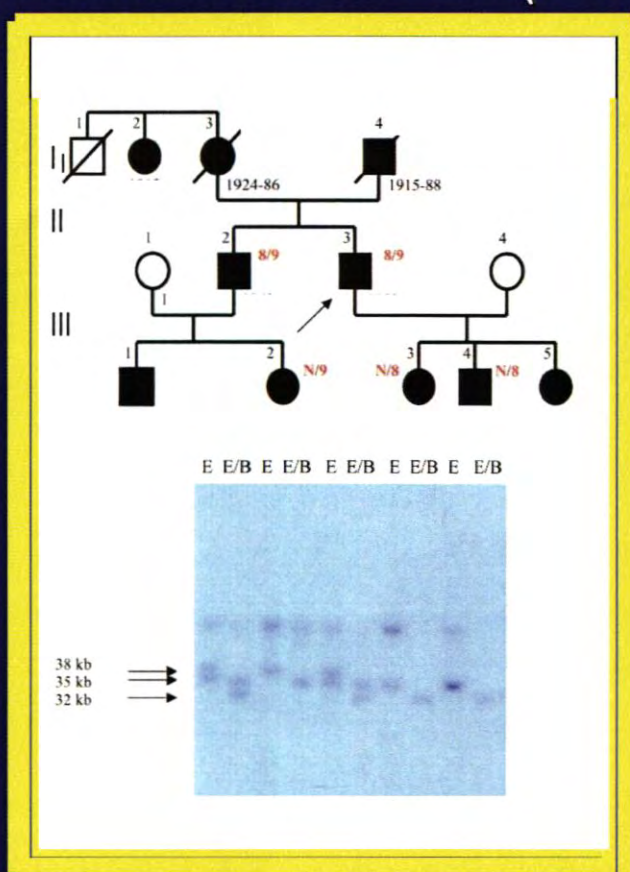


**DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE
MEDICINSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU**

Organiziraju

Poslijediplomski tečaj stjecanja znanja s provjerom

**NOVOSTI U KLINIČKOJ GENETICI:
MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, TERAPIJA I
PREVENCIJA FACIOSKAPULOHUMERALNE
MIŠIĆNE DISTROFIJE (FSHD)**



**Gost- predavač: Dr. Richard J.L.F.LEMMERS, PhD.
Department of Human Genetics, Leiden University
Medical Center, Leiden, Netherlands**

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

NOVOSTI U KLINIČKOJ GENETICI:

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, TERAPIJA I PREVENCIJA FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE (FSHD)

Urednica: Nina Canki-Klain

DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Hrvatski institut za istraživanje mozga

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 FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE (FSHD)

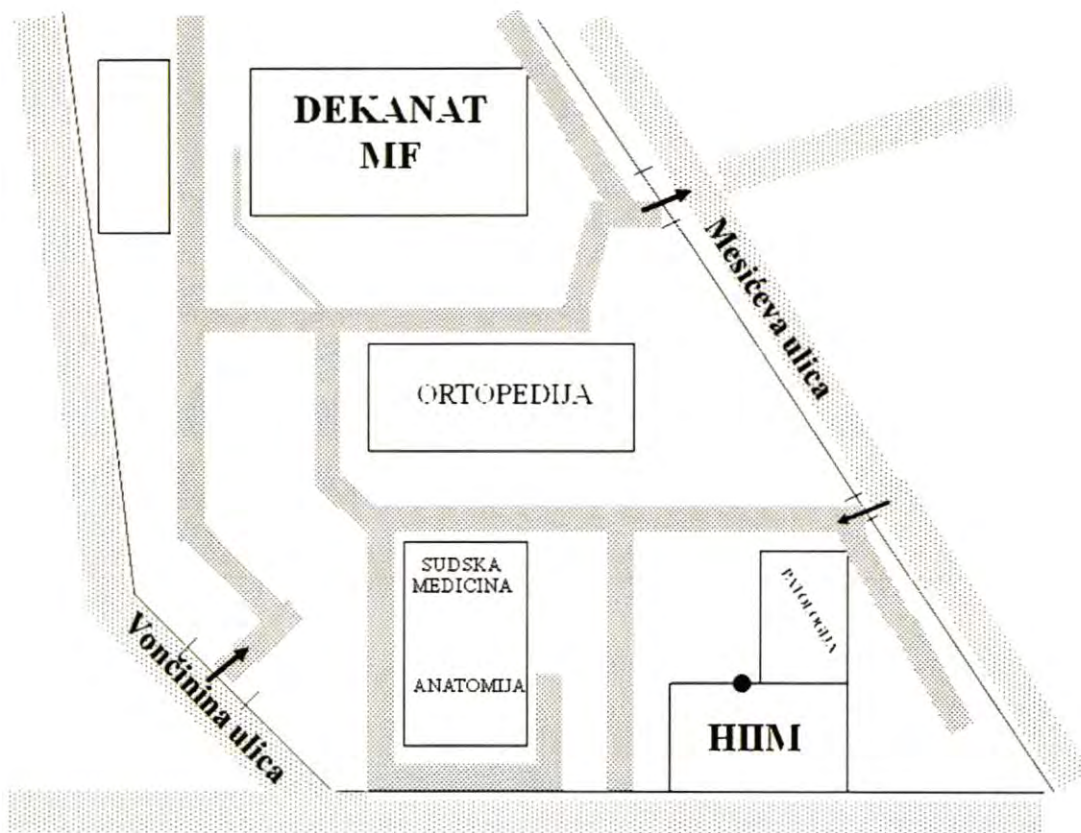
**Priručno štivo
Poslijediplomski tečaj stjecanja znanja s provjerom**

**Organizatori
DRUŠTVO ZA KLINIČKU GENETIKU HRVATSKE
MEDICINSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU**

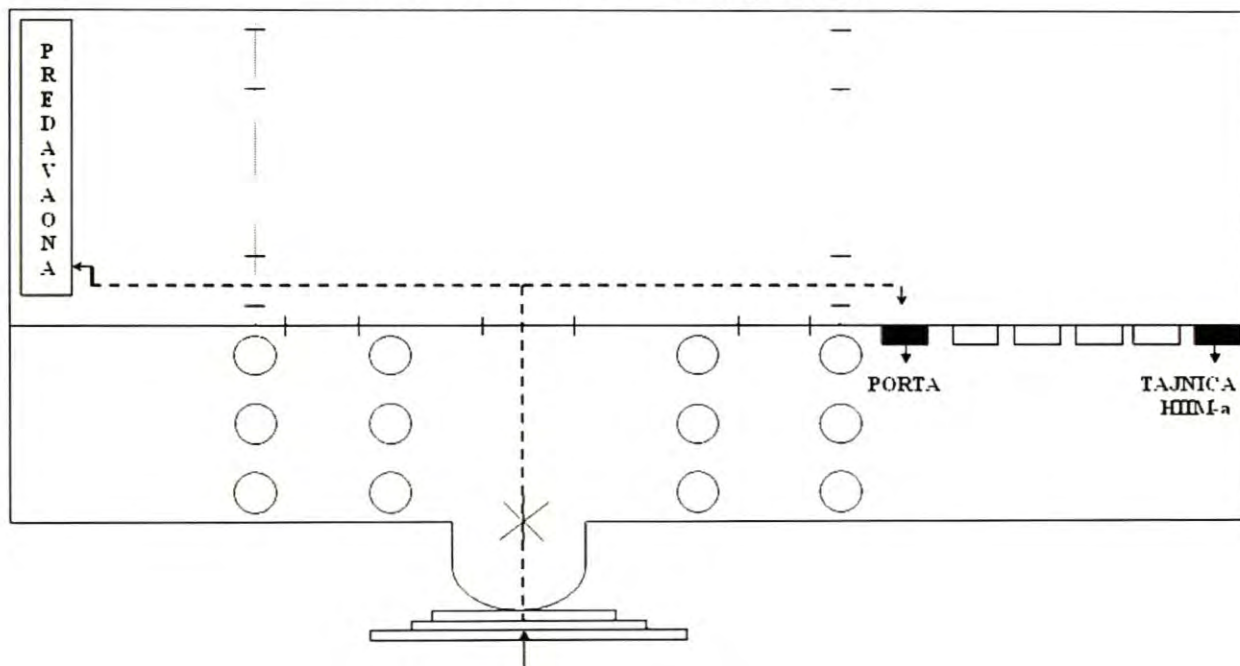
**Gost-predavač: Dr. Richard J.L.F. LEMMERS
Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center
Leiden, Netherlands**

**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, 31.03.-01.04.2011.**



Hrvatski institut za istraživanje mozga



SADRŽAJ

Program poslijediplomskog tečaja

Popis sudionika tečaja

KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE (FSHD)	16
Osman Sinanović	
KLINIČKA SLIKA I DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA FSHD	26
Biserka Kovač	
VARIJABILNOST KLINIČKE SLIKE FSHD: prikaz slučajeva	53
Davorika Vranješ	
KAKO PREPOZNATI FSHD?	60
Nina Canki-Klain	
MORFOLOGIJA PATOLOŠKIH PROMJENA U FSHD	63
Sanja STIFTER	
DIJAGNOSTIČKA I PROGNOŠTIČKA VRIJEDNOST MAGNETSKE REZONANCIJE U ANALIZI LEZIJA U FSHD BOLESNIKA	67
Dražan Lovrić	
OFTALMOLOŠKI ASPEKTI FSHD-DIJAGNOSTIKA, DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA I LIJEČENJE.....	75
Neda Stigmayer i Nenad Vukojević	
ULOGA FIZIJATRA U REHABILITACIJI BOLESNIKA S FSHD	82
Ida Kovač	
MOGUĆE PLUĆNE KOMPLIKACIJE U BOLESNIKA S FSHD	91
Taida Alfirević-Ungarov	
ULOGA ORTOPEDA U ZBRINJAVANJU BOLESNIKA S FSHD	103
Vladimir Kovač	
A UNIFYING MODEL FOR FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY	107
Richard J.L.F. Lemmers	
PSIHOLOŠKI ASPEKTI FSHD	109
Nataša Jokić-Begić	

PRIKAZI BOLESNIKA IZ OBITELJI OBOLJELIH OD FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE118

Sanja Kovačić i Nina Canki-Klain

GENETSKO SAVJETOVANJE, GENETSKO TESTIRANJE I PRENATALNA DIJAGNOSTIKA FSHD.....121

Nina Canki-Klain

DODATNI MATERIJALI.....128

Richard J. L. F. Lemmers, Patrick J. van der Vliet, Rinse Klooster, Sabrina Sacconi, Pilar Camaño, Johannes G. Dauwese, Lauren Snider, Kirsten R. Straasheijm, Gert Jan van Ommen, George W. Padberg, Daniel G. Miller, Stephen J. Tapscott, Rabi Tawil, Rune R. Frants, Silvère M. van der Maarel: **A Unifying Genetic Model for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy**. Science 2010; 329:1650-1653.

Richard J. L. F. Lemmers, Marie"lle Wohlgemuth, Kristiaan J. van der Gaag, Patrick J. van der Vliet, Corrie M. M. van Teijlingen, Peter de Knijff, George W. Padberg, Rune R. Frants and Silvere M. van der Maarel: **Specific Sequence Variations within the 4q35 Region Are Associated with Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy**. Am J Hum Genet 2007; 81: 884-894.

Melanie Ehrlich, Kesmic Jackson, Koji Tsumagari, Pilar Camaño, **Richard JFL Lemmers**: **Hybridization analysis of D4Z4 repeat arrays linked to FSHD**. Chromosoma 2007; 116: 107-116.

Richard J.L.F. Lemmers, Peggy de Kievit, Lodewijk Sandkuijl, George W. Padberg, Gert-Jan B. van Ommen, Rune R. Frants, Silvère M. van der Maarel: **Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere**. Nature genetics 2002; 32 : 235-236.

PROGRAM

ČETVRTAK, 31.3.2011.

07.30-08.30 Registracija sudionika

Moderatori :Nina CANKI-KLAIN i Ljerka CVITANOVIĆ-ŠOJAT

08.30-09.15 KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE (FSHD)
Osman SINANOVIĆ

09.15-10.00 KLINIČKA SLIKA I DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA FSHD
Biserka KOVAČ

10.15-10.45 VARIJABILNOST KLINIČKE SLIKE FSHD:prikaz slučajeva
Davorka VRANJEŠ

10.45-11.15 Odmor

Moderatori: Osman SINANOVIĆ i Davorka VRANJEŠ

11.15-12.00 KAKO PREPOZNATI FSHD?
Nina CANKI-KLAIN

12.00-12.30 MORFOLOGIJA PATOLOŠKIH PROMJENA U FSHD
Sanja STIFTER

12.30-13.00 DIJAGNOSTIČKA I PROGNOСТИČKA VRIJEDNOST MAGNETSKE REZONANCIJE U ANALIZI LEZIJA U FSHD BOLESNIKA
Dražen LOVRIĆ

13.00-14.30 Ručak

Moderatori: Biserka KOVAČ i Romana GJERGJA-JURAŠKI

14.30-14.50 AUDIOLOŠKI ASPEKTI FSHD-DIJAGNOSTIKA I TERAPIJA
Jadranka HANDŽIĆ

14.50-15.20 OFTALMOLOŠKI ASPEKTI FSHD-DIJAGNOSTIKA, DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA I LIJEČENJE
Neda STIGLMAYER i Nenad VUKOJEVIĆ

15.20-15.50 ULOGA FIZIJATRA U REHABILITACIJI BOLESNIKA S FSHD
Ida KOVAČ

- 15.50-16.20** **MOGUĆE PLUĆNE KOMPLIKACIJE U BOLESNIKA S FSHD**
Taida ALFIREVIĆ-UNGAROV
- 16.20-16.50** **ULOGA ORTOPEDA U ZBRINJAVANJU BOLESNIKA S FSHD**
Vladimir KOVAČ
- 16.50-17.00** **Odmor**
- 17.00-18.00** **A UNIFYING GENETIC MODEL FOR FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY**
Richard J.L.F. LEMMERS
- 18.00-18.15** **Rasprava**
- 18.15-19.00** **PSIHOLOŠKI ASPEKTI FSHD**
Nataša JOKIĆ-BEGIĆ

PETAK, 1.4.2011.

Moderatori: Richard J.L.F. LEMMERS, Astrid MILIĆ i Nina CANKI-KLAIN

- 09.00-09.45** **RASPRAVA O MOLEKULARNIM DIJAGNOSTIČKIM PROTOKOLIMA FSHD**
- 09.45-11.15** **PRIKAZI BOLESNIKA I RASPRAVA**
- 11.15-11.30** **Odmor**
- 11.30-13.00** **GENETSKO SAVJETOVANJE, GENETSKO TESTIRANJE I PRENATALNA DIJAGNOSTIKA FSHD**
Nina CANKI-KLAIN
- 13.00-14.00** **Ručak**
- 14.00-16.15** **VJEŽBE**
- 16.15-16.30** **Odmor**
- 16.30-17.15** **RASPRAVA O ANALIZIRANIM BOLESNICIMA U VJEŽBI**
- 17.15-18.00** **PISMENI TEST PROVJERE ZNANJA**
- 18.00-18.45** **EVALUACIJA TEČAJA I ZAKLJUČNA SJEDNICA**

POPIS SUDIONIKA

Taida Alfirević-Ungarov

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

Irena Barbarić

Doc.dr.sc., spec.pedijatar
KBC Rijeka, Klinika za pedijatriju
Istarska 43
Mobitel: 091 5733882
Fax: 051- 623126
e-mail: irena.barbaric@gmail.com

Ivana Birek

Med. lab. ing.
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za patologiju
Šalata 10, 10000 Zagreb
Tel. 01-4566984
Fax: 01-4921151
e-mail: birekivana@gmail.com

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

Ljerka Cvitanović-Šojat

Doc.dr.sc., pedijatar-neurolog
Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu
KBC Sestre milosrdnice, Klinika za pedijatriju
Vinogradska cesta 29
Tel. 01- 37 87 655
e-mail ljerka-cvitanovic-sojat@zg.htnet.hr

Marina Čule

Stud.med.

Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

Dankovečka 9, 10 040 Zagreb

Mobitel: 099/7435562

e-mail: culemarina@yahoo.com

Tea Ferenc

Stud.med.

Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet.

Ulica Franje Gažija 6, 48 000 Koprivnica

Mobitel: 095814-7895

e-mail: tea.ferenc@gmail.com

Romana Gjergja-Juraški

Dr.med., pedijatar – neurolog

KBC Sestre milosrdnice, Klinika za pedijatriju

Vinogradska cesta 29

Mobitel: 091 209 7867

e-mail: romana.gjergja@zg.t-com.hr

Jadranka Handžić-Ćuk

Prof.dr.sc., spec. otorinolaringolog

Klinika za bolesti uha, nosa i grla i kirurgiju glave i vrata

KBC Zagreb i MF Sveučilišta u Zagrebu

Šalata 4, 10 000 Zagreb

Tel. 01-236 88 38

e-mail: jadranka.handzic-cuk@usa.net

Diana Hrg

Med. lab. ing.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za patologiju

Šalata 10, 10000 Zagreb

Tel/ Mobitel: 01-4566984; 091/5123034

Fax: 01-4921151

e-mail: dianah@vip.hr

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

Andrea Kalaba

Stud.med.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Božidara Magovca 14, Zagreb

Mobitel:099545-3172

e-mail: andrea_kalaba@hotmail.com

Ivona Kaloper

Med. lab. ing.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za patologiju

Šalata 10, 10000 Zagreb

Tel/ Mobitel: 01-4566984; 0981789992

Fax: 01-4921151

e-mail: bombonac@gmail.com

Lidija Knežević-Poljak

Dr.med., spec.neurolog

KBC Osijek

Klinika za neurologiju

Huttlerova 4, 21000 Osijek

Tel. 031-512 359

Mobitel : 091-161 87 60

e-mail: lidijaknez@yahoo.com

Tea Kos

Stud.med.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Trg Matije Gupca 44, 42 000 Varaždin

Mobitel: 0989306634

e-mail: tea_kos@yahoo.com

Iva Košuta

Dr. med.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Institut za patologiju

Šalata 10, 10000 Zagreb

Tel/ Mobitel: 01-4566984, 0917974274

Fax: 01-4921151

e-mail: ivakosuta@gmail.com

Biserka Kovač

Dr.sc., dr.med.spec. neurolog

Predavač na Studiju fizioterapije

Veleučilišta Lavoslav Ružička, Vukovar

OB 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

Vladimir Kovač
Prof.dr.sc.,spec. ortoped
Ortopedski odjel, KB Dubrava
Avenija Gojka Šuška 6, 10 000 Zagreb
Mobitel: 00385 - 98 232 638
Fax: 00385 01 -290 25 71
e-mail: vladimirkovac@inet.hr

Sanja Kovačić
Dr.sc., spec. neurolog
Odjel neurologije OB Zabok
Bračak 8, 49210 Zabok
Mobitel: 0989498140
Fax: 049-204009
e-mail: sanja.drca@kr.t-com.hr

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

Richard J.L.F. Lemmers, PhD
Department of Human Genetics
Leiden University Medical Center (LUMC)
Albinusdreef 2, Postzone S-3-P
2333 ZA Leiden , The Netherlands
Tel. 31 71 526 9481 / 9451 / 9557
Fax: 31 71 526 8285
E-mail: r.j.l.f.lemmers@lumc.nl

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

Sanja Mišević

Dr.med., spec. neurolog
Klinika za neurologiju, KBC Osijek
Huttlerova 4, 31 000 Osijek
Mobitel: 091 56 99 710
Fax: 031- 512 359
e-mail sanja_misevic@vip.hr

Marija Mišić

Dipl. ing. biol.
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za patologiju
Šalata 10, 10000 Zagreb
Tel/ Mobitel: 01-4566984; 0914566984
Fax: 01-4921151
e-mail: marija.misic@mef.hr

Dragana Mitrevski

Stud.med.
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Mobitel: 0915484478
e-mail: mitrevskidragana@gmail.com

Vanja Saftić

Dr.med.,specijalist pedijat.
KBC Sestre Milosrdnice, Klinika za pedijatriju
Vinogradska cesta 29
Mobitel:: 0997330793
e-mail: vanjasaf@gmail.com

Antun Sasso

Prof.dr.sc., spec.pedijatar
KBC Rijeka, Klinika za dječje bolesti
Šetalište 12.divizije 24, 51000 Rijeka
Mobitel: 0914228222
Fax: 051-623126
e-mail: antun.sasso@medri.hr

Osman Sinanović

Redovni profesor neurologije Univerziteta u Tuzli
Klinika za neurologiju, UKC Tuzla
Trnovac bb, 75 000 Tuzla, Bosna i Hercegovina
Tel. 387- 35 303 131

Fax: 387- 35 303 471

e-mail: osman.sinanovic@ukctuzla.ba

Nino Sinčić

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

Neda Stigmayer

Prof.dr.sc., spec. okulist

Klinika za očne bolesti, KBC i

MF Sveučilišta u Zagrebu

Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb

Tel 01-2388430

e-mail nedastig@mef.hr

Ivica Ščurić

Dr.med., spec. neurolog

SB za medicinsku rehabilitaciju

Gajeva 2, 49217 Krapinske toplice

Mobitel: 091 504 75 40

e-mail: iscuric@inet.hr

Aleksandra Šimić

Dr.med., spec. neurolog

Klinika za neurologiju , KBC Osijek

Huttlerova 4, 31 000 Osijek

Mobitel: 091 56 61 270

Fax: 031- 512 359

e-mail: aleksandra.dr.simic@windowslive.com

Sanja Štifter

Doc.dr.sc., spec. patolog

MF Sveučilišta u Rijeci

Zavod za patologiju

Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka

Tel./ Mobitel: 051- 325 983; 091 5130465

Fax: 051-325 810

e-mail: stiftersanja@gmail.com

Maša Vikić-Topić

Stud.med.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Mikulićeva 6, Zagreb

Mobitel: 091 5251512

e-mail: lavic7@gmail.com

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

Maja Vugrinec

Stud.med.
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
4.Požarinje 14, Zagreb
Telefon/ Mobitel: 098 668 789
e-mail: mvugrinec@gmail.com

Nenad Vukojević

Doc.dr.sc., spec. oftalmolog
Klinika za očne bolesti MF Sveučilišta u Zagrebu
i KBC Zagreb
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb
Mobitel: 098 332 773
Fax: 01-2850090
nenad.vukojevic@zg.t-com.hr

Silvijo Vuković

Dr med., spec. neurolog
Odjel neurologije, OB Zabok
Bračak 8, 49 210 Zabok
Mobitel: 0989498140
Fax: 049-204009
e-mail: silvijovuk@gmail.com

Danijela Zjačić

Stud.med.
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Vrlička 14, Zagreb
Mobitel: 098187428
e-mail: dzjacic@gmail.com

KLINIČKE KARAKTERISTIKE I DIJAGNOSTIKA FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE

Osman SINANOVIĆ

Klinika za neurologiju, Univerzitetski klinički centar Tuzla,
75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina

Uvod

Progresivne mišićne distrofije (distrofinopatije, udno pojasne mišićne distrofije, facioskapulohumeralna mišićna distrofija) su klinički i etiološki heterogena grupa miopatija. Termin *mišićna distrofija* je prvi put pomenuta od strane Wihelma Erba 1891. za progresivnu neuromišićnu bolest («*dystrophia muscularis progressiva*»). Termin distrofija namjeravao je da opiše kliničku i histološku koegzistenciju znakova mišićne atrofije i hipertrofije. Različite miopatološke promjene opisane u ovoj bolesti predstavljaju kriterij koji je i danas validan. Proširenje identifikacije brojnih etiološki različitih miopatija, međutim, sada otežavaju identifikaciju progresivne degenerativne miopatije – mišićna distrofija ili miopatija. Stoga se klasifikacija na neki način čini arbitrarno, jer npr. različite forme distalnih miopatija nisu progresivne distrofije. Na drugoj strani, okulofaringealna mišićna distrofija obično ne pokazuje histopatološki distrofičke promjene. Međutim, progresivne mišićne distrofije se jasno razlikuju od kongenitalnih mišićnih distrofija. Ova etiološki heterogena grupa autozomno recesivnih poremećaja obično počinje na rođenju i dovodi do teške progresivne onesposobljenosti (1).

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija (FSHD) je bolest koja se naslijeđuje autozomno dominantno sa visokom genskom penetracijom i varijabilnom ekspresijom. Opise bolesnika sa kliničkom slikom FSHD možemo naći u medicinskoj literaturi u 19. stoljeću, a prve opise bolesti kao zasebnog kliničkog entiteta su dali Landouzy i Dejerine u člancima objavljenim 1885. godine (2-4)(Slika1). Oni su dokazali da se radi o miopatiji i ukazali na činjenicu da se

u mnogim slučajevima radi o nasljednoj bolesti. Istaknuli su da samo ime ukazuje na najvažnije kliničke znake, a koji je razlikuju od miopatije, ranije opisana od strane Duchenne-a (progresivna mišićna distrofija – Duchenne). Nešto kasnije, uveden je i termin «skapuloperonealna amiotrofija» (4-5) za mišićnu distrofiju čija je klinička slika slična ranoj fazi FSHD u velikog broja bolesnika, u kojih je facijalna slabost tek minimalno izražena. Zbog ovih sličnosti nerijetko bolesnici sa FSHD se pogrešno dijagnostikuju kao skapuloperonealna mišićna distrofija (4).



Louis Théophile Joseph Landouzy
(1845-1917)



Jules Déjérine (1849 – 1917)

Slika 1. Louis Landouzy i Jules Dejerine

Epidemiologija

Prevalenca FSHD se kreće od 1 na 20 000 do 1 na 45 000, zavisno od geografskog područja. Bolest pogađa oba spola, ali se nešto češće sreće u žena nego u muškaraca. Prosječna pojava bolesti je vezana za drugu deceniju, ali se bolest može javiti i ranije i kasnije.

Molekularna genetika

Bolest se nasljeđuje autosomno dominantno. Uzročni gen još nije otkriven, ali je poznato da genetsku osnovu u 95% slučajeva FSHD predstavlja smanjenje polimorfnog D4Z4 ponavljajućeg niza na kromosomu 4 (4q35) koji prepoznaje sonda p13E-11 (1,4,6-7). Ovaj oblik bolesti se označava kao tip 1 FSHD (FSHD1), a u samo malom procentu nije utvrđeno

smanjenje D4Z4 ponavljajućeg niza na hromozomu 4q35 i ovaj oblik bolesti se označava kao FSHD2.

Klinička slika

Bolest, kao što smo već rekli, zahvata oba spola, ali češće ženski. U oko 5% slučajeva javlja se u dobi do četiri godine, a u 95% u dobi od 15-19 godina. Klinička slika je vrlo varijabilna, od minimalne slabosti facijalnih mišića do značajne generalizirane slabosti. Može se očitovati u vrlo ranoj slabosti mišića lica, mada su saopštenja o manifestnoj slabosti facijalnih mišića vrlo različita.

Početak bolesti se definiše kao trenutak kada bolesnik postane svjestan da ima određenih slabosti i/ili oštećenja uzrokovanih bolešću. Izraz lica je miopatski, bolesnik otežano zatvara oči, ne može napućiti usne, teško ili ne može da fućka, ponekad ima lagoftalmus i sijaloreju (Slika 2 i 3). Neki bolesnici spavaju sa otvorenim očima i kada slabost mišića lica nije značajan.



Slika 2. Slabost facijalnih mišića kod bolesnika sa facioskapulohumeralnom mišićnom distrofijom (ljubaznošću prof. dr. S. Apostolskog)



Slika 3. Slabost facijalnih mišića kod bolesnika sa facioskapulohumeralnom mišićnom distrofijom

Zahvatanje mišića lopatica uzrokuje razvoj tzv krilastih lopatica (scapula alata) što je posljedica slabosti širokog leđnog mišića (m. latissimus dorsi) i prednjeg pilastog mišića (m. serratus anterior)(Slika 4).



Slika 4. Krilaste lopatice (scapulae alatae) kod bolesnika

sa facioskapulohumeralnom distrofijom

Bolesnik teško može dići ruke iznad horizontale (Slika 5). Deltoidni mišić obično nije zahvaćen, a biceps je manje zahvaćen nego triceps, što podsjeća na izgled Popaja, poznatog lika iz ranije vrlo popularnog dječijeg crtanog filma.



Slika 5. Slabost mišića ramenog pojasa i skapularnih mišića kod bolesnika sa facioskapulohumeralnom distrofijom (ljubaznošću prof. dr. S. Apostolskog)

Mišići karličnog pojasa bivaju kasnije zahvaćeni nego ramenog. Mišićna slabost može biti prisutna i u distalnim mišićima donjih udova sa pojavom visećih stopala. Rani početak bolesti uglavnom korelira s težim tokom bolesti. Kada bolest odmakne razvija se naglašena lordoza (Slika 6) ali i skolioza, sa teškom slabošću paravertebralnih mišića. U značajnog broja bolesnika (oko 75%) bolesnici imaju bolove u mišićima. Posebno je česta bol u ramenom zglobu. Od ukupnog broja oko 20% bolesnika vremenom postanu vezani za invalidska kolica (4,7,8,9).



Slika 6. Naglašena slabost mišića ramenog pojasa i lordoza u bolesnika sa facioskapulohumeralnom mišićnom distrofijom

Dijagnostika

Dijagnoza facioskapulohumeralne mišićne distrofije (FSHD) nije jednostavan zadatak, kao u ostalom i mnogih drugih neuromuskularnih bolesti. Na kliničkom nivou prihvaćena su četiri glavna kriterija koji definiraju ovu bolest, mada je zasigurno, definitivna potvrda moguća samo na DNK nivou (veličina delecije polimorfnog područja D4Z4 na 4q35 fragmentu)(8,10,11).

Glavni **klinički kriteriji** su: 1. pojava slabosti facijalnih mišića i ramenog pojasa, ne prelazeći na ekstraokularne, faringealne i lingvalne mišiće kao i na miokard; 2. slabost facijalnih mišića u više od 50% pogođenih članova porodice; 3. autozomalno dominantni način nasljeđivanja; evidentna miopatija na elektromiografiji i mišićnoj biopsiji u bar jednog pogođenog člana, bez biopsijskih nalaza koji upućuju na moguće druge bolesti (11).

Uobičajeno je da **su prvi simptomi** vezani za facijalne mišiće i mišiće ramenog pojasa. Pojava slabosti mišića karličnog pojasa kao prvi znak bolesti nije tipična za FSHD, ali je slabost ovih mišića u daljem toku bolesti očekivani dio kliničkog spektra. Vrijeme početka bolesti i/ili njenog uočavanja, je vrlo varijabilan. Moguć je i prije pete godine života, ali je najčešći u drugoj deceniji. Kada se bolest dijagnostikuje u ranom djetinjstvu uobičajene su slabosti facijalnih mišića (11,12).

Facijalna slabost pogađa očne zatvarače (m. orbicularis oculi) i perioralne mišiće (m. orbicularis oris) i javlja se u velike većine bolesnika. U odsustvu facijalne slabosti, dijagnoza FSHD se može prihvatiti samo ako većina pogođenih članova porodice imaju facijalnu slabost. Facijalna slabost ponekad može biti vrlo diskretna i vidljiva samo u obliku izvjesne asimetrije facijalne ekspresije. Postoje i dokazi da dominantna skapulohumeralna prezentacija bolesti bez facijalne slabosti može pripadati istom mehanizmu mutacije na hromozomu 4q35 (7,8,11).

Slabost mišića ramenog pojasa prije svega podrazumijeva slabost skapularnih fiksatora i pektoralnih mišića koji bivaju zahvaćeni na samom početku bolesti u većine bolesnika. Na drugoj strani deltoidni mišići ostaju pošteđeni kroz duži period, a kada budu zahvaćeni onda je to parcijalna i proksimalna atrofija. Pošto je triceps obično više zahvaćen nego biceps to daje karakterističan izgled ramena koji se opisuje, kao što smo već rekli, kao Popajev izgled.

Asimetrična zahvaćenost mišića ramenog pojasa je skoro pravilo i obično prvo biva zahvaćena desna strana. Asimetrična zahvaćenost facijalnih mišića je također česta. U detekciji mišićne atrofične asimetrije od koristi može biti ultrazvuk, kompjuterizirana tomografija ili pak magnetna rezonanca (11).

Bolest je progresivna a progresija je vrlo varijabilna, a u nekim slučajevima vrlo diskretna i skoro neprimjetna, tako da mnogi bolesnici ostaju dugo relativno dobro pokretni. Vezanost za invalidska kolica, dakle nije obavezna i prema nekim serijama sreće se u manje od 50% slučajeva (u oko 10%-20% slučajeva). Progresivnost je izraženija u bolesnika sa ranijim ispoljavanjem bolesti. Treba naglasiti da poboljšanje bolesti ne postoji i ako se zapazi očigledno se radi o pogrešnoj dijagnozi. Progresija inače podrazumijeva zahvatanje abdominalnih mišića i ekstenzora na nogama relativno rano, a pojava slabosti u području karličnih mišića i mišića gornjih ekstremiteta može se pojaviti u bilo koje vrijeme nakon pojave slabosti mišića ramenog pojasa (1, 11).

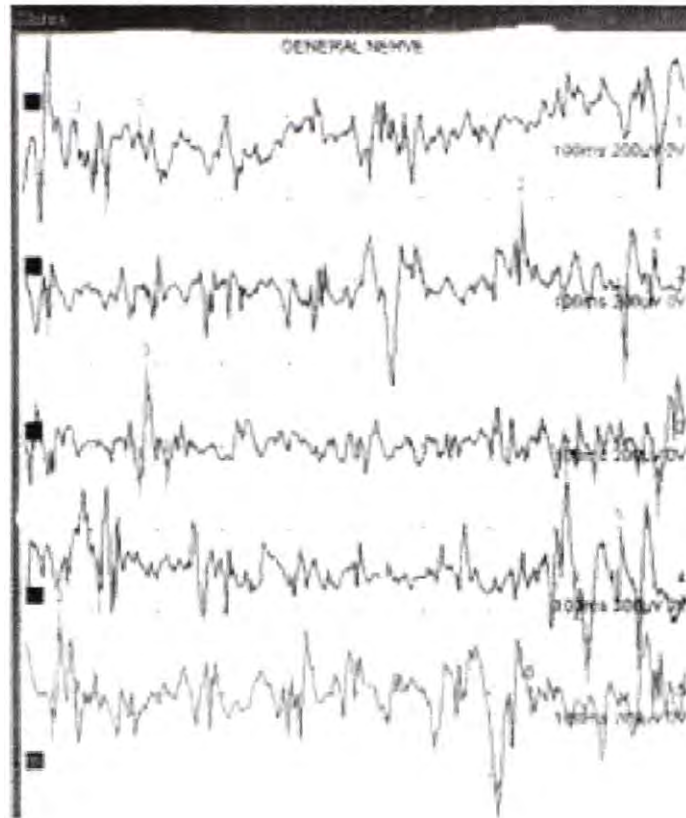
Kod nekih bolesnika mogu biti prisutne mišićne *pseudohipertrofije* (Slika 7), kao i *umjerene kontrakture*. *Pad sluha* je relativno čest i uglavnom je progresivan fenomen, sa prvim poteškoćama u području percepcije viših tonova, te *Coatsov sindrom*, odnosno eksudativna retinopatija s teleangiektazijama. Pad sluha i retinopatija su češći u onih bolesnika sa ranim početkom bolesti.



Slika 7. Umjerena pseudohipertrofija listova u bolesnika sa facioskapulohumeralnom mišićnom distrofijom

Laboratorijski dijagnostički kriteriji podrazumijevaju analizu **serumske kreatin kinaze (SCK)**, elektromioneurografski (EMNG) nalaz i nalaze mišićne biopsije. SCK može biti normalna, ali je često (u oko 50% bolesnika) umjereno povišena, rijetko značajno (preko pet puta od normale). Ako se visoke vrijednosti SCK zadržavaju kroz duže vrijeme treba razmisliti o drugoj dijagnozi. **EMNG nalaz** najčešće je tipično miopatski (potencijali kraćeg trajanja, polifazični, niske amplitude)(Slika 8). U ekstenzivnom elektromiografskom nalazu

moгу se naći i neurogeni znaci u vidu potencijala visoke amplitude, te pozitivnih neurogenih valova. Brzine motornog i senzornog provođenja su tipičan nalaz.



Slika 8. Tipičan miopatski nalaz kod bolesnika sa facioskapulohumeralnom mišićnom distrofijom

Standardna **mišićna biopsija** se preporučuje kao obavezni dio dijagnostičkog spektra i pokazuje tipičan miopatski nalaz. Nadalje, prisustvo malih angularnih vlakana je relativno čest biopsijskih nalaz. U slučaju prisustva malih grupa atrofičkih vlakana, poželjna je druga biopsija u istog bolesnika ili u njegovog pogođenog rođaka. Prisustvo ćelijskih infiltrata nije iznenađujuće ali je njihov značaj nepoznat. U ovim slučajevima nužna je molekularna dijagnostika i veličina delecije DNK fragmenta na 4q35 su presudni za potvrdu dijagnoze (11-13).

Literatura

1. Zierz S. Progressive muscle dystrophies. In: Lisak RP, Truong DD, Carroll WM, Bhidayasiri R (eds). International Neurology. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009: 449-456.

2. Landouzy L and Dejerine J. De la myopathie atrophique progressive. Rev Med 1885a; 5: 81-117.
3. Landouzy L and Dejerine J. De la myopathie atrophique progressive. Rev Med 1885b; 5: 253-366.
4. Padberg GW. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. In: Emery AEH (ed). Neuromuscular Disorders: Clinical and Molecular Genetics. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1999: 105-121.
5. Davidenkow S. Scapulooperoneal amyotrophy. Arch Neurol Psychiatry 1939; 41: 694-701.
6. Wijmenga C, Frants RR, Brouwer OF et al. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. Lancet 1990; 336: 651-653.
7. Padberg GW. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. In: Lisak RP, Truong DD, Carroll WM, Bhidayasiri R (eds). International Neurology. Chichester: Wiley-Blackwell, 2009: 223-224.
8. Barišić N. Neuromuskularne bolesti. U: Barišić N i suradnici. Pedijatrijska neurologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2009: 295-416.
9. Sinanović O, Kapidžić-Duraković S. Progressive muscular dystrophies in children. Acta Med Sal 2010; 39 (suppl 1): S40-S47.
10. Lunt PW, Harper PS. Genetic counseling in facioscapulohumeral muscular dystrophy. J Med Genet 1991; 28: 655-664.
11. Padberg GW, Lunt PW, Koch M, Fardeau M. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. In: Emery AEH (ed). Diagnostic Criteria for Neuromuscular Disorders. 2nd Edition. London: Royal Society of medicine Press, 1997: 9-15.
12. Munsat TL. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and the scapulohumeral syndrome. In: Engel AG, Banker BO (eds). Myology. New York: McGraw-Hill, 1986; 1251-1266.
13. Dubovitz V. Muscle biopsy. 2nd ed. London: Bailliere Tindall, 1986.

KLINIČKA SLIKA I DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE

Biserka KOVAČ

Odjel za neurologiju, OB Vukovar

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija (FSHD) je nasljedna mišićna bolest s progresivnim razvojem slabosti mišića i propadanjem mišićnog tkiva. Nasljeđuje se autosomno dominantno, u 10 do 30% slučajeva javlja se sporadično. FSHD je osobito je zanimljiva kliničarima iz više razloga. Prema novijim podacima iz 2008-e godine najčešća je među mišićnim distrofijama s prevalencijom od 7/100000¹. Dok nije došlo do važnih spoznaja iz područja molekularne genetike FSHD, ona se svrstavala prema prisustvu tzv. klasičnih simptoma u treću nasljednu bolest mišića po učestalosti iza Duchenneove mišićne distrofije, Beckerove mišićne distrofije i mionije distrofije². Zbog širokog spektra različitih fenotipova FSHD teško je bilo čak i najvećim autoritetima iz područja miologije uspostaviti točno definirani set kliničkih simptoma i znakova simptoma koji bi upućivala FSHD. Kako su dolazile spoznaje o pojedinim novim kliničkim simptomima i znacima u sklopu FSHD, bolest je tijekom vremena nazivana različito: Landouzy-Dejerine mišićna distrofija, facioskapularna mišićna bolest, facioskapulohumeralna mišićna distrofija, skapulohumeralna mišićna distrofija, Coatova bolest, bilateralna senzorneuralna gluhoća itd. Klinički simptomi i znaci FSHD su po prvi puta od francuskih liječnika Lois Landouzy-a i Joseph Dejerin-a još daleke 1884. Oni su upozorili na pojavnost bolesti u pojedinim obiteljima, opisujući prisutnost bolesti u 4 generacije jedne obitelji koji su istraživali kroz 11 godina. Formalna definicija kliničke slike je nastala tek 1952. godine na temelju istraživanja obitelji iz Utaha s velikim brojem oboljelih od FSHD. Početkom 1980-ih kliničari postaju svjesni da je varijabilnost kliničkog izražaja upravo posljedica genetske i patofiziološke kompleksnosti bolesti, da bi u 90-im godinama prošlog stoljeća završila istraživanja koja s pojavom bolesti povezuju promjene na genu DUX4 na kromosomu 4³. Genetičkim testiranjima se mjeri broj ponavljajućih sekvenci D4Z4 (3,2kb jedinica) odnosno njihovih delecija na subtelomeričkoj regiji kromosoma 4q35 kojese najuvjerljiviji dokazi potvrde dijagnoze FSHD i u asimptomatskih bolesnika. Normalni D4Z4 aleli imaju 11-

100 ponavljajućih jedinica, a u osoba s FSHD je broj ponavljanja smanjen na od 1 do 10. U više od 95% slučajeva FSHD se detektira upravo navedena genetska mutacija, dok postoje bolesnici s nezamjetljivom različitim fenotipom (FSHD tip 1B) kod kojih nema patološke promjene na 4q kromosomskom mjestu, ali i bolesnicu kojih se sumnja da postoje drugi odgovorni geni i drugi mehanizmi koji objašnjavaju tzv. objedinjenu teoriju genetičkog modela FSHD. Unatoč novih otkrića iz područja molekularne genetike ostaje saznanje da se još dosta u istraživanju bolesnika s FSHD mora učiniti jer egzaktni mehanizam koji vodi dio atrofije mišića u bolesnika i posljedične slabosti u njima još nije jasan. To bi dakako bilo važno u terapiji FSHD; u izboru valjanog farmaceutskog pripravka ili genetičkog liječenja bolesti⁴.

Teba naglasiti da u svakodnevnoj rutinskoj praksi u našoj zemlji neurolozima nisu dostupni laboratoriji za molekularnu dijagnostiku FSHD. Većina se liječnika praktičara mora osloniti na klinički pregled i poznavanje simptoma i znakova suspektnih na FSHD, te na detaljno razmatranje velikog broja sličnih bolesti u sklopu diferencijalne dijagnoze. U slučajevima negativnog nalaza najčešće genetske mutacije za FSHD potrebo je pristupiti postupcima dokazivanja ili isključivanja drugih nasljednih i stečenih bolesti koje klinički slične FSHD.

Klinička slika u bolesnika s facioskapulohumeralnom mišićnom distrofijom

Osnovno što se u kliničkoj slici prepoznaje u bolesnika s FSHD su opisali upravo Landouzy i Dejerine je slabost mišića lica, progresivna slabost i atrofija mišića lopatice i nadlaktice. Težina mišićnih slabosti je prema njihovom opisu varirala u pojedinim aficiranih članova iste obitelji. Na pojašnjenje razumijevanja mehanizma nasljeđa FSHD i varijabilnosti ekspresije kliničke slike su utjecali Tyler i Stephens 1950. godine kad su u 240 članova jedne obitelji koja je 1840. godine imigrirala u Utah pronašli 58 bolesnika. 1982. godine Padberg je u retrospektivnom prikazu 107 bolesnika dao pojašnjenje o kliničkim simptomima, progresiji bolesti, te pridonio upotpunjenju kliničke dijagnoze odgovarajućim laboratorijskim nalazima. Klinički kriteriji za dijagnozu FSHD koji su etablirani 1991. godine su: pojava bolesti na mišićima lica (i to u više od 50% aficiranih članova obitelji), na mišićima lopatice i ramenog

pojasa uz poštedu ekstraokularnih mišića, faringealnih mišića, mišića jezika i miokarda. U te kriterije ulazi i autosomno dominantni način nasljeđivanja u aficiranim obiteljima, prisustvom opatskog uzorka u nalazu biopsije mišića u najmanje jednog aficiranog člana

obitelji bez specifičnog biooptičkog nalaza mišića koji bi govorio u prilog druge mišićne bolesti⁵. Nakon publikacije navedenih kriterija opisani su bolesnici u kojih je miokard bio involviran⁶.

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija je bolest se visokim stupnjem interfamilijarne i intrafamilijarne varijabilnosti kako u kliničkoj slici tako i u progresiji bolesti. Genetička dijagnoza kojom se utvrđuje broj ponavljanja D4Z4 jedinica nije pogodan za predviđanje kliničkog izražaja i tijeka bolesti. Godine pojavljivanja bolesti imaju utjecaj na tijek bolesti, ali se prognoza ipak temelji na individualnoj procjeni u svakog bolesnika. U 90% bolesnika simptomi se javljaju do 20-e godine, najčešće u tinejdžerskim godinama, u teškim infantilnim oblicima mišićna slabost je vidljiva po rođenju.

Najčešći su klinički simptomi u bolesnika s FSHD su karakteristični: osjećaj slabosti mišića ramena kao prvi simptom što im u drugoj ili trećoj dekadi života čini poteškoće u izvođenju aktivnosti za koje je potrebno odizanje ruku iznad glave. Potom se javlja slabost facijalne muskulature, slabost odizanja stopala. U objektivnom neurološkom pregledu bolesnika s FSHD naći će se klinički znaci, prema Padbergu, u slijedećoj učestalosti: slabost facijalne muskulature u 94% bolesnika, slabost mišića ramenau 93%, slabost dorzifleksora stopala u 67%, slabost muskulature zdjeličnog pojasa u 50% bolesnika. U samo 5% bolesnika bolest započinje simptomima slabosti muskulature zdjeličnog pojasa⁷.

Napredovanjem molekularnih dijagnostičkih testova za dokazivanje FSHD, osim se povećao broj detektiranih bolesnika, proširen je i spektar kliničkih simptoma koji se pripisuju FSHD: osjećaj boli u mišićima kao vodeći simptom u velikom broju bolesnika, poteškoće hoda usljed višestopala, bol u ramenu, poteškoće hoda zbog slabosti mišića lista ili slabosti mišića natkoljenice uz nestabilnost koljena. Opisuju se i atipični simptomi i klinički znaci kao npr. bolesnici s FSHD s pošteđenom facijalnom muskulaturom a izraženim znacima miopatije na lopaticama, bolesnici s FSHD i samo izraženom udno pojasnom slabošću, bolesnici sa slabošću distalne muskulature, bolesnici sa sporom progresivnim FSHD i s progresivnom eksternom oftalmoplegijom i dr.

Slabost mišića lica se očituje najčešće u vidu slabosti kružnog mišića oka i usta (m. orbicularis oculi i m. orbicularis oris). Očite su poteškoće kod otvaranja i zatvaranja očiju. Od

ranog djetinjstva spavaju s poluotvorenim očima a kod pokušaja čvrstog spuštanja kapka uvrću trepavice prema unutra. Oči sene mogu zatvoriti (lagophthalmus), moguć je keratitis. Bolesnici se ne smiju, odnosno kod pokušaja smješka imaju karakterističan tzv. „transverzalni osmijeh“, ne mogu pokazivati lutnju (ne mršte se), ne mogu zviždati. Poneki bolesnici imaju poteškoće kod izgovora glasa M, B i P. Izraz lica ima je uvijek ozbiljan zbog nemogućnosti postizanja smješka što im može praviti poteškoće socijalne prirode. Često je nalaz na ustima asimetričan, a nedavno su na mišićima jezika snimanjem magnetnom rezonancijom pronađeni znaci atrofije. Nije nađeno znakova atrofije niti slabosti muskulature ždrijela i grkljana što upućuje da su problemi s gutanjem koje neki bolesnici mogu imati sekundarna posljedica slabosti samo orofacijalnih mišića⁸. Rijetko imaju probleme s artikulacijom odnosno izgovaranjem riječi mada se ona može pojaviti u kasnijem stadiju ili kod vrlo izražene kliničke slike bolesti.

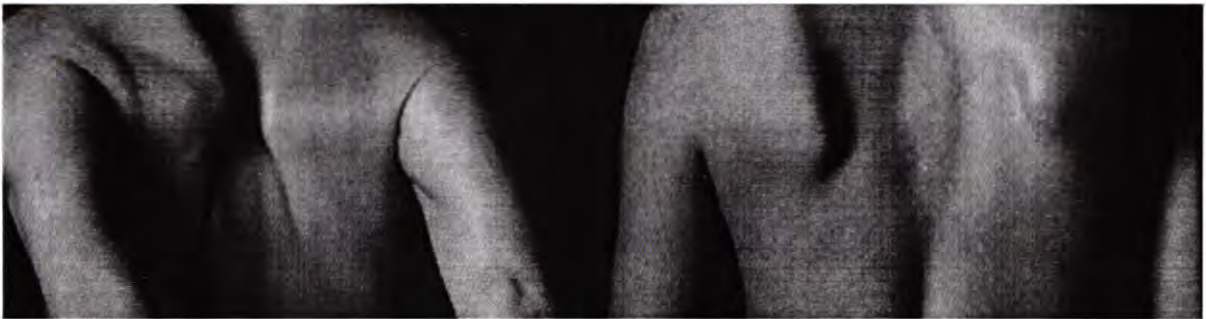


Slika 1. Izraz lica u bolesnika s FSHD (preuzeto s Interneta)



Slika 2. „Transverzalni osmijeh“ i hipotrofija mišića ramenog pojasa u bolesnika s FSHD (preuzeto s Interneta)

Slabost mišića ramena se očituje u vidu neobičnog položaja skapule kod odizanja ramena zbog slabosti srednjeg i donjeg dijela m. trapezius i unutarnje rotacije ruke. Ramena imaju tendenciju pomicanja ukoso i naprijed, ravna se prednja grudna stijenka, a u 5% bolesnika postoji pectus excavatum. Atrofija velikog pektoralnog mišića osobito sternalne glave i klavikularnog dijela sternokleidomastoidnog mišića su rani znaci bolesti. Kod aktivne fleksije i abdukcije ramena upadljiva je krilasta skapula. One nisu samo uzrokom funkcionalog deficita ruku u vidu nemogućnosti izvođenja pokreta, nego izvor bola u bolesnika, a predstavljaju i kozmetički deficit. Slabost je često asimetrična i ta karakteristika razlikuje FSHD od udno-pojasne mišićne distrofije.



Slika3. Krilaste skapule u bolesnika s FSHD

Slabost abdominalne muskulature je također rani znak bolesti. To uzrokuje koštani deformitet u vidu izravnjanja lumbalne lordoze, te izged prominentnogtrbuha u bolesnika s FSHD. Slabost je izraženija u donjim abdominalnim mišićima, javlja se pozitivan Beevor-ov znak – pomicanje pupka na gore kod posjedanja, odnosno nakon fleksije vrata. Neki od autora prisustvo tog kliničkog znaka ističu kao vrlo važan kriteriji postavljanja dijagnoze FSHD⁹.



Slika 4. Prominentan trbuh i izravnjanje lumbalne lordoze u bolesnika s FSHD (preuzeto s Interneta)

Slabost i atrofije mišića donjih ekstremiteta najviše je izražena, kako klinički, tako i na magnetnoj rezonanciji na mišiću prednjeg dijela potkoljenice (musculus tibialis anterior, peronealna muskulatura), mišićima stražnjeg dijela natkoljenice, zatim i na medijalnom dijelu mišića stražnjeg dijela potkoljenice (medijalni dio musculusgastrocnemius). Najčešća klinička manifestacija kao posljedica afekcije muskulature donjih ekstremiteta je viseće stopalo koje kod bolesnika zahtjeva karakterističan hod uz odizanje natkoljenica. Ako su zahvaćeni i mišići zdjeličnog pojasa javlja se uz peronelani i gegajući hod u bolesnika uz okretanje zjelice prema naprijed, te vrlo izraženu lumbalnu lordozu. Bolesnici sa slabošću muskulature donjih ekstremiteta teško ustaju iz stolice, ne mogu dugo stajati, hodati, penjati se uz stepenice.



Slika 5. Slabost mišića prednjeg dijela potkoljenice u bolesnika s FSHD

Premda je progresija bolesti varijabilna, u većine bolesnika je spora. Karakteristična je asimetrija razvoja mišićnih slabosti; prvo na jednoj potom na drugoj strani tijela. Bolest u većine započinje slabošću muskulature ramena, lica; više donje no gornje facijalne muskulature, pa muskulature trbuha, itd. U 30% familijarnih FSHD ne dolazi do progresije bolesti dalje od slabosti mišića ramena, s druge strane, u ostalih familija u većine bolesnika dolazi do razvoja slabosti dorzifleksora stopala (u 80%), te slabosti muskulature zjeličnog pojasa (u 20%). U istoj obitelji mogu postojati i različite varijacije progresije bolesti. Na početku bolestideltoidni mišiću na rukama je u početku minimalno aficiran, promjene su izražene nanadlacticama; musculus biceps brachi i musculus triceps brachi postaju slabi i smanjuju se. Mišići podaktice mogu biti pošteđeni i bolesnici mogu imati ruke nalik Popajevim. U nekih bolesnika se može se javiti eventualno i slabost ekstenzora šake s

oslabljenim hvatom šake i oslabljenom funkcijom ruke u cjelosti. 10 do 20% bolesnika nakon 50-e godine starosti treba invalidsku stolicu za funkcioniranje izvan doma. Oko u oko 20 % bolesnika dolazi do teškog invaliditeta zbog vrlo izraženih mišićnih slabosti⁷. U prosjeku bolesnici s FSHD imaju normalan životni vijek.

Što je u podlozi karakterističnog asimetričnog razvoja mišićnih slabosti u FSHD, ne znase. Neke hipoteze govore u prilog izrazitijeslabosti jedne strane kao rezultat njezine pojačane upotrebe; kod dešnjaka desne, a ljevaka lijeve¹⁰, a neke nastanak asimetrije pripisuju isključivo utjecaju genetskog mehanizma u razvoju bolesti. Unatoč asimetriji incidencija kontraktura (u oko 10% bolesnika) i skolioze (u oko 30%) je mala¹¹.

Inako ne često, u manjeg broja bolesnika s FSHD su prisutne kardiološke i plućne komplikacije tako da se i o njima mora voditi računa osobito u bolesnika s FSHD koji imaju jako izražene mišićne slabosti i zbog toga su u invalidskim kolicima, u onih s teškom kifoskoliozom i pectus excavatum. Kardiološke komplikacije se javljaju zbog reducirane funkcije lijevog ventrikla srca i shodno tome abnormalnom srčanom aktivnošću⁶.

Padberg je 1980. godine FSHD je nazivao multisistemskom bolešću obzirom da je zamjećenopostojanje retinalnih abnormalnosti u bolesnika usljed nastanka vaskularnih promjena u vidu retinalnih teleangiektazija te prisustvo gubitka sluha. Gubitak vida je zamjećen u vrlo malog broja bolesnika s FSHD, ali gubitak sluha s nalazom obostranog neuralnog oštećenja je češći: u 25 do 65%. Često je gubitak sluha prisutan u infantilnom obliku bolesti ili u bolesnika s ranom pojavom simptoma.

Bol je vrlo ozbiljan simptom u bolesnika s FSHD, više od 58% bolesnika osjeća bol više od 4 puta na tjedan. Izražen je kod pojačanog napora i usljed nepravilnog držanja tijela što je posljedica mišićne slabosti. Nepovoljne meteorološke prilike, osobito povišen postotak vlage u zraku imaju utjecaj na frekventniju pojavu boli¹². Osima bola, više od polovine bolesnika s FSHD se žali na pojačan umor, čiji mehanizam nastanka nije potpuno jasan. Nesumnjivo umor može biti posljedica smanjenog opsega fizičkih aktivnosti, ali i reducirane motivacije za kretanjem koja se čini se još pojačava s duljinom trajanja bolesti.

U Infantilnom obliku FSHD ili obliku s ranom pojavom simptoma tegobe započinjuranije, po rođenju ili u drugoj dekadi života. Često se radi o sporadičnima oblicima FSHD s velikom delecijom D4Z4 na samo 1 ili 3 ponavljanja (u zdravih je broj ponavljanja 11 do 100). Mnogi su dijagnosticirani kao Moebius sindrom što je zapravo ekstremno rijetka kongenitalna neurološka bolest koja s očituje obostranom facijalnom paralizomi obostranom nemogućnosti abdukcije očiju kao posljedica defektnog razvoja VI i VII kranijskog živca. Većina bolesnik

s ranom pojavom simptoma FSHD imaju normalni motorni razvoj, razvijaju mišićnu slabost nekoliko godine poslije. Treba naglasiti da postoje i teški oblici infantilne FSHD. U Japanu su opisani bolesnici u kojih je teška motorička slabost udružena s mentalnom retardacijom i epilepsijom bolesnika s ranim javljanjem bolesti¹³. U nekih pak bolesnika s ranom pojavom bolesti i s epilepsijom, gluhoćom i retinopatijom su izraženi blagi ili umjereni kognitivni deficiti.

