

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko

Małgorzata Dorobek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1989 r. lekarz, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie

1996 r. specjalista I stopnia z neurologii, Klinika Neurologii WUM staż specjalizacyjny 1991 r. – 1996 r.

1996 r. Master of Sciences In Medical Genetics, Department of Human Genetics, University of Newcastle upon Tyne, UK, stypendium finansowane przez British Council 1995 - 1996

1998 r. doktor nauk medycznych, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie. Tytuł rozprawy: „Heterogenność genetyczna i kliniczna dystrofii obręczowo – kończynowej” promotor: prof. dr hab. n. med. Irena Hausmanowa – Petruszewicz, recenzenci: prof. Jacek Zaremba, prof. Ewa Bartnik

1999 r. – specjalista II stopnia z neurologii – staż specjalizacyjny w Klinice Neurologii WUM (okres 1996 – 1999 r.)

2006 r. Licencja PTNK w zakresie elektromiografii

2017 r. Licencja PTNK w zakresie potencjałów wywołanych

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

1991 r. – 2004 r. Zespół Badawczo – Leczniczy Chorób Nerwowo – Mięśniowych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, asystent, od 1998 r. do grudnia 2004 r. – adiunkt

1991 r. – wrzesień 1995 r. – staż specjalizacyjny (Klinika Neurologii, I wydział lekarski WUM)

wrzesień 1995 r. – wrzesień 1996 r. - pobyt na stypendium finansowanym przez British Council, Newcastle upon Tyne, UK, Newcastle University, Department of Human Genetics.

Podypłomowe studia o tematyce genetyka medyczna oraz metodologia molekularna stosowana w diagnostyce schorzeń nerwowo – mięśniowych

październik 1996 r. – kwiecień 1999 r. - staż specjalizacyjny (Klinika Neurologii, I wydział lekarski WUM)

2005 r. – 2009 r. Kierownik Pracowni EMG i Potencjałów Wywołanych w Klinice Neurologii CSK, MSWiA, Warszawa

2009 r. do 31.07.2017 r. , Zastępca Kierownika Kliniki Neurologii, CSK, MSW, Warszawa

01.08.2017 do obecnie, p.o. Kierownik Kliniki Neurologii CSK, MSWiA, Warszawa

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

KORELACJE KLINICZNO – GENETYCZNE W WYBRANYCH DYSTROFIACH MIĘŚNIOWYCH

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

- 1. Dorobek M, Kabzińska D, Ryniewicz B, Fidziańska-Dolot A, Hausmanowa-Petrusewicz I.** Genetic investigations in facioscapulohumeral muscular dystrophy: a preliminary report. *Neurol Neurochir Pol* 2004; 38(2):83-8. **MNiSW 5, IC 7.11**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu planu badania, wieloletniej obserwacji klinicznej pacjentów i członków rodzin, stworzeniu bazy danych DNA i pacjentów, wykonaniu części badań molekularnych, interpretacji wszystkich wyników badań molekularnych w korelacji z obrazem klinicznym, wykonaniu tabel i rycin, napisaniu publikacji, wyboru piśmiennictwa, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 70%.

- 2. Dorobek M, Kabzińska D.** A severe case of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) with some uncommon clinical features and a short 4q35 fragment. *Eur J Paediatr Neurol* 2004;8(6):313-6. **MNiSW 6**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu planu badania, obserwacji klinicznej pacjenta i członków rodziny, interpretacji wyników badań molekularnych w korelacji z

obrazem klinicznym, wykonaniu rycin, napisaniu publikacji, wyboru piśmiennictwa, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 90%.

- 3. Dorobek M, van der Maarel SM, Lemmers RJ, Ryniewicz B, Kabzinska D, Frants RR, Gawel M, Walecki J, Hausmanowa-Petrusewicz I.** Early-onset facioscapulohumeral muscular dystrophy Type 1 with some atypical features. *J Child Neurol* 2014;30(5):580-7. **IF: 1.434, MNiSW 25**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji planu badania, wieloletniej obserwacji klinicznej pacjentów, stworzeniu bazy danych, wykonaniu części badań molekularnych, interpretacji wyników badań molekularnych w korelacji z obrazem klinicznym, wykonaniu tabeli 1 i 2, i ryciny 3 i 4, napisaniu publikacji, wyboru piśmiennictwa. Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 70%.

- 4. Goselink RJM, Voermans NC, Okkersen K, Brouwer OF, Padberg GW, Nikolic A, Tupler R, Dorobek M, Mah JK, van Engelen BGM, Schreuder THA, Erasmus CE.:** Early onset facioscapulohumeral dystrophy – a systematic review using individual patient data. *Neuromuscular Disorders*. Artykuł zaakceptowany do druku. Opublikowany online: wrzesień 20, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2017.09.007>, **IF:2. 969, MNiSW 30**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na pracach nad publikacją przekazaniu klinicznych danych 22 pacjentów z wczesnym początkiem dystrofii twarzowo – łopatkowo – ramieniowej. Mój wkład oceniam na 10%

- 5. Dorobek M, Szmidt-Sałkowska E, Rowińska-Marcińska K, Gawel M, Hausmanowa-Petrusewicz I.** Relationships between clinical data and quantitative EMG findings in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurol Neurochir Pol* 2013;47(1):8-17. **IF: 0.537, MNiSW 25**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji planu badania, wieloletniej obserwacji klinicznej pacjentów, stworzeniu bazy danych, wykonaniu części badań molekularnych, interpretacji wyników badań molekularnych w korelacji z obrazem klinicznym, wykonaniu tabeli 1 i 2,3 i ryciny 1, napisaniu pracy, wyboru piśmiennictwa, Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 70%.

- 6. Dorobek M, Fidziańska-Dolot A.** Sarcoglycanopathies, a particular limb-girdle muscular dystrophy type (phenotype in three Polish families): initial report. *Neurol Neurochir Pol* 2002;36(6):1095-105. **MNiSW 5, IC 4.55**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu koncepcji i planu badania, obserwacji klinicznej pacjentów, interpretacji wyników badań immunocytochemicznych w korelacji z obrazem klinicznym, wykonaniu tabel, napisaniu publikacji, wyboru piśmiennictwa, pełnieniu roli autora korespondencyjnego. Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 80%.

7. **Dorobek M**, Ryniewicz B, Kabzińska D, Fidziańska A, Styczyńska M, Hausmanowa-Petrusewicz I. The frequency of c.550delA mutation of the CANP3 gene in the Polish LGMD2A population. Genet Test Mol Biomarkers. 2015;19(11):637-40.

IF: 1.297, MNiSW 15,

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: opracowaniu planu i koncepcji badania, nadzorze nad wykonaniem badań, wieloletniej obserwacji klinicznej pacjentów, stworzeniu bazy danych, wykonaniu części badań molekularnych, interpretacji wyników badań molekularnych, w korelacji z obrazem klinicznym, napisaniu publikacji, wyborze piśmiennictwa, pełnieniu roli autora korespondencyjnego, Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 70%.

8. Nadaj-Pakleza AA, **Dorobek M**, Nestorowicz K, Ryniewicz B, Szmidt-Sałkowska E, Kamińska AM. Muscle pathology in 31 patients with calpain 3 gene mutations. Neurol Neurochir Pol. 2013;47(3):214-22.

IF: 0.537, MNiSW 15, IC 12.45

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: postawieniu klinicznego i genetycznego rozpoznania, stworzeniu bazy danych pacjentów, wykonaniu części badań molekularnych i nadzorze nad tymi badaniami, interpretacji wyników badań molekularnych w korelacji z obrazem klinicznym, Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 30%.

9. Hausmanowa - Petrusewicz I, Rowińska - Marcińska K, Fidziańska A, Niebrój - Dobosz I, **Dorobek M**. Heterogenność genetyczna zespołu Emery – Dreifussa. Doniesienie wstępne. Neurologia Dziecięca 2000; 9(18): 21-6.

MNiSW 3, IC 1.44

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: ocenie i obserwacji klinicznej pacjentów, stworzeniu bazy danych EDMD, stworzeniu banku DNA, wyborze piśmiennictwa. Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 30 %.

10. Rowińska - Marcińska K, Szmidt - Sałkowska E, Fidziańska A, Zalewska E, **Dorobek M**, Karwańska A, Hausmanowa-Petrusewicz I. Atypical motor unit potentials in Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). Clin Neurophysiol 2005; 116 (11):2520-7. **IF: 2,64 MNiSW 20, IC 12.54**

Mój wkład w powstanie pracy polegał na: obserwacji klinicznej pacjentów, stworzeniu bazy danych EDMD, stworzeniu banku DNA, analizie artykułu. Mój wkład w powstanie pracy oceniam na 20 %.

c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Dystrofie mięśniowe to grupa genetycznie uwarunkowanych schorzeń u podłoża, których leży zanik tkanki mięśniowej, jej zastąpienie tkanką tłuszczową i włóknieniem. Kliniknym wyrazem tego procesu jest postępujące osłabienie i zanik mięśni. Opisano kilkadziesiąt różnych postaci dystrofii, które wynikają z mutacji różnych genów – które w większości kodują białka komórki mięśniowej. Przy podziale dystrofii uwzględnia się: sposób dziedziczenia (autosomalnie recesywny, autosomalnie dominujący, recesywny sprzężony z płcią), początek objawów (wiek dziecięcy, dorosły), zajęcie określonych grup mięśniowych, a w ostatnich latach także gen kodujący określone białko komórki mięśniowej, którego deficyt lub brak stwierdza się w danej jednostce chorobowej. Zajęcie mięśnia serca (pierwotne lub wtórne) może współistnieć z wieloma dystrofiami mięśniowymi.

Przedmiotem badań były: dystrofia twarzowo – łopatkowo – ramieniowa (ang. FSHD, *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*), wybrane postaci dystrofii obręczowo – kończynowej (ang. LGMD, *limb girdle muscular dystrophy*) i dystrofii Emery – Dreifussa (ang. EDMD, *Emery- Dreifuss muscular dystrophy*). Schorzenia te należą do chorób rzadkich. Dystrofie te zostały wybrane ze względu na to, że nie były wcześniej badane w Polsce genetycznie i elektrofizjologicznie oraz ponieważ mogą sprawiać pewne trudności diagnostyczne, a dodatkowo w przypadku dystrofii typu Emery – Dreifussa, - również ze względu na współwystępowanie groźnych dla życia zaburzeń kardiologicznych.

Prace uwzględnione w cyklu powstały w oparciu o moje wieloletnie doświadczenie kliniczne i specjalistyczne, zainteresowania tematyką chorób mięśni oraz ich podłożem genetycznym. Samodzielnie stworzyłam bazę danych (pacjentów i DNA), wybrałam i wyselekcjonowałam grupy pacjentów, prowadziłam wieloletnią obserwację kliniczną, zaplanowałam, wykonałam i zinterpretowałam testy molekularne oraz zinterpretowałam i częściowo wykonałam badania elektrofizjologiczne.

Dystrofia twarzowo – łopatkowo – ramieniowa (ang. *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*, FSHD) należy do chorób rzadkich, niemniej jednak jest jedną z najczęstszych dystrofii, trzecią co do częstości po dystrofii miotonicznej i dystrofinopatiach. Występuje z częstością 5 - 13/100000 osób w populacji [Deenen 2014, Mostacciuolo 2009] i dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący. Fenotyp FSHD został po raz pierwszy opisany w 1884 r. [Landouzy i Dejenire 1884]. Typowy klasyczny fenotyp FSHD charakteryzuje się powoli postępującym zazwyczaj asymetrycznym osłabieniem mięśni twarzy, obręczy barkowej, następnie mięśni kończyn dolnych i tułowia [Padberg 1982].

W przeważającej liczbie przypadków pierwsze objawy pojawiają się w drugiej, trzeciej dekadzie życia. Fenotypowa ekspresja jest bardzo zmienna i obejmuje spektrum od objawów subklinicznych (około 20% pacjentów) do postaci FSHD ze znacznym osłabieniem kończyn dolnych, prowadzącym do unieruchomienia pacjentów (około 20% przypadków).

Według Brouwer'a pacjenci z FSHD o wczesnym początku, - to chorzy z osłabieniem mięśni twarzy występującym przed 5 r. ż. i osłabieniem mięśni kończyn występującym przed 10 r. ż. [Brouwer 1994]. Rokowanie i przebieg w postaciach FSHD o wczesnym początku są odmienne. Według piśmiennictwa, chorzy z FSHD o wczesnym początku mogą stanowić 4,2% - 16% wszystkich pacjentów z tym typem dystrofii mięśniowej, w zależności od badanej populacji.

Dotychczas zidentyfikowano dwie genetycznie odmienne postacie choroby: FSHD1 i FSHD2. FSHD1 stanowią 90 - 95% przypadków, a defekt genetyczny wynika z delecji powtórzeń mikrosatelitarnych D4Z4 w *locus 4q35* (FSHD1). U osób zdrowych występuje od 11 do 100 takich powtórzeń, u pacjentów z FSHD w wyniku delecji w *locus 4q35* pozostaje 1 – 10 fragmentów D4Z4 [van der Maarel 2011]. Każde z powtórzeń D4Z4 zawiera retrogen DUX4 (ang. *Double homeobox, 4*). Według modelu epigenetycznego zmiany w metylacji powtórzeń D4Z4 i modyfikacje chromatyny oraz jej relaksacja, powodują nieprawidłową ekspresję DUX4 w mięśniach szkieletowych [Hewitt 2015]. Uważa się, że ekspresja DUX4 zaburza proces różnicowania komórek mięśniowych, powoduje śmierć komórek w procesie apoptozy, ich nadmierną wrażliwość na stres oksydacyjny.

Opisano nieliczne (5% - 10%) przypadki FSHD, w których nie stwierdza się delecji w *locus 4q35*. Ten wariant nazwano FSHD2. W większości przypadków FSHD2 stwierdza się mutacje w genie zaangażowanym w epigenetyczny proces modyfikacji tzw.: *SMCHD1* (ang. *Structural Maintenance of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1 gene*) [Lemmers 2012]. Mutacje w *SMCHD1* powiązane są z hypometylacją D4Z4, relaksacją chromatyny i ekspresją transkryptu DUX4.

