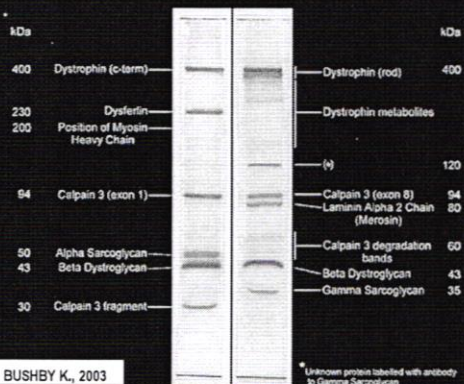
Dystrophin (N-term)	Dysferlin (exon 11-12 junct.)	Laminin $\alpha 2$ chain (200kd)
Dystrophin (rod)	Dysferlin (exon 53)	Laminin $\alpha 5$ chain
Dystrophin (C-term)	Telethonin	Laminin b1 chain
α -Sarcoglycan	Caveolin 3	Laminin g1 chain
β -Sarcoglycan	Myosin heavy chain (neonatal)	β -Spectrin
γ -Sarcoglycan	Emerin	β -Dystroglycan
δ -Sarcoglycan	Lamin A/C	α -Dystroglycan
Calpain 3 (exon 1)	Collagen VI	Desmin
Calpain 3 (exon 8)	Laminin $\alpha 2$ chain (80kd)	Utrophin

WESTERN BLOT



KAPLAN et al., 1996

Representative Lanes from Multiplex Blots



BUSHBY K., 2003

- Molekularne genetske studije su pokazale različite mutacije koje uzrokuju bolesti gena koji kodiraju posve različitu zbirku proteina koji su obuhvaćeni u svim biološkim aspektima mišićne stanice.
- Ovi novo otkriveni geni skeletnih mišića kodiraju vrlo različite proteine s različitim smještajem unutar ili na površini niti skeletnog mišića

GENETSKA PODJELA LGMD

- Dominantni oblici (LGMD1)** obično blaže i rjeđe, <10% svih PMD i
- Recesivni oblici (LGMD2)**, mnogo češći (prevalencija 1:15 000), s geografskim/etničkim razlikama
- 8+16 podgrupa - većina vrlo rijetka

GENETSKA KLASIFIKACIJA-1995 AUTOSOMNE DOMINANTNE (LGMD1) -8

Oznaka bolesti	MIM	Smještaj gena	Oznaka gena / protein
1. LGMD1A	159000	5q31	MYOT / myotilin (titin)
2. LGMD1B	159001	1q11-q21	LMNA / lamin A/C
3. LGMD1C	607780	3p25	CAV3 / caveolin-3
4. LGMD1D	603511	2q35	DES
5. LGMD1E	602067	7q36.3	DNAJB6
6. LGMD1F	608423	7q32.1-q32.2	Nepoznat
7. LGMD1G	609115	4q21	Nepoznat
8. LGMD1H	613530	3p25.1-p23	Nepoznat

GENETSKA KLASIFIKACIJA AUTOSOMNE RECESIVNE (LGMD2) -16

Oznaka bolesti	MIM	Smještaj gena	Oznaka gena / protein
1. LGMD2A	253600	15q15.1	CAPN3 /calpain-3
2. LGMD2B	253601	2p13	DYSF /dysferlin
3. LGMD2C	253700	13q12	SGCG /γ-sarcoglycan
4. LGMD2D	608099	17q12-q21.33	SGCA /α-sarcoglycan
5. LGMD2E	604286	4q12	SGCB /β-sarcoglycan
6. LGMD2F	601287	5q33	SGCD /δ-sarcoglycan
7. LGMD2G	601954	17q12	TCAP / titin-cap (telethonin)
8. LGMD2H	254110	9q31-q34	TRIM32 / tripartite motif containing 32
9. LGMD2I	607155	19q13.3	FKRP / fukutin related protein
10. LGMD2J	608807	2q31	TTN / titin

AUTOSOMNE RECESIVNE (LGMD2)

Nastavak

Oznaka bolesti	Oznaka bolesti	Oznaka bolesti	Oznaka gena / protein
11. LGMD2K (MDDGC1)	609308	9q34	POMT1 /protein O-mannosyltransferase 1
12. LGMD2L (MDDGC1)	611307	11p14.3	ANO5/anoctamin 5
13. LGMD2M (MDDGC4)	607440	9q31-q33	FKTN/fukutin
14. LGMD2N (MDDGC2)	613158	14q24	POMT2/ protein O-mannosyl transferase 2
15. LGMD2O	613157	1p34	POMGNT1/protein O-linked mannose beta 1,2-n-acetylglucosaminyl-transferase 1
16. LGMD2Q	601282	8q24	PLEC

PMD (LGMD) najbolje ilustriraju

- Kliničku, genetsku i patogenetsku heterogenost mišićnih distrofija
- Teškoće u postavljanju točne dg.
- Potrebu za dijagnostičkom strategijom prilagođenom ispitivanoj populaciji
- Potrebu za multidisciplinarnim dijagnostičkim i terapijskim pristupom

DIJAGNOSTIČKE ZAMKE- GENETSKA HETEROGENOST

1. Istu ili sličnu kl.sliku određuje **više gena**
2. Težinu kliničke slike određuje **priroda mutacije istog gena** (DMD/BMD) koja može biti odgovorna i za različit način nasljeđivanja istog gena (OPMD)

GENETSKA HETEROGENOST

LOKUSNA

- LGMD-8+16 različitih lokusa (gena)

ALELSKA

- LGMD2B-MM (dysferlin)
- LGMD2I -MDC1C (FKRP)
- LGMD2J-TMD-CMD1G (TTN)

Više ne vrijedi pojednostavljena jednadžba:
1 bolest =1 gen i

1 gen = 1 bolest

zbog dva istovremena fenomena tj :

- Fenotipske konvergencije (1 bolest =više gena
GENETSKA HETEROGENOST npr : LGMD, itd.)
- Fenotipske divergencije (1 gen = više bolesti-
FENOTIPSKA HETEROGENOST, npr:DMD/BMD

PREMA PODACIMA
 GENETABLE OF NEUROMUSCULAR DISORDERS
<http://www.musclegenetable.fr/>
 29.10.2012.

POZNATO JE

16 Različitih grupa NM bolesti
 681 Bolesti
 319 Različitih gena
 319 Različitih proteina od kojih su
 24 mitohondrijska
 93 Mapirana lokusa čeka identifikaciju gena

DIJAGNOSTIKA LGMD

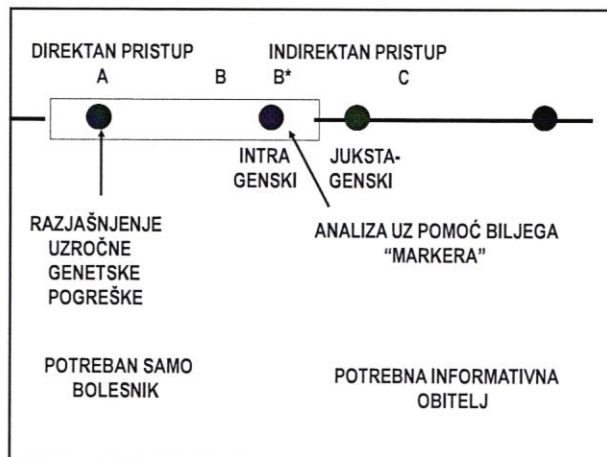
Danas se osniva na komplementarnom

- Kliničkom
- Genetskom
- Proteinskom
- DNA pristupu

što je najučinkovitije u okviru specijaliziranih neuromišićnih centara za rijetke bolesti.

MOLEKULARNE GENETSKE ANALIZE

1. Bolesti s identificiranim genom-
DIREKTAN PRISTUP
2. Bolesti s poznatim lokusom ali još
neidentificiranim genom-
INDIREKTAN PRISTUP



ANALIZA POVEZIVANJA

Uspješnost (točnost) ovisi o više faktora

- Točnost dijagnoze
- Poznavanje lokacije gena na kromosomu
- Dostupnost blizih polimorfnih markera
- Bolesnici bi morali biti "informativni" t.j. heterozigoti za polimorfne markere
- Ne bi smjela postojati genetska heterogenost t.j. više od jednog lokusa za klinički fenotip
- Siguran paternitet

DIREKTNA ANALIZA ili ANALIZA MUTACIJE

Vrste mutacija:
 "klasične"
 nestabilne ili dinamične

- PREDNOSTI pred INDIRECTNOM ANALIZOM**
1. NE OVISI O OBITELJSKOM SASTAVU
 2. PRIMJENLJIVA NA SPORADIČNOG BOLESNIKA

3.Projekt humanog genoma

- Mogućnost lokalizacije bilo kojeg gena gene ukoliko je informativna obitelj

ZAKLJUČAK

Racionalan dijagnostički pristup ovim bolestima je multidisciplinaran :

- Misлити na genetsku bolest
- Klinički podaci
- Način nasljeđivanja
- Najčešća vjerojatna bolest
- Usmjeriti pretrage kako bi se dobila najtočnija informacija, po mogućnosti DNA analizom

Prevalence of the 550delA Mutation in Calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia

Nina Canki-Klain,^{1,2*} Astrid Milic,¹ Biserka Kovac,³ Anuska Trlaja,⁴ Damir Grgicevic,⁵ Niko Zurak,² Michel Fardeau,⁶ France Leturcq,⁷ Jean-Claude Kaplan,⁷ J. Andoni Urtizberea,^{8,9} Luisa Politano,¹⁰ Giulio Piluso,¹¹ and Josue Feingold¹²

¹Croatian Institute for Brain Research, Zagreb University Medical School, Croatia

²Department of Neurology, Zagreb University Medical School, Croatia

³Department of Neurology, Clinical Hospital Osijek, Croatia

⁴Department of Transfusional Medicine, Clinical Hospital Split, Croatia

⁵Croatian Institute of Transfusional Medicine, Zagreb, Croatia

⁶Inserm U523, Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

⁷Laboratoire de Biochimie et Génétique moléculaire, Groupe Hospitalier Cochin, Paris, France

⁸Service de Médecine Physique et de Readaptation de l'Enfant, Hôpital Raymond Poincaré, Garches, France

⁹European Neuromuscular Centre Baarn, The Netherlands

¹⁰Department of Clinical and Experimental Medicine, Section of Cardiomyology and Medical Genetics,

2nd University of Napoli, Italy

¹¹Department of Pathology, 2nd University of Napoli, Italy

¹²Université de Paris, Paris, France

Mutations in the calpain 3 (*CAPN3*) gene are responsible for limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) type 2A. We report five causal mutations: 550delA, Δ FWSAL, R541W, Y357X and R49H found on 45/50 of alleles studied in 25 unrelated families from Croatia. The 550delA mutation was present on 76% of *CAPN3* chromosomes that led us to screen general population for this mutation; 532 random blood samples from three different regions were analyzed using allele-specific PCR. Four healthy 550delA heterozygous were found suggesting a frequency of 1 in 133. All four carriers detected originated from an island and mountain region close to the Adriatic Sea. These findings combined with haplotype analysis confirm that our general population is rather "closed" with a probable founder effect in some parts of

the country. In addition, the high frequency of 550delA mutation found in some neighboring European countries together with the easy detection of the 550delA mutation should streamline genetic analysis, especially bearing in mind the geographic and ethnic origin of the patients. Our results, combined with published haplotype studies suggest that 550delA originated in the Eastern Mediterranean from which it has probably spread widely across Europe. Extending this study to other areas would help to address this epidemiological question. Our data are relevant to accurate genetic counseling and patient testing since we lack sensitive and specific biopsy screening methods for detecting patients with calpainopathy. Thus, detection of patients relies on the direct detection of gene mutation and our findings may be helpful in establishing diagnostic screening strategy.