Temeljiti neurološki pregled bolesnika je svakako od neprocjenjive važnosti u procesu postavljanja dijagnoze facioskapulohumeralne mišićne distrofije. Genealoški podatci koji mogu uputiti na autosomno dominantni način nasljeđivanja su vrijedni u postavljanju dijagnoze kao i mjerene blago povišene vrijednosti kreatinin kinaze (CK) u serumu bolesnika, elektromioneurografski nalaz miopatskog uzorka, testiranje sluha, genetičko testiranje kromosoma 4. Može koristiti nalaz biopsije mišića koji može povrditi dijagnozu ali više s ciljem traženja druge mišićne bolesti u slučaju negativnog nalaza genetičkog testiranja na FSHD.

U diferencijalnoj dijagnozi kod pregleda bolesnika sa izraženim kliničkim kriterijima koji bi mogli govoriti za FSHD a to je: asimetrija i selektivna zahvaćenost pojedinih grupa mišića, pošteta ekstraokularnih mišića, bulbarnih mišića, deltoideusa i respiratorne muskulature koji pomažu razlikovanju FSHD od drugih mišićnih distrofija, treba razmisliti i druge vrste bolesti koje se očituje istim ili sličnim kliničkim simptomima ili znacima.

Diferencijalna dijagnoza facioskapulohumeralne mišićne distrofije

Nasljedna multisistemska bolest autosomno dominantnog načina nasljeđivanja **miotona distrofija tip I (DM tip I-Steinert)** vrlo je učestala u pojedinim obiteljima. Osnovno kliničko obilježje u bolesnika je slabost mišića lica i muskulature ekstremiteta. Slabost mišića je uglavnom simetrična; na licu je simetrična ptoza kapaka, na ekstremitetima je slabost distalne muskulature. U bolesnika s DM tip I je slabost i atrofija izražena je na mišićima vrata i facijalnoj muskulaturi s izraženom slabosti mastikatornih mišića. Usta u tih bolesnika izgledaju napućena, vilica im visi. Djeluju iscrpljeno što se uobičajeno označava kao miopatski facies. Zbog slabosti sternokleidomastoidealnog mišića glava im je nagnuta prema naprijed.



Slika 6. Slabost mišića lica i vrata u bolesnika s miotonom distrofijom (preuzeto s Interneta)

Kao i u bolesnika s FSHD bolesnici s DM tip I mogu imati disartriju i disfagiju. Ono što ih značajno klinički razlikuje od bolesnika s FSHD su miotoni fenomeni usljed prolongirane relaksacije mišića i prisustvo čitavog niza kliničkih simptoma zbog čega je priroda DM multisistemska jer osim skeletnih mišića patološke promjene u DM tip I zahvaćaju i glatku muskulaturu, oči, srce, endokrini sustav i središnji živčani sustav bolesnika. Diferencijalno dijagnostičke poteškoće može činiti distrofija miotonika u novorođenčadii FSHD s početkom po porodu. Rađaju se hipotona djeca s generaliziranom slabosti mišića i slabosti mišića lica, nemogućnosti sisanja, gutanja, respiratornom insuficijencijom i dr. smetnjama. Dokazivanje povišenog broja CTG nukleotida u DMPK (dystrophia myotonica protein kinasa) genu u bolesnika s DM tip I uvelike pomaže u postavljanju dijagnoze infantilnih, ali i adolescentnih oblika bolesti.

Miotonička distrofija tip II PROMM (proksimalna miotonička miopatija) se očituje sličnim simptomima kao u miotoničkoj distrofiji tip I, obično nešto blažim, zbog manje anticipacije nego u DM tip I. Treba ju uzeti diferencijalno dijagnostički u razmatranje osobito u komparaciji s bolesnicima s FSHD s blažim simptomima i kasnijeg početka. U bolesnika s PROMM se bolesnici žale na mišićnu slabost provociranu naporom, klinički se uočava blaža miotonija, osobito sličan je raspored mišićnih slabosti kao u bolesnika u FSHD a to je u proksimalnoj muskulaturi (ramena, bedra), rijetko je u bolesnika s DM tip 2 je zahvaćena facijalna muskulatura. Metode dokazivanja DM2 genetičkim testovima utvrđivanjem ekspanzije na Znf9 (cink finger 9) genu kromosoma 3 razrješavaju diferencijalno dijagnostičke dileme.



Slika 7. Slabost muskulature ekstremiteta u bolesnika s DM tip 2

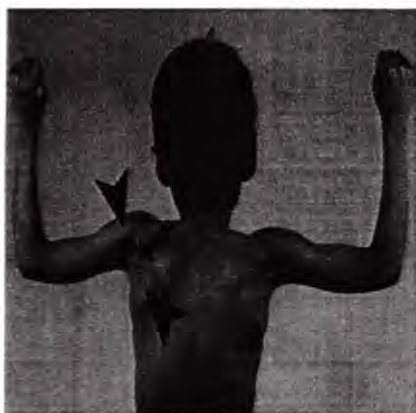
Udno pojasne (limb-girdle, LMGD) mišićne distrofije su velika skupina klinički sličnih ili istih entiteta prvi put opisane 1876. godine koja može i danas činiti diferencijalno dijagnostičke poteškoće u njihovom razlikovanju od bolesnika s FSHD. FSHD je opisana nešto kasnije nego LGMD i ostaje dojam da je detaljan neurološki pregled i pomno proučeno nasljeđe u bolesnika s mišićnim distrofijama omogućilo distinkciju tih dviju bolesti. Walton i Nattrass 1954. godine opisali udno pojasnu distrofiju mišića kao bolest koju karakterizira progresivna slabost i atrofija predominantno proksimalne muskulature ekstremiteta, velika varijabilnost u godinama starosti pojave simptoma; u prvoj, drugoj, trećoj, četvrtoj ili petoj, pa čak i šestoj dekadi života, lagana klinička progresija, autosomno recesivni ili autosomno dominantni način nasljeđivanja. LGMD su unutar skupine različite prema patofiziološkom nastanku odnosno genetskom deficitu koji dovode do mutacija različitih proteina koji su neophodni za normalnu funkciju mišića: sarkoglikana, disferlina, fukutina, kalveolina, kalpaina 3, lamina A/C i dr^{14} , a iste su zbog karakteristično udno pojasne slabosti mišića zdjeličnog pojasa, osobito mišića ramenog pojasa. Osnovna razlika u tipičnim oblicima LGMD i FSHD je u distribuciji slabosti i hipotrofija na nogama: kod bolesnika s udno pojasnom mišićnom distrofijom osim slabosti i atrofije mišićna zdjeličnog pojasa češća je zahvaćenost femoralne muskulature donjih ekstremiteta dok je u bolesnika s FSHD češća afekcija peronealnih mišića. Treba naglasiti da postoje poteškoće u kliničkom razlikovanju od FSHD s bolesnicima s LGMD tip 2G koja se javlja u ranijem djetinjstvu s visećim stopalom zbog atrofije m. tibialis anterior. U LGMD tip 2B (dysferlin miopatija) je distribucija slabosti muskulature donjih ekstremiteta više distalna i kod Miyoshi forme distribuirana straga. U malom broju

bolesnika s FSHD se slabost miškulature zdjeličnog pojasa pojavljuje kao prvi simptom što je kod većine udno-pojasnih mišićnih distrofija osnovno obilježje. Kod LGMD tip 1A može se javiti uz udno-pojasnu distribuciju mišićne slabosti i nazalni govor zbog hipotrofije faringealne miškulature, dok je u bolesnika s FSHD moguća disartrijska kao posljedica atrofije facijalnih mišića i mišića jezika koji treba razlikovati od nazalnog govora. Kod bolesnika s pojedinim tipovima LGMD su češće prisutni poremećaji srčanog ritma no što se nalazi u bolesnika s FSHD. Ono što je slično u obje vrste FSHD i LGMD je rijetka pojava kontraktura, sporo progredijentni tijek, mentalna očuvanost. Treba znati da unutar LGMD postoje velike varijabilnosti fenotipskog izražaja. Općenito, autosomno recesivne LGMD su distrofije s težim kliničkim simptomima tako da je u LDMD tip 2C, 2D, 2E i 2F (sarkoglikanopatije) i učestala pojava lumbalne lordoze i kontraktura. Kod razmatranja asimetrične distribucije mišićne slabosti kao važnog kriterija za postavljanje dijagnoze FSHD, treba imati na umu da i Leiden-Moebius varijanta kao najheterogenija od svih LGMD se može očitovati asimetričnom slabosti ali zdjelične miškulature. Skapulohumeralna distrofija (Erbova) je tip LGMD autosomno recesivnog načina nasljeđivanja, a očituje je asimetričnom slabošću mišića ramenog pojasa (sindrom „smrznutog ramena“) s poštedom deltoidnog mišića, supra i infraspinatusa. Ukoliko se znaci miopatije javljaju u kasnijoj životnoj dobi bolesnika (četvrtoj ili petoj dekadi života ili čak kasnije), osobito s kliničkom slikom tzv. quadriceps miopatije vjerojatno se ne radi o FSHD nego o autosomno dominantnoj LGMD kasnog pojavljivanja¹⁴. Danas, kao i u ostalim tipovima mišićnih distrofija, osim razlikovanja osnovnih kliničkih karakteristika u svakog pojedinog bolesnika razvoj sofisticiranih dijagnostičkih metoda histologije, histokemije, ultrastrukture, elektrodijagnostike, genetičkih metoda omogućava postavljanje točne dijagnoze ne samo pojedinih mišićnih distrofija, nego i pojedinih tipova unutar istih kliničkih entiteta.

Udno pojasna mišićna distrofija tip 2A je najčešća autosomno recesivna forma LGMD čija distribucija mišićne slabosti u bolesnika može biti slična kao u bolesnika s FSHD. Uzrokovana je mutacijom kalpain 3 gena (CAPN 3 – koji kodira kalpain 3 proteazu)¹⁵, a tipična distribucija slabosti i hipotrofije mišića je na stražnjim mišićima bedra, izražena je skapula alata, široki stav, kontraktura Ahilove tetive. Unekih bolesnika s kalpainopatijom (LGMD 2A) zahvaćena jedijafragma uzrokom insuficijencije respiracijske miškulature, rjeđe se javlja hipertrofija mišića lista i uvećan jezik. Klinička slika u bolesnika je vrlo

varijabilna, a kao i u bolesnika s FSHD, rijetke su kardiogene abnormalnosti. U diferencijalnoj dijagnozi kalpainopatije i FSHD osim molekularne analize pomaže i vrijednost serumske kreatin fosfokinaze (CK) koja je češće povišena u svih bolesnika s autosomno recesivno nasljednim LGMD, pa i u one tip 2A, nego u bolesnika s FSHD u kojih je uglavnom blago povišena. Ipak, vrijednosti CK nije u autosomno recesivnih LGMD nije veća nego u distrofinopatija, dermatomiositisa, polimiositisa, hipotireodne miopatije, rabdomiolize i deficijencije acid maltaze¹⁶.

Duchennova mišićna distrofija (DMD) i Bekerova mišićna distrofija (BMD) se razlikuju od FSHD ponajviše po tome što su u njih predominantno involvirani donji ekstremiteti. Osim toga, kao najprepoznatljiviji znak se pojavljuje pseudohipertrofija mišića lista, deltoideusa i jezika, te brza progresija mišićnih slabosti osobito u Dechenneovoj distrofiji gdje dolazi do nepokretnosti bolesnika u prosjeku oko 12 godine života.



Slika 7. Pseudohipertrofija m. deltoideusa u bolesnika s Duchenneovom mišićnom distrofijom

Bekerovu mišićnu distrofiju je ponekad teže razlikovati od FSHD samo na temelju pregleda, obzirom da ima blaže simptome i kliničke znake od Duchenneove. Dokaz manjka ili potpunog nedostatka distrofina na bioptičkom materijalu mišića Westernblot tehnikom ili imunohistokemijski, kao i dokaz genske mutacije (najčešće delecije) na Xp21 lokusu, dakako najuvjerljivijegovore za distrofinopatije. Distrofinopatije i FSHD razlikuje bitno način nasljeđivanja bolesti; X vezani način nasljeđivanja kod Duchenneove i Beckerove MD, a autosomno dominantni kod FSHD. Vrijednost kreatin fosfokinaze (CK) je značajno viša u distrofinopatija shodno izrazitijoj progresiji mišićnih slabosti nego u bolesnika s FSHD.

Emery-Dreifuss mišićna distrofija je X- vezana (kad je mutacija gena koji kodira protein ovojnice jezgre mišićna stanice emerin) ili autosomno dominantna (kod mutacije gena za laminin A i C) nasljedna mišićna bolest koju treba razmotriti u diferencijalno dijagnostičkom

promišljanju FSHD. Javlja se u tinejdžerskim godinama kao i FSHD, ima postepeni razvoj mišićne slabosti skapuloperonealne distribucije (m. biceps brachi, triceps brachi, peronealne muskulature), stršeće skapule. Slabost facijalne muskulature javlja se u nekih slučajeva rijetko ili u kasnijem tijeku bolesti. Ono što je vrlo tipično za EDMD x-vezanu formu su rani razvoj kontraktura, osobito laktova, krute kralježnice, poremećaji srčanog ritma zbog kojih bolesnici ponekad trebaju pace-maker već prije 30-e godine starosti.

Distalna miopatija može se očitovati kao autosomno dominantna distalna miopatija s dokazanom mutacijom myotilin S55F i agregatima myotilina i desmina na bioptičkom materijalu mišića u bolesnika¹⁷. Ta se miopatija javlja u starijoj životnoj dobi, a atrofije i slabost su distalno distribuirani na mišićima stopala i na mišićima šaka. Može biti involviran i mišić bedra (biceps femoris, semimembranosus), mišići glutealne muskulature i tada pravi manje diferencijalno dijagnostičke poteškoće u odnosu na FSHD. 1980. godine je opisana familija s distalnom hereditarnom miopatijom, ali i s različitim stupnjem zahvaćenosti udno pojasnih mišića, te u nekih slučajevima i mimičke muskulature¹⁸. Distalna hereditarna miopatija se javlja u juvenilnom obliku. Termin distalna miopatija je uveden još daleke 1902. kada je Gowers opisao 18-godišnjaka s atrofijom i slabošću mišića stopala i šaka koje je započela rano od 10-11 godine života. Proksimalna muskulatura je bila pošteđena, nije bilo neuropatskog uzorka, senzornih ispada, a zabilježana je hipotrofija facijalne muskulature te oba sternokleidomastoida što ju je povezivalo s fenotipom FSHD kojoj je klinička slika već tada bila definirana¹⁹.

Kongenitalne mišićne distrofije su autosomno recesivne bolesti koje se očituju jako izraženom proksimalnom slabošću mišića po rođenju (ili u prvoj godini života) koja može biti progresivna ili ne.

Za razliku od FSHD kontraktura su vrlo česte kao i abnormalnosti središnjeg živčanog sustava. Nalaz biopsije koji govori za distrofički proces (značajno povećano endomizijalno i perimizijalno vezivno tkivo, varijacije u veličini mišićnih vlakana s malim okruglim vlaknima, nezrelih vlaknima i nekrotičnim mišićnim vlaknima) ih razlikuje u odnosu na

kongenitalnemioopatije. U postavljanju dijagnoze važna je klinička slika i rezultati genetičke obrade. Klasifikacija pojedinih oblika kongenitalnih mišićnih distrofija je prema defektu pojedinih proteina: deficit proteina ekstracelularnog matriksa (laminina, nekoliko tipova kolagena), deficit integrina, deficit glikosiltransferaze (POMT1 /O-mannosyltransferaze 1),

POMT 2 /O-mannosyltransferaze 2), fukutina, fukutin vezanog proteina i dr. deficita proteina endoplazmatskog retikuluma (selenoproteina N- rigid spine syndrom)²⁰.

Najčešća (7-12/100000) kongenitalna mišićna distrofija u Japanu (s mutacijom fukutina), nazvana Fukuyama, može upućivati na FSDH s pojavom po rođenju. Očituje se teškom mišićnom slabošću udno-pojasne distribucije, ali i bulbarnim smetnjama, okularnom patologijom. Kod mišićne distrofije okularna patologija je u vidu strabizma ili abnormalnih pokreta očiju, pojavljuje se s respiracijskom insuficijencijom, kontrakturama, s mentalnom retardacijom uzrokovanom patološkim promjenama u mozgu. Prognoza je loša, mada postoje bolesnici koji žive dugo s minimalnim deficitima.

Kongenitalna mišićna distrofija s deficitom laminina alfa 2 je u većini slučajeva vrlo teška. Očituje se atrofijom proksimalne muskulature ekstremiteta kasnije i distalne, slabošću facijalnih mišića, u nekih i hipertrofijom jezika. U bolesnika s parcijalnim deficitima laminina ima kliničkih varijanti koje upućuju na FSDH zbog udno-pojasne distribucije mišićnih slabosti, ali i na Emery-Dreifus mišićnu distrofiju zbog izraženog fenomena krute kraljenice (rigid spine).

Urlich-ova kongenitalna mišićna distrofija podsjeća na FSDH ranog početka jer se u nje osim rane hipotonije i slabosti distalne muskulature na nogama javlja i facijalni dismorfizam: mikrognatija, okruglo lice s spuštenom donjim kapkom i prominentnim očima. Ova je vrsta kongenitalne distrofije teža no FSDH ranog početka budući da zbog slabosti muskulature nogu i jakih kontraktura takvi bolesnici uopće ne hodaju ili prestaju hodati u dobi od 2-10 godine. Inteligencija im je normalna.

Bethlem mioopatija nastaje usljed autosomno dominantne mutacije gena za kolagen VI i očituje se mišićnom slabošću udno-pojasne distribucije blaže progresivnog tijeka. Kao i Urlich distrofija karakterizirana je jakim kontrakturama i promjenama na koži, respiracijskim

smetnjama, a može se pojaviti i u 6-oj dekadi života što je značajna razlika u odnosu na dob pojavljivanja FSHD.

Kongenitalna mišićna distrofija s rigid spine može se očitovati stršećom skapulom, slabošću facijalne i bulbarne muskulature. Takvi bolesnici imaju prosječno niži BMI index zbogne uzimanja hrane, najčešći znak je spinalni rigiditet, nemogućnost hoda u ranoj životnoj dobi,

kontrakture koje se postupno razvijaju od 3-10 godine i skolioza, kontrakture lica, proksimalnih dijelova ekstremiteta, ekstenzora prstiju što ih značajno razlikuje od bolesnika s FSHD ranog početka.

Walker-Warburg sindrom uzrokuju mutacije u svih 6 glikotransferaza a rezultiraju najtežom formom svih kongenitalnih mišićnih distrofija u kojima dolazi do smrti aficiranog djeteta u 9-mjeseću života. Osim jake hipotonije mišića takva djeca imaju velike abnormalnosti na očima: mikroftalmus, glaukom, okularni kolobom promjene na retini i posljedičnu sljepoću kao i vrlo izražene strukturalne abnormalnost mozga²⁰.

Okularna miopatija može biti dominantno nasljedna bolest, a može biti i sporadična. Očituje se kao ptoza kapaka koja je asimetrična, statična i tu mogu postojati diferencijalno dijagnostičke dileme kod početka simptoma FSHD na facijalnoj muskulaturi. Kad se okularna miopatija očituje ptozom u kombinaciji s paralizom vanjskih pokretača očnih jabučica bez dvoslika ili s oftalmoplegijom, onda je razlika prema FSHD jasna.

Okulofaringealna mišićna distrofija (OPMD) je autosomno dominantna nasljedna bolest kod koje se promjene na očima očituju kao progresivna ptoza kapaka koja često zahtjeva i operacijsku korekciju. Javlja se i disfagija, a slabost mišića može se očitovati i na proksimalnoj muskulaturi ekstremiteta u daljnjem tijeku bolesti. Metode molekularne dijagnostike (dokaz ekspanzije CTG tripleta u PABPN1 genu u bolesnika s okulofaringealnom mišićnom distrofijom) pomažu postavljanju pravilne dijagnoze u odnosu na FSHD uz uočavanje ostalih kliničkih osobitosti koje govore u prilog FSHD.

Kongenitalne miopatije su hereditarne uglavnom neprogresivne bolesti koje treba spomenuti u razmatranju diferencijalne dijagnoze FSHD. Poznat je veliki broj kongenitalnih miopatija, a

osnovna podjela prema morfološkim i genetskim obilježjima ih svrstava u 4 osnovne grupe: 1.miopatije s nakupljanjem proteina (npr.nemalinska miopatija, miopatije usljed nakupljanja miozna i dr.)2.miopatije s jezgrama (central core disease, multiminicore disease) 3.miopatije s centralnim jezgrama (miotubularna miopatija, centronuklearnamiopatija) 4.miopatije s varijacijama u broju vlakana (kongenitalna disproporcija vlakana).Uglavnom se klinički očituju u neonatalnom periodu hipotonijom djeteta, zaostajanjem glave, vanjskom rotacijom bedra, slabim pokretima fleksije bedra, koljena i lakta, difuznom slabošću mišića, lica,

zjeličnog i ramenog pojasa, aksijalne muskulature i gubitkom mišićne mase. Postoje i izrazito teški klinički oblici u ranoj dječijoj dobi (npr.autosomno recesivni oblik central core disease) s eksternom oftalmoplegijom, generaliziranom slabošću muskulature i atrofijama, bulbarnim smetnjama bez respiracijske insuficijencije, kod nekih kardiomiopatijom i manifestacijama od strane SŽS²¹. Međutim, neki slučajevi kongenitalne miopatije se mogu pojaviti u odrasloj dobi ili mogu imati lagano progresivni tijek i time kao i s pojavom nekih simptoma pokazati sličnost s FSHD. Kongenitalnemiopatije s prezentacijom u adolescentnoj dobi se mogu očitovati sporo progresivnom udno-pojasnom slabošću mišića. Za razliku od FSHD češće se izražene skeletne abnormalnosti: kongenitalne dislokacije kuka, kifoskolioza i deformiteti stopala.

Nemalinska miopatija na primjer,koja je uzrokovana mutacijom 6 gena, se može očitovati minimalno progresivnim ili neprogresivnom slabošću udno pojasne muskulature, bulbarnih i facijalnih mišića uz različitoi zražene koštane deformitete u vidu kontraktura. Javlja se često i pectus excavatum koji može biti i u bolesnika s FSHD.Lice bolesnika s nemalinskom miopatijom tipa 2 je elongirano, usta u obliku šatora,gotsko nepce, retrognatija.U ranom početku slabost ekstremiteta je na distalnoj muskulaturi, kasnije zahvaća proksimalnu i ekstenzore vrata, može se javiti i oftalmolegija.

U nemalinskoj miopatiji 5 (autosomno recesivna mutacija za troponin T1)je osim rane pojave slabosti već u prvim mjesecima života s hipotonijom, proksimalnomslabošća, opisan tremor brade i ekstremiteta.

U centronuklernalnoj miotubularnoj miopatiji (mutacija myotubularina u teškoj x-vezanoj formi) u prvim danima života često može biti izražena bilateralna ptoza, slabost facijalne muskulature i oftalmoplegija.

U bolesnika s multiminocor kongenitalnoj miopatiji (mutacije gena za selenoprotein N) s pojavom simptoma u djetinjstvu koja se očituje slabošću proksimalne ili aksijalne muskulature, facijalne i bulbarne slabosti, uz kontrakture se javlja i maligna hipertermija što nikako nije slučaj u bolesnika s FSHD.

U bolesnika s kongenitalnom miopatijom usljed disproporcije mišićnih vlakana klinička slika može se očitovati slabošću facijalne muskulature, ptozom, slabošću aksijalne i proksimalne

muskulature i dorzifleksora stopala, stršećim skapulama i općenito dojmom tankog habitusa tijela. Takvi bolesnici često imaju potrebu za neinvazivnom noćnom ventilacijom zbog respiracijske insuficijencije, negdje od 3. do 55. godine života .

Kongenitalna miopatija usljed nakupljanja myosina (hyalin body myopathy) se u manjeg broja bolesnika može pojaviti u adultnoj dobi. Kod njih je slabost je skapuloperonealne distribucije i sporo progresivna što može biti vrlo nalik na FSHD pa čak i sa simptomima povremenog poremećaja srčanog ritma koji se može javiti u obje bolesti.

Oligosimptomatskom obliku FSHD može biti vrlo slična klinička slika u bolesnika sa sarkotubularnom kongenitalnom miopatijom (ili LGMD 2H) osobito u nekih bolesnika kad se javlja u adultno doba. Očituje se umjereno progresivnom slabošću proksimalnih mišića ruku i nogu, te facijalnom slabošću, stršećim skapulama. Javlja se i bol kao jedan od češćih simptoma i kod FSDH i to izazvano vježbama, te kontrakture.

Diferencijalno dijagnostički je potrebno misliti i na reducing body miopatiju s pojavom simptoma u adultno doba koja se očituje skapuloperonealnom slabošću, ali i slabošću aksijalne muskulature, spinalnim rigiditetom i pognutim položajem bolesnika koji su ranije bili atletski građeni s hipertrofijom mišića²¹. Izražene kontrakture i fatalne kardiomiopatije govori protiv dijagnoze FSHD.

Veliki je još broj kliničkih, histoloških i genetskih entiteta rijetkih i tzv. „vjerojatnih“ kongenitalnih miopatija koje klinički mogu sličiti na teške, klasične i oligosimptomatske oblike FSHD.

Mnoge druge kliničke manifestacije kao što su: teške hipotonije, poteškoće hranjenja respiracijski distres, teške koštane abnormalnosti, makrocefalija, pilorostenozna, jetrena

disfunkcija ukazuju na izrazito lošu prognozu i uglavnom govore protiv postavljanja dijagnoze FSHD.

Zahvaljujući naprednim tehnikama elektronske mikroskopije, enzimskim histokemijskim i imunocitokemijskim metodama kao i metodama molekularne genetike za identifikaciju genskih mutacija koji je kodiraju pojedine proteine, mnoge od kongenitalnih miopatija su dobro definirane i time je njihovo razlikovanje od FSHD ranog početka uspješnije.

Miofibrilarna miopatija (bolest nakupljanja desmina- desminopatija, miotilinopatija, zasopatija, alfa-B kristalinopatija i dr.) je u većini slučajeva autosomno dominantna nasljedna mišićna bolest koja se očituje sporom progresivnom slabošću mišića, a dokazuje se histološkim nalazom biopsije mišića, imunocitokemijskim tehnikama, metodama molekularne genetike koja upućuju na mutacije nekoliko poznatih gena koji kodiraju proteine citoskeleta mišića: miotilin, desmin, alfa-B kristalini dr. Klinički se u tih bolesnika zamjećuje slabo progresivna slabost mišića u nekih višeproksimalne muskulature (u 20%), a u nekih distalne (u 80%) na ekstremitetima. Može se javiti, mada rijetko, i slabost facijalne muskulature. Po tim karakteristikama može sličiti na FSHD. Ono što govori protiv FSHD su parestezije, jaki grčevi u mišićima, dispneja i disfagija, češća je i miokardiopatija i smetnje disanja usljed slabosti respiracijske muskulature. Elektromioneurografijom možemo u takvih bolesnika osim miopatskog uzorka naći i spontana miotona izbijanja te usporenje brzine provodljivosti uz klinički nalaz polineuropatije i to u 20% bolesnika. Vrijednosti serumske CK su normalne ili blaže povišene²².

Kronična progresivna eksterna oftalmoplegija (CPEO) je česta klinička manifestacije **mitohondrijske miopatije**. Mutacija mitohondrijske DNA u najvećem broju slučajeva nastaje sporadično, ali može biti i nasljedna. Mitohondrijske miopatije su bolesti s vrlo različitim kliničkim izražajima. CPEO može biti jedini klinički znak u bolesnika, ali ukoliko je udružena sa slabošću skeletne muskulature može biti diferencijalno dijagnostički problem u odnosu na ostale mišićne distrofije, pa tako i FSHD. CPEO bolest koju karakterizira sporo progresivna paraliza ekstraokularnih mišića koja započinje simetričnom ptozom kapka, a nakon više mjeseci i godina se pojavljuje oftalmopareza. Ptoza može napredovati a bolesnik koristi frontani mišić za podizanja kapaka, podiže bradu ili rukama pridržava kapke. Ptoza može biti i unilateralna ili se razvija samo oftalmopareza. Kronična eksterna oftalmoplegija može biti dio kliničke slike atipičnih fenotipa FSHD.



Slika 8. Bolesnik s progresivnom eksternom oftalmoplegijom(preuzeto s Interneta)

Kearns-Sayre sindrom (KSS) je rijetka mitohondrijska miopatija u kojoj dominira kronična progresivna eksterna oftalmoplegija. Javlja se prije 20-e godine uz još čitav niz simptoma: mišićna slabost koja je progresivna i pogoršava se fizičkom aktivnošću, javlja se umor, ponekad grčevi u mišićima. Od simptoma se pojavljuje pigmentna retinopatija, gubitak sluha, bolest srca., „Ragged red fibers“ na histološkom preparatu mišića su tipičan znak što pomaže u diferencijalnoj dijagnozi u odnosu na FSHD kao i je prisustvo ostalih abnormalnosti: mentalna retardacija, cerebelarni znaci, endokrinološke abnormalnosti, epileptički napadaji i dr²³.

Neki od kliničkih entiteta koji prate mitohondrijske miopatije su MELAS sindrom sa znacima mitohondrijske encefalopatije s laktacidozom i epizodama nalik na moždani udar ili mioklonu epilepsiju s ragged red fibers (MERRF). Općenito su to teške bolesti s razvojem progresivnih mišićnih slabosti.

Endokrine miopatije se uobičajeno očituju mišićnom slabosti, najčešće proksimalne muskulature ekstremiteta. Njihov patofiziološki mehanizam nastanka nije u potpunosti jasan, a histološki i elektromiografski nalaz nije uvijek konzistentan. Najčešće kategorije endokrinih miopatija uključuju: 1. miopatije uslijed adrenalne disfunkcije (Cushing-ova bolest ili steroidna miopatija), 2. miopatije uslijed tiroidne disfunkcije: miksedem ili tireotoksična miopatija. Ukoliko postoji hipertireoidizam u takvih bolesnika postoji slabost skeletne muskulature, a ukoliko je izražen hipotireoidizam prevladavaju mišićni grčevi. 3. miopatije uslijed paratiroidne disfunkcije 4. dijabetička miopatija s ishemijskom infarkcijom femoralnih mišića 5. miopatije uslijed hipofizarne disfunkcije²⁴. Najčešća je steroidna miopatija i može praviti diferencijalno dijagnostičke poteškoće u razlikovanju FSHD mada u toj miopatiji nije zahvaćena facijalna muskulatura.

Tiroidna oftalmopatija (Gravesova oftalmopatija) je dio autoimunog procesa koji između ostalog zahvaća orbitalno i periorbitalno tkivo i daje karakterističan izgled bolesnikovih očiju-egzoftalmus, koji može podsjećati na izgled bolesnika sa slabošću snage i tonusa m. orbicularisoculi. Tipična je pojava retrakcija gornje i donje vjeđe s vidljivim sklerama i proptozom bulbusa. Bolesnici se žale na binokularne vertikalne diplopije. Poremećaji funkcioniranja tiroidne žlijezde može uzrokovati i orbitalni miositis i slabost očnih mišića uz znake miopatije na ekstremitetima²⁴.

Nasljedne metaboličke bolesti koje se očituju kao miopatije su brojne, nazvane prema substancama koje im nedostaju: deficijencija acid maltaze (Pompeova bolest), deficijencija karnitina, deficijencija karnitin palmitil transferaze, deficijencija laktatdehidrogenaze, deficijencija mioadenilatdeaminase, deficijencija fosfofruktokinaze, deficijencija fosforilaze (Mc Ardleova bolest) i dr. Osnovno što se u nasljednim metaboličkim miopatijama događa je razvoj kronične mišićne slabosti uslijed gubitka mišićne mase uslijed nedostatnog stvaranja energetskog produkta u mitohondrijima mišića. Bolesnici s nasljednim metaboličkim bolestima ne mogu tolerirati napor, javljaju se bolni mišićni grčevi koji se ne javljaju redovno u bolesnika s FSH. U bolesnika s metaboličkim miopatijama javlja se i slabost mišića a kliničke slike ovise o dobi pojavljivanja simptoma, ako se jave po rođenju, mogu biti fatalne. U Pompeovoj bolesti (defekt gena odgovoran za deficit enzima acid maltaza) elektromioneurografski nalaz je tipičan, postoje miotona izbijanja, pozitivni denervacijski valovi i fibrilacije i kompleksna repetitivna izbijanja. Mišićna biopsija pokazuje vakuole koje sadržavaju glikogen¹⁶. Klinička slika se očituje slabo progresivnom mišićnom slabošću mišića bedra, ramena i slabošću respiracijske muskulature. Važno je postaviti pravu dijagnozu jer nadoknada nedostatnog enzima značajno poboljšava inače lošu prognozu ove bolesti. McArdleova bolest (genetski deficit za enzim fosforilazu) se očituje najčešće prije 15-e godine. Mišićna slabost nije jako progresivna, a nakon napora se javljaju jaki bolovi i slabost u mišićima koja pokazuje tendenciju značajnog poboljšanja nakon odmora, što nije slučaj u bolesnika s FSHD.

Inflamatorne miopatije su stečene bolesti poprečno prugastih mišića koje se očituju mišićnom slabošću, inflamacijskim promjenama i povišenom razinom CK u serumu i kao

takve mogu praviti dijeferencijalno dijagnostičke poteškoće u razlikovanju od FSH. Značajnu razliku od FSHD kod inclusion body miositisa, dermatomiositisa i polimiositisa su promjene

na mišićima, koži i vezivnom tkivu nastalim na imunološkoj osnovi koja ujedno daje i odgovarajuće imunološke laboratorijske pokazatelje (miositis specifična antitijela) i značajno viši CPK od razine mjerene u bolesnika s FSHD. U bolesnika s dermatomiositisom i polimiositisom karakteristična je slabost i bol u mišićima proksimalne muskulature, očni mišići nisu zahvaćeni, a u težim oblicima bolesti involvirani su i mišići facijalne muskulature. U dermatomiositisu postoje odgovarajuće promjene na koži: eritem oko očiju na gornjoj vjeđi oka, tamno crveni eritem na ekstenzornim dijelovima prstiju, laktovima i koljenima koje značajno pomažu kliničkom razlikovanju od FSHD. Mišićne slabosti u

polimiositisu i dermatomiositisu su subakutnog ili akutnog početka, progresivnog tijeka, a kasnije mogu zahvatiti i distalnu muskulaturu ekstremiteta. Involvirani su mišići farinksa i vrata što uzrokuje otežano gutanje i poteškoće držanja glave. U blažim kliničkim oblicima mogu biti samo zahvaćeni mišići vrata i paravertebralne muskulature. U polimiositisu se za razliku od FSHD javlja respiracijska insuficijencija zbog slabosti respiracijske muskulature osobito u teškom akutnom obliku.

Sporadični Inclusion body miositis (s-IBM) i hereditarna inclusion body miopatija je zanimljiva skupina bolesti u diferencijalno-dijagnostičkom promišljenju u odnosu na FSHD jer se očituje mišićnom slabošću koja se može javiti asimetrično, odnosno na jednoj strani tijela, može doći do slabosti facijalne muskulature, a ekstraokularni mišići nisu zahvaćeni. Obično se slabost postepeno javlja usljed upalne aktivnosti na mišićima i to na proksimalnoj i distalnoj muskulaturi ekstremiteta. Može početi slabošću mišića natkoljenice, šake, fleksora prstiju, neki bolesnici imaju poteškoće s gutanjem što klinički ne upućuje na tipičan klinički tijek u bolesnika s FSHD. Mišićna biopsija pokazuje tipičan nalaz citoplazmatskih vakuola i inkluzija. Do sada nema specifične uzročne terapije niti za FSHD niti za IBM za koji se pretpostavlja da ga uzrokuju neovisno generirani degenerativni i imunološki procesi²⁵.

Adultne forme spinalne mišićna atrofije (SMA tip III -Kugelberg-Welanderova bolest, SMA tip IV) su bolesti koje gotovo redovito u kliničkim simptomima mogu praviti diferencijalno dijagnostički poteškoće u dijagnozi u odnosu na FSHD. To su autosomno recesivne bolesti s definiranim genetskim deficitom (SMN 1 gen na kromosomu 5q) kojima je osnovna karakteristika progresivna slabost donjeg motoričkog neurona. Budući da su to neuropatije, klinički se razlikuju od FSHD po odsutnim mišićno tetivnim

refleksima, fascikulacijama na skeletnim mišićima. Razlikuju se po nalazu detekcijske elektromioneurografije (gubitak perifernih motoneurona) te nalazu denervacijske atrofije na bioptičkom materijalu mišića. Prema kliničkom nalazu sličnija je LGMD po karakterističnoj distribuciji mišićne slabosti, sporo je progresivnog tijeka. SMA tip III se javlja nakon 18 godine, adultna forma tip IV sredinom 30 –ih. Sporo progredijentnoj slabosti mišića ekstremiteta u bolesnika sa SMA za razliku od bolesnika s FSHD mogu se u kasnijem tijeku bolesti pridružiti bulbarne smetnje, a klinički se mogu uočiti pseudohipertrofije. U obje bolesti ; SMA tip III i tip IV kao i u FSHD bolesnici imaju normalni očekivani životni vijek.

Facioskapulohumeralna spinalna mišićna atrofija (FSH SMA) - spinalna muskularna distrofija s FSH fenotipom je opisana je davno kao atipična slika Kugelberg Welander spinalne atrofije upravo zbog facioskapulohumeralne distribucije mišićnih slabosti i atrofije praćene vidljivim fascikulacijama, oslabljenim mišićno tetivnim refleksima i nalazom EMNG koji upućuje na neurogenu leziju stranica prednjih rogova spinalne moždine²⁶. To je autosomno dominantna ili sporadična bolest koja je karakterizirana s udno pojasnom slabošću i slabošću facijalne muskulature spore progresije koja se pojavljuje prije 20 godine života u bolesnika, najviše je opisana u Japanu.

Danas su poznate **skapuloperonealne spinalne mišićne atrofije**: tip 1 (autosomno dominantna), tip 2 (autosomno recesivna forma) i X-vezana skapuloperonealna spinalna mišićna atrofija od kojih je tip 1 je nasličnija FSHD po godinama pojavljivanja (od 14-26 godina), atrofiji distalnih dijelova donjih ekstremiteta, afekcijom facijalne muskulature i pektoralnog mišića.

Skapulohumeralna spinalna mišićna atrofija je karakterizirana slabošću mišića skapulohumeralne distribucije a razlikuje se klinički od FSHD po tome što se atrofija javlja kasno, u periodu od 4. do 6. desetljeća života, rapidne je progresije sa smrtnim ishodom zbog respiracijske insuficijencije unutar tri godine.

Davidenkow sindrom je poznata forma skapuloperonealne SMA karakterizirane slabošću pektoralne i udno pojasne muskulature i distalne muskulature ekstremiteta. Bolesnici imaju

pes equinovarus, gubitak osjeta po tipu „čarapa“ i fascikulacije što ih značajno klinički razlikuje od bolesnika s FSHD.

Distalna spinalna mišićna atrofija (spinalni oblik Morbus Charcot-Mariae-Tooth ili hereditarna senzomotorna neuropatija tip II) se klinički očituje atrofijom peronealnih mišića na potkoljenicama i slabosti dorzalne fleksija stopala²⁷. Pes cavus, odsutni ili oslabljeni mišićno tetivni refleksi u kliničkom pregledu već upućuju na neuropatiju u podlozi poremećaja. Elektromioneurografija i genetska analiza pomažu u diferencijalnoj dijagnozi distalne spinalne mišićne atrofije i FSHD.

Miastenija gravis (MG) je bolest koja se javlja kao posljedica imunološkog zbivanja na postsinaptičkom dijelu neuromišićne sinapse. Često se očituje okularnim simptomima, npr. ptozom kapaka koja može biti asimetrična. Kod miastenije postoji često zahvaćenost mišića

pokretača očnih bulbusa uz dvoslike, poremećaje vidne oštine (akomodacije) što ju razlikuje klinički od slabosti na m. orbicularis oculi bolesnika s FSHD. Različitosti su i u kliničkim znacima motoričke zamorljivosti u miastenije gravis npr. kod forsiranog pogleda prema gore nastaje ptoza kapka zbog patološke zamorljivosti na mišiću podizaču gornjeg ocnog kapka, kod bolesnika s MG se može javiti strabizam koji mijenja smjer tijekom dana. Kod bolesnika s MG je izražen miopatskifacies (kiselu lice) zbog slabosti mimičke muskulature, postoji zaostajanje gornje usne, ponekad otvorena usta zbog slabosti m. massetera, izmijenjen govor, rinolalija, disfonija, otežano žvakanje i gutanje hrane, a sve se to popravljaju nakon primjene antikolinesteraznih lijekova što je vrlo važan dijagnostički znak. Bolesnici s miastenijom nemaju atrofije muskulature na licu, ramenom i zdjeličnom pojasu izuzev u kasnim atrofičnim stadijima bolesti, mada je slabost muskulature pretežno proksimalna kao i u bolesnika FSHD. Slabost poprečno prugastih mišića u bolesnika s miastenijom gravis pokazuje dnevne varijacije (s odmaranjem se smanjuje ili nestaje), a bolest se dokazuje i elektrofiziološkim testom repetitivne stimulacije, dokazom smanjenja mišićne slabosti primjenom antikolinesteraznih lijekova te dokazom antitijela na nikotinske acetilkolinске receptore.

Lambert-Eaton sindrom kao stečeni poremećaj presinaptičkog dijela neuromišićne spojnice se rijetko očituje okularnim simptomima. U bolesnika s LE sindromom se javljaju poteškoće u vidu slabosti proksimalne muskulature ekstremiteta koje se popravljaju ponavljanjem pokreta što se u distrofijama nikada ne javlja. U postavljanju dijagnoze presinaptičkog poremećaja neuromišićne spojnice pomaže dokaz antitijela na voltažne kalcijске kanale i ev. dokaz maligne bolesti.

Bolesti motornih neurona (BMN): amiotrofična lateralna skleroza, progresivna bulbarna paraliza, progresivna muskularna atrofija i primarna lateralna skleroza su progresivne i često fatalne neurodegenerativne bolesti. Zbog toga ih je važno ih je razlikovati od FSHD. U MND se javljaju neki od simptoma i znakova sličnih FSHD: slabost, umor i atrofija u mišićima ekstremitetima. Atrofije mišića su uglavnom drugačijeg rasporeda (segmentnog) no u FSHD i napreduju značajno bržim tijekom. Grčevi u mišićima, napredujuće bulbarne smetnje i slabost respiracijske muskulature su tipični za MND. Klinički nalaz koji upućuje na kombinaciju oštećenja donjeg i gornjeg motoričkog neurona, kao i tipičan elektromiografski nalaz (teški gubitak motoričkih neurona s izraženim fenomenom teritorijske i vremenske kompenzacijske aktivnosti preostalih motoričkih jedinica) ima veliko značenje u postavljanju dijagnoze BMN. Asimetrična slabost muskulature ramenog pojasa i asimetrična stršeća skapula koja se može vidjeti u bolesnika s FSHD može klinički nalikovati na upalno oštećenje vlakana brahijalnog pleksusa. Pleksus neuritis se očituje slabošću mišića ramena (flakcidna paraliza ramena i paraskapularnih mišića nekoliko dana poslije) i atrofijom kojoj prethodi akutno ili subakutno nastala jaka bol. Osobite diferencijalno dijagnostičke poteškoće može činiti rijetka hereditarna forma brahijalnog neuritisa (BN) s autosomno dominantnim nasljeđivanjem u bolesnika s mutacijom SEPT9 gena na kromosomu 17q koja može biti rekurentna, često i bilateralna i s facijalnom dismorfijom u vidu asimetrije facijalne muskulature, hipotelorizmom²⁸.

Kronična inflamatorna demijelinizacijska poliradikuloneuropatija (CIDP), dijabetička polineuropatija ili amiotrofija se mogu očitovati mišićnim slabostima i atrofijama u ekstremitetima proksimalne ili distalne distribucije gdje će klinički nalaz koji upućuje na oštećenja donjeg motoričkog neurona uvelike pomoći u diferencijalnoj dijagnozi, kao i elektromiografski nalaz.

Mišićna slabost u ekstremitetima i muskulaturi lica su česta klinička obilježja u **kanalopatijama** zbog čega se razmatraju u diferencijalnoj dijagnozi FSHD. Kanalopatije su skupina bolesti kojese uzrokovane različitim genetskim mutacijama čije su posljedice poremećaj strukture ionskih kanala (kloridnih, natrijskih, kalijjskih i kalcijjskih) koji se klinički očituju čitavim nizom simptoma od miotonije do periodične paralize.

Bolesti nastale mutacijom gena za kloridne kanale su Thomsenova kongenitalna miotonija i Beckerova generalizirana miotonija koja uz simptome miotonije može imati i vidljive hipotrofije mišića ruku i vrata. Mišićnom slabošću se može očitovati i neuromiotonija (Isaacs

sindrom), gdje je ipak klinički predominantno izražena kontinuirana ili povremena nevoljna mišićna kontrakcija prisutna i za vrijeme sna. Poremećaji u kalcijским kanalima (koji su rijanodinski receptori u retikulumu sarkoplazme) uzorkuju poremećaje u kontrakciji mišićnih vlakana. Ti su poremećaji izraženi u hipokalijemijskoj periodičnoj paralizi, uzrokuju i malignu hipertermiju a viđaju se u centralcormiopatii. U periodičnoj hipokalemijskoj paralizi osim karakterističkih noćnih ataka slabosti mišića kojima prethode vegetativni simptom, može se očitovati i atipičnim atakama slabosti: slabost jednog ekstremiteta, obostrana brahijalna slabost. Genetski uzrokovane mutacije natrijskih kanala su najčešći uzrok hiperkalemijske periodične paralize i kongenitalne paramiotonije (Euleburgova bolest). Kod njih se javljanju atake mišićnih slabosti uz izražene fenomene miotonije provociranih vježbanjem i hladnoćom

koje se mogu kod ponavljanja očitovati i kao trajna slabost u proksimalnoj muskulaturi što može sličiti mišićnoj distrofiji. Obično takvi bolesnici imaju i mioipatske promjene na EMNG uz povišene vrijednosti CK²⁹.

Postaviti sumnju na FSHD u naših bolesnika ukoliko poznajemo osnovne kliničke karakteristike bolesti možda i nije teško. Međutim, ako smo svjesni koliko se veliki broj različitih bolesti i kliničkih entiteta prezentira istim ili sličnim kliničkim znacima kao i FSHD te uzmemo u obzir veliku varijabilnost njezinog kliničkog izražaja, trebali bismo u procesu postavljanja dijagnoze FSHD biti oprezni i temeljiti.

Literatura:

1. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data. www.orpha.net, November 2008 Number 1, Orphanet report Series
2. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases: a world survey. *Neuromuscul Disord.* 1991;1:19-29.
3. Lemmers RJ, Wohlgemuth M, van den Gaag KJ, et al (November 2007) Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapular muscular dystrophy. *Am.J.Hum.Genet.* 81(5):884-94.
4. Rose MR, Tawil R.: Drug treatment for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(2):CD002276.
5. Padberg GW, Lunt PW, Kohm M, et al. Diagnostic criteria for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1991;1:231-234.

6. Trevisan CP, Pastorello E, Armani M. Et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and occurrence of heart arrhythmia. *Eur Neurol.* 2006;56:1-5.
7. Padberg GW. *Facioscapulohumeral Diseases /thesis/*. Leiden, the Netherlands: Leiden University;1982.
8. Wohlgemuth M, de Swart BJM, Kalf JG, et al. Dysphagia in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology.* 2006;66:1926-1928.
9. Shahrizaila N, Wills AJ. Significance of Beevors sign in facioscapulohumeral dystrophy and other neuromuscular diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76:869-870.
10. Brouwer OF, Padberg GW, Van Der Ploeg RJO, et al. The influence of handedness on the distribution of muscular weakness of the arm in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Brain.* 1992;115:1587-1598.
11. Padberg GW. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: a clinician's experience. In Upadhyaya M, Cooper DN, eds. *Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy*. New York, NY: Bios Scientific Publishers;2004:41-54.
12. Koetsier CP. Pain related to FSHD dystrophy: an underestimated problem? Results of an inquiry in the Netherlands, Baarn VSN, FSH Watch. Publication of FSH Society (USA). 1997;summer:23-24.
13. Funakoshi M, Goto K, Arhata K. Epilepsy and mental retardation in a subset of early onset 4q35-associated facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology.* 1998;50:1791-1794.
14. Sahgal V, Reger S. Physical Medicine and Rehabilitation for Limb-Girdle Muscular Dystrophy. 2009. April. Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/313515-overview> (13. ožujka 2011.)
15. Kramerova I, Beckman JS, Spencer MJ. Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A), *Biochim Biophys Acta.* 2007 Feb;1772(2):128-44.
16. Santra G. Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine* 2008;9(4):302-5.
17. Berciano J, Gallardo E, Dominguez-Perles R, Garcia A, Garcia-Barredo R, Combarros O, et al. Autosomal-dominant distal myopathy with a myotilin S55F mutation: sorting out the phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008 Feb;79(2):205-8.

18. Bachmann H, Wagner A. Myopathia distalis tarda hereditaria. Results of a genealogical, clinical, clinical-chemical and electromyographic family study. *Psychiatr Neurol Med Psxchol (Leipz)*. 1980 Jan;32(1):20-8.
19. Biemond A. Myopathia distalis juvenilis hereditaria. *Acta Psychiatrica Scandinavica* Vol 30;Issue 1-2:25-38, June 1955.
20. Lopate G. Congenital Muscular Dystrophy. 2009. Feb. Dostupno na:<http://emedicine.medscape.com/article/1180214-overview>(14.ožujka 2011.)
21. Lopate G. Congenitale Myopathies. 2009. May. Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/1175852-overview> (15.ožujka 2011.)
22. Selcen D, Engel AG, Myofibrillar Myopathy. Includes: Alpha-B Crystallinopathy, BAG3-Related Myofibrillar Myopathy, Desminopathy, Filaminopathy, Myotilinopathy, Zaspopathy. 2010, July. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1499>.(15.ožujka 2011.)
23. Hampton R. Chronic Progressive External Ophthalmoplegia. 2008.Dec. Dostupno na:<http://emedicine.medscape.com/article/1215103> (16.ožujka 2011.)
24. Wayne E Anderson, DO Endocrine Myopathies 2010. Feb. Dostupno na:<http://emedicine.medscape.com/article/1170469-overview>(16.ožujka 2011.)
25. Lin HC, Barkaus PE, Collins MP, Collins MIP, InclusionBodyMyositis 2010, June Dostupno na <http://emedicine.medscape.com/article/1172746-overview> (16.ožujka 2011.)
26. Furokawa T, Toyokura Y. Chronic spinal muscular atrophy of facioscapulohumeral type. *J. Med Genet*. 1976 August;13(4):285-289.
27. Tsao B, Armon C. Spinal Muscular Atrophy. 2011.Mar. Dostupno na:<http://emedicine.medscape.com/article/1181436-overview>(17.ožujka 2011.)
28. van Alfen N, van Engelen BG, Huges RA. Treatment of idiopathic and hereditary neuralgic amyotrophy (brachial neuritis). *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jul 8;(3):CD006976.
29. Ropper HA, Brown HR, Adams and Victor's principles of Neurology. 8th edition. New York: The McGraw-Hill Companies; 2005.

VARIJABILNOST KLINIČKE SLIKE FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE

Davorka VRANJEŠ

KBC Zagreb Klinika za neurologiju, Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu

Facioskapulohumoralna mišićna distrofija je relativno česta primarna bolest mišića. Nasljeđuje se autonomno dominantno, a uzrokovana je patološkom promjenom gena na krajnjem dijelu dugog kraka kromosoma 4.

Tipična klinička slika karakterizirana je slabošću mišića lica, sporo progresivnim descendentnim razvojem asimetrične slabosti mišića ramenog obruča, posebno onih koji podižu lopatice, te mišića nadlaktica, a potom zdjeličnih i peronealnih mišića. Ono što je specifično za ovaj oblik mišićne distrofije je izrazita varijabilnost kliničke slike, odnosno težine pojedinih simptoma i znakova bolesti. Prema nekim radovima do 30% aficiranih osoba ostanu asimptomatske. Većina bolesnika vrlo postupno razvija umjerenu do znatnu mišićnu slabost, ali ostaje pokretna do visoke životne dobi. Oko 20% bolesnika relativno brzo razvijaju teški motorički deficit te postaju nepokretni desetak godina nakon pojave prvih znakova bolesti.

Oko 5% bolesnika nemaju karakterističnu deleciju na kromosomu 4q35, te se govori o FSHD tip II. Interesantno je da kod tih bolesnika klinička slika ne pokazuje značajniju razliku niti veću varijabilnost u usporedbi sa FSHD tip I.

Prvi znakovi bolesti najčešće se javljaju između 20-40 godine života. Pojava bolesti u ranom djetinjstvu po dojenačkoj dobi je rijetka, a klinički se manifestira sa slabošću facijalnih mišića, te kasnijom bržom progresijom i težim motoričkim deficitom. Slabost facijalnih mišića jedan je od ranih znakova bolesti i u adultnom obliku i najčešće je asimetrična. Ponekad može biti vrlo blagog intenziteta te se prepoznaje samo kod nekih radnji kao što je nemogućnosti fućkanja, puhanja balona, pijenja na slamku, ili nepotpuno zatvaranje očiju kod spavanja. Ekstraokularni mišići kao i bulbarni mišići su sačuvani. Fleksori vrata su relativno

sačuvani u odnosu na ekstenzore. Često dominira slabost mišića ramenog obruča sa odignutim skapulama, horizontalno položenim klavikulama, te atrofijom pektoralnih mišića. Na nadlakticama je zahvaćen m. biceps i triceps brachii dok je m. deltoideus obično sačuvan. Osim ekstenzora šake mišići podlaktica i šaka pošteđeni. Slabost abdominalnih mišića očituje se izbačenim trbuhom i lumbalnom hiperlordozom. Kod naglašenije slabosti mišića donjeg dijela trbušne stjenke pri fleksiji vrata dolazi do pojave podizanja umbilikusa (Bevorov znak). Na nogama prvo se razvija slabost peronalnih mišića (dorzoфлектора stopala) dok su mišići lista sačuvani. Ne tako rijetko asimetrična slabost peronalnih mišića može biti i jedan od prvih znakova bolesti što predstavlja diferencijalno dijagnostički problem u odnosu na heterogenu grupu skapulo-peronealnih sindroma. Prema nekim autorima oblik s dominantnim zahvaćanjem mišića ramenog obruča te peronalnih mišića uz izostanak evidentne faciopareze je poseban klinički entitet/Scapuloperonealna mišićna distrofija/ iako su obje bolesti povezane sa delecijom 4q35. Mišići zdjeličnog pojasa i natkoljenica u ranoj fazi bolesti obično su sačuvani, premda rana pojava slabosti proksimalnih mišića nogu nije tako rijetka.

Oštećenje sluha te pojava teleanigektazija na retini su česti kod bolesnika s FSHD. Miokard je rijetko zahvaćen, ali kod oko 60% bolesnika nađene su smetnje provođenja.

CK je blago do umjereno povišen, a može biti uredan. EMNG obrada pokazuje znakove miopatije samo u atrofičnim mišićima udova te mišićima lica. U ostalim poglavito u distalnim mišićima često se nalazi širi i viši potencijali koji upućuju na neurogeno oštećenje.

U kliničkoj praksi često se susrećemo s bolesnicima kod kojih se razvoj bolesti i klinički nalaz razlikuje u usporedbi sa klasičnim obrascem motoričke slabosti, kako u vremenu pojave te intezitetu prisutnih simptoma, što često može dovesti do dijagnostičkih pogrešaka ili neprepoznavanja bolesti u ranijoj fazi

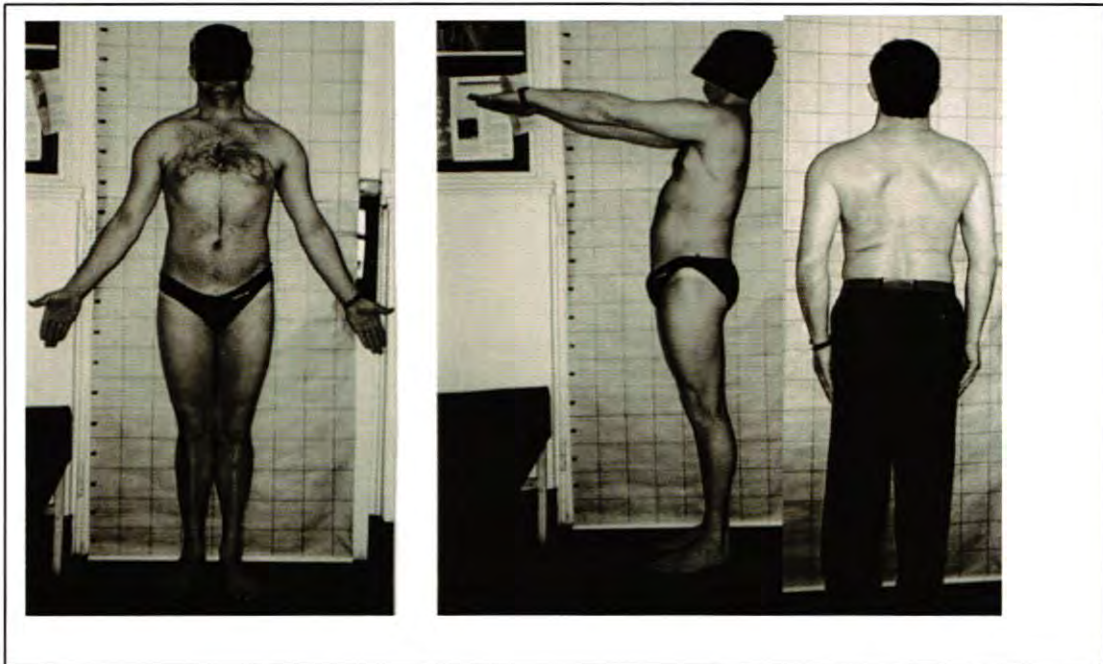
Prikazi bolesnika:

Bolesnik 1: L.S. m. 1957. god.