Tak więc, w obu FSHD1 i FSHD2 relaksacja chromatyny powtórzeń D4Z4 w komórkach somatycznych powoduje nieprawidłową ekspresję retrogeny DUX4 w komórkach mięśni szkieletowych. Jednak tylko określone haplotypy 4qA *locus 4q35*, zawierają sygnał poliadenylacji, który stabilizuje transkrypt DUX4 w komórkach mięśniowych, pozwalając na ujawnienie fenotypu. DUX4 jest czynnikiem transkrypcyjnym, którego ekspresja w warunkach normalnych jest tłumiona w komórkach somatycznych. Mechanizm w jaki nieprawidłowa ekspresja DUX4 prowadzi do uszkodzenia mięśni nie jest znany, ale sugeruje

się możliwy wpływ na procesy apoptozy, upośledzenie regeneracji komórek mięśniowych, zmiany przetwarzania RNA i wpływ na ekspresję genów w komórkach macierzystych [Mul 2017].

Korelacje kliniczno – genetyczne w FSHD1 są złożone. Istnieje odwrotna korelacja między liczbą pozostałych w wyniku delecji powtórzeń D4Z4, a fenotypem klinicznym. Im większa jest delecja D4Z4, tym wcześniejszy początek choroby, szybsza progresja i bardziej wyrażone objawy kliniczne [Lemmers 2014]. Jednak zależność ta nie zawsze występuje. U pacjentów z delecją o tej samej wielkości, ekspresja fenotypowa może być różna, nawet w tej samej rodzinie, co tylko w części przypadków wynika z mozaicyzmu somatycznego. Ocenia się, że w 10 – 20% przypadków nosiciele delecji mogą nie wykazywać objawów choroby [Mul 2017].

Zbadano pacjentów z 95 rodzin, z klinicznym rozpoznaniem lub poważnym podejrzeniem FSHD, u których dokonano oceny stanu klinicznego (przynajmniej dwukrotnie, w rok – do 10 lat, od postawienia rozpoznania), przeprowadzono: histopatologiczne i elektrofizjologiczne badania mięśni oraz badania genetyczne. Badaniom molekularnym poddano 248 osób (z 95 rodzin), w tym chorych oraz członków ich rodzin (wszyscy wyrazili zgodę na udział w badaniach). Badana grupa obejmowała pacjentów Kliniki Neurologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz konsultowanych w Zespole Chorób Nerwowo – Mięśniowych IMDiK, PAN.

Pierwszą część badań genetycznych wykonałam w Zakładzie Genetyki Uniwersytetu w Leiden (Holandia), będącym wiodącym ośrodkiem w badaniach nad podłożem molekularnym FSHD w Europie. Po odbyciu szkolenia w Leiden zaadaptowałam metodologię testu genetycznego w kierunku FSHD w pracowni genetycznej IMDiK, PAN w Warszawie. Tu zbadano genetycznie pozostałych pacjentów. Były to pierwsze badania nad podłożem molekularnym FSHD wykonane w Polsce. Większość prac wykonywałam samodzielnie, samodzielnie dokonałam interpretacji wyników oraz przeanalizowałam korelacje kliniczno – genetyczne. Należy podkreślić, iż mimo postępu genetyki molekularnej - diagnostyka FSHD jest nadal oparta na tej metodologii.

DNA izolowano z krwi obwodowej metodą solną i/lub zatapiano w bloczkach agarozowych, następnie trawiono enzymami restrykcyjnymi EcoRI, BlnI, HindIII. DNA poddano elektroforezie klasycznej, w części przypadków elektroforezie w zmiennym polu elektrycznym (ang. *Pulse Field Gel Electrophoresis*, PFGE). Następnie, DNA przeniesiono

na membrany i poddano hybrydyzacji z sondą p13E-11, która rozpoznaje charakterystyczny dla FSHD polimorfizm (delecję), w niektórych przypadkach z sondą 9B6A, która rozpoznaje same powtórzenia D4Z4. Dla rozpoznania alleli 4qA/4qB, próbki DNA były trawione enzymem restrykcyjnym *HindIII*, a następnie poddane elektroforezie i hybrydyzacji, z użyciem sond molekularnych 4qA and 4qB. Pozycje sond były uwidocznione autoradiograficznie (rezultaty hybrydyzacji przedstawione zostały na rycinach w pracy 1 i 3 cyklu). Przy podejrzeniu mozaicyzmu somatycznego, procent komórek z delecją 4q35 oceniono programem Image - Quant.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono molekularną weryfikację rozpoznań FSHD, postawionych na podstawie objawów klinicznych. W 26 z 95 rodzin nie stwierdzono delecji w *locus 4q35* i postawiono inne diagnozy: miopatii wrodzonej (dwa przypadki miopatii nemalinowej), zapalenia wielomięśniowego, niedorozwoju mięśnia piersiowego, neuropatii oraz innych dystrofii mięśniowych (głównie LGMD2A).

Ad. 1. Wstępne wyniki badań nad dystrofią twarzowo – łopatkowo – ramieniową zostały przedstawione w pierwszej pracy cyklu, pt. :”Badania genetyczne w dystrofii twarzowo – łopatkowo – ramieniowej”. Analizie poddano obraz kliniczny, przebieg choroby oraz wyniki badań molekularnych u 62 pacjentów z FSHD z 44 rodzin (w tym 18 przypadków sporadycznych). W 23% badanych rodzin, fenotyp oceniono jako ciężki. Za ciężkie przypadki uznano te, w których pierwsze objawy choroby wystąpiły przed końcem pierwszej dekady życia, z przebiegiem szybkim i złośliwym. We wszystkich dziecięcych postaciach FSHD delecje były duże tj. efektem delecji były fragmenty *EcoRI/BlnI* o wielkości 10-15 kz (kilo zasad). W całej grupie badanych pacjentów, stwierdzono znaczny odsetek (41%) dużych delecji (D4Z4 10 – 15 kz), które w większości (67%) występowały u pacjentów ze sporadyczną postacią FSHD. Średni wiek zachorowania u tych chorych przypadkał na 10 rok życia.

U pacjentów ze sporadyczną postacią FSHD i delecją 4q35 o średniej wielkości (D4Z4 20 – 29 kz) średni wiek zachorowania był istotnie późniejszy i przypadkał na 21 rok życia. W przypadkach rodzinnych duże delecje stanowiły jedynie 27%. Delecje średniego rozmiaru – z fragmentem *EcoRI/BlnI* o wielkości 16-29 kz - występowały w 57% rodzin i dominowały w przypadkach rodzinnych (69%). Mała delecja została stwierdzona w jednej rodzinie (*EcoRI/BlnI* fragment 30 kz). W jednym przypadku potwierdzono mozaikowość somatyczną.

Uzyskane wyniki pozwoliły na potwierdzenie wcześniejszych obserwacji, że im większa delecja, tym wcześniejszy początek i szybszy przebieg FSHD. W badanej grupie występowały jednak odstępstwa od tej reguły. W rodzinach z dużą delecją jedynie w 55% przypadków choroba ujawniała się wcześnie (tj. przed 10 rokiem życia). Natomiast wśród rodzin z małymi i średnimi delecjami nie było chorych z FSHD o wczesnym początku. W badanej grupie u niektórych pacjentów obserwowano nietypowy fenotyp FSHD, który charakteryzował się izolowanym, jednostronnym i asymetrycznym osłabieniem mięśni obręczy barkowej lub asymetrycznym osłabieniem mięśni dosiebnych kończyn dolnych. U 8 pacjentów (12%) nie stwierdzono osłabienia mięśni twarzy lub/i typowego dla FSHD braku stabilizacji łopatek powodującego unoszenie się ich przy odwodzeniu ramion.

Mutacje *de novo* stwierdzono w 11% rodzin, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, w których podawano odsetek 10- 30% mutacji *de novo* w FSHD [Lemmers 2014]. Praca ta jest pierwszym oryginalnym, genetyczno – klinicznym opracowaniem grupy pacjentów z FSHD w populacji polskiej.

Ad. 2. W drugiej pracy z cyklu opisano rodzinę z pacjentką z FSHD o wczesnym początku i nietypowym przebiegu klinicznym. Pierwszym objawem w piątym miesiącu życia była postępująca, początkowo prawostronna ptoza i niezdolność do zamykania oczu. Rozwój ruchowy był opóźniony, samodzielny chód w 17 miesiącu życia charakteryzował się częstymi upadkami i trudnościami ze wstawaniem. Asymetryczne ustawienie łopatek współistniało z brakiem ich stabilizacji, pogłębiona lordoza w odcinku lędźwiowym była znaczna, od 4 roku życia stosowano gorset w pozycji siedzącej. W 7 roku życia stwierdzono osłabienie i zanik mięśni proksymalnych kończyn górnych i dolnych. Chód był kaczkowaty z opadaniem stóp. Osłabienie mięśni twarzy z osłabieniem mięśnia okrężnego ust skutkowało mową nosową i dyzartryczną. Osłabienie słuchu wymagało stosowania aparatu słuchowego. Badanie tomografii komputerowej głowy i EEG były prawidłowe.

U jednego z rodziców w wieku 44 lat stwierdzono niezdolność do nadymania policzków i gwizdania, osłabienie zginaczy przedramienia prawego i barku – bez progresji.

PFGE po wcześniejszym trawieniu enzymami restrykcyjnymi EcoRI/BlnI z hybrydyzacją sondą molekularną P13E11 wykazała obecność fragmentów o wielkości 8.6 kb u probanda i u jednego z rodziców. U rodzica delecja 4q35 była obecna w około 20% komórek somatycznych, co wskazywało na mozaicyzm somatyczny. Niewielki odsetek komórek z delecją może tłumaczyć łagodny, niepostępujący przebieg choroby u rodzica.

Praca ta podkreśla znaczenie mozaicyzmu somatycznego i heterogenności fenotypowej z nim związanej. Klasyczna elektroforeza z następową hybrydyzacją metodą Southerna, stosowana w rutynowych badaniach diagnostycznych, - może nie wykazać mozaicyzmu somatycznego, co utrudnia poradnictwo genetyczne. Dlatego w przypadkach nowo zdiagnozowanych rodzin, w szczególności kiedy fenotyp pacjenta jest znacznie łagodniejszy, niż ten oczekiwany wobec wielkości delecji, - należy rozważyć wykonanie testu PFGE.

Opisana w tym doniesieniu rodzina charakteryzuje się pewnymi nietypowymi cechami. Postępująca ptoza uznawana była za jedno z kryteriów wykluczających FSHD [Padberg 1996, Padberg 1997], - i nadal uznawana jest za objaw nietypowy w tej jednostce chorobowej.

Trudności sprawia również postępowanie rehabilitacyjne i ortopedyczne w przypadkach z tak zaawansowaną hyperlordozą u pacjentów z wczesnodziecięcą postacią FSHD.

Ad. 3. Trzecia praca prezentuje wyniki badań nad dystrofią twarzowo – łopatkowo – ramieniową typu I, o wczesnym początku. Celem tej pracy było wyłonienie z genetycznie homogennej grupy 69 rodzin z FSHD, przypadków o tzw. wczesnym początku, ocena częstości ich występowania, charakterystyka kliniczna, z uwzględnieniem objawów poza mięśniowych i nietypowych.

Częstość występowania FSHD o wczesnym początku w populacji polskiej oceniono na 21%. Wśród 69 rodzin z FSHD - chorych z wczesnym początkiem choroby zidentyfikowano w 26% rodzinach. Osłabienie mięśni twarzy było wyraźnie u ponad 50% pacjentów już w okresie niemowlęcym, zatem można im przypisać tzw. postać niemowlęcą FSHD wg. Brooke i Carroll & Brooke, w której osłabienie mięśni twarzy jest pierwszym objawem występującym w pierwszych dwóch latach życia [Brooke 1977, Carroll and Brooke 1979]. W badanej grupie chorych z FSHD o wczesnym początku rozwój ruchowy był opóźniony niemal w 1/3 przypadków. Jedna trzecia pacjentów utraciła zdolność samodzielnego poruszania się w wieku 9-31 lat (średnio w 20 roku życia). Nadmierna hyperlordoza lędźwiowa występowała w ponad połowie przypadków, a skolioza w odcinku piersiowym kręgosłupa w 27% przypadkach. U 9% (2) chorych stwierdzono niewydolność oddechową (14 r. ż. i 18 r. ż.) . Zajęcie ośrodkowego układu nerwowego (upośledzenie słuchu, niepełnosprawność intelektualna, padaczka) opisywano w literaturze u około 40-50% chorych z FSHD o wczesnym początku [Brouwer 1995, Funakoshi 1998]. W grupie badanej u 30% pacjentów stwierdzono zajęcie ośrodkowego układu nerwowego (w 18% przypadków

niepełnosprawność intelektualną, a w 22% - osłabienie słuchu). U części pacjentów występowały łącznie; osłabienie słuchu oraz niepełnosprawność intelektualna.

Wykazano również obecność nietypowych dla tej dystrofii objawów: opadanie głowy (2), asymetryczną postępującą ptozę (1), kardiomiopatię przerostową (1), przykurcze niezwiązane z unieruchomieniem. Przykurcze ścięgien Achillesa, w stawach łokciowych, kolanowych i biodrowych (w różnej konfiguracji) zaobserwowano u 4 chorych.

Obserwowaliśmy różnie wyrażoną zmienność wewnątrzrodzinną, która przynajmniej w dwóch przypadkach związana była z mozaicyzmem somatycznym u rodziców. W piśmiennictwie podaje się, że fenotyp dorosłych z mozaicyzmem somatycznym zależy od wielkości allelu 4q35, odsetka komórek z delecją i płci [Lemmers 2004], podobną zależność stwierdziliśmy u naszych pacjentów. W naszym materiale mozaicyzm somatyczny stwierdziliśmy w 2 przypadkach na 9 mutacji *de novo* (w 1/5 przypadków). Kobieta z mozaicyzmem somatycznym nie wykazywała objawów choroby, a mężczyzna przejawiał dyskretne niepostępujące objawy osłabienia mięśni prawej obręczy barkowej.