© 2003 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: limb-girdle muscular dystrophy type 2A; calpain 3 (*CAPN3*) gene; 550delA mutation; epidemiology; screening

Grant sponsor: Ministry of Science and Technology, Republic of Croatia; Grant numbers: 108041/1998, 0108052/2002; Grant sponsor: Association Française contre les Myopathies, France; Grant number: 7233/2000; Grant sponsor: Telethon, Italy; Grant number: C61.

*Correspondence to: Dr. Nina Canki-Klain, M.D., Ph.D., Department of Neurology, University Hospital Zagreb, Medical School, Kispaticeva 12, 10 000 Zagreb, Croatia.
E-mail: nina.canki-klain@zg.hinet.hr

Received 30 December 2002; Accepted 6 May 2003

DOI 10.1002/ajmg.a.20408

© 2003 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

The limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a group of muscular diseases with great clinical variability and genetic heterogeneity. In 1999, Beckmann

et al. [1991] linked a recessive form (LGMD2A, OMIM 253600) to chromosome 15 in a genetic isolate from the Isle of La Réunion. Confirmation of this localisation was subsequently reported in northern Indiana Amish [Young et al., 1992] and Brazilian families [Passos-Bueno et al., 1993]. The identification of causal mutations in the proteolytic enzyme, calpain 3 cosegregating with the disease in LGMD2A families, confirmed its role in the cause of this condition [Richard et al., 1995]. The most extensive mutation study published so far [Richard et al., 1999] was based on the analysis of 181 families from diverse ethnic or geographic origins including 19 countries (Brazil, Bulgaria, Canada, France, Greece, Israel, Italy, Japan, Lebanon, the Netherlands, Poland, Portugal, Russia, Spain, Switzerland, Turkey, United Kingdom, United States and Vietnam). It demonstrated a world-wide distribution of the disease. Special attention was also given to particular genetic

isolates such as the Amish community [Allamand et al., 1995], communities from the Réunion Island [Fardeau et al., 1996] or from the Basque country [Urtasun et al., 1998].

In September 1998, our group initiated a genetic and epidemiological study of muscular dystrophies (MDs) in Croatia. The objective of this 5-year long prospective study was to determine the different types of MDs and their respective frequencies in the population of Croatia (4,381,352 people, census, April 2001, [Reskovic, 2001]). Lack of similar previous studies and the possibility of molecular analysis of only two types of muscular dystrophy in this country (Duchenne/Becker muscular dystrophy and Steinert myotonic dystrophy) led to the development of a specific diagnostic strategy [Canki-Klain et al., 2000] based on the selection of families with at least two affected individuals in order to speed up genetic studies.

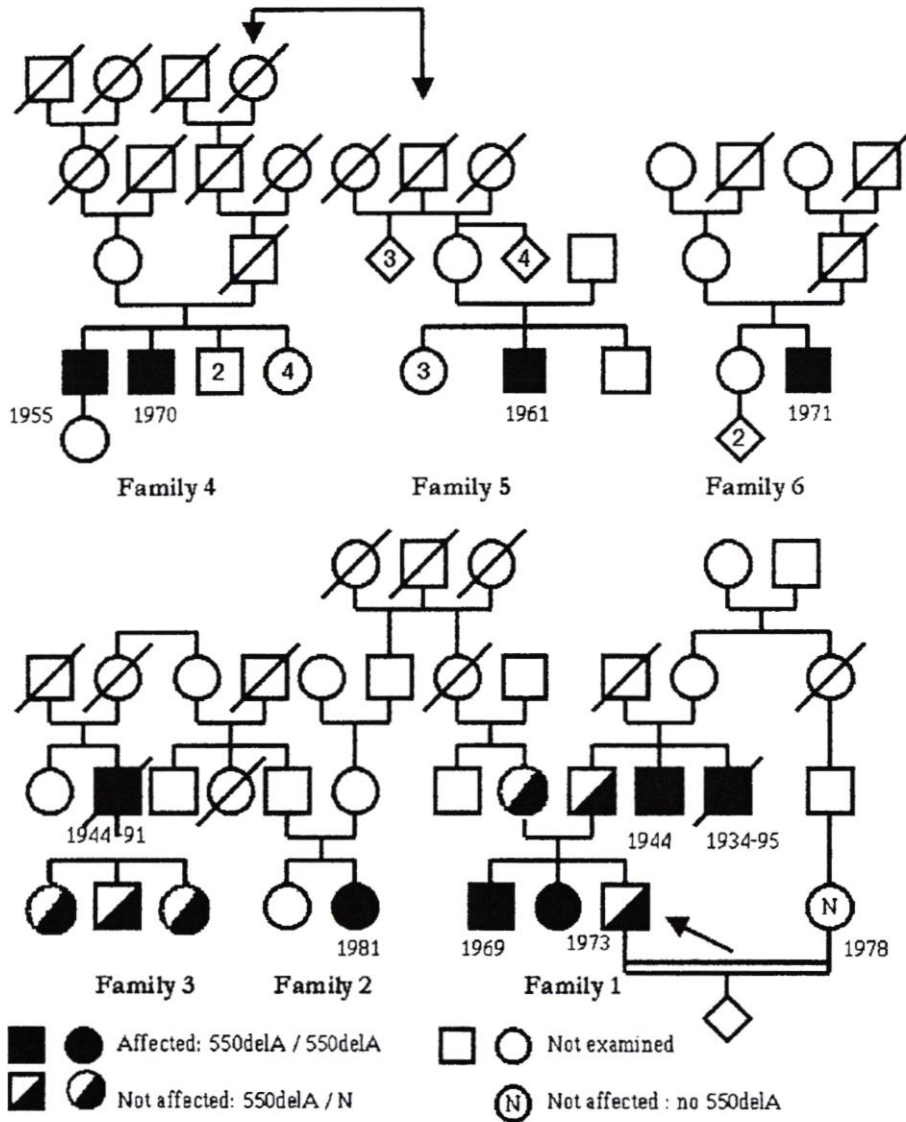


Fig. 1. Pedigree analysis of first six studied families from one small rural community demonstrates links between certain families although consanguinity was found in only one family.

Our attention was drawn by several male and female patients from a small community in Northwestern Croatia affected by a muscular dystrophy similar to that in patients described in the inbred community in the southern part of Réunion Island [Fardeau et al., 1996], as well as to the original description by Erb [1884] of juvenile LGMD. A detailed clinical and genealogical study of the nine patients from six apparently non-related families (Fig. 1) enabled us to identify links between the different nuclear families. Sequence analysis of eight available patients demonstrated the presence of 550delA in exon 4 of calpain3 gene [Canki-Klain et al., 1999] in a homozygous state. The 9th patient, from family 3, died in 1991, but his three children were unaffected 550delA heterozygotes. In addition to these 550delA homozygous patients, we found several other LGMD2A families in which one or both mutated alleles were 550delA.

Based on these findings, we hypothesised that LGMD2A was the most prevalent autosomal recessive muscular dystrophy in Croatia with a high frequency of the 550delA mutation [Milic et al., 2001]. To validate our hypothesis, we began to screen simultaneously the general population for the 550delA mutation [Canki-Klain et al., 2002].

MATERIALS AND METHODS

LGMD Patients

During a 3-year period we selected 25 LGMD2A families using multiple sources of ascertainment (data from Neurology Departments, Specialised Divisions, Associations of Muscular Dystrophy families, records of muscle biopsies, DNA analysis, and family photographs), clinical assessment, mode of inheritance and molecular confirmation of at least one CAPN3 allele. Special emphasis was on individual family studies with intensive search for new secondary cases in the families of the probandi. Analysis of 50 chromosomes for 5 CAPN3 mutations [Milic, 2002] is presented in Table I. Rapid screening for the above mentioned mutations combined with a specific clinical diagnostic strategy has permitted the identification of 90% of CAPN3 mutated alleles in our population. A high prevalence of 550delA mutation (76%) became evident.

Study Population

After informed consent, 532 random blood samples, that is 0.01% of the 4,381, 352 people of Croatia



Fig. 2. Geographical distribution of three blood donor's centres. Concentration of healthy 550 delA carriers is found on one island and mountain region close to Split.

[Reskovic, 2001], were collected from healthy blood donors from three different regions of Croatia (Fig. 2).

Mutation Analysis

Genomic DNA was prepared from peripheral blood samples (K-EDTA) by standard salting-out procedure [Miller et al., 1988]. Detection of the 550delA mutation was performed by allele-specific amplification (ASA) [Ye et al., 1992]. Two hundred fifty nanograms of DNA were amplified by PCR in a 25-μl volume containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM of each dNTP, 1 U of Taq polymerase (Eppendorf, Germany) and 1 pmol of each primer (except 3 pmol of the inner primer for the amplification of the mutated allele). Beside the usual primers: 5'-GAG GAA TGT GGA GGA AGG AC-3' and 5'-TTC CTG TGA GTG AGG TCT CG-3' [Richard et al., 1995] the amplification mixture also contained two short inner primers: 5'-TGA CTG CCT GCC AAC-3', for the amplification of normal size allele and 5'-GTT GAT TGT TGT ACG TG-3', for the amplification of a mutated allele [Pogoda et al., 2000]. After 5 min denaturation at 94°C, thermocycling was performed as follows: first 5 initial cycles of 93°C (1'), 65°C (45'') and 72°C (1') were followed by 25 cycles of 93°C (1'), 55°C (45'') and 72°C (1'). After PCR, the product was electrophoresed on a 2% horizontal agarose gel stained with ethidium bromide or on 8% polyacrylamide gel stained with silver.