Obiteljska anamneza: Majka 66 god. slične tegobe i klinički nalaz., navodno i njen otac. Kćer (14 god) klinički suspektna (slabost peronealnih mišića). Sin 11 god. klinički izgleda zdrav.

Anamneza: Motorni razvoj uredan, u adolescenciji i ranoj odrasloj dobi bavio se aktivno sportskim aktivnostima. Nakon 35 god. zapaža pojačano zamaranje osjećaj slabosti ruku i nogu, imao češće distorzije skočnih zglobova, osjećao krampe u listovima, bol duž vratne i LS kralješnice, te osjećaj parestezija kod eleviranih ruku.

Prva neurološka obrada u dobi od 40 god. Uputna dg. Sy. cervicobrachiale et LS.



Neurološki status: prominentna lumbalna lordoza, atrofija peronealnih mišića i pseudohipotrofija mišića lista uz očuvan m. extensor dig.brevis, spuštena ramena, izbočene lopatice slabost mišića lica. EMNG: tipična miopatija samo u atrofičnim mišićima Miješani uzorak sa znacima miopatije i neuropatije u ostalim mišićima. Ostalo: CK povišen do 448 u/L, ostali biokemijski parametri uredni. Perciptivna gluhoća (25%) EKG: uredan. UZ srca: proširenje lijevog ventrikla i septalna hipertrofija.

DNA analiza učinjena u Parizu uz pomoć sonde p13E11 koja prepoznaje lokus D4Z4 na distalnom dijelu kromosoma 4 je pokazala smanjenje fragmenta karakteristično za FSH.



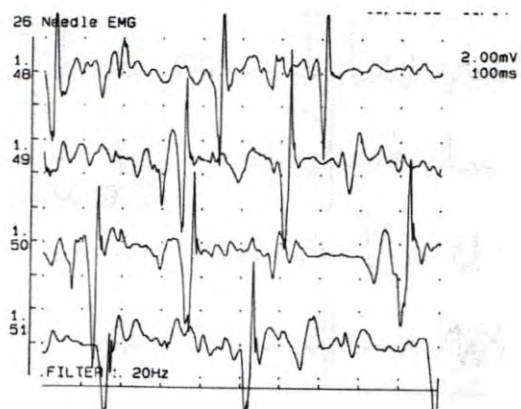
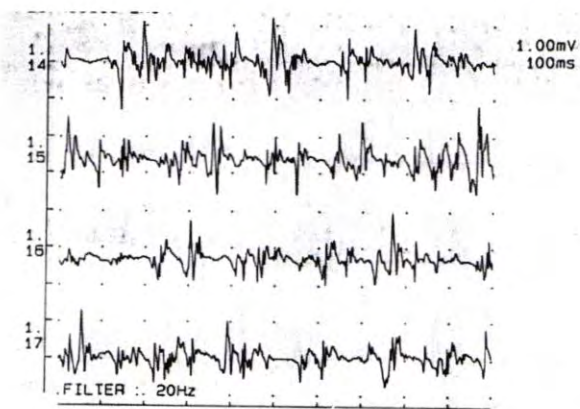
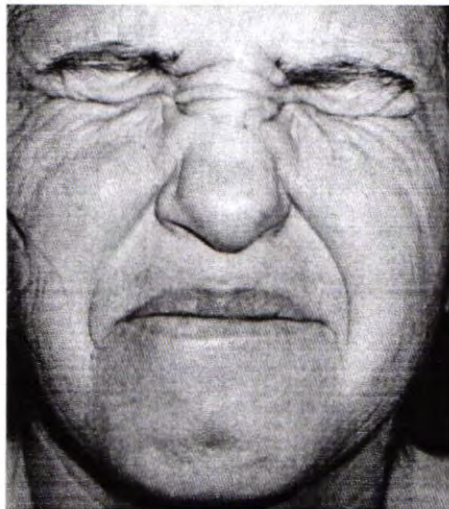
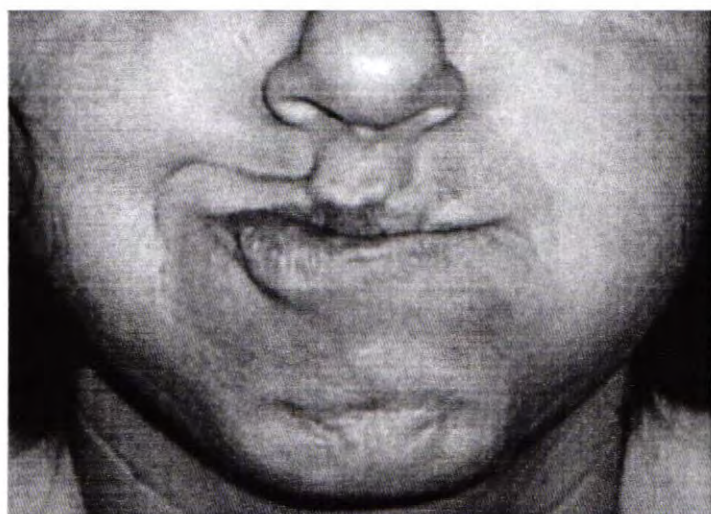
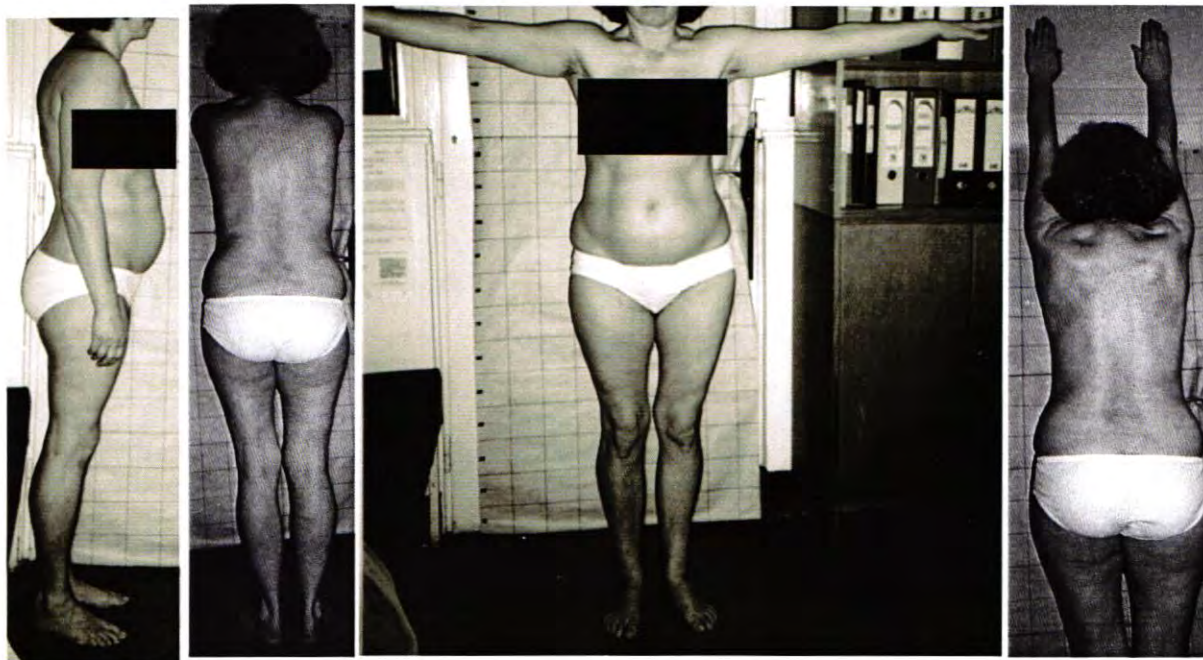
Bolesnica 2: K. P. 1952 god. Prva obrada u dobi 46 god.

Obiteljska anamneza: Ne zna za slične tegobe kod članova obitelji.

Anamneza: Do tridesetih godina bez teškoća. Kasnije zapaža da ne može potrčati zbog slabosti lijevog stopala, česti grčevi u listovima. **Neurološki nalaz:** Hod na peti lijevo neizvediv, na prstima bez ograničenja. Atrofija peronealnih mišića lijevo uz očuvan m.ext. digg. brevis. Atrofija medijalne glave lista

obostrano, distalne trećine lijeve natkoljenice. Ramena savijena prema naprijed uz stršeće lopatice pri abdukciji izrazitije desno. Slabost fleksije glave, pućenje asimetrično, stisak apaka očuvan. Vlastiti refleksi prisutni. EMG: jasna miopatija u atrofičnim mišićima, znakovi miopatije i neuropatije u „očuvanim“ mišićima. CK oko 500U/l.

DNA nalaz: Patološki smanjen fragmet (38,5kb) blizu telomernog kraja kromosoma 4, što potvrđuje dijagnozu FSH.



Bolesnik 3. L. Z., rođ. 1955. god.

Obiteljska anamneza: b.o.

Anamneza: U trećoj godini roditelji zamjećuju da ne može potpuno zatvoriti oči. U 5 god. liječen bolnički radi šarlaha nađena asimetrična slabost mimične muskulature te postavljena sumnja na mišićnu distrofiju. U 13 god. slabost mišića nogu prilikom trčanja, nemogućnost podizanja iz čučnja, kasnije nemogućnost penjanja uz stepenice. Dg. Mišićna distrofija. Od 34 god. nepokretan koristi se kolicima.

Neurološki status: 47 god. Nepokretan. Facies myopatica obostrana slabost mišića lica sa Belovim fenomenom. Atrofija mišića ramenog obruča, skapule alate, zdjeličnog pojasa, peronealnih mišića, hipotrofija malih mišića šaka, podlaktica. Fleksijske kotrature koljena i lakatnih zglobova.

EKG: Sinus ritam, hipertrofija lijeve klijetke, hipertrofija lijevog atrija.

Oftalmolog. Rethinopathia (na retini vidljivi eksudati, hemoragije mikroaneurizme) jače lijevo.

Perceptivna naglušnost.

DNA obrada u Parizu 1998. god. potvrđuje dg. FSHD.

Bolesnica br 4. S. M. rođ. 1971 god.

Obiteljska anamneza: b.o.

Anamneza: Psihomotorni razvoj uredan. Oko 30 god. života (nakon II poroda) zapaža zapinjanje stopala kod hoda. Prvi neurološki pregled u 37 god. Dg. Protrusio disci. L5 S1. Radiculopathia . Posljednje dvije godine čini joj se da je progresija mišićne slabosti nešto brža.

Neurološki nalaz: Nešto slabije pućenje ustiju, hipotrofična oba m. sternocleidomastoideusa, jače lijevo. Lijeva skapula strši, diskretno i desno ali još uvijek uz primjerenu mišićnu snagu i opseg pokreta u ramenima. Hipotrofija peronealnih mišića

potkoljenica uz održan m. extensor brevis, te medijalne glave m. gastrocnemiusa, dorzalnu fleksiju stopala ne izvodi, peronealni (pijetlov) hod, refleks simetrično oslabljeni ali prisutni osim RAT obostrano. CK oko 300.

EMNG: Miopatija u peronealnim mišićima m. gastrocnemius i m. sternocleidomastoideus, Neurogena lezija uz pojedine polifazičke potencijale u mišićima ramenog obrčca i nadlektica. EKG uredan.

DNA analiza: Nije učinjena.

Dg. FSHD suspt. Dif. dg. Scapuloperonelana MD

Literatura:

1. Tawil R, Facioscapulohumoral Muscular Dystrophy in. Katiorij B., Kaminski HJ. Preston DC Ruff Dc Shapiro BE Neuromuscular Disorder in Clinical Practice Butterworth Heiman, Boston 2002. p1072:1077
2. Kuzmić-Šamija R,Lozić, B, Resić. B Tomasović M. Vlastelica Ž, Metiličić V, Sedlakova J.: Early onset Facioscapulo humoral muscular dystrophy , Pediatra Croatica Vol. 53, N. 3 November 2009.
- 3.DeGreef J.C,Lemmers R.J.L. F.,Day W.J. etn al. Clinical features of facioscapulohumoral muscular dystrophy 2, Neurology 2010;75:1548-1554.
http://en.wikipedia.org/wiki/facioscapulohumoral_muscular_dystrophy

KAKO PREPOZNATI FSHD?

Nina CANKI-KLAIN

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga

Sažetak. Facioskapulohumeralna mišićna distrofija (FSHD) ili Landouzy-Dejerineov atrofični oblik mišićne distrofije, (MIM 158 900) po učestalosti je treća, a po nekim najnovijim podacima jedna od najčešćih genetskih mišićnih bolesti, s poprečnom incidencijom od najmanje 1:20 000 živorođenčadi.

Nasljeđuje se na autosoman dominantan način, premda 10-30% svih bolesnika predstavlja prvi slučaj u obitelji tj. de novo nastalu mutaciju koju u 40% uzrokuje mozaik jednog od roditelja ili samog bolesnika.

Klinička slika bolesti je vrlo raznolika obzirom na dob, težinu i napredovanje simptoma, a znatne razlike postoje između različitih kao i unutar iste obitelji. Varijabilnost simptoma obuhvaća široki spektar idući od asimptomatskih nositelja/nositeljica gena do teških oblika koji dovode do gubitka autonomnog kretanja (20% bolesnika). Isto je tako raznolika dob početka bolesti, premda se simptomi u većine bolesnika javljaju u drugoj dekadi života. Kako se radi o visokoj penetraciji gena, više od 95% bolesnika pokazuje simptome do 20 godine. Kliničke znakove karakterizira bilateralna, asimetrična, selektivna i progresivna hipotrofija i slabost mišića koja najprije lokalizirano zahvaća lice te se polagano širi na rameno područje, trup, donje dijelove trbuha, ekstenzore stopala te proksimalne dijelove gornjih ekstremiteta i mišiće zdjeličnog pojasa.

Bolest mogu pratiti oštećenja nemišićnih struktura. Tako se često opažaju senzorički gubitak sluha i promjene kapilara retine. Te promjene rijetko pokazuju simptome, ali je korisno da bolesnik bude pod kontrolom okulista koji će u slučaju potrebe, anomalije moći potvrditi uz pomoć fluorescentne angiografije (FAG). Sistematsko traženje promjena na oku se preporuča u bolesnog malog djeteta koje nije u stanju zamijetiti promjene vida te u teškim oblicima bolesti koji se obično javljaju već u dječjoj dobi.

Genetska osnova FSHD se sastoji u smanjenju polimorfnog D4Z4 ponavljajućeg niza na krajnjem dijelu dugog kraka kromosoma 4 (4q35) koji prepoznaje sonda p13E-11 i koji je povezan sa specijalnim haplotipom A4161. Premda se radi o intenzivnim istraživanjima koja traju više od dvadeset godina, uzročni gen još nije poznat. Dosadašnji podaci ukazuju na složen i možda jedinstven molekularno genetski mehanizam u kojem bi važnu ulogu igrali epigenetski mehanizmi.

Većina bolesnika (>95%) su heterozigoti za djelomičnu deleciju ponavljajućih elemenata makrosatelitnog područja ponavljanja D4Z4. U klasičnim slučajevima, dijagnoza se osniva prvenstveno na karakterističnoj kliničkoj slici i obiteljskoj povijesti bolesti i potvrđuje standardnom visoko senzibilnom (95%) i specifičnom (95%) molekularnom analizom uz pomoć sonde p13E-11 koja pokazuje smanjenje fragmenta DNK ispod 38 kb (t.j.< 10 ponavljajućih jedinica) dok normalne vrijednosti iznose od 41-350 kb (t.j. od 11-100 ponavljajućih jedinica). Varijabilnost kliničke slike i složenost genetskog uzroka mogu pokatkada otežati dijagnozu bolesti. U takvim slučajevima su potrebna dopunska ispitivanja (CK, EMG, MR ili CT mišića) uz upotrebu specifičnih molekularnih tehnika. Genetsko savjetovanje naoko zdravim roditeljima nakon rođenja FSHD djeteta u obitelji u kojoj je to prva pojava bolesti, nužno nalaže detaljan klinički pregled oba roditelja uz molekularnu analizu upotrebom specijalne metode(PFGE) kako bi se otkrio ili isključio mogući mozaik. Za sada ne postoji djelotvorno liječenje FSHD premda su bila izvedena neka klinička ispitivanja koja nisu pokazala zadovoljavajuće rezultate.

Kako bismo prepoznali FSHD, potrebno je misliti na:

- **Genetsku mišićnu bolest**
- **Učestalost pretpostavljene bolesti u populaciji**
- **Dob i spol bolesnika**
- **Poznavati kliničku sliku i pažljivo gledati bolesnika:**
 - o Atrofična
 - o Asimetrična
 - o Selektivna
 - o Descendentna zahvaćenost mišića
- **Slušati bolesnika (bolovi u mišićima)**
- **Genetske osobitosti:**
 - o Autosomna dominantna bolest

- De novo nastala bolest u 10-30% bolesnika od kojih 12-40% ima mozaik
- Penetracija gena je visoka (do druge dekade života prisutni simptomi u > 95% bolesnika)
- **Obiteljsku podaci**
 - Velika varijabilnost unutar iste i različitih obitelji (od asimptomatskih ili pauci simptomatskih osoba do vezanosti uz invalidska kolica)
 - Postojanje perceptivne naglušnosti u nekih članova s ili bez mišićne slabosti
 - Pitati članove obitelji o spavanju s poluotvorenim očima

MORFOLOGIJA PATOLOŠKIH PROMJENA U FSHD

Sanja ŠTIFTER

Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Biopsija skeletnog mišića je značajna za postavljanje dijagnoze miopatskih poremećaja. Predstavlja korisnu dijagnostičku tehniku pri dijagnosticiranju svakog pojedinačnog tipa miopatskih poremećaja. Analizom strukturalnih i ultrastrukturalnih obilježja različitih mišićnih poremećaja morfološki se isti diferenciraju i doprinosi se usmjerenom i ciljanom dijagnosticiranju. Poznato je da miopatije pokazuju fenotipsku varijabilnost koju objašnjavamo genetskom patogenezom. No, za patologe je značajna i histološka heterogenost koja je osobito izražena u FSHD.

Neki poremećaji se mogu dijagnosticirati na rutinskim rezovima obojanim hematoksilinom i eozinom (HE). *Svjetlosnim se mikroskopom* jasno mogu uočiti opće karakteristike tkiva procijeniti odnos mišićnih vlakana, jezgara, vezivnog i masnog tkiva, prisutnost upalnih stanica, vaskularnih i neuralnih komponenti. Zasebna i sama metoda rutinske svjetlosne mikroskopije (HE) često nije dostatna za postavljanje dijagnoze poremećaja skeletne muskulature.

Histokemijske metode su neophodne u nekim prilikama, a uključuju modificirana trikromna bojanja poput Gomory-a, ili Masson-a; periodične kiselina Schiff-a (PAS), Oil red O (ORO). Enzimatske histokemijske metode poput Congo Red, reduciranog nikotinamid adenin dinukeotida (NADH-TR), sukcinat dehidrogenaza (SDH), citokrom oksidaza, kisela fosfataza, adenzin trifosfataza (ATPaza) preinkubirane na pH 9.4, 4.6 i 4.3. Isto tako u određenim slučajevima je neophodna imunohistokemijska analiza (npr. distrofina, sarkoglikana i merozina) i naposljetku elektronsko mikroskopska (EM) analiza.

Prijem i priprema uzorka

Za histološku analizu u pravilu se uzima mišić standardnih lokalizacija ili iz mišićne skupine najzahvaćenije promjenom. Svježi uzorak (na ovlaženoj gazi) doprema se za patohistološku dijagnostiku. Ovisno o dimenziji uzorak se procjenjuje optimalnim (1cm) /suboptimalnim (>0,5cm) i jedan dio se odvaja za smrzavanje u poprečnom/uzdužnom rezu. Dio se stavlja u postupak fiksacije u puferiranom formalinu, a dio se fiksira za EM(2mm) u gluteraldehidu.

HE,ORO,PAS

Na HE se promatra postoji li odstupanje u veličini vlakana, vakuole, pravilna distribucija obojenja i artefakti koji mogu biti od dijagnostičkog značaja.

Histologija FSHD

Histološke promjene u slučaju FSHD su nespecifične. Nespecifične kronične miopatske promjene na poprečnom presjeku angulirana vlakna, atrofična i sporadično hipertrofična vlakna; mononuklearni upalni infiltrat oskudan do srednje obilan (slika 1), prisutnost anguliranih i atrofičnih vlakana je potvrđena u brojnim biopsijama. Sarkomere su ponekad normalne, dok se povremeno može uočiti distorzija miofibrila, vezikularne svijetle jezgre. No, karakteristično da je većina mišićnih vlakana neupadljiva.

Slučajevi kada je prisutan izraženi gubitak mišićnih vlakana nerijetko su praćeni izraženijim upalnim infiltratom, nekrozom i fagocitozom.

Za *elektronsku mikroskopiju*, mali fragment uzorka mišića s poprečnim i uzdužnim presijekom se svježi odmah po eksciziji fiksiraju u 3% cacodylatom puferiranom gluteraldehidu, post-fiksiraju u osmij tetraoksidu, dehidriraju kroz smole na 65°C tijekom 24 sata. Polutanki rezovi 1 µm debljine se kontrastiraju toluidinskim plavilom i pregledaju svjetlosnim mikroskopom. Ultratanki rezovi 70 nm debljine se dižu na (bakrene) mrežice, bojaju uranil acetatom i olovo citratom i analiziraju pod elektronskim mikroskopom.

U većini biopsija mišićna vlakna izgledaju normalno, no nalaze se ultrastrukturni znakovi nekroze koja je prethodila i prekid, nepravilnosti regeneracije vlakana

“Cufanje” bazalne membrane u intersticij u kojem su sporadično makrofagi. Poneka mišićna vlakna su smežurana te je ultrastrukturno teško razlikovati radi li se o posljedici denervacije ili ozljede.

EM morfologija u FSHD

Osnovna obilježja su raznolikost i varijabilnost promjena. Mogu se uočiti pseudomijelinske figure, nemalini štapići, razdvajanje i sužavanje miofibrila (slika 2), polarna, perinuklearna agregacija mitohondrija segmentiranje jezgara, praćeno polarnom perinuklearnom agregacijom mitohondrija, glikogena i lipidnih vakuola.

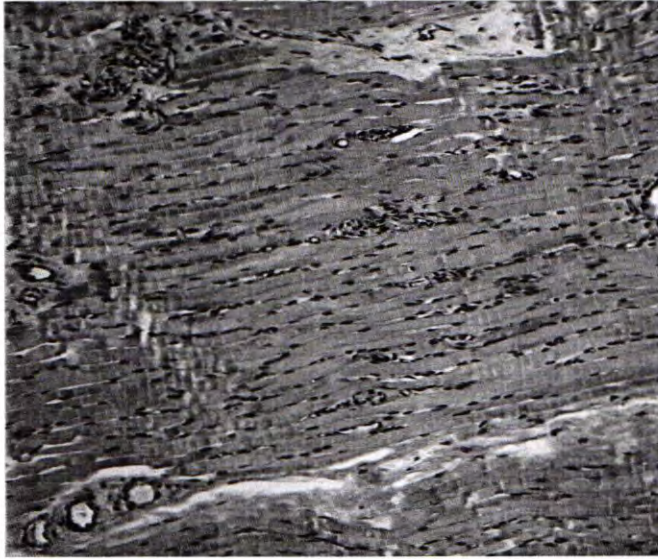
ZAKLJUČAK

Dopustit ćete mi na kraju da postavim pitanje: Pa čemu onda izlagati bolesnika biopsiji kada sa vrlo visokom razinom nepouzdanosti kliničar dobiva nalaz koji je nerijetko nekonkluzivan? Naime, još uvijek nije poznat specifičan ili karakterističan patološko morfološki supstrat na celularnoj i subcelularnoj razini mišićne stanice koji bi ukazivao na FSHD. Sukladno mišljenju većine neurologa, smatramo da je indikacija za biopsiju indicirana u slučaju kada molekularna dijagnostika nije potvrdila dijagnozu ili ako ista nije izvediva, a radi se o usamljenom bolesniku u obitelji s ne karakterističnom kliničkom slikom .

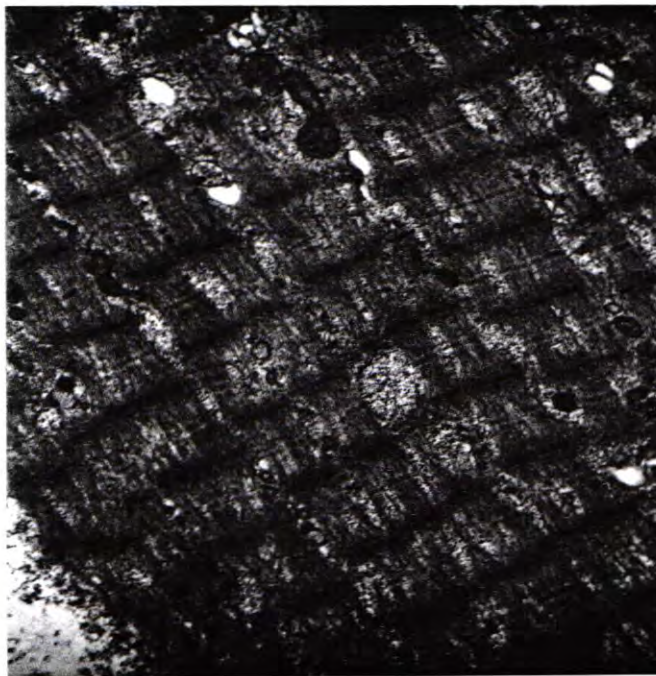
Literatura:

1. Carpenter S, Karpati G. Pathology of skeletal muscle 2nd Ed. Oxford press 2001 str.437-442.
2. Marietta Barro, Gilles Carnac, Sébastien Flavie, Jacques Mercier, Yegor Vassetzky, Dalila Laoudj-Chenivresse. Myoblasts from affected and non-affected FSHD muscles . J Cell Mol Med Article in Press.
3. Owji M, Modarressi F, Geramizadeh B, Borhani Haghghi A, Alizadeh AR, Heidari T. Diagnosis of Myopathies Using Histology, Histochemistry, Immunohistochemistry and Electron Microscopy: A Single Center Experience IRCMJ 2010; 12(4):434-440.
4. Neudecker S, Krasnianski M, Bahn E, Zierz S. Rimmed vacuoles in facioscapulohumeral muscular dystrophy: a unique ultrastructural feature. Acta Neuropathol (2004) 108 : 257–259.

Slika 1. Histokemijsko bojanje PAS. Prikaz mišića prožetog upalnim infiltratom, i periferno subsarkolemalno umnažanje jezgara u uzdužnom presjeku na (x100).



Slika 2. Elektronsko mikroskopski prikaz, razdvajanje i sužavanje miofibrila, x8900.



DIJAGNOSTIČKA I PROGNOŠTIČKA VRIJEDNOST MAGNETSKE REZONANCIJE U ANALIZI LEZIJA U FSHD BOLESNIKA

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.

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija (FSHD) je autosomno-dominantni nasljedni poremećaj i treća najčešća nasljedna mišićna distrofija, odmah iza Duchenne i miotonične mišićne distrofije, sa prevalencijom u svijetu 1: 20000.

Genetska greška se objašnjava gubitkom kritičnog broja repetitivnih elemenata (D4Z4) u 4q35 subtelomernoj zoni.

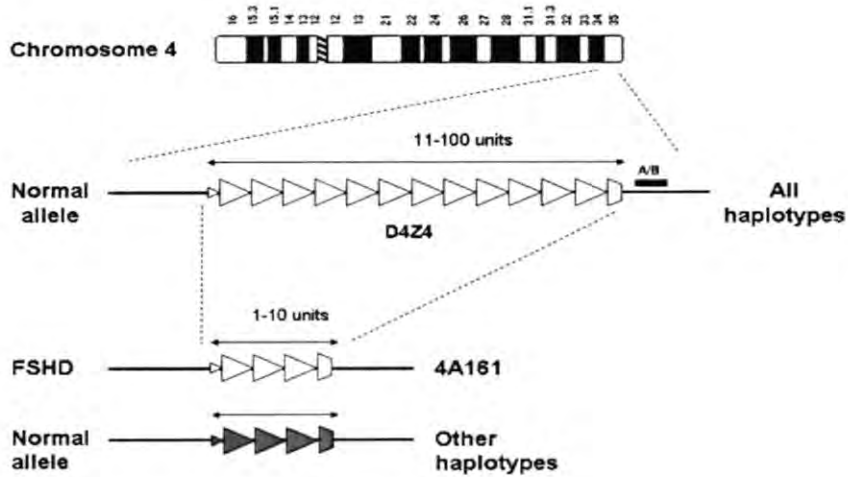
Varijacije u broju kopija (CNVs) česti su uzrok fenotipskih raznolikosti, ali i podložnosti bolestima te su uzrok i facioskapulohumeralne mišićne distrofije .

Nova otkrića pokazuju da sama redukcija broja D4Z4 kopija nije dovoljna za ekspresiju simptoma FSHD.

Bolest se obično javlja prije 20 godine života i karakterizirana je asimetričnim gubitkom snage i atrofijom mišićnog tkiva koje počinje na licu i ramenom obruču te dorziflektorima stopala. Početak simptoma i progresija bolesti su varijabilni što je važno u diferencijalnoj dijagnozi tako da pacijenti bez slabosti mišića lica mogu lako biti svrstani u skupinu pacijenata sa LGMD.

Okolo 20 % pacijenata treba pomoć invalidskih kolica no očekivana duljina života nije skraćena.

Slika 1.



Trenutno **FSHD**, kao i druge mišićne distrofije nemaju poznatu efikasnu metodu liječenja. Kako je napredovanje bolesti sporo i nasumično, a detaljni podaci o prirodi bolesti nepotpuni, određivanje uspješnosti terapijskog/terapeutskog pristupa je teško.

Isto tako, još ne postoje objektivni i kvantitativni neinvazivni biomarkeri za procjenu težine i progresije mišićne degeneracije. Razvoj takvih biomarkera mogao bi 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

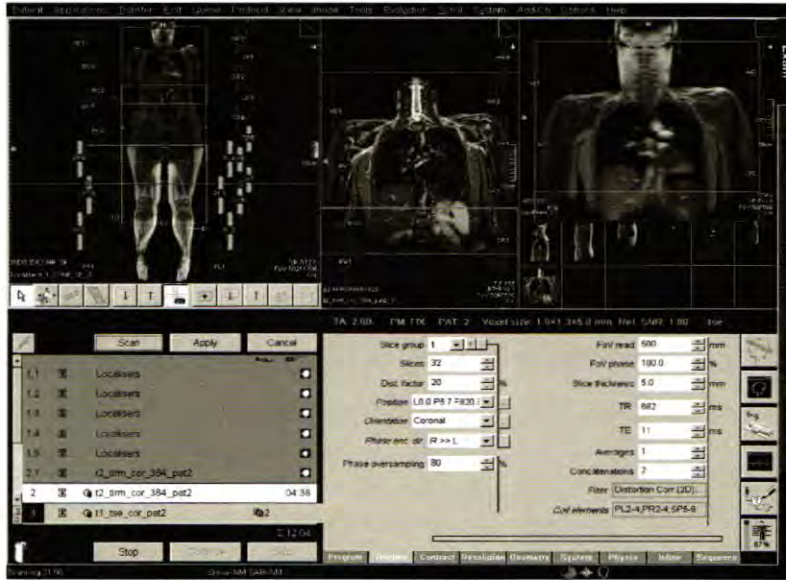
Od početka se u dijagnostici neuromuskularnih bolesti primjenjivalo multisekvencijsko oslikavanje najčešće u transverzalnoj ravnini i uz primjenu T1 mjerenih slika (T1-weighted spin echo) te T2 mjerenih slika (T2-weighted spin echo) ili STIR (short tau inversion recovery) sa debljinama slojeva od 5 mm 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 2. Prikazuje pripremu protokola na radnoj stanici za „whole-body MRI“ pacijenta



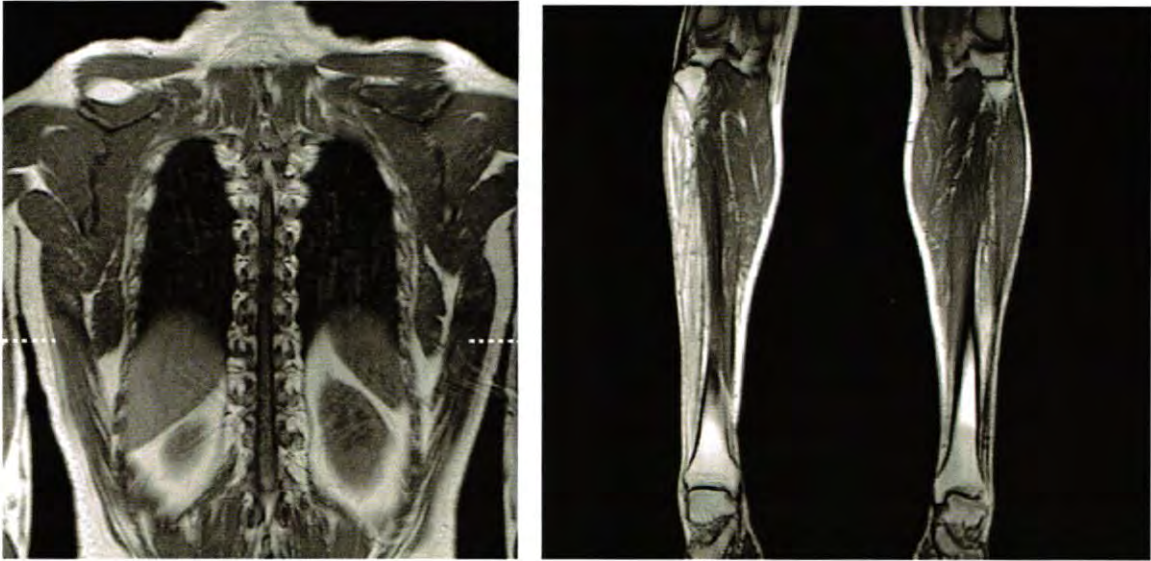
Distrofične promjene kao što su masna infiltracija i degeneracija te atrofija mišića na T1 mjerenim slikama se prikazu porastom intenziteta signala zahvaćenog/ih mišića dok se upalne promjene kao što je mioedem, koji može biti prvi znak mišićne distrofije, prikazu povišenim intenzitetom signala mišića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

Magnetska rezonancija u praćenju bolesnika sa kliničkom slikom FSHD

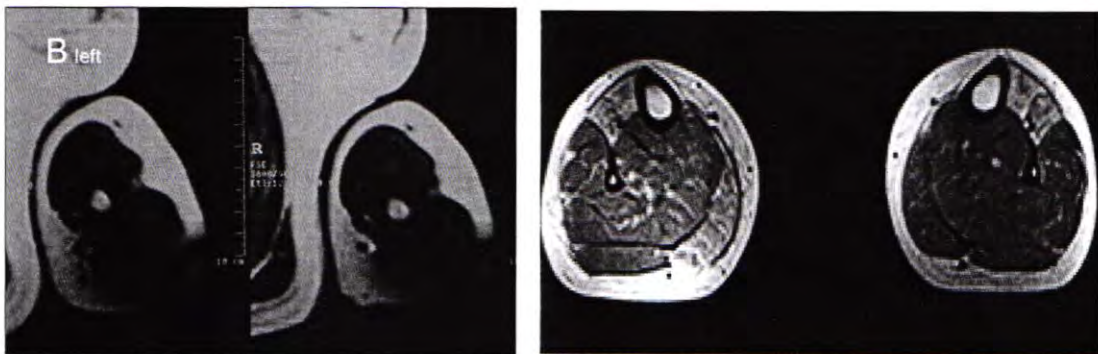
Magnetska rezonancija je visoko senzitivna no nisko specifična dijagnostička metoda te treba imati na umu da opisane distrofične promjene i mioedem pojedinačnog mišića koje prikazemo nisu specifične za FSHD kao niti za druge mišićne distrofije.

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

Kod facioskapulohumeralne mišićne distrofije karakterističnu asimetričnu slabost i atrofiju mišićnog tkiva koja najčešće počinje na licu i ramenom obruču te zahvaća i medijalnu glavu m. gastrocnemiusa, m. tibialis anterior i m. soleus te na natkoljenici m. semimembranosus, m. biceps femoris, m. semitendinosus i grupu aduktornih mišića prate distrofične promjene nađene pri oslikavanju na magnetskoj rezonanci.



Slika 3. pokazuje koronarni prikaz mišića trupa i ramenog obruča. **Slika 4.** pokazuje asimetriju u zahvaćanju prednjeg odjeljka mišića lijeve potkoljenice pacijenta sa dokazanom FSHD



Slika 5. pokazuje mioedem bicepsa lijeve nadlaktice. **Slika 6.** pokazuje masnu degeneraciju m. tibialis anterior obje potkoljenice.

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 FSHD, 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 upotrebom 3-point Dixon tehnikom tek treba vidjeti.

Literatura:

[1]Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases – a world survey. *Neuromuscul Disord.* 1991;1:19–29.

[2]Padberg GW. Facioscapulohumeral disease. Leiden: Leiden University; 1982;.

- [3]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.
- [4]Rose MR, Tawil R. Drug treatment for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;2:CD002276.
- [5]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.
- [6]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.
- [7]Olsen DB, Gideon P, Jeppesen TD, Vissing J. Leg muscle involvement in facioscapulohumeral muscular dystrophy assessed by MRI. *J Neurol.* 2006;253:1437–1441.
- [8]Iosa M, Mazza C, Frusciante R, et al. Mobility assessment of patients with facioscapulohumeral dystrophy. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2007;22:1074–1082.
- [9]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.
- [10]Klomp DW, Renema WK, van der GM, de Galan BE, Kentgens AP, Heerschap A. Sensitivity-enhanced ¹³C MR spectroscopy of the human brain at 3 Tesla. *Magn Reson Med.* 2006;55:271–278.
- [11]Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1:307–310.
- [12]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.

- [13]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.
- [14]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;190:W8–W12.
- [15]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.
- [16]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.
- [17]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.
- [18]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.
- [19]Gold GE, Han E, Stainsby J, Wright G, Brittain J, Beaulieu C. Musculoskeletal MRI at 3.0 T: relaxation times and image contrast. *AJR Am J Roentgenol*. 2004;183:343–351.

OFTALMOLOŠKI ASPEKTI FSHD-DIJAGNOSTIKA, DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA I LIJEČENJE

Neda STIGLMAYER i Nenad VUKOJEVIĆ

Klinika za očne bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb

UVOD

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija je autosomno dominantna bolest i jedna od najčešćih mišićnih distrofija. U području oftalmološkog zanimanja su mogućnosti nastupa promjena koje zahvaćaju mišiće lica, odnosno naročito vjeđa, no mišićne promjene organa vida povezane su s promjenama mrežnice oka, koje mogu dovesti, do značajnog oštećenja vidne funkcije.

Genetski mehanizam koji determinira ovu bolest još u potpunosti nije poznat, ali se smatra da je povezan sa skraćanjem (delecijom) polimorfnog D4Z4 ponavljajućeg niza na kromosomu 4q35. (1) i specifičnog haplotipa 4A161 (2,3). Postoje istraživanja koja promjene na mišićima i na žilama mrežnice oka povezuju s nepravilnom ekspresijom FRG1. Smanjena ekspresija dovodi do smanjene angiogeneze, a pretjerana ekspresija istog FRG1 dovodi do pojačanog grananja krvnih žila mrežnice, dilatacije žila, propuštanja i stvaranja edema. (4) Postoje istraživanja koja detektiraju više gena čija je pretjerana ekspresija otkrivena u ranoj fazi FSHD, od kojih neki reguliraju glatku muskulaturu žila i stanice endotela, dok druga istraživanja navode uz već poznate varijacije kopija D4Z4 i značajan utjecaj epigenetskih čimbenika (5,6).

Među prvim manifestacijama FSHD je zahvaćanje kružnog mišića vjeđa, dok su vanjski očni mišići, koji pokreću očnu jabučicu pošteđeni. Atrofija i slabost kružnog ocnog mišića dovodi do disproporcije nabora i bora na čelu i oko očiju; lice postaje glatko i ulašteno, oči se doimaju velike, otvorene i izbočene, ali ne postoji pravi egzoftalmus.

50-70% oboljelih od FSHD na mrežnici oka ima promjene koje se manifestiraju kao pojačana vijugavost žila, teleangiektazije, mikroaneurizme, eksudacija, eksudativna ablacija mrežnice.

Uznapredovale promjene koje zahvaćaju žutu pjegu mogu dovesti do trajnog oštećenja vidne funkcije.

BOLESNICI I METODE

U ovom prikazu pokazat ćemo bolesnike sa navedenim promjenama, kako vanjskog dijela, tako i sa promjenama na mrežnici vezano za FSHD. Uz standardnu oftalmološku obradu funkcije svih dijelova oka, analizirane su i kolor fotografije pozadine očiju i fluoresceinska angiografija mrežnice, metoda koja nam omogućuje detaljnu razradu krvožilnog dijela mrežnice i sve njezine promjene.

REZULTATI

U djece su rjeđe jasno uočljive promjene vjeđa i mišića lica koji bi upućivali na FSHD, premda obično postoje, ali ih treba tražiti zahtjevom jakog zatvaranja očiju, puhanjem balona itd. Bolesnici su obično mršavi, mogu imati povišeni krvni tlak i druge bolesti koje su prije koincidencija nego povezanost s FSHD. Opisujemo majku i sina sa različito razvijenim karakteristikama bolesti, gdje je kod sina izraženija bolest i u dobi od 18 godina vezan je za kolica. Promjene na licu i vjeđama prisutne su od najranijeg djetinjstva sa nemogućnošću zatvaranja vjeđnog raspora. Liječenje se sastoji, i kod njega i kod majke, u zaštiti prednjeg segmenta oka umjetnim suzama za prevenciju oštećenja i zamućenja rožnice.

Sljedeći bolesnik s dokazanom mišićnom distrofijom je razvio obostrane, za FSHD tipične promjene na mrežnici, s izraženom vijugavosti i arterija i vena, edemom mrežnice, krvarenjima i eksudatima i gubitkom vidne oštine na lijevom oku. **(Slika 1 i 2)** Fluoresceinskom angiografijom se nađu vijugave i arterije i vene, dilatirane vene, teleangiektazije mikroaneurizme, zona mrežnice bez kapilarne perfuzije, hipofluorescentna krvarenja, okludirane manje žilice, šantovi, propuštanje iz krvnih žila i teleangiektazija, edem mrežnice, uključujući i edem makule lijevog oka. **(Slika 3 i 4)**

Na desnom oku promjene su bile manje izražene sa propuštanjima iz krvnih žila, ali je vidna oština bila očuvana jer tada nije razvio značajniji edem makule. Bolesnik je liječen laser fotokoagulacijom, nakon koje se stanje stabiliziralo, edem retine i makule je regresirao te se vidna oština oporavila.

Kod devetogodišnjeg dječaka, koji je prvi put došao na pregled zbog eksudativno odignute mrežnice lijevog oka, na pregledu se nađe vrlo slaba vidna oštrina lijevog oka (osjet i projekcija svjetla) te eksudativno odignuta mrežnica u svim kvadrantima sa obilnom subretinalnom i intraretinalnom eksudacijom. (**Slika 5**) Pregledom periferije fundusa, u gornjem dijelu preekvatorijalno nađe se angiom mrežnice promjera 7-8 mm. (**Slika 6**) Fluoresceinska angiografija je potvrdila dijagnozu angioma, a po mrežnici vidljiva obilna propuštanja iz dilatiranih žila, teleangiektazije, te jako izražen edem mrežnice. (**Slika 7 i 8**) Pacijent je liječen laser fotokoagulacijom. U dva navrata je tretiran angiom, nakon čega je došlo do regresije angioma, ali zbog obilnog edema mrežnice laser nije bio učinkovit na ostale lezije na mrežnici te je eksudativno odignuće mrežnice ostalo.

RASPRAVA

Analiza dokumentacije i molekularno testiranje bolesnika potvrđuju pojavnost, rjeđe prepoznatu, iako prisutnu i na strukturama vjeđa, a češće uočljivu u slučajevima sa tipičnim retinološkim manifestacijama FSHD. Zapravo pažljivom analizom vide se i neke neuobičajene promjene kao što su zone mrežnice bez perfuzije, vaskularna okluzija, šantovi te izrazitu vijugavost i arterija i vena. Neki autori baš stupanj arterijske vijugavosti povezuju sa težinom osnovne bolesti što je vidljivo i kod našeg pacijenta. (7) Očekivan je povoljan odgovor na laser fotokoagulaciju opisanih lezija kao i kod drugih vaskularnih bolesti mrežnice sa sličnom patogenezom (Coatsova bolest ili dijabetična retinopatija).

Naš bolesnik je uz uobičajene, ali jako izražene manifestacije bolesti, imao i angiom mrežnice. Iste promjene spominju i neki drugi autori (8,9). Unatoč laser fotokoagulaciji, zbog opsežnog edema i eksudativno odignute mrežnice nije došlo do oporavka vidne oštrine. Sličan problem su kod djece nailazili i neki drugi autori pa je zajednički zaključak da opisivane promjene treba otkriti i liječiti ranije, dok ne dođu do stupnja kada liječenje više nije efikasno.(10)

LITERATURA

1. Striphati, Facioscapulohumeral dystrophy. eMedicine, Neurology. 2010.
2. Lemmers RJ, de Jievit P, Sandkuijl L, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM, Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. Nat Genet 2002; 32: 235-6.

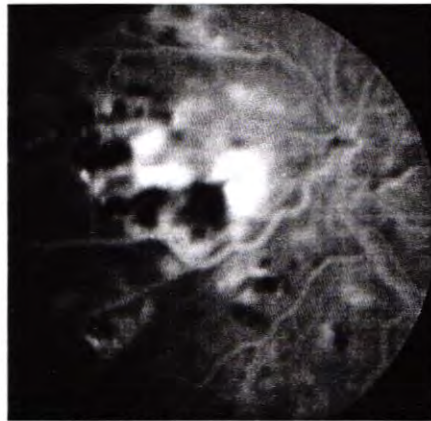
3. Richard J. L. F. Lemmers, Marie`lle Wohlgenuth, Kristiaan J. van der Gaag, Patrick J. van der Vliet, Corrie M. M. van Teijlingen, Peter de Knijff, George W. Padberg, Rune R. Frants, and Silve`re M. van der Maarel. Specific Sequence Variations within the 4q35 Region Are Associated with Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2007;81(5):884-94.
4. Wuebbles RD, Hanel ML, Jones PL. FSHD region gene 1 (FRG1) is crucial for angiogenesis linking FRG1 to facioscapulohumeral muscular dystrophy-associated vasculopathy.. *Dis Model Mech.* 2009.
5. Osborne RJ, Welle S, Venance SL, Thornton CA, Tawil R. Expression profile of FSHD supports a link between retinal vasculopathy and muscular dystrophy. *Neurology.* 2007;68(8):569-77.
6. Cabianca DS, Gabellini D.J The cell biology of disease: FSHD: copy number variations on the theme of muscular dystrophy. *Cell Biol.* 2010;191(6):1049-60
7. Longmuir SQ, Mathews KD, Longmuir RA, Joshi V, Olson RJ, Abràmoff MD. Retinal arterial but not venous tortuosity correlates with facioscapulohumeral muscular dystrophy severity. *AAPOS.* 2010;14(3):240-3.
8. Bass SJ, Sherman J, Giovinazzo V. Bilateral Coats' response in a female patient leads to diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Optometry.* 2011;82(2):72-6.
9. Fujimura H, Yoshikawa H, Ueno S, Yorifuji S, Tarui S. A case of facioscapulohumeral muscular dystrophy with sensorineural hearing loss and retinal angioma. *Rinsho Shinkeigaku.* 1989;29(11):1387-91.
10. Pauleikhoff D, Bornfeld N, Bird AC, Wessing A. Severe visual loss associated with retinal telangiectasis and facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1992;230(4):362-5.



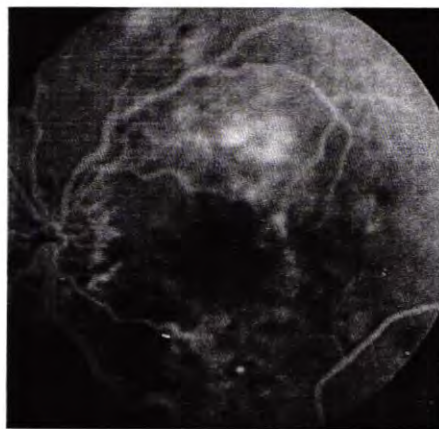
Slika 1. Kolor fotografija fundusa. Vidljiva krvarenja, eksudati, edem i vijugavost žila mrežnice



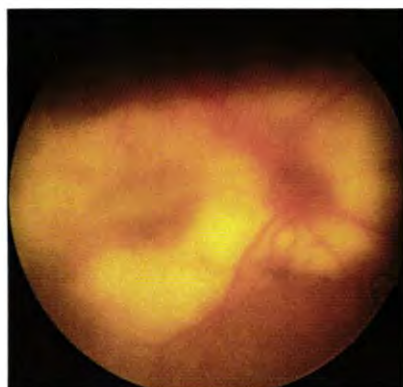
Slika 2. Kolor fotografija žute pjege i okolne mrežnice sa edemom i eksudatima



Slika 3. Fluoresceinska angiografija. Vidljiva propuštanja iz teleangiektazija, i nakupljanje kontrasta u edematoznu mrežnicu



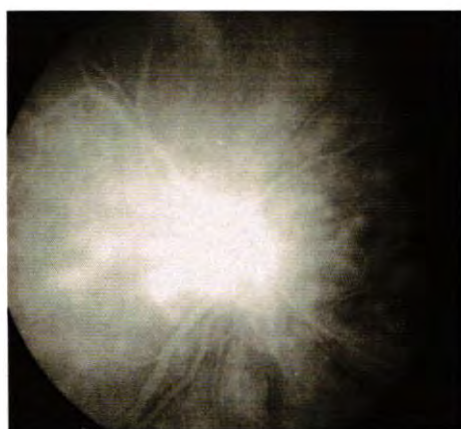
Slika 4. Fluoresceinska angiografija. zamjetan edem makule i okolne mrežnice



Slika 5. Kolor fotografija fundusa. Vidljiva obilna eksudacija sa edemom i odignućem mrežnice



Slika 6. Kolor fotografija perifernog angioma mrežnice



Slika 7. Fluoresceinska angiografija. Vidljivo nakupljanje kontrasta u edematoznu mrežnicu i bojanje optičkog diska



Slika 8. Fluoresceinska angiografija angioma

ULOGA FIZIJATRA U REHABILITACIJI BOLESNIKA S FSHD

Ida KOVAČ

KBC Zagreb, Klinički zavod za rehabilitaciju i ortopedska pomagala, Zagreb

Uvod

Bolesnici s facioskapuloperonalnom distrofijom (FSHD) dio su velike, heterogene skupine bolesnika s neuromuskularnim bolestima, za koje, usprkos vrijednim spoznajama o etiologiji bolesti, još uvijek ne postoji i etiološka terapija. Njihov tretman je još uvijek pretežno simptomatski, a provodi se metodama fizioterapije, radne terapije, primjenom pomagala, a ponekad i kirurški. Primjena tih metoda trebala bi biti dio kompleksnog rehabilitacijskog tretmana, multimodalnog i interdisciplinarnog te provedenog po bio-psiho-socijalnom modelu. Bolesnika uključujemo kao aktivnog partnera u program rehabilitacije, psihološki ga osnažujemo te kroz prilagodbu na kroničnu, progresivnu bolest s naglaskom na preostale mogućnosti, a ne funkcionalne gubitke, i kroz bihevioralne postupke promjene ponašanja, umanjujemo onesposobljenost, a podižemo kvalitetu življenja. Obzirom na relativno mladu životnu dob bolesnika s FSH distrofiju više bi pažnje trebalo posvetiti kvaliteti njihove psihosocijalne integracije.

Klinička slika

Klinička slika bolesnika s facioskapuloperonalnom distrofijom (FSHD) je karakterizirana slabošću mišića lica i mišića ramenog obruča, a posebno stabilizatora lopatica (cca 80% bolesnika) da bi kasnije bili zahvaćeni i mišići zdjelice (cca 50%) te dorzifleksori stopala. Tipični problemi bolesnika su radi slabosti mišića lica vezani na probleme sa žvakanjem, gutanjem i govorom uz otežanu elevaciju i abdukciju ruku u ramenima s funkcionalnom insuficijencijom gornjih udova. Radi slabosti, pareze stopala razvija se otežan hod i problemi sa hodanjem. Nisu izraženi znakovi bulbarne simptomatologije. Klinička slika je vrlo varijabilna u ekspresiji kako intenziteta pojedinih simptoma bolesti tako i u tijeku i progresiji bolesti. Načelno, FSHD je sporo progresivna bolest s povremenim periodima bržeg slabljenja mišića kao i progresije posljedičnih onesposobljenja. Težina bolesti varira od vrlo

blage do vrlo teške. Kod cca 20% bolesnika radi teže mišićne slabosti nogu dolazi do gubitka mogućnosti samostalnog hoda odnosno vezanosti za upotrebu invalidskih kolica. Bolest se dominantno javlja se u pubertetskoj dobi, ali se može javiti i u kasnijim godinama, kada su simptomi uglavnom blaži. Česta je asimetrija u slabosti ramena i donjih udova. Kontraktura zglobova se relativno rjeđe nego kod progresivnih mišićnih distrofija kao Duchenne, a blažeg su stupnja. Kod 35% bolesnika je uočena deformacija kralježnice, primarno u smislu hiperlordoze lumbalne kralježnice. Respiratorna funkcija je u pravilu primjerena, ali je kod cca 10 % ozbiljnije insuficijentna (Tawil & Van Der Maarel 2006, Kilmer i dr. 1995).

Nakon postavljanja dijagnoze, kod bolesnika se provodi klinička evaluacija sa ciljem planiranja rehabilitacije, koja treba obuhvatiti:

- 1) Klinički pregled sa funkcionalnim mjerenjima radi procjene mišićne snage i funkcionalnih ograničenja
- 2) Planiranje fizioterapije i odabir pomagala
- 3) Kontrolni klinički pregledi, sa procjenom mišićne snage i funkcionalnom evaluacijom jednom godišnje.

Terapijski tretman fizioterapijom kod bolesnika s FSHD

Mišićna slabost – tretman kineziterapijom

Slabost mišića lica, koja značajnija u donjim mišićima lica nego u kranijalnim dijelovima lica, je često prvi znak bolesti. Bolesnik ne može napućiti usta, nasmijati se a ima poteškoće kod zatvaranja kapaka. Skapule alate su pak najčešći, rani znak bolesti kao posljedica slabosti m. trapeziusa (donjeg dijela) što dovodi do pomicanja lopatica prema proksimalno kada bolesnik flektira ili abducira ruke. Ramena tendiraju položaju prema naprijed, dok pektoralni mišići atrofiraju. M. deltoideusi ostaju minimalno zahvaćeni sve do uznapredovalog stadija bolesti, m. biceps i m. triceps su selektivno zahvaćeni i brzo atrofiraju dok mišići podlaktica ostaju očuvani. Slabost trbušnih mišića rezultira prominencijom trbuha uz naglašenu lumbalnu lordozu do ekstremne hiperlordoze. Posebno je izražena slabost donjih abdominalnih mišića radi čega dolazi po pomaka pupka prema proksimalno.

Kilmer i suradnici su 1995. verificirali su oštećenja i onesposobljenja na grupi od 53 bolesnika s FSHD tijekom 10 godišnje analize. Primarno tjelesno oštećenje u smislu mišićne lezije i slabosti evaluirali su mjerenjima (man. uelnim mišićnim testom MMT-om) te izometričkim i izokinetičkim mjerenjima. Mjerenjima sa MMT-om je ustanovljena značajnija oslabiljenost proksimalne muskulature tj. ramenog obruča i lica iako se i pareza dorzalnih fleksora stopala rano pojavljuje. Uočena je asimetrija u mišićnoj snazi odnosno stupnju pareza na gornjim i na donjim udovima. Prosječna slabost muskulature je bila umjerenog stupnja sa prosječnom ocjenom 3,7/5 po MMT-u. Progresija slabosti je bila -0,22 MMT po dekadi životne dobi. Kod bolesnika kojima se bolest ranije javila, progresija je bila značajnija. Mjerenja izometričke i izokinetičke snage, pokazale su smanjenu snagu prosječno za 36-68% u usporedbi s kontrolnom populacijom. Mišićna slabost ima za posljedicu funkcionalna ograničenja odnosno onesposobljenost.