U piętnastu pacjentów z wczesnym początkiem FSHD wykonano biopsję mięśniową. W dwóch przypadkach nie stwierdzono nieprawidłowości, w kolejnych dwóch uzyskano jedynie tkankę łączną. W dziesięciu pozostałych biopsjach stwierdzono różnie nasilone (dyskretne lub znaczne) zmiany miopatyczne. U jednego pacjenta zmiany w biopsji sugerowały cechy zapalne, jednak zastosowanie leczenia sterydami nie miało wpływu na nasilenie objawów i przebieg. Nie stwierdzono korelacji między nasileniem zmian w biopsji mięśniowej, zmianami elektromiograficznymi a stopniem zajęcia mięśni i fenotypem. Oprócz potwierdzenia procesu miopatycznego i wykluczenia innych schorzeń np. strukturalnych miopatii – wyniki biopsji nie przyczyniły się do postawienia nozologicznego rozpoznania i nie miały wpływu przewidywanie możliwego przebiegu choroby.

Fragmety EcoRI/BlnI powstałe w wyniku delecji w *locus 4q35* były wielkości od 9 kz do 19 kz), jednak najczęściej stwierdzano fragmenty o wielkości 10 kz. W 50% badanych rodzin, zachorowanie związane było z nową mutacją.

Identyfikacja i charakterystyka pacjentów z FSHD o wczesnym początku jest ważna ze względu na możliwy szybszy przebieg, większe nasilenie objawów klinicznych, odmienne rokowanie oraz częstsze występowanie objawów pozamięśniowych.

Ad 4. Kolejną pracą cyklu, to publikacja przeglądowa. W dotychczasowych doniesieniach literaturowych, przedstawione zostały opisy stosunkowo małych grup pacjentów (do 36 pacjentów) lub pojedyncze przypadki. Brak jest natomiast szczegółowych danych dotyczących fenotypu, przebiegu choroby, dodatkowych objawów klinicznych. Dlatego, przeanalizowano piśmiennictwo w celu poszukiwania doniesień dotyczących opisów FSHD o wczesnym początku. W publikacji tej uwzględniono 43 prace z danymi klinicznymi 227 pacjentów. W ¼ pacjentów z wczesnym początkiem FSHD, pierwsze objawy pojawiły się w pierwszym roku życia, - dotyczyły one głównie osłabienia mięśni twarzy, co powodowało trudności w karmieniu i niemożność zamykania oczu. Średni wiek chorych w chwili doniesienia (publikacji) wynosił 18.8 lat, w tym wieku 40% pacjentów było już niezdolnych do samodzielnego poruszania się. U połowy pacjentów stwierdzono objawy niezwiązane z zajęciem mięśni szkieletowych, najczęściej upośledzenie słuchu (40%), nieprawidłowości siatkówki (37%) i rzadziej upośledzenie rozwoju psychoruchowego, padaczkę, a także zaburzenia kardiologiczne. U 32% pacjentów stwierdzono przynajmniej jeden z tych objawów, a w 18% pacjentów występowało przynajmniej dwa lub więcej objawów niezwiązanych z zajęciem mięśni szkieletowych. Nieprawidłowości dotyczące kręgosłupa były częste, (70%), wynikały z zaawansowanej hyperlordozy (51%), kyfoskoliozy (9%), obserwowano również nieprawidłowości budowy klatki piersiowej (lejkowata) oraz mnogie deformacje kostne.

Stwierdzono korelacje między wielkością delecji *4q35* a ciężkością i zaawansowaniem dystrofii (tj. im większa delecja, tym wcześniejszy początek), podobnie jak w postaci FSHD wieku dorosłego. *De novo* mutacje w FSHD1 były częstsze w przypadkach o wczesnym początku.

Analiza przypadków wybranych w tej pracy wskazuje, że, postać o wczesnym początku charakteryzuje się cięższym fenotypem i częstszym występowaniem objawów niezwiązanych z zajęciem mięśni szkieletowych. Podobnie jak w przypadkach wieku dorosłego, obserwuje się znaczną heterogenność kliniczną w przypadkach o dziecięcym początku. W piśmiennictwie nie ma lub rzadkie są opisy naturalnego przebiegu choroby. Wobec rzadkości samego schorzenia, potrzebne są badania wielośrodkowe, które pozwolą na lepsze poznanie tych zagadnień, a przez to na dokładniejsze przewidywanie przebiegu choroby i postępowanie w przypadku licznych i dość częstych współwystępujących objawów klinicznych.

Podsumowanie korelacji genotypowo-fenotypowych pacjentów z FSHD1

Rozpoznanie FSHD potwierdzone zostało na podstawie badań molekularnych w 69 rodzinach. Przypadków sporadycznych było 28, pozostałe są rodzinne. W większości badanych rodzin, stwierdzono zmienność wewnątrzrodzinną przebiegu choroby. Wyrażała się ona różnym wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby, stopniem ich nasilenia oraz selektywnością osłabienia poszczególnych grup mięśniowych. U większości pacjentów zaznaczona była asymetria zaniku i osłabienia mięśni. Asymetria objawów jest bardzo charakterystyczna dla FSHD. Pierwsze objawy choroby w tej grupie chorych wystąpiły między 1 a 42 rokiem życia. W 5 rodzinach, w których obserwowano chorych z pełnoobjawowym obrazem FSHD, stwierdzono również bezobjawowych nosicieli delecji 4q35. Nosicielkami były głównie kobiety w wieku 16- 55 lat. W badanej grupie chorych, w 19 przypadkach (tj. w 18%) pierwsze objawy choroby wystąpiły w/po 20 roku życia, w pozostałych przypadkach początek był wcześniejszy. Pozostaje to w zgodzie z danymi literaturowymi, w których podaje się, że u większości chorych pierwsze objawy kliniczne występują przed 20 rokiem życia [Tawil 2014, Padberg 1982].

U 14% chorych stwierdzono objawy pozamięśniowe: upośledzenie umysłowe, padaczkę, niedosłuch, odwarstwienie siatkówki i kardiomiopatię przerostową. Klinicznie jawny niedosłuch zmysłowo – odbiorczy dotyczył 12% chorych. Objawy pozamięśniowe były znamienne częstsze u pacjentów z postacią o wczesnym początku i występowały u 32% chorych, u pozostałych chorych z FSHD - w 10% przypadków. Upośledzenie umysłowe, niedosłuch, padaczka oraz zaburzenia naczyniowe siatkówki należą do obrazu chorobowego w FSHD. Kardiomiopatii nie wiązano z obecnością delecji 4q35, jednak pacjenci z FSHD włączani są do przesiewowych badań kardiologicznych, oferowanych chorym z chorobami mięśni [Trevisan 2006, van Dijk 2014].

U 5 chorych z FSHD stwierdzono pewne nietypowe cechy w obrazie klinicznym: opadanie głowy, przykurcze wielostawowe (w tym w stawach kolanowych i biodrowych) nie związane z osłabieniem mięśni, postępujące asymetryczne opadanie powiek oraz polineuropatię ruchowo - czuciową. Przed erą badań genetycznych objawy te pozwalały odrzucić podejrzenie FSHD [Padberg 1996, Padberg 1997]. Niemniej jednak nie można wykluczyć nawet nikłej możliwości rzadkiego współwystępowania FSHD z innym niezdiagnozowanym przez nas schorzeniem.

U niektórych chorych po wykluczeniu delecji 4q35 i ponownej analizie obrazu klinicznego choroby, wysunięto podejrzenie LGMD (ang.; *limb – girdle muscular dystrophy*). W Europie najczęstszą postacią LGMD jest typ 2A, związany z mutacją w genie kapaliny 3. Wobec

konieczności różnicowania FSHD z LGMD2A, u niektórych chorych uruchomiono i wdrożono diagnostykę molekularną tej postaci dystrofii. Badania genu kalpajny 3 pozwoliły na rozpoznanie LGMD2A w 16 przypadkach. Okazało się więc, że różnicowanie FSHD z LGMD2A było trafne w 12% przypadków, pierwotnie rozpoznanych jako FSHD.

Wobec podobieństwa fenotypowego, w niektórych przypadkach między oboma typami dystrofii, Leidenroth i inni wskazali na konieczność molekularnej diagnostyki różnicowej FSHD with LGMD2A [Leidenroth 2012].

Ad. 5. Piąta praca z cyklu przedstawia charakterystykę elektrofizjologiczną homogennej genetycznie grupy pacjentów z FSHD1. Pewne nietypowe dla miopatii zmiany elektrofizjologiczne, takie jak; podwyższona amplituda pojedynczych jednostek ruchowych i spontaniczna aktywność elektryczna w spoczynku były opisywane w FSHD przed erą diagnostyki molekularnej [Padberg 1997, Munsat 1972].

Celem analizy było wykazanie ewentualnych zależności pomiędzy fenotypem a zmianami elektrofizjologicznymi, a wobec selektywności zajęcia mięśni – wskazanie, w których mięśniach najwcześniej pojawiają się zmiany miopatyczne oraz jakie parametry wykazują największą czułość, pozwalającą stwierdzić miopatyczny charakter zmian. Planowaliśmy również ocenę zmian elektrofizjologicznych w przypadkach subklinicznych.

Badania elektrofizjologiczne przeprowadzone zostały według jednolitego schematu w grupie 37 pacjentów z rozpoznaniem FSHD1 w wieku 7–58 lat (średnia 28,8 lat). Pacjenci należeli do trzech różnych fenotypowo i różnych liczbowo grup: o wczesnym początku (według Brouwer'a), o klasycznym fenotypie oraz do grupy z objawami subklinicznymi. Wykonano ilościowe badanie EMG (elektromiograficzne) mięśni: bocznego uda (ang. *vastus lateralis*, VL), piszczelowego przedniego (*tibialis anterior* TA), naramiennego (*deltoid*, DD) i dwugłowego ramienia (*biceps brachii*, BB), po stronie słabszej, - z użyciem koncentrycznej elektrody igłowej (DCN 37, Medtronic) i aparatu Keypoint, Medtronic Functional Diagnostics EMG System.

Podczas ruchu dowolnego analizowano parametry MUP (ang. *Motor Unit Potential*): czas trwania, amplitudę, wskaźnik wielkości SI (ang. *Size Index*) oraz odsetek potencjałów wielofazowych. Analizowano zapis spoczynkowy oraz zapis podczas maksymalnego wysiłku, jego amplitudę i gęstość zapisu.

Badania elektromiograficzne potwierdziły miopatyczny charakter zmian u wszystkich pacjentów oraz w 130 z 136 mięśni badanych. W niewielkim odsetku przypadków, tj. u 14%

chorych stwierdzono czynność spoczynkową (fibrylacje, dodatnie potencjały odnerwienia, wyładowania pseudomiotoniczne).

Patologiczną interferencję zapisu wysiłkowego stwierdzono tylko w około 40% badanych mięśni. Amplitudę zapisu wysiłkowego mniejszą niż 1 mV zarejestrowano w około 50% badanych mięśni, najczęściej w mięśniu naramiennym i piszczelowym przednim. Patologiczny zapis interferencyjny z amplitudą poniżej 1 mV korelował z obniżoną siłą mięśniową (w skali MRC 3.2) (ang. *Medical Research Council*) tylko w mięśniu piszczelowym przednim.

Maksymalną amplitudę zapisu wysiłkowego o wartości powyżej 5 mV wykazano w około 9% mięśni, najczęściej w mięśniu obszernym uda i naramiennym.

W badanych mięśniach stwierdzono różnie obniżone parametry pojedynczych jednostek ruchowych, a zmiany te najczęściej stwierdzano w mięśniach piszczelowych przednich i naramiennych, w których w ponad 50% wykazano skrócenie czasu trwania MUP i obniżenie wskaźnika SI. O selektywności zajęcia mięśni w FSHD świadczy fakt, że tylko u 14% pacjentów zarówno wskaźnik SI jak i czas trwania potencjałów były obniżone we wszystkich czterech badanych mięśniach.

W przypadkach subklinicznych zmiany miały typowy charakter miopatyczny, a u jednego pacjenta obniżenie wskaźnika SI było jedyną nieprawidłowością.

Biopsja mięśniowa wykonana została u 28 pacjentów (w 10 przypadkach badano mięsień obszerny uda boczny, w 18 - mięsień naramienny). W 1/3 przypadków wynik biopsji mięśniowej był prawidłowy. U pozostałych pacjentów zmiany miały charakter miopatyczny i różniły się jedynie stopniem nasilenia, obserwowano głównie zanik włókien mięśniowych i zmniejszoną liczbę włókien typu 1. Nie stwierdzono korelacji między zmianami elektrofizjologicznymi, zmianami histopatologicznymi, a stopniem nasilenia osłabienia mięśni. Jednakże rezultaty badań EMG i histopatologicznych nie pochodziły z tych samych mięśni, ponieważ biopsję zawsze wykonywano po stronie przeciwnej do EMG, a nadto zajęcie mięśni w FSHD jest asymetryczne i selektywne.

Nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy stopniem nasilenia zmian elektrofizjologicznych a wiekiem pacjentów. Wynik ten nie był niespodziewany, jako, że badana grupa była heterogenna klinicznie, co wyrażało się różnym wiekiem wystąpienia pierwszych objawów, różnie szybką progresją i znaczną selektywnością zajęcia poszczególnych grup mięśniowych. Podsumowując u wszystkich pacjentów stwierdzono zmiany miopatyczne o różnym nasileniu w różnych mięśniach, ale mogą także występować pewne cechy dla miopatii

niecharakterystyczne (spontaniczna aktywność w spoczynku, wysoka amplituda pojedynczych MUPs, podwyższona amplituda zapisu wysiłkowego), a nawet zapis może być prawidłowy. Zmiany miopatyczne były szczególnie wcześnie i wyraźnie wyrażone w mięśniach piszczelowych przednich i naramiennych. Wskaźnik SI okazał się być szczególnie czuły w ocenie zmian miopatycznych u pacjentów z objawami subklinicznymi.