RESULTS

Figure 3 illustrates the detection of the 550delA mutation by allele-specific amplification (ASA). Close to the full-size band of 292 bp, a 142 bp band was amplified in the presence of a mutated allele and a 178 bp band in the presence of a normal allele. Table II summarises the results of the study. The detection of four healthy 550delA heterozygous individuals makes the frequency of 1 in 133 (0.75%) in our general population. When analysed by region (Table II; Fig. 3), there is striking variability. In 198 blood donors from the capital city (Zagreb) no carrier was found. Similarly, no carriers were found in a small sample of 69 donors from the

TABLE I. Molecular Analysis of 25 LGMD2A Families (50 CAPN3 Chromosomes) in the Population of Croatia

Mutations	Exon	No. of CAPN3 chromosomes (no. of homozygous probands)	Frequency (%)
550delA	4	38/50(14)	76
ΔFWSAL	4	2/50	4
R541W	13	3/50	6
Y357X	13	1/50	2
R49H	1	1/50	2
Undefined one of 2 alleles		5/50	10
Total		50/50	100

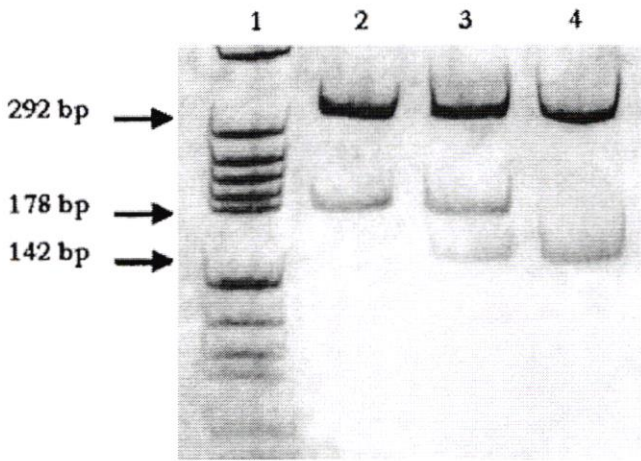


Fig. 3. Detection of 550delA mutation by allele specific amplification (ASA) on silver stained polyacrylamide gel. **Lane 1:** DNA Molecular Weight Marker V (Roche); **(lane 2)** ASA-PCR product of wild type DNA (wt/wt); **(lane 3)** ASA-PCR product of 550delA heterozygote (550delA/wt); **(lane 4):** ASA-PCR product of 550delA homozygote (550delA/550delA). Arrows indicate: a full-size band of 292 bp; a 142 bp amplified band of mutated allele, and a 178 bp band of normal allele.

North-East region of Osijek. All four carriers were from the pool of 265 blood donors (1 in 66). Three of them originate from one island and the last one from a mountainous region close to the Adriatic Sea in the vicinity of Split. All four carriers were examined and were found unaffected.

DISCUSSION

Mutations in the calpain 3 gene of LGMD2A patients were first identified by Richard et al. [1995]. In 1999 [Richard et al., 1999], a total of 114 variants were described in the *CAPN3* gene: 97 distinct causal mutations, 12 polymorphisms and 5 variants that could not be classified as either mutation or polymorphism. Since then, at least 17 novel mutations have been identified [Chou et al., 1999; Minami et al., 1999; Chae et al., 2001; Milic et al., 2002], two of them in patients from Croatia. According to Richard et al. [1999] most mutations 68/97 (70%) represent private variants, although certain mutations were found more frequently. Among these particular mutations 11/97 (11%) are associated with a founder effect, and 7/97 (7%) are really recurrent. Among the 114 distinct calpain three muta-

TABLE II. Frequency of Healthy 550delA Heterozygotes on 532 Random Blood Samples Collected From February 7 to September 19, 2001

City	No. of samples	No. (%) 550delA/wt	95% confidence interval (%)
Osijek	69	0/69 (0)	0.00–5.34
Split (+islands)	265	4/265 (1.52)	0.41–3.86
Zagreb	198	0/198 (0)	0.00–1.86
Total	532	4/532 (0.75)	0.20–1.92

tions published so far world-wide [Chou et al., 1999; Minami et al., 1999; Richard et al., 1999; Chae et al., 2001; Milic et al., 2002], the 550delA mutation, the most prevalent in Croatia, was found in patients originating from 10 different European countries (Table III). The highest frequency after Croatia is in Italy [Politano et al., 2001] where six of 14 non-related families carry the same mutation in a homozygous state, and in Russia were 8 of 14 unrelated families were homozygous for 550delA [Pogoda et al., 2000]. In addition, one of two families in Slovenia was homozygous [Meznaric-Petrusa et al., 2002]; three unrelated families with compound heterozygotes living in Croatia are originally from Bosnia and Herzegovina and the same mutation is found in 50% LGMD2A of patients in consanguineous Turkish families [Topaloglu et al., 1997].

Several authors [Dincer et al., 1997; Richard et al., 1997; Pogoda et al., 2000] have suggested that this mutation may be an old mutation since the marker haplotypes flanking the disease locus in some available families from France, Sicily, Turkey and Russia suggested a single mutational event rather than a recurrent coincidental mutation. To test this hypothesis we performed haplotype analysis of all available Croatian families (data not shown) using five microsatellite markers: D15S514, D15S779, D15S782, D15S780 and D15S778. These markers are flanking the *CAPN3* gene, and were used in previous haplotype studies by Richard et al. [1999]; Topaloglu et al. [1997]; and Pogoda et al. [2000]. Comparison of our and other published data showed complete core haplotype identity suggesting that the 550delA may have arisen on an ancestral chromosome in the Mediterranean population in the past. Unfortunately, the lack of further published observations does not permit any certain conclusion as to the origin of this mutation. Nevertheless, these findings

TABLE III. Incidence of 550delA Mutation in Different Countries

Family origin	No. of LGMD2A families including / homozygous probands/	References
Bosnia and Herzegovina	4/1/	Canki-Klain [this issue]
Croatia	20/13/*	Canki-Klain et al. [1999, 2000, 2002]; Milic et al. [2001]
France	5	Richard et al. [1995, 1997, 1999]
Greece	1	Bushby [personal communication]
Italy	14/6/	Politano [this issue]
Netherlands	2	MGC Leiden (cit. Richard et al. [1999]; Ginjaar et al. [2002])
Poland	1	Ginjaar et al. [2002]
Russia	14/8/	Pogoda et al. [2000]
Slovenia	2/1/	Meznaric-Petrusa et al. [2002]
Turkey	5/5/	Dincer et al. [1997]; Topaloglu et al. [1997]

*One affected compound heterozygous patient without 550delA is not included, that makes difference in total number of LGMD2A families in Tables I and III.

have practical implications: we would propose that a rational first step in the diagnosis of suspected calpainopathy in patients originating from the eastern Mediterranean would be to test for this 550delA mutation, which is relatively easy and quick to detect using the methods described here.

Our study of the carrier frequency of this mutation, and the data on the geographic concentration of the origin of the patients harbouring the 550delA mutation, (mainly in closed mountainous regions and surrounding islands) are highly suggestive of the formation of a genetic isolate. A combination of this founder effect and genetic drift may explain the distribution of the mutation. This point is very important to consider for accurate genetic counselling and testing patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Prof. Kate Bushby for personal communication and helpful manuscript suggestions. This study was supported in part by grants number 108041/1998; 0108052/2002 from the Ministry of Science and Technology Republic of Croatia, by grant no 7233/2000 of Association Française contre les Myopathies, France and by Telethon, Italy (grant C61 to LP). A Milic is predoctoral fellow from Croatian Ministry of Science and Technology and Zagreb University School of Medicine.