Mišićna slabost, kao vodeći simptom neuromuskularnih bolesti uključujući i FSH distrofiju tretira se fizioterapijom, odnosno kineziterapijom. Program kineziterapije se planira na temelju dijagnoze, kliničko-funkcionalne evaluacije statusa bolesnika te provedenih mjerenja mišićne snage. Iako je uloga kineziterapije neosporno pozitivna, postoje još uvijek dileme o intenzitetu i dužini trajanja vježbi kod pojedinih vrsta neuromuskularnih bolesti. Sa stručnog aspekta, nažalost, o ulozi vježbi kod bolesnika s neuromuskularnih bolesti još nema jedinstvenog stajališta, prvenstveno s aspekta intenziteta kao i vrste vježbi. Problem je nedostatak ili nezadovoljavajuća kvaliteta kontroliranih, randomiziranih studija na tu temu pa u kliničkom radu značajnu i praktičnu ulogu imaju kliničke smjernice i iskustva eksperata i radnih skupina.

Kineziterapija obuhvaća vježbe snage i izdržljivosti za skeletnu muskulaturu, posebno ramenog i zdjeličnog pojasa, dorzifleksora stopala, vježbe za održavanje pokretljivosti zglobova s vježbama istezanja, kao i respiratorni trening. Vježbe mogu biti aktivne, sa ili bez otpora, a kod težih pareza, aktivno potpomognute i pasivne. U kliničkoj praksi preporuka je da bolesnika educiramo i potaknemo da usvoji kontinuirano, svakodnevno provođenje vježbi kao redovnu naviku i dio življenja. Značajnu ulogu, dokazano, imaju i aerobne vježbe (šetnja, vožnja bicikla, vježbe u vodi).

Kod bolesnika s miopatijom, postoji oprez i strah od mogućih oštećenja mišića neadekvatno doziranom kinezioterapijom, što je dokazano kod brzo progresivnih distrofija gdje je uočen veći porast kreatinin kinaze distrofičnih mišića nego kod zdravih mišića (**Reimann J 2000**).

Fowler 1998. izvještava o pozitivnom učinku vježbi s otporom koji su doveli do porasta mišićne snage kod bolesnika sa neuromuskularnim bolestima, ukoliko slabost mišića nije bila prevelika, uz spori porast intenziteta vježbi. Vježbanje je bilo svakodnevno, ograničenog trajanja vježbi uz poštivanje tjelesne izdržljivosti i sposobnosti bolesnika.

Po studiji **DeLateura 1979.** provedenoj as bolesnicima sa mišićnom distrofijom preporučuje se izvođenje većeg broja aktivnih, aerobnih vježbi sa submaksimalnim otporom. Ciljanim aktivnostima ko što su hodanje, plivanje u vodi ili vožnja bicikla, povećava se izdržljivost kod bolesnika ali i opći osjećaj kondicije.

Za kineziterapijski tretman bolesnika s FSH distrofijom, značajnu ulogu ima studija **Olsen DB i suradnika 2005.** Autori su pokazali pozitivne rezultate kontrolirane kineziterapije kod bolesnika s FSHD. Pet bolesnika s FSHD (četiri muškarca i četiri žene) je provelo vježbanje na sobnim biciklima, po 35 minuta, 5 puta tjedno, tijekom 12 tjedana. Uspoređivali su se efekti programa vježbanja bolesnika s FSHD sa 7 osoba (4 muškarca i 3 žene) koji ne boluju od FSHD-e. Trening je, u konačnici, povećao fizičku kondiciju u obje grupe. Značajno je da nije uočeno oštećenja mišića (procjenjeno biopsijama) i laboratorijskim testovima niti u jednoj grupi bolesnika. U obje grupe je uočeno neznatno povećao broj kapilara u mišićima, što je normalna reakcija na vježbanje. Šest ljudi sa FSHD-om je imalo povećanje snage, sedam povećanje izdržljivosti, a pet porast nivoa aktivnosti nakon treninga. Nitko nije imao promjenu u mogućnosti hodanja, a samo je jedna osoba imala smanjen osjećaj zamora. Zaključak autora je da su aerobne vježbe, nižeg intenziteta poboljšale oksigenaciju i radni kapacitet kod bolesnika s FSHD, a da pritom nisu izazvale mišićna oštećenja. Takvo kontrolirano vježbanje kod bolesnika sa FSHD se pokazalo kao sigurno i korisno.

Van der Kooi EL i suradnici su 2005. analizirali učinak kineziterapije u kombinaciji s primjenom beta2-adrenergičnih agonista na mišićnu snagu kod bolesnika s FSHD, pri čemu je dokazan pozitivan učinak na mišićnu snagu i masu. Učinci dugotrajne primjene terapije su još uvijek nepoznati, stoga još nema kliničke rutinske primjene.

Općenito, 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. Individualna varijabilnost u mišićnoj slabosti i u ostalim manifestacijama FSH distrofije na lokomotornom sustavu (deformacija kralježnice, kontraktura) kao i funkcionalnim onesposobljenjima čini nužnim individualni pristup u planiranju rehabilitacije.

Kontraktura kod bolesnika s FSH distrofijom se rjeđe razvijaju, a relativno su blagog stupnja. Po učestalosti i po stupnju kontraktura FSH distrofija se značajno razlikuje od ostalih distrofija tipa Duchenne, Backer ili Emery Dreifuss. Najčešće se javljaju na gležnjevima i stopalima radi skraćanja Ahilovih tetiva, rjeđe na koljenima. Kontraktura, uz slabost mišića, otežavaju stajanje i hod, izazivaju umor radi pojačanih napora pri hodu, provociraju nestabilnost te sklonost padanju. U kombinaciji s slabošću natkoljениčnih mišića te zdjelične muskulature (ekstenzora kuka), kontraktura su uzrok progresivnih poteškoća u hodu, a kod 20% dolazi i do gubitka samostalnog hodanja. Kompenzatorne modifikacije u posturi (prominencija trbuha uz hiperlordozu) dovode do dodatnog pogoršanja kontraktura.

Fizioterapijski tretman kontraktura se provodi po načelima kojima se tretiraju i bolesnici sa sličnim neuromuskularnim bolestima odnosno miopatijama. Za prevenciju ili tretmanu umjerenih kontraktura, po većini autora, provode se aktivne vježbe i pasivne vježbe istezanja zglobova nogu. Vježbe istezanja treba, dva puta dnevno po 10-15 puta, dva puta dnevno, za svaki zglob. Prije početka vježbi je moguća i poželjna primjena termoterapije (krioterapije ili oprezna primjena topline). U borbi protiv kontraktura, korisnim se pokazalo hodanje i stajanje (samostalno ili u stalku za vertikalizaciju) po barem nekoliko sati dnevno, kao i potrbušno ležanje. Kineziterapija se često provodi u kombinaciji s primjenom ortoza za prevenciju kontraktura ili olakšanje hoda. Navedeni postupci su u tretmanu kontraktura kod mišićne distrofije pokazali umjerenu učinkovitost po studijama Scotta 1981. i Fowlera 1982.

U kasnijoj, uznapredovaloj fazi bolesti kada kontraktura postaju fiksirane, a fizioterapija više nema učinka, postavlja se indikacija za operativnu korekciju kontraktura tj. tenotomije.

Postoperacijski se provodi imobilizacija ortozama u trajanju do 6 tjedana uz ranu vertikalizaciju i intenzivnu rehabilitaciju (kineziterapiju).

Fizioterapija ima svoje mjesto u postoperacijskom tretmanu i kod drugih kirurških zahvata koji se provode radi ublažavanja deformacija muskuloskeletnog sustava, poglavito u smislu stabilizacija skapula, torakoskapularne fuzije. Intenzivnom kineziterapijom se započinje tri mjeseca nakon operacijskog zahvata, tj nakon skidanja imobilizacije ortozom. Kineziterapija se provodi radi poboljšanja pokretljivosti ramena tj. glenohumeralnog zgloba kao i poboljšanja snage muskulature (m.deltoideusa).

Radi slabosti dorzalnih fleksora stopala koja klinički rezultira flakcidnom parezom stopala, otežanim hodom koji postaje nestabilan te zahtijeva pojačani napor bolesnika, korisna je primjena ortoza za stabilizaciju stopala i gležnjava (AFO - Ankle Foot orthosis). Ortoze za stabilizaciju stopala i gležnja mogu poboljšati stabilnost i prevenirati padove kod osoba s parezoma stopala. Ukoliko postoji značajnija mišićna slabost nogu i zdjelice muskulature koristi se hodalica, a kada pareza progredira do stupnja da samostalni hod više nije moguć (u cca 20% po Kulmeru), nužna je primjena invalidskih kolica. Radna terapija kao i primjena tehničko-rehabilitacijskih pomagala trebaju bolesniku s FSHD, kroničnom bolesti s brojnim funkcionalnim onesposobljenjima, poboljšati i olakšati obavljanje aktivnosti svakodnevnog života, radnih i okupacijskih sadržaja.

ZAKLJUČAK

Još uvijek u nedostaku etiološke terapije bolesnika s facioskapuloperonalnom distrofijom, rehabilitacija ima značajnu ulogu. Po suvremenim načelima struke, treba biti provedena po bio-psiho-socijalnom modelu. Fizioterapija ima nezaobilaznu ulogu jer se njom usporava nastanak tjelesnih oštećenja i posljedičnih funkcionalnih nesposobnosti bolesnika. Na prvom mjestu je kinezioterapija (aktivne vježbi, vježbe s doziranoim otporom, pasivne vježbe i vježbe istezanja za održavanje pokretljivosti zglobova). Prema studiji po Olsenu i koautorima 2005. najbolji učinak kod bolesnika s FSHD su pokazale aerobne vježbe koje su dokazano poboljšale okcigenaciju i radni kapacitet bolesnika, a da pritom nisu izazvale mišićna oštećenja. Važno je, također, u pravom trenutku, uočiti potrebu za adekvatnim pomagalom (npr. ortoza za stabilizaciju donjih udova ili pomagala za kretanje (hodalice, kolica) kako bi se umanjio stupanj onesposobljenosti bolesnika. Kod ireverzibilnih kontraktura zglobova radi skraćanja tetiva, nakon neuspješne fizioterapije, provode se kirurški zahvati u smislu tenotomija

(uz ortotsku opskrbu i prateću rehabilitaciju). Primjena ortoza (AFO) kod pareza stopala radi slabosti dorzifoleksora stopala omogućava bolju stabilnost, olakšava hod i i prevenira padanje. Psihološkom potporom, edukacijom kao i primjenom pomagala pomaže se bolesniku da u okviru postojeće bolesti ima što bolju kvalitetu življenja. Suvremena tehničkih pomagala za kontrolu okoline i obavljanje aktivnosti svakodnevnog življenja kao i primjena pomagala za kretanje, olakšavaju obavljanje aktivnosti svakodnevnog života, komunikaciju, mobilnost i omogućavaju bolju kvaliteta življenja i psihosocijalnu reintegraciju, u svakodnevni život, školovanje i radne aktivnosti bolesnika s FSHD.

LITERATURA:

1. Kilmer D. Myopathy. U: DeLisa JA, ed. Rehabilitation Medicine. Principles and Practice. Fourth Edition, Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. 2005:914- 928
2. McDonald CM, Han JJ, Abresch TR, Carter GT. Myopathic Disorders. U: Braddom R.L. Physical medicine and Rehabilitation. Third edition. Saunders Elsevier 2007: 1099-1131
3. Tawil R, Van Der Maarel SM. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Muscle Nerve. 2006;34:1-1
4. Kilmer DD, Abresch RT, McCrory MA, Carter GT, Fowler WM, Johnson ER, McDonald CM. Profiles of neuromuscular diseases. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Am J Phys Med Rehabil. 1995;74: 131-9
5. Krasnianski M, Eger E, Neudecker S, Jakubiczka S, Zierz S. Atypical Phenotypes in Patients With Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy 4q35 Deletion . Arch Neurol. 2003; 60:1421-1425
6. Vranješ D, Mitrović Z, Canki-Klain N, Bilić E, Jurenić, Dubravka Ž, Šoštarko M. Kliničke i elektromiografske značajke facioskapulohumeralne mišićne distrofije (FSH) (Clinical and electromyographic features of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSH)) Neurologia Croatica. Supplement (1331-5196) 53 (2004), Suppl 3; 131-132
7. Tawil R, Griggs RC. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. In: Rosenberg RN, Pruisner SB, DiMaurio S et al (eds) The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease. Butterworth-Heinemann. Boston. 1997: 931-8.

8. 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.
9. Aitkens SG , Lord AF, Bernauer E et al. Relationship of manual muscle testing to objective strength measurements. *Muscle Nerve* 1989; 12: 173-177.
10. Grimby G. *Neuromuscular Disease U: Fletcher GF, Banja J, Jann BB . Rehabilitation medicine . Contemporary clinical perspectives. Lea andn Fabiger 1992; 103-122.*
11. Kovač I. *Rehabilitacija i fizikalna medicina bolesnika s neuromuskularnim bolestima. Izdavač: Savez društava distrofičara Hrvatske. Tisak EDOK Samobor, 2004.*
12. Edwards S. *Neurological Physiotherapy. A problem– solving approach. Second edition. Churchill Livingstone. Edinburg. Harcourt Publishers Limited, 2002.*
13. Reimann J, Irintchev A, Wernig A. Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2000; 10: 276-82.
14. Fowler WM Jr. Management of musculoskeletal complications in neuromuscular diseases: weakness and the role of exercises. *Phys Med Rehabil* 1988; 2: 489- 507.
15. DeLateur BJ, Giaconi RM. Effect on maximal strength of submaximal exercise Duchenne muscular dystrophy . *Am J Phys Med* 1979; 58: 26-36.
16. Olsen DB, Ormgreen MC, Vissing J. Aerobic training improves exercise performance in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 2005;64:1064–6
17. van der Kooi EL, Lindeman E, Riphagen I. Strength training and aerobic exercise training for muscle disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;1:CD003907
18. 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.
19. Vignos PJ, Watkins MP. The effect of exercise in muscular dystrophy. *JAMA* ,1996; 197: 843.
20. Scott OM, Hyde SA, Goddard C, Dubowitz V. Prevention of deformity in Duchenne muscular dystrophy: a prospective study of stretching and splintage. *Physiotherapy* 1981; 67: 177-80.
21. Fowler WM Jr. Rehabilitation management of muscular dystrophy and related disorders: II. Comprehensive care. *Arch Phys Med Rehabil* 1982; 63: 322-8.

22. Bushby K, Finke R, Birnkrant DJ, L E Case LE, Clemen PRs, Cripe L, Kaul A, Kinnet K, McDonald G, Pandya S, s Poysky J, Shapiro F, Tomezsk J, Constantin C, for the DMD Care Considerations Working Group*. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. www.thelancet.com/ Neurology 9 February 2010: 177

PLUĆNE KOMPLIKACIJE FACIOSKAPULOHUMERALNE MIŠIĆNE DISTROFIJE

Taida ALFIREVIĆ-UNGAROV

Specijalna bolnica za plućne bolesti, Zagreb

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija (FSHD) je autosomno dominantno nasljedni oblik mišićne distrofije i donedavno se smatralo da je to, nakon Duchennove i miotoničke mišićne distrofije, treća najčešća distrofija. Lista rijetkih bolesti iz 2008. navodi pak FSHD kao najčešći oblik mišićne distrofije.

Bolest je karakterizirana sporo progresivnom asimetričnim slabošću mišića ramena, nadlaktice, donjeg dijela lica, zdjeličnog pojasa i nogu, varijabilnim nastupom, težinom i progresijom bolesti. Postoje velike individualne razlike u pojavnosti simptoma i progresiji bolesti čak i unutar obitelji koje dijele istu gensku mutaciju. Simptomi bolesti mogu se javiti u ranom djetinjstvu, ali u oko 95% slučajeva bolest se manifestira oko 20-te godine. Oko 10-20% bolesnika postanu ovisni o kolicima a isti postotak ostane asimptomatski cijelog života (1,2).

Plućne komplikacije neuromuskularnih bolesti (NMB)

NMB uzrokuju patološku funkciji mišića, bilo zbog poremećaja na nivou leđne moždine (npr. spinalna mišićna atrofija, amiotrofična lateralna skleroza), perifernih živaca (npr. Gullain-Barre' sindrom), neuromišićne spojnice (mijastenija gravis) ili samog mišića (npr. Duchenne mišićna distrofija, FASCIOSKAPULOHUMERALNA MIŠIĆNA DISTROFIJA-FSHD). Neovisno o kojoj se NMB radi, ako se razvije respiracijska insuficijencija (RI), uzroci, mehanizam nastanka i kliničke manifestacije RI su iste. RI je najozbiljnija komplikacija, te najčešći uzrok morbiditeta i mortaliteta kod bolesnika s NMB (3).

RI definiramo sniženim parcijalnim tlakom kisika u arterijskoj krvi ($PaO_2 < 60$ mmHg) i urednim ili povećanim parcijalnim tlakom ugljičnog dioksida arterijske krvi ($PaCO_2$). Za razliku od parenhimskih bolesti pluća koje uzrokuju dominantno hipoksemičnu RI (snižen

PaO₂ , uredan ili snižen PaCO₂), NMB uzrokuju zatajenje respiracijske pumpe što vodi u hipoventilaciju i hiperkapničnu RI (PaCO₂>45 mmHg i snižen PaO₂).

NMB nisu karakterizirane samo progresivnom slabošću skeletne muskulature, već i respiratorne, bulbarne, a kod miopatija i srčane muskulature. (Slika 1). Nemogućnost adekvatne ventilacije zbog slabosti inspiratorne muskulature (neadekvatna ekspanzija pluća i atelektaze), nemogućnost adekvatnog iskašljavanja zbog dominantne slabosti ekspiratorne muskulature (rizik atelektaze i pneumonije), rizik od aspiracija hrane (apscedirajuće pneumonije) zbog slabosti bulbarne muskulature, te plućne komplikacije uzrokovane ovim stanjima osnovni su uzrok RI (3,4).

Torakalna skolioza, česta kod NMB, dodatno pogoršava plućnu funkciju. U stabilnih bolesnika (bez plućne infekcije) popustljivost (compliance) prsnog koša je obrnuto proporcionalna Cobb-ovu kutu. Bolesnici sa Cobb-ovim kutom manjim od 70% su uglavnom asimptomatski, oni sa kutom između 70-100% imaju dispneju u naporu, a kod onih s kutom većim od 100% javlja se respiracijska insuficijencija. U blizini konveksnog dijela skoliotične kralježnice komprimirani su dijelovi pluća što dodatno kompromitira ventilaciju i smanjuje klirens sekreta iz dišnih putova. Učestale infekcije na tom području dovode do fibroznih promjena u preegzistentno zdravim plućima (5).

Kod bolesnika kod kojih je zbog vezanosti za kolica smanjena potreba za većim dišnim radom dolazi do brojnih strukturnih promjena muskuloskeletnog sistema, pa tako i ankiloze torakovertebralnih i kostosternalnih zglobova, što dodatno smanjuje popustljivost prsnog koša i kompromitira ventilaciju (6).

Zahvaćenost srčanog mišića kod miopatija te poremećaji disanja u spavanju, koji su česti u bolesnika s NMB, također pridonose progresiji RI.

RI se najprije javlja tijekom spavanja i može mjesecima i godinama prethoditi dnevnoj RI (7). I kod zdravih ljudi spavanje je izazov za respiracijski sustav s padom ventilacije i promjenom tipa disanja što dovodi do pada (ali ne klinički značajnog) PaO₂ i porasta PaCO₂. Mogućnost

bolesnika s NMB da odgovori na izmijenjeno fiziološko stanje tijekom spavanja ograničeno je njihovim kapacitetom ventilacije i funkcijom respiratornih mišića. Simptomi RI tijekom spavanja su: česta buđenja tijekom noći, noćne more, noćna znojenja, jutarnje glavobolje, smanjenje koncentracije, umor, razdražljivost i pretjerana dnevna pospanost. Ti su simptomi

nekarakteristični, često se previde i ne povezuju se s RI. Dispneja kao dominantni simptom RI najprije se javlja u naporu što je prekriveno slabom pokretljivošću ovih bolesnika, pa je pojava dispneje u mirovanju znak uznapredovale RI. Posljedice RI su policitemija (sklonost tromboze), plućna i arterijska hipertenzija, hipertrofija desnog i lijevog srca te konačno srčano popuštanje (8).

Plućne specifičnosti fascioskapulohumeralne mišićne distrofije

Plućne manifestacije NMB ovise o stupnju zahvaćenosti respiratornih mišića, o skupini zahvaćenih respiratornih mišića, o stanju koštanog dijela prsnog koša, stupnju zahvaćenosti bulbarnih mišića i srčanog mišića, te prisutnosti poremećaja disanja u spavanju.

Respiratorni mišići i koštani dio prsnog koša kod FSHD

Značajan broj bolesnika s FSHD ima kompromitiranu plućnu funkciju što često ostaje neprepoznato i nedijagnosticirano, jer neposredno ne ugrožava život, ali može pridonijeti bržem razvoju FSHD.

10 godišnje prospektivno praćenje profila oštećenja i invalidnosti u 53 bolesnika s FSHD pokazalo je da je 50% bolesnika imalo blago snižen VC kao dokaz restriktivnog poremećaja ventilacije, 13% je imalo teže oštećenje VC, a 22% bolesnika je imalo plućne komplikacije. 35% bolesnika s FSHD je imalo deformitet kralježnice, a kod većine to je bila hiperlordoza. Dob ili trajanje bolesti, u ovoj studiji, nisu imali utjecaja na plućnu funkciju (9).

U studiji Stübgena iz 2009. g. nađena je signifikantno značajna razlika u funkciji respiratorne muskulature između zdravih i bolesnika s FSHD. Bolesnici s FSHD nisu imali simptoma ili znakova koji bi upućivali na slabost respiratornih mišića. Slabost respiratornih mišića je bila blaga, slabošću su više bili zahvaćeni ekspiratorni nego inspiratorni mišići, a funkcija dijafragme (određivanjem transdijafragmalnog tlaka) nije se razlikovala u ispitivanih grupa (10).

Kod nekih NMB podjednako su zahvaćeni inspiratorni i ekspiratorni mišići (npr. Duchennnova mišićna distrofija), a kod nekih (npr. spinalna mišićna distrofija) zbog češće zahvaćenosti ekspiratorne muskulature i nemogućnosti iskašljavanja učestale respiracijske infekcije javljaju se puno prije nastanka RI (11).

Atipičan tijek FSHD bolesti može uzrokovati i slabost mišića gornjih dišnih putova. U japanskoj studiji od 151 bolesnika s genetski dokazanom FSHD i ranim nastupom bolesti 4,6% je imalo atrofiju lingvalne muskulature, a dvojica su imala disfagiju (12), pa iako se disfagija ne smatra simptomom FSHD, ne treba je smatrati ni isključnim kriterijem za dijagnozu FSHD (13). Disfagija može uzrokovati aspiraciju hrane te razvoj recidivirajućih pneumonija i posljedične fibrozne promjene na plućima.

Skolioza se javlja u oko 1/3 bolesnika s FSHD, uglavnom je blaga (što ne isključuje pojavu teških oblika) i uglavnom se javlja kod ranog početka bolesti. Zbog nemogućnosti uspravnog sjedenja dijafragma je pritisnuta što može dodatno pogoršati ventilaciju pluća FSHD bolesnika.

Kod Dichenne mišićne distrofije (DMD) RI se očekuje kod svih bolesnika. Pojava RI je individualna i ovisi o postignutom vitalnom kapacitetu (VC). Kod bolesnika s DMD vitalni kapacitet do 10-te godine očekivano raste. Nakon toga slijedi plato, a potom VC pada, u početku sporo a potom i do 250 ml/godišnje. Bolesnici koji postignu VC manji od 1200 ml umiru u prosjeku s 15,3 godina, a oni koji postignu VC >od 1700 ml dožive u prosjeku 21 godinu. Podaci se odnose na bolesnike koji nisu provodili kućnu ventilaciju (14).

Za razliku od DMD, FSHD je sporo progresivna bolest i slabost respiratorne muskulature rijetko progredira u RI. (Slika 2). Ako se razvije RI uzrokovana je deformitetom prsnog koša ili (ako se bolest manifestira u dječjoj dobi) primarnom slabošću dijafragme i/ili slabosti interkostalnih mišića.

Simptomatsku respiracijsku insuficijenciju i potrebu za dugotrajnom ventilacijskom potporom tijekom noći razvije samo 1% bolesnika s FSHD. Faktori rizika za razvoj RI su teška mišićna slabost i vezanost za kolica, srednje teška do teška kifoskolioza (kao dobro poznati uzrok RI) i lumbalna hiperlordoza. Kako se pektus excavatum nalazi u oko 5% bolesnika s FSHD, a u bolesnika koji su na ventilacijskoj potpori u 3 od 10 bolesnika, pektus excavatum se također

smatra faktorom rizika za razvoj RI. Restrospektivno svi su bolesnici (osim dvojice) imali simptome RI koji nisu bili prepoznati i povezivani s RI. RI se javi kasno u tijeku bolesti i vrijeme od početka FSHD do razvoja RI, koja je zahtijevala potrebu za dugotrajnom ventilacijskom potporom tijekom spavanja, je bilo od 22 do 59 godina (15).

Međutim kod 20 godina stare bolesnice s genetski dokazanom FSHD koja nije imala niti jedan od gore navedenih faktora rizika (isključen embolizam i parenhimska bolest pluća) razvila je hiperkapničku respiracijsku insuficijenciju u trećem tromestru trudnoće što je zahtijevalo kućnu neinvazivnu mehaničku ventilaciju tijekom noći. Autori sugeriraju da bi i trudnoća mogla biti jedan od potencijalnih faktora rizika (16). Inače u trudnoći kod 24% bolesnica s FSHD dolazi do pogoršanja simptoma koji se ne vraćaju na stanje prije poroda (17). Opisana je FSHD sa senzoneuralnim gubitkom sluha, tortuoznim retinalnim arteriolama i ranim nastupom i progresijom teške restriktivne plućne disfunkcije, RI, plućnog srca i smrti (18).

Srce kod FSHD

Zahvaćenost srčanog mišića je česta u miopatijama, ali nije ekstenzivno istraživana u bolesnika s FSDH i još je uvijek tema rasprava.

U multicentričnoj studiji Trevisan i sur. 12% bolesnika s FSHD a bez kardiovaskularnih faktora rizika imalo je simptome (palpitacije zbog supraventrikularne aritmije) ili elektrokardiografske znakove (kratkotrajne supraventrikularne tahikardije) srčane zahvaćenosti (19). Galetta i sur. uspoređivali su srčanu funkciju u bolesnika s FSHD i zdravih istih godina i izvijestili o subkliničkoj redukciji funkcije lijevog ventrikula i abnormalnoj miokardnoj aktivnosti u bolesnika s FSHD (20), a u studiji Laforêta i sur. od 100 bolesnika s genetski dokazanom FSHD 5% je imalo smetnje provođenja ili aritmije a u odsutnosti drugih kardiovaskularnih faktora rizika (21). Do 2009. objavljena su samo 4 slučaja hipertrofičke kardiomiopatije kod bolesnika sa FSHD, a u jednom slučaju prvi put je dokazana hipertrofička kardiomiopatija biopsijom srčanog mišića (22).

Poremećaji disanja u spavanju kod FSHD

Poremećaji disanja u spavanju (sleep disordered breathing) su česti kod bolesnika s mišićnom distrofijom i opisani su kod Duchenn, miotoničke i limb girdle mišićne distrofije. Međutim, u PubMed-u upotrebljavajući FSHD i spavanje kao ključne riječi nađeno je samo 8 referenca s malim uzorkom FSHD bolesnika u kojima se ispitivala kvaliteta spavanja i poremećaji disanja

u spavanju. U ispitivanim uzrocima poremećaji disanja u spavanju su česti kod bolesnika s FSHD. Opstruktivne apneje u spavanju (kao najčešći oblik), REM ovisne desaturacije ili miješani oblici poremećaja disanja u spavanju javljaju se u 39% bolesnika s FSHD, ne ovise o kliničkoj težini bolesti i često su asimptomatski. Indeks tjelesne mase, opseg vrata i dnevna

pospanost nisu bili prediktori poremećaja disanja u spavanju, pa se skrining poremećaja disanja u spavanju mora uključiti u kliničku procjenu FSHD (23). Druga studija Della Marca i sur. pokazala je da uzrok OSAS u bolesnika s FSHD nisu anatomske anomalije (cefalometrijska mjerenja), već slabost mišića gornjih dišnih puteva (24).

Procjena plućne funkcije kod bolesnika s NMB

Uz anamnezu i fizikalni pregled (osvrta na tip disanja, upotrebu pomoćne muskulature, paradoksnog disanja) u praćenju ovih bolesnika važna je procjena plućne funkcije (plućni volumeni i protoci, plinska analiza arterijske krvi te eventualno cjelonoćna polisomnografija). Tipična metoda za procjenu slabosti periferne muskulature kao što je elektromiografija teško se može primijeniti na procjenu stanja respiratorne muskulature. Plućni volumeni, protoci i plinska analiza arterijske krvi su nespecifični i nesenzitivni testovi u procjeni stanja respiratorne muskulature, ali su važni u praćenju i isključenju pridružene plućne bolesti. Naime vitalni kapacitet (VC) je uredan ili minimalno reduciran sve dok je snaga respiratorne muskulature iznad 50% predviđene.

Tek kada je snaga respiratorne muskulature manja od 50% predviđene bilježi se pad VC. Pad VC iz sjedećeg u ležeći položaj za 5-10% bilježimo i kod zdravih osoba. Pad za 25% ima specifičnost 90%, a senzitivnost 79% za dijagnozu slabosti dijafragme kao glavnog inspiratornog mišića.

Mjerenje maksimalnog inspiratornog i ekspiratornog tlaka koji ispitanik generira u ustima je jednostavna mjera snage inspiratornih (maximum inspiratory pressure-PI max, MIP) i ekspiratornih mišića (maximum expiratory pressure –PEmax, MEP). Sniženi MIP ili MEP sugeriraju slabost respiratorne muskulature. Visoki MIP >od 80 cm H₂O kod muškaraca i >70 cm H₂O kod žena isključuje mišićnu slabost i ima visoku negativnu prediktivnu vrijednost. Upotreba standardnog usnika pri mjerenju VC, MIP ili MEP kod bolesnika s FSHD može dati lažno negativne rezultate. Zbog slabosti orofacijalne muskulature bolesnici ne mogu ustima

obuhvatiti usnik te dolazi do gubitka zraka. Stoga se kod tih bolesnika umjesto usnika koristi facijalna maska, a za procjenu snage respiratorne muskulature češće se koristi test ušmrkavanja (maximal sniff nasal inspiratory pressure -SNIP test) Vršni protok pri manevru kašlja direktno korelira s mogućnosti iskašljavanja i čišćenja sekreta

iz dišnih putova. Vrijednost vršnog protoka ispod 270L/min je povezana s neadekvatnim iskašljavanjem i potrebom za asistiranjem iskašljavanja.

Plinska analiza arterijske krvi determinira stupanj respiracijske insuficijencije. Kako se RI prvo javlja tijekom spavanja pa dnevne vrijednosti respiracijskih plinova mogu biti uredne unatoč RI. Stoga je vjerojatnije da će RI biti prisutna ujutro nakon buđenja, nego kasnije tijekom dana. Dnevni poremećaj plinova arterijske krvi implicira kasno i teško oštećenje respiratorne funkcije, pa plinska analiza arterijske krvi nije niti senzitivna niti specifična za ranu detekciju RI. Ako je RI incipijentna manja infekcija, upotreba sedativa ili upotreba kisika može uzrokovati značajan porast PaCO₂ (3,6,25). Algoritam praćenja plućne funkcije u bolesnika s NMB, pa tako i bolesnika s FSHD, ovisi o simptomatologiji i postignutim vrijednostima plućne funkcije (26) (Slika 3).

Bolesnici koji nemaju značajno poremećenu plućnu funkciju, ali imaju simptome koje upućuju na RI tijekom noći kandidati su za cijelonoćnu polisomnografiju.

Zaključak: S obzirom na ekstremnu varijabilnost FSHD, kod tih bolesnika treba misliti i na mogućnost da se u tijeku bolesti razviju plućne komplikacije, a u konačnici i respiracijska insuficijencija. Kako je FSHD sporoprogresivna bolest RI ostaje nedijagnosticirana sve do pojave akutne RI, najčešće uzrokovane respiratornim infektom, što često zahtjeva hitnu intubaciju i mehaničku ventilacijsku potporu. Odvajanje od respiratora kod NMB često je nemoguće i takvi bolesnici ostaju trajno vezani za respirator. Stoga je rano u tijeku bolesti potrebna obrada plućne funkcije, provođenje preventivnih mjera (imunizacija protiv influenze (27), izbjegavanje aktivnog i pasivnog pušenja, respiratorna fizioterapija) te određivanje dinamike daljnjeg praćenja.

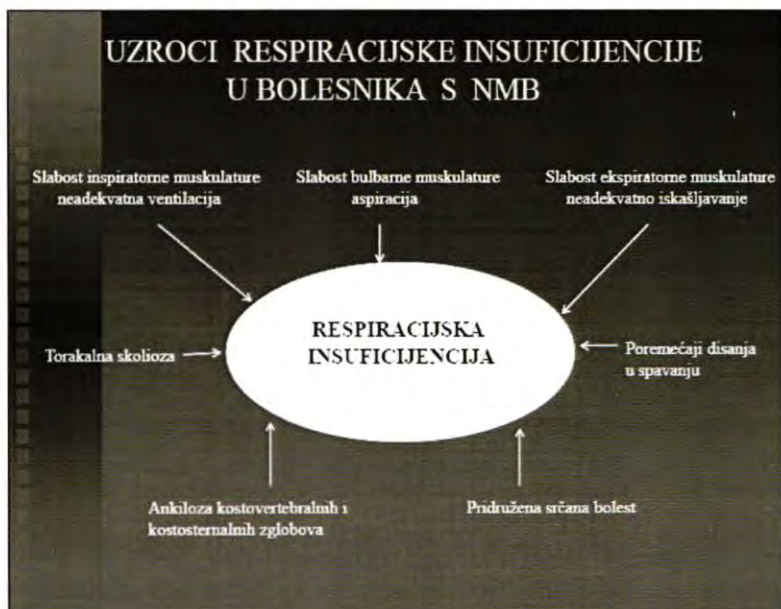
Reference:

1. Prevalence of rare diseases: Bibliographic data, www.orpha.net, November 2008 Number 1, Orphanet Report Series.
2. Pandy S, King WM, Tawil R. Fascioscapulohumeral dystrophy. *Phys Ther.* 2008;88:105-113
3. 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
4. Beneditt JO. The neuromuscular respiratory system: Physiology, pathophysiology, and a respiratory care approach to patients *Respir Care* 2006;51:829-837.
5. Buyse B. Pulmonary manifestation of central neural, neuromuscular and osteo-articular chest wall disorders *Eur Respir Mon* 2006;34:262-289.
6. Perrin C, Unterborn JN, Ambrosino CD, Hill NS. Pulmonary complications of chronic neuromuscular diseases and their management *Muscle Nerve* 2004;29:5-27
7. Piper A. Sleep abnormalities associated with neuromuscular disease: pathophysiology and evaluation *Semin Respir Crit Care Med* 2002;23:211-219.
8. Shneerson J. Sleep in neuromuscular and thoracic cage disorders *Eur Respir Mon* 1989;10:324-344.
9. Kilmer DD, Abresch RT, McCrory MA, Carter GT, Fowler WM Jr, Johnson ER, McDonald CM. Profiles of neuromuscular diseases: Fascioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil.* 1995;74(5 Suppl):131-9.
10. Stöbgen JP, Schulz C. Lung and respiratory muscle function in FSHD. *Muscle Nerve.* 2009;39:729-34.
11. Simonds AK. Neuromuscular disease *Eur Respir Mon* 2001;16:218-226.
12. Yamanaka G, Goto K, Matsumura T, et al. Tongue atrophy in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 2001;57:733-735.
13. Wohlgemuth M, de Swart BMJ, Kalf JG, Joosten FBM, Van der Vliet AM, Padberg GW. Dysphagia in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 2006;1926-28

14. Rideau Y, Gatin G, Bach J, Gines G. Prolongation of life in Duchenne's muscular dystrophy. *Acta Neurol* 1983; 5: 118-24.
15. Wohlgemuth M, van der Kooi EL, van Kasteren RG, et al. Ventilatory support in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 2004;63 :176– 178.
16. Gienapp TW, Bonne VJ, Lipchik RJ, Biller J, Franco R. Facioscapulohumeral muscular dystrophy presenting as progressive respiratory failure treated with noninvasive ventilation *Chest Meeting Abstracts* 2007;132: 730a.
17. Ciafaloni E, Pressman EK, Loi AM, Smirnow AM, Guntrum DJ, Dilek N, Tawil R. Pregnancy and birth outcomes in women with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 2006;67(10):1887-9.
18. Yasukohchi S, Yagi Y, Akabane T, Terauchi A, Tamagawa K, Mizuno Y. Facioscapulohumeral dystrophy associated with sensorineural hearing loss, tortuosity of retinal arterioles, and an early onset and rapid progression of respiratory failure. *Brain Dev*. 1988;10(5):319-24.
19. Trevisan CP, Pastorello E, Armani M, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and occurrence of heart arrhythmia. *Eur Neurol*. 2006;56 :1– 5.
20. Galetta F, Franzoni F, Sposito R. Subclinical cardiac involvement in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2005;15 :403-408.
21. Laforêt P, de Toma C, Eymard B, Becane HM, Jeanpierre M, Fardeau M, Duboc D. Cardiac involvement in genetically confirmed facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology*. 1998 Nov;51(5):1454-6.
22. Tsuji M, Kinoshita M, Imai Y, Kawamoto M, Kohara N. Facioscapulohumeral muscular dystrophy presenting with hypertrophic cardiomyopathy: a case study. *Neuromuscul Disord*. 2009;19(2):140-2.
23. Della Marca G, Frusciante R, Dittoni S, Vollono C, Buccarella C, Iannaccone E, Rossi M, Scarano E, Pirronti T, Cianfoni A, Mazza S, Tonali PA, Ricci E. Sleep disordered breathing in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Neurol Sci*. 2009;285:54-8
24. Della Marca G, Pantanali F, Frusciante R, Scarano E, Cianfoni A, Calò L, Dittoni S, Vollono C, Losurdo A, Testani E, Colicchio S, Gnoni V, Iannaccone E, Farina B, Pirronti T, Tonali PA, Ricci E. Cephalometric findings in facioscapulohumeral muscular dystrophy patients with obstructive sleep apneas. *Sleep Breath*. 2010 Feb 20.

25. De Palo VA, McCool FD. Respiratory muscle evaluation of the patient with neuromuscular disease Semin Respir Crit Care Med 2002;23:201-209.
26. Paschoal IA, Vilaalba WO, Pereira MC. Chronic respiratory failure in patients with neuromuscular diseases: diagnosis and treatment J Bras pneumol 2007;33:81-92
27. Finder JD, Birnkrant D, Carl J, Farber HJ, Gozal D, Iannaccone ST, Kovesi T, Kravitz RM, Panitch H, Sshramm C, Schroth M, Sharma G, Sievers L, Silvestri JM, Sterni L; American Thoracic Society. Respiratory care of patient with Duchenne muscular dystrophy: ATS consensus statement. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:456-465.

Slika 1. Uzroci respiracijske insuficijencije u bolesnika s NMB



Slika 2. Vjerojatnost razvoja respiracijske insuficijencije u bolesnika s NMB

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

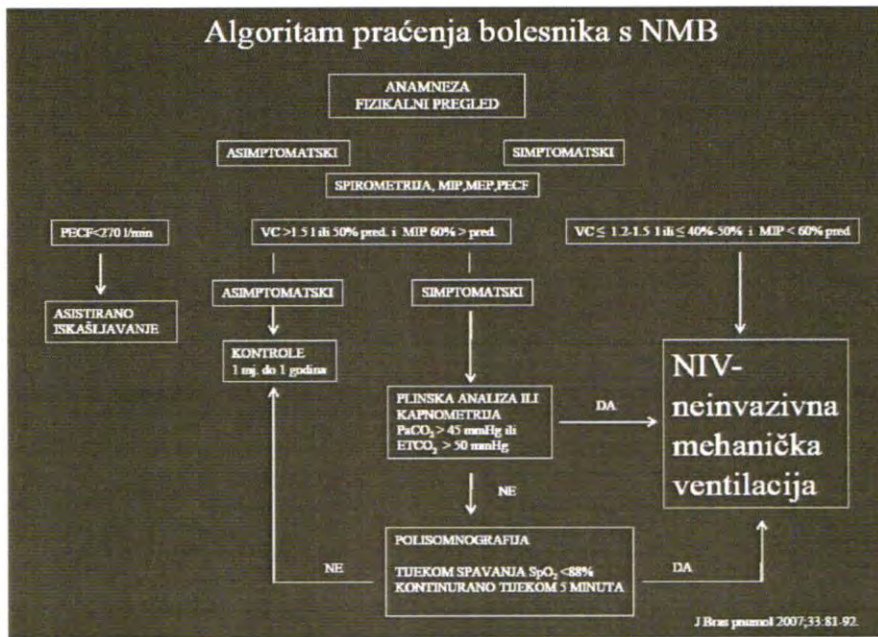
Motor neurone disease/ALS

Early onest scoliosis

Spinal cord lesion above C6

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

Slika 3. Algoritam praćenja plućne funkcija u bolesnika s NMB (modificirano po ref 26).



VC; vitalni kapacitet, MIP; maksimalni inspiratorni tlak, PEF; maksimalni vršni protok pri manevru kašlja,

PaCO₂; parcijalni tlak ugljičnog dioksida arterijske krvi, SpO₂; saturacija kisika perferne krvi

Ventilator za kućnu upotrebu



Neinvazivna ventilacija



ULOGA ORTOPEDA U ZBRINJAVANJU BOLESNIKA S FSHD

Vladimir KOVAČ

Ortopedski odjel, Klinička bolnica Dubrava, 10000 Zagreb

Bolesnici sa facioskapulohumeralnom distrofijom (FSHD), predstavljaju složeni medicinski problem koji zahtijeva timsko rješavanje. Za razliku od drugih neuromuskularnih bolesti gdje su kontrakture ekstremiteta i skolioze glavni ortopedski problem, bolesnici sa FSHD-om razvijaju drugačiju ortopedsku problematiku.

Dominantna je patologija slabost mišića koji stabiliziraju lopatice, što rezultira nestabilnošću skapula, razvijaju se scapula alata, sa otežanom funkcijom gornjih ekstremiteta u predjelu ramenog obruča.

Drugi je problem pojava izražene strukturne deformacije kralješnice (35%), od kojih su najčešće hiperlordoze lumbosakralne kralješnice, a tek nakon toga po važnosti dolaze skoliotične deformacije kralješnice. Kontrakture zglobova donjih ekstremiteta se rjeđe sreću i blažeg su intenziteta nego kod npr. progresivnih mišićnih distrofija tipa Ducjhenne ili Emery Dreifus.

Nestabilnost skapula

Operacijsko nestabilnosti koje su posljedica slabosti stabilizatora i fiksatora skapula sastoji u različitim oblicima skapulopeksije kao i skapulodeze. Opisane metode koriste koštane transplantate, vijke, ploče te serklaže kojima se mediokaudalni dio lopatice fiksira za 5-8 rebro, obično u položaju od 15 - 25 st. abdukcije. Kao sredstva serklaže mogu se koristiti 16 gg. žičana serklaža, ili pak trake od umjetnih materijala. Nakon takve je operacije neophodna imobilizacija gipsom ili ortozom (torakoabdukcijskog tipa), obično u trajanju do 3 mjeseca, a potom slijedi postoperacijska rehabilitacija. Prosječno se postoperacijski postiže dobro poboljšanje aktivne pokretljivosti ruku u ramenom pojasu (100 st. abdukcije, 90 st. fleksije,

35 st. ekstenzije, vanjske rotacije 20 st., unutarnje rotacije 90 st.) , dokazano u nekoliko studija (Bunch WH i surad. 1993, Demirhan M i sur. , Diab M i sura. 2005, Giannini S i

surad. 2006, Krishnan SG i suradnici 2005. Opisani dobri postoperacijski rezultati mogu biti relativno brzo kompromitirani u slučaju brze progresije bolesti, odnosno daljnje mišićne slabosti.

Nefuzijske fiksacije čini se da postižu jednake rezultate, bez negativnih efekata postoperacijske imobilizacije.

Strukturalna lumbosakralna hiperlordoza

Primarna strukturalna hiperlordoza kralježnice je rijetkost u ortopedskoj praksi. Hiperlordoze uglavnom nastaju kao sekundarne, popratne pojave kontraktura donjih ekstremiteta, u prvom redu fleksorne kontrakture kukova.

Preoperacijski je, stoga, nužna dijagnostika funkcijskim testovima (Thomas-ov hvat), te funkcijskim Rtg slikama kojima se registrira stupanj kontrakture zgloba kuka, te strukturalnost deformacije kralježnice. Operacijski izbor je stabilizacija lumbalnog segmenta kralježnice, segmentalnom fiksacijom odnosno spondilodezom. Za razliku od prethodnih, distrakcijskih tehnika kojima se nekontrolirano korigirala lordoza, te je postojala opasnost od fiksacije kralježnice u disbalansiranom položaju, današnje tehnike omogućuju segmentalnu fiksaciju i korekciju deformacije primjenom transpedikularnih vijaka i serklaža, te postizanje planiranog stupnja lordoze. RTG obrada profila cijelog trupa, uključujući kranium, te prikaz nagiba zdjelice, omogućavaju planiranu rekonstrukciju balansirano profila cijele kralježnice, pa tako i lumbalne lordoze.

Pri tome je od važnosti i poznavanje fizioloških segmentalnih nagiba kralješaka, koji se mogu koristiti u rekonstrukciji profila kralježnice. U zagradama je naveden intervertebralni nagib izražen u stupnjevima Th1-2 (+1), Th2-3 (+3), Th3-4 (+3,5), Th4-5 (+5), Th5-6 (+5), Th6-7 (+5), Th7-8 (+5), Th8-9 (+4), Th9-10 (+3), Th10-11 (+3), Th11-12 (+2,5), Th12-L1 (+1), L1-L2 (-4), L2-L3 (-7), L3-L4 (-13), L4-L5 (-20), L5-S1 (-28).

Jasno je da je preduvjet svake fiksacije kralježnice na sakrum, sačuvana gibljivost kukova kojima se kompenzira ukočenje kralježnice. Današnje mogućnosti operacijske segmentalne fiksacije kralježnice imaju prednost brze mobilizacije bolesnika nakon operacije, bez potrebe

postoperacijske imobilizacije odnosno mirovanja, što se ranijim tehnikama fiksacije nije moglo izbjeći.

Neuromuskularne skolioze

Relativno su rijetke i njihovo se liječenje ne razlikuje od suštinskog rješavanja skolioza kod drugih neuromuskularnih bolesti, kao i rješavanje kontraktura na ekstremitetima.

Kontrakture se gotovo neizbježno razvijaju kod svih bolesnika s miopatijama, a najučestalije su kontrakture na gležnjevima uz deformaciju stopala po tipu ekvinusa a rjeđe fleksijske kontrakture na koljenima. Njihovo prisustvo otežava stajanje i hod, izaziva umor radi pojačanih napora pri hodu, provocira nestabilnost i sklonost padanju a, u kombinaciji s slabošću mišića natkoljenica te zdjelične muskulature mogu dovesti i do gubitka samostalnog hodanja. Kada su fiksirane, a fizikalna terapija više nema učinka, postavlja se indikacija za operativnu korekciju kontraktura tj. tenotomije. Najčešći op. zahvat je korekcija kontraktura stopala, odnosno elongacija skraćenih Ahilovih tetiva, a metoda izbora je tzv. perkutana tenotomija. To je minimalno invazivan zahvat nakon kojeg je moguća brza mobilizacija bolesnika u plastičnim AFO ortozama. Operacijski zahvat se obično provodi simetrično, obostrano, i to u jednom operacijskom zahvatu. Vrlo važan dio tretmana je rana postoperacijska rehabilitacija s brзом vertikalizacijom bolesnika plastičnim ortozama za donje udove tipa AFO ili KAFO. Operacijsko rješavanje kontraktura zglobova omogućuje uvjete za nastavak i provođenje kvalitetnije rehabilitacije a bolesniku bolje korištenje preostale snage mišića.

Indikacija za operaciju skolioze se postavlja rano, za razliku od idiopatskih skolioza, tj. već kod zakrivljenosti po Cobbu za cca 30 st., dok je vitalni kapacitet (FVC) još iznad 50%. Operacija predstavlja stabilizaciju kralježnice tj. spondilodezu i to metodom sublaminarne serklaže (po Luque-u) ili sistemom "multi hook-rod systems"). Ove instrumentacije ne zahtjevaju postoperacijsku imobilizaciju spinalnim ortozama te je bolesniku je dozvoljeno sjedenje odmah nakon operacije.

Literatura:

1. Benzel E.C., Spine Surgery, Techniques, Complication avoidance, and Management, 2nd edition, Elsevier, Churchill, Livingstone, 2005

2. Bunch WH, Siegel IM. Scapulothoracic arthrodesis in facioscapulohumeral muscular dystrophy. Review of seventeen procedures with three to twenty-one-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am.* Mar 1993;75(3):372-6.
3. Demirhan M, Uysal O, Atalar AC, et al. Scapulothoracic arthrodesis in facioscapulohumeral dystrophy with multifilament cable. *Clin Orthop Relat Res.*
4. Diab M, Darras BT, Shapiro F. Scapulothoracic fusion for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Oct;87(10):2267-75
5. Giannini S, Ceccarelli F, Faldini C, Pagkrati S, Merlini L. Scapulopexy of winged scapula secondary to facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;449:288-94.
6. Krishnan SG, Hawkins RJ, Michelotti JD, Litchfield R, Willis RB, Kim YK. Scapulothoracic arthrodesis: indications, technique, and results. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;435:126-33
7. Leigh Ann Curl, M.D., Scapular Fixation Surgery for People with FSHD, FSH Society International Patient and Researcher Network Meeting, Friday, July 30, 2010 - Sunday, August 1, 2010
8. Mummery CJ, Copeland SA, Rose MR. Scapular fixation in muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(3)

A UNIFYING GENETIC MODEL FOR FACIOSCAPULOHUMERAL MUSCULAR DYSTROPHY

Richard JLF LEMMERS

Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is a common form of muscular dystrophy in adults that is characterized by progressive and often asymmetric weakness and wasting of facial, shoulder girdle and upper arm muscles. FSHD is most often caused by contraction of the D4Z4 macrosatellite repeat array, but only when the repeat array is localized on a specific genetic background of chromosome 4q. Repeat contractions on other, non-permissive 4q or 10q chromosomes do not cause FSHD. D4Z4 repeat contractions cause a local chromatin relaxation, resulting in the transcriptional deregulation of genes within or close to D4Z4. The candidate gene *DUX4* has been identified within each D4Z4 unit and encodes for a double homeobox protein of unknown function. Different from *DUX4* transcripts originating from internal units, the *DUX4* transcript from the last D4Z4 unit is spliced to a unique last exon in the region immediately flanking D4Z4. This exon contains a polyadenylation signal which presumably stabilizes the distal transcript which can be observed in FSHD myotubes only.

We performed detailed genotyping and D4Z4 sequencing in permissive and non-permissive haplotypes and in FSHD patients with an unusual genotype that were selected worldwide after a complex molecular diagnosis outcome. We show that FSHD patients carry specific single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the polyadenylation signal that affects the polyadenylation of *DUX4* transcripts. Permissive chromosomes carry a canonical *DUX4* polyadenylation signal, and a non-canonical polyadenylation signal was detected in non-permissive chromosomes. Transfection studies revealed that *DUX4* transcripts are efficiently polyadenylated and are more stable when expressed from permissive chromosomes.

These findings suggest that FSHD arises through a toxic gain of function attributable to the stabilized distal *DUX4* transcript. Our study not only explains the striking haplotype-specificity of the disorder, but also provides a genetic mechanism that unifies all genetic observations in all patients with FSHD.

Literatura:

Richard J. L. F. Lemmers, Patrick J. van der Vliet, Rinse Klooster, Sabrina Sacconi, Pilar Camaño, Johannes G. Dauwese, Lauren Snider, Kirsten R. Straasheijm, Gert Jan van Ommen, George W. Padberg, Daniel G. Miller, Stephen J. Tapscott, Rabi Tawil, Rune R. Frants, Silvère M. van der Maarel: **A Unifying Genetic Model for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy**. Science 2010; 329:1650-1653.

Richard J. L. F. Lemmers, Marieëlle Wohlgemuth, Kristiaan J. van der Gaag, Patrick J. van der Vliet, Corrie M. M. van Teijlingen, Peter de Knijff, George W. Padberg, Rune R. Frants and Silvere M. van der Maarel: **Specific Sequence Variations within the 4q35 Region Are Associated with Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy**. Am J Hum Genet 2007; 81: 884-894.

Melanie Ehrlich, Kesmic Jackson, Koji Tsumagari, Pilar Camaño, **Richard JFL Lemmers**: **Hybridization analysis of D4Z4 repeat arrays linkednto FSHD**. Chromosoma 2007; 116: 107-116.

Richard J.L.F. Lemmers, Peggy de Kievit, Lodewijk Sandkuijl, George W. Padberg, Gert-Jan B. van Ommen, Rune R. Frants , Silvère M. van der Maarel: **Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere**. Nature genetics 2002; 32 : 235-236.

Navedena literatura dostupna je u dodatnim materijalima na kraju priručnog štiva.

PSIHOLOŠKI ASPEKTI FSHD

Nataša JOKIĆ-BEGIĆ

Odsjek za psihologiju, Filozofski fakultet u Zagrebu

Znam da imam FSHD od kada sam bio dječak. Naslijedio sam tu bolest od majke. U djetinjstvu sam mogao sve što i moji vršnjaci. Bolesti nije bilo, samo sam znao za nju, ali nisam o njoj mislio niti sam vjerovao da će se ona kod mene javiti. Ponekad me bilo malo sram mame. Nisam nikome od prijatelja pričao o bolesti, potpuno sam poricao činjenicu da ću i ja oboljeti. Kroz srednju školu nisam imao nikakvih simptoma i moje negiranje se uspješno nastavilo. Znao sam kakvi su mladi ljudi: vjeruju da im se baš ništa ne može dogoditi. No, na fakultetu je bolest postajala sve više dio mog života. Osim toga i mojoj mami je bilo sve lošije. Osjećao sam se kao da sam sam na svijetu, kao da me nitko ne može razumjeti osim mame s kojom sam pokušavao razgovarati ali ona se uvijek rasplakala kada smo dotaknuli tu temu, govoreći mi: „Oprosti, ja sam kriva što si ti bolestan“. To mi nije nimalo koristilo, od tih sam riječi postajao sve depresivniji. Kao da sam bio greška prirode, kao da mi je oduzeta budućnost. Imao sam djevojku, njoj nisam ništa govorio, samo sam jedan dan prekinuo našu vezu. Ne bih se mogao pomiriti s činjenicom da i moje dijete jednog dana pati kao mama i ja. Netko treba prekinuti taj lanac. Kako je vrijeme odmicalo bolest je bila sve očitija, trpio sam prilično snažne bolove, bio sam stalno umoran. U to vrijeme je Internet ušao u naše živote i ondje sam našao pregršt korisnih savjeta, ali od sveg mi je najviše značila spoznaja da nisam sam, da je moguće živjeti kvalitetan život, da ima načina i za dobivanje zdravog potomstva. Mislim da je najvažnije za bolesnika dobiti istinite i jasne informacije, te znati da u svemu nisi sam. Marko, 29g.

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija je nasljedna bolest koja pogađa ljude oba spola. Facioskapulohumeralna mišićna distrofija je relativno česta primarna bolest mišića s prevalencijom 1:20 000. Nasljeđuje se autosomno dominantno (Vranješ i sur., 2004.). Javlja se uglavnom u adolescentnoj i ranoj odrasloj dobi. U kliničkoj slici dominira slabost facijalnih

mišića (mišića lica) i ramenog obruča. Simptomi koji se rano pojavljuju su poteškoće sa zatvaranjem očiju, podizanjem ruku i zviždanjem. Životni vijek ovih bolesnika je normalan. Psihološki aspekti bolesti uključuju suočavanje s kroničnom boli i umorom, a mogu se javiti i psihičke smetnje u vidu anksioznosti, depresivnosti i slabije socijalne prilagodbe. U tekstu koji slijedi pažnju ćemo posvetiti subjektivnoj patnji koju mogu osjećati osobe oboljele od FSHD-a.