Dystrofie obręczowo – kończynowe – wprowadzenie

Dystrofie obręczowo – kończynowe (*ang. limb-girdle muscular dystrophies*, LGMDs) należą do schorzeń rzadkich, a ich częstość występowania oceniana jest różnie od 0,07 - 0,43 na 100 000 osób w populacji [Narayanaswami 2014] do 1-9 na 100 000 [Orphanet]. LGMDs są heterogenną grupą wrodzonych miopatii, których wspólną cechą jest postępujące proksymalne osłabienie mięśni kończyn (obręczy biodrowej i barkowej), o różnym początku (w wieku dziecięcym i dorosłym) oraz przebiegu szybkim lub powolnym. LGMDs podzielono na dwie główne grupy w zależności od sposobu dziedziczenia; te o dziedziczeniu autosomalnie dominującym (LGMD1) i te o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym (LGMD2), które są najczęstsze. Nazewnictwo oparte jest o kolejne litery alfabetu, które wyznaczają chronologiczną identyfikację każdego następnego chromosomalnego *locus*. W części przypadków objawom zajęcia mięśni szkieletowych, mogą towarzyszyć objawy kardiologiczne (kardiomiopatie przerostowe, rozstrzeniowe, zaburzenia rytmu), objawy niewydolności mięśni oddechowych z nocną hipowentylacją, powysiłkowe bóle mięśniowe, przerost mięśni [Faysoil 2016, Rogozhina 2016]. Wobec genetycznej heterogenności i podobieństwa fenotypowego różnych podtypów, postawienie precyzyjnego rozpoznania określonego wariantu LGMD może być trudne. Rozpoznanie stawiane jest na podstawie fenotypu (niektóre postaci mają pewne odrębne charakterystyczne cechy kliniczne), sposobu dziedziczenia, wyników badań dodatkowych (immunocytochemicznych lub Western blot, ze specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi, skierowanymi przeciwko białkom komórki mięśniowej), a następnie sekwencjonowania genów, kodujących białka, których brak lub deficyt stwierdzono w badaniach z przeciwciałami monoklonalnymi. W diagnostyce molekularnej zespołów obręczowo – kończynowych coraz częściej stosowane są nowe, szybkie metody sekwencjonowania, w tym sekwencjonowanie egzomowe (*ang. whole-exom sequencing*, WES). Pozwala to na pominięcie badań inwazyjnych, w szczególności biopsji mięśniowej.

W diagnostyce pomocne są również dane epidemiologiczne, dotyczące częstości występowania poszczególnych wariantów LGMD w określonych rejonach geograficznych. Najczęstsze (90%) są postaci o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym (LGMD2) – a wśród tych najczęściej występujące warianty to; kalpainopatie i dysferlinopatie. Kalpainopatie (LGMD2A) związane są z mutacjami w genie kodującym kalpainę 3, a dysferlinopatie (LGMD2B), wynikają z mutacji w genie dysferliny. Oba te warianty LGMD występują w Europie najczęściej [Kuhn 2016, Guglieri M 2008]. W Europie centralnej sarkoglikanopatie są stosunkowo rzadkie. Sarkoglikanopatie obejmują cztery rzadkie warianty LGMD o dziedziczeniu autosomalnie recesywnym, stanowiące około 10% wszystkich LGMD i 37% LGMD o początku w okresie dziecięcym [Marsolier 2016]. Poszczególne warianty sarkoglikanopatii występują ze zmienną częstością w różnych rejonach geograficznych [Pegoraro 2012, Marsolier 2016]. Schorzenia z tej grupy o początku w wieku dziecięcym, mogą swoim fenotypem przypominać dystrofię mięśniową Duchenne'a, ale opisuje się w tej grupie również postaci o przebiegu łagodniejszym. Sarkoglikanopatie charakteryzują się postępującym osłabieniem mięśni ksobnych, które u większości chorych prowadzi do wczesnej utraty zdolności samodzielnego poruszania się. W przypadkach sarkoglikanopatii może występować niewydolność mięśnia serca w przebiegu kardiomiopatii, a także niewydolność oddechowa [Schade 2014, Fayssoil 2016]. Dystrofie te związane są z mutacjami genów kodujących cztery białka transbłonowe komórki mięśniowej: alfa - sarkoglikan (LGMD2D), beta - sarkoglikan (LGMD2E), gamma – sarkoglikan (LGMD2C) i delta - sarkoglikan (LGMD2F). Sarkoglikany (SG) wbudowane w błonę komórkową są częścią kompleksu glikoproteinowego dystrofiny, który łączy przestrzeń zewnątrzkomórkową z cytoszkieletem komórki, zapewniając stabilność sarkolemy i ochronę włókien mięśniowych przed urazem mechanicznym w trakcie skurczu mięśnia. Mutacje w którymkolwiek z genów kodujących sarkoglikany utrudniają formowanie kompleksu, prowadząc do jego destabilizacji i wtórnego deficytu pozostałych SG [Marsolier 2016]. Zjawisko destabilizacji tego kompleksu ma ważne implikacje diagnostyczne, bowiem na podstawie badania białek SG można wyłonić grupę dystrofii obręczowo – kończynowych, związanych z mutacjami genów kodujących te białka. Badania immunohistochemiczne biopsji mięśniowej z przeciwciałami przeciwko SGs oraz badania z przeciwciałami przeciwko dystrofinie w połączeniu z genetycznymi testami mającymi na celu wykluczenie mutacji w genie dystrofiny - pozwoliły na wyłonienie pięciu pacjentów z 3 rodzin (dwóch chłopców i

trzy dziewczynki) z nieprawidłową ekspresją białek sarkoglikanowych, tzw. sarkoglikanopatii.

Rodziny te zostały opisane w **6 – tej pracy z cyklu pt. „Sarkoglikanopatie, szczególny typ dystrofii obręczowo – kończynowych”**.

Przebieg kliniczny u tych pacjentów charakteryzował się wystąpieniem pierwszych objawów w wieku dziecięcym (pierwsza dekada życia, między 2 a 7 rokiem życia), które we wszystkich przypadkach związane były z osłabieniem mięśni ksobnych kończyn dolnych. Progresa była szybka, prowadząc do utraty zdolności samodzielnego poruszania się między 11 a 17 r. ż. u trzech chorych. Przerost mięśni łydek obserwowano w dwóch przypadkach, aktywność kinazy keratynowej była wysoka (60 do 130 razy w stosunku do normy). Nie obserwowano objawów niewydolności oddechowej i zajęcia mięśnia serca, ale pacjenci byli wciąż w wieku dziecięcym. Fenotyp przypominał ten obserwowany w dystrofii mięśniowej Duchenne`a u jednego pacjenta, a u jednej z pacjentki rozpoznano wcześniej dystrofię typu Duchenne - like.

Poza sekwencjonowaniem czterech genów kodujących sarkoglikany, diagnostyka tych dystrofii oparta jest na badaniach białek błony komórki mięśniowej. Diagnostykę sarkoglikanopatii na poziomie badania białek (metodami immunocytochemicznymi i Western blot) - komplikuje fakt wtórnego deficytu dystrofiny, w rzadkich przypadkach [Ozawa 1995, Vainzof 1999]. Może to sugerować błędne rozpoznanie dystrofinopatii, szczególnie w przypadkach sporadycznych. Diagnostyka różnicowa zespołów obręczowo – kończynowych o wczesnym początku i szybkim przebiegu powinna także uwzględniać nosicielki mutacji w genie *DMD* (ang. *Duchenne muscular dystrophy*) z nieprawidłową losową inaktywacją chromosomu X i pacjentki z nieprawidłowościami chromosomalnymi, np. z translokacją chromosomu X na autosom z miejscem przełamania w *Xp21* (*DMD locus*) [Viggiano 2016].

Ocena białek komórki mięśniowej stała się nieocenionym narzędziem diagnostycznym, pozwalającym na diagnostykę różnicową zespołów obręczowo – kończynowych, jest pomocna na jednym z pierwszych etapów postępowania diagnostycznego, szczególnie wtedy, gdy nowe metody analizy DNA np. WES, nie są dostępne.

LGMD2A – kalpainopatie

Jest to najczęstszy wariant dystrofii obręczowo – kończynowych.

Badania genetyczne w kierunku LGMD2A przeprowadzone zostały w pracowni genetycznej IMDiK PAN. Badano pacjentów, u których wcześniej wykluczono, dysferlinopatie i sarkoglikanopatie na podstawie badań immunocytochemicznych z przeciwciałami skierowanymi przeciwko dysferlinie i białkom sarkoglikanowym.

W tej grupie chorych badania bioptatów mięśni i testy molekularne pozwoliły na wyłonienie pacjentów z dystrofią mięśniową obręczowo-kończynową typu 2A.

LGMD2A to dystrofia mięśniowa związana z mutacjami w genie kodującym białko kalpainę 3, kodowane przez gen *CANP3* na chromosomie 15. Kalpaina 3 zaangażowana jest w procesy fizjologiczne, które wpływają na funkcje innych białek i jest głównym regulatorem funkcji sarkomerów. Ekspresja kalpains 3 jest największa w mięśniach szkieletowych, szczególnie we włóknach typu II [Ono 2016].

Opisano już niemal kilkaset różnych mutacji w genie *CANP3*, w większości są to małe (kilku- lub kilkunastu nukleotydowe) delecje, insercje lub duplikacje, rozproszone po wszystkich 24 eksonach genu (Leiden mutation database, www.dmd.nl/canp3_home.html).

W niektórych populacjach poszczególne mutacje występują częściej niż inne. Przykładowo w Hiszpanii szczególnie częsta jest mutacja c.2362AG-->TCATCT, którą rzadko obserwuje się w innych populacjach [Urtrasun 1998]. Natomiast na obszarze Europy Centralnej i Turcji najczęstszą mutacją w genie *CANP3* jest c.550delA [Balci 2006]. Analiza haplotypów w populacji rosyjskiej i w Chorwacji wykazała możliwość efektu założyciela dla mutacji c.550delA. Sugerowano, że mutacja ta pierwotnie powstała we wschodnim rejonie śródziemnomorskim i stamtąd rozprzestrzeniła się na obszar Bałkanów i Europy Centralnej [Canki – Klain 2004, Milic 2005].

Ad. 7. W siódmej pracy cyklu za cel postawiono identyfikację pacjentów z LGMD2A oraz ocenę częstości występowania mutacji c.550delA genu *CANP3* w populacji polskiej. Badania genetyczne w kierunku LGMD2A przeprowadzone zostały w pracowni genetycznej IMDiK PAN. Zbadano grupę 80 pacjentów z 76 rodzin, u których w obrazie klinicznym dominowało postępujące osłabienie i zanik mięśni ksobnych obręczy biodrowej i barkowej, bez towarzyszących objawów kardiologicznych, oddechowych i niepełnosprawności umysłowej. Badania elektromiograficzne i wyniki biopsji mięśniowej wykazały zmiany miopatyczne u wszystkich chorych. W ponad połowie przypadków przeprowadzono immunohistochemiczne

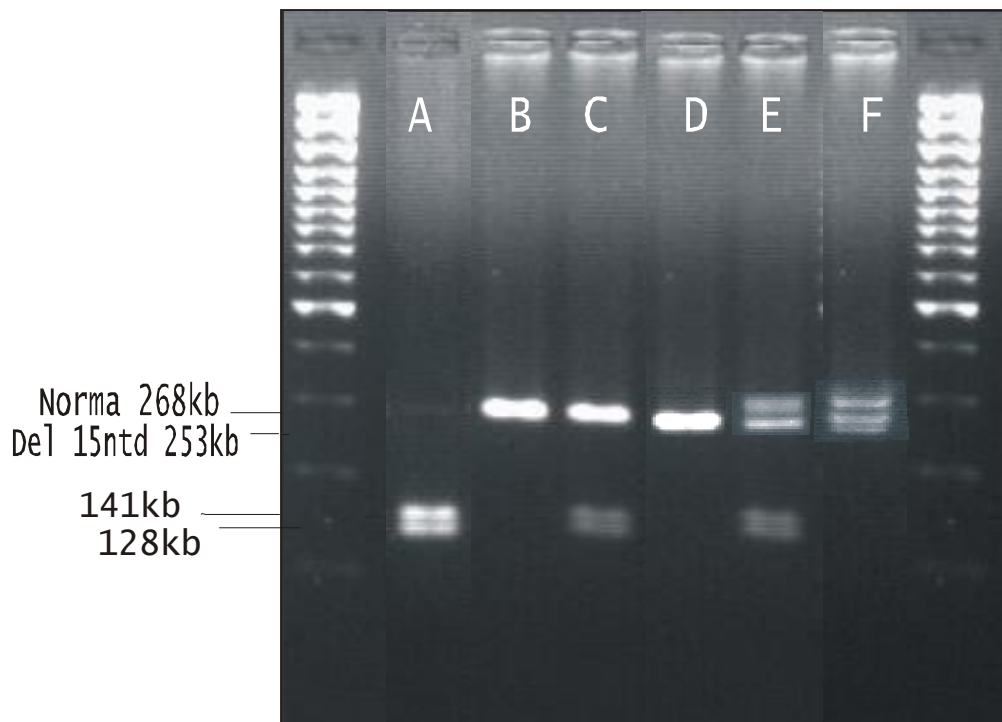
badanie ekspresji dysferliny i sarkoglikanów, co pozwoliło na wykluczenie dysferlinopatii (LGMD2B) i sarkoglikanopatii (LGMD2C, 2D, 2E, 2F).

Eksony genu *CANP3* powielano w łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction, PCR*), z wykorzystaniem starterów obejmujących sąsiadujące sekwencje intronowe [Richard 1995], a następnie otrzymany produkt poddano sekwencjonowaniu metodą Sangera (ABI PRISMS 377 Applied Biosystem).

Mutacje w genie *CANP3* zidentyfikowano w 62 rodzinach. W 79% z tych rodzin mutacja c.550delA występowała przynajmniej na jednym allelu. W 29% rodzin mutacja c.550.delA występowała w układzie homozygotycznym. W populacji polskiej badań analizy haplotypów dotychczas nie przeprowadzono.

Pozostałe powtarzające się mutacje to według częstości: c.598-612del15ntd; c.2242C>T; oraz c.418dupC; c.1356insT. Zidentyfikowano dwa nowe warianty w genie *CANP3*: c.700G>A (p.Gly234Arg) oraz c.661G>A (p.Gly221Ser). Stwierdzono, że glicyna w pozycjach p.234 i p.221 jest aminokwasem wysoko konserwowanym u wielu gatunków, toteż z dużym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że mutacje w tych pozycjach będą miały charakter patogenny.