REFERENCES

- Allamand V, Broux O, Bourg N, Richard I, Tischfield JA, Hodes ME, Conneally PM, Fardeau M, Jackson CE, Beckmann JS. 1995. Genetic heterogeneity of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a genetic isolate (Amish) and evidence for a new locus. *Hum Mol Genet* 4:459–463.
- Beckmann JS, Richard I, Hillaire D, Broux O, Antignac C, Bois E, Cann H, Cottingham RW Jr, Feingold N, Feingold J, Kalil J, Lathrop GM, Marcadet A, Masset M, Mignard C, Passos-Bueno M.-R, Pellerain N, Zatz M, Dausset J, Fardeau M, Cohen D. 1991. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci* 312:141–148.
- Canki-Klain N. 2002. Od Erbove "juvenilne forme" progresivne mišićne distrofije do kalpainopatije. *Acta Medica Saliniana* 31(1):9–10.
- Canki-Klain N, Zurak N, Leturcq F, Recan D, Kaplan JC, Urtizbarea JA, Potocki K, Milicic D. 1999. Limb-girdle muscular dystrophy with calpain deficiency (LGMD 2A) in Croatia: A survey in a small rural community. *Neuromuscular Disord* 9:502, D.P.7.
- Canki-Klain N, Milic A, Leturcq F, Zurak N. 2000. Clinical, genetic and epidemiological study of calpainopathy (LGMD2A) in Croatia. *Neurol Croat* 49(Suppl. 3):78–79.
- Canki-Klain N, Milic A, Kovac B, Trlaja A, Grgicevic D, Zurak N, Feingold J. 2002. Carrier frequency of 550delA mutation of CAPN3 gene in Croatia. *Acta Myologica* XXI:73.
- Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama K, Igarashi F, Nonaka I. 2001. Calpain 3 gene mutations: Genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 11:547–555.
- Chou F-L, Angelini C, Daentl D, Garcia C, Greco C, Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzinska A, Wessel H, Hoffman EP. 1999. Calpain III mutation analysis of a heterogeneous limb-girdle muscular dystrophy population. *Neurology* 52:1015–1020.
- Dincer P, Leturcq F, Richard I, Piccolo F, Yalnizoglu D, De Toma C, Akoren Z, Broux O, Deburggrave L, Roudaut C, Urtizbarea A, Jung D, Tan E, Jeanpierre M, Campbell KP, Kaplan JC, Beckmann JS, Topaloglu H. 1997. A biochemical, genetic, and clinical survey of autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies in Turkey. *Ann Neurol* 42:222–229.
- Erb WH. 1884. Über die "juvenile Form" der progressiven Muskelatrophie und ihre Beziehungen zur sogenannten Pseudohypertrophie der Muskeln. *Dtsch Arch Klin Med* 34:467–519.
- Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, Feingold N, Feingold J, Mignard D, De Ubeda B, Collin H, Tome FMS, Richard I, Beckmann J. 1996. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy: Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain* 119:295–308.
- Ginjaar HB, Frankhuizen WS, Mos de M. 2002. Classification of limb girdle muscular dystrophy types 1C, 2A and 2B based on protein and/or DNA studies. *Neuromuscul Disord* 12:731, D.P.3.1.
- Meznaric-Petrusa MMP, Zidar J, Zupancic N. 2002. Clinical, molecular and genetic features of calpainopathy in Slovenia. *Neuromuscul Disord* 12:731, D.P.3.3.
- Milic A. 2002. Limb-girdle muscular dystrophy's in Croatia caused by mutations in gene coding for calpain 3 (CAPN3) (Croatian). Master of Science Thesis, University of Zagreb, 2002.
- Milic A, Kovac B, Leturcq F, Zurak N, Canki-Klain N. 2001. High incidence of 550 delA mutation in limb-girdle muscular dystrophy types 2A (LGMD2A) in Croatia. *Eur J Hum Genet* 9(Suppl 1):278, P0909.
- Milic A, Piluso G, Ventriglia V, D'Amico F, Kovac B, Trlaja A, Mitrovic Z, Zurak N, Politano L, Canki-Klain N. 2002. Mutation spectrum of CAPN3 gene in LGMD2A patients in Croatia. *Eur J Hum Genet* 10(Suppl 1):181–182. P0512.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Minami N, Nishino I, Kobayashi O, Ikezoe K, Goto Y, Nonaka I. 1999. Mutations of calpain 3 gene in patients with sporadic limb-girdle muscular dystrophy in Japan. *J Neurol Sci* 171:31–37.
- Passos-Bueno MR, Richard I, Vainzof M, Fougereuse F, Weissenbach J, Broux O, Cohen D, Akiyama J, Marie SKN, Carvalho AA, Guilherme L, Kalil J, Tsanacis AMT, Zatz M, Beckmann JS. 1993. Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. *J Med Genet* 30:385–387.
- Pogoda TV, Krakhmaleva IN, Lipatova NA, Shakhovskaya NI, Shishkin SS, Limborska SA. 2000. High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD Patients from Russia. *Hum Mutat* 15:295–300.
- Politano L, Nigro V, Petretta V, Passamano P, Piluso P, Belsito B, Esposito MG, Ventriglia V, Aurino S, Palladino A, Comi LI, Nigro G. 2001. Clinical, genetic and epidemiological aspects of limb-girdle muscular dystrophy in southern Italy. *BAM* 11:63.
- Reskovic V. 2001. Hrvatska ima 4,381.352 stanovnika. *Jutarnji list* 01. 06:7.
- Richard I, Broux O, Allamand V, Allamand V, Fougereuse F, Chiannilkulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, Hillaire D, Passos-Bueno MR, Zatz M, Tischfield JA, Fardeau M, Jackson CE, Cohen D, Beckmann JS. 1995. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3-cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 81:27–40.
- Richard I, Brenguier L, Dincer P, Roudaut C, Bady B, Burgunder JM, Chemaly R, Garcia CA, Halaby G, Jackson CE, Kurnit DM, Lefranc G, Legum C, Loiselet J, Merlini L, Nivelon-Chevallier A, Ollagon-Roman E, Restagno G, Topaloglu H, Beckman JS. 1997. Multiple independent molecular aetiology for limb-girdle muscular dystrophy type 2A patients from various geographical origins. *Am J Hum Genet* 60:1128–1138.
- Richard I, Roudaut, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JEMA, Anderson LVB, Beley C, Cobo A-M, de Diego C, Eymard B, Gallano P, Ginjaar HB, Lush A, Politt C, Topaloglu H, Urtizbarea A, Visser M, Van der Kooi A, Bushby K, Bakker E, Lopez de Munain A, Fardeau M, Beckmann JS. 1999. Calpainopathy—A survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet* 64:1524–1540.
- Topaloglu H, Dincer P, Richard I, Ackoren Z, Alehan D, Ozme S, Caglar M, Karaduman A, Urtizbarea A, Beckmann JS. 1997. Calpain-3 deficiency causes a mild muscular dystrophy in childhood. *Neuropediatrics* 28:212–216.
- Urtasun M, Saenz A, Roudaut C, Poza JJ, Urtizbarea JA, Cobo A-M, Richard I, Garcia Bragado F, Leturcq F, Kaplan JC, Marti Maso JF, Beckmann JS, Lopez de Munain A. 1998. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). *Brain* 121:1735–1747.
- Ye S, Humphries S, Green F. 1992. Allele specific amplification by tetra-primer PCR. *Nucleic Acids Res* 20:1152.
- Young K, Foroud T, Williams P, Jackson CE, Beckmann JS, Cohen D, Conneally PM, Tischfield J, Hodes ME. 1992. Confirmation of linkage of limb-girdle muscular dystrophy, type 2, to chromosome 15. *Genomics* 13:1370–1371.

Calpainopathy (LGMD2A) in Croatia: Molecular and Haplotype Analysis

Astrid Milić¹, Nina Canki-Klain^{1,2}

¹Croatian Institute for Brain Research, Zagreb University School of Medicine, Zagreb; and

²Division of Neurogenetics, Department of Neurology, Zagreb University School of Medicine, Zagreb, Croatia

Aim	To determine types and frequency of CAPN3 mutations in 29 unrelated Croatian families, analyzed during 6-year prospective and ongoing genetic and epidemiological study of muscular dystrophies in Croatia.
Methods	Mutation analysis included allele-specific polymerase chain reaction (PCR) or combination of PCR and restriction fragment length polymorphisms (RFLP) methods. Haplotype analysis was performed by PCR and DNA electrophoresis using 5 highly polymorphic markers flanking CAPN3 gene locus.
Results	Mutation analysis revealed the presence of 6 different CAPN3 mutations (550delA, R541W, P82L, delFWSAL, R49H, Y537X), accounting for 94.8% of CAPN3 chromosomes in the studied population. 550delA was the most frequent mutation, found in 43/58 (74%) CAPN3 chromosomes, whereas the frequency of other five mutations ranged from 2-9%. Haplotype analysis of 38 chromosomes carrying 550delA mutation showed the presence of the same haplotype on 66% of analyzed chromosomes.
Conclusions	The present data, together with our previously published results, explain the frequency and the distribution of the 550delA mutation in Croatia by founder effect and genetic drift. Results of haplotype study are in favor of the hypothesis that 550delA is an old, rather than a recurrent mutation. The findings are important for effective diagnostic screening of CAPN3 gene in Croatia and neighboring countries, as well as for accurate genetic counseling.

Calpainopathy, limb girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A; OMIM 253600), or Erb's muscular dystrophy is an autosomal recessive muscular disorder characterized by symmetrical and selective atrophy of proximal limb muscles. The clinical features have been described by Erb in 1884 (1) as juvenile progressive muscular dystrophy, whereas the name LGMD2A dates from 1995 when Bushby and Beckmann (2) proposed a locus-based classification of LGMDs. In 1991, this muscular dystrophy was linked to chromosome 15q in patients from Reunion Island (3). Further linkage analysis defined 15q15.1-15.3 interval as the one containing LGMD2A disease locus (4). The analysis of genes from this region led

to the identification of CAPN3 gene mutations as the cause of LGMD2A (5). CAPN3 gene encodes calpain 3 (p94, OMIM 114240), muscle-specific member of the calpain family, which made LGMD2A the first described muscular dystrophy caused by enzymatic, rather than structural protein defect. Calpainopathy is considered to be the most frequent autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (6) and accounts for 39% of all LGMDs (7).

Since 1995, more than 150 different CAPN3 mutations of all types have been found worldwide (6-12). Although the majority of mutations represent private variants, some mutations have been found more frequently. However, fre-

quencies and types of CAPN3 mutations found in different populations vary according to the geographic and ethnic origin of the studied population. These findings, together with uncertainty of calpain 3 protein analysis (13,14), show how important accurate knowledge of mutation spectrum in some populations is for developing fast, cheap, and non-invasive diagnostics of LGMD2A.

The aim of our study was to determine the CAPN3 mutation spectrum in Croatia, their frequency, and geographical distribution, as well as to speculate on the origin of some mutations by haplotype analysis.

Materials and Methods

Patients

During a 6-year period, 40 patients from 29 unrelated LGMD2A families (25 male, 15 female) and their 34 healthy relatives were selected for CAPN3 mutation analysis. The selection of patients was done using a specific strategy based on detailed clinical features, progression of disease, creatine phosphokinase (CPK) values, electromyography, computerized transverse tomography (CT scan) of muscles, and genealogical study. Special emphasis was put on intensive search for new secondary cases in the family of the proband in order to determine the mode of inheritance (15,16). Each patient participating in the study signed the informed consent before giving the blood sample for molecular analysis.

Eighty seven individuals were selected for haplotype analysis: 35 patients from 25 families; 32 healthy family members, 25 of them being heterozygous for one of CAPN3 mutations; 2 healthy 550delA heterozygotes (children of deceased homozygous proband) and; 18 healthy individuals from a population study (16), 2 of them being 550delA carriers. A total of 174 chromosomes were analyzed: 92 with one of 6 CAPN3 mutations, 7 with unknown mutation(s), and 75 wild type chromosomes.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples by standard salting-out procedure (17).

Mutation Analysis

550delA and Y537X. Polymerase chain reaction (PCR) mixture contained 250 ng of DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ (3.0 mM in case of Y537X), 200 µM of each

dNTP (Eppendorf, Hamburg, Germany), 1 U Taq polymerase (Eppendorf), 1 pmol of each external primer (5), and two short inner primers. For 550delA mutation, the previously described inner primers were used (18), whereas in case of Y537X, internal primers were generated by our group: 5'-AGG AGC AAA ACC TAC AT-3' for the amplification of normal size allele (1 pmol) and 5'-TCC CGC ATG TTG ATT TA-3' for the amplification of a mutated allele (3 pmol). After 5-minute denaturation at 94°C, 550delA thermocycling was performed as follows: first 5 initial cycles of 93°C (1'), 65°C (45''), and 72°C (1') were followed by 25 cycles of 93°C (1'), 55°C (45''), and 72°C (1'). The Y537X thermocycling conditions differed only in annealing temperatures (62°C in the first 5 cycles, 52°C in the remaining 25 cycles).

R541W, R49H, P82L, and delFWSAL. First, 250 ng of DNA were amplified by PCR in a 25-µL volume containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP (Eppendorf), 1 Unit of Taq polymerase (Eppendorf), and 3 pmol of each primer (5). After 5-minute denaturation at 94°C, thermocycling was performed in 35 cycles as follows: 93°C (1'), 62°C (45''), and 72°C (1'). Subsequently, PCR products were incubated with *Bsp* LU11 I (Roche, Mannheim, Germany) for R541W, *Ita* I (Roche) for R49H, or *Msp* I restriction enzyme (Promega, Mannheim, Germany) for P82L detection, according to manufacturer's recommendations. DelFWSAL PCR product was electrophoresed on 8% polyacrylamide gel and stained with silver.

Haplotype Analysis

Haplotype analysis was performed using 5 highly polymorphic microsatellite markers, flanking CAPN3 gene locus on chromosome 15q15.1-15.3: D15S514, D15S779, D15S782, D15S780, and D15S778 (4). The marker genotyping consisted of PCR reaction for each marker, DNA-PAGE and silver staining. PCR amplification of DNA (200 ng) was performed in 25 µL reaction mix containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP (Eppendorf), 1 U Taq polymerase (Eppendorf), and 3 pmol of each primer. The primer sequences for each microsatellite marker, as well as marker allele sizes and its frequencies, were found on www.gdb.org and www.cephb.fr. Initial 5-minute denaturation on 94°C was followed by 30 cycles

of 92°C (30''), 58°C (D15S514, D15S779, and D15S780) or 60°C (D15S782 and D15S778) (30''), and 72°C (30'').