FSHD je nasljedna neurološka bolest koja se može manifestirati u dijapazonu od jedva zamjetnih znakova do ozbiljne narušenosti kako zdravlja, tako i vanjskog izgleda. Iz toga proizlaze nekoliko izvora osobne patnje koji mogu pratiti bolest:

- a) zabrinutost zbog zdravlja - obzirom na vanjske znake bolesti, osoba s FSHD je konstantno podsjećana na činjenicu da je bolesna (dakle vulnerabilna, fragilna), što onemogućuje "negaciju" kao vrlo snažan mehanizam obrane - posljedično se javlja anksioznost i depresivnost
- b) suočavanje s kroničnom boli i umorom – istraživanja pokazuju da se oboljeli najčešće žale na kroničnu bol i to prije svega u donjem dijelu leđa i nogama koja im značajno narušava kvalitetu života (Padua i sur., 2009).
- c) zabrinutost zbog prijenosa bolesti na potomke - kako se radi o nasljednoj bolesti kod oboljelih su mogući snažni osjećaji krivnje ukoliko su i njihova djeca naslijedila bolest, ili stanja visoke tjeskobe tijekom trudnoće ili pak osjećaji uskraćenosti ako su odlučili da radi bolesti neće imati potomstvo
- d) zabrinutost zbog izgleda - s čime su povezani nisko samopoštovanje, nisko samopouzdanje, slabija socijalna prilagodba, te posljedična depresivnost

ZABRINUTOST ZBOG ZDRAVLJA

Od svih spoznaja koje imamo o sebi, vjerojatno je najteže prihvatiti spoznaju da smo smrtni. Iako je potpuno izvjesno da će svatko od nas jednom u budućnosti umrijeti, te činjenice nismo svjesni uvijek i stalno. Dapače, gotovo uvijek i gotovo stalno imamo *iluziju neranjivosti* koja je bitan dio našeg mentalnog zdravlja. Kada bi stalno bili svjesni nadolazeće smrti, brojni naši postupci ne bi imali smisla, osjećali bi se bespomoćno i apatično, depresivno i ustrašeno. Zbog toga je mehanizam *negacije* te potpuno izvjesne činjenice o našoj konačnosti bitan i nužan element kvalitetnog života. Negacija je vrlo koristan mehanizam obrane jer nas odmiče

od poteškoća koje ne možemo riješiti, i ostavlja prostora i energije za poteškoće s kojima se možemo izboriti. poduzimamo korake kojima nijećemo tu činjenicu.

Način na koji to činimo je stvarajući *obrambene atribucije*, odnosno objašnjenja događaja koja omogućuju izbjegavanje osjećaja ranjivosti i smrtnosti. Jedan oblik obrambenih atribucija je *nerealistični optimizam*, vjerovanje da će se nama dogoditi dobre stvari, odnosno da se nama neće dogoditi loše stvari u budućnosti. Upravo zbog ove pristranosti u mišljenju pušači misle kako oni neće oboljeti od raka, mladi vozači misle kako se drugima događaju nesreće, igrači lutrije misle kako će baš oni ostvariti dobitak. Iako nerealistični optimizam može u konačnici dovesti do fatalnih posljedica, on omogućuje ljudima da budu optimistični i da se osjećaju bolje.

Mogu li bolesni ljudi negirati svoju bolest i biti nerealno optimistični? U pravilu da, ovaj obrambeni mehanizam je toliko snažan da će se aktivirati i u najtežim stanjima (Lazarus, 1979). Pogotovo je to moguće kod bolesti koje su „nevidljive“, odnosno ne izazivaju bolove i ne ostavljaju traga na vanjskom izgledu. Sama ta činjenica dozvoljava oboljelima da nekada *negiraju* bolest, a time i da kvalitetnije sudjeluju u svakodnevnim životnim zahtjevima. Međutim, bolesnici koji trpe bolove i/ili imaju vanjske znake bolesti stalno su podsjećani na bolest, na činjenicu koliko su fragilni i vulnerabilni, što može interferirati s nerealnim optimizmom, što ih može činiti depresivnim i ustrašenim.

J

oš jednu pristranost uobičajeno koristimo u trenucima suočavanja s tragičnim vijestima. Radi se o *vjerovanju u pravedan svijet*, odnosno vjerovanju da se loše stvari događaju lošim ljudima, a dobre stvari dobrim ljudima. Kada se dogodi neka nesreća ili bolest, vrlo vjerojatno će svi ljudi tražiti odgovornost u ponašanju koje je dovelo do nesreće. Kada čujemo da je netko obolio od raka pluća pitat ćemo je li pušio, i pozitivan odgovor će nam objasniti „razloge“ za pojavu bolesti, pri čemu ćemo potpuno zanemariti činjenicu da brojni oboljeli nisu nikada pušili. Naša potreba da objasnimo tragične događaje nekom pravilnošću, a ne samo slučajnošću nas čuva od uznemirujućih misli o vlastitoj sigurnosti.

No, što je s obrambenim mehanizmima u situaciji informacije o nasljednoj bolesti? Takva spoznaja govori kako je „sudbina u genima“, što je potpuno oprečno ljudskoj prirodi koja želi život imati pod kontrolom. Jedan vrlo ilustrativni citat iz „Genoma“ Matta Ridleya opisuje što znači spoznaja o nasljeđu bolesti: „Dobar život, izvrsna medicina, zdrava hrana, brižna obitelj

i bogatstvo ne mogu pomoći. Vaša sudbina je u vašim genima i ništa ne možete učiniti da to spriječite“. Može li se u takvim okolnostima aktivirati pristranost o nerealističnom pozitivnom doživljaju sebe? Može li se u slučaju informacije o neliječivoj nasljednoj bolesti aktivirati iluzija kontrole? Što je s nerealističnim optimizmom i homeostatskim mehanizmom očuvanja kvalitete života?

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazuju da je ljudski psihološki aparat dovoljno prilagodljiv da i u situaciji suočavanja s neizbježnom sudbinom aktivira obrambene snage, daje smisao životu i na taj ga način održava (Jokić-Begić i Arambašić, 2010). Pri tome treba naglasiti da postoje velike interindividualne razlike koje su prije svega uvjetovane osobinama ličnosti. Nemaju svi pojedinci iste mogućnosti pozitivnog procesiranja informacija. Stoga je nužan interdisciplinarni pristup oboljelim osobama.

Nužno da liječnici u radu sa ovim (ali i svim ostalim) bolesnicima jasno daju informacije o rizicima koje bolest nosi, daljnjem tijeku bolesti, mogućnostima oporavka. Dati će na taj način priliku bolesniku da integrira te informacije, a kasnije izvan liječničke ordinacije dobivene informacije će mu pomoći da se uspješnije izbori sa svojim osjećajima straha i žalosti. Pri tome treba naglasiti da je nužno davanje istinitih informacija. Posebno je bitno da liječnik ne banalizira bolesnikova pitanja i da daje iskrene odgovore - pojačat će se povjerenje, a time će i komunikacija biti uspješnija. Valja naglasiti odgovornost liječnika u prepoznavanju psihičkih smetnji u prihvatanju i suočavanju s bolešću, koje ako se pravovremeno uoče mogu biti tretirane na odgovarajući način čime će se oboljelom omogućiti bolja kvaliteta života.

SUOČAVANJE S BOLI I UMOROM

Rezultati rijetkih istraživanja kvalitete života FSHD-a govore o sniženju tjelesnog aspekta kvalitete života uslijed bolova koje trpe oboljeli, te kroničnog umora (Padua i sur., 2009).

Istraživanje je također uputilo na moguće rodne razlike: žene izvještavaju o intenzivnoj boli i posljedično nižoj kvaliteti života. Bol se najčešće javljala u donjem dijelu leđa i u nogama.

Bol je uvijek osobno iskustvo. Biopsihosocijalni model doživljavanja i suočavanja s boli predstavlja dobar okvir za shvaćanje te prediktora i zaštitnih čimbenika u određivanju

intenziteta boli, odnosno za pokušaj razumijevanja individualnog iskustva boli (Miro i sur., 2010). Rezultati istraživanja na osobama oboljelim od FSHD-a potvrđuju značaj osobinskih

varijabli kao što je katastrofiziranje (preuveličavanje simptoma, ruminiranje, bespomoćnost) u lošijem psihološkom funkcioniranju, te u intenzivnijim doživljajima boli. Ova nalaz je sukladan rezultatima dobivenim na drugim bolnim stanjima. Autori su i na skupini oboljelih od FSHD-a potvrdili dobro dokazanu činjenicu da socijalna podrška predstavlja zaštitni čimbenik u doživljaju boli. Što osoba percipira više socijalne podrške to će njezino psihološko funkcioniranje biti bolje, a doživljaj boli manje intenzivan (Miro i sur., 2010).

I

ako rijetka, ovakva istraživanja upućuju i na praktične smjernice. Oboljelog treba upoznati sa mogućnostima suočavanja s boli. Pri tome treba što više usmjeravati na usvajanje nefarmakoloških načina suočavanja s boli, a što uključuje aktivan životni stil, ne prepuštanje crnim mislima i ruminacijama (ponavljajućim mislima), preusmjeravanje pažnje, upražnjavanje tehnika relaksacija, značaju traženja i dobivanja socijalne podrške. Sve su ovo načini na koji osoba vraća svoje prirodne obrambene mehanizme, uvodi ponovno kontrolu u svoj život, a time vraća i osjećaj smisla i svrsishodnosti.

ZABRINUTOST RADI POTOMSTVA

FSHD se nasljeđuje autosomno-dominantno, što znači da će svaki nositelj sigurno oboljeti, iako klinička slika može varirati od jednog do drugo člana obitelji. Svako dijete oboljelog ima 50% šansu oboljeti od ove bolesti.

Strelovit napredak genetike doveo je do razvoja i primjene genetskih testova. Oni omogućuju otkrivanje nasljednih bolesti, odnosno rizičnih faktora za pojavu nekoga patološkog procesa. U FSHD-u je genetsko testiranje svakako indicirano kako u dijagnostičke svrhe, tako i u predikciji pojave bolesti. Prema našim spoznajama u literaturi nema istraživanja koja su se bavila isključivo psihološkim reakcijama nakon genetskog testiranja baš za ovu specifičnu bolest, psihološke reakcije na spoznaju o genetskom opterećenju su istraživane za druge bolesti. Rezultati su iznenađujući. Emocionalne reakcije nakon suočavanja s pozitivnim DNA nalazima (o genetskoj predispoziciji) za razvoj bolesti su kratkotrajne, pogotovo kada se radi o dijagnostičkom testiranju. Čini se da psihološki aparat aktivira obrambene snage koji daje smisao životu i tako ga održavaju. Istražujući ponašanja nakon prenatalnog testiranja

istraživači zaključuju da je odluka o ponašanju dinamičan proces koji se mijenja u vremenu pod utjecajem iskustva i zahtjeva koji su stavljeni pred osobu. Stavovi u jednoj vremenskoj

točki nisu pouzdani prediktori ponašanja u budućnosti. Stoga svakako treba oboljele u svakoj fazi bolesti, a pogotovo pred donošenje odluka o potomstvu ponovno upućivati na genetsko savjetovanje.

Treba naglasiti da u emocionalnim i ponašajnim reakcijama postoje velike interindividualne razlike, koje su, prije svega, uvjetovane osobinama ličnosti i stoga je nužan interdisciplinarni pristup osobi prije pristupanja genetskom testiranju. Drugim riječima, iako istraživanja pokazuju da su psihološke posljedice genetskoga testiranja kratka vijeka, to ne znači da u kliničkim uvjetima, tj. u kontaktu s pojedincem, ne možemo očekivati i drukčije situacije. Osobitu pažnju valja posvetiti obiteljskim interakcijama te populaciji sadašnjih i budućih roditelja, jer su se najveći učinci genetskoga testiranja pokazali upravo na tim skupinama. U svakom slučaju, pažljiva procjena psihičkih karakteristika pojedinca omogućit će pravilnu primjenu osjetljivih medicinskih postupaka, pa i postupka genetskoga testiranja (Jokić-Begić i Arambašić, 2010).

ZABRINUTOST ZBOG IZGLEDA

U socijalnom okruženju koje cijeni ljepotu, osobe čija vanjšina je ozbiljno nagrđena izložena su stalnim i intenzivnim socijalnim stresovima. Izobličenja tijela, a poglavito lica, koja su često simptom u FSHD-u, utječu na : (i) doživljaj sebe (tzv. *self-image*); (ii) socijalnu prilagodbu.

Posljednjih 20-tak godina u okviru psihologije brojna istraživanja su se bavila utjecajem tjelesnog izgleda na brojne aspekte života pojedinca. Narušavanje tjelesnog izgleda nije trivijalan problem, ona sa sobom nosi brojne i ozbiljne posljedice na osobno psihičko zdravlje i kvalitetu života. Živimo u zapadnjačkoj kulturi koja tjelesnu ljepotu ističe kao vrijednost i poželjnost. Voditi računa o svome izgledu, truditi se izgledati lijepo i njegovano, kulturni je imperativ koji nam se nameće preko svih medija i u kojem odrastamo. Ne biti lijep vrlo često znači i biti odbačen. Brojna istraživanja su pokazala koliko vanjski izgled utječe na socijalne interakcije od najranije dobi. Primjerice, tjelesno atraktivne osobe će imati bolje izgleda tijekom studiranja, traženja posla, pa čak i kod uhićenja radi kaznenog djela - manja im je šansa da će biti optuženi nego "ružni" ljudi.

U FSHD-u bolest se najčešće pojavljuje u adolescenciji ili ranoj odrasloj dobi, dakle u razdoblju života u kojem izgled predstavlja vrlo važan aspekt svijesti o sebi. Objasnimo prvo što znači svijest o sebi i kako se ona formira. Slika o sebi je “kognitivna generalizacija o sebi, nastale na osnovu iskustva, koje organiziraju i vode obradu svake informacije koja se odnosi na samog pojedinca”. (Markus, 1977, u Lazarus 1979). Ona se može izazvati bilo kojim podražajem koji će našu pažnju usmjeriti na nas same, što uključuje odraz sebe u zrcalu, čuti vlastiti snimljen glas, udariti se u nešto ili neočekivano doživjeti neuspjeh u nečemu. Svijest o sebi je složena mentalna shema sebe samoga koja se odnosi na najrazličitije aspekte osobe: od izgleda (*body-image*), preko svijesti o vlastitim sposobnostima i aspektima ličnosti do vrlo specifičnih aspekata kao što je npr. sposobnost izvršavanja zadatak u okviru zadanih rokova, ili kompetencije za obavljanje nekih životnih zadataka. Čovjek nije svjestan “svega” o sebi u svakoj situaciji. U ovisnosti od podražaja, aktivirat će se oni dijelovi sheme o sebi koji su povezani sa znakovima u situaciji. Tako će pogled na svoj odraz u zrcalu izazvati aktiviranje svijesti o svom tjelesnom izgledu, a čitanje ovog teksta aktiviranje dijela svijesti o svojim sposobnostima shvaćanja sadržaja koji su izvan okvira vaše struke. Ako u situaciji nema istaknutog znaka, aktivirat će se oni aspekti pojma o sebi koji su povezani s onim o čemu ste razmišljali. Istraživanja su pokazala (Gibbons, 1990., u Adams, 1977) da “aktiviranje sheme o sebi neizbježno dovodi do samoprocjenjivanja”. Proces koji je započeo usmjeravanjem pažnje na sebe dovodi do preispitivanja, odnosno uspoređivanja aktivirane sheme o sebi sa standardom. U sklopu našeg pojma o sebi postoje dvije vrste “potencijalnog sebe”: ja kakav bi želio biti i ja kakav bih trebao biti. Ukoliko su ove tri slike sebe (dakle, ja kakav jesam, ja kakav bih želio biti i ja kakav bih trebao biti) u suglasju tada osoba osjeća zadovoljstvo. No, ako dođe do nesuglasja između ovih komponenti svijesti o sebi tada će se javiti negativne emocije kao što su anksioznost i depresivnost.

Na osnovu samovrednovanja se razvija samopoštovanje. Ukoliko su u ljudskom iskustvu češće pozitivne samoprocjene, tada će samopoštovanje biti više, i obrnuto. Za samopoštovanje nisu jednako važni svi aspekti sebe. Netko će visoko samopoštovanje graditi na tjelesnoj ljepoti, a netko drugi na visokim intelektualnim postignućima. Čemu ćemo dati prednost, ovisi o ranim iskustvima, te vrijednostima i ciljevima koje smo tijekom odgoja usvojili od roditelja, grupa kojima smo pripadali te društva u kojem živimo.

Svijest o sebi se razvija od najranije životne dobi i ovisi o socijalnom iskustvu. Naš osobni identitet određen je našim odnosima s drugim ljudima.

Razmotrimo što je sa “svijesti o sebi” i “samopoštovanju” kod osoba koje imaju vidljive tjelesne malformacije, kao što je kod osoba sa FSHD-om. U pojam o sebi je nužno ugrađena slika sebe kao osobe s bolešću, pri čemu se bolest može osjećati kao „nametnuta“ ili kao „kazna“ jer se javlja nakon razdoblja u kojem nije bilo znakova bolesti. Posljedice su anksioznost i depresivnost, što ima negativan utjecaj na samopouzdanje (*self-esteem*). Radi sniženog samopouzdanja i socijalne interakcije su rjeđe. Na taj se način umanjuju negativne reakcije okoline, ali se i umanjuje vjerojatnost da se ostvare dublje i toplije relacije koje bi imale blagotvoran utjecaj na samopoštovanje. Posebno su kritični slučajevi bolesti u kojoj se ona manifestira na licu, obzirom da se ne može prikriti. Obraćanje pažnje na lice druge osobe je instinktivno ponašanje i uočava se već kod novorođenčadi (utvrđeno je da dijete staro samo nekoliko dana duže zadržava pogled na ljudskom licu ili slici ljudskog lica, nego na bilo čemu drugome). I u odrasloj dobi facijalna ekspresija je osnova komunikacije - putem nje se iščitavaju tuđa raspoloženja, namjere, očekivanja kao i reakcije na nas same. Zbog važnosti koje lice ima u interakciji s drugima, svaka vidljiva promjena na vlastitom licu dovest će do osjećaja izloženosti, te mogućim osjećajima srama i gubitka. Znatiželjni pogledi, sažaljenje ili averzija koja se može iščitati iz tuđe facijalne ekspresije mogu dovesti do socijalne izolacije. Nisko samopoštovanje, depresija i anksioznost su osjećaji koji ozbiljno i trajno mogu narušiti kvalitetu života (čak i više nego tjelesni simptomi) i ugroziti psihičko i tjelesno zdravlje osobe. Tijekom tretmana oboljelog svakako treba obratiti pažnju na psihološku prilagodbu na bolest. Psihičke poteškoće se ne smiju banalizirati, i ukoliko se primijete svakako treba uključiti i stručnjaka psihijatra ili psihologa koji će naučiti osobu kako da se bolje prilagodi bolesti.

LITERATURA:

1. Adams GR. Physical attractiveness research: A developmental social psychology of beauty. *Hum Dev* 1977; 20: 217-239.
2. Jokić-Begić N, Arambašić L. Psihološki čimbenici povezani s genetskim testiranjem, *Društvena istraživanja* 2010; 3: 355-376.
3. Lazarus RS. Positive denial: the case for not facing reality. *Psychol Today* 1979;12: 44-60
4. Macgregor FC. *Transformation and identity*. New York, Quadrangle, New York Times Book, 1974.

5. Miró J, Raichle KA, Carter GT, O'Brien SA, Abresch RT, McDonald CM, Jensen MP. Biopsychosocial Factors on Chronic Pain in Persons With Myotonic and Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *Am J Hosp Palliat Care*. 2009 ; 26(4): 308–319.
6. Padua L, Aprile I, Frusciante R, Iannaccone E, Rossi M, Renna R, Messina S, Frasca G, Ricci E. Quality of life and pain in patients with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 40: 200–205, 2009
7. Vranješ D, Mitrović Z, Canki-Klain N, Bilić E, Jurenić D, Žagar M, Šoštarko M. Kliničke i elektromiografske značajke facioscapulohumeralne mišićne distrofije (FSH), *Neurologia Croatica* 2004; Suppl 3; 131-132.
8. Winter Y, Schepelmann K, Spottke AE, Claus D, Grothe C, Schröder R, Heuss D, Vielhaber S, Tackenberg S, Mylius V. Health-related quality of life in ALS, myasthenia gravis and facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Journal of Neurology* 2010; 257(3):1473-1481

PRIKAZI BOLESNIKA I RASPRAVA

Prikaz bolesnika iz obitelji oboljelih od facioskapulohumeralne mišićne distrofije

Sanja Kovačić¹ i Nina Canki-Klain²

¹Odjel neurologije, Opća bolnica Zabok, Zabok, Hrvatska

²Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga

UVOD

Facioskapulohumeralna mišićna distrofija (FSHD) je po učestalosti treća od genetskih mišićnih bolesti s približnom prevalencijom 1: 20 000. Nasljeđuje se na autosoman dominantan način. Premda uzročni gen još nije otkriven, poznato je da bolest uzrokuje smanjenje polimorfnog D4Z4 ponavljajućeg niza koji se nalazi na krajnjem dijelu dugog kraka kromosoma 4 (4q35) a koji prepoznaje sonda p13E-11 (1) i koji se nalazi na kromosomu 4 povezanim s haplotipom 4A161 (2).

Kliničku sliku karakterizira slabost mišića lica, sporo progresivan razvoj asimetrične slabosti najčešće mišića ramenog obruča, posebno onih koji podižu lopatice, te mišića nadlaktica, a potom zdjelice i peronealnih mišića. Ovaj se oblik bolesti javlja najčešće od 12. godine pa nadalje, kod oba spola. Sporo napreduje, s povremenim kratkim periodima brzog onesposobljenja mišića i njihove slabosti. Težina bolesti varira od vrlo blage do vrlo teške koja dovodi do gubitka autonomnog hoda. Životni vijek obično nije skraćen.

PRIKAZ BOLESNIKA

U ovom je radu prikazan pedeset dvogodišnji bolesnik s FSHD i njegova obitelj.

Obiteljska anamneza: Majka i otac nisu bili u srodstvu premda su potjecali iz istog kraja. Otac je radio u rudniku i umro od srčane slabosti u 50. godini. Roditelji navodno nisu imali nikakvih mišićnih tegoba. Bolesnik ima dva brata od kojih jedan nosi slušni aparat od 19. god. te dvije sestre. Jednoj od njih, tri godine starijoj od bolesnika potvrđena je molekularno FSHD

u dobi od 43 god. Bolesnik je imao nedavno preminulu suprugu koja je bolovala od neurofibromatoze tip 1. Sin ima 25 godina i prema pričanju oca nema kliničkih znakova bolesti kao ni kćer koja ima 20 godina. Sin bolesnika ima kćer u dobi od 5 godina koja nije pregledana, ali je po opisu djeda zdrava.

Osobna anamneza: Po pričanju je uvijek bio zdrav. Nije imao nikakav operativni zahvat koji bi zahtijevao opću narkozu.

Sadašnja bolest: Sadašnja bolest je započela već u 14. godini. Od 14-15. godine je primjećivao pri igranju nogometa da ne može trčati kao drugi dječaci i često je padao pri hodu. Primijetio je da mu strše lopatice i da sve teže može držati ruke iznad glave. Pri novačenju je osposobljen, ali je u Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu postavljena dijagnoza mišićne distrofije. U dobi od 24 godine napravljen je bio detaljan neurološki i EMG pregled i postavljena dijagnoza „progresivne mišićne distrofije pojasnog descendentnog tipa u fazi kad je uz rameni pojas koji je najviše zahvaćen, došlo do zahvaćanja lica i zdjelice i pojasa“. Bolesniku je savjetovano rehabilitacijsko liječenje barem jednom godišnje. Obzirom na relativno benignan tok bolesti te očuvanost mišića podlaktica, šaka i prstiju, savjetovalo se da se bolesniku osigura radno mjesto u sjedećem položaju. Ne uzima trajne terapije. Alergije na lijekove negira.

Klinički nalaz: Bolesnik je samostalno pokretan, no potpuno je ovisan o tuđoj pomoći pri obavljanju svakodnevnih radnji (oblačenje, osobna higijena, teško jede žlicom i sl.). Ne može ustati iz čučnja niti iz stolice, ne može hodati niti uz niti niza stuba. Slabije čuje na desno uho. Povremeno ima „palpitacije“, no zadnjih više od 10 godina nije neurološki obrađivan. Bolesnik ima slabije artikuliran govor uslijed slabosti mimične muskulature koja je jače izražena desno. Elevacija ruku je moguća samo do razine trbuha. Ne izvodi fleksiju i ekstenziju u laktu obostrano. Pronacija je moguća, ali ne izvodi supinaciju. Može stati na prste, ali ne na pete. Hod uz geganje. Dominira slabost mišića ramenog obruča, osobito podizača lopatica. Najizraženija hipotrofija mišića lopatica obostrano, oba ramena i obje nadlaktice, nešto manje mišića zdjelice i peronealnih mišića, više lijevo. MTR ne izazivam. Vidi se blaga torakolumbalna lordoza.

RASPRAVA

Veliki broj osoba sa invaliditetom živi u klimi diskriminacije, predrasuda, neznanja, s često nezadovoljenim elementarnim potrebama. Također sve teža gospodarska situacija u našoj zemlji koja je sa sobom donijela porast nezaposlenosti i male plaće, problemi su s kojima se susreće sve veći broj građana, posebice osoba s invaliditetom. Iz razgovora s bolesnikom i

njegovom suprugom stječe se dojam negacije bolesti u sina i od strane oca i sina radi moguće diskriminacije, odnosno straha od gubitka posla. Kategorička tvrdnja bolesnika neurologu da ima zdravog sina, kćer i zdravu unuku nužno nameće brojne etičke dileme liječniku praktičaru koji nije educiran za genetsko savjetovanje. Genetsko savjetovanje je proces, a ne čin, što znači da je u više navrata bolesniku i njegovoj obitelji potrebno dati iscrpnu informaciju o tijeku, mogućim komplikacijama i sadašnjim mogućnostima liječenja bolesti, što će motivirati bolesnika. Isto tako, bolesnik treba znati da li ima rizik za bolesno dijete i kakve su mogućnosti izbora. Za to je neophodan uvjet stvoriti povjerenje između liječnika i obitelji. Postoje principi kojih se treba držati: pravo bolesnika da zna za svoju bolest kao i pravo da to ne zna, ukoliko ne želi. Genetsko savjetovanje bi trebalo biti ne direktivna informacija, a ne savjet što bi bolesnik trebao ili ne učiniti. Ukoliko liječnik osjeća teškoće u kontaktu s bolesnikom koji ima genetsku bolest, bilo bi najbolje da ga uputi u genetsko savjetovalište.

ZAKLJUČAK

Na temelju poznavanja sestre i sina bolesnika kod kojih je u dobi od 43 i 13 god. postavljena sumnja na FSHD koja je potvrđena u Parizu u laboratoriju prof. J-C.Kaplana, anamnestičkog podatka o slabosti sluha brata te karakteristične kliničke slike i tijeka bolesti bolesnika, može se sa sigurnošću tvrditi da bolesnik ima FSHD. Molekularna potvrda dijagnoze nije potrebna. Bolesniku su preporučeni pregled sluha i procjena plućne funkcije, rehabilitacijsko liječenje te po potrebi pregled kod okulista i po potrebi FAG. Nažalost, bolesnik je zainteresiran jedino za ocjenu radne sposobnosti

LITERATURA

1. Wijmenga C, Frantz RR, Brouwer OF et al. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. *Lancet* 1990; 336:651-653.
2. Lemmers RJ, Wohlgemuth M, van der Gaag KJ, van der Vliet PJ, van Teijlingen CM, de Knijff P, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 884-94.

GENETSKO SAVJETOVANJE, GENETSKO TESTIRANJE I PRENATALNA DIJAGNOSTIKA FSHD

Nina CANKI-KLAIN

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatski institut za istraživanje mozga

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. Tako točna dijagnoza FSHD omogućuje određivanje potencijalnih rizičnih osoba na osnovi autosomnog dominantnog načina nasljeđivanja. Osim poznavanja načina nasljeđivanja, potrebno je voditi računa i o nekim drugim fenomenima poput penetrantnosti gena, varijabilnosti kliničke slike unutar iste i različitih obitelji te posebno učestalosti de novo nastalih mutacija (10-30%), somatskom i germinalnom mozaiku.

U slučaju FSHD 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

Koliko je za sada poznato, biopsija mišića je beskorisna u bolesnika s klasičnom FSHD slikom i obiteljskom anamnezom, budući da je histološki nalaz nespecifičan, imunohistokemija ne dolazi u obzir, a molekulska analiza iz krvi može u najmanje 95% bolesnika potvrditi ili isključiti dijagnozu. U slučaju negativnog molekuskog nalaza treba učiniti detaljnu analizu mišića o čemu je već bilo govora.

Testiranje potencijalno rizičnih asimptomatskih odraslih osoba je moguće. Međutim potrebno je voditi računa o psihološkim posljedicama pozitivne dijagnoze na zdravu osobu. Osim toga, usprkos razvoju molekularne dijagnostike, težinu i vrijeme pojavljivanja kliničkih simptoma nije moguće sa sigurnošću predvidjeti. To isto vrijedi za asimptomatske osobe kao i za testirane fetuse.

Procjena rizika

Procjena rizika u slučaju FSHD nije teška pod pretpostavkom da je dijagnoza točna

Procjena se osniva na određivanju egzaktne dijagnoze na osnovi kliničke slike, obiteljskih podataka i /ili molekularne analize

Roditelji probanda- Većina bolesnika s FSHD ima roditelja s kliničkim simptomima FSHD i jedan D4Z4 alel sa skraćanjem (70%-90% osoba s FSHD). Ipak u približno 10-30% propozitusa s FSHD bolest nastaje uslijed de novo nastalog skraćanja D4Z4 područja alela A4161. Zbog toga bi bilo korisno ispitati bolesnikove roditelje klinički i molekularnim genetskim testiranjem. Pregledom je moguće ustanoviti, da je jedan od roditelja bolestan, ali

da blaga klinička slika ili nedovoljno poznavanje bolesti nisu omogućili prepoznavanje dijagnoze u roditelja. Zbog toga nije moguće tvrditi, da se radi o negativnoj obiteljskoj anamnezi prije nego što se učini primjereno ispitivanje bliskih članova obitelji bolesnika.

Potrebno je imati na umu da obiteljska povijest bolesti može izgledati „negativna“ jer se nije prepoznalo bolest u članovima obitelji, zbog asimptomatskog roditelja čija se delecija nalazi subtelomerno od lokusa D4Z4 s kojim se hibridizira sonda (te je zbog toga sonda negativna), rane smrti roditelja prije pojave simptoma ili kasnog početka bolesti u bolesnog roditelja. Ako je mutacija nastala u roditelja tada je moguće da majka ili otac ima somatski mozaik za mutaciju te može biti blago ili minimalno zahvaćen bolešću..

Propozitusova braća i sestre -Rizik za braću i sestre propozitusa ovisi o genetskom statusu roditelja. Ako je jedan od roditelja bolestan, rizik za braću i sestre da naslijede skraćenu mutaciju D4Z4 iznosi 50%.

Kada niti jedan od roditelja nema skraćenje D4Z4, rizik za braću propozitusa izgleda mali. Ako niti jedan propozitusov roditelj nema prepoznatljivo D4Z4 smanjenje, tada postoje dvije mogućnosti:

1.Germinalni mozaik u jednog od roditelja ili 2.de novo nastalo skraćenje D4Z4 u propozitusa. Potrebno je naglasiti da učestalost mozaika u spolnim stanicama nije poznata.

Potomci probanda- Svaki potomak bolesnika ima 50% rizik da naslijedi mutaciju koju predstavlja skraćenje D4Z4

Drugi članovi obitelji probanda- Rizik za druge članove obitelji ovisi o statusu probandovih roditelja. Ako je jedan od roditelja bolestan ili samo ima skraćenje D4Z4, tada on i njegova obitelj imaju rizik.

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.

Prediktivna medicina

Osnova prediktivnog testiranja leži u činjenici da bilo kakva promjena otkrivena u DNK ostaje u pravilu nepromijenjena od začeća do smrti bez obzira na prisutnost ili odsutnost kliničkih simptoma, omogućuje da se prije pojave simptoma predvidi 10-30 godina ili čak više, da li će neka zdrava osoba razviti specifičnu bolest. Dob pri nastanku kao i težina bolesti mogu pokazivati korelaciju s veličinom i prirodom genetske mutacije. Ipak u većini slučajeva ne postoji pouzdan prognostički pokazatelj za neku osobu.

Prediktivna medicina se osniva na otkrivanju gena čije bi poznavanje trebalo pomoći da se spriječi pojava bolesti. Etičke dileme su ogromne, naročito kada se radi o genima teških

smrtonosnih bolesti koje se javljaju tek u odraslo životno doba i za koje ne postoji nikakvo liječenje

Problemi oko obavještene privole pri presimptomatskom testiranju

1. Upućivanje na testiranje bez privole
2. Testiranje djece i maloljetnika
3. Upućivanje na testiranje pod pritiskom "sa strane"

PLANIRANJE OBITELJI I PRENATALNA DIJAGNOSTIKA FSHD

Najpogodnije vrijeme za određivanje genetskog rizika i razgovor o dostupnosti prenatalnog testiranja predstavlja vrijeme prije trudnoće. Isto tako bi bilo primjereno kada bi rizični asimptomatski članovi obitelji, koji su u prokreativnoj dobi, donijeli odluku o testiranju prije trudnoće. Mladim bolesnicima ili rizičnim osobama je potrebno pružiti genetsko savjetovanje uključujući mogući rizik za potomstvo kao i mogućnosti izbora (donatorstvo sperme ili jajašaca, adopcija, trajna kontracepcija, usvajanje itd). Isto tako je korisno upoznati zainteresirane s informacijama dostupnim na internetu:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1443/>

<http://www.fshsociety.org/pages/about.html>

<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/consult.pdf>.

Prenatalno molekularno testiranje je moguće ukoliko postoji 50% rizik. Prije analize je potrebno poznavati skraćenje mutacije D4Z4 bolesnog roditelja. Analiza se radi iz DNA. Obično se upotrebljavaju stanice ploda dobivene amniocentezom između 15. i 18. tj. trudnoće ili korionske resice uzete oko 12. tj. trudnoće.

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.
5. Falek A. Use of the coping process to achieve psychological homeostasis in genetic conditions. In: Lubs HA, de la Cruz F eds. Genetic Counseling. New York: Raven Press, 1977:179-191. rezultata i pomoć (medicinska, psihološka, socijalna)



Supporting Online Material for

A Unifying Genetic Model for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy

Richard J. L. F. Lemmers, Patrick J. van der Vliet, Rinse Klooster, Sabrina Sacconi,
Pilar Camaño, Johannes G. Dauwerse, Lauren Snider, Kirsten R. Straasheijm,
Gert Jan van Ommen, George W. Padberg, Daniel G. Miller, Stephen J. Tapscott, Rabi Tawil,
Rune R. Frants, Silvère M. van der Maarel*

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: maarel@lumc.nl

Published 19 August 2010 on *Science Express*
DOI: 10.1126/science.1189044

This PDF file includes:

Materials and Methods

Figs. S1 to S8

References

Materials and Methods

Control Individuals and Patients with FSHD

Proximal and distal region sequences from the D4Z4 repeat array were generated from control individuals and patients with FSHD that were selected from our collection of >3000 individuals and from Hapmap samples (*S1,S2*). The FSHD-affected families (F1-F8) were ascertained via Neuromuscular Centers worldwide. All individuals have been genotyped in detail by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and all markers in the D4Z4 locus that have been described previously. Blood from all individuals was collected after informed consent was obtained.

Somatic Cell Hybrids and DNA Clones

Some sequences of the D4Z4 locus were generated from monoallelic sources. FSHD chromosome sequences were obtained from monochromosomal rodent somatic cell hybrids HHW1494 (4A161) and SU10 (4A161) (gift from S. Winokur, Irvine, CA) and phage clones λ 42 (4A161), λ 68 (4A161L), and λ 260201 (4A161) (*S3*). As chromosome 4qB sources, we used the monochromosomal rodent somatic cell hybrids GM11687 (4B168) (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ), 4L-10 (4B163) (gift from E. Stanbridge, Irvine, CA), and HHW416 (4B163) (gift from M. Altherr, Los Alamos, NM). Chromosome 10A166 sequences were generated from cosmid C85 (*S3*) and the monochromosomal rodent somatic cell hybrids 726-8a (U.K. Human Genome Mapping Project Resource Center) and GM11688 (Coriell Cell Repositories).

Clinical description FSHD families

F1

The proband presented at age 28 with right arm weakness. He was, however, aware of shoulder weakness since age 18. Examination showed mild asymmetric facial weakness, asymmetrical shoulder muscle weakness and atrophy and abdominal muscle weakness.

His 62 year old father, noted shoulder muscle weakness since age 16, and pelvic girdle weakness since age 30. He was diagnosed as FSHD on clinical grounds. His parents, four brothers, two sisters and one daughter were reportedly unaffected. Examination showed mild asymmetric shoulder girdle weakness (Shoulder abduction: Right 110°, Left 80°), severe pelvic girdle and hamstrings weakness, and Right tibialis anterior paralysis and Left paresis.

F2

The proband, a 61-year-old woman, noticed right foot dorsiflexor weakness at age 17. At age of 20, she noticed difficulty lifting her arms above shoulder level.

Presently, she can walk small distances but is otherwise wheelchair dependent. Examination shows very mild orbicularis oculi weakness and moderate orbicularis oris weakness. She has bilateral scapular winging with severe biceps and triceps weakness, moderate wrist extension weakness, moderate to severe hip girdle weakness and bilateral foot drop.

Her 32 year old son had onset of foot dorsiflexor weakness at age 18 followed by shoulder girdle weakness at age 20. Examination showed moderate facial weakness,

and bilateral scapular winging. He had mild triceps and finger extension weakness in the upper extremities and normal lower extremity strength except asymmetric tibialis anterior weakness.

F3

The proband, a 47 years-old woman, developed progressive facial and shoulder girdle muscle weakness starting at age 15. At age 45, she noticed difficulty in walking and climbing stairs and was diagnosed clinically with FSHD. Her 26 years-old older daughter had asymmetric facial and shoulder girdle involvement (R. arm abduction 80°, L. arm 70°) and right foot dorsiflexor weakness highly evocative of FSHD.

F4

The proband was noted to have dysarthria and facial weakness at age two. Examination at age 5, showed severe facial weakness, scapular winging, as well as abdominal, quadriceps and hamstring weakness.

His father, aged 37 has right facial weakness since childhood. Examination showed facial weakness as well as right scapular winging with shoulder girdle weakness, asymmetric pectoralis major atrophy and abdominal muscle weakness.

F5

This family is an example of a FSHD family in which the deletion of D4Z4 extends proximally and was described in Lemmers *et al.* (54).

F6

Family F6 consists of a deceased affected father who has six children, of whom four sons are affected and have been examined. Two children and fourteen grandchildren have not been examined. The proband (66 years old) reported a drop-foot at the age of 18 and was noted to have facial and shoulder muscle weakness on clinical examination. He became aware of significant upper-arm weakness at the age of 45 and pelvic girdle weakness at 50 years and noticed a weak handgrip at 62 years when he started wearing foot-ankle orthoses. Although the four brothers differed in age by 8 years, they all had a comparable clinical condition on a recent physical examination.

F7

Family F7 has been reported before (Rf207 in *S5*). The proband had mild facial weakness, moderate shoulder girdle weakness and mild foot-extensor weakness when he was examined for the first time at the age of 49. Her eldest daughter had mild facial, shoulder and foot-extensor weakness in addition to Klippel-Trenaunay-Weber syndrome. Her sister had mild facial and shoulder girdle weakness. The proband's brother (55 years) complained of inability to run, what he related to low back pain. His oldest son (29 years) had mild shoulder weakness, another son (321; 20 years) had asymmetrical facial weakness, and one daughter (324; 18 years) had mild facial and shoulder-girdle weakness.

F8

The proband, aged 64 had symptom onset at age 25 with proximal leg weakness. Exam shows facial weakness, scapular winging, mild biceps and hip flexion weakness, and asymmetric tibialis anterior weakness. Her twin daughters have FSHD. In one, symptom onset was at age 30 with difficulty raising her right arm. Examination at age 45, shows facial weakness, scapular winging, severe biceps weakness and asymmetric wrist extension weakness, and mild quadriceps tibialis anterior weakness as well as abdominal muscle weakness. Her twin sister dates her symptoms to age 18 with difficulty lifting her arm. Exam at age 45 shows facial weakness, scapular winging, severe biceps weakness, mild triceps weakness, mild hip girdle, tibialis anterior and abdominal weakness.

Detailed genotyping D4Z4 locus

For the genotyping high quality DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes. The genotyping (chromosomal variation) was based on the chromosomal location (chromosome 4q or 10q), the SSLP variation, the array size and composition (sensitivity to restriction enzymes *BlnI* and *XapI*) of the D4Z4 repeat array and on the distal variation A and B (1). In short, restriction enzyme digested genomic DNA was separated by PFGE and after Southern blotting analyzed with different radioactive labelled DNA probes. The SSLP size variation was determined by PCR. All methods have been described previously and can be found on the Fields Center Website (www.fieldscenter.org).

Sequence analysis of the proximal D4Z4 sequence (D4F104S1-D4Z4 region) and distal D4Z4 sequence (D4Z4 and pLAM or D4Z4 and 4qB)

All primers for proximal and distal D4Z4 PCR were designed using Primer3 software and optimal PCR results were obtained when using high quality plug DNA prepared for PFGE analysis (1) that was, after equilibration in TE⁻⁴, dissolved in TE⁻⁴ to a final DNA concentration of 25 ng/uL.

The sequence of the D4F104S1-D4Z4 region (Fig. 1B; A, A-L and B chromosomes, nucleotides 4309-7854 in Genbank accession number AF117653) of different chromosomes was determined with either forward primer 5'-CTG GGA GTT GGG CAT TTT CTc ATT AGC-3' or forward primer 5'-CTG GGA GTT GGG CAT TTT CTg ATT AGC-3' in combination with reverse primer 5'-GGC GGT CTG GGA TCC GGT GA-3'. To enable a PCR reaction that was specifically amplifying a single chromosome 4q we selected individuals that carry the chromosome of interest in combination with a hybrid chromosome 4. Hybrid chromosomes 4 (with normal-sized D4Z4 array) can be found in about 10% of the population. In these individuals all undesirable chromosomes (homologous 4q and 10q) can be eliminated from PCR amplification by a preceding *BlnI* digestion in which the *BlnI* restriction site is exclusively absent from the chromosome of interest. In addition some D4F104S1-D4Z4 sequences were determined in the somatic cell hybrids and DNA clones described above. The PCR reaction was performed on 100 ng of genomic DNA with 1.5 uL GC-dNTPs (0.5 mM dATP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dTTP, 0.3 mM dGTP and 0.2 mM 7-deaza-dGTP), 0.4 U of Phusion F530-L DNA polymerase and supplemented GC buffer, in a total volume of 25 µl. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 98°C

for 3 min., followed by 39 cycles of denaturation at 98°C for 25 s, annealing at 68°C for 20 s, and extension at 72°C for 3 min. The final extension time was 6 min. at 72°C. To determine the sequence consensus for chromosomes 4A161, 4A161L, 4B163, 4B168 and 10A166 at least 3 independent chromosomes of each variant were sequenced.

To obtain D4Z4-pLAM sequences for different 4q and 10q chromosomes we analyzed individuals that carry different combinations of A and B chromosomes. For example, we selected an individual with one 4qA, one 4qB and two *BlnI* sensitive 10q chromosomes and used A-specific reverse primers in combination a *BlnI* digestion prior to the PCR amplification to specifically amplify the 4qA chromosome. The same primers were used to amplify different 10q chromosomes in individuals with two 4qB chromosomes. To amplify the D4Z4-pLAM sequence of 4qA and 10q chromosomes (Fig. 1B, nucleotides 4580-8195 in Genbank accession number FJ439133) we used forward primer 5'-AGC GTT CCA GGC GGG AGG GAA G-3' and either reverse primer 5'-CAG GGG ATA TTG TGA CAT ATC TCT GCA CTC ATC-3' (for 4qA and 10A176 chromosomes), or reverse primer 5'-TGG AGT TCT GAA ACA CAT CTG CAC TGA-3' (for 10A166 chromosomes). For the amplification of 4qB chromosomes (Fig. 1B, nucleotides 4988-7695 in Genbank accession number FJ439133 combined with nucleotides 0-1047 in AF017466) we used forward primer 5'-CGC GGT TCA CAG ACC GCA CAT C-3' and a 4qB specific reverse primer 5'-GCC CGG CAC ACA TGT TTG TCT CCT T-3'. Finally, the D4Z4-pLAM sequences from 4A161L chromosomes and from the complex F4 chromosome (Fig. 1B, nucleotides 6188-7506 in Genbank accession number FJ439133 combined with nucleotides 0-

2221 in U74497) were determined with forward primer 5'-AGC CCA GGG TCC AGA TTT GGT TTC AG-3' and reverse primer 5'-CAG GGG ATA TTG TGA CAT ATC TCT GCA CTC ATC-3'. All PCR reactions were performed on 100 ng of genomic DNA, in a solution containing 1.5 μ L GC-dNTPs (0.5 mM dATP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dTTP, 0.3 mM dGTP and 0.2 mM 7-deaza-dGTP, 2.5 U of LA-Taq DNA polymerase and supplemented with 2xGC buffer (TAKARA), with a total volume of 25 μ L. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 94°C for 1 min., followed by 34 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 68°C for 30 s, and extension at 72°C for 3 min. The final extension time was 10 min. at 72°C. To determine the sequence consensus for chromosomes 4A161, 4A161L, 4B163, 4B168, 10A166 and 10A176T at least 3 independent chromosomes for each variant were sequenced.

Site directed mutagenesis poly(A) signals

Site directed mutagenesis of the poly(A) signals (PAS) were performed using PCR and mismatched primers. For the construction of the 10A166 mutated PAS on the 4A161 construct (generation 4A161b^{10mPAS}) PCR products were created with forward primer 5'-GCT GGA AGC ACC CCT CAG CGA GGA A-3' and PAS¹⁰ reverse primer 5'-GGA TCC ACA GGG AGG GGG AAT TTT GAT ATA TCT CTG AAC TAA TC-3' (fragment 1) and with PAS¹⁰ forward primer 5'-GAT TAG TTC AGA GAT ATA TCA AAA TTC CCC CTC CCT GTG GAT CC-3' and M13-Reverse Primer (fragment 2). Similarly, for the construction of the 4A161 PAS on the 10A166 and 10A176T construct (generation 10A166b^{4PAS} and 10A176T^{4PAS}) PCR products were created with forward primer 5'-GCT GGA AGC ACC CCT CAG CGA GGA A-3' and with PAS⁴

reverse primer 5'-GGA TCC ACA GGG AGG GGG CAT TTT AAT ATA TCT CTG AAC TAA TC-3' (fragment 1) and with PAS⁴ forward primer 5'-GAT TAG TTC AGA GAT ATA TTA AAA TGC CCC CTC CCT GTG GAT CC-3' and M13-Reverse Primer (fragment 2). After gel purification PCR fragments 1 and 2 were mixed and amplified with forward primer 5'-GCT GGA AGC ACC CCT CAG CGA GGA A-3' and M13-Reverse primer creating a 1 kb D4Z4-pLAM-pCR2.1 fragment. The PCR reaction was performed on 100 ng of plasmid DNA with 3 uL dNTPs (2 mM), 0.4 U of Phusion F530-L DNA polymerase and supplemented GC buffer (fragment1) or HF buffer (fragment 2), in a total volume of 30 µl. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 98°C for 3 min., followed by 20 cycles of denaturation at 98°C for 25 s, annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 45 s (fragment 1 and 1 kb D4Z4-pLAM-pCR2.1 fragment) or 15 s (fragment 2). The final extension time was 10 min. at 72°C. Finally, with a *KpnI* digestion the original Poly(A) signals were replaced by the mutated ones. All constructs were sequence-verified.

Cloning of proximal and distal D4Z4 sequences.

Proximal and distal D4Z4 fragments were cloned in either the TOPO blunt-II (for Phusion amplified fragments) or in the TOPO TA pCR2.1 (for LA-Taq amplified fragments) vector and subsequently these vectors were transfected into NEB 5-alpha F'I^q Competent *E. coli* cells (New England Biolabs).

Transfection distal D4Z4 constructs to C2C12 cells

C2C12 mouse muscle cells were cultured in DMEM supplemented with 20% fetal bovine serum, 4 mM L-glutamine, 4.5 g/L glucose and 1% penicillin-streptomycin in an incubator with 10% CO₂ atmosphere at 37°C. For transfection 8x10⁴ cells were seeded in each well of a 6-well cell culture plate (Nunc) and grown for 24 hours prior to transfection. To monitor the transfection efficiency D4Z4 plasmids were co-transfected with pEGFP-C1 plasmids. For each construct 2 ug of D4Z4 plasmid DNA was mixed with 2 ug of pEGFP-C1 plasmid DNA after which 365 µl sera-free DMEM was added and 9 µl Plus reagent (Invitrogen). The DNA-Plus Reagent mixture was incubated for 15 minutes at room temperature. Meanwhile 365 µl sera-free DMEM was prepared with 9 µl Lipofectamine reagent (Invitrogen). Then, DNA-Plus reagent mixture and Lipofectamine reagent were combined and incubated for 15 minutes at room temperature to subsequently replace the C2C12 medium for 1 hour in an incubator at 37°C. Afterwards, transfection medium was replaced by 2 mL fresh C2C12 medium and after 24 hour incubation cells were harvested.

Quantification of DUX4 mRNA levels using real-time RT-PCR

Total RNA was extracted using the Macherey Nagel total RNA isolation kit with DnaseI treatment. The RNA concentration was determined on a ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) and the quality was analyzed with a RNA 6000 nanochip on an Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies Netherlands BV, Amstelveen, The Netherlands). cDNA was synthesized from 0,5 µg of total RNA using random hexamer primers (Fermentas, St Leon-Rot, Germany) and the RevertAid H Minus M-MuLV First Strand Kit

(Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. After the cDNA reaction 30 μ L of water was added to an end volume of 50 μ L. The mRNA levels were measured by real-time PCR using a SYBR Green QPCR master mix kit (Stratagene) on a MyiQ (Biorad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands) running an initial denaturation step at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 45 s at 62°C. The ratio between PAS and DAS primer set were determined by forward primer 5'-CCC AGG TAC CAG CAG ACC-3' and reverse primers 5'-TCC AGG AGA TGT AAC TCT AAT CCA-3' (PAS) or 5'-TGA TCA CAC AAA AGA TGC AAA TC-3' (DAS). All the primers used for real-time PCR were designed using Primer 3 software. To ensure that residual genomic DNA was not being amplified, control experiments were performed in which reverse transcriptase was omitted during cDNA synthesis. Amplification efficiencies were determined from standard curves generated by serial dilution of plasmid DNA.

Northern blot analysis

For the Northern blot analysis of the D4Z4 transcript the previously described C2C12 transfection was scaled up to two 10-cm-diameter Petri dishes per D4Z4 construct. Total RNA was extracted using the Macherey Nagel total RNA isolation kit with *DnaseI* treatment. For each lane 10 μ g total RNA was separated on a 0.8% agarose gel containing 10% formaldehyde and blotted onto Hybond XL (GE healthcare Life Science). Hybridizations were performed in a formamide hybridization mix (*S6*) for 16 h at 50°C using a ³²P labelled a D4Z4 probe that covers the 300 bp homeobox region of D4Z4 (D4Z4-HD). As control, the transfection

efficiency for the different conditions was analyzed by hybridization with a GFP probe. Probe labelling was performed using the Megaprime labeling kit (GE healthcare Life Science) according to the manufacturer's protocol. The blots were washed at 65°C and to a stringency of 2× SSC and 0.1% SDS. The radioactivity on the membranes was visualized by phosphor imaging on a Storm 840 Phosphor Imaging System (Molecular Dynamics).

DUX4 expression analysis in primary myotubes

Myoblasts were isolated from a needle muscle biopsy sample of the Vastus Lateralis as described before (S7). After pre-plating, myoblasts were cultured in F-10 Nutrient medium (Gibco Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.), 20% FCS, 100U/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin, 4pg/ml bFGF and 1µM hexamethazone, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C.

Myotubes were obtained by growing the myoblasts at 70% confluency on differentiation media (DMEM (+glucose, +L-glutamin, +pyruvate), 2% horse serum) for 6 days. Total RNA isolation, cDNA preparation and real-time PCR were performed as described in the previous sections All samples were run in duplo. All PCR products were analyzed for specificity by melting curve analysis and on a 2% agarose gel. The results of the quantitative RT-PCR were analyzed and quantified using iQ5 optical system software version 2.0 (Biorad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands). All expression levels were calculated using GAPDH (primers hGAPDHFw 5'-AGC ACA TCG CTC AGA CAC-3' and hGAPDHRev 5'-GCC CAA TAC GAC CAA ATC C-3') as constitutively expressed standard for cDNA input, and the relative

steady-state RNA levels of the DUX4 gene (forward primer 5'-CCC AGG TAC CAG CAG ACC-3' and reverse primers 5'-TCC AGG AGA TGT AAC TCT AAT CCA-3' (PAS)) were calculated by the method of Pfaffl (58).

3' RACE

The polyadenylation site was identified by 3' RACE using the GeneRacer kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Total RNA (1 µg) from C2C12 transfected cells was treated with amplification grade *DNase* I followed by clean-up on RNeasy column (Invitrogen). Reverse transcription was performed using the GeneRaceroligoT primer and Superscript III, followed by treatment with *RNase* H. *DUX4* transcripts were amplified by nested PCR using forward primers LS 182 5'-CAC TCC CCT GCG GCC TGC TGC TGG ATG A-3' then 1A 5'-GAG CTC CTG GCG AGC CCG GAG TTT CTG-3' combined with the GeneRacer 3' primer and then GeneRacer 3' nested primer. PCR conditions were 95°C denaturation for 30 seconds, 62°C annealing for 30 seconds and 68°C extension for 1 minute. Primary and nested reactions were each 35 cycles.

In silico prediction of poly(A) signals

For the in silico prediction of poly(A) signals we use the online available tools DNAFSminer (<http://dnafsminer.bic.nus.edu.sg/>) and PolyApred (<http://www.imtech.res.in/raghava/polyapred/>). We used accession numbers FJ439133 (4A161) and AL732375 (10A166).

References

- S1. R. J. Lemmers *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 884-894 (2007).
- S2. R. J. Lemmers *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, **86**, 364-377 (2010).
- S3. J. C. van Deutekom *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **2**, 2037-2042 (1993).
- S4. R. J. Lemmers *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1207-1214 (1998).
- S5. R. J. Lemmers *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 1124-1130 (2004).
- S6. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- S7. R. Klooster *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 1615-1624 (2009).
- S8. M.W. Pfaffl, *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).

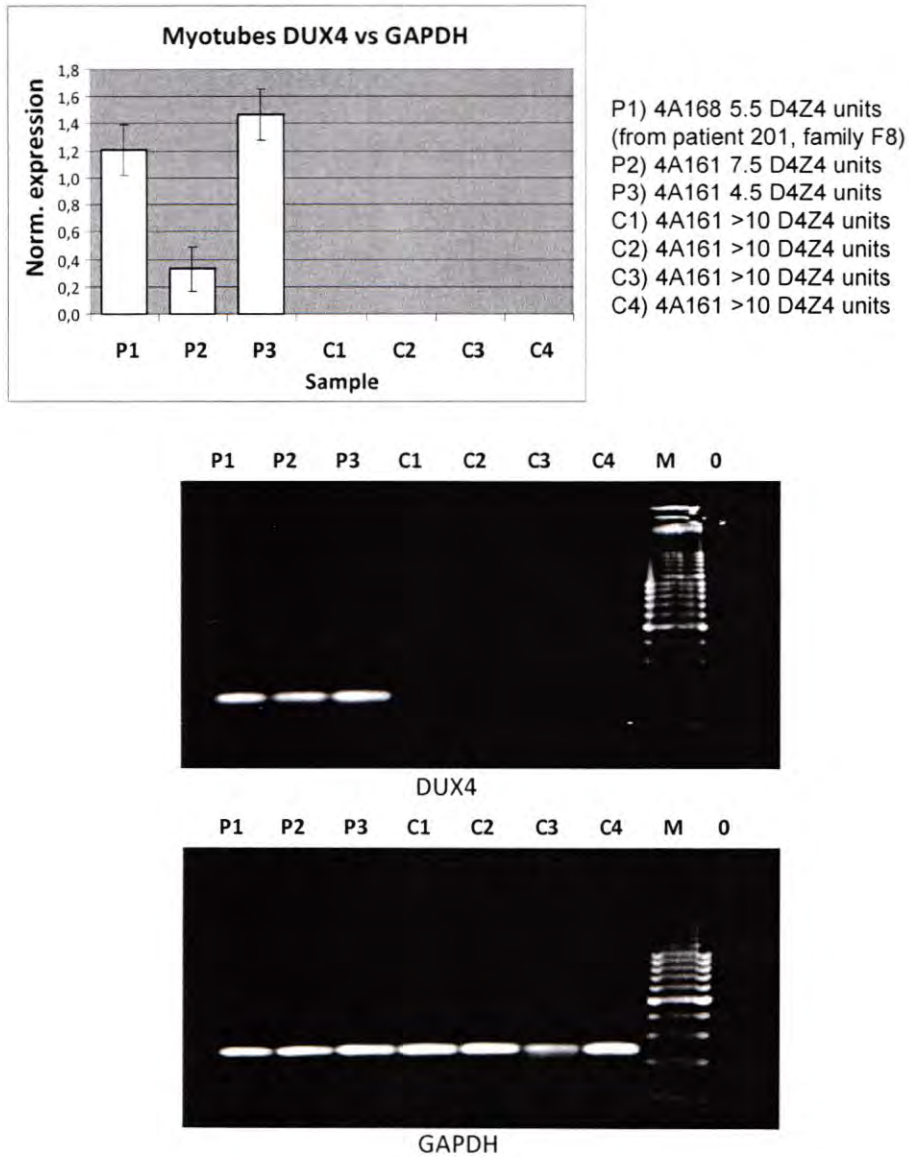


Fig S1: Expression analysis of the distal *DUX4* transcript in primary myotubes.