Podsumowując, w badanej przez nas grupie mutacje w genie *CANP3* stwierdzono u 81% pacjentów z LGMD. Ze wstępnych badań można było wnosić, że mutacja c.550delA występuje często. Wobec tego z myślą o badaniach przesiewowych zaprojektowano RFLP – PCR (ang. *Restriction fragment length polymorphism polymerase chain reaction*) eksonu 4 genu *CANP3* z enzymem restrykcyjnym – endonukleazą BsaAI. Enzym ten rozpoznaje miejsce restrykcyjne, które powstaje w wyniku homozygotycznej delecji adeniny w pozycji 550 sekwencji kodującej genu *CANP3*. W wyniku trawienia eksonu 4 powstają dwa oligonukleotydy o wielkości 141 kz (kilo zasad) i 128 kz (A). W sytuacji, gdy nie ma miejsca restrykcyjnego (nie ma delecji c.550delA), na żelu widoczny jest prążek o wielkości 268 kz (ang. *wild type*) (B). Metoda RFLP - PCR z enzymem BsaAI wykrywa również drugą co do częstości występowania mutację c.598_612, wynikającą z delecji 15 nukleotydów w egzonie 4, co w przypadku mutacji homozygotycznej powoduje powstanie fragmentu DNA egzonu 4 o wielkości 253 kz (D).



A. Homozygotyczna delecja adeniny w pozycji 550 sekwencji kodującej *CANP3*. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *Bsa*AI produktów PCR eksonu 4, powstają dwa prążki o wielkości 141kz i 128 kz.

B. Przy braku delecji adeniny w pozycji 550 nie ma miejsca restrykcyjnego dla enzymu restrykcyjnego *Bsa*AI – widoczne są dwa allele o wielkości 268 kz.

C. Heterozygotyczna delecja adeniny w pozycji 550 sekwencji kodującej *CANP3*. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *Bsa*AI produktów PCR eksonu 4 pojawiają się 3 prążki o wielkości 268 kz, 141 kz i 128 kz.

D. Homozygotyczna delecja 15 nukleotydów w pozycji 598-612 *CANP3*. Po trawieniu *Bsa*AI produktów PCR eksonu 4 pojawia się pojedynczy prążek o wielkości 253 kz.

E. Heterozygotyczna delecja adeniny w pozycji 550 *CANP3* na jednym allele i heterozygotyczna delecja 15 nukleotydów w pozycji 598-612 na drugim allele. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *Bsa*AI produktów PCR eksonu 4 powstają 4 prążki o wielkościach 268 kz, 253 kz, 141 kz i 128 kz.

F. Heterozygotyczna delecja 15 nukleotydów w pozycji 598-612 *CANP3*. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *Bsa*AI produktów reakcji PCR eksonu 4 pojawiają się 2 prążki o wielkościach 268 kz i 253 kz.

Metodą tą posłużono się również w badaniu częstości występowania mutacji c.550delA u 248 zdrowych osób, stanowiących populacyjną grupę kontrolną.

Wykazano, że LGMD2A jest najczęstszą postacią wśród dystrofii obręczowo-kończynowych w populacji polskiej, podobnie np. jak w populacji rosyjskiej [Pogoda 2000] i regionie baskijskim [Urtasun 1998]. Wykazano, że najczęstszą mutacją w LGMD2A jest c.del550A, podobnie jak w innych populacjach (Rosji, Czechach, Niemczech) [Pogoda 2000, Stechlikowa 2014, Hanisch 2007]. Badanie przesiewowe za pomocą metody RFLP - PCR pozwoliło na wykrycie ponad 80% mutacji w genie *CANP3* w polskiej grupie chorych z LGMD2A. Oszacowano częstość nosicielstwa heterozygotycznej mutacji c.550delA w zdrowej Polskiej populacji na 1/124. Podobną częstość występowania tej mutacji stwierdzono u zdrowych osób w populacjach krajów z Polską sąsiadujących (np. rosyjskiej) i innych europejskich (np. chorwackiej); wynoszą one odpowiednio 1/150 i 1/133.

Uzyskane wyniki mają ogromne znaczenie w diagnostyce różnicowej pacjenta z fenotypem LGMD. U pacjentów z takim obrazem klinicznym, bez objawów zajęcia mięśnia serca i układu oddechowego oraz bez cech niepełnosprawności umysłowej, w pierwszej kolejności można rozważyć badanie w kierunku LGMD2A i mutacji c.550delA w *CANP3*.

Ad. 8. Ósma praca cyklu poświęcona została analizie obrazu histopatologicznego mięśni u pacjentów z genetycznie potwierdzonym rozpoznaniem LGMD2A. Celem pracy było wyłonienie charakterystycznych histopatologicznych cech oraz ewentualnych korelacji histopatologiczno-genetycznych, znamienych dla tej postaci LGMD lub konkretnej mutacji. Analizie poddano 31 biopsji mięśni obszernego uda bocznego.

Badanie histopatologiczne przeprowadzono z wykorzystaniem barwień hematoksyliną i eozyną, (H&E), Trichromem Gomoriego, dehydrogenazą NADH, dehydrogenazą bursztynową (SDH), dehydrogenazą mleczanową (LDH) i barwieniu na ATP-azy. Analizowano trzy grupy pacjentów: z homozygotyczną mutacją c.550delA (16 chorych), z homozygotycznymi mutacjami innymi niż c.550delA (5 chorych), z mutacjami o typie złożonych heterozygot (10 pacjentów).

W biopsjach mięśni potwierdzono obecność typowych zmian dystroficznych: obecność włókien o różnej średnicy, regenerujących, zmienionych martwiczo oraz włóknienie. Nie stwierdzono korelacji między stopniem nasilenia zmian miopatycznych a wiekiem pacjentów lub czasem trwania choroby. W grupie pierwszej (tj. u pacjentów z homozygotyczną mutacją c.550delA) wykazano korelację między włóknieniem a czasem trwania choroby – włóknienie

nasilało się w czasie. Obecność „*lobulated fibers*” stwierdzono w ponad 50% biopsji, głównie we włóknach typu pierwszego. „*Lobulated fibers*” to włókna o nierównomiernym rozkładzie barwień na enzymy oddechowe.

Nie stwierdzono istotnych różnic w biopsji mięśniowej w trzech badanych grupach. Wykazano jednak wyższy odsetek tzw. „*lobulated fibers*” w grupie pierwszej (niemal w 2/3 przypadków) – jakkolwiek grupa ta była najliczniejsza. Nie stwierdzono korelacji między długością trwania choroby a liczbą „*lobulated fibers*”. W naszym materiale przewaga włókien typu I występowała w 1/3 badanych mięśni, natomiast przewaga włókien typu II była rzadka (>10%).

„*Lobulated fibers*” opisywano wcześniej w LGMD2A, ale występują one także w innych dystrofiach (FSHD, DMD, sarkoglikanopatiach, dystrofii miotonicznej typu 2), zapalnych miopatiach, dystoniach i schorzeniach neurogennych [Bethlem 1973, Figarella – Branger 2002].

Podsumowując, w LGMD2A w biopsji mięśniowej występują zmiany miopatyczne o różnym nasileniu. Zmiany o charakterze „*lobulated fibers*” stwierdzono niemal w połowie przypadków. U chorych z homozygotyczną mutacją c.550delA w genie *CAPN3* zmiany typu „*lobulated fibers*” mogą być obecne nawet w 2/3 przypadków. A zatem „*lobulated fibers*” u pacjenta z fenotypem LGMD mogą pomóc w ukierunkowaniu diagnostyki molekularnej na LGMD2A.

Dystrofia typu Emery’ego – Dreifussa (ang. *Emery Dreifuss muscular dystrophy* EDMD)

Jest to rzadka, heterogenna genetycznie grupa dystrofii mięśniowych, która charakteryzuje się zajęciem mięśni szkieletowych i mięśnia serca. W obrazie klinicznym EDMD dominują następujące elementy: wczesne przykurcze wielostawowe, usztywnienie kręgosłupa, powoli postępujący zanik i osłabienie mięśni grupy ramiennie - strzałkowej oraz objawy sercowe. Objawy zajęcia mięśnia serca są częste, zagrażają życiu pacjentów i wynikają z zaburzeń przewodnictwa lub/i kardiomiopatii. Stąd w rodzinach tych zdarzają się przypadki nagłej śmierci sercowej.

Obecnie znanych jest przynajmniej 5 typów EDMD, które wynikają z mutacji genów kodujących białka jądrowe [Madej 2016, Bonne 2015]. Większość dotychczas zidentyfikowanych przypadków należy do emerynopatii (EDMD1), spowodowanych mutacjami w genie emeryny (*locus Xp28*) o dziedziczeniu recesywnym sprzężonym z płcią [Bione 1994]. Druga postać EDMD2 wynika z mutacji genu laminy A/C (LMNA) na

chromosomie 1p11-23 i dziedziczy się w sposób autosomalnie dominujący lub recesywny [Bonne 1999]. Brak laminy A/C i emeryny w błonie jądrowej można wykazać w skrawkach mięśniowych, leukocytach i skórze, co wykorzystywane jest w diagnostyce.

Ad.9. Heterogenność genetyczna i kliniczna dystrofii Emery'ego- Dreifussa została wykazana u pacjentów w kolejnej pracy z cyklu.

Przedstawiono grupę 42 chorych (z 27 rodzin), pozostających w wieloletniej obserwacji Kliniki Neurologii WUM. Rozpoznanie postawiono na podstawie badań genetycznych (stwierdzenia mutacji w *LMNA* lub *EMD*) lub/i badania ekspresji emeryny i/lub laminy A/C w skrawkach mięśniowych. Badania genetyczne zostały przeprowadzone przez zespół prof. D. Toniolo w Institut of Biochemical Genetics w Pawii, natomiast badania ekspresji białek jądrowych w skrawkach mięśni – w pracowni neuropatologii Kliniki Neurologii WUM.

W ten sposób rozpoznanie emerynopatii postawiono u 24 chorych, a rozpoznanie laminopatii 11 pacjentów. U 37 chorych fenotyp odpowiadał klasycznym kryteriom zespołu EDMD. U pozostałych chorych obraz kliniczny odpowiadał zespołowi obręczowo – kończynowemu z towarzyszącymi objawami kardiologicznymi lub bez nich. U jednego z pacjentów stwierdzono niewielkie objawy miopatyczne z towarzyszącą sztywnością kręgosłupa w odcinku szyjnym. Bardzo ważne było wykazanie zmienności wewnątrzrodzinnej, - obok pacjentów z klasycznym fenotypem zespołu EDMD, stwierdzono przypadki izolowanej kardiomiopatii (bez klinicznych cech zajęcia mięśni szkieletowych) w tej samej rodzinie. Kobiety nosicielki w rodzinach o dziedziczeniu recesywnym sprzężonym z płcią, nie przejawiały objawów klinicznych, poza jednym przypadkiem, w którym stwierdzono blok przedsionkowo – komorowy, wymagający wszczepienia stymulatora.

Podsumowując, w badanej grupie chorych wykazano heterogenność genetyczną i niejednorodność objawów klinicznych zespołu EDMD. Wczesne rozpoznanie jest ważne ze względu na współistnienie poważnych zaburzeń kardiologicznych (także u nosicieli), które stanowią integralną część tego fenotypu, stąd diagnostyka kardiologiczna powinna być wdrażana jak najwcześniej – także u pozornie zdrowych członków rodziny.

Ad.10. W pracy tej analizowano zapisy elektromiograficzne u 21 pacjentów z rozpoznaniem EDMD1 lub EDMD2, potwierdzonym w badaniach molekularnych. Celem pracy była analiza nietypowych dla miopatii elektrofizjologicznych zmian w EDMD, w tym szczególnie tzw.

nieregularnych MUPs. Nieregularne MUPs charakteryzują się wysoką amplitudą, zwiększoną polifazją i wydłużonym bądź prawidłowym czasem trwania, mogą występować w procesach neurogennych. Potencjały te były opisywane w EDMD, przed erą diagnostyki molekularnej [Petty 1986].

Wykonano badania ilościowe mięśni przy użyciu koncentrycznej elektrody igłowej (*ang. concentric needle electromyography CNEMG*) i aparatu Keypoint (Medtronic Functional Diagnostics, Dania) przy standardowych ustawieniach. Badano mięśnie dwugłowy ramienia (BB, *ang. biceps brachii*) i prosty uda (RF *ang. rectus femoris*), rejestrując zapisy wysiłkowe oraz zapisy podczas niewielkiego ruchu dowolnego. Analizowano czas trwania, amplitudę, pole powierzchni potencjałów jednostek ruchowych (MUPs) oraz odsetek potencjałów wielofazowych. W 12 przypadkach przeanalizowano wskaźnik wielkości SI (*ang. size index*) oraz indeks powierzchnia/amplituda. Średnie wartości parametrów jednostki ruchowej zostały porównane z wartościami referencyjnymi pracowni. Średnie wartości tych parametrów zostały przeanalizowane dla wszystkich potencjałów, a oddzielnie - dla prostych i nieregularnych potencjałów. Ponieważ nie było wyraźnych różnic w parametrach EMG pomiędzy pacjentami z EDMD1 i EDMD2, stąd oba warianty zostały przeanalizowane łącznie.

Wyniki badań elektromiograficznych potwierdziły proces miopatyczny we wszystkich badanych mięśniach. We wszystkich przypadkach podczas maksymalnego wysiłku, zarejestrowano zapis interferencyjny o amplitudzie w zakresie 0.99 – 3.5 mV.

Nieregularne potencjały jednostek ruchowych charakteryzowały się dłuższym czasem trwania, większą powierzchnią i wyższą amplitudą niż potencjały proste. Zwiększony odsetek potencjałów nieregularnych oraz obniżone średnie wartości parametrów MUP (czas trwania, powierzchnia, powierzchnia/amplitudę, SI) stwierdzono w obu badanych mięśniach, ale były one znacznie częstsze w mięśniu BB. Amplituda MUPs była obniżona w 77% RF, a w mięśniach BB tylko w 30%. W tych ostatnich amplituda była zwiększona w 22% mięśni.

Zwiększoną (powyżej prawidłowych wartości) amplitudę pojedynczych MUPs (> 1440 uV w BB i > 1600 uV w RF) stwierdzono w 7 przypadkach w mięśniu BB i w 2 przypadkach w mięśniu VL. Wykazano również, że średnie wartości amplitudy MUP i liczba pojedynczych potencjałów o podwyższonej amplitudzie zwiększają się z wiekiem pacjenta. Potencjały o zwiększonej amplitudzie były zwykle nieregularnymi potencjałami.