Results

The following mutations were detected in the study sample: 550delA, R541W, P82L, delFWSAL, R49H, and Y537X (Table 1, Fig. 1).

Thirty-eight 550delA chromosomes included in the haplotype study belonged to 12 homozygotes, 11 compound heterozygotes, 1 healthy heterozygote (child of deceased homozygous proband), and two 550delA carriers from population study (16). Five different haplotypes were obtained in 31/38 chromosomes with 550delA mutation (Table 2, Fig. 2). In 7/38 chromosomes belonging to 5 solitary compound heterozygous probands (550delA/R541W; 550delA/R541W; 550delA/R49H; 550delA/delFWSAL; 550delA/unknown mutation) and 2 healthy 550delA heterozygotes, haplotype phases could not be established. However, in 4 solitary patients and both carriers, it was possible to theoretically construct the most frequent haplotype. One patient (550delA/R49H) did not show any of the analyzed haplotypes.

Three families with R541W showed two different haplotypes (Table 2, Fig. 2), with difference only in the first marker (2-9-4-4-2 and 5-9-4-4-2). In additional two families, presented by

solitary probands, we were able to theoretically construct a 2-9-4-4-2 haplotype.

Haplotypes obtained for delFWSAL, P82L, and Y537X, as well as 2 haplotypes for 2 chromosomes carrying unknown mutation(s) are presented in Table 2 and Figure 2.

Haplotype analysis also included 75 wild type chromosomes. In 30 of them, haplotype phases could be established (Fig. 2). Their analysis enabled us to compare wild type haplotypes with the most frequent 550delA haplotype.

Discussion

Mutation analysis of 29 Croatian LGMD2A families revealed the presence of 6 different mutations with the predominance of 550delA (16), accounting for 74% of the analyzed CAPN3 chromosomes. The same mutation was described in a few families from France and Netherlands, but its higher frequency was observed in Slavic populations and in several neighboring countries from eastern Mediterranean part of Europe. In Bulgaria, 550delA was found in 9 out of 12 LGMD2A families (19). In Russia, 8 out of 14 families had 550delA homozygous patients (18), whereas in Turkey 550delA mutation was reported on 36% of 44 CAPN3 chromosomes (20). In Italy, 550delA was found on 23% mutated alleles from 56 families (7), but it is worth mentioning that a large proportion of mutant alleles (40%) in one of the northeastern regions of the country

Table 1. CAPN3 mutations found on 58 chromosomes from 29 unrelated limb girdle muscular dystrophy type 2A (LMGD 2A) families from Croatia

Mutation	Consequence	Exon	Number of CAPN3 chromosomes	Frequency (%)
R49H (146G>A)	missense mutation Arg (R) → His (H)	1	1/58	1.7
P82L (245C>T)	missense mutation Pro (P) → Leu (L)	1	3/58	5.2
550delA	frameshift mutation	4	43/58	74.1
delFWSAL (598-612del)	5 aminoacid deletion (in frame) Phe(F), Trp(W), Ser(S), Ala(A) and Leu(L)	4	2/58	3.5
Y537X (1611C>A)	nonsense mutation Tyr (Y) → STOP(X)	13	1/58	1.7
R541W (1621C>T)	missense mutation Arg (R) → Trp (W)	13	5/58	8.6
Unknown			3/58	5.2
Total			58/58	100.0

Table 2. Results for 40/52 CAPN3 chromosomes included in haplotype study

Parameter	550delA					Mutation					unknown	
	25	2	2	1	1	R541W	delFWSAL	P82L	Y537X		1	1
Number of chromosomes	25	2	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1
Marker:												
D15S514	2	8	2	5	5	2	5	2	4	5	2	5/2
D15S779	9	9	9	9	10	9	9	9	9	10	9	9
D15S782	3	3	4	3	3	4	4	3	5	5	5	7
D15S780	4	4	4	4	4	4	4	4	1	4	3	3
D15S778	1	1	1	1	1	2	2	3	2	3	4	4

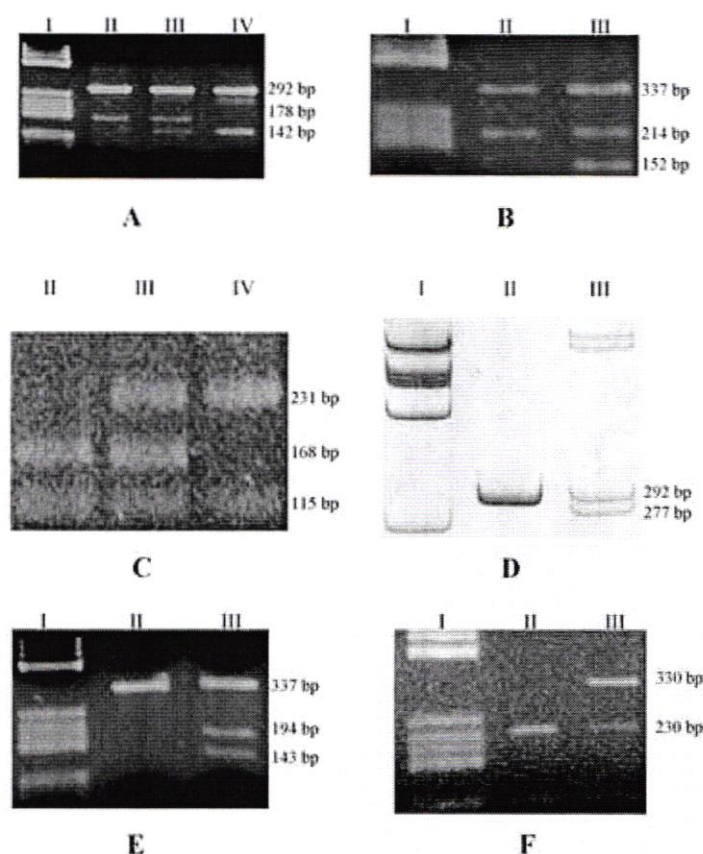


Figure 1. Six CAPN3 mutations found in Croatia. Roman numerals indicate: I) DNA molecular weight marker (Roche, Mannheim, Germany); II) Wild type sample (wt/wt); III) Heterozygous sample (mutation/wt); IV) Homozygous sample (mutation/mutation). **A.** 550delA: beside the full-size band of 292 bp, a 142 bp band was amplified in the presence of a mutated allele and a 178 bp band in the presence of normal allele. **B.** Y537X: close to full-size band of 337 bp, a 214 bp band was amplified in the presence of a normal allele and 152 bp band in the presence of a mutated allele. **C.** P82L: wild type PCR product was cut on 168 and 115 bp bands, in the presence of mutated allele 231 and 115 bp bands were observed. **D.** delFWSAL: polyacrylamide gel separation of the wild type polymerase chain reaction (PCR) resulted in one normal (292 bp) band, whereas in the presence of mutation, additional band of 277 bp was detected. **E.** R541W: in the presence of mutated allele PCR product was cut on 194 and 143 bp bands, whereas wild type allele remained the same. **F.** R49H: in the presence of mutation PCR product was cut on 330 and 230 bp bands, in case of normal allele only 230 bp band was present.

(Friuli) were due to 550delA mutation (6). In addition, 550delA mutation was reported in one family from Greece (8), 2 families from Slovenia (21), 2 Czech compound heterozygous patients (12), and in 3 compound heterozygotes from Croatia originating from Bosnia and Herzegovina. As far as we know, 550delA was not reported in other parts of the world. Based on these data, we would like to propose that the first step in the diagnostics of suspected calpainopathy in patients from eastern Mediterranean and southeastern Europe would be testing for this mutation, using simple and rapid method of allele-specific amplification.

R541W was the second most frequent mutation in Croatia, found in 5 LGMD2A families. It was also found in Italy (7) and Netherlands (www.dmd.nl). Interestingly, 3 families with R541W originated from Bosnia and Herzegovina, suggesting that this mutation would be, like 550delA, important in diagnostics of LGMD2A in that country.

Other 4 mutations, already described in other populations (9,20,22), were found only in one or two Croatian families, with frequency ranging from 2 to 5%. Therefore, the geographic and ethnic origin of LGMD2A patient, as well as geo-