Primary myoblast cultures of FSHD1 patients (P1-P3) and controls (C1-C4) were allowed to differentiate for 6 days and RNA was tested for the expression of the distal *DUX4* transcript by quantitative RT-PCR. Only in FSHD1 myotubes, *DUX4* could be detected. Upper panel: bar diagram of *DUX4* expression levels relative to *GAPDH*. Lower panels: agarose gels of end-point RT-PCR products. Key: sizes and chromosome variants of the relevant D4Z4 repeats.

Fig. S2. Sequence variants identified at the proximal and distal end of the D4Z4 repeat on permissive and non-permissive chromosomes. Upper panel shows sequence variants identified in the proximal and lower panel in the distal region of the major chromosomes (black nucleotides in white boxes indicate the 4A161 sequence, white nucleotides in black boxes indicates sequence variation with respect to 4A161). White chromosomes are permissive to FSHD (P) black chromosomes are non-permissive (NP). The exons (ex1, ex2 and ex3) of *DUX4* are indicated as well as the position of the poly(A) signal (PAS) and the open reading frame (ORF). All sequences are deposited in to Genbank under accession numbers HM101229, HM101230, HM101231, HM101232, HM101233, HM101234, HM101235, HM101240, HM101241, HM101242, HM101243, HM101244, HM101245, HM101246, HM101247, HM101248, HM101249, HM101250, HM101251 and HM190160, HM190161, HM190162, HM190163, HM190164, HM190165, HM190166, HM190167, HM190168, HM190169, HM190170, HM190171, HM190172, HM190173, HM190174, HM190175, HM190176, HM190177, HM190178, HM190179, HM190180, HM190181, HM190182, HM190183, HM190186, HM190187, HM190188, HM190189, HM190190, HM190191.

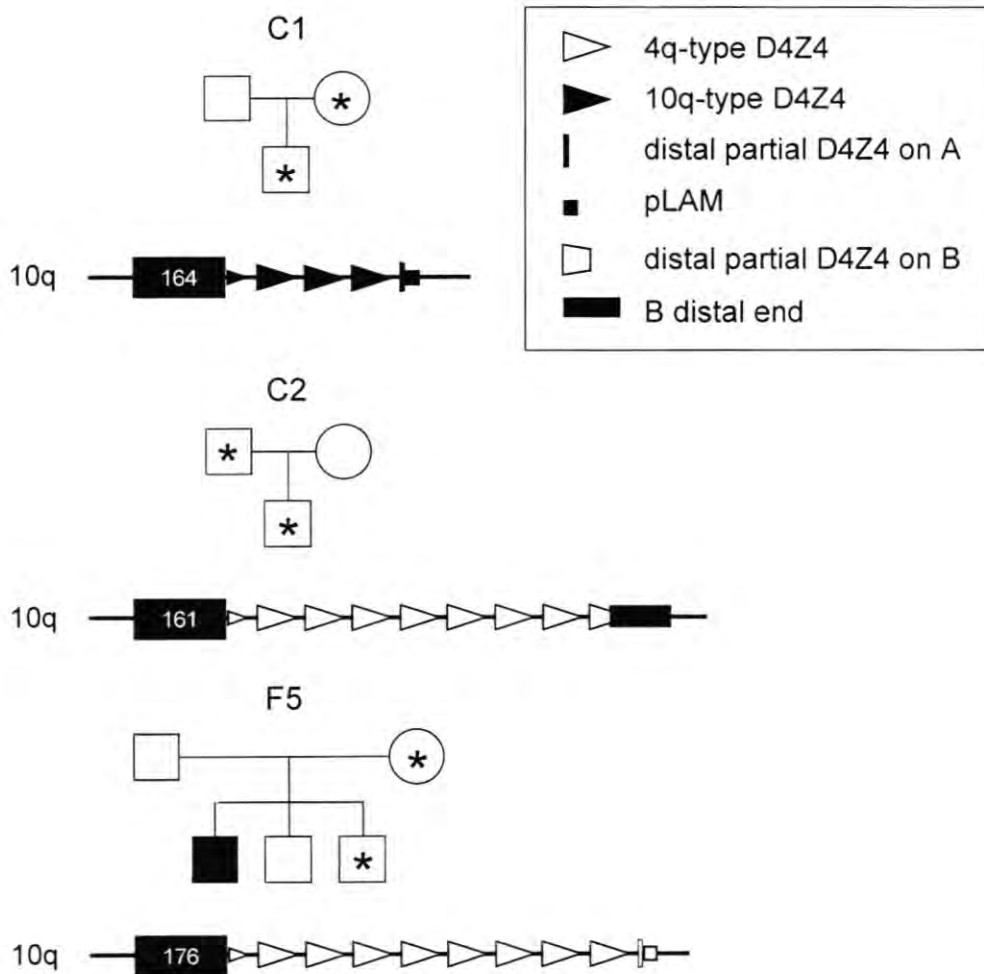
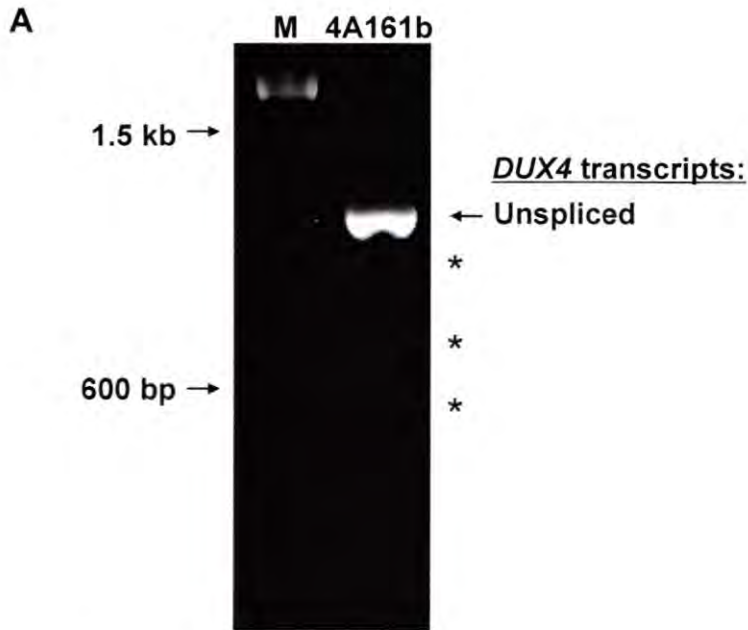


Fig. S3. Pedigrees of 2 control families and FSHD1 family F5 with healthy individuals carrying FSHD1-sized D4Z4 repeat arrays on chromosomes 10A164 (4½ D4Z4 units), 10B161T (8 D4Z4 units), and 10A176T (8½ D4Z4 units). The composition of the relevant chromosome is shown below each pedigree. All healthy carriers of these non-permissive chromosomes are marked with an asterisk. 4B168 was observed in two independent control individuals showing D4Z4 repeat arrays of 8 units.



B Sequence 3' RACE Unspliced DUX4 transcript

```

GAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAAC
GGAGGCCCGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCCTCGCTGGAAGCAC
CCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGG
TTGGGACGGGGTCGGGTGGTTTCGGGGCAGGGCCGTGGCCTCTCTTTTCGCGGGG
AACACCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCGCCCCCTCCACCGGG
CTGACCGGCCTGGGATTCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAGAGACTCCA
CACCGCGGAGAACTGCCATTCTTTCTGGGCATCCCGGGGATCCCAGAGCCGG
CCCAGGTACCAGCAGGTGGGCCGCTACTGCGCACGCGCGGGTTTTCGCGGCAG
CCGCTGGGCTGTGGGAGCAGCCCGGGCAGAGCTCTCCTGCCTCTCCACCAGC
CCACCCCGCCGCTGACCGCCCCCTCCCCACCCCCACCCCCACCCCCGAAA
ACGCGTCGTCCCTGGGCTGGGTGGAGACCCCGTCCCGCGAAACACCGGGCC
CCGCGCAGCGTCCGGGCTGACACCGCTCCGGCGGCTCGCCTCCTCTGCGCCC
CCGCGCCACCGTCGCCCCCGCCCGGGCCCCCTGCAGCCTCCCAGCTGCCAGC
GCGGAGCTCCTGGCGGTCAAAAAGCATACCTCTGTCTGTCTTTGCCCGCTTCCT
GACTAGACCTGCGCGCAGTGCACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTG
GCCTCTCTGTGCCCTTGTCTTCCGTGAAATTCTGGCTGAATGTCTCCCCCA
CCTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTACATCTCCTGGATGAT
TAGTTCAGAGATATATATAAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCTATAGAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fig. S4. 3'RACE PCR on C2C12 transfected with the distal D4Z4 construct of the 4A161 chromosome. (a) 3'RACE PCR shows the unspliced transcript and some splice variants of *DUX4* (marked with asterisks). (b) Sequence of the unspliced *DUX4* transcript verifies the use of the predicted poly(A) signal.

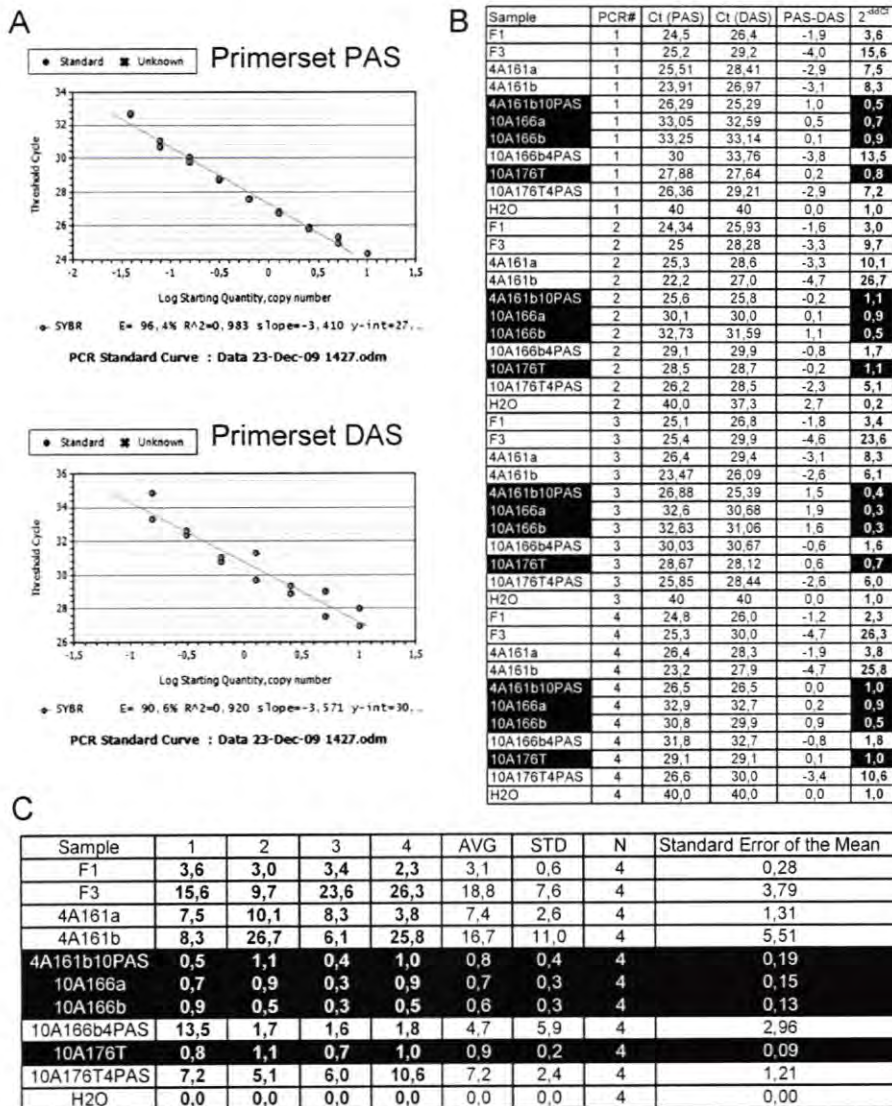
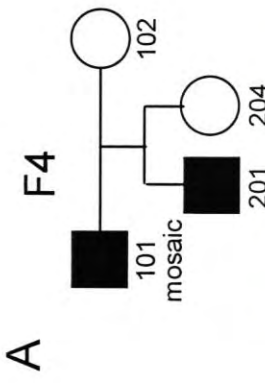
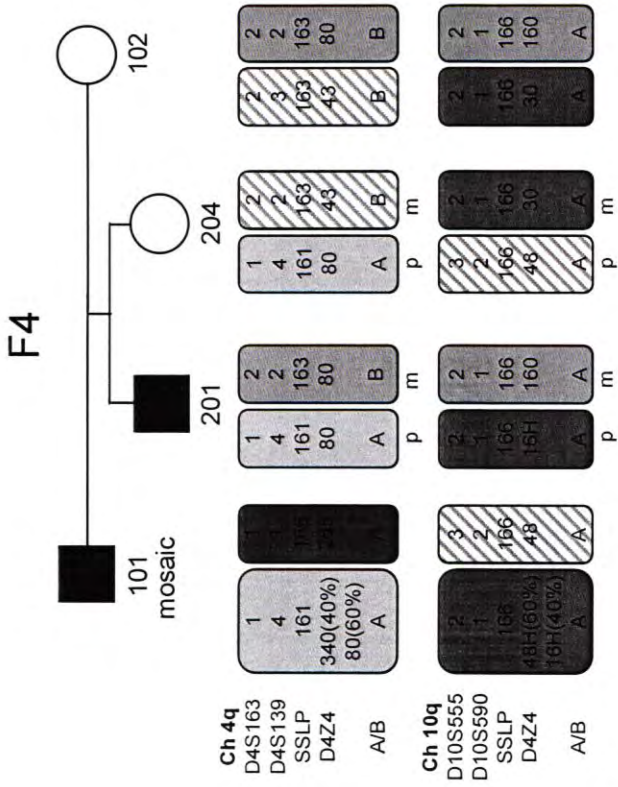


Fig. S5. Q-PCR data for analyzing the polyadenylation of the *DUX4* transcript expressed from the different constructs shown in figure 2. (a) Amplification efficiency of the primer pairs PAS and DAS. (b) Table showing Q-PCR results. Indicated are sample ID (sample), PCR analysis (PCR#), Ct value of PAS PCR (CtPAS), Ct value of DAS PCR (CtDAS), difference between CtPAS and CtDAS (PAS-DAS) and ratio between fold change PAS and DAS (2^{-ddCt}). For each PCR the Ct value of the non-template reaction (H2O) is indicated. (c) Calculation of the mean value of the standard error of the mean based on the results in (b).

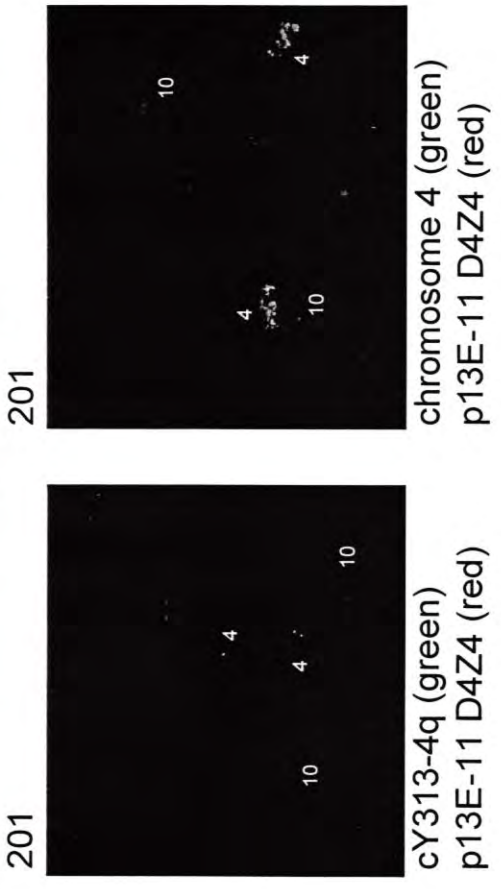
A



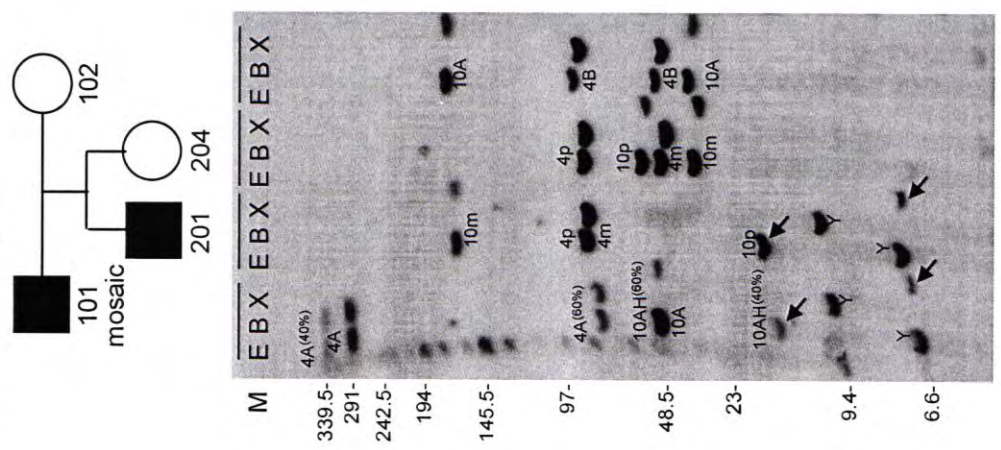
B



C



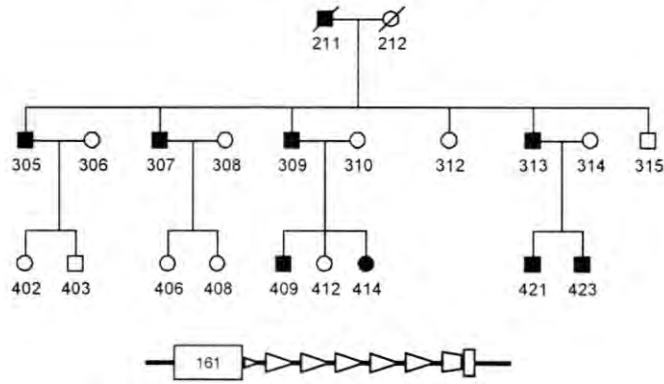
M



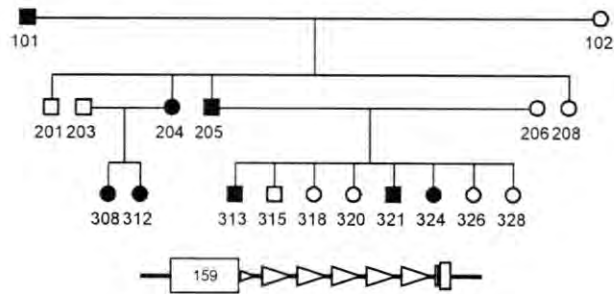
p13E-11

Fig. S6. PFGE Southern blot and FISH studies in family F4. (a) PFGE Southern blot of genomic DNA digested with *EcoRI* and *HindIII* (E), *EcoRI* and *BlnI* (B) or with *XapI* (X) and hybridized with p13E-11. The chromosomal origin of the different D4Z4 repeat arrays as well as the percentage mosaicism is indicated. The pathogenic allele is marked with an arrow. The cross-hybridizing Y fragment is labeled with Y. Marker lane on the left. (b) Segregation analysis of chromosomes 4 and 10 in family F4 indicating that the pathogenic mosaic 16 kb (3 units) large D4Z4 repeat array in the father is located on chromosome 10. This chromosome is transmitted to the affected son, but not to the unaffected daughter. (c) FISH analysis to metaphase chromosomes of patient 201 using digoxigenin-labeled chromosome 4 paint (left) and fluorescently labeled probes recognizing a region (cY313, green signal) 80kb proximal to the D4Z4 repeat on chromosome 4 and showing that sequences proximal to the D4Z4 repeat were not transferred to chromosome 10 (right). In addition, we hybridized a 4.1 kb *KpnI-NaeI* fragment (red signal) on which p13E-11 resides and 500 bp of the proximal D4Z4 sequence for which we previously showed that the signal intensity of this probe correlates with the D4Z4 repeat array size (S4). Indeed as shown in both figures patient 201 shows equally intense D4Z4 signals on both chromosomes 4 (both 80 kb D4Z4), while one of the chromosomes 10 shows a stronger signal (160 kb D4Z4) and the other shows the weakest D4Z4 signal corresponding to the 16 kb hybrid FSHD repeat array.

F6 (4A161L, 6 D4Z4 units)



F7 (4A159, 5.5 D4Z4 units)



F8 (4A168, 5.5 D4Z4 units)

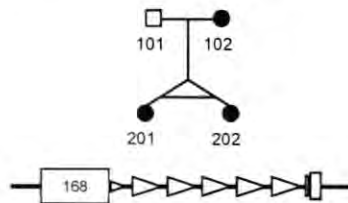


Fig. S7. Pedigrees of 3 FSHD families F6, F7 and F8 with D4Z4 repeat contractions on rare permissive chromosomes 4A161L, 4A159 and 4A168. In all families the contracted D4Z4 repeat cosegregated with the disease. The composition of the disease repeat is shown below each pedigree.

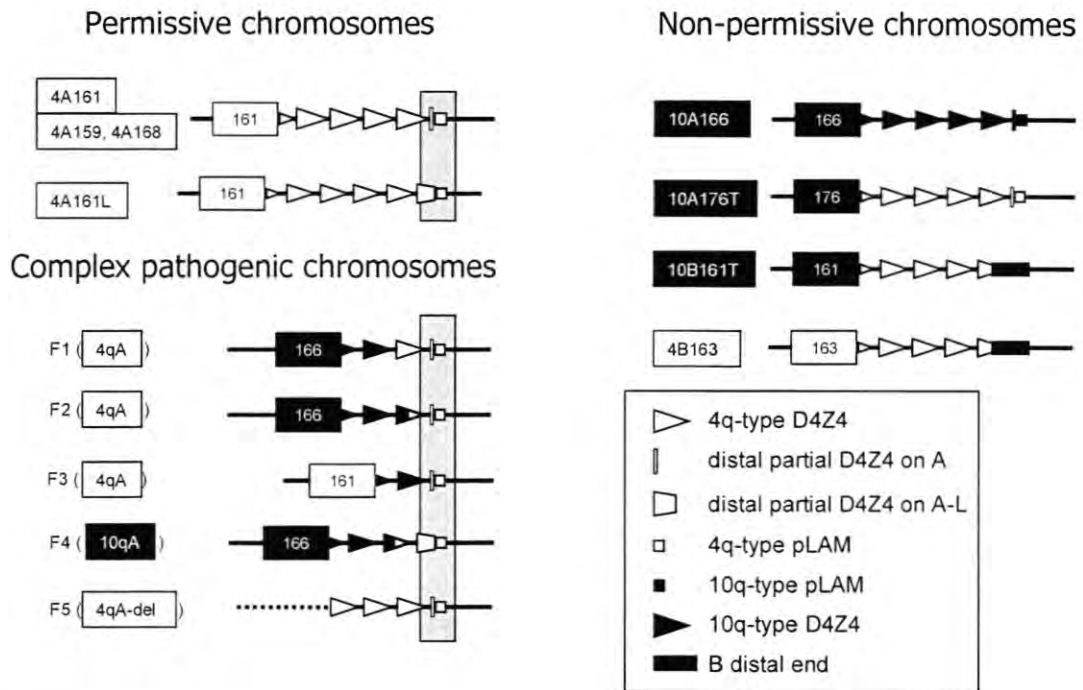


Fig. S8. All permissive chromosomes, including those with unusual disease associated repeat structures (complex pathogenic chromosomes that have been identified in FSHD1 families F1-F5) share the distal end of the D4Z4 repeat and flanking pLAM sequences indicated by the open grey box. This region is absent in the non-permissive chromosomes in the right panel.

within a habitat (5–7). Population density–dependent olfactory plasticity may serve as one of such adaptive mechanisms. Our results indicate that *nep-2* regulates olfactory plasticity by acting in a cell-nonautonomous manner. Mammals possess seven neprilysin family proteins: neprilysin, endothelin-converting enzyme 1 (ECE1), ECE2, phosphate-regulating neutral endopeptidase (PHEX), neprilysin-2, damage-induced neuronal endopeptidase (DINE), and Kell (16). Although little is known about the loss-of-function phenotypes of the neprilysin family proteins, recent biochemical studies revealed that neprilysin scavenges amyloid β peptide efficiently and with this mechanism can prevent Alzheimer’s disease (17). On the basis of our observations, we propose a model in which SNET-1 peptide is secreted as an environmental signal that prevents olfactory plasticity and NEP-2 turns off the SNET-1 signals by degrading the excess peptides, creating a balance sensitive to environmental signals. By acting on an unknown receptor in the olfactory sensory circuit, SNET-1 negatively regulates olfactory plasticity (Fig. 4G and fig. S14). Given that *daf-22*, *nep-2*, and *snet-1* regulate the plasticity of the response to several types of odorants (fig. S3), the pheromonal information may also regulate other behaviors through

the peptide signaling. Our identification of the SNET-1 pathway that regulates olfactory plasticity sheds light on the complexity of the regulatory network underlying simple sensory behavior in *C. elegans* and suggests similar regulation might be present in other animals.

References and Notes

1. C. I. Bargmann, E. Hartwig, H. R. Horvitz, *Cell* **74**, 515 (1993).
2. H. A. Colbert, C. I. Bargmann, *Neuron* **14**, 803 (1995).
3. T. Hirotsu, Y. Iino, *Genes Cells* **10**, 517 (2005).
4. W. M. Nuttley, K. P. Atkinson-Leadbetter, D. Van Der Kooy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 12449 (2002).
5. J. M. J. Travis, D. J. Murrell, C. Dytham, *Proc. Biol. Sci.* **266**, 1837 (1999).
6. H. J. Poethke, T. Hovestadt, *Proc. Biol. Sci.* **269**, 637 (2002).
7. D. E. Bowler, T. G. Benton, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **80**, 205 (2005).
8. P. J. Hu, “Dauer,” in *Worm Book*, D. L. Riddle, Ed., 10.1895/wormbook.1.144.1 (2007).
9. R. A. Butcher et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 1875 (2009).
10. R. A. Butcher, M. Fujita, F. C. Schroeder, J. Clardy, *Nat. Chem. Biol.* **3**, 420 (2007).
11. P. Y. Jeong et al., *Nature* **433**, 541 (2005).
12. J. Srinivasan et al., *Nature* **454**, 1115 (2008).
13. R. A. Butcher, J. R. Ragains, E. Kim, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 14288 (2008).
14. K. Yamada, T. Hirotsu, M. Matsuki, H. Kunitomo, Y. Iino, *Genetics* **181**, 1347 (2009).

15. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
16. A. J. Turner, R. E. Isaacs, D. Coates, *Bioessays* **23**, 261 (2001).
17. N. Iwata, M. Higuchi, T. C. Saïdo, *Pharmacol. Ther.* **108**, 129 (2005).
18. A. Devault et al., *FEBS Lett.* **231**, 54 (1988).
19. R. Taussig, R. R. Kaldany, R. H. Scheller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 4988 (1984).
20. T. R. Zahn et al., *Traffic* **5**, 544 (2004).
21. W. S. Schackwitz, T. Inoue, J. H. Thomas, *Neuron* **17**, 719 (1996).
22. W. Li, S. G. Kennedy, G. Ruvkun, *Genes Dev.* **17**, 844 (2003).
23. E. L. Peckol, E. R. Troemel, C. I. Bargmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 11032 (2001).
24. K. Kim et al., *Science* **326**, 994 (2009).
25. The authors acknowledge J. Ragains for synthesis of the dauer pheromone ascariosides. Y.I. and T.J. were supported by a Grant-in-aid for Scientific Research, J.C. by NIH grant CA24487, and R.A.B. by an NIH K99 Pathway to Independence Award (GM087533). We thank S. Mitani and P. Sengupta for *srbc-64* and *srbc-66* strains.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/329/5999/1647/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S14
References

10 May 2010; accepted 26 July 2010
10.1126/science.1192020

A Unifying Genetic Model for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy

Richard J. L. F. Lemmers,¹ Patrick J. van der Vliet,¹ Rinse Klooster,¹ Sabrina Sacconi,² Pilar Camaño,^{3,4} Johannes G. Dauwerse,⁵ Lauren Snider,⁶ Kirsten R. Straasheijm,¹ Gert Jan van Ommen,¹ George W. Padberg,⁷ Daniel G. Miller,⁸ Stephen J. Tapscott,⁶ Rabi Tawil,⁹ Rune R. Frants,¹ Silvére M. van der Maarel^{1*}

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is a common form of muscular dystrophy in adults that is foremost characterized by progressive wasting of muscles in the upper body. FSHD is associated with contraction of D4Z4 macrosatellite repeats on chromosome 4q35, but this contraction is pathogenic only in certain “permissive” chromosomal backgrounds. Here, we show that FSHD patients carry specific single-nucleotide polymorphisms in the chromosomal region distal to the last D4Z4 repeat. This FSHD-predisposing configuration creates a canonical polyadenylation signal for transcripts derived from *DUX4*, a double homeobox gene of unknown function that straddles the last repeat unit and the adjacent sequence. Transfection studies revealed that *DUX4* transcripts are efficiently polyadenylated and are more stable when expressed from permissive chromosomes. These findings suggest that FSHD arises through a toxic gain of function attributable to the stabilized distal *DUX4* transcript.

Autosomal dominant FSHD (FSHD1; OMIM 158900) is a common form of muscular dystrophy, affecting 1 in 20,000 people, that is characterized by progressive and often asymmetric weakness and wasting of facial, shoulder girdle, and upper arm muscles (1). The disorder is most often caused by contraction of the D4Z4 macrosatellite repeat array in the subtelomeric region of chromosome 4q35 (2). This polymorphic macrosatellite repeat normally consists of 11 to 100 D4Z4 units, each 3.3 kb in size and ordered head-to-tail. Patients with FSHD1 have one

repeat array of 1 to 10 units (Fig. 1A). At least one unit of D4Z4 is required to develop FSHD (3).

D4Z4 contraction needs to occur on a specific chromosomal background to cause FSHD. The chromosome 10q subtelomere contains an almost identical repeat array, but contractions on this chromosome are nonpathogenic (Fig. 1A). Translocated copies of the chromosome 4 and chromosome 10 repeat units are frequently encountered on either chromosome end (4). This complex genetic situation, in which genetically almost identical repeat units can be exchanged between both

chromosomes with apparently discordant pathological consequences, has long hampered the identification of the disease mechanism.

Disease models were postulated in which D4Z4 repeat contractions cause chromatin remodeling and transcriptional deregulation of genes close to D4Z4. Indeed, contracted D4Z4 repeat arrays show partial loss of DNA methylation and of heterochromatic histone 3 lysine 9 trimethylation and heterochromatin protein 1 γ markers consistent with a more open chromatin structure (5, 6). Transcriptional up-regulation of genes proximal to D4Z4 was reported in FSHD1 patients (7) but could not be confirmed (8, 9).

Exchanges between repeat units of chromosomes 4 and 10 occur much less frequently than anticipated: Most translocated repeat units are relicts of ancient translocation events between chromosomes 4q and 10q (10). Of the two distal chromosome 4q configurations, 4qA and 4qB, only contractions of the 4qA form led to FSHD1

¹Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center, 2333 ZA Leiden, Netherlands. ²Centre de Référence pour les Maladies Neuromusculaires and CNRS UMR6543, Nice University, 06202 Nice, France. ³Department of Neurosciences, BioDonostia Health Research Institute, Hospital Donostia, 20014 San Sebastián, Spain. ⁴CIBERNED, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain. ⁵Department of Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, 2333 ZA Leiden, Netherlands. ⁶Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA 98109, USA. ⁷Department of Neurology, Radboud University Medical Center Nijmegen, 6500 HC Nijmegen, Netherlands. ⁸Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, WA 98195, USA. ⁹Department of Neurology, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY 14642, USA.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: maarel@lumc.nl

(11). Genetic follow-up studies unveiled consistent polymorphisms in the FSHD locus, resulting in the recognition of at least 17 genetic variants of distal 4q (10). Contractions in the common variant 4A161 cause FSHD1, whereas contractions in many other variants, such as the common

4B163, do not cause FSHD1 (Fig. 1A) (12). Thus, it appears that chromosome 4A161-specific sequence variants are causally related to FSHD.

Because at least one D4Z4 unit is necessary to cause disease, we reasoned that the minimal pathogenic region might reside in the first or the

last unit. The distal unit of the D4Z4 repeat was recently shown to have a transcriptional profile that differs from internal units (13, 14). Although the major transcript in each unit is the *DUX4* gene, which codes for a double homeobox protein, none of these transcripts seem to be stable,

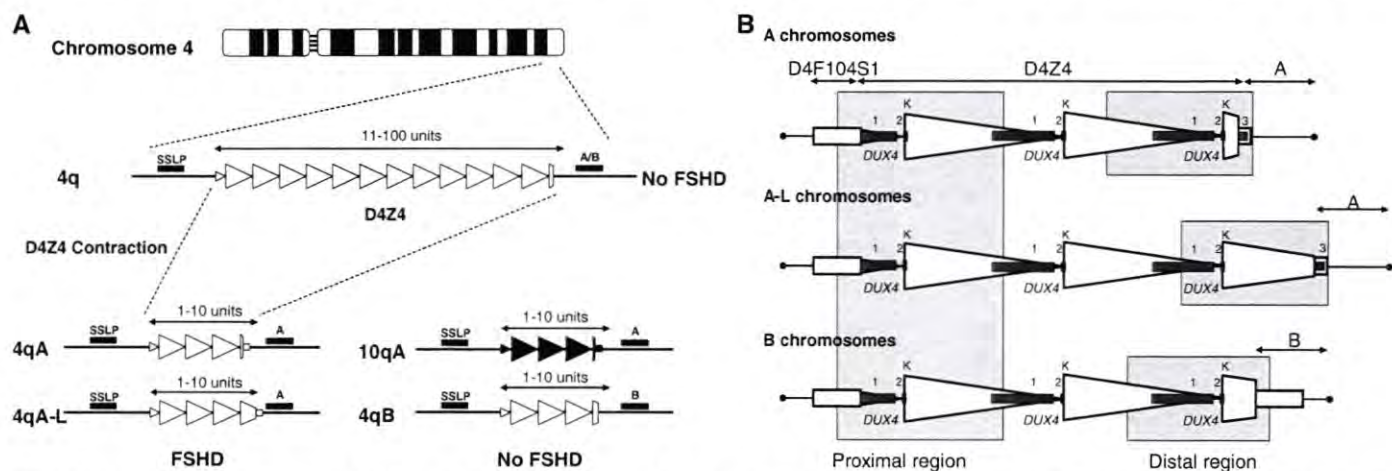


Fig. 1. Schematic overview showing the minimal genetic requirement for FSHD1. (A) The D4Z4 repeat array on chromosome 4q35 (open triangles) and its homolog on chromosome 10q26 (closed triangles), indicating the location of the simple sequence length polymorphism (SSLP) and 4qA/4qB polymorphisms that define the genetic background of the repeat. Patients with FSHD1 have a

D4Z4 repeat array size of 1 to 10 units on 4qA but not on 4qB or 10q chromosomes. (B) Schematic of the D4Z4 repeat and flanking sequences on A, A-L (with an extended distal D4Z4 repeat unit), and B chromosomes. Each D4Z4 unit is defined by the *KpnI* restriction site (K). The proximal and distal regions that were sequenced are indicated. The exons of *DUX4* are indicated as gray boxes numbered 1 to 3.

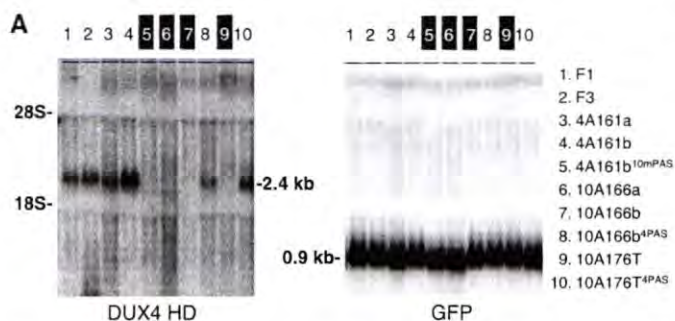
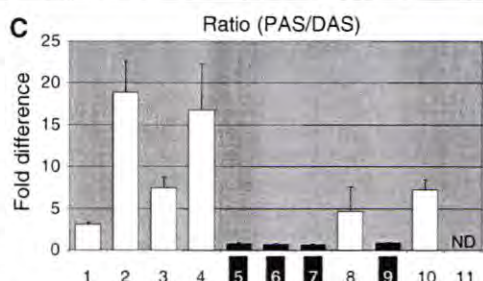
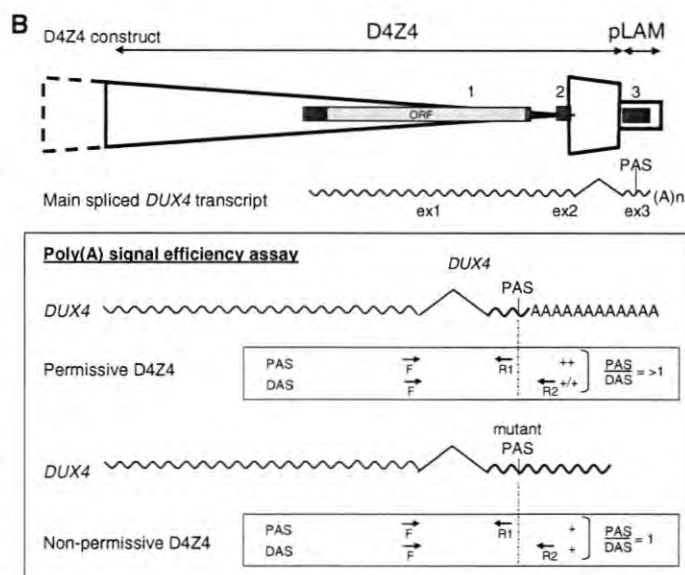


Fig. 2. *DUX4* expression analysis after transfection of the distal D4Z4 unit and flanking pLAM sequence into C2C12 mouse myoblast cells. (A) Northern blot analysis of C2C12 mouse myoblast cells transfected with genomic D4Z4 constructs [see (B)] derived from permissive (lanes 1 to 4) or nonpermissive (lanes 6, 7, and 9) chromosomes or constructs in which the poly(A) signals from nonpermissive chromosomes are replaced by those from permissive chromosomes (4PAS, lanes 8 and 10) and vice versa (10mPAS, lane 5). Only constructs with canonical poly(A) signals show a *DUX4* transcript. Cotransfected EGFP gene was used as a control. (B) Schematic of the transfected sequence, including the distal D4Z4 unit and flanking pLAM sequence. The *DUX4* gene and the poly(A) signal are part of the transfected sequence. The main spliced *DUX4* transcript and its open reading frame (ORF) are indicated. The primers used to quantify polyadenylation efficiency are indicated. The boxed area shows the design of the assay to infer the polyadenylation efficiency of the *DUX4* poly(A) signal. The forward primer straddles exons 2 and 3 and is therefore specific for the spliced *DUX4* transcript. The primer set proximal to the poly(A) signal (PAS) and a primer set using the same forward primer but a reverse primer distal to the poly(A) signal (DAS) are indicated, as well as the expected PAS/DAS ratios. (C) Bar diagram with the observed PAS/DAS ratios of permissive chromosomes (lanes 3 and 4), nonpermissive chromosomes (lanes 6, 7, and 9), and permissive chromosomes in which the poly(A) signal is replaced for a sequence derived from a nonpermissive chromosome (10mPAS, lane 5) or vice versa (4PAS, lanes 8 and 10), or of pathogenic chromosomes derived from families F1 and F3 (lanes 1 and 2). Lane 11 is a negative control. ND, not detected. Error bars represent values of quadruple experiments with standard errors of the mean.



probably due to the absence of a polyadenylation signal in internal D4Z4 units. Spliced and unspliced transcripts of the *DUX4* gene in the last unit, however, use a unique 3' untranslated region (UTR) in the pLAM region (15), which is immediately distal to this last unit (Figs. 1B and 2B) and which contains a poly(A) signal that presumably stabilizes this distal transcript (13, 14). The *DUX4* transcript of the distal D4Z4 unit encompasses two facultative introns in the 3'UTR. When expressed in C2C12 muscle cells, *DUX4* causes a phenotype compatible with molecular observations in FSHD (16). This distal *DUX4* transcript can be observed in FSHD1 myotubes but not in control myotubes (fig. S1) (17).

To investigate why the 4A161 chromosome is permissive for disease, we compared the sequence of the 4A161 chromosome with that of common, nonpermissive 4B163 and 10A166 chromosomes. We could not identify a sequence signature in the proximal D4Z4 unit of the repeat array that explained the permissiveness of the 4A161 chromosome (fig. S2). However, immediately distal to D4Z4, in the adjacent pLAM sequence, we found a polymorphism potentially affecting polyadenylation of the distal *DUX4* transcript. The *DUX4* poly(A) signal ATTTAAA, which

is commonly used in humans (18), is present on the permissive 4A161 chromosome, whereas the corresponding ATCAAAA sequence on chromosome 10q is not known to be a poly(A) signal (fig. S2). Nonpermissive 4qB chromosomes, like 4B163, lack pLAM altogether, including this poly(A) site (Fig. 1B). Another nonpermissive 10qA chromosome (10A176T) (10) carries ATTTAA at this position, which is also not known as a poly(A) signal (figs. S2 and S3). In silico poly(A) signal prediction programs (19, 20) also recognized the *DUX4* poly(A) signal in 4A161 but failed to identify potential poly(A) signals in nonpermissive chromosomes 10A166 and 10A176T.

To explore whether these polymorphisms affect the distal *DUX4* transcript, we transfected the last D4Z4 unit and flanking pLAM sequence of permissive and nonpermissive chromosomes in C2C12 cells and assessed the stability of the distal *DUX4* transcript by Northern blot analysis (Fig. 2A). We also examined the relative potency of the poly(A) signals on the permissive and nonpermissive chromosomes in directing polyadenylation of the distal *DUX4* transcript. We studied polyadenylation site usage indirectly by using a quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (21) in which we compared *DUX4* transcript levels proximal and distal of the poly(A) site (Fig. 2B). The use of the predicted poly(A) signal was verified by 3' rapid amplification of cDNA ends (fig. S4). We also transfected constructs in which the poly(A) signal of permissive chromosomes was replaced by those of nonpermissive chromosomes, and vice versa. We found that *DUX4* transcripts were stable (Fig. 2A) and efficiently polyadenylated (Fig. 2C) when we used constructs from permissive chromosomes or when the poly(A) signal of a permissive chromosome was introduced on constructs derived from nonpermissive chromosomes. Consistently, when constructs derived from nonpermissive chromosomes were transfected, no *DUX4* transcripts could be detected on Northern blot and polyadenylation was inefficient. *DUX4* stability and polyadenylation efficiency decreased when the poly(A) signal of permissive constructs was replaced by nonpermissive sequences. Altogether, constructs with a bona fide poly(A) signal produced stable transcripts and showed polyadenylation efficiency that was 4 to 16 times as high as constructs with a mutation in the poly(A) signal. This suggests that increased polyadenylation, and hence stability, of the distal *DUX4* transcript may be centrally involved in FSHD pathogenesis.

We next studied FSHD1 patients with unusual hybrid D4Z4 repeat array structures that contain mixtures of 4-type and 10-type units. We identified four families (F1 to F4) with one or more individuals with FSHD1, carrying a contracted D4Z4 repeat array that commences with 10-type units and ends with 4-type units (Fig. 3). In family F3, we identified a patient with a de novo meiotic rearrangement between chromosomes 4q and 10q, leaving one and a half 10-type repeat units on a permissive 4A161 chromosome. In

family F4, the mildly affected father is a mosaic FSHD1 patient (22) due to a mitotic contraction of such hybrid repeat array. The mosaic pathogenic repeat starts with two and a half 10-type D4Z4 units and ends with one and a half 4-type repeat units. This repeat array in the father was transmitted to his affected son, demonstrating its pathogenicity, and, unexpectedly, it was found to reside on chromosome 10 (fig. S6). Only the distal end of the D4Z4 repeat array was transferred to chromosome 10q, so that none of the FSHD candidate genes located proximal to the D4Z4 repeat array were cotransferred to chromosome 10 (fig. S6). This report of a FSHD1 family linked to chromosome 10 apparently precludes a key role for proximal 4q genes in the pathogenesis of FSHD. Altogether, all unusual FSHD1-causing repeat arrays reported here thus share the commonality of a terminal 4qA repeat unit with a directly adjacent pLAM sequence.

We also analyzed other disease-permissive chromosome 4 variants (fig. S7): 4A161L was previously described (10, 15), whereas 4A159 and 4A168 are newly discovered uncommon permissive variants from a survey of >300 independent patients with FSHD. In addition, we studied >2000 control individuals and identified additional nonpermissive chromosome variants: 4B168, 10A164, and 10B161T (fig. S3). Thus, D4Z4 contractions on 4A161, 4A161L, 4A159, and 4A168 chromosomes are pathogenic, and D4Z4 contractions on 4B163, 4B168, 10A166, 10A164, 10B161T, and 10A176T chromosomes are nonpathogenic.

We sequenced the first and last D4Z4 units and flanking sequences in these newly identified permissive and nonpermissive chromosomes. (Fig. 1B and fig. S2). In support of our earlier data, there is no common sequence in the proximal D4Z4 region that unifies FSHD-permissive chromosomes. At the distal end, all permissive chromosomes differed very little in sequence and all contained a canonical *DUX4* poly(A) signal, whereas nonpermissive chromosomes showed much more sequence variation relative to the permissive chromosomes. The only exception, 4B163, has a D4Z4 sequence highly identical to 4A161 but, importantly, lacks the pLAM sequence (Fig. 1). The permissive 4A161L chromosome is identical to 4A161 but carries an extended D4Z4 sequence, preceding an identical pLAM sequence (Fig. 1B and fig. S2). Sequence analysis of the distal D4Z4-pLAM region of the pathogenic chromosome in our four families with complex repeat array structures showed a sequence identical to the permissive 4A161 sequence. Transfection experiments with D4Z4-pLAM sequences derived from the disease chromosomes of families F1 and F3 showed transcript stabilities and polyadenylation efficiencies of the distal *DUX4* transcript comparable to 4A161 chromosomes (Fig. 2B). This demonstrates that *DUX4* can also be efficiently produced from these chromosomes. Altogether, our study demonstrates that all patients with FSHD1 that came to our attention have an

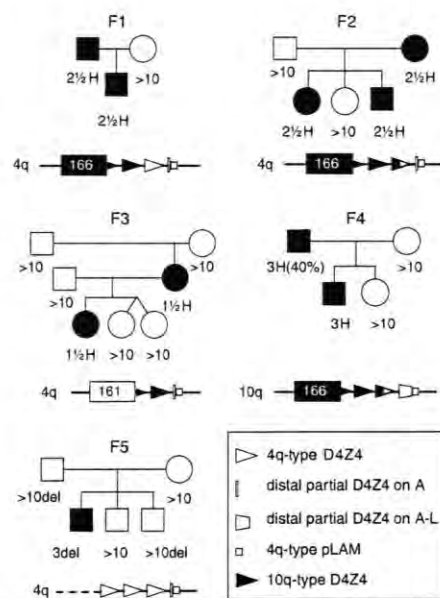


Fig. 3. Pedigrees of FSHD1 families with complex pathogenic chromosomes. Families F1 to F4 all carry a hybrid D4Z4 repeat (H) that commences with chromosome 10-type repeat units (closed triangles) but end with 4-type repeat units (open triangles). In family F3, a meiotic rearrangement between chromosomes 4 and 10 generated a short hybrid repeat structure on 4A161. In family F4, this pathogenic repeat is located on chromosome 10 and originates from a mitotic D4Z4 contraction in the mildly affected father that is transmitted to his affected son. Family F5 represents a disease chromosome in which, in addition to partial deletion of the D4Z4 repeat, the region proximal to the D4Z4 repeat is also deleted (del).

identical sequence in the last D4Z4 unit and immediately flanking pLAM sequence, and it shows that specific sequence variants unique to the permissive haplotypes confer pathogenicity to the repeat irrespective of its chromosomal localization (fig. S8).

Finally, this distal pLAM region is also preserved in individuals with FSHD1 in whom the deleted region extends proximally to the D4Z4 repeat array (F5 in Fig. 3), as well as in FSHD2 patients, who have a classical FSHD phenotype but show a similar local chromatin relaxation on a 4A161 chromosome independent of D4Z4 repeat array contraction (6, 23).

Our study puts forward a plausible genetic model for FSHD. In this model, two polymorphisms create a polyadenylation site for the distal *DUX4* transcript, located in the pLAM sequence. In combination with the chromatin relaxation of the repeat, this leads to increased *DUX4* transcript levels. FSHD may arise through a toxic gain of function attributable to the stabilized distal *DUX4* transcript. Our study thus not only explains the striking chromosome specificity of the disorder but also provides a genetic mechanism

that may unify the genetic observations in patients with FSHD.

References and Notes

1. R. Tawil, S. M. Van Der Maarel, *Muscle Nerve* **34**, 1 (2006).
2. C. Wijmenga *et al.*, *Nat. Genet.* **2**, 26 (1992).
3. R. Tupler *et al.*, *J. Med. Genet.* **33**, 366 (1996).
4. J. C. de Greef, R. R. Frants, S. M. van der Maarel, *Mutat. Res.* **647**, 94 (2008).
5. P. G. van Overveld *et al.*, *Nat. Genet.* **35**, 315 (2003).
6. W. Zeng *et al.*, *PLoS Genet.* **5**, e1000559 (2009).
7. D. Gabellini, M. R. Green, R. Tupler, *Cell* **110**, 339 (2002).
8. R. Klooster *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 1615 (2009).
9. P. S. Masny *et al.*, *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 448 (2010).
10. R. J. Lemmers *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* **86**, 364 (2010).
11. R. J. Lemmers *et al.*, *Nat. Genet.* **32**, 235 (2002).
12. R. J. Lemmers *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 884 (2007).
13. M. Dixit *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 18157 (2007).
14. L. Snider *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2414 (2009).
15. J. C. van Deutekom *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **2**, 2037 (1993).
16. D. Bosnakovski *et al.*, *EMBO J.* **27**, 2766 (2008).
17. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
18. E. Beaudoin, S. Freier, J. R. Wyatt, J. M. Claverie, D. Gautheret, *Genome Res.* **10**, 1001 (2000).
19. F. Ahmed, M. Kumar, G. P. Raghava, *In Silico Biol.* **9**, 13 (2009).

20. H. Liu, H. Han, J. Li, L. Wong, *Bioinformatics* **21**, 671 (2005).
21. S. H. Ahn, M. Kim, S. Buratowski, *Mol. Cell* **13**, 67 (2004).
22. S. M. van der Maarel *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 26 (2000).
23. J. C. de Greef *et al.*, *Hum. Mutat.* **30**, 1449 (2009).
24. We thank all patients and family members for their participation. This study was supported by the Fields Center for FSHD and Neuromuscular Research, the Netherlands Organization for Scientific Research NWO 917.56.338, a Breakthrough Project Grant by the Netherlands Genomics Initiative NWO 93.51.8001, the National Institutes of Health P01NS069539, the Muscular Dystrophy Association, the Shaw Family Foundation, a Marjorie Bronfman Fellowship grant from the FSH Society, the Dutch FSHD Foundation, the Pacific Northwest Friends of FSH Research, Centro Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), the Basque Government (Fellowship grant, 2008111011), and Instituto Carlos III, ILUNDAIN Fundazioa.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.1189044/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S8
References

3 March 2010; accepted 21 July 2010

Published online 19 August 2010;

10.1126/science.1189044

Include this information when citing this paper.

The Genetic and Molecular Basis for Sunscreen Biosynthesis in Cyanobacteria

Emily P. Balskus and Christopher T. Walsh*

Ultraviolet UV-A and UV-B radiation is harmful to living systems, causing damage to biological macromolecules. An important strategy for dealing with UV exposure is the biosynthesis of small-molecule sunscreens. Among such metabolites, the mycosporine and mycosporine-like amino acids (MAAs) are remarkable for their wide phylogenetic distribution and their unique chemical structures. Here, we report the identification of a MAA biosynthetic gene cluster in a cyanobacterium and the discovery of analogous pathways in other sequenced organisms. We have expressed the cluster in a heterologous bacterial host and characterized all four biosynthetic enzymes *in vitro*. In addition to clarifying the origin of the MAAs, these efforts have revealed two unprecedented enzymatic strategies for imine formation.

Mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) are ultraviolet (UV)-absorbing small molecules ($\lambda_{\text{max}} = 310$ to 360 nm) (1) that are synthesized by cyanobacteria, fungi, and eukaryotic micro- and macroalgae (2–5). These metabolites are also ingested and accumulated by numerous marine animals. Discovered and named for mediating light-induced fungal sporulation (6–8), mycosporines and MAAs are involved in many other biological processes, including UV photoprotection of organisms (2–5, 9) and their embryos (10), osmotic regulation (11), and defense against oxidative stress (12). Additionally, their ability to prevent UV-induced skin damage *in vivo* (13) has led to their commercial-

ization as Helioguard 365, a formulation containing MAAs shinorine and porphyra-334 that is used in skin care and cosmetic products.

Structurally this large natural-product family is divided into two groups: the mycosporines, which contain a single proteogenic or modified amino acid residue linked to a cyclohexenone core, and the MAAs, which have two such substituents (Fig. 1A). The amino acids are attached to the central ring through imine linkages, an arrangement best represented as a combination of resonance tautomers (Fig. 1B). This extensive conjugation facilitates absorption of UV (Fig. 1C). Fungi produce only mycosporines, whereas cyanobacteria, algae, and marine organisms can synthesize both mycosporines and MAAs.

The occurrence, distribution, and biology of mycosporines and MAAs have been subjects of intense investigation, but elucidation of the precise biochemical mechanisms underlying their

functions has been hampered by a lack of knowledge regarding the molecular and genetic basis for their biosynthesis. Previous feeding studies with cyanobacteria and fungi revealed that the amino acid substituents were added in the later stages of biosynthesis and suggested, but did not prove, that the mycosporine core might originate from shikimate pathway intermediate 3-dehydroquinate (14, 15). Despite these efforts, no genes have been definitively linked to mycosporine or MAA production in any organism.

We attempted to locate candidate biosynthetic gene clusters using a genome mining approach prompted by the discovery of genes encoding shikimate pathway enzymes in the genome of sea anemone *Nematostella vectensis* (16), including a dehydroquinate synthase homolog (DHQS) adjacent to an *O*-methyltransferase (*O*-MT). Recognizing that a methyltransferase was likely involved in mycosporine assembly, we considered the DHQS and *O*-MT to be candidate biosynthetic genes. BLAST searches with both protein sequences revealed clustered homologs in genomes of dinoflagellates, cyanobacteria, and fungi (17).

Examining the hits in their genomic contexts revealed that open reading frames (ORFs) encoding DHQs and *O*-MTs were accompanied by a third conserved ORF, usually annotated as a hypothetical protein. A conserved domain search using this gene revealed homology to the adenosine triphosphate (ATP)-grasp superfamily. As these enzymes catalyze peptide bond formation, we reasoned that this gene product might be involved in amino acid installation. We also noted genetic variations between cyanobacterial and fungal clusters consistent with the structural differences between cyanobacterial MAAs and fungal mycosporines; cyanobacteria had a second

Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: christopher_walsh@hms.harvard.edu

Specific Sequence Variations within the 4q35 Region Are Associated with Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy

Richard J. L. F. Lemmers, Mariëlle Wohlgemuth, Kristiaan J. van der Gaag, Patrick J. van der Vliet, Corrie M. M. van Teijlingen, Peter de Knijff, George W. Padberg, Rune R. Frants, and Silvère M. van der Maarel

Autosomal dominant facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is mainly characterized by progressive wasting and weakness of the facial, shoulder, and upper-arm muscles. FSHD is caused by contraction of the macrosatellite repeat D4Z4 on chromosome 4q35. The D4Z4 repeat is very polymorphic in length, and D4Z4 rearrangements occur almost exclusively via intrachromosomal gene conversions. Several disease mechanisms have been proposed, but none of these models can comprehensively explain FSHD, because repeat contraction alone is not sufficient to cause disease. Almost-identical D4Z4-repeat arrays have been identified on chromosome 10q26 and on two equally common chromosome 4 variants, 4qA and 4qB. Yet only repeat contractions of D4Z4 on chromosome 4qA cause FSHD; contractions on the other chromosomes are nonpathogenic. We hypothesized that allele-specific sequence differences among 4qA, 4qB, and 10q alleles underlie the 4qA specificity of FSHD. Sequence variations between these alleles have been described before, but the extent and significance of these variations proximal to, within, and distal to D4Z4 have not been studied in detail. We examined additional sequence variations in the FSHD locus, including a relatively stable simple sequence-length polymorphism proximal to D4Z4, a single-nucleotide polymorphism (SNP) within D4Z4, and the A/B variation distal to D4Z4. On the basis of these polymorphisms, we demonstrate that the subtelomeric domain of chromosome 4q can be subdivided into nine distinct haplotypes, of which three carry the distal 4qA variation. Interestingly, we show that repeat contractions in two of the nine haplotypes, one of which is a 4qA haplotype, are not associated with FSHD. We also show that each of these haplotypes has its unique sequence signature, and we propose that specific SNPs in the disease haplotype are essential for the development of FSHD.

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD [MIM 158900]) is the third-most-common myopathy with an autosomal dominant pattern of inheritance. The disease is mainly characterized by progressive wasting and weakness of the facial, shoulder, and upper-arm muscles. FSHD displays wide clinical variability, ranging from asymptomatic individuals with minimal clinical signs apparent only on careful examination to patients who use wheelchairs.¹

FSHD is caused by a contraction of the macrosatellite repeat D4Z4 in the subtelomeric region of chromosome 4q35.² The D4Z4 repeat array, which consists of single repeat units of 3.3 kb, is very polymorphic in length and is highly recombinogenic.³ Control individuals carry D4Z4 repeats with 11–100 units, whereas the majority of patients have a D4Z4-repeat size of 1–10 units on one of their chromosomes 4. In 10%–30% of the cases, FSHD is caused by a de novo contraction of the D4Z4 repeat. Intrachromosomal gene conversions underlie these rearrangements.⁴

Detailed sequence analysis of the D4Z4 unit revealed the presence of a putative ORF in addition to repetitive sequences often found in heterochromatic domains of the human genome.^{5,6} This intronless ORF, named “*DUX4*,” encodes a 424-aa protein with two predicted homeobox

sequences.⁷ With consideration of the gradual spread in muscle weakness and the crucial role of homeobox proteins in body patterning during early development, *DUX4* is considered a strong candidate for FSHD. However, consistent evidence of expression emanating from D4Z4 is lacking.^{7–9}

Therefore, other models were proposed in which D4Z4 plays an indirect role in FSHD pathogenesis.^{10–13} All these models predict a change in chromatin structure on D4Z4 contraction. Several observations corroborate these models: a protein repressor complex has been identified that binds D4Z4 and suppresses the expression of genes in close vicinity of the repeat.¹⁰ Moreover, D4Z4 is significantly hypomethylated in FSHD alleles.¹³ Unfortunately, none of these models can comprehensively explain FSHD, because certain conditions, in addition to repeat contraction, need to be met for disease to occur.

First, the D4Z4 contraction needs to occur on chromosome 4q, since a very homologous and equally polymorphic D4Z4 repeat is located on chromosome 10q26, but FSHD-sized D4Z4 repeats on 10q have never been associated with disease.^{14,15} Sequence analysis showed that the 10q26 repeat is ~98% identical to the 4q35 repeat, and the regions extending 40 kb proximal to D4Z4 and at least

From the Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands (R.J.L.F.L.; K.J.v.d.G.; P.J.v.d.V.; C.M.M.v.T.; P.d.K.; R.R.F.; S.M.v.d.M.); and Department of Neurology, University Medical Center Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands (M.W.; G.W.P.)

Received March 1, 2007; accepted for publication July 2, 2007; electronically published September 7, 2007.

Address for correspondence and reprints: Dr. Silvère M. van der Maarel, Leiden University Medical Center, Department of Human and Clinical Genetics, Albinusdreef 2, 2333 ZA Leiden, The Netherlands. E-mail: maarel@lumc.nl

Am. J. Hum. Genet. 2007;81:884–894. © 2007 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved. 0002-9297/2007/8105-0003\$15.00
DOI: 10.1086/521986

10 kb distal to D4Z4 are highly homologous.¹⁶ Specific sequence differences assist the molecular diagnosis of FSHD by discriminating between repeats from both chromosomes through the presence of chromosome-specific restriction-recognition sites within the repeat units: *BlnI* for 10q-derived repeat units and *XapI* for 4q-derived repeat units.^{15,17}

Second, the contraction needs to occur on a specific variant of 4qter. Two subtelomeric variations distal to D4Z4 were identified on chromosome 4, with alleles 4qA and 4qB.¹⁶ The most prominent difference between 4qA and 4qB alleles is the presence of a 260-bp sequence (pLAM) followed by a 6.2-kb β -satellite repeat directly distal to D4Z4 on 4qA. Both variants are almost equally common in the control population. However, we have shown that FSHD alleles are exclusively associated with the 4qA variant.¹⁸

We hypothesized that allele-specific sequence differences are accumulating between 4qA and 4qB alleles because of a lack of allelic exchanges between 4qA and 4qB and that some of these differences underlie the 4qA specificity of FSHD. A first indication that 4qA and 4qB subtelomeres evolve relatively independently came from the observation that the distal A/B variation on 4qter was in linkage disequilibrium (LD) with a G/C SNP within the most proximal D4Z4 unit (hereafter designated as the "D4Z4 SNP").⁴ We showed the presence of the C variant, which leads to an extra *PvuII* restriction site in D4Z4, in 29% of the 4qB alleles, whereas this restriction site was almost absent in the 4qA alleles. This observation motivated us to analyze the allelic variation of the D4Z4 region on chromosomes 4 and 10 in more detail.

For this study, we used four polymorphisms in 4qter: the repeat-size variation of D4Z4, the D4Z4 SNP, the distal A/B variation, and a relatively stable simple sequence-length polymorphism (SSLP) located 3.5 kb proximal to D4Z4. We confirmed the LD between the region proximal and distal to D4Z4. On the basis of specific sequence variations within and close to D4Z4, the subtelomeric region of chromosome 4q can be subdivided into at least nine haplotypes. Most importantly, we show that D4Z4 contractions in one of the three 4qA haplotypes are not associated with FSHD.

Subjects and Methods

Control Individuals and Patients with FSHD

The polymorphic markers were determined in genomic DNA from 222 unrelated healthy individuals and 86 independent individuals with sporadic and familial FSHD. All control and patient DNA samples tested were randomly chosen from our collection of >1,000 individuals. Blood from all individuals was collected after informed consent was obtained.

Somatic Cell Hybrids and DNA Clones

The chromosome 4qA sources were the monochromosomal rodent somatic cell hybrids HHW1494 and SU10 (gift from S. Winokur, Irvine, CA) and phage clones λ 42, λ 68, and λ 260201.³

All these sources represent FSHD alleles. As chromosome 4qB sources, we used the monochromosomal rodent somatic cell hybrids GM11687 (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ), 4L 10 (gift from E. Stanbridge, Irvine, CA), and HHW416 (gift from M. Altherr, Los Alamos, NM). Chromosome 10qA sources were cosmid C85³ and the monochromosomal rodent somatic cell hybrids 726 8a (U.K. Human Genome Mapping Project Resource Center) and GM11688 (Coriell Cell Repositories).

FSHD-Affected Families Rf10 and Rf204

Families Rf10 and Rf204 were ascertained via one of the Dutch Neuromuscular Centers. In Rf10, four affected members who all carry a 33-kb FSHD allele (4qA161; see the "Results" section) were identified. In addition, a healthy spouse (II-9) who carried a different 33-kb allele (4qA166) was identified. Also, his brother (II-11) carried this FSHD-sized 4qA166 allele and was not affected. Family Rf204 has been described before (as "family A")¹⁹ and includes five patients with FSHD who carry a 17-kb FSHD allele (4qA161). In this family, a second FSHD-sized allele of 24 kb (4qA166) was found in an unaffected sister (II-11). Further analysis of this family revealed five unaffected children of the oldest, deceased brother (II-1), who carried the same 24-kb allele. All unaffected carriers of the FSHD-sized 4qA166 allele in both families have reached the age range at which the disease usually becomes manifest.

DNA Isolation

DNA was isolated from peripheral-blood lymphocytes (PBLs). PBLs were embedded in agarose plugs (InCert agarose [FMC]) at a concentration of 5×10^5 cells per plug and were treated with 600 μ g/ μ l pronase and 1% Sarkosyl for 40–48 h at 37°C. Next, plugs were washed in Tris-EDTA (TE)⁻⁴ and were stored in 0.5 M EDTA at 4°C. Before they were used, plugs were successively equilibrated in TE⁻⁴ and the appropriate restriction-enzyme buffer.

Repeat Length and Distal Variation

For D4Z4 array sizing, DNA samples were double digested with *EcoRI* and *HindIII* or *EcoRI* and *BlnI* or with *XapI* only. To determine the distal A/B variation at 4qter, DNA was digested with *HindIII*.¹⁸ All digestions were performed according to the manufacturer's instructions. *EcoRI*, *HindIII*, and *XapI* were purchased from MBI Fermentas, and *BlnI* was purchased from GE Healthcare. DNA was separated in a 22-h run on a 0.85% agarose gel (MP agarose [Roche]) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) at 8.5 V/cm in four identical cycles, with a switch time increasing linearly from 1 s at the start to 20 s at the end of each cycle. The run was performed in 0.5 \times Tris/borate/EDTA supplemented with 150 ng/ml ethidium bromide at 23°C.

Restriction Analysis of Proximal D4Z4 Unit

The D4Z4 SNP in the first (proximal) unit of the D4Z4 repeat (AF117653:g.6045G \rightarrow C) was analyzed in genomic DNA samples by a double digestion with *PvuII* and *BlnI*. *PvuII* and *BlnI* were purchased from GE Healthcare. The Southern-blot analysis of the *PvuII* polymorphism with probe p13E-11 (D4F104S1)² reveals chromosome 4–derived fragments of 2,849 bp (C variant, *PvuII*+) or 4,559 bp (G variant, *PvuII*-) in size, depending on the presence or absence of the *PvuII* restriction site, whereas chromosome 10–derived fragments are 2,464 bp because of the presence of a *BlnI* restriction site.⁴

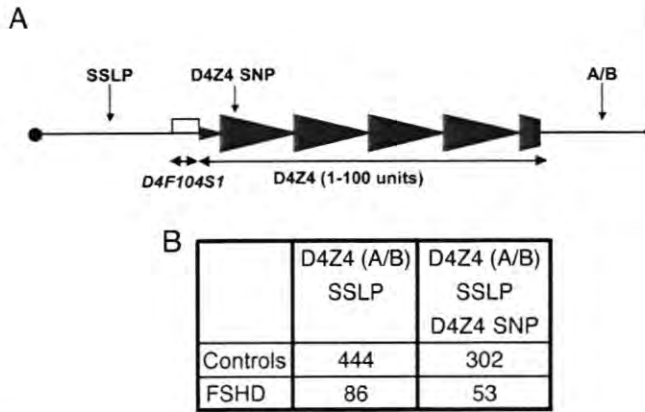


Figure 1. A, Schematic representation of the D4Z4 repeat on chromosomes 4q35 and 10q26 with the localization of the four polymorphic markers used in this study. The SSLP marker is localized 3.5 kb proximal to D4Z4. The D4Z4 SNP, the D4Z4-repeat size variation, and the distal A/B variation have been described elsewhere.^{4,18} The 475-bp *D4F104S1* sequence is localized immediately proximal to D4Z4. B, Overview of the total number of control and patient alleles that were tested for these polymorphisms.

Blotting and Hybridization

After digestion and gel electrophoresis, DNA was transferred to a Hybond XL membrane (GE Healthcare) by Southern blotting. Hybridization was performed in a buffer containing 0.125 M Na_2HPO_4 (pH 7.2), 10% PEG6000, 0.25 M NaCl, 1 mM EDTA, and 7% SDS for 16–24 h at 65°C.

Membranes for D4Z4 sizing were hybridized with probe p13E-11 and were washed in $2 \times$ saline sodium citrate (SSC) and 0.1% SDS. For A/B typing, membranes were sequentially hybridized with probes 4qA or 4qB and were washed in either $1 \times$ SSC and 0.1% SDS (4qA) or $0.3 \times$ SSC and 0.1% SDS (4qB). The linear gels for the *PvuII* polymorphisms in the most proximal D4Z4 unit were hybridized with p13E-11 and were washed in $0.3 \times$ SSC and 0.1% SDS. All membranes were exposed for 16–48 h to phosphorimager screens and were analyzed with the Image Quant software program (Molecular Dynamics).

Genotyping of the SSLP

The SSLP proximal to D4Z4 is localized between positions 1532 and 1694 of AF117653 and was studied by PCR with the use of forward primer 5'-GGTGGAGTTCTGGTTTCAGC-3' and reverse primer 5'-CCTGTGCTTCAGAGGCATTG-3'. For fragment analysis, the forward primer was labeled with HEX. SSLP fragments were amplified using standard PCR methods, and size differences were determined with the use of an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer. Primers were designed using Primer3 software.

Determination of SSLP and *D4F104S1* Sequences

The majority of the SSLP and *D4F104S1* sequences were determined in the somatic cell hybrids and DNA clones described above. For the analysis of the SSLP sequence in other 4qA161 and 4qB163 alleles, so-called monosomic individuals were analyzed. Monosomic individuals carry a translocated chromosome 10-derived D4Z4 repeat on one of their chromosomes 4.²⁰ Se-

quence analysis of the monoallelic DNA sources showed that 10q-derived alleles include an 8-nt insertion in their SSLP sequence that is not present on 4qA161 and 4qB163 alleles. Consequently, DNA digestion in monosomic individuals who carry the 4qA161 or 4qB163 haplotype on their normal chromosome 4, with use of the 8-nt insertion-specific restriction enzyme *FspBI*, allows a discriminative PCR covering each of these SSLP sequences.

The D4Z4 SNP leading to a polymorphic *PvuII* site within D4Z4 was used for the analysis of the SSLP and *D4F104S1* sequence of 4qB162, 4qB166, and 4qB168 alleles. This polymorphic *PvuII* site is present in alleles encompassing the G variant (4qB162, 4qB164, 4qB166, and 4qB168 alleles) and is virtually absent in all other haplotypes. *PvuII* digestion of the alleles carrying the G variant results in a 4,764-bp fragment containing this SSLP sequence, whereas alleles belonging to other haplotypes give rise to restriction fragments of 6,475 bp in size. Therefore, *PvuII*-digested chromosomal DNA from individuals who carry a single allele with the G variant allows the isolation of a gel slice of ~4,764 bp containing the SSLP and *D4F104S1* region. Purified DNA from this gel slice was used in a PCR specific to both regions.

Finally, the SSLP and *D4F104S1* sequences of 4qA166 alleles and the *D4F104S1* sequences of additional 4qA161 alleles were derived from gel slices containing *EcoRI*-digested chromosomal DNA fragments of appropriate size after PFGE analysis. The position of the D4Z4 repeat in the gel was determined using an appropriate molecular size standard (MidRange I PFG Marker [New England Biolabs]), after which the fragments were sliced out of the gel and the DNA was isolated.

For both *PvuII* and *EcoRI* sliced agarose fragments, the DNA was extracted with a gel extraction kit (Machery Nagel Gel Extraction NS Extract II) that allows the extraction of DNA fragments <50 kb. The SSLP sequence was determined with the primers disclosed in the "Genotyping of the SSLP" section. The *D4F104S1* sequence was analyzed using forward primer 5'-CCCAGTTACTGTCTGGTGA-3' and reverse primer 5'-GAAAGCCCCCTGTGGGAG-3'. Primers were designed using Primer3 software.

Statistical Analyses

Differences among major haplogroups with respect to the D4Z4 SNP were tested by means of a nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney test with Monte-Carlo simulation (10,000 randomizations). To obtain a global estimate of D4Z4-repeat number differences among the haplotypes, we used a Kruskal-Wallis test with Monte-Carlo simulation (10,000 randomizations). Both tests were performed using StatXact 4 from Cytel Software. Descriptive statistics (mean, median, and counts) were obtained using the descriptive data-analysis tool included in Microsoft Excel.

Results

Allelic Subdivision of 4q Subtelomere

We demonstrated elsewhere that mitotic D4Z4 rearrangements occur at a much higher frequency intrachromosomally than interchromosomally.⁴ Furthermore, the apparent suppression of recombination between 4qA and 4qB type alleles was confirmed by the different distribution of a SNP within the proximal D4Z4-repeat unit on 4qA and 4qB chromosome ends.⁴ In this study, the sequence variation within the FSHD locus was further analyzed using four different polymorphisms (fig. 1A). Proximal to D4Z4, we identified a novel, relatively stable SSLP

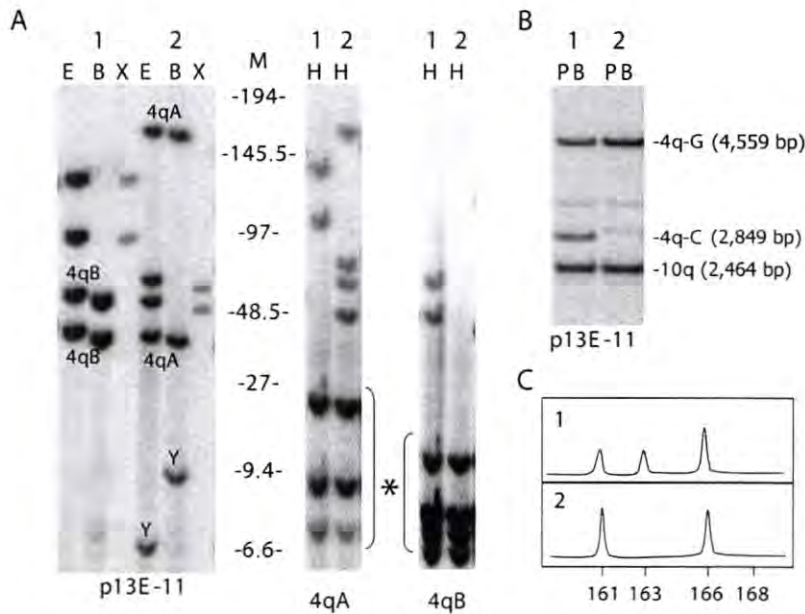


Figure 2. Examples of D4Z4 genotyping, including the three polymorphic markers in control individual (1) and FSHD-affected patient (2). *A*, D4Z4 sizing and A/B typing after PFGE and Southern blotting. For D4Z4 sizing, DNA was digested with restriction enzymes *EcoRI* and *HindIII* (lane E), *EcoRI* and *BlnI* (lane B), or *XapI* (lane X), and the blotted DNA was hybridized with probe p13E-11 located immediately proximal to D4Z4 (left panel). The four fragments present in lane E represent two 4q- and two 10q-derived repeat arrays with different repeat sizes. The 4q or 10q origin of the D4Z4 repeats can be determined by digestions with *BlnI* or *XapI*, which fragmentize 10q- or 4q-derived repeat arrays, respectively. Consequently, individual 1 carries 4q D4Z4 repeats of 40 kb and 55 kb and 10q repeats of 95 kb and 130 kb, whereas individual 2 carries 4q alleles of 35 kb and 165 kb and 10q repeats of 50 kb and 65 kb. For A/B typing, DNA was digested with *HindIII* (lane H) and was hybridized serially with probes 4qA and 4qB, located immediately distal to D4Z4 (right panel). Both 4q alleles (40 kb and 55 kb) in individual 1 carry the B variant, and both 4q alleles (35 kb and 165 kb) in individual 2 carry the A variant. As was shown elsewhere, 10q alleles almost always carry the A variant.¹⁸ The molecular weight marker (M) in kilobases is shown in the middle. Cross-hybridizing Y-chromosome-derived fragments with probe p13E-11 in individual 2 (male) are indicated with "Y." Non-4q and -10q cross-hybridizing fragments with probes 4qA and 4qB are marked with an asterisk (*). *B*, Analysis of the G/C SNP within D4Z4 (for description, see the work of Lemmers et al.⁴). Double digestion of genomic DNA with *PvuII* and *BlnI* (PB) reveals 10q fragments of 2,464 bp upon hybridization with p13E-11. 4q alleles reveal fragments of either 4,559 bp or 2,849 bp, depending on the presence (C variant) or absence (G variant) of the *PvuII* restriction site in D4Z4, respectively. One 4qB allele in individual 1 contains the C variant, whereas all other 4q alleles in both individuals carry the G variant. *C*, Example of the fragment run of the SSLP sequence. Altogether, this analysis demonstrates that individual 1 carries a 4qB161 and a 4qB163 allele next to the two 10qA166 alleles and that individual 2 carries two 4qA161 alleles and two 10qA166 alleles.

that was shown to be moderately polymorphic on 4q and 10q alleles. In the D4Z4 repeat, the D4Z4 SNP within the most proximal unit was analyzed. Furthermore, the length of the repeat array was determined in addition to the distal A/B variation. All these analyses were done using Southern blotting (for D4Z4 length, A/B variation, and D4Z4 SNP) or PCR (for SSLP variation). In total, 222 independent control individuals and 86 independent patients with FSHD were analyzed for the D4Z4-repeat size, the A/B polymorphism, and the SSLP variation. Of these individuals, 151 controls and 53 patients with FSHD were also analyzed for the D4Z4 SNP (fig. 1B). An example of the genotyping of 4qter and 10qter alleles in two unrelated individuals is depicted in figure 2. Figure 2A shows the analysis of the D4Z4 size variation and determination of the A/B polymorphism by PFGE. Figure 2B shows Southern-blot analysis of the D4Z4 SNP, and figure 2C shows the results of the SSLP analysis by PCR in the same individuals.

The size of the SSLP sequence was next established in six independent 10q sequences from GenBank (accession numbers AL845259, AY028079, BX649463, BX294170, BX005259, and AL954635) and three monoallelic DNA sources (M&M), and they were found to be 165 bp without sequence variation (fig. 3). Further analysis showed that the peak at 166 bp in the SSLP fragment run represents the 165-bp 10q fragment and that the running pattern is disturbed by a specific 8-nt sequence within this SSLP (see below).

After analysis of all alleles with the above-described markers, all alleles from the control individuals were categorized and counted. An overview of the different 4q and 10q haplotypes is depicted in figure 4B. On the basis of the proximal SSLP, 4qA alleles ($n = 200$) are able to be subdivided into three haplotypes (4qA161, 4qA163, and 4qA166). Of these haplotypes, 4qA161 is the most prevalent (86%). All but one 4qA allele analyzed for the D4Z4

4q sources

	Haplotype	SSLP sequence				D4Z4 SNP		4qA/4qB
		CA _n -MA-CA _n	G/T	CT _n	8 nt	(G/C)	D4Z4	
λ.42	4qA161	CA ₁₀ -AA-CA ₁₀	G	CT ₈	-	G	15	A
λ.68	4qA161	CA ₁₀ -AA-CA ₁₀	G	CT ₈	-	G	15	A
λ.260201	4qA161	CA ₁₀ -AA-CA ₁₀	G	CT ₈	-	G	17	A
SU10	4qA161	CA ₁₀ -AA-CA ₁₀	G	CT ₈	-	G	10	A
HHW1494	4qA161	CA ₁₀ -AA-CA ₁₀	G	CT ₈	-	G	20	A
4L-10	4qB163	CA ₁₀ -AA-CA ₁₁	G	CT ₈	-	G	85	B
HHW416	4qB163	CA ₁₀ -AA-CA ₁₁	G	CT ₈	-	G	96	B
GM11687	4qB168	CA ₁₉	T	CT ₇	+	C	140	B

10q sources

	Haplotype	SSLP sequence				D4Z4 SNP		4qA/4qB
		CA _n -MA-CA _n	G/T	CT _n	8 nt	(G/C)	D4Z4	
GM11688	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	60	A
762-8A	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	120	A
C85	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	27	A
AL845259	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	-	-
AL954635	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	-	-
AY028079	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	-	-
BX649463	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	-	-
BX294170	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	-	-
BX005259	10qA166	CA ₉ -AA-CA ₈	T	CT ₇	+	G	-	-

Figure 3. Haplotype analyses of individual 4q and 10q DNA sources, of which the last six 10q sequences are obtained from GenBank. The identity of the DNA source is shown in the first column. The haplotype and the SSLP sequence are listed in columns 2 and 3, whereas the D4Z4 SNP is shown in column 4. The last two columns display the D4Z4-repeat length (in kb) and the distal variation.

SNP (127 of 128) carry the G variant of the D4Z4 SNP. 4qB alleles ($n = 244$) are more polymorphic for the proximal SSLP and are able to be subdivided into six haplotypes: 4qB161 (2%), 4qB162 (5%), 4qB163 (68%), 4qB164 (1%), 4qB166 (3%), and 4qB168 (21%). The 4qB163 haplotype represents the most common haplotype, and the majority of the alleles within this haplotype (107 of 108) have the G variant of the D4Z4 SNP. In the small number of 4qB161 alleles ($n = 4$), we found only the G variant of the D4Z4 SNP. By contrast, almost all alleles belonging to other 4qB haplotypes (61 of 62) carry the C variant of the D4Z4 SNP. There is a significant difference in distribution of the D4Z4 SNP between 4qA and 4qB haplotypes ($P < .0001$) and between 4qB163 and 4qB162, 4qB166, and 4qB168 haplotypes ($P < .0001$). 10q alleles seemed more homogeneous than 4q alleles and were subdivided into the haplotypes 10qA166 (96%) and 10qA164 (4%). All GenBank 10qA166 sequences mentioned above and monoallelic 10qA166 sources show the G variant in D4Z4 (fig. 3).

The almost invariable presence of the 166-bp SSLP on chromosome 10 was concluded from segregation analysis in a subset of families with FSHD ($n = 52$ segregations) and from the observation that, on SSLP analysis, individuals homozygous for 4qA ($n = 41$) invariably presented with a peak of double intensity at 166 bp (10qA166), in addition to peaks of single or double intensity at 161 bp

(4qA161) or 163 bp (4qA163) or increased intensity of the peak at 166 bp (4qA166).

FSHD Alleles and Individual 4q Sources

Since contractions of the D4Z4 repeat on 4qA alleles are associated with FSHD, carriers of a pathogenic D4Z4 repeat were also studied for these four polymorphisms. In total, 86 independent FSHD alleles were analyzed, and all were shown to belong to the 4qA161 haplotype, on the basis of the SSLP and the distal A/B variation. Of these alleles, 53 were analyzed for the D4Z4 SNP, and all carried the G variant.

In addition, eight monosomic 4q sources were completely genotyped (fig. 3). Five 4qA sources that represent pathogenic alleles from patients with FSHD display the characteristics of the 4qA161 haplotype. Furthermore, three monochromosomal rodent somatic cell hybrids that carry 4qB alleles were analyzed and were shown to belong to the 4qB163 and 4qB168 haplotypes.

Nonpathogenic 4q Haplotypes

It was surprising that all 86 FSHD alleles analyzed belong to the 4qA161 haplotype (fig. 4C). No FSHD alleles that belong to the 4qA166 haplotype were found, even though they represent 11% of the total 4qA alleles in control in-

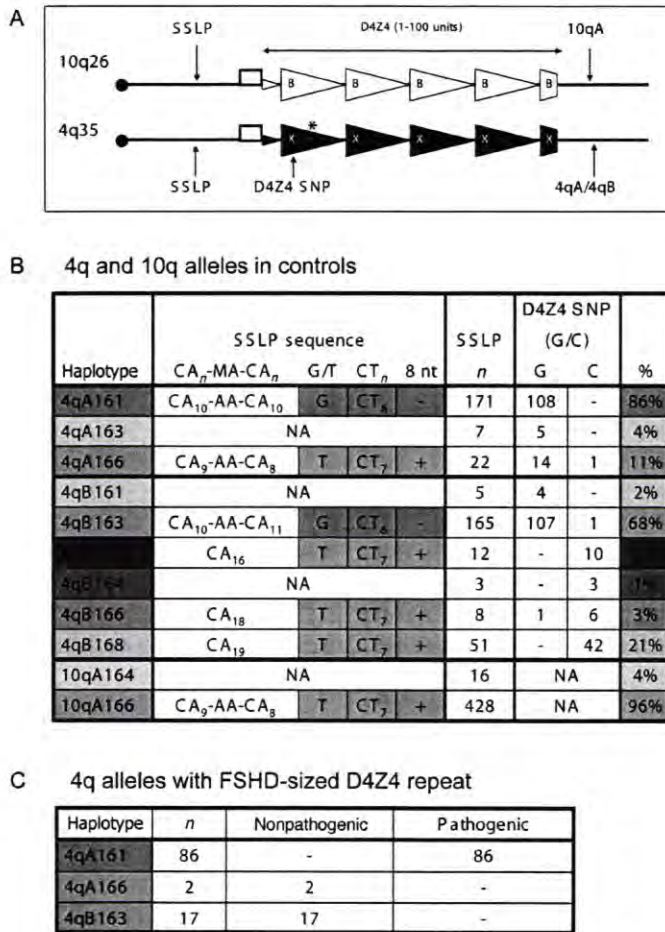


Figure 4. Overview of the different haplotypes that were defined after complete genotyping of 4qA, 4qB, and 10q alleles. **A**, All D4Z4-repeat units on 10q alleles encompass the *BlnI* restriction site (B), which is absent in D4Z4 in all 4q alleles. Likewise, all D4Z4-repeat units on 4q alleles encompass the *XapI* restriction site (X) that is absent in D4Z4-repeat units on 10q alleles, except for D4Z4 repeats in the 4qA166 haplotype, which lack the *XapI* restriction site in their most proximal D4Z4 unit (indicated with an asterisk [*]). **B**, Genotyping of 4q and 10q alleles in control individuals. The first column lists the different haplotypes that have been identified, and the second shows the sequence of the SSLP in each haplotype (M = A or C). Those haplotypes for which we could not obtain SSLP sequence information are indicated by "NA" (not analyzed). The third and fifth columns represent, respectively, the number of alleles found in each haplotype (SSLP *n*) and the prevalence (%) of each haplotype among 4qA, 4qB, and 10q alleles. The distribution of the G and C variants in the D4Z4 SNP is shown in the fourth column (D4Z4 SNP (G/C)). In total, 200 4qA alleles were genotyped, and, on the basis of SSLP length, they were subdivided into three haplotypes: 4qA161, 4qA163, and 4qA166. 4qB alleles (*n* = 244) were subdivided into six haplotypes, designated as 4qB161, 4qB162, 4qB163, 4qB164, 4qB166, and 4qB168, and 10q alleles into haplotypes 10qA166 and 10qA164. There is a significant difference in D4Z4 SNP distribution between 4qA and 4qB haplotypes (*P* < .0001) and between 4qB163 and 4qB162, 4qB166, and 4qB168 haplotypes (*P* < .0001). **C**, Genotyping of alleles with an FSHD-sized D4Z4 repeat. Without exception, all FSHD alleles belong to the 4qA161 haplotype. All alleles with an FSHD-sized repeat that belong to the 4qA166 or 4qB163 haplotypes are nonpathogenic.

dividuals. However, we identified two patients from independent families with FSHD in whom we found evidence of the nonpathogenicity of D4Z4 contractions on 4qA166 alleles. Both of them carried 4qA166 alleles having D4Z4-repeat sizes in the pathogenic range, in addition to an FSHD-sized 4qA161 D4Z4 repeat. This latter allele we considered to be pathogenic, on the basis of its cosegregation with disease.

Family Rf10 is a 3-generation FSHD-affected family with patients who are moderately affected (fig. 5). The pre-

vious molecular diagnosis of this family was very complex because the 33-kb (8 D4Z4 units) 4qA allele was detected not only in the affected family members but also in a healthy spouse (individual II-9). Our current study reveals that this healthy spouse carries a 33-kb 4qA166 allele, whereas a 33-kb 4qA161 allele was detected in all patients with FSHD in this family, indicating its causal relation to disease. Additional genotyping of the family of individual II-9 showed that his brother (II-11) also carries the 33-kb 4qA166 allele and is not affected with FSHD.

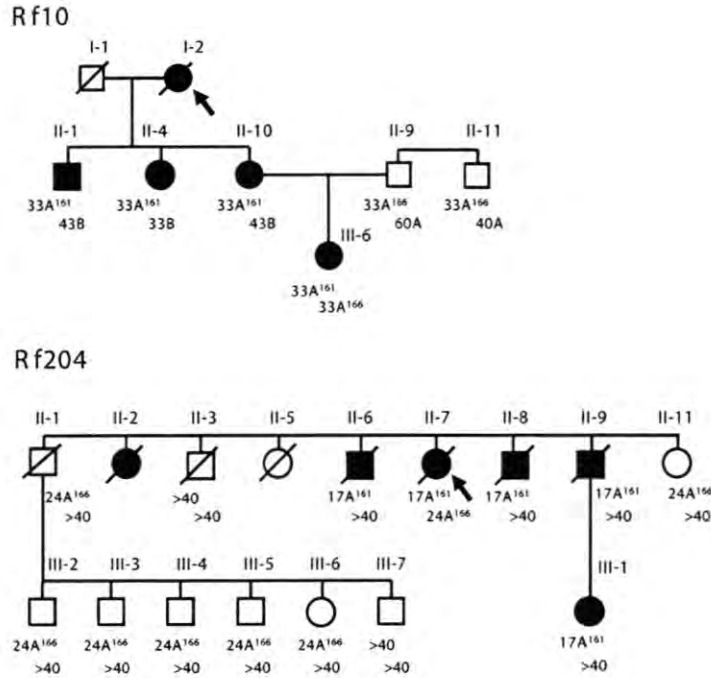


Figure 5. Pedigrees of FSHD-affected families Rf10 and Rf204. The patients with FSHD in family Rf10 carry a 33-kb 4qA161 ($33A^{161}$) allele and are moderately affected. Individuals II-9 and II-11 carry a 33-kb 4qA166 ($33A^{166}$) allele and do not display any clinical signs of muscular dystrophy. In family Rf204, all patients with FSHD carry a 17-kb 4qA161 ($17A^{161}$) allele and are moderately to severely affected. Six individuals carry an FSHD-sized allele of 24 kb ($24A^{166}$), which belongs to the 4qA166 haplotype, and they are not affected (II-11, III-2, III-3, III-4, III-5, and III-6). Index cases are indicated with an arrow.

In family Rf204, a 17-kb (3 D4Z4 units) 4qA161 allele is causing FSHD. The patients of this family are moderately to severely affected. A second FSHD-sized allele (24 kb, 5 D4Z4 units) in this family has been reported elsewhere¹⁹ but was now shown to belong to the 4qA166 haplotype. Although D4Z4 repeats of 24 kb on 4qA alleles would be expected from prior information to cause FSHD, six individuals (II-11, III-2, III-3, III-4, III-5, and III-6) who carry this allele have no clinical signs of muscular dystrophy. Only one individual (II-7) who carries this allele developed FSHD, but she also carries the 17-kb pathogenic 4qA161 allele.

In addition to these nonpathogenic D4Z4 contractions on 4qA166 alleles, we further substantiated our previous observation that contractions on 4qB alleles do not cause FSHD.²¹ At present, we identified 17 FSHD-sized D4Z4 repeats on 4qB alleles in independent individuals. In line with previous findings on 4 of these alleles, none of these 17 alleles were shown to be pathogenic. We determined the haplotype of 13 of these nonpathogenic alleles and showed that they all belong to the 4qB163 haplotype (fig. 4C).

Haplotype-Specific Sequences

To find further evidence of the accumulation of haplotype-specific sequence variations at 4qter, we determined the sequence of the SSLP and a 475-bp fragment in

D4F104S1 in the different haplotypes. To this end, the SSLP and *D4S104F1* fragment were PCR amplified and were sequenced in at least three independent sources of the most common 4q and 10q haplotypes. As shown in figure 6, each haplotype analyzed is defined by a unique combination of 15 SNPs within the *D4F104S1* fragment.

The SSLP was shown to consist of a number of short, rather stable microsatellite repeats (CA and CT). In addition, the SSLP contains an A/C SNP, a G/T SNP, and a polymorphic insertion of 8 nt (fig. 4B). On the basis of these results, the 10qA166 haplotype can be distinguished from the most abundant 4q haplotypes (4qA161 and 4qB163) by the presence of SNP variant T, a CT stretch of 7 instead of 6 dinucleotides, and the presence of the 8-nt insertion.

On the basis of the SSLP sequence, most haplotypes can now be distinguished from each other. Similar to the 10qA166 SSLP sequence, other alleles that carry the 8-nt insertion (4qA166, 4qB162, 4qB166, and 4qB168) were also shown to be 1 nt smaller on sequencing than in the SSLP fragment run.

In retrospect, we carefully reanalyzed D4Z4 sizing by PFGE of 4qA166 alleles with restriction enzymes *EcoRI/HindIII*, *EcoRI/BlnI*, and *XapI*. In total, we analyzed 15 different 4qA166 alleles and observed that, as expected, all D4Z4 units lack the *BlnI* restriction site within their repeats, as is characteristic of 4q repeats (data not shown). Remarkably, all these alleles also lack the *XapI* restriction