W biopsji mięśniowej stwierdzono zmiany miopatyczne, obecne były włókna mięśniowe o różnej średnicy; atroficzne i przerosłe. Włókna typu I o mniejszej średnicy były rzadsze. Nie

obserwowano lub rzadko obserwowano rozrost tkanki łącznej, martwicę włókien lub cechy regeneracji. Takie cechy w biopsji mięśniowej pacjentów z EDMD były również wcześniej opisywane przez innych autorów [Emery 2000].

Badania symulacyjne przeprowadzone w tej pracy sugerują, że nieregularne MUPs generowane są przez grupy włókien, o większej i mniejszej średnicy niż te prawidłowe. Pierwszy wysoki komponent potencjału jest generowany przez włókna o większej w stosunku do normy średnicy, natomiast kolejne mniejsze komponenty potencjału są generowane przez włókna o mniejszej średnicy. Te korelacje pozostają w zgodzie z obrazem morfologicznym mięśni naszych pacjentów z EDMD, w których dominują włókna przerosłe i małe, a te ostatnie wynikają z rozszczepienia włókien przyrosłych. Rozszczepienie włókien jest czynnikiem zwiększającym liczbę i gęstość włókien [Nandekar 1995]. Wyniki naszego badania sugerują, że MUPs z wysoką amplitudą są wyrazem zmian strukturalnych w mięśniu, w szczególności przerostu włókien i ich zaszczepienia.

Podsumowując, MUPs o wysokiej amplitudzie, nietypowej dla procesu miopatycznego wynikają z obecności pojedynczych włókien przerosłych i atroficznych oraz ze zwiększonej gęstości włókien, co jest rezultatem ich rozszczepienia. Miopatyczny charakter zmian i prawidłowe wartości neurografii wskazują na to, że nieregularne MUPs są wyrazem procesu miopatycznego.

Podsumowanie:

Cykl prac składających się na osiągnięcie naukowe dotyczy korelacji kliniczno – genetycznych w wybranych postępujących dystrofiach mięśniowych. Analizie poddano obraz kliniczny, zmiany elektrofizjologiczne oraz morfologiczne. Podjęto próbę skorelowania ich ze stwierdzonym defektem genetycznym.

Wykazano:

- w 27% rodzin z fenotypowym rozpoznaniem FSHD nie potwierdzono tego rozpoznania w badaniach molekularnych. Choć obraz kliniczny FSHD jest dość charakterystyczny, to w rozpoznaniu różnicowym należy uwzględnić np.: miopatie wrodzone np. nemalinowa, inne dystrofie, w szczególności LGMD2A

- stosunkowo częste występowanie (21%) tzw. postaci FSHD o wczesnym początku (według definicji Brouwer'a) w populacji polskiej, w porównaniu z danymi dostępnymi w piśmiennictwie

- w naszym materiale w około 30%, a w doniesieniach literaturowych w 50% - przypadków FSHD o wczesnym początku, stwierdzono objawy pozamięśniowe, które także należą do obrazu tej jednostki chorobowej.
- wykazano (podobnie jak w doniesieniach innych autorów), że im większa delecja, tym wcześniejszy początek i cięższy przebieg FSHD, chociaż odstępstwa od tej reguły są możliwe
- w niektórych przypadkach FSHD zmienność wewnątrzrodzinna może wynikać z mozaicyzmu somatycznego, co jest trudne do wykazania w rutynowych molekularnych badaniach genetycznych
- w przypadkach nowo zdiagnozowanych rodzin, a w szczególności kiedy fenotyp pacjenta jest znacznie łagodniejszy, niż ten oczekiwany wobec wielkości delecji, - należy rozważyć wykonanie testu PFGE.
- wobec selektywności zajęcia mięśni w FSHD – wynik biopsji mięśniowej może być prawidłowy, co stwierdzono u 1/3 pacjentów, którzy mieli wykonaną biopsję mięśniową
- wczesno – dziecięce dystrofie obręczowo – kończynowe wynikające z patologii białek sarkoglikanowych – mogą wymagać diagnostyki różnicowej z dystrofinopatiami
- LGMD2A jest najczęstszą postacią LGMD w polskiej populacji (po wykluczeniu sarkoglikanopatii i dysferlinopatii), u pacjentów bez objawów zajęcia mięśnia serca i oddechowych oraz bez cech niepełnosprawności intelektualnej
- mutacja c.550delA w genie *CAPN3* występuje u 80% pacjentów z LGMD2A. Tak częste występowanie tej konkretnej mutacji można uwzględnić w diagnostyce molekularnej dystrofii obręczowo – kończynowych
- częstość nosicielstwa mutacji c.550delA w genie *CAPN3* wynosi w populacji polskiej 1:124 (podobny rząd wielkości jak w innych populacjach), co może mieć znaczenie dla poradnictwa genetycznego
- w biopsji mięśniowej u pacjentów z LGMD2A częste są zmiany o charakterze „lobulated fibers”. Obecność tych zmian może być pomocna w diagnostyce LGMD i ukierunkować badanie genetyczne na LGMD2A
- EDMD jednostka genetycznie i klinicznie heterogenna, jest szczególnie ważna wobec współistnienia zwykle względnie łagodnych objawów mięśniowych oraz mogących zagrażać życiu objawów kardiologicznych. Objawy kardiologiczne, zatem powinny być aktywnie diagnozowane u pacjentów i członków ich rodzin, również tych klinicznie pozornie bezobjawowych

- w biopsji mięśniowej u pacjentów z EDMD1 i 2 stwierdzono niespecyficzne zmiany miopatyczne. Wspólną cechą obrazu morfologicznego były: różna wielkość włókien mięśniowych, obecność włókien zanikłych i przerosłych. Często obserwowano zmniejszoną liczbę włókien typu 1 o mniejszej średnicy. Martwica włókien, przerost tkanki łącznej obserwowano rzadko, a regeneracji włókien mięśniowych nie stwierdzono w żadnym przypadku. Takie cechy przewlekłości procesu miopatycznego, opisywane były także przez innych autorów

W badaniach elektrofizjologicznych wykazano:

- w FSHD nie stwierdzono korelacji między wynikiem biopsji mięśniowej, parametrami elektrofizjologicznymi i obrazem klinicznym
- w FSHD największe zmiany miopatyczne występują w mięśniu piszczelowym przednim i naramiennym, a wskaźnik SI może być szczególnie przydatny w ocenie zmian elektrofizjologicznych w przypadkach subklinicznych
- wobec selektywności zajęcia mięśni w FSHD, - niektóre mięśnie (np. mięśnie ksozne kończyn dolnych) mogą nie wykazywać zmian elektrofizjologicznych w badaniu EMG
- nieregularne potencjały jednostki ruchowej są wynikiem zmian strukturalnych w mięśniu: przerostu i rozszczepienia, - w przewlekłym procesie miopatycznym występującym w obu typach dystrofii mięśniowej Emery'ego-Dreifussa (EDMD1 i EDMD2)
- zmiany elektrofizjologiczne w FSHD i EDMD są znacznie mniej nasilone w porównaniu do innych dystrofii np. dystrofinopatii

Piśmiennictwo:

Balci B, Aurino S, Haliloglu G, Talim B, Erdem S, Akcören Z, Tan E, Caglar M, Richard I, Nigro V, Topaloglu H, Dincer P. Calpain-3 mutations in Turkey. *Eur J Pediatr.* 2006;165(5):293-8

Bethlem J, van Wijngaarden GK, de Jong J. The incidence of lobulated fibres in the facioscapulo-humeral type of muscular dystrophy and the limb-girdle syndrome. *J Neurol Sci.* 1973;18(3):351-8.

Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1994; 8(4):323-7.

Bonne G, Leturcq F, Ben Yaou R. Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. 2004 [updated 2015].

Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizbera JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. Mutations in the gene

encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1999; 21(3):285-8.

Brooke MH. *A Clinician's View of Neuromuscular Disease.* Baltimore, MD. Williams & Wilkins; 1977

Brouwer OF, Padberg GW, Bakker E, Wijmenga C, Frants RR. Early onset facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle & nerve. Supplement* 1995;S,67-72

Canki-Klain N, Milic A, Kovac B, Trlaja A, Grgicevic D, Zurak N, Fardeau M, Leturcq F, Kaplan JC, Urtizberea JA, Politano L, Piluso G, Feingold J. Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Am J Med Genet A.* 2004;125A(2):152-6. Review.

Carroll J.E., Brooke M.H.: Infantile facioscapulohumeral muscular dystrophy. In Serratrice G., Roux H., eds. *Peroneal Atrophies and Related Disorders*, New York: Masson; 1979; 305-319.

Deenen JC, Arnts H, van der Maarel SM, et al. Population-based incidence and prevalence of facioscapulohumeral dystrophy. *Neurology* 2014;83:1056-9.

Emery AEH. Emery–Dreifuss muscular dystrophy—a 40 year retrospective. *Neuromuscul Disord* 2000;10:228–32.

Faysoil A, Oagna A, Chaffaut C, Chevret S, Guimarães-Costa R, Leturcq F, Wahbi K, Prigent H, Lofaso F, Nardi O, Clair B, Behin A, Stojkovic T, Laforet P, Orlikowski D, Annane D. Natural History of Cardiac and Respiratory Involvement, Prognosis and Predictive Factors for Long-Term Survival in Adult Patients with Limb Girdle Muscular Dystrophies Type 2C and 2D. *PLoS One.* 2016 27;11(4)

Figurella-Branger D, El-Dassouki M, Saenz A, Cobo AM, Malzac P, Tong S, Cassotte E, Azulay JP, Pouget J, Pellissier JF. Myopathy with lobulated muscle fibers: evidence for heterogeneous etiology and clinical presentation. *Neuromuscul Disord.* 2002 ;12(1):4-12

Funakoshi M, Goto K, Arahata K. Epilepsy and mental retardation in a subset of early onset 4q35-facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 1998;50(6):1791-4

Guglieri M1, Magri F, D'Angelo MG, Prella A, Morandi L, Rodolico C, Cagliani R, Mora M, Fortunato F, Bordoni A, Del Bo R, Ghezzi S, Pagliarani S, Lucchiari S, Salani S, Zecca C, Lamperti C, Ronchi D, Aguenouz M, Ciscato P, Di Blasi C, Ruggieri A, Moroni I, Turconi A, Toscano A, Moggio M, Bresolin N, Comi GP: Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum Mutat.* 2008;29(2):258-66. Hanisch F, Müller CR, Grimm D, Xue L, Traufeller K, Merckenschlager A, Zierz S, Deschauer M. Frequency of calpain-3 c.550delA mutation in limb girdle muscular dystrophy type 2 and isolated hyperCKemia in German patients. *Clin Neuropathol.* 2007;26(4):157-63.

Hewitt JE. Loss of epigenetic silencing of the DUX4 transcription factor gene in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2015 15;24(R1):R17-23.

Ho CY, Jaalouk DE, Vartiainen MK, Lammerding J. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature.* 2013;23;497(7450):507-11

Koch AJ, Holaska JM. Emerin in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;29:95-106.

Kuhn M, Gläser D, Joshi PR, Zierz S, Wenninger S, Schoser B, Deschauer M: Utility of a next-generation sequencing-based gene panel investigation in German patients with genetically unclassified limb-girdle muscular dystrophy. *J Neurol.* 2016;263(4):743-50.

Landouzy L, Dejerine J. : De la myopathie atrophique progressive. Rev. Med. Francaise 1885;

Leidenroth A, Sorte HS, Gilfillan G, Ehrlich M, Lyle R, Hewitt JE. Diagnosis by sequencing: correction of misdiagnosis from FSHD2 to LGMD2A by whole-exome analysis. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(9):999-1003

Lemmers RJLF Miller DG, van der Maarel SM. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. Editors In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, editors. Source GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. 1999 [updated 2014 Mar 20].

Lemmers RJ, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GW, Amell AM, van der Vliet PJ, Almomani R, Straasheijm KR, Krom YD, Klooster R, Sun Y, den Dunnen JT, Helmer Q, Donlin-Smith CM, Padberg GW, van Engelen BG, de Greef JC, Aartsma-Rus AM, Frants RR, de Visser M, Desnuelle C, Sacconi S, Filippova GN, Bakker B, Bamshad MJ, Tapscott SJ, Miller DG, van der Maarel SM. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nat Genet.* 2012;44(12):1370-4

Lemmers RJ, van der Wielen MJ, Bakker E, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. Somatic mosaicism in FSHD often goes undetected. *Ann Neurol.* 2004 ;55(6):845-50.

Madej-Pilarczyk A, Kochański A. Emery-Dreifuss muscular dystrophy: the most recognizable laminopathy. *Folia Neuropathol.* 2016;54(1):1-8. Review.

Marsolier J, Laforet P, Pegoraro E, Vissing J, Richard I; Sarcoglycanopathies Working Group. 1st International Workshop on Clinical trial readiness for sarcoglycanopathies 15-16 November 2016, Evry, France. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(7):683-692.

Milic A1, Canki-Klain N. Calpainopathy (LGMD2A) in Croatia: molecular and haplotype analysis. *Croat Med J.* 2005;46(4):657-63.

Mostacciuolo ML, Pastorello E, Vazza G, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: Epidemiological and molecular study in a north-east Italian population sample. *Clinical Genetics* 2009;75:550-555.

Mul K, Kinoshita J, Dawkins H, van Engelen B, Tupler R; FSHD Consortium. 225th ENMC international workshop:: A global FSHD registry framework, 18-20 November 2016, Heemskerk, The Netherlands. *Neuromuscul Disord.* 2017; 27(8):782-790

Munsat TL, Piper D, Cancilla P, Mednick J. Inflammatory myopathy with facioscapulohumeral distribution. *Neurology.* 1972; 22(4):335-47

Nandekar SD, Barkhaus PE, Charles A. Multi motor unit action potential analysis (MMA). *Muscle Nerve* 1995;18:1155-66.