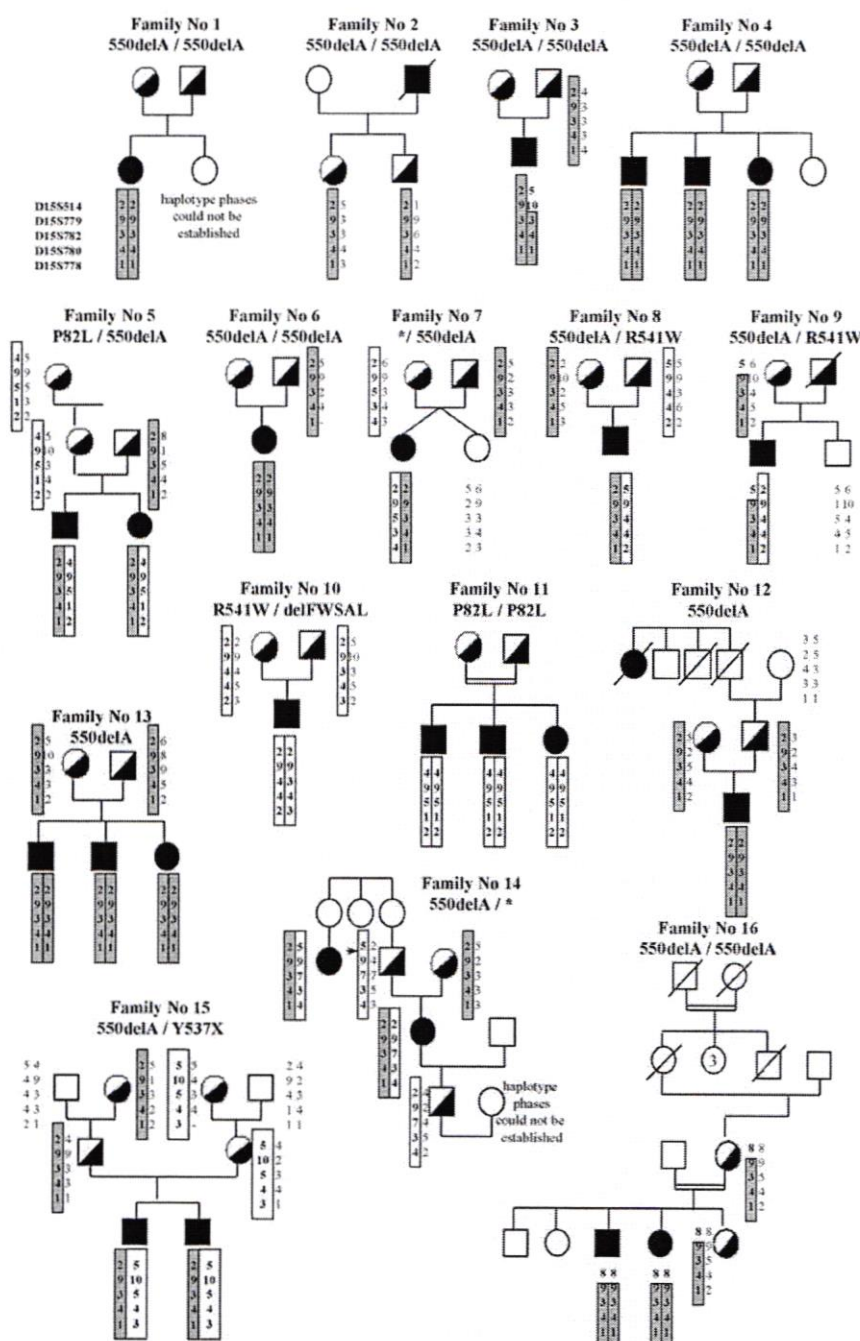


Figure 2. Pedigrees of 16 Croatian LGMD 2A families and results of haplotype analysis. Black squares and circles represent affected men and women. Deceased individuals are presented by diagonal line; horizontal double line corresponds to consanguineous families. Healthy individuals are represented by white squares and circles. Half black squares and circles represent healthy heterozygotes (carriers). Mutations found in each family are indicated above each pedigree. Asterisk indicates unknown mutation(s). Marker loci are listed from centromere to telomere and are presented in front of Family No 1. 550delA haplotype, found in all families, is shown within grey, full-line box. Haplotypes of other mutations are presented within white, full-line boxes. Unboxed haplotypes represent wild type chromosomes. In two individuals, results for markers D15S778 were not presented which is noted with a dash. Arrow indicates the point of the probable crossing-over.

Table 3. Results of haplotype studies for 550delA mutation in other European countries

Parameter	Country (ref.)													
	France (8)			Italy (8)		Russia (18)						Turkey (23)		
Number of chromosomes	1	1	1	2	11	3	1	2	1	1		8	2	2
Marker:														
D15S514	2	2	2	5	2	2	2	6	5	9		2	2	2
D15S779	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9		9	3	9
D15S782	5	4	3	3	/	/	/	/	/	/		4	6	4
D15S780	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		4	3	5
D15S778	3	2	2	3	3	3	4	2	1	2		5	7	7

graphical distribution of the mutation should be important in determining the diagnostic approach for these "rare" mutations.

Screening for 6 mentioned mutations, using rapid and simple methods described here, enabled the identification of almost 95% of pathological CAPN3 chromosomes in Croatia. Results of this study are important not only for our population, but show the strategy for developing fast, cheap, and non-invasive diagnostics of LGMD2A.

Haplotype study was used to determine the origin of 550delA and other CAPN3 mutations found among our LGMD2A patients. Linkage analysis of 550delA patients from 8 different countries was found to be associated with the same haplotype, which has suggested 550delA mutation as a representative of the ancestral mutational event (8). Besides on results from Croatia and several other countries, we suggest that 550delA is the typical mutation of eastern Mediterranean and southeastern Europe, from which it had probably spread across Europe (16). To test this hypothesis, haplotype analysis of Croatian LGMD2A families was performed. The 5 polymorphic markers were used: D15S514, D15S779, D15S782, D15S780, and D15S778, where distance between the first and fifth marker is less than 1 cM. CAPN3 gene locus is located between D15S779 and the third D15S782, D15S779 being the closest one to CAPN3 gene (4).

Results of our haplotype study showed the presence of 5 different haplotypes linked to 550delA. The same haplotype, 2-9-3-4-1, was found on 66% of all analyzed 550delA chromosomes. If we include the theoretical results for several solitary patients, this percentage would increase to 82%. In addition, in 2 out of 4 slightly different haplotypes, the difference was observed only for the first marker. Furthermore, haplotype analysis of wild type chromosomes showed distinct haplotypes from those obtained for 550delA (data not shown). These results, together with

those from previously population study (16), suggest and favor the hypothesis that Croatian population is rather closed, with founder effect in some parts of the country.

As we have used the same markers as several previous studies (8,18,23), we were able to compare haplotypes from our and other geographical and ethnic origins. It is evident that differences exist, but the core haplotype was preserved in the majority of cases (Table 3). Therefore, our results support the hypothesis that 550delA is an old mutation.

Small number of chromosomes bearing other 5 mutations does not permit any conclusion concerning haplotype. However, it is interesting to mention that in 5 R541W chromosomes from 5 unrelated families almost the same haplotype (2/5-9-4-4-2) has been obtained, suggesting a possible founder effect.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the participation of LGMD2A patients and their family members in this study. We are also thankful to Dr Isabelle Richard and Carinne Roudaut for technical assistance (P82L detection). This study was supported by grants No. 108041/1998 and 0108052/2002 from the Ministry of Science, Education, and Sports Republic of Croatia and in part by grant No. 7233/2000 of Association Française contre les Myopathies (AFM).

Reference

- 1 Erb W. About "juvenile form" of progressive muscle atrophy, its correlation to muscle pseudohypertrophy [in German]. *Dtsch Arch Klin Med.* 1884;34:467-519.
- 2 Bushby KM, Beckmann JS. The limb-girdle muscular dystrophies – proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord.* 1995;5:337-43.
- 3 Beckmann JS, Richard I, Hillaire D, Broux O, Antignac C, Bois E, et al. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III.* 1991;312:141-8.
- 4 Allamand V, Broux O, Richard I, Fougereousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, et al. Preferential localization of the limb-girdle muscular dystrophy type 2A gene in the proximal part of a 1-cM 15q15.1-q15.3 interval. *Am J Hum Genet.* 1995;56:1417-30.

- 5 Richard I, Broux O, Allamand V, Fougereousse F, Chiannilkulchai N, Bourg N, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*. 1995;81:27-40.
- 6 Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, Angelini C. The frequency of limb girdle muscular dystrophy 2A in north-eastern Italy. *Neuromuscul Disord*. 2005;15:218-24.
- 7 Fanin M, Fulizio L, Nascimbeni AC, Spinazzi M, Piluso G, Ventriglia VM, et al. Molecular diagnosis in LGMD2A: mutation analysis or protein testing? *Hum Mutat*. 2004;24:52-62.
- 8 Richard I, Brenguier L, Dincer P, Roudaut C, Bady B, Burgunder JM, et al. Multiple independent molecular etiology for limb-girdle muscular dystrophy type 2A patients from various geographical origins. *Am J Hum Genet*. 1997;60:1128-38.
- 9 Richard I, Roudaut C, Saenz A, Pogue R, Grimbergen JE, Anderson LV, et al. Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 1999;64:1524-40.
- 10 Chae J, Minami N, Jin Y, Nakagawa M, Murayama K, Igarashi F, et al. Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2001;11:547-55.
- 11 Milic A, Piluso G, Ventriglia V, D'Amico F, Kovac B, Trlaja A, et al. Mutation spectrum of CAPN3 gene in LGMD 2A patients in Croatia. *Eur J Hum Genet*. 2002;10 Suppl 1:181.
- 12 Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, Vondracek P, Marikova T, Mazanec R, et al. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord*. 2004;14:659-65.
- 13 Anderson LV, Davison K, Moss JA, Richard I, Fardeau M, Tome FM, et al. Characterization of monoclonal antibodies to calpain 3 and protein expression in muscle from patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Am J Pathol*. 1998;153:1169-79.
- 14 Talim B, Ognibene A, Mattioli E, Richard I, Anderson LV, Merlini L. Normal calpain expression in genetically confirmed limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Neurology*. 2001;56:692-3.
- 15 Canki-Klain N, Zurak N. Strategy of genetic and epidemiological study of muscular dystrophies in Croatia. *Pediatrica Croatica*. 1997;41:75-9.
- 16 Canki-Klain N, Milic A, Kovac B, Trlaja A, Grgicevic D, Zurak N, et al. Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Am J Med Genet*. 2004;125:152-6.
- 17 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
- 18 Pogoda TV, Krakhmaleva IN, Lipatova NA, Shakhovskaya NI, Shishkin SS, Limborska SA. High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD2 patients from Russia. *Hum Mutat*. 2000;15:295.
- 19 Todorova A, Georgieva B, Tournev I, Kremensky I. LGMD 2A in Bulgarian patients-mutations and polymorphisms in CAPN3 gene. *Eur J Hum Genet*. 2003;11 Suppl 1:206.
- 20 Balci B, Talim B, Haliloglu G, Aurino S, Akcoren Z, Leturcq F, et al. Calpain-3 mutations in Turkey: 10 years experience. *Neuromuscul Disord*. 2004;14:606.
- 21 Meznaric-Petrusa MM, Zidar J, Zupancic N, Fanin M, Angelini C, Piluso G, et al. Clinical, molecular and genetic features of calpainopathy in Slovenia. *Neuromuscul Disord*. 2002;12:731.
- 22 de Paula F, Vainzof M, Passos-Bueno MR, de Cassia M Pavanello R, Matioli SR, V B Anderson L, et al. Clinical variability in calpainopathy: what makes the difference? *Eur J Hum Genet*. 2002;10:825-32.
- 23 Topaloglu H, Dincer P, Richard I, Akcoren Z, Alehan D, Ozme S, et al. Calpain-3 deficiency causes a mild muscular dystrophy in childhood. *Neuropediatrics*. 1997;28:212-6.

Received: May 5, 2005

Accepted: June 14, 2005

Correspondence to:

Astrid Milić

Zagreb University School of Medicine

Croatian Institute for Brain Research

Šalata 12

10 000 Zagreb, Croatia

astridmilic@hotmail.com

NON-INVASIVE PROTEIN ANALYSIS IN THE FIRST DYSFERLINOPATHY CROATIAN FAMILIES

Abstract

Mutations in human dysferlin (*DYSF*) gene cause both limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) and Miyoshi myopathy (MM), also named dysferlinopathy. They are autosomal recessive muscular dystrophies characterized by degeneration and weakness of proximal and/or distal limb girdle muscles caused by partial or complete absence of a sarcolemmal protein dysferlin. The size and large mutational spectrum of *DYSF* impose a multistep diagnosis strategy before gene analysis. Here we report the first three patients from two unrelated Croatian families in which diagnosis of dysferlinopathy was suggested on the basis of clinical picture, family history and linkage analysis. In order to confirm the presumed diagnosis, we performed a blood-based assay in which dysferlin expression is screened in blood monocytes. All three tested patients showed complete absence of dysferlin expression, giving strong evidence of dysferlinopathy that was recently confirmed by mutation analysis. In conclusion, we would suggest the presented diagnostic strategy as a reliable and non-invasive method to be used as an alternative to muscle tissue protein analysis in routine diagnostics of dysferlinopathies, prior to the more complex and demanding search for causative *DYSF* mutations. This non-aggressive approach seems especially useful in situation in which multiplex Western blot (WB) analysis of different muscular dystrophy proteins on muscle sample is not available.