```

4qA161      AGCCGAGACTTCATCAAATTTCTGCACCAATGAAAAAAAAATTTACAAGAGAAAAACAAA
4qB163      AGCCGAGACTTCATCAAATTTCTGCACCAATGAAAAAAAAATTTACAAGAGAAAAACAAA
4qA166      AGCCGAGACTTCATCAAATTTCTGCAGCAATGAAAAAAAAATTTACAAGAGAAAAACAAA
10qA166     AGCCGAGACTTCATCAAATTTCTGCAGCAATGAAAAAAAAATTTACAAGAGAAAAACAAA
4qB168      AGCCGAGACTTCATCAAATTTCTGCAGCAATGAAAAAAAAATTTACAAGAGAAAAACAAA
*****

4qA161      AACCTATTAAACGTCACGGACAAGGCCAGAGTTTGAATATACTGTGGTCATCTCTCGCTC
4qB163      AACCTATTAAACGTCACGGACAAGGCCAGAGTTTGAATATACTGTGGTCATCTCTCGCTC
4qA166      AACCTATTAAACGTCACGGACAAGGCCAGAGTTTGAATATACTGTGGTCATCTCGCTC
10qA166     AACCTATTAAACGTCACGGACAAGGCCAGAGTTTGAATATACTGTGGTCATCTCGCTC
4qB168      AACCTATTAAACGTCACGGACAAGGCCAGAGTTTGAATATACTGTGGTCATCTCGCTC
*****

4qA161      CAGTGCAAACGTGTTTCAGAAAGCCTACTGCTATTTTCCTTGCTGTAACAGAGGAACATT
4qB163      CAGTGCAAACGTGTTTCAGAAAGCCTACTGCTATTTTCCTTGCTGTAACAGAGGAACATT
4qA166      CAGTGCAAACGTGTTTCAGAAAGCCTGCTTTATTTTCCTTGCTGTAACAGAGGAACATT
10qA166     CAGTGCAAACGTGTTTCAGAAAGCCTGCTTTATTTTCCTTGCTGTAACAGAGGAACATT
4qB168      CAGTGCAAACGTGTTTCAGAAAGCCTGCTTTATTTTCCTTGCTGTAACAGAGGAACATT
*****

4qA161      TCCTGTCTTATGCTTATTCTACTCTGCAATCCCCTAAGGCTTTTTCTCTCCCTCCCAGAA
4qB163      TCCTGTCTTATGCTTATTCTACTCTGCAATCCCCTAAGGCTTTTTCTCTCCCTCCCAGAA
4qA166      TCCTGTCTTATGCTTATTCTACTCTGCAATCCCCTAAGGCTTTTTCTCTCCCTCCCAGAA
10qA166     TCCTGTCTTATGCTTATTCTACTCTGCAATCCCCTAAGGCTTTTTCTCTCCCTCCCAGAA
4qB168      TCCTGTCTTATGCTTATTCTACTCTGCAATCCCCTAAGGCTTTTTCTCTCCCTCCCAGAA
*****

4qA161      TCTTAAAGTGCATTCGAAGTACAGGCAAAATCCTCCAGAACTTGTGAGAACATAAAT
4qB163      TCTTAAAGTGCATTCGAAGTACAGGCAAAATCCTCCAGAACTTGTGAGAACATAAAT
4qA166      TCTTAAAGTGCATTCGAAGTACAGGCAAAATCCTCCAGAACTTGTGAAAACATAAAT
10qA166     TCTTAAAGTGCATTCGAAGTACAGGCAAAATCCTCCAGAACTTGTGAAAACATAAAT
4qB168      TCTTAAAGTGCATTCGAAGTACAGGCAAAATCCTCCAGAACTTGTGAAAACATAAAT
*****

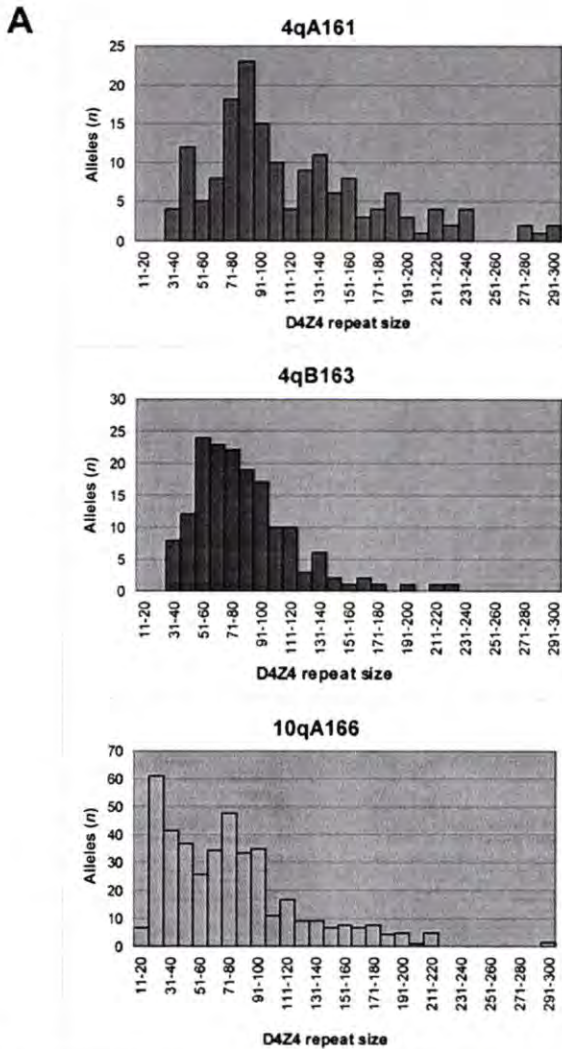
4qA161      GATCTGACTAGTTTGGCATTGCTTTTGGGGATCTGGGAAAATCTGTGCACACTTCTGGAG
4qB163      GATCTGACTAGTTTGGCATTGCTTTTGGGGATCTGGGAAAATCTGTGCACACTTCTGGAG
4qA166      GATCTGACTAGTTTGGCATTGCTTTTGGGGATCTGGGAAAATCTGTGCACACTTCTGGAG
10qA166     GATCTGACTAGTTTGGCATTGCTTTTGGGGATCTGGGAAAATCTGTGCACACTTCTGGAG
4qB168      GATCTGACTAGTTTGGCATTGCTTTTGGGGATCTGGGAAAATCTGTGCACACTTCTGGAG
*****

4qA161      ACCCTTGTCATGCCATTTTATAAAATCTATTGTGCCTCAAGTCAGAAGTGTGTGAGGGG
4qB163      ACCCTTGTCATGCCATTTTATAAAATCTATTGTGCCTCAAGTCAGAAGTGTGTGAGGGG
4qA166      ACCCTTGTCAGGCCATTTTATAAAATCTATTGTGCCTCAAGTCAGAAGTGTGTGAGGGG
10qA166     ACCCTTGTCAGGCCATTTTATAAAATCTATTGTGCCTCAAGTCAGAAGTGTGTGAGGGG
4qB168      ACCCTTGTCAGGCCATTTTATAAAATCTATTGTGCCTCAAGTCAGAAGTGTGTGAGGGG
*****