Narayanaswami P, Weiss M, Selcen D, David W, Raynor E, Carter G, Wicklund M, Barohn RJ, Ensrud E, Griggs RC, Gronseth G, Amato AA; Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology; Practice Issues Review Panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. Evidence-based guideline summary: diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies: report of the guideline development subcommittee of the American Academy of Neurology and the practice issues review panel of the American Association of Neuromuscular & Electrodiagnostic Medicine. *Neurology.* 2014 14;83(16):1453-63.

- Niebroj-Dobosz I, Marchel M, Madej A, Sokolowska B, Hausmanowa-Petrusewicz I. Circulating autoantibodies to troponin I in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2008;27:1-6.
- Ono Y, Ojima K, Shinkai-Ouchi F, Hata S, Sorimachi H. An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie.* 2016 122:169-87.
- Ozawa E, Yoshida M, Suzuki A, Mizuno Y, Hagiwara Y, Noguchi S. Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1995;4 Spec No:1711-6. Review.
- Padberg GW, Lunt PW, Koch M, Fardeau M.: Facioscapulohumeral muscular dystrophy .In: Emery A.E.H. [ed]. Diagnostic criteria for neuromuscular disorders. Royal Society of Medicine Press, London 1997, p 22
- Padberg GW, Lunt PW, Koch M, Fardeau M.: Diagnostic criteria for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromusc Disord* 1996; 1: 231
- Padberg GW, Facioscapulohumeral disease. Leiden, The Netherlands: University of Leiden, 1982. Thesis
- Pegoraro E, Hoffman EP. Limb-girdle muscular dystrophy overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2000 1993–2016, updated 2012 Aug 30.
- Petty RKH, Thomas PK, Landon DN. Emery–Dreifuss syndrome. *J Neurol* 1986;233:108–14.
- Pogoda TV, Krakhmaleva IN, Lipatova NA, Shakhovskaya NI, Shishkin SS, Limborska SA. High incidence of 550delA mutation of CAPN3 in LGMD2 patients from Russia. *Hum Mutat.* 2000;15(3):295.
- Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell.* 1995;78(1):27-40.
- Rogozhina Y, Mironovich S, Shestak A, Adyan T, Polyakov A, Podolyak D, Bakulina A, Dzemeshkevich S, Zaklyazminskaya E. New intronic splicing mutation in the LMNA gene causing progressive cardiac conduction defects and variable myopathy. *Gene.* 2016 31;595(2):202-206.
- Schade van Westrum SM1, Dekker LR, de Voogt WG, Wilde AA, Ginjaar IB, de Visser M, van der Kooi AJ. Cardiac involvement in Dutch patients with sarcoglycanopathy: a cross-sectional cohort and follow-up study. *Muscle Nerve.* 2014;50(6):909-13.
- Stehlíková K, Skálová D, Zídková J, Mrázová L, Vondráček P, Mazanec R, Vohánka S, Haberlová J, Hermanová M, Zámečník J, Souček O, Ošlejšková H, Dvořáčková N, Solařová P, Fajkusová L. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies in the Czech Republic. *BMC Neurol.* 2014;14:154.
- Tawil R, van der Maarel SM, Tapscott SJ. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skelet Muscle.* 2014; 4:12.
- Trevisan CP1, Pastorello E, Armani M, Angelini C, Nante G, Tomelleri G, Tonin P, Mongini T, Palmucci L, Galluzzi G, Tupler RG, Barchitta A. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and occurrence of heart arrhythmia. *Eur Neurol.* 2006;56(1):1-5.

Urtasun M, Sáenz A, Roudaut C, Poza JJ, Urtizberea JA, Cobo AM, Richard I, García Bragado F, Leturcq F, Kaplan JC, Martí Massó JF, Beckmann JS, López de Munain A. Limb-girdle muscular dystrophy in Guipúzcoa (Basque Country, Spain). *Brain*. 1998;121 (Pt 9):1735-47.

Vainzof M, Moreira ES, Ferraz G, Passos-Bueno MR, Marie SK, Zatz M. Further evidence for the organisation of the four sarcoglycans proteins within the dystrophin-glycoprotein complex. *Eur J Hum Genet*. 1999; 7(2):251-4.

Viggiano E, Ergoli M, Picillo E, Politano L. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet*. 2016; 135(7):685-98.

van der Maarel SM, Tawil R, Tapscott SJ. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and DUX4: breaking the silence. *Trends Mol Med*. 2011;17(5):252-8.

van Dijk GP, van der Kooi E, Behin A, Smeets J, Timmermans J, van der Maarel S, Padberg G, Voermans N, van Engelen B. High prevalence of incomplete right bundle branch block in facioscapulohumeral muscular dystrophy without cardiac symptoms. *Funct Neurol*. 2014;29(3):159-65.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych:

Udział w innych badaniach:

Po uzyskaniu stopnia dr n. med. brałam udział w realizacji kilku projektów badawczych, które nie wchodziły w skład wyżej opisanego osiągnięcia naukowego:

- 1. Cykl prac z badań biochemicznych nad patomechanizmem uszkodzenia błony jądrowej w EDMD, wynikających z mutacji w genach laminy A/C i emeryny.**
Jestem współautorem prac, które powstały we współpracy z zespołem prof. Hutchinson z Durham University w Wielkiej Brytanii

Lamina A/C i emeryna są komponentami wewnętrznej błony jądrowej (INM *ang. internal nuclear membrane*). Jedną z hipotez zakłada, że w wyniku mutacji w genach kodujących laminę A/C i emerynę, powstają zmiany strukturalne w błonie jądrowej, dochodzi do zaburzenia interakcji między białkami w niej występującymi, co może powodować jej osłabienie. Aby wykazać trafność tej hipotezy, zbadano rozpuszczalność lamin i ich rozkład w fibroblastach skóry pacjentów z mutacjami w genie emeryny. Fibroblasty skóry wybrane zostały ze względu na łatwą dostępność i to, że stanowią łatwo modyfikowalny w hodowli model.

Stwierdzono zwiększoną rozpuszczalność wszystkich lamin. Nadto wykazano, że lamina C uległa przemieszczeniu z błony jądrowej do nukleoplazmy w fibroblastach pacjentów z EDMD1. Wykazano, że białko wiążące laminę A/C, LAP2 - alfa (*ang. Lamin A/C binding protein*) również zmieniło lokalizację w błonie jądrowej. W/w rezultaty potwierdziły hipotezę zakładającą zmiany strukturalne w błonie jądrowej. Jednak redystrybucja tych białek mogłaby również sugerować wpływ na ekspresję genów jądrowych.

W kolejnej pracy udowodniliśmy, że jedną z funkcji emeryny jest regulacja napływu białka beta-catenin do jądra. Beta-catenin jest ważnym aktywatorem transkrypcji genów. Wobec tego, białka wewnętrznej błony jądrowej, w tym emeryna mogą mieć wpływ na drogi przekazywania sygnału, poprzez ograniczenie dostępu do jądra białek aktywujących transkrypcję. W późniejszych pracach udowodniono, że mutacje w genach emeryny i laminy A/C mogą wpływać na transkrypcje genów jądrowych [Koch 2014, Ho 2013].

Markiewicz E, Tilgner K, Barker N, van de Wetering M, Clevers H, **Dorobek M**, Hausmanowa-Petrusewicz I, Ramaekers FC, Broers JL, Blankesteyn WM, Salpingidou G, Wilson RG, Ellis JA, Hutchison CJ. T The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *EMBO J.* 2006 26;25(14):3275-85. IF 10.086

Markiewicz E, Venables R, Mauricio-Alvarez-Reyes, Quinlan R, **Dorobek M**, Hausmanowa-Petrusewicz I, Hutchison C. Increased solubility of lamins and redistribution of lamin C in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy fibroblasts. *J Struct Biol.* 2002 ;140(1-3):241-53. IF 4.194

2. Badania nad patogenezą kardiomiopatii u pacjentów z EDMD1 i EDMD2.

Ta praca powstała we współpracy z zespołem prof. Ireny Niebrój – Dobosz.

Badania nad mechanizmami autoimmunologicznymi zaangażowanymi w rozwój kardiomiopatii, miały na celu poszukiwanie obecności przeciwciał przeciw komórkom mięśnia serca. Przeciwciała przeciwko białkom komórek mięśnia komór serca wykazano w surowicy pacjentów z EDMD1 i EDMD2 (14). Grupy kontrolne składały się z 10 pacjentów z rozstrzeniową kardiomiopatią (*ang Dilated Cardiomyopathy* (DCM) i dziesięciu zdrowych osób. Białka surowicy pacjentów rozdzielono przy pomocy elektroforezy w żelu agarozowym, a następnie poddano badaniu techniką Western blotting. U pacjentów z EDMD

i DCM, wykazano obecność przeciwciał przeciwko białkom mięśnia komory serca w klasie IgG. W obu schorzeniach EDMD1 i EDMD2, białko o masie 85 kD było najbardziej immunogenne. Przeciwciała przeciwko troponinie I (24 kD), przeciwko tropomiozynie (35 kD) i przeciw aktynie (43 kD) występowały w mniejszym stężeniu. Stwierdzono wyraźne różnice w reaktywności autoprzeciwciał pomiędzy obiema formami EDMD i także pomiędzy pacjentami z EDMD i pacjentami z izolowaną DCM. Nie stwierdzono wyraźnych korelacji pomiędzy reaktywnością i częstością występowania autoprzeciwciał a klinicznymi parametrami pacjentów z EDMD.

Autoprzeciwciała przeciwko białkom mięśnia serca mogą być markerami procesów autoimmunologicznych w rozstrzeniowej kardiomiopatii w przebiegu EDMD. Kolejne badania mogą pozwolić na zdefiniowanie roli tych przeciwciał w przewidywaniu podatności na rozwój kardiomiopatii. Późniejsze doniesienia potwierdziły, że przeciwciała przeciwko troponinie I mogą być przydatnym markerem rozwoju rozstrzeniowej kardiomiopatii w EDMD, we wczesnych jej fazach [Niebrój - Dobosz 2008].

Niebrój - Dobosz I, **Dorobek M**, Marchel M, Hausmanowa - Petruszewicz I. Evidence for autoimmunity to heart-specific antigens in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Acta Myol.* 2006; 25(2):68-72.

3. **Badania nad charakterystyką kliniczną i fenotypem nosicielek dystrofinopatii.**

W pracy tej posłużono się badaniami biochemicznymi (CK), elektrofizjologicznymi, morfologicznymi (biopsja mięśnia) i immunocytochemicznymi oraz Western blotting z przeciwciałami przeciwko dystrofinie u 24 kobiet. 12 z nich było pewnymi nosicielkami mutacji w genie *DMD*, a u 12 pacjentek wcześniej rozpoznano dystrofię obręczowo – kończynową. Wskazano na konieczność identyfikacji sporadycznych, izolowanych nosicielek dystrofinopatii, co może być trudne, szczególnie w przypadkach nie wykazujących lub wykazujących niewielkie objawy kliniczne np. izolowaną HiperCKemię lub przerost mięśni łydek. Postawienie prawidłowego rozpoznania skutkuje odpowiednim poradnictwem genetycznym.

Hausmanowa - Petruszewicz I, Fidziańska A, Niebrój-Dobosz I, **Dorobek M**, Bojakowski J. Dystrophinopathies in females. *Folia Neuropathol.* 2000;38(1):7-12. IF 0.258

4. Cykl prac dotyczących neuroobrazowania w udarach mózgu, leczenia trombolitycznego i rzadkich przyczyn udaru mózgu.

Udar jest trzecią przyczyną śmierci i pierwszą przyczyną niepełnosprawności na świecie. W ostatnich latach poczyniono znaczne postępy w leczeniu i diagnostyce neuroobrazowej udaru mózgu. Wczesne radiologiczne potwierdzenie udaru niedokrwiennego ma kluczowe znaczenie w precyzyjnej ocenie ogniska niedokrwiennego i w podjęciu decyzji o zastosowaniu leczenia fibrynolitycznego. Rola badania CT we wczesnej fazie udaru mózgu sprowadza się głównie do wykluczenia krwawienia do OUN, bowiem zmiany niedokrwienne w pierwszych godzinach są w tomografii słabo wyrażone.

Ad.1. W pierwszej z tych prac, analizowano przydatność różnych technik neuroobrazowania we wczesnej fazie udaru niedokrwiennego mózgu. Przeanalizowano dane kliniczne i wyniki badań obrazowych u 92 pacjentów z udarem mózgu w fazie ostrej i nadostrej.

W grupie tych 92 pacjentów wykazano stosunkowo niską czułość, badania tomografii komputerowej (*ang. Computed tomography, CT*), - w ocenie ogniska niedokrwiennego. W badaniu CT wczesne zmiany niedokrwienne wykazano u 38% pacjentów i w 42% przypadkach w fazie nadostrej udaru mózgu. W badaniu perfuzyjnym CT nieprawidłowości perfuzji w obszarze korespondującym do objawów klinicznych – były obecne u 79% pacjentów. Czułość DWI (*ang. diffusion weighted imaging*) sięgała 95%, a łącznie z perfuzją MR – osiągnęła 100%. Wnioski z tej pracy są następujące: badanie MR w połączeniu z DWI, powinno stać się metodą z wyboru w ocenie pacjentów z ostrym udarem niedokrwiennym mózgu. Perfuzja jest cennym uzupełnieniem wartości diagnostycznej innych technik strukturalnych, szczególnie w przypadkach budzących wątpliwości diagnostyczne.

Ad. 3. Wiele technik stosowanych w badaniu MR (*ang. magnetic resonance imaging*) jest szczególnie użytecznych w ocenie udaru mózgu. Ocena zmian w opcji DWI/FLAIR (*ang. fluid attenuated inversion recovery*) jest szczególnie przydatna i uważana za radiologiczny marker w ocenie wielkości zmiany niedokrwiennej. Celem analizy była ocena czy metoda DWI/FLAIR jest użyteczna w identyfikacji pacjentów z udarem mózgu, także lakunarnym w czasie do 4.5 godz. od wystąpienia objawów. Autorzy przeanalizowali dane 86 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu, ze znanym początkiem objawów. Badanie neuroobrazowe (CT, MR) było wykonane we wszystkich przypadkach do 24 godzin od pojawienia się pierwszych objawów. Zmiany niedokrwienne oceniano w korelacji z czasem trwania

objawów. Czas od początku objawów do wykonania badania MR był znacząco krótszy u pacjentów za zmianami niedokrwiennymi widocznymi tylko w DWI (średnio 2.78 h, n = 24). U pacjentów, u których zmiany niedokrwiennie widoczne były również w innych technikach badania MR, czas od początku objawów do wykonania badania MR był znacząco dłuższy (średnio 8.6 h, n = 62). Badanie MR z opcją DWI/FLAIR charakteryzowało się 58% czułością i 94% specyficzną w identyfikacji pacjentów będących w oknie terapeutycznym dla leczenia trombolitycznego. Dla udarów lakunarnych (n = 20), owe parametry cechowały się zbliżonymi wartościami. W podsumowaniu, należy stwierdzić, że obecność ostrej zmiany niedokrwiennej widocznej jedynie w DWI, z dużą specyficzną pozwala na identyfikację pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu, również lakunarnym - w czasie krótszym niż 4.5 h, tj. w oknie terapeutycznym dla leczenia trombolitycznego.