Keywords

• LGMD2B • MM • *DYSF* • Dysferlin • Monocytes • Western blotting • Linkage analysis

© Versita Sp. z o.o.

Astrid Milić,
Martina Malnar,
Nina Canki-Klain*

Croatian Institute for Brain Research,
University of Zagreb School of Medicine,
Šalata 12, 10 000 Zagreb, Croatia

Received 22 August 2011
accepted 11 September 2011

1. Introduction

The term "dysferlinopathy" [1] is related to autosomal recessive muscular disorders involved in at least two clinically distinct muscular dystrophies due to mutations in the same gene (phenotypic heterogeneity): proximal disease designated LGMD2B (OMIM #253601) [2], affecting limb girdle muscles and the distal Miyoshi myopathy (MM; OMIM #254130) [3]. They are both caused by mutations in the *DYSF* gene (OMIM #603009), located on chromosome 2p13, spanning region of more than 150kb and containing 55 exons [4,5]. *DYSF* mutations are distributed along the entire length of the gene, with no obvious hot spots and where the majority of more than 300, so far reported, sequence variants (including disease-causing mutations and non-pathogenic polymorphisms) represent

single nucleotide changes and small insertion and/or deletions [Leiden Muscular Dystrophy pages database: www.dmd.nl].

DYSF gene encodes dysferlin, a 237 kDa transmembrane protein belonging to a ferlin family of proteins, named after homology to *C. elegans* spermatogenesis factor Fer-1. The main characteristic of this protein family is the presence of multiple C2 domains (ranging from four to seven, latter being the number present in dysferlin), which are implicated in various biological processes [6]. Recent data suggest a role of dysferlin in the muscle fiber repair process [7-9], myoblast differentiation [10], T-tubulogenesis [11], monocyte phagocytosis [12] and muscle regeneration [13]. Dysferlin is predominantly expressed in skeletal and heart muscle, where it localizes to the plasma membrane of muscle fibers [14,15]. In addition, dysferlin is also found in

blood monocytes, brain, lung and placenta [2,3,15-17].

Although accurate and definitive diagnosis of dysferlinopathies relies on direct gene mutation analysis, screening of the whole gene for mutations is laborious, expensive, time-consuming and an inappropriate approach for routine laboratories. Protein analysis, on the other hand, proved to be reliable for differential diagnostics of muscular dystrophies [1,18]. Moreover, above mentioned dysferlin expression in blood monocytes enabled the development of a blood-based assay that analyses dysferlin expression from a peripheral blood sample [16]. This assay is a relatively simple and quick method of dysferlin analysis, resembling the usual protein analysis from muscle. However, it is a significantly less invasive and painless approach that overcomes the problems associated with handling and storage

* E-mail: nina.canki-klain@mef.hr

of muscle samples. Therefore it represents a valuable alternative to muscle tissue protein analysis, as well as an important and decisive step prior to the start of demanding gene mutational analysis.

Herein, we present the application of the specific diagnostic strategy [19] adapted to our population of 4,29 million people, followed by linkage analysis and monocyte protein analysis of dysferlin that has permitted us to confirm the first diagnosis of dysferlinopathy in two families from Croatia.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

A total of three patients from two unrelated families were included in the study (Figure 1). In Family No.1, two siblings (brother and younger sister) were born to non-affected, apparently non-related parents from close villages. Both patients, aged 39 and 28 years, respectively, showed characteristic clinical features (both were good in sports in childhood and adolescence; they had early adult onset with massive elevation of serum CK levels, asymmetry of legs, "dysferlin gait" and showed relatively slow progression) which, together with genealogical data, directed us to the diagnosis of LGMD2B. On the other hand, a 34-year old male patient from Family No.2 with two year older, healthy brother was born to unrelated parents originating from the same, small geographic region. In this family, clinical data together with disease course during 10-year follow-up (active in sport in childhood and early adolescence; was accidentally found to have high transaminases at the age of 19 years; seven years later his slender right leg was noticed and CK was 21x normal; slow progression of symptoms with bilateral asymmetric muscle wasting and weakness in the lower legs) suggested a diagnosis of Miyoshi myopathy (MM).

2.2. Methods

Following informed consent, peripheral blood samples were used for DNA extraction of patients and family members (presented in Figure 1) and monocyte isolation of the three patients. DNA was extracted using standard salting-out and procedure [20], while monocyte isolation is described later in the text.

Protein analysis of dysferlin was done in monocytes for all three patients and one healthy individual who was used as a positive control of dysferlin expression. A muscle biopsy sample obtained from an individual not affected by any muscle disorder served as another positive control.

Haplotype analysis. Haplotype analysis was performed using two intragene markers (Cy172-H32 and 104-sat), as well as four polymorphic microsatellite markers located in the close vicinity of *DYSF* locus: D2S292, D2S2113, D2S291 and D2S2111. The marker genotyping consisted of PCR reaction for each marker and DNA-PAGE followed by polyacrylamide gel silver staining. PCR amplification of DNA (200 ng) was performed in a 25 µl reaction mix containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 200 µM of each dNTP (Eppendorf, Germany), 1 U Taq polymerase (Eppendorf, Germany) and 3 pmol of each primer. Initial denaturation (5 min at 94°C) was followed by 30 cycles consisting of denaturation (30 sec at 92°C), annealing (30 sec), and elongation (30 sec at 72°C). Annealing temperatures were as follows: 52°C (D2S292), 56°C (Cy172-H32 and 104-sat), 60°C (D2S291 and D2S2113) and 64°C (D2S2111). The primer sequences and marker allele sizes were obtained from literature [2,3] and from www.gdb.org and www.cephb.fr, respectively.

Muscle biopsy. The muscle biopsy sample, frozen in liquid nitrogen, was homogenized in 20 volumes of Treatment buffer (75mM Tris, 15% SDS, 20% glycerol, 5% p-mercaptoethanol and bromophenol blue solution). After denaturation at 95°C for 5 minutes, homogenate was centrifuged for 5 minutes at 14000 rpm.

Monocyte isolation. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from whole blood sample of patients by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. In continuation, PBMCs were separated into monocytes (CD14⁺) and lymphocytes (CD14⁻) using CD14-coated microbeads (Milteny Biotech, Germany) and MACS separator according to manufacturer's instructions and as previously described [16,21]. Isolated monocytes were then lysed with a lysis buffer consisting of 20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM sodium-pyrophosphate, 1mM β-glycerolphosphate, 1mM Na₃VO₄, 1µg/ml leupeptin and 1mM PMSF.

Protein analysis. Protein concentration was determined using the Bradford protein assay. Approximately 20 µg of proteins (from muscle homogenate and cell lysate, respectively) were separated on a 4-7% gradient SDS-PAGE. Immunoblotting was performed as previously described [22], using anti-dysferlin primary

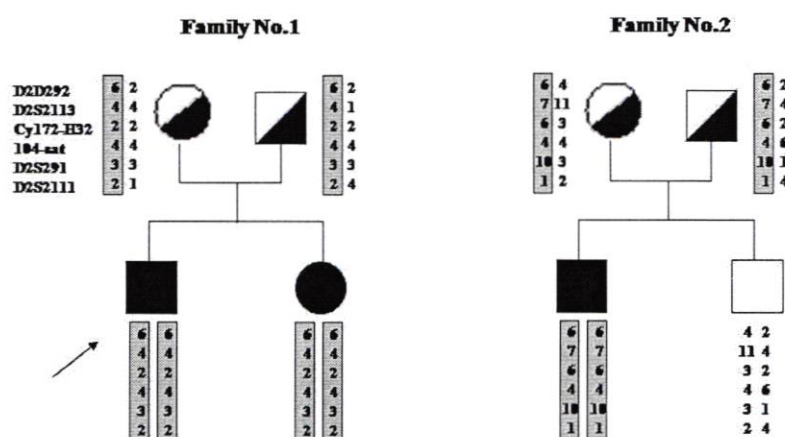


Figure 1. Pedigrees of two Croatian dysferlinopathy families and results of haplotype analysis. Black squares and circles represent affected males and females, respectively. Healthy individual is represented by white square, while half black squares and circles represent healthy heterozygotes. Marker loci are listed from telomere to centromere and are presented in front of Family No.1. Haplotypes carrying dysferlin mutations are shown within the grey box, while unboxed haplotypes represent wild type chromosomes.

monoclonal antibodies (Hamlet; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). Protein bands were detected with chemiluminescence system Super Signal®West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, USA).

3. Results

Diagnosis suggested by clinical features was followed by linkage analysis and then by protein analysis on isolated monocytes from peripheral blood.

Haplotype analysis. The results of haplotype analysis are presented in Figure 1. In both families affected members are homozygous for two intragene and four polymorphic markers flanking the *DYSF* gene. However, haplotypes are different in each family: 6/4/2/4/3/2 in Family No.1 and 6/7/6/4/10/1 in Family No.2, respectively.

Protein analysis. Western blot analysis of monocytes from all three patients demonstrated the absence of dysferlin expression, when compared with the two controls: skeletal muscle sample and monocyte's cell lysate from two healthy individuals, respectively (Figure 2).

4. Discussion

Direct gene analysis, with identification of causative mutation(s), represents definitive

confirmation of a clinically suspected diagnosis of dysferlinopathy. Such an accurate diagnosis of a genetic defect is nowadays prerequisite for participation in gene [23] and/or pharmacological [24–26] therapy treatments. However, in some disorders including dysferlinopathy, the size of the gene, as well as the large mutational spectrum impose the need for a different, usually multistep diagnostic approach prior to gene screening.

In our first family, clinical and genealogical data (two of three affected children of different gender born to apparently non-related parents originating from the same village), together with characteristic clinical features and disease course in the second family, directed us to the diagnoses of LGMD2B and MM, respectively. The availability of the patients' parents and a healthy sibling in family No. 2 permitted the first step in confirming the suspected diagnosis i.e. linkage analysis using two intragene (Cy172-H32 and 104-sat) and four polymorphic markers located in a close vicinity of *DYSF* gene (D2S292, D2S2113, D2S291 and D2S2111). Intragene markers are located in intron 2 (Cy172-H32) and intron 29 (104-sat) of *DYSF*, respectively. While the first is a CCAT repeat, the latter is characterised by a CA dinucleotide repeating unit [2,3]. The same repeats are also found in four polymorphic microsatellite markers used in this study. They are positioned

on chromosome 2p as listed in the text, D2S2113 and D2S291 being the closest to the *DYSF* gene [27]. Results of linkage analysis (Figure 1), suggested the existence of linkage for dysferlinopathy in both families. Different haplotypes were obtained in each family, but interestingly in both families haplotypes of affected persons were in a homozygous state, both for intragene and extragene markers. This might indicate the existence of the same mutation on both alleles in each of the two studied families. These findings could be useful in future testings of new dysferlinopathy families from the same region of Croatia.