4qA161      AGATGGGGAGACATTGGGATGCGCGCGCTGGGGCTCTCCACAGGGGGCTTTCG
4qB163      AGATGGGGAGACATTGGGATGCGCGCGCTGGGGCTCTCCACAGGGGGCTTTCG
4qA166      AGATGGGGAGACATTGGGATGCGCGCGCTGGGGCTCTCCACAGGGGGCTTTCG
10qA166     AGATGGGGAGACATTGGGATGCGCGCGCTGGGGCTCTCCACAGGGGGCTTTCG
4qB168      AGATGGGGAGACATTGGGATGCGCGCGCTGGGGCTCTCCACAGGGGGCTTTCG
*****

```

Figure 6. Alignment of a 475-bp consensus sequence within *D4F104S1* of the most common haplotypes (4qA161, 4qB163, 4qA166, 4qB168, and 10qA166). The consensus is based on the sequence of at least three independent alleles for each specific haplotype. The highlighted nucleotides indicate the presence of haplotype-specific SNPs. Similar to the SLP, the 4qB163 sequence is very homologous to the pathogenic 4qA161 sequence, whereas the 4qA166 sequence is more homologous to the 10qA166 and 4qB168 sequences.



B

	4qA161	4qB163	10qA166
MEAN	119.28	86.23	79.13
MEDIAN	100	75	71
<i>n</i>	165	159	420

Figure 7. A, Overview of D4Z4-repeat length distribution in the most common haplotypes, 4qA161, 4qB163, and 10qA166. Statistical analysis revealed that the D4Z4-repeat size distributions differ significantly between these haplotypes ($P < .0001$). B, Mean and median of the D4Z4-repeat length and number of alleles in the major haplotypes.

site in their first unit. This insensitivity for *BlnI* and *XapI* in the first repeat unit of the D4Z4 repeat could not be observed in alleles of the other 4q haplotypes. Since the *XapI* restriction site is localized 2.7 kb distal to *D4F104S1*, this finding suggests the presence of additional haplotype-specific sequence variations in D4Z4 and reinforces our

interpretation of the LD extending into the D4Z4-repeat unit.

D4Z4-Repeat Size Distribution

Finally, the D4Z4-repeat size distribution was studied in the different haplotypes. It was shown elsewhere that both 4q and 10q alleles display a multimodal repeat size distribution.²⁰ Because of a limited number of alleles in the low-abundance haplotypes, the size distribution was analyzed only for the most common types on chromosomes 4 and 10. This analysis showed that these haplotypes show a significantly different distribution ($P < .0001$) of D4Z4-repeat sizes (fig. 7A). In addition, the mean and median of the different D4Z4 alleles were calculated for these haplotypes (fig. 7B). The observed sequence variations in the SLP and *D4F104S1* sequences and the differences in the mean and median D4Z4-repeat size and size distribution corroborate the concept that the different haplotypes have evolved independently of each other.

Discussion

Contractions of the macrosatellite repeat D4Z4 cause FSHD, but the molecular mechanism underlying this myopathy is largely unknown. Transcription emanating from D4Z4 has never been consistently established, which led to different disease models in which the contraction of D4Z4 causes a change in chromatin conformation and loss of spatiotemporal control over gene expression in *cis* or in *trans*.⁷⁻¹³ However, none of these models can comprehensively explain the epigenetic mechanisms underlying FSHD.

To study the role of D4Z4 in the pathogenesis of FSHD, allelic variants of the D4Z4 region have been analyzed. Previously,¹⁶ D4Z4 repeats were detected on three different chromosome ends—on two variants of chromosome 4 (4qA and 4qB) and on chromosome 10q. In addition, a polymorphic sequence variation within D4Z4 on 4qB alleles suggested the existence of additional allelic D4Z4 variants.¹⁸ The aim of this study was to investigate the allelic variation in D4Z4 alleles in relation to the 4qA specificity of FSHD. Therefore, we examined sequence variations on 4qA, 4qB, and 10q chromosomes, by analyzing four different polymorphic markers in patients and controls of European descent. The markers are localized proximal to (for SLP), within (for D4Z4 SNP and D4Z4-repeat number variation), and distal to (for A/B) the D4Z4 repeat.

As shown in figure 4B, we were able to unequivocally subdivide all 4qter and 10qter chromosomes in nine different 4q and two distinct 10q haplotypes. The presence of rare alleles within a haplotype that carry a D4Z4 SNP variant different from the majority of alleles indicates that exchanges between the different haplotypes do occur but at a very low frequency and supports the observation that D4Z4 contractions generally occur intrachromosomally.⁴

Subsequently, we stratified for alleles with D4Z4-repeat

sizes <38 kb, which usually fall into the pathogenic range (fig. 4C).^{18,21} In total, 86 FSHD alleles were analyzed, and all could be assigned to the 4qA161 haplotype. Importantly, in two independent families (Rf10 and Rf204), we were able to show the presence of 4qA166-type FSHD-sized D4Z4 repeats in multiple unaffected relatives, indicating that these alleles are nonpathogenic. Finally, we identified 17 FSHD-sized D4Z4 repeats on 4qB alleles, which were all nonpathogenic. Further genotyping of these short 4qB alleles showed that they all belong to the 4qB163 haplotype. These two findings show that D4Z4 contractions alone are insufficient to cause disease.

Sequence comparison of the SSLP and *D4F104S1* sequences in the different haplotypes showed the presence of only a few consistent sequence variations between the nonpathogenic 4qB163 and the pathogenic 4qA161 haplotypes. In alleles from the nonpathogenic 4qA166 haplotype, we observed the absence of the *XapI* restriction site in the proximal D4Z4-repeat unit, a feature characteristic of chromosome 10-derived repeat units and not observed in other 4q haplotypes. Furthermore, 4qA166 and 10qA166 haplotypes share high sequence similarities in their SSLP and *D4F104S1* sequences, which differ considerably from the sequence of the 4qA161 haplotype (figs. 4 and 6).

Previously, the nonpathogenicity of FSHD-sized D4Z4 repeats on chromosome 10 was explained by its chromosomal context: only the transcriptional activity of genes on 4q, not that of genes on 10q, would be sensitive to D4Z4-repeat contractions. Moreover, the A/B variation distal to D4Z4 was thought to play a role in the nonpathogenicity of short 4qB alleles. This study shows that neither of these explanations comprehensively addresses the unique association of FSHD with D4Z4 contractions on specific haplotypes, since 4qA166 alleles are now shown to be nonpathogenic as well.

Apparently, because of suppression of interchromosomal rearrangements, each haplotype evolves relatively independently, which allows the accumulation of haplotype-specific sequence variations that may underlie the 4qA161 specificity of FSHD. These sequence variations may be important for the chromatin structure or transcriptional characteristics of the 4q subtelomere and changes thereof in FSHD and must be located close to (distal or proximal) or within D4Z4.

Interestingly, the region immediately proximal to D4Z4 has been implicated to function as a nuclear matrix attachment region (MAR) separating the D4Z4 repeat and upstream genes in two DNA loops.²² This MAR was shown to be weakened on one chromosome 4 in FSHD myoblasts, suggesting the coexistence of the contracted D4Z4 repeat and upstream genes in a single DNA loop on disease chromosomes. It was postulated that these differences in loop organization may account for the transcriptional deregulation of the upstream genes *FRG1* and *FRG2* in FSHD.¹⁰ Since we found haplotype-specific sequence variations in the region coinciding with this MAR, it will be interesting

to study the functionality of the MAR in the different haplotypes and to determine whether the MAR weakening in contracted alleles is specific to the 4qA161 haplotype.

Alternatively, D4Z4 homologues recently have been identified in the genomes of rodents and Afrotheria.²³ The hypothetical *DUX4* gene was shown to be conserved during evolution, which might support a coding function for D4Z4. Therefore, it is eminent to further investigate the presence of haplotype-specific sequence variations in *DUX4* in relation to FSHD.

Altogether, our study demonstrates that the subtelomeric region of chromosome 4q35 can be divided into nine different haplotypes. Our data strongly support the hypothesis that interchromosomal repeat exchanges between the different 4q haplotypes are rare, which allows each of the haplotypes to accumulate specific sequence variations. Only D4Z4 contractions in specific haplotypes, most notably 4qA161, seem to be associated with FSHD. Therefore, future research should be focused on identifying consistent sequence variations for the different haplotypes, since these variations may be essential to FSHD pathogenesis.

Acknowledgments

We thank patients with FSHD and their relatives for participating in our studies. This study was supported by grants from the FSH Society, Muscular Dystrophy Association grant 3793, and Netherlands Organization for Scientific Research grant NWO 016.056.338.

Web Resources

Accession numbers and URLs for data presented herein are as follows:

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> (for SSLP sequences [accession numbers AF117653, AL845259, AY028079, BX649463, BX294170, BX005259, and AL954635])

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/> (for FSHD1A)

Primer3, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

References

1. Padberg GW (1982) Facioscapulohumeral disease. Leiden University, Leiden
2. Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, Gruter AM, Hofker MH, Moerer P, Williamson R, et al (1992) Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 2:26–30
3. van Deutekom JC, Wijmenga C, van Tienhoven EA, Gruter AM, Hewitt JE, Padberg GW, van Ommen GJ, Hofker MH, Frants RR (1993) FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. *Hum Mol Genet* 2:2037–2042
4. Lemmers RJ, van Overveld PG, Sandkuijl LA, Vrieling H, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2004) Mechanism and timing of mitotic rearrangements in the subtelomeric D4Z4 repeat involved in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 75:44–53

5. Hewitt JE, Lyle R, Clark LN, Valleley EM, Wright TJ, Wijmenga C, van Deutekom JC, Francis F, Sharpe PT, Hofker M, et al (1994) Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 3:1287-1295
6. Winokur ST, Bengtsson U, Feddersen J, Mathews KD, Weif-
enbach B, Bailey H, Markovich RP, Murray JC, Wasmuth JJ, Altherr MR, et al (1994) The DNA rearrangement associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy involves a heterochromatin-associated repetitive element: implications for a role of chromatin structure in the pathogenesis of the disease. *Chromosome Res* 2:225-234
7. Gabriels J, Beckers MC, Ding H, De Vriese A, Plaisance S, van der Maarel SM, Padberg GW, Frants RR, Hewitt JE, Collen D, et al (1999) Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. *Gene* 236:25-32
8. Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM (2003) Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet* 12:2895-2907
9. Alexiadis V, Ballestas ME, Sanchez C, Winokur S, Vedanarayanan V, Warren M, Ehrlich M (2007) RNAPol-ChIP analysis of transcription from FSHD-linked tandem repeats and satellite DNA. *Biochim Biophys Acta* 1769:29-40
10. Gabellini D, Green M, Tupler R (2002) Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 110:339-248
11. Jiang G, Yang F, van Overveld PG, Vedanarayanan V, van der MS, Ehrlich M (2003) Testing the position-effect variegation hypothesis for facioscapulohumeral muscular dystrophy by analysis of histone modification and gene expression in subtelomeric 4q. *Hum Mol Genet* 12:2909-2921
12. Masny PS, Bengtsson U, Chung SA, Martin JH, van Engelen B, van der Maarel SM, Winokur ST (2004) Localization of 4q35.2 to the nuclear periphery: is FSHD a nuclear envelope disease? *Hum Mol Genet* 13:1857-1871
13. van Overveld PG, Lemmers RJ, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM (2003) Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 35:315-317
14. Bakker E, Wijmenga C, Vossen RH, Padberg GW, Hewitt J, van der Wielen M, Rasmussen K, Frants RR (1995) The FSHD-linked locus D4F104S1 (p13E-11) on 4q35 has a homologue on 10qter. *Muscle Nerve* 2:S39-S44
15. Deidda G, Cacurri S, Piazzo N, Felicetti L (1996) Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *J Med Genet* 33:361-365
16. van Geel M, Dickson MC, Beck AF, Bolland DJ, Frants RR, van der Maarel SM, de Jong PJ, Hewitt JE (2002) Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin. *Genomics* 79:210-217
17. Lemmers RJL, de Kievit P, van Geel M, van der Wielen MJ, Bakker E, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2001) Complete allele information in the diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy by triple DNA analysis. *Ann Neurol* 50:816-819
18. Lemmers RJ, de Kievit P, Sandkuijl L, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM (2002) Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. *Nat Genet* 32:235-236
19. Wohlgenuth M, Lemmers RJ, van der Kooi EL, van der Wielen MJ, van Overveld PG, Dauwerse H, Bakker E, Frants RR, Padberg GW, van der Maarel SM (2003) Possible phenotypic dosage effect in patients compound heterozygous for FSHD-sized 4q35 alleles. *Neurology* 61:909-913
20. van Overveld PG, Lemmers RJ, Deidda G, Sandkuijl L, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2000) Interchromosomal repeat array interactions between chromosomes 4 and 10: a model for subtelomeric plasticity. *Hum Mol Genet* 9:2879-2884
21. Lemmers RJ, Wohlgenuth M, Frants RR, Padberg GW, Morava E, van der Maarel SM (2004) Contractions of D4Z4 on 4qB subtelomeres do not cause facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 75:1124-1130
22. Petrov A, Pirozhkova I, Carnac G, Laoudj D, Lipinski M, Vassetzky YS (2006) Chromatin loop domain organization within the 4q35 locus in facioscapulohumeral dystrophy patients versus normal human myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6982-6987
23. Clapp J, Mitchell LM, Bolland DJ, Fantes J, Cornocan AE, Scotting PJ, Armour JA, Hewitt JE (2007) Evolutionary conservation of a coding function for D4Z4, the tandem DNA repeat mutated in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 81:264-279

Hybridization analysis of D4Z4 repeat arrays linked to FSHD

Melanie Ehrlich · Kesmic Jackson · Koji Tsumagari · Pilar Camaño · Richard J. F. L. Lemmers

Received: 1 May 2006 / Revised: 18 August 2006 / Accepted: 22 August 2006 / Published online: 28 November 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is an autosomal dominant disease involving shortening of D4Z4, an array of tandem 3.3-kb repeat units on chromosome 4. These arrays are in subtelomeric regions of 4q and 10q and have 1–100 units. FSHD is associated with an array of 1–10 units at 4q35. Unambiguous clinical diagnosis of FSHD depends on determining the array length at 4q35, usually with the array-adjacent p13E-11 probe after pulsed-field or linear gel electrophoresis. Complicating factors for molecular diagnosis of FSHD are the phenotypically neutral 10q D4Z4 arrays, cross-hybridizing sequences elsewhere in the genome, deletions including the genomic p13E-11 sequence and part of D4Z4, translocations between 4q and 10q D4Z4 arrays, and the extremely high G+C content of D4Z4 arrays (73%). In this study, we optimized conditions for molecular diagnosis of FSHD with a 1-kb D4Z4 subfragment probe after hybridization with p13E-11. We demonstrate that these hybridization conditions allow the identification of FSHD alleles with deletions of the genomic p13E-11 sequence and aid in determination of the nonpathogenic D4Z4 arrays at 10q. Furthermore, we show that the

D4Z4-like sequences present elsewhere in the genome are not tandemly arranged, like those at 4q35 and 10q26.

Introduction

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is a unique dominant disorder involving shortening of D4Z4, a subtelomeric array of tandem 3.3-kb repeat units (Wijmenga et al. 1992). This copy-number polymorphic repeat (1–100 units per array) is present at both 4q35 and 10q26, but only short (1–10 unit) arrays at 4q35 are linked to FSHD (Upadhyaya et al. 1997; Wijmenga et al. 1993). The mechanism for this unusual relationship, which seems to be a cis effect (Ehrlich 2004), is still unknown (Gabellini et al. 2002; Jiang et al. 2003; Winokur 2003). The 4q-specific nature of this disease is impressive given the 99% homology between the 4q and 10q D4Z4 repeat units (GenBank AF117653 and NT_017795) and the >95% homology between the 42-kb region proximal to D4Z4 at 4q35 and 10q26 and the homology distal to the array (van Geel et al. 2002). At 4q35, there are two polymorphic forms of the D4Z4-distal sequence, 4qA and 4qB (Fig. 1), which are found at similar frequencies (van Geel et al. 2002). Only D4Z4 contractions on 4qA are associated with the disease but short 4q35 alleles only very infrequently have a distal, nonpathogenic 4qB sequence (Lemmers et al. 2002, 2004).

Unambiguous clinical diagnosis of FSHD depends on DNA analysis (Lemmers et al. 2001; Lunt 2000). Moreover, there is some correlation between the size of short, FSHD-causing arrays at 4q35 (1–10 D4Z4 repeat units) and the severity of the disease (Lunt et al. 1995; Tawil et al. 1996). For molecular diagnosis of FSHD, the 4q35 D4Z4 arrays have to be distinguished from the almost identical

Communicated by E.A. Nigg

M. Ehrlich (✉) · K. Jackson · K. Tsumagari
Program in Human Genetics and Department of Biochemistry,
Tulane Medical School,
New Orleans, LA, USA
e-mail: ehrlich@tulane.edu

P. Camaño
Unidad Experimental, Hospital Donostia,
San Sebastián, Spain

R. J. F. L. Lemmers
Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center,
Leiden, The Netherlands
e-mail: r.j.l.f.lemmers@lumc.nl

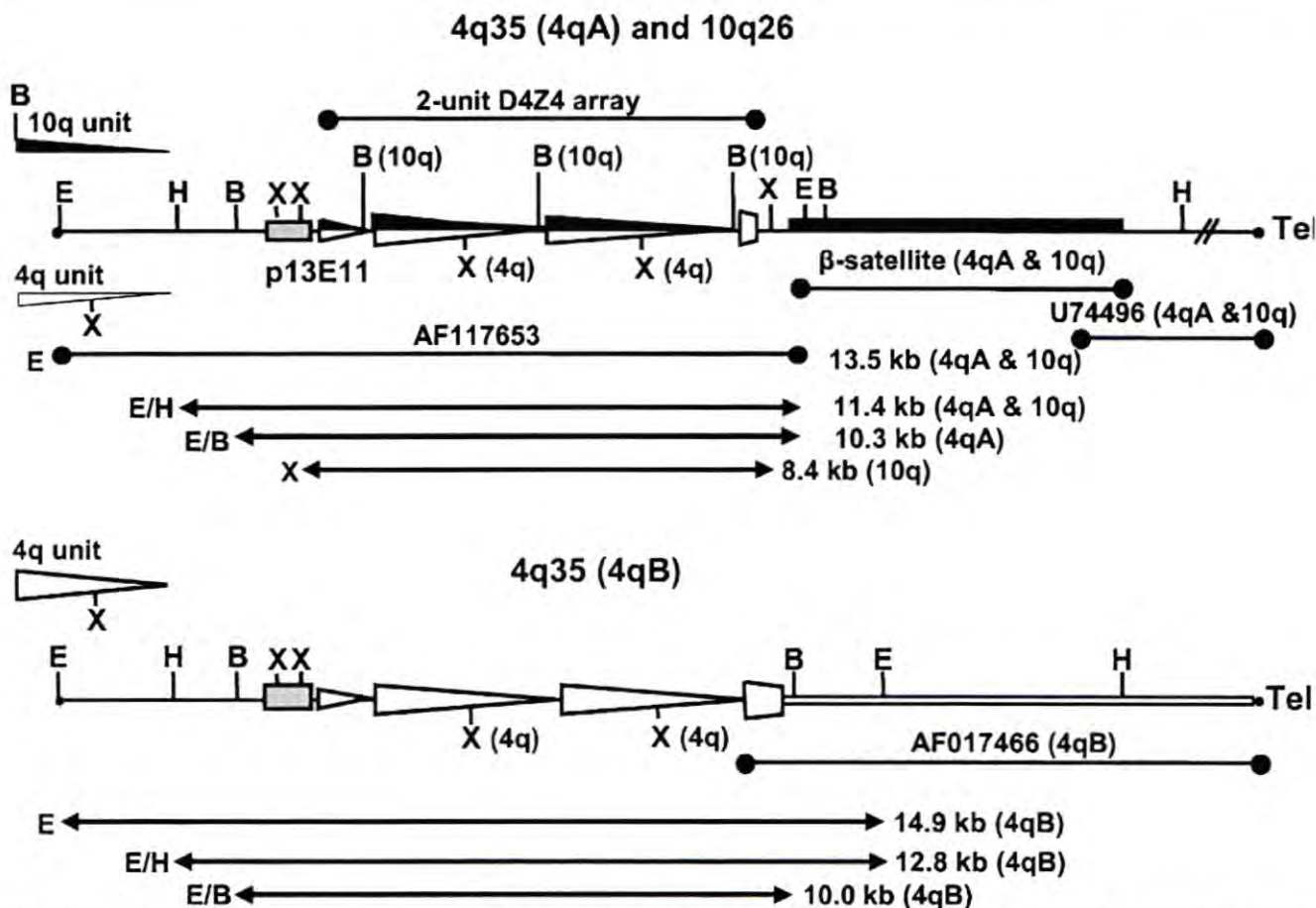


Fig. 1 A schematic of the DNA sequences and diagnostically important restriction sites in the distal portion of 4q35 and 10q26 (not to scale). The D4Z4 arrays are depicted as containing two 3.3-kb *KpnI* repeat units (white and black triangles for canonical 4q35 and 10q26 units, respectively), although FSHD patients can have 1–10 units at their FSHD-causing short 4q35 D4Z4 array and the other arrays can have up to 100 units. D4Z4 has partial *KpnI* repeat units (small triangle and trapezoid) at its borders. The two polymorphic forms (4qA and 4qB) of sequences between the end of D4Z4 and the TTAGGG arrays of the telomere of 4q are indicated. The 6.2-kb β -satellite DNA in 4qA and 10q contains tandem 68-bp repeats.

ones at 10q26, which are also highly polymorphic in array size. In addition, D4Z4 must be detected under conditions in which there is no interference from many homologous sequences elsewhere in the genome, especially in the acrocentric chromosomes (Hewitt et al. 1994). The probe for analysis of the length of each D4Z4 array is almost always the nonrepeated p13E-11 sequence, which is located 0.1 kb proximal to D4Z4 (Hewitt et al. 1994; Wright et al. 1993) (Fig. 1). The sizes of D4Z4 arrays are determined by blot hybridization to a 0.8-kb p13E-11 probe after electrophoresis of genomic DNA digested with restriction endonucleases that excise the intact array linked to the genomic p13E-11. The enzymes for the excision are *EcoRI* for linear gel electrophoresis (LGE) or *EcoRI* plus *HindIII* for pulsed-field gel electrophoresis (PFGE; Fig. 1). The use of *HindIII*

Restriction cleavage sites that are important for molecular diagnosis (*E*, *EcoRI*; *H*, *HindIII*; *B*, *BlnI*; *X*, *XapI*) and the >5-kb restriction fragments are shown for the type of digest indicated on the left. There is infrequently one additional *HindIII* site proximal to D4Z4 that is polymorphic and close to the proximal *BlnI* site. The *NotI* site that is occasionally used to determine the chromosomal location of a translocated D4Z4 array is on 4q proximal to the depicted sequence; *NotI* digests subjected to PFGE are blot-hybridized to a proximal probe that gives 4q35 fragments between 200 and 500 kb (Lemmers et al. 2003)

as well as *EcoRI* for PFGE digests minimizes the electrophoretic distortion of the D4Z4 bands by yielding more extensive cleavage of the bulk DNA.

One and, preferably, two digests are also made with restriction endonucleases that cleave only canonical 10q26 D4Z4 repeat units (*BlnI* in an *EcoRI/BlnI* double digest) or only canonical 4q35 units (*XapI*) to distinguish short, FSHD-causing D4Z4 arrays on 4q35 from phenotypically neutral, short D4Z4 arrays on 10q26 (Fig. 1) (Deidda et al. 1996; Lemmers et al. 2001). To resolve the above-mentioned 4qA and 4qB polymorphism distal to D4Z4 on 4q35, *HindIII* digests can be used for blot hybridization with 4qA- or 4qB-specific oligonucleotide probes (Fig. 1). All FSHD alleles of 1–10 repeat units were shown to have the 4qA type of distal sequence (Lemmers et al. 2002).

Another complication in molecular diagnosis of FSHD stems from the homology between the D4Z4 arrays at 4q35 and 10q26. Subtelomeric exchanges between chromosomes 4 and 10 are found in about 20% of individuals (Lemmers et al. 1998; Matsumura et al. 2002; van Deutekom et al. 1996). Consequently, FSHD-sized D4Z4 repeats can have some canonical 10q-type units, which contain one *BlnI* site each, replacing some of the canonical 4q-type units, which do not have a *BlnI* site. For research on how contraction of D4Z4 causes FSHD, it is necessary to not only size D4Z4 alleles, but also to analyze any subtelomeric exchanges between 4q and 10q arrays to identify which *BlnI*-resistant D4Z4 repeat units actually reside on 4q.

In addition, DNA-based diagnosis of FSHD is complicated by deletions of the p13E-11 probe region from the genome (Lemmers et al. 2003). These deletions may or may not extend into the array itself, which is only 0.1 kb distal (Fig. 1). Deletions of p13E-11 are estimated to occur in about 3% of FSHD patients and of the control population. They do not influence the severity of the disease but they can result in a false-negative molecular diagnosis for FSHD (Lemmers et al. 2003).

A recent report describes a polymerase chain reaction (PCR) method to detect D4Z4 arrays of less than six repeat units specifically from 4q35 with a special Taq polymerase (Goto et al. 2006). Primers are used from sequences just outside the array where there are 1-bp differences between 4q and 10q. PCR gives a specific product only from small D4Z4 arrays on 4q. No product is obtained from unaffected individuals. However, such a negative result without an internal control to eliminate technical problems could produce false negatives. The method only worked for FSHD patients with 1–5 repeat units but many Caucasian patients have FSHD alleles of 6–10 repeat units (Butz et al. 2003; Orrell et al. 1999; Upadhyaya et al. 1997; Lemmers et al. 2006), including occasional patients with severe and early-onset symptoms (Wu et al. 2004). In addition, some somatic mosaics do not have the FSHD phenotype (Lemmers et al. 2004), but because their short 4q D4Z4 arrays could also be amplified, their DNA samples would produce false positives. Lastly, deletions of the p13E-11 region cannot be identified using PCR for molecular diagnosis.

These complications are not shared by Southern blot hybridization with p13E-11 probes supplemented with a new D4Z4 subfragment probe, as described in this report. Previously, we used a 0.7-kb subfragment of the 3.3-kb unit of D4Z4 arrays (Fig. 2) as a probe to analyze D4Z4 methylation and showed that most of the signal obtained by blot hybridization of *KpnI* digests of human DNA was in a 3.3-kb band (Tsien et al. 2001). There is one *KpnI* site per tandem D4Z4 unit at 4q35 and 10q26. In contrast, at least several YACs containing D4Z4-like sequences from acrocentric chromosomes do not seem to have these sequences

in strict tandem arrays (Lyle et al. 1995). This indirect evidence suggested, but did not prove, that the 0.7-kb D4Z4 subfragment probe was specific. In the present study, we have designed a 1-kb subfragment of D4Z4 as a hybridization probe and rigorously tested it and the 0.7-kb probe for their specificity. We describe the use of the 1-kb probe in the molecular diagnosis of FSHD.

Materials and methods

Patients and samples

Clinically confirmed patients were obtained via one of the Dutch neuromuscular centers and informed consent was given. For rodent-human somatic cell hybrid (SCH) DNAs, cell lines were used (Coriell Institute for Medical Research). The hybrids with a Chinese hamster genetic background were as follows (the identity of the human chromosome(s) and then the cell line are given: del(4)(p16.2) and 5, GM14193; del(4p16.1), 5, and 8, GM11448; der(X)t(X;4)(p21;q35), GM14221A; 10, GM10926; 9, GM10611; 11, GM10927; 13, GM10898; 22, GM10888; Y, GM06317. The hybrids with a mouse background were as follows: 4, GM11687A; 1, GM13139; 3, GM11713; 14, GM10479; 15, GM11715; 16, GM10567; 21 and 22, GM10322.

To lyse red blood cells from 10 ml of peripheral blood supplemented with EDTA, the sample was incubated on ice for 15 min with 40 ml of 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 1 mM EDTA, pH 8.0. After centrifugation, the pellet was treated once more with 15 ml of the above solution, and pelleted again. The final pellet was resuspended in 1 ml of 75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8.0 (SE). For PFGE, the suspension was quickly mixed with 1 ml of melted 1.4% agarose (InCert agarose, FMC) in SE at 50°C, and added to a plastic mold to form ~0.1-ml plugs, each containing ~1–1.5 × 10⁶ cells for PFGE. From 10 ml of blood, ~20 plugs can be obtained. After leaving at 4°C for 30 min, the ejected plugs were incubated in 10 ml of SE containing 1% sarcosyl and 0.6 mg/ml pronase (Sigma) for 2 days at 37°C. Then the plugs were rinsed with TE⁺ (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA), and stored in 0.5 M EDTA, pH 8, at 5°C. For diagnostic LGE, DNA was isolated by the method of Miller et al. (1988) or by melting DNA from a DNA-agarose plug.

Enzyme digestion, electrophoresis, and blotting

DNA-agarose plugs containing ~8 µg of DNA were rinsed in a rotator for 15 min with water; twice for ~1.5 h with TE⁺; and 3 h in the reaction buffer for the enzymes to be used. Half of a plug was incubated for 6 h with 30 U of each enzyme (*EcoRI* plus *HindIII*, *EcoRI* plus *BlnI*, or

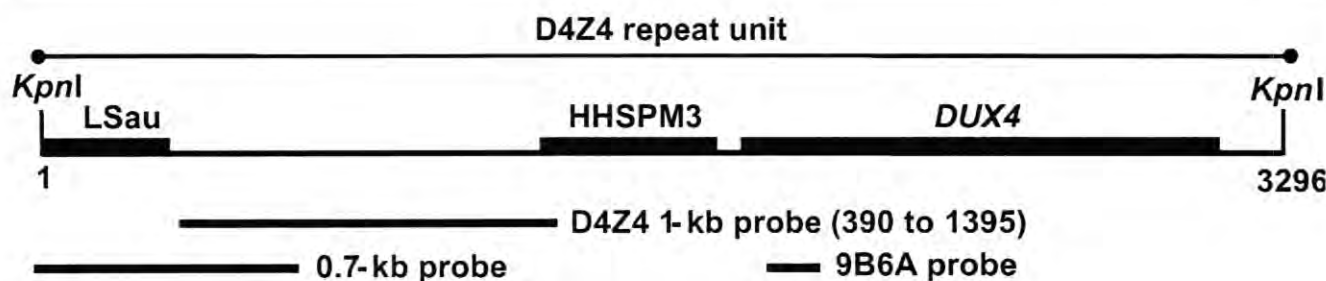


Fig. 2 A diagram drawn to scale of D4Z4 subrepeats and hybridization probes. *DUX4* is the open reading frame with two almost identical homeodomains to which the 9B6A probe hybridizes. The LSau and HHSPM3 subregions are partially homologous to repeats: GenBank

X59423 and X06587, respectively. The positions of the 1-kb D4Z4 probe are given relative to the beginning of the recognition site of *KpnI* in GenBank AF117653

XapI; enzymes from Roche except *XapI* from Fermentas) under the manufacturers' conditions but with an additional 3.3 mM spermidine (Sigma) and 1 mM dithiothreitol. The digests and markers (λ midi-range concatemer; New England Biolabs) were subject to PFGE in a 0.85% agarose gel (MP agarose, Roche; 20×20 or 14×21 cm gels) in 44.5 mM Tris–borate buffer, 1 mM EDTA, pH 8.3 with 0.15 μ g/ml ethidium bromide (gel and electrophoresis buffer). Electrophoresis was done in a homemade device at 8.5 V/cm and 21°C with 4 cycles (5.5 h each) and a switch time increasing linearly from 1 to 20 s or in a commercial apparatus (CHEF Mapper XA, Bio-Rad) at 6 V/cm and 22°C for 22 h, with the switch time increasing linearly from 1 to 20 s. DNA was nicked by UV irradiation in a commercial crosslinking apparatus, denatured in 0.4 M NaOH, 0.6 M NaCl for 30 min, and transferred in that solution to a membrane (Hybond XL, Amersham or Zeta-GT, BioRad), neutralized, and cross-linked to the membrane by UV irradiation in the same apparatus. For LGE of D4Z4, samples were loaded onto a thin strip of 1% agarose on top of a 0.5% agarose gel and electrophoresed using 40 mM Tris–base, 1.1% acetic acid, 1 mM EDTA, pH 7.6, with 0.15 μ g/ml ethidium bromide as the gel and running buffer. For LGE of *KpnI* digests, electrophoresis was in a 1% agarose gel at 120 V for 4 h.

Probes and hybridization

The 1-kb D4Z4 probe was generated by PCR using 100 ng of a plasmid containing the 3.3-kb D4Z4 unit in a Bluescript KS vector (Winokur et al. 1994). The primers (5'-3') were GGAAGGCGGGCAGAGATG and CCGGACCTCTCCAGGGAT. The PCR conditions were 94°C for 15 min followed by 35 cycles of 94°C for 45 s, 62°C for 45 s, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. The 1-kb PCR product was purified by gel extraction (QIAGEN). From the same plasmid, the 3.3-kb D4Z4 probe was excised with *KpnI*. The 0.7-kb D4Z4 subfragment probe was excised from its cloning vector

(pBC KS +/-) using *EagI* and *EcoRV* (Kondo et al. 2000). The p13E-11 sequence (Wright et al. 1993) was excised as a 810-bp fragment with *EcoRI* and *SacI* from a plasmid or obtained by PCR. For 9B6A, the *DUX4* homeodomain region was amplified by PCR from a plasmid (Hewitt et al. 1994) using vector primers (M13-20 Forward and M13 Reverse, Invitrogen) to give a product containing 320 bp of the *DUX4* homeodomain region. About 25 ng of each DNA was labeled with 50 μ Ci of [α -³²P]dCTP (3,000 Ci/mmol) by random priming (Megaprime, Amersham or NEBlot kit, New England Biolabs followed by Spin Column 30, Bio-Rad). For the λ probe, 1.5 ng of template was labeled with 5 μ Ci of [α -³²P]dCTP. About one fifth of the product was used per blot and could be cohybridized with the p13E-11 probe.

For the 1-kb D4Z4 probe, the blots were prehybridized with rotation in a hybridization tube for 1 h at 60°C with 20 ml of 0.125 M sodium phosphate, pH 7.2, 0.25 M NaCl, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 μ g/ml of denatured salmon sperm DNA, and 50% freshly added formamide. The hybridization tubes were rated to withstand at least 180°C (e.g., Stovall hybridization bottle, Sigma) and were tightly capped. After addition of probe ($\sim 2 \times 10^7$ cpm), the bottle was similarly rotated overnight. The blots were washed with rotation at 65°C for 10 min each with 50 or 100 ml (depending on the size of the bottle) of prewarmed 2×SSC, 0.1% SDS; 0.5×SSC, 0.1% SDS; and 0.1×SSC, 0.1% SDS. For the p13E-11 probe, the hybridization solution was 0.125 M sodium phosphate, pH 7.2, 0.25 M NaCl, 1 mM EDTA, 7% SDS, 10% PEG 6000, 100 μ g/ml of denatured salmon sperm DNA; prehybridization, hybridization, and washing were at 65°C but were done in a 100-ml volume in a covered tray with gentle shaking; and three 15-min washes were with ~ 0.3 l of 2×SSC, 1% SDS. Alternatively, a commercial hybridization solution (PerfectHyb, Sigma) could be used at 65°C in a hybridization tube followed by 10-min washes at 65°C with 2×SSC, 0.1% SDS, 1×SSC; 0.1% SDS, and 0.5×SSC, 0.1% SDS, preferably in covered trays. Phosphorimager exposure was for 2 days. For rehybridization, the blot was

first stripped by pouring boiling $0.1\times$ SSC, 0.1% SDS on top and cooling to room temperature or by soaking it in 0.4 M NaOH for 30 min at room temperature followed by rinsing with $2\times$ SSC. Stripped membranes were kept moist until reuse. For diagnostic purposes, after probing with p13E-11 and phosphorimaging, the blot can be used without stripping for rehybridization with the 1-kb probe.

For the 9B6A probe, we used the hybridization conditions for p13E-11 followed by washing at 65°C twice with $0.3\times$ SSC, 0.1% SDS for 15 min and then once with $0.1\times$ SSC, 0.1% SDS for 30 min. For the 0.7-kb D4Z4 probe, a commercial solution (ExpressHyb, Clontech) was used at 72°C followed by two washes each at 72°C with $2\times$ SSC, 0.05% SDS and $0.1\times$ SSC, 0.1% SDS. The 3.3-kb D4Z4 probe was hybridized with the homemade solution and washed as for the 1-kb probe except at 63°C . For SCH DNAs, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of denatured rat liver DNA was included in the hybridization solution. The blots containing *KpnI* digests were exposed to X-ray film for 2 days.

Results

Rationale for designing a new D4Z4 hybridization probe

We designed a new optimized D4Z4 probe and tested its specificity directly. One of the D4Z4 subregions (Fig. 2) that is repeated elsewhere in the genome independently of the rest of the D4Z4 sequence is the 0.3-kb LSau-homology sequence (Hewitt et al. 1994) with $\sim 90\%$ homology to this part of the repeat unit. It is present on the short arms of the acrocentric chromosomes and the pericentromeric regions of chromosomes 1, 3, and 9, as well as on Yq (Meneveri et al. 1993). The 0.7-kb probe overlapped that sequence (Fig. 2). Therefore, by PCR, we generated a 1-kb D4Z4 subsequence that excludes the LSau region of D4Z4 repeat units and almost all of the HHSPM3 region (Sp-0.3–8), another low-copy repeat region (Hewitt et al. 1994; Zhang et al. 1987). This probe was tested for its specificity by PFGE and LGE as described below.

Initial tests of the specificity of the 1-kb D4Z4 probe

D4Z4 arrays are unusual because of their extremely high G+C content, 73% (69% for the 1-kb subfragment), compared with the overall human genomic G+C content of 42%. D4Z4's high G+C content makes it more difficult to get specific conditions for hybridization. We tested the specificity of the 1-kb D4Z4 probe by blot hybridization of *KpnI* digests of human DNA and DNA from human-rodent SCHs containing one or a few human chromosomes. With a hybridization buffer containing 50% formamide and annealing conditions that gave a temperature for hybridiza-

tion that was 15°C below the T_m , only human DNA and SCH DNA containing human chromosome 4 or 10 gave a signal with the 1-kb D4Z4 probe (Fig. 3a, 1-kb probe). Essentially, the entire signal was in the expected band composed of 3.3-kb D4Z4 repeat units. Under nonstringent conditions (changing the temperature to 49°C), a high-molecular-weight smear was observed from human DNA and DNA from SCHs containing the acrocentric human chromosomes (Fig. 3b). The 0.7-kb D4Z4 probe (Fig. 2) that we had used in an earlier study (Tsien et al. 2001) gave only a slight increase in $>3.3\text{-kb}$ signal from total human DNA under our standard conditions (see "Materials and methods"; data not shown) using non-stringent conditions for annealing with a commercial hybridization solution but very stringent conditions for the final wash (T_m minus wash temperature of only 12°C). This validates its previous use as a hybridization probe in detection of DNA methylation within the D4Z4 array by Southern blotting DNA digested with CpG methylation-sensitive enzymes (Tsien et al. 2001). Surprisingly, even the entire 3.3-kb D4Z4 repeat unit could be used as a probe with a similar high degree of specificity for D4Z4 in chromosomes 4 and 10 as seen for the 0.7-kb probe, when the hybridization was under stringent conditions (Fig. 3c).

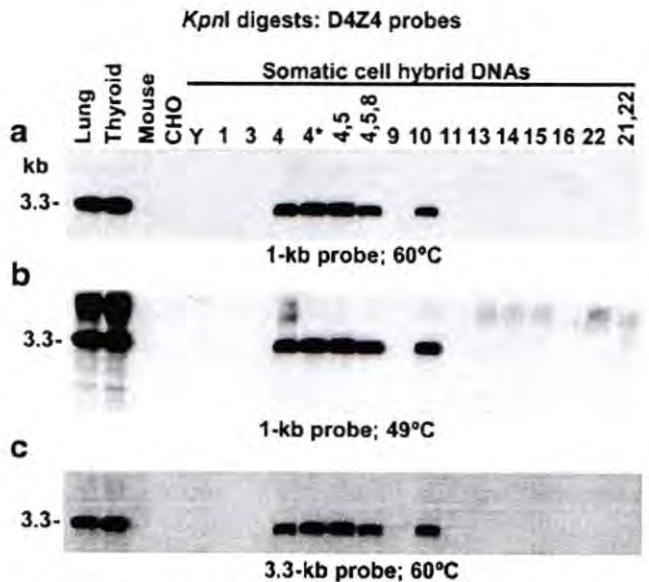


Fig. 3 Determination of the specificity of D4Z4 probes with somatic cell hybrid DNAs. DNA from human lung or juvenile thymus, mouse, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or SCHs was digested with *KpnI* and subject to LGE and repeated hybridization with the indicated D4Z4 probe and stripping. The SCH DNAs had only the indicated one human chromosome (*horizontal labels over lanes*) or several (*vertical labels*) and were in a murine or CHO genetic background. The *asterisked SCH* had a single $\text{der}(X)\text{t}(X;4)(\text{p}21;\text{q}35)$; therefore, the only part of chromosome 4 present was the 4q35 region. After high-stringency hybridization with the 1-kb D4Z4 probe (**a**), the faint low-molecular-weight band seen at low stringency in human DNA (**b**) was not observed, even with longer exposures

The 1-kb probe for analysis of p13E-11 deletions

An important advantage of using a D4Z4 probe for molecular diagnosis of FSHD is that it allows the visualization of a D4Z4 allele distal to a p13E-11 deletion in FSHD patients as well as in unaffected individuals. Upon PFGE and blot hybridization with this probe, all four D4Z4 arrays, including the one with a deletion of p13E-11, can be seen in a sample from a patient with an FSHD-associated allele (Fig. 4b). As expected, the p13E-11 probe failed to reveal the FSHD-causing allele with the proximal deletion of the genomic p13E-11 sequence (Fig. 4b). Although PFGE is much more informative than LGE for FSHD molecular diagnosis, LGE is often employed and without the useful *XapI* digest. Figure 5 shows examples (FB3 and FB4) of how a D4Z4 probe, but not a p13E-11 probe,

reveals a short D4Z4 array that lacks a p13E-11 sequence distal to it upon Southern blotting after LGE.

Molecular diagnosis of FSHD with D4Z4 vs p13E-11 probes

Using the recommended digests for molecular diagnosis, *EcoRI/HindIII*, *EcoRI/BlnI*, and *XapI*, we did PFGE followed by blot hybridization to the p13E-11 probe and obtained the typical D4Z4 array patterns for unaffected individuals and FSHD patients (Fig. 4a). The blot was stripped and hybridized with the new 1-kb D4Z4 probe. One of the advantages of using the 1-kb D4Z4 probe is the increased sensitivity of detection of D4Z4 arrays in *XapI* digests (Fig. 4; CB2, FB1, and FB2), which allow visualization of only the 10q-type (*XapI*-resistant) arrays,

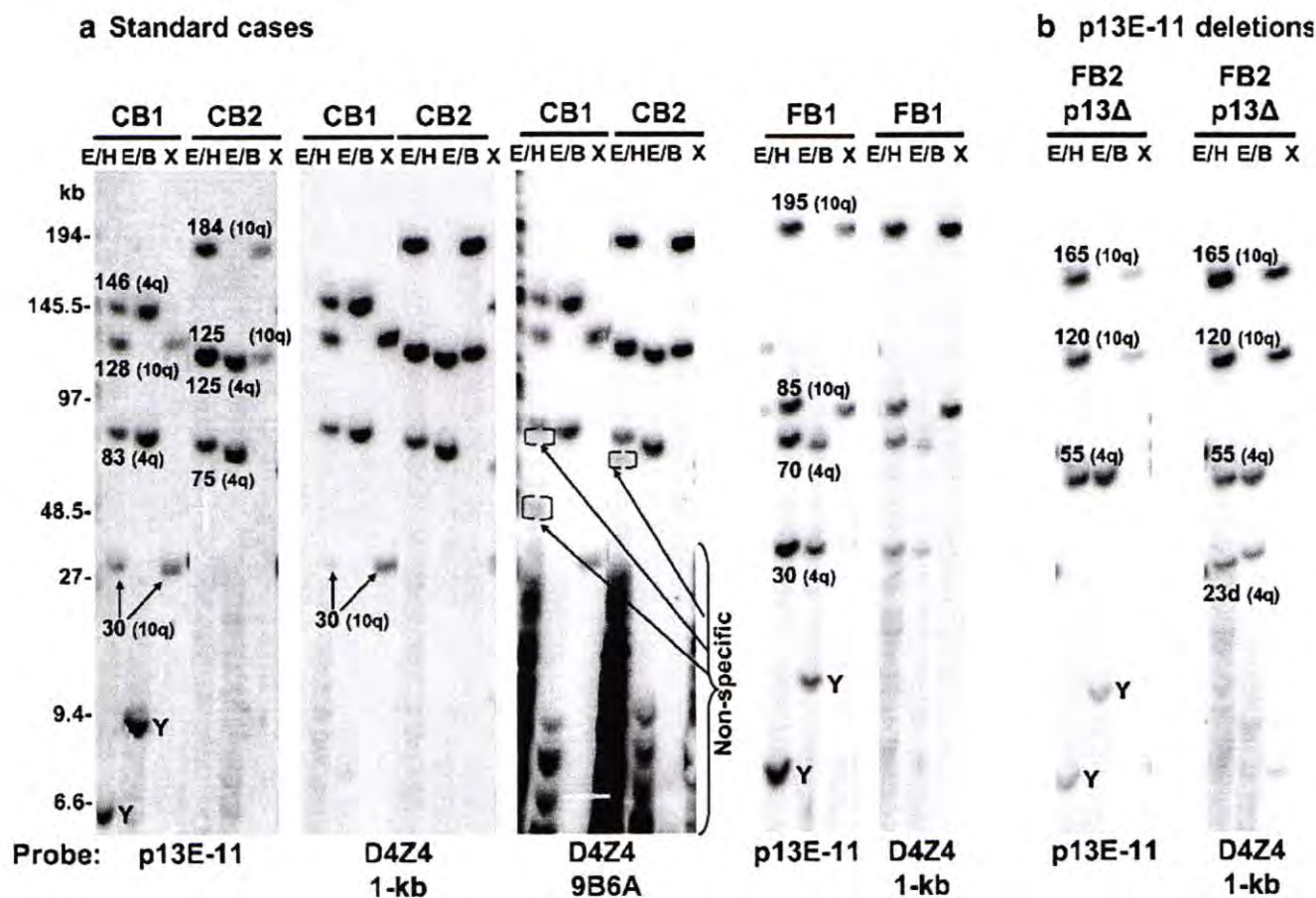
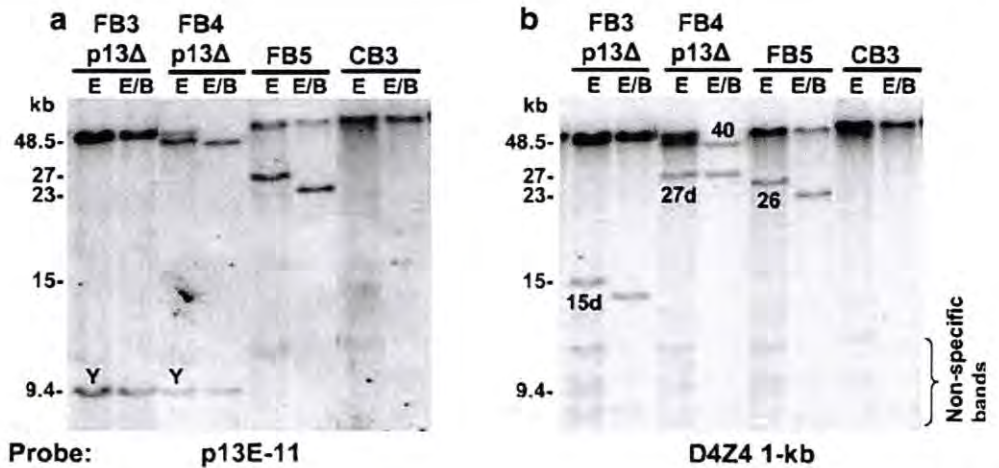


Fig. 4 Comparison of different probes for PFGE diagnosis of FSHD. DNA samples from control blood (CB1 and CB2) or FSHD blood (FB1 and FB2, or FB p13EΔ for p13E-11 deletion patients) were digested with *EcoRI/HindIII*, *EcoRI/BlnI*, or *XapI* (*ApoI*) and subjected to PFGE. They were then blot-hybridized with the indicated probe (Fig. 2) either under the standard hybridization conditions for p13E-11 or 9B6A or the more stringent conditions for the 1-kb D4Z4 probe (see “Materials and methods”). The Y chromosome-derived

fragments that cross-hybridize with the p13E-11 probe are indicated. These are seen in all males and not in females. The sizes of markers (in kilobase) for the first gel are given on the left and the sizes of D4Z4-containing bands within the blots. The *small d* indicates that there was a deletion of p13E-11 immediately proximal to that array, which is only visualized with the D4Z4 probe. The *brackets* denote the nonspecific signal from the 9B6A probe. Blots were hybridized first to the p13E-11 probe, stripped, and then hybridized to a D4Z4 probe

Fig. 5 Identification of FSHD alleles in patients with p13E-11 deletions by LGE. The same terminology is used as in Fig. 4. Note that for the full molecular diagnostic test by LGE, *XapI* digests should be used in addition to *EcoRI* single digests and *EcoRI/BlnI* double digests. These samples had previously been characterized by PFGE as in Fig. 4



thus facilitating identification of 4q arrays in the *EcoRI/HindIII* digests (Lemmers et al. 2001). When blots were probed with p13E-11, there was usually a decrease in the signal in *XapI* bands relative to the analogous *EcoRI/HindIII* bands. This decrease is due to the *XapI* sites in the genomic p13E-11 (Fig. 1). Avoiding decreases in signal intensity can be especially important when there are only small amounts of DNA in peripheral blood-derived DNA-agarose plugs.

Previously, when a D4Z4 probe was desired for PFGE (Lemmers et al. 1998), 9B6A (Fig. 2), a probe from the homeodomain region of D4Z4 (Hewitt et al. 1994), was used. This D4Z4 subfragment probe gave much nonspecific signal that interfered with detecting low-molecular-weight D4Z4 arrays under previously employed conditions (Lemmers et al. 1998) because of the absence of formamide to lower the T_m during hybridization. (Fig. 3a). With the 9B6A probe from a *DUX4* subregion of D4Z4, which is much more highly repeated in the human genome than is D4Z4, the stringent hybridization and washing conditions used for the 1-kb probe nonetheless gave interfering background. In contrast, even under low-stringency conditions (differential of the T_m and the temperature for the annealing step was 35 and 29°C for the washing steps), the p13E-11 probe gave only specific bands, except for a Y chromosome-derived, noninterfering band of <10 kb (Fig. 4).

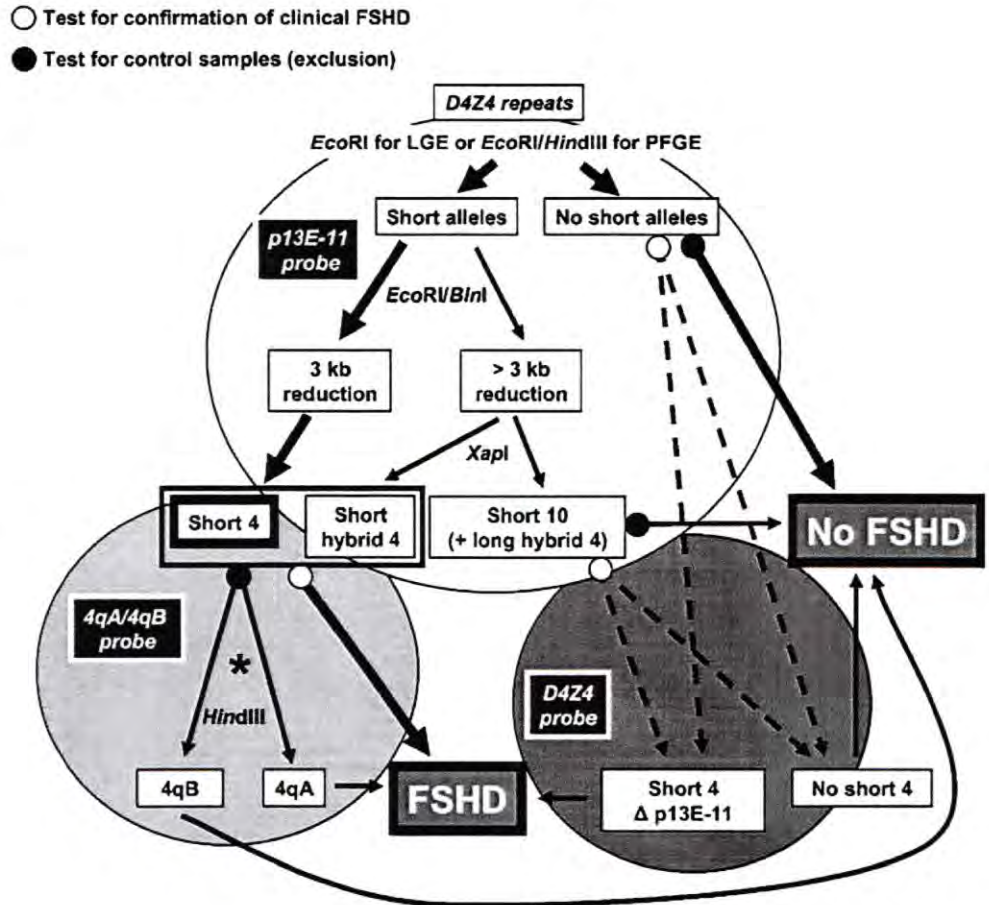
A flowchart of recommended procedures for molecular diagnosis incorporating the use of the 1-kb D4Z4 probe is shown in Fig. 6. No one simple set of procedures will cover all cases because of the inherent complexity of FSHD molecular diagnosis due to the 4q and 10q homology between D4Z4 arrays and adjacent sequences, translocations between 4q and 10q D4Z4 arrays, mitotic D4Z4 contractions, deletions encompassing p13E-11, and the wide range of sizes of D4Z4 arrays combined with the need for high resolution of bands in the 30- to 45-kb range.

Although PFGE with DNA-agarose plugs is recommended, LGE is often used throughout the analysis or just to confirm the size of short D4Z4 arrays with more accuracy. Analysis should start with the p13E-11 probe and *EcoRI/HindIII* (PFGE) or *EcoRI* (LGE) digests, *EcoRI/BlnI* digests, and *XapI* digests. For a patient suspected of having FSHD, a short array that displays a reduction of 3 kb (Figs. 1 and 5) in *EcoRI/BlnI* vs *EcoRI* digests upon LGE confirms FSHD with >99% confidence. If a reduction of more than 3 kb is seen or the *EcoRI/HindIII* or *EcoRI* band is no longer visible in *EcoRI/BlnI* digests, *XapI* digests provide discrimination between a short D4Z4 array on 10q (no FSHD) and a short hybrid array containing 4q- and 10q-type repeat units on chromosome 4 (FSHD) (Lemmers et al. 2001). A short hybridizing *XapI* fragment corresponding to the short *EcoRI/HindIII* or *EcoRI* fragment indicates no FSHD, and while its absence indicates FSHD. Upon PFGE with high-molecular-weight DNA in agarose plugs, usually all four alleles can be visualized with the p13E-11 probe. This facilitates detection of hybrid arrays and mosaicism and can signal the need for further testing in the case of D4Z4 translocations between chromosomes 4 and 10 that interfere with the analysis (Lemmers et al. 1998). For all LGE analyses or when less than four alleles are seen upon PFGE, rehybridization of the membrane should be done with the 1-kb D4Z4 probe to look for FSHD alleles with a deletion of the p13E-11 probe region. When the neurologist is not completely sure of FSHD and the genetic analysis reveals a short D4Z4 array on 4q, then additional 4qA/4qB testing is needed (Fig. 6, asterisk). Rehybridization to the 1-kb D4Z4 probe also clarifies the hybrid composition of arrays, although this is not necessary for molecular diagnosis.

If individuals that are not suspected of having FSHD (unaffected spouses or healthy family members of patients) are included in the genetic test and they do not display any FSHD-like allele, no analysis is needed beyond that

FSHD molecular diagnosis flowchart

Fig. 6 Flowchart for the molecular diagnosis of FSHD for confirmation (clinical FSHD) as well as exclusion (clinically no FSHD) purposes. Recommended enzyme digestions and hybridization with three sets of hybridization probes (three shaded circles), starting with the p13E-11 probe, are shown for molecular diagnosis of FSHD. The chromosomal location (4 or 10) of the D4Z4 array is indicated and whether the size of the array is within the range for FSHD linkage (short). Most frequent outcomes for either PFGE or LGE analysis for FSHD are shown with thick arrows. The dotted arrows indicate recommended rehybridization for confirmation of FSHD with the 1-kb D4Z4 probe for all LGE tests and for PFGE tests that reveal less than four arrays



described above. However, if these individuals unexpectedly display an allele that mimics an FSHD allele, extra tests have to be performed to explain these apparently false-positive results. If a short homogeneous 4q-type or hybrid array is detected, then an additional Southern blot with *HindIII* digested DNA is needed. Subsequent hybridization with 4qA- and 4qB-specific probes (Fig. 1) will discriminate pathogenic short 4qA alleles from rare nonpathogenic, short 4qB alleles (Lemmers et al. 2002).

Discussion

The p13E-11 sequence, which is adjacent to D4Z4 at 4q35 and 10q26, has been almost the only blot hybridization probe used for determining whether the 4q35 arrays had contracted to a size that is linked to FSHD. We identified a subfragment of the D4Z4 sequence and stringent hybridization conditions that allow detection of D4Z4 at 4q35 and 10q26 without interference from cross-hybridizing sequences elsewhere in the genome. Use of the 1-kb D4Z4 probe avoids the p13E-11 probe-associated loss in

sensitivity for detection of 10q26 D4Z4 arrays (Fig. 1) in one of the recommended digests for molecular diagnosis of FSHD, the *XapI* digest (Lemmers et al. 2001) (Fig. 1). However, the 1-kb D4Z4 probe is not a substitute for the p13E-11 probe but rather should be used for rehybridization of certain samples (Fig. 6).

An important advantage of using a D4Z4 probe for molecular diagnosis of FSHD in conjunction with the p13E-11 probe is that it permits the identification of about 3% of FSHD patients who have a deletion of the p13E-11 genomic sequence next to a short 4q D4Z4 array (Lemmers et al. 2003). Upon hybridization to a p13E-11 probe, a probable deletion encompassing p13E-11 can be noticed by PFGE, but not LGE, which does not resolve all the D4Z4 arrays. It is therefore advisable to rehybridize routinely with a D4Z4 probe during LGE diagnosis of FSHD or to do PFGE, rather than LGE, in which case the need for additional probing with D4Z4 is usually apparent (Fig. 6). Even for PFGE, unusual combinations of D4Z4 alleles that could include an FSHD allele may only be detected upon rehybridization with the D4Z4 probe. Other examples of the superiority of PFGE for molecular diagnosis are cases

with somatic mosaicism. Somatic mosaicism, which can affect the severity of FSHD, is present in almost half of the de novo FSHD patients (Lemmers et al. 2004) and requires PFGE, in which all the D4Z4 arrays are visualized, for assessment.

In addition, for research purposes, PFGE is needed to determine the composition of hybrid arrays containing both canonical 4q-type (*BlnI*-resistant, *XapI*-sensitive) and 10q-type (*BlnI*-sensitive, *XapI*-resistant) D4Z4 repeat units. This is not necessary for diagnosis because it is the length of the array on 4q35, and not whether it contains 4-type D4Z4 repeat units, which determines the clinical status. To characterize the composition of hybrid D4Z4 arrays, it is necessary to detect in *EcoRI/BlnI* and *XapI* digests not only the D4Z4 arrays linked to p13E-11 with the p13E-11 probe, but also to visualize all subfragments from hybrid arrays in a subsequent hybridization with a D4Z4 probe. About half of the translocation products between D4Z4 repeat units on 4q35 and 10q26 contain hybrid arrays.

Other advantages of a specific probe for the D4Z4 arrays at 4q35 and 10q26 for research on FSHD accrue from the lack of PCR primer pairs from within the array that amplify only 4q35 and 10q26 D4Z4 sequences without amplifying partially homologous sequences and subsequences elsewhere, especially on the acrocentric chromosomes (Lyle et al. 1995). The 1-kb subfragment of D4Z4 and even the only slightly less specific 0.7- and 3.3-kb D4Z4 hybridization probes permit a variety of experiments examining the nature of D4Z4 arrays. Using the 1-kb D4Z4 probe, the expected 3.3-kb *KpnI* fragments were observed only from human-rodent SCHs that contained chromosome 4 or 10 or a translocated subtelomeric portion of human 4q. Under nonstringent conditions, *KpnI* digests of DNA from the SCHs that had human acrocentric chromosomes gave a high-molecular-weight smear rather than a 3.3-kb repeat-unit band in 1% agarose LGE (Fig. 3b). Analogous blots of DNA digested just outside the array by *EcoRI* and *HindIII* gave a <3-kb smear from the human acrocentric chromosomes under low-stringency conditions, while the hybridizing signal from chromosomes 4 and 10 had the expected high molecular weight (data not shown). This indicates that the D4Z4-like sequences in the acrocentric chromosomes are not tandemly arranged, although they seem to be clustered from Southern blot analysis of several acrocentric chromosome-derived YACs (Lyle et al. 1995). In summary, the use of the 1-kb D4Z4 probe can aid in molecular diagnosis of FSHD (Fig. 6), advance our knowledge of D4Z4 chromatin structure, and reveal the composition of hybrid D4Z4 arrays for research on FSHD.

Acknowledgements We thank Yang Fan and Chunbo Shao for help with the manuscript and Drs. Robert Bloch, Meredith Bond, and Mimi Blitzer for generously hosting us at the University of Maryland Medical School in the aftermath of the Hurricane Katrina flood in

New Orleans. This research was supported in part by the National Institutes of Health, USA (NIH NS048859 to M. Ehrlich); the FSH Society (to R.J.F.L. Lemmers); and Eurogendis, Fundación Kutxa and Fundación Ilundain (to P. Camano).

References

- Butz M, Koch MC, Muller-Felber W, Lemmers RJ, van der Maarel SM, Schreiber H (2003) Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Phenotype–genotype correlation in patients with borderline D4Z4 repeat numbers. *J Neurol* 250:932–937
- Deidda G, Cacurri S, Piazio N, Felicetti L (1996) Direct detection of 4q35 rearrangements implicated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *J Med Genet* 33:361–365
- Ehrlich M (2004) Exploring hypotheses about the molecular etiology of FSHD: loss of heterochromatin spreading and other long-range interaction models. In: Cooper DN, Upadhyaya M (eds) FSHD facioscapulohumeral muscular dystrophy: molecular cell biology and clinical medicine. BIOS Scientific Publishers, New York, NY, pp 253–276
- Gabellini D, Green MR, Tupler R (2002) Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell* 110:339–348
- Goto K, Nishino I, Hayashi YK (2006) Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 16:256–261
- Hewitt JE, Lyle R, Clark LN, Valleley EM, Wright TJ, Wijmenga C, van Deutekom JC, Francis F, Sharpe PT, Hofker M, Frants RF, Williamson R (1994) Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 3:1287–1295
- Jiang G, Yang F, Van Overveld PG, Vedanarayanan V, Van Der Maarel S, Ehrlich M (2003) Testing the position–effect variegation hypothesis for facioscapulohumeral muscular dystrophy by analysis of histone modification and gene expression in subtelomeric 4q. *Hum Mol Genet* 12:2909–2921
- Kondo T, Bobek MP, Kuick R, Lamb B, Zhu X, Narayan A, Bouré D, Viegas-Pequignot E, Ehrlich M, Hanash SM (2000) Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2. *Hum Mol Genet* 9:597–604
- Lemmers RJ, van der Maarel SM, van Deutekom JC, van der Wielen MJ, Deidda G, Dauwerse HG, Hewitt J, Hofker M, Bakker E, Padberg GW, Frants RR (1998) Inter- and intrachromosomal subtelomeric rearrangements on 4q35: implications for facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) aetiology and diagnosis. *Hum Mol Genet* 7:1207–1214
- Lemmers RJ, de Kievit P, van Geel M, van der Wielen MJ, Bakker E, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2001) Complete allele information in the diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy by triple DNA analysis. *Ann Neurol* 50:816–819
- Lemmers RJ, de Kievit P, Sandkuijl L, Padberg GW, van Ommen GJ, Frants RR, van der Maarel SM (2002) Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. *Nat Genet* 32:235–236
- Lemmers RJ, Osborn M, Haaf T, Rogers M, Frants RR, Padberg GW, Cooper DN, van der Maarel S, Upadhyaya M (2003) D4F104S1 deletion in facioscapulohumeral muscular dystrophy: phenotype, size, and detection. *Neurology* 61:178–183
- Lemmers RJ, van der Wielen MJ, Bakker E, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM (2004) Somatic mosaicism in FSHD often goes undetected. *Ann Neurol* 55:845–850

- Lemmers RJ, van der Wielen MJ, Bakker E, Frants RR, van der Maarel SM (2006) Rapid and accurate diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 16:615–617
- Lunt P (2000) Facioscapulohumeral muscular dystrophy: diagnostic and molecular aspects. In: Deymeer F (ed) *Neuromuscular diseases: from basic mechanisms to clinical management*, vol 18. *Monogr Clin Neurosci* (Karger, Basel) pp 44–60
- Lunt PW, Jardine PE, Koch MC, Maynard J, Osborn M, Williams M, Harper PS, Upadhyaya M (1995) Correlation between fragment size at D4F104S1 and age at onset or at wheelchair use, with a possible generational effect, accounts for much phenotypic variation in 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD). *Hum Mol Genet* 4:951–958
- Lyle R, Wright TJ, Clark LN, Hewitt JE (1995) The FSHD-associated repeat, D4Z4, is a member of a dispersed family of homeobox-containing repeats, subsets of which are clustered on the short arms of the acrocentric chromosomes. *Genomics* 28:389–397
- Matsumura T, Goto K, Yamanaka G, Lee J, Zhang C, Hayashi YK, Arahata K (2002) Chromosome 4q;10q translocations; Comparison with different ethnic populations and FSHD patients. *BMC Neurol* 2:7
- Meneveri R, Agresti A, Marozzi A, Saccone S, Rocchi M, Archidiacono N, Corneo G, Della Valle G, Ginelli E (1993) Molecular organization and chromosomal location of human GC-rich heterochromatic blocks. *Gene* 123:227–234
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215
- Orrell RW, Tawil R, Forrester J, Kissel JT, Mendell JR, Figlewicz DA (1999) Definitive molecular diagnosis of facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology* 52:1822–1826
- Tawil R, Forrester J, Griggs RC, Mendell J, Kissel J, McDermott M, King W, Weiffenbach B, Figlewicz D (1996) Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy. The FSH-DY Group. *Ann Neurol* 39:744–748
- Tsien F, Sun B, Hopkins NE, Vedanarayanan V, Figlewicz D, Winokur S, Ehrlich M (2001) Hypermethylation of the FSHD syndrome-linked subtelomeric repeat in normal and FSHD cells but not in ICF syndrome cells. *Mol Genet Metab* 74:322–331
- Upadhyaya M, Maynard J, Rogers MT, Lunt PW, Jardine P, Ravine D, Harper PS (1997) Improved molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): validation of the differential double digestion for FSHD. *J Med Genet* 34:476–479
- van Deutekom JC, Bakker E, Lemmers RJ, van der Wielen MJ, Bik E, Hofker MH, Padberg GW, Frants RR (1996) Evidence for subtelomeric exchange of 3.3 kb tandemly repeated units between chromosomes 4q35 and 10q26: implications for genetic counseling and etiology of FSHD1. *Hum Mol Genet* 5:1997–2003
- van Geel M, Dickson MC, Beck AF, Bolland DJ, Frants RR, van der Maarel SM, de Jong PJ, Hewitt JE (2002) Genomic analysis of human chromosome 10q and 4q telomeres suggests a common origin. *Genomics* 79:210–217
- Wijmenga C, Hewitt JE, Sandkuijl LA, Clark LN, Wright TJ, Dauwerse HG, Gruter AM, Hofker MH, Moerer P, Williamson R et al (1992) Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 2:26–30
- Wijmenga C, Frants RR, Hewitt JE, van Deutekom JC, van Geel M, Wright TJ, Padberg GW, Hofker MH, van Ommen GJ (1993) Molecular genetics of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 3:487–491
- Winokur ST, Bengtsson U, Feddersen J, Mathews KD, Weiffenbach B, Bailey H, Markovich RP, Murray JC, Wasmuth JJ, Altherr MR, Schutte BC (1994) The DNA rearrangement associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy involves a heterochromatin-associated repetitive element: implications for a role of chromatin structure in the pathogenesis of the disease. *Chromosome Res* 2:225–234
- Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM (2003) Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet* 12:2895–2907
- Wright TJ, Wijmenga C, Clark LN, Frants RR, Williamson R, Hewitt JE (1993) Fine mapping of the FSHD gene region orientates the rearranged fragment detected by the probe p13E-11. *Hum Mol Genet* 2:1673–1678
- Wu ZY, Wang ZQ, Murong SX, Wang N (2004) FSHD in Chinese population: characteristics of translocation and genotype-phenotype correlation. *Neurology* 63:581–583
- Zhang XY, Loflin PT, Gehrke CW, Andrews PA, Ehrlich M (1987) Hypermethylation of human DNA sequences in embryonal carcinoma cells and somatic tissues but not in sperm. *Nucleic Acids Res.* 15:9429–9449