As linkage analysis was in accordance with dysferlinopathy, our next diagnostic step was to check dysferlin expression, as previously published studies showed the reliability of this approach in confirming LGMD2B diagnosis [18,28]. In order to avoid the more invasive method of muscle biopsy we focused on a recently developed blood based assay, that analyses dysferlin expression in non-muscle tissue, i.e. a blood sample. Western blotting (WB) on monocytes was done according to the protocol described first by Ho *et al.* [16] and later improved by de Luna *et al.* [21]. This improved protocol emphasizes the importance of monocyte separation from other peripheral mononuclear cells. As Western blot of total peripheral mononuclear cells can raise false negative results, monocyte separation makes the assay more reliable and effective [21]. In our experience the main advantage of this improvement was a significant decrease in the expression of an additional protein band (mostly present in non-monocyte cells), which reacted very strongly with used antibodies and therefore made difficult the interpretation of obtained results.

Analysis of blood samples of all 3 patients revealed the total absence of dysferlin expression (Figure 2) providing strong evidence of the clinically suggested diagnosis. Nevertheless, confirmatory mutational analysis (done, but not shown here) is nowadays mandatory, in order to ensure accurate genetic counseling and future therapy.

There are several publications containing data that suggest that dysferlin analysis from a blood sample is a major improvement in

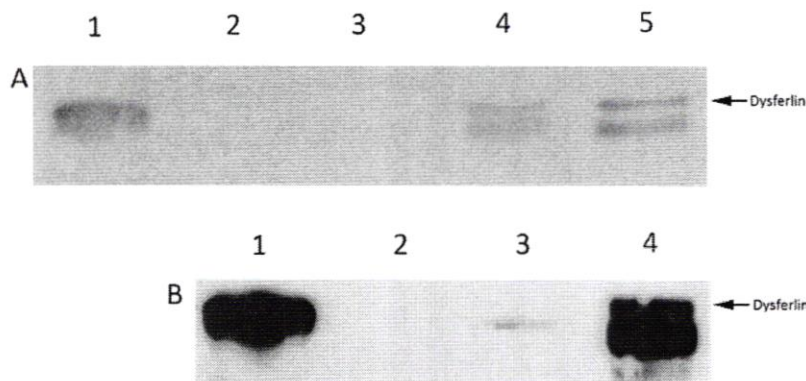


Figure 2. Western blot analysis of dysferlin expression. a. Column 1 represents control muscle, while columns 4 and 5 correspond to monocyte cell lysate from a healthy individual. Columns 2 and 3 represent two LGMD2B patients (Family No.1) with complete absence of dysferlin expression. b. Column 1 corresponds to the control muscle sample, while no sample was loaded to column 2 (empty); column 3 represents monocyte cell lysate of patient from Family No.2 in which complete absence of dysferlin expression was obtained; column 4 corresponds to monocyte cell lysate from the control healthy individual.

the diagnostics of dysferlinopathy, with the possibility of routine use. In almost all of them, lack and reduction of dysferlin expression was followed by molecular confirmation of dysferlinopathy [16,21,29,30]. In the first published article based on 12 patients with dysferlinopathy (LGMD2B, MM, distal anterior compartment myopathy) [16] blood-based assay proved to be as reliable as previously performed protein analysis from muscle sample, showing dysferlin absence in all 12 studied patients. Moreover, in 3 of them the causative *DYSF* mutation was identified. In another article [29], concerning two dysferlin gene mutation carriers, significant reduction of dysferlin expression both in monocytes and muscle was also confirmed by *DYSF* mutation found on one allele by genetic analysis. De Luna *et al.* [21] performed WB on monocytes in 25

patients, and all of them displayed absence of dysferlin. These results were confirmed several times and were compared either by dysferlin analysis in skeletal muscle and/or by genetic analysis, giving the 100% reproducibility of the used blood based assay. Just recently, Meznaric *et al.* [30] described the first two dysferlinopathy patients in Slovenia, in which a severe reduction of dysferlin was found both in muscle samples and in monocytes and finally confirmed by *DYSF* causative mutations.

However, it should be emphasized that the use of blood-based assay is still limited, i.e. the majority of routine laboratories are still giving priority to common dysferlin analysis from muscle. This can be explained by routine work in which only muscle samples permit multiplex western blot analyses of different muscular dystrophy proteins [22], which is a very useful

initial step in the analysis of patients with limb-girdle muscular dystrophy in centers equipped with numerous antibodies available for direct testing of proteins encoded by LGMD2 genes. On the other hand, in cases where economic or other circumstances do not permit such study, dysferlin blood-based assay seems to be more suitable as it has proven to be a reliable initial orientation prior to the final diagnosis confirmation by gene mutational analysis.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the participation of patients and their family members in this study. This study was supported by grants No. 0108052/2002 and 1080000003435/2007 from the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia.

References

- [1] Bushby K. M., Making sense of limb girdle muscular dystrophies, *Brain*, 1999, 122, 1403-1420
- [2] Bashir R., Britton S., Strachan T., Keers S., Vafiadaki E., Lako M. *et al.*, A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B, *Nat. Genet.*, 1998, 20, 37-42
- [3] Liu J., Aoki M., Illa I., Wu C., Fardeau M., Angelini C. *et al.*, Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb-girdle muscular dystrophy, *Nat. Genet.*, 1998, 20, 31-36
- [4] Bashir R., Strachan T., Keers S., Stephenson A., Mahjneh I., Marconi G. *et al.*, A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p, *Hum. Mol. Genet.*, 1994, 3, 455-457
- [5] Bejaoui K., Hirabayashi K., Hentati F., Haines J. L., Ben Hamida C., Belal S. *et al.*, Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14, *Neurology*, 1995, 45, 768-772
- [6] Lek A., Lek M., North K.N., Cooper S. T., Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins, *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10, 231-247
- [7] Bansal D., Miyake K., Vogel S. S., Groh S., Chen C. C., Williamson R. *et al.*, Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy, *Nature*, 2003, 423, 168-172
- [8] Bansal D., Campbell K. P., Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy, *Trends. Cell Biol.*, 2004, 14, 206-213
- [9] Han R., Campbell K. P., Dysferlin and muscle membrane repair, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2007, 19, 409-416
- [10] De Luna N., Gallardo E., Soriano M., Dominguez-Perles R., de la Torre C., Rojas-García R. *et al.*, Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation «in vitro», *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 17092-17098
- [11] Klinge L., Laval S., Keers S., Haldane F., Straub V., Barresi R. *et al.*, From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis, *FASEB J.*, 2007, 21, 1768-1776
- [12] Nagaraju K., Rawat R., Veszelovszky E., Thapliyal R., Kesari A., Sparks S. *et al.*, Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B, *Am. J. Pathol.*, 2008, 172, 774-785
- [13] Chiu Y. H., Hornsey M. A., Klinge L., Jørgensen L. H., Laval S. H., Charlton R. *et al.*, Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.*, 2009, 18, 1976-1989
- [14] Matsuda C., Aoki M., Hayashi Y. K., Ho M. F., Arahata K., Brown R. H. Jr., Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi myopathy, *Neurology*, 1999, 53, 1119-11122
- [15] Anderson L. V., Davison K., Moss J. A., Young C., Cullen M. J., Walsh J. *et al.*, Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development, *Hum. Mol. Genet.*, 1999, 8, 855-861
- [16] Ho M., Gallardo E., McKenna-Yasek D., De Luna N., Illa I., Brown R. H., A novel blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy, *Ann. Neurol.*, 2002, 51, 129-133
- [17] Vandre D. D., Ackerman W. E., Kniss D. A., Tewari A. K., Mori M., Takizawa T., Dysferlin is expressed in human placenta but does not associate with caveolin, *Biol. Reprod.*, 2007, 77, 533-542
- [18] Vainzof M., Anderson L. V., McNally E. M., Davis D. B., Faulkner G., Valle G. *et al.*, Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies, *J. Mol. Neurosci.*, 2001, 17, 71-80

- [19] Canki-Klain N., Milić A., Kovač B., Trlaja A., Grgičević D., Zurak N. et al., Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia, *Am. J. Med. Genet.*, 2004, 125A, 152-156
- [20] Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F., A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucl. Acids. Res.*, 1998, 16, 1215
- [21] De Luna N., Freixas A., Gallano P., Caselles L., Rojas-García R., Paradas C. et al., Dysferlin expression in monocytes: A source of mRNA for mutation analysis, *Neuromuscul. Disord.*, 2007, 17, 69-76
- [22] Anderson L.V., Davison K., Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins, *Am. J. Pathol.*, 1999, 154, 1017-1022
- [23] Lostal W., Bartoli M., Bourg N., Roudaut C., Bentaib A., Miyake K. et al., Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer, *Hum Mol Genet*, 2010, 19, 1897-1907
- [24] Hattori H., Nagata E., Oya Y., Takahashi T., Aoki M., Ito D. et al., A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene, *Eur J Neurol*, 2007, 14, 1288-1291
- [25] Lerario A., Cogiamanin F., Marchesi C., Belicchi M., Bresolin N., Porretti L. et al., Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy, *BMC Musculoskelet. Disord.*, 2010, 11, 157
- [26] Wang B., Yang Z., Brisson B. K., Feng H., Zhang Z., Welch E. M. et al., Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression, *J. Appl. Physiol.*, 2010, 109, 901-905
- [27] Illarioshkin S. N., Ivanova-Smolenskaya I. A., Tanaka H., Poleshchuk V. V., Markova E. D., Tsuji S., Refined genetic location of the chromosome 2p-Linked pregressive muscular dystrophy gene, *Genomics*, 1997, 42, 345-348
- [28] Anderson L.V., Harrison R. M., Pogue R., Vafiadaki E., Pollitt C., Davison K. et al., Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies), *Neuromuscul. Disord.*, 2000, 10, 553-559
- [29] Illa I., De Luna N., Domínguez-Perles R., Rojas-García R., Paradas C., Palmer J. et al., Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases, *Neurology*, 2007, 68, 1284-1289
- [30] Meznaric M., Gonzales-Quereda L., Gallardo E., De Luna N., Gallano P., Fanin M. et al., Abnormal expression of dysferlin in skeletal muscle and monocytes supports primary dysferlinopathy in patients with one mutated allele, *Eur. J. Neurol.*, 2011, 18, 1021-1023