Ad. 2. Celem kolejnej pracy, była ocena bezpieczeństwa i efektywności trombolitycznego leczenia udaru niedokrwiennego mózgu w zależności od godziny i dnia przyjęcia do szpitala. Analizowano dane z 27 ośrodków, łącznie 1330 pacjentów, korzystając z rejestru SITS (*ang. Safe Implementation of Treatment in Stroke*). 32.5% pacjentów przyjęto do szpitala w dni wolne od pracy, 65.3% pacjentów przyjętych zostało poza regularnymi godzinami pracy, a 7.9% pacjentów przyjętych zostało w godzinach nocnych. W żadnym z w/w okresów nie stwierdzono zwiększenia częstości występowania klinicznie objawowego krwawienia śródczaszkowego, zwiększenia śmiertelności w ciągu pierwszych siedmiu dni, związku z poprawą stanu neurologicznego ≥ 4 punktów w skali NIHSS (*ang. National Institutes of Health Stroke Scale*) w siódmym dniu po leczeniu trombolitycznym. U pacjentów przyjętych w godzinach nocnych, stwierdzono tendencję do rzadszego osiągnięcia zadowalającego wyniku w zmodyfikowanej skali Rankina (0-2), co odpowiada pełnej sprawności lub niewielkiej niepełnosprawności. W konkluzji do wyników badania, wykazano, że rezultaty leczenia trombolitycznego są podobne, niezależnie od dnia przyjęcia, jak i pory dnia. Jednak celowe byłoby zachowanie szczególnej ostrożności, w przypadku przyjęć w godzinach nocnych.

Ad. 4. W kolejnej pracy analizowano wyniki leczenia trombolitycznego u 946 pacjentów w okresie 2003 – 2009 r., które były zgłoszone do bazy SITS. U 23.7% z tych chorych stosowano dożylnie leki przeciwnadciśnieniowe, w chwili zachorowania mieli powyżej 80 lat, leczenie trombolityczne podano w 3 do 4.5 godziny od zachorowania, stosowano doustne leczenie przeciwkrzepliwie, pacjenci przeżyli poprzedni udar w czasie krótszym niż 3

miesiące od obecnego zachorowania, pacjenci przebyli udar i chorowali na cukrzycę. Wykazano, że w tych przypadkach wyniki leczenia były gorsze w porównaniu do pacjentów bez tych obciążeń, będących w wieku poniżej 80 lat i przy zastosowaniu leczenia w czasie krótszym niż 3 godz. od początku objawów. Nie stwierdzono jednak większego odsetka klinicznie objawowego krwawienia wewnątrzczaszkowego, ani większego ryzyka zgonu.

Ad.5. W artykule zaprezentowane są przypadki pacjentów, u których objawy sugerują udar mózgu. Przedstawiono użyteczność różnych technik badania rezonansu magnetycznego, w tym w szczególności DWI w rozwiązywaniu wątpliwości diagnostycznych.

Ad.6. Udar niedokrwienny obu wzgórz jest bardzo rzadkim (0.1% - 2% wszystkich udarów niedokrwiennych) rodzajem udaru, który na ogół wynika z zamknięcia tętnicy Percherona. Tętnica Percherona, jest wariantem anatomicznym unaczynienia OUN, który polega na obecności wspólnego pnia tętniczego odchodzącego jednostronnie od segmentu P1 tętnicy tylnej mózgu. Zamknięcie tej tętnicy powoduje udar obu wzgórz, czasem również części śródmózgowia. Obustronny udar wzgórz charakteryzuje się triadą objawów: różnym stopniem zaburzeń świadomości, zaburzeniami ruchomości gałek ocznych, zaburzeniami poznawczymi. W publikacji przedstawiony został typowy i nietypowy obraz udaru niedokrwiennego obu wzgórz, w pięciu przypadkach, każdy o różnym obrazie klinicznym, przeanalizowano trudności diagnostyczne oraz użyteczność różnych metod neuroobrazowania w diagnostyce tej postaci udaru.

Wobec różnego i niejednoznacznego obrazu klinicznego, trudności w uwidocznieniu tętnicy Percherona w trybie ostrym w badaniu MR/CT i rzadkości występowania tego zespołu, przypadki obustronnego udaru wzgórz są rzadko leczone trombolitycznie.

1. Piliszek A, Witkowski G, Sklinda K, Szary C, Ryglewicz D, **Dorobek M**, Walecki J. Comprehensive imaging of stroke - Looking for the gold standard. *Neurol Neurochir Pol.* 2016 ;50(4):241-50. **IF 0.857**

2. Karliński M, Kobayashi A, Sobolewski P, Lisewski P, Romanowicz S, Fryze W, Nyka W, Zięba M, **Dorobek M**, Członkowska A. Is there a bad time for intravenous thrombolysis? The experience of Polish stroke centers. *Neurol Neurochir Pol.* 2014; 48(1):45-51. **IF 0.486**

3. Witkowski G, Piliszek A, Sienkiewicz-Jarosz H, Skierczyńska A, Poniatowska R, **Dorobek M**, Filipek-Gliszczyńska A, Ryglewicz D, Walecki J. The usefulness of diffusion-weighted/fluid-attenuated inversion recovery imaging in the diagnostics and timing of lacunar and nonlacunar stroke. *Neuroradiology*. 2014; 56(10):825-31. **IF 2.485**

4. Karliński M, Kobayashi A, Litwin T, Sobolewski P, Fryze W, Romanowicz S, Glonek M, Nyka W, Lisewski P, Członkowska A; SITS Poland Collaborative Group (**Dorobek M**). Intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke in patients not fully adhering to the European licence in Poland. *Neurol Neurochir Pol*. 2012; 46(1):3-14. **IF 0.486**

5. Szary C, Filipek-Gliszczyńska A, **Dorobek M**, Walecki J. Obrazowanie dyfuzyjne rezonansu magnetycznego w rozstrzyganiu wątpliwości klinicznych – analiza wybranych przypadków. *Neurologia po Dyplomie*, 2012; 7(6): 7-18 **MNiSW 2, IC 3.85**

6. Kozera-Strzelińska D, Nesteruk M, Holak-Puczyńska A, Nesteruk T, Dorobek M. Bilateral paramedian thalamic infarct: A report of five cases. *Postępy Psychiatrii i Neurologii* 2016, vol. 25, 4, 255-262 **MNiSW 13, IC 113.15**

5. **Badania dotyczące ryzyka zachorowania na stwardnienie rozsiane w zależności od polimorfizmów stwierdzanych w genach paraoksygenazy 1 i 2**

Zakrzewska-Pniewska B, Nojszewska M, Róg T, Pniewski J, **Dorobek M**, Styczyńska M, Szczudlik A. Polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes and the risk of multiple sclerosis in the Polish population. *Neurol Neurochir Pol*. 2013; 47(1):49-52. **IF0.537**

6. **Opisy przypadków**

Nesteruk M, Ługiewicz R, **Dorobek M**. Neuropatia bólowa u 36-letniego mężczyzny po obustronnej orchidektomii i chemioterapii z powodu raka jąder, z cukrzycą i insulinowym uszkodzeniem nerwów obwodowych. *Polski Przegląd Neurologiczny* 2015, T 11, Nr 2, 68-71.

Nesteruk M, Nesteruk T, Mandecka M, **Dorobek M**. Syphilis of the central nervous system as a cause of cognitive impairment at younger age, diagnostic difficulties. Case Study Case Rep. 2015; 5(1): 29-37

Dorobek M, Szmidt-Sałkowska E, Drac H, Harding A, Kwieciński H. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies caused by 17p11.2 chromosome deletion. Neurol Neurochir Pol. 1999; 33(1):177-85.

Analiza bibliometryczna

Jestem autorem lub współautorem 40 publikacji (w tym pierwszym lub ostatnim autorem 20 z nich) oraz autorem 4 rozdziałów w podręcznikach.

- Liczba prac oryginalnych łącznie (18), opublikowanych w czasopismach posiadających IF:

13 (w tym **12** po uzyskaniu stopnia doktora)

- Liczba prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach bez IF: (5)

- Liczba prac przeglądowych opublikowanych w czasopismach z IF (**IF: 2.969**): (1)

- Liczba prac poglądowych w czasopismach bez IF (6)

- Liczba prac z badań wielośrodkowych – (7) łączny **IF-197.056**

- Opisy przypadków opublikowane w czasopismach bez IF: 7

Sumaryczny IF za oryginalne pełnotekstowe prace naukowe po doktoracie zgodnie z rokiem opublikowania: IF: **25.503**

Sumaryczny IF łącznie 29.113

Liczba cytowań wg bazy Web of Science (WoS), bez autocytowań: **2355**

Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **8**

Staże w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich

- wrzesień 1995 r. – wrzesień 1996 r. - pobyt na stypendium finansowanym przez British Council, Newcastle upon Tyne, UK, Newcastle University, Department of Human Genetics.

Podypłomowe studia o tematyce genetyka medyczna oraz metodologia molekularna stosowana w diagnostyce schorzeń nerwowo – mięśniowych

- 2002 – pięć - tygodniowy pobyt, w Department of Human Genetics, Leiden University, Holandia, - szkolenie w zakresie podłoża molekularnego FSHD i metodologii molekularnych badań diagnostycznych.

Udział w projektach badawczych

1. Molecular, morphological and electrophysiological studies on muscle and nerve in genetic and acquired muscle disorders, 2001 – wykonawca
2. The role of emerin in the pathogenesis of the clinical phenotype of Emery – Dreifuss dystrophy with special attention to cardiac pathology., KBN 4P05B 061 18 – 2003 – 2005 wykonawca
3. Dystrofia twarzowo – łopakowo – ramieniowa, korelacje kliniczno – genetyczne, ze szczególnym uwzględnieniem mozaicyzmu somatycznego i zmienności wewnątrzrodzinnej. “Facioscapulohumeral muscular dystrophy. Genotype – Phenotype correlations, somatic mosaicism and intrafamilial variability” KBN 6P05B 071 20 – kierownik projektu 2002 – 2004 r.
4. Evaluation of functional and structural neuroimaging techniques in diagnosing of acute phase of ischemic brain stroke. N N402 433338 2010-2013 – wykonawca
5. Mezenchymal stem cells in the treatment of ischaemic brain stroke. In the project: MESENCHYMAL STEM CELLS, TRANSPLANTATION, REGENERATION (Stratemed) – investigator 2016 – 2018 EXPLORE ME, - wykonawca

The purpose of this project is to demonstrate the safety of the delivery of MSCs by intracarotid infusion and to assess the efficacy of treatment in subjects who have had unilateral, predominately cortical, ischemic strokes in the region of middle cerebral artery (MCA). MSCs will be derived from the patient's own bone marrow and infused up to 10 days after stroke. It is phase I of the clinical trial. The patients will be recruited to inclusion and exclusion criteria and evaluated for primary and secondary outcome measures. Currently, experimental phase on animals (dogs) is performed. The protocol may be changed.

Współpraca z innymi ośrodkami naukowymi

- University of Newcastle upon Tyne, Department of Human Genetics
- Institut of Biochemical Genetics in Pawia
- Department of Human Genetics, Leiden University Medical Centre, The Neatherlands
- Instytut Medycyny Doświadczalnej I Klinicznej, PAN
- Johns Hopkins University, Baltimore, US

Nagrody:

Wyróżnienie I stopnia, dla Zespołu Badawczego: Zimowski J.G, Bisko M.U, Fidziańska E.J, Fidziańska A.Z, Badurska B, Niebrój – Dobosz I, **Kozłowska M**, Hausmanowa - Petruszewicz I, Zaremba J.S za publikację: Detection of deletions within the gene of dystrophin in Polish families affected with Duchenne/Becker muscular dystrophy. Eur J Neurol. 1997; 4: 138-142. Przyznane decyzją Rady Naukowej Instytutu Psychiatrii i Neurologii z dnia 21 maja 1998 r.

Aktywność naukowa

- realizacja projektów badawczych j/w
- publikacje – zał. 4
- prezentacje na spotkaniach OW – PTN oraz na Zjazdach PTN - (zał 4)
- recenzent prac magisterskich studentów Wydziału Pielęgniarstwa i Logopedii
- recenzent prac przedstawionych na 13th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists 2017 r.
- recenzent artykułów dla Neurologii I Neurochirurgii Polskiej - 2016 r.
- udział w badaniach wielośrodkowych

Aktywność dydaktyczna

- od **2002 do 2012** r. wykłady o tematyce chorób mięśni, na kursach chorób nerwowo - mięśniowych dla lekarzy specjalizujących się w neurologii, organizowanych przez Zespół Nerwowo – Mięśniowy, IMDiK, PAN
- od **2008 do 2012** r. wykłady o tematyce chorób mięśni, na kursach chorób nerwowo - mięśniowych dla lekarzy specjalizujących się w neurologii, organizowanych przez Klinikę Neurologii, WUM
- **2009 – 2014 r** – nadzór merytoryczny nad badaniami elektrofizjologicznymi i szkolenie lekarzy w pracowni EMG i Potencjałów Wywołanych, Kliniki Neurologii, CSK, MSWiA

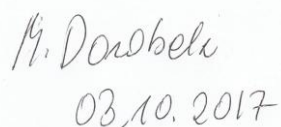
- Kierownik specjalizacji z neurologii lekarzy szkolących się w Klinice Neurologii, CSK, MSWiA

Działalność organizacyjna:

- **2005 – 2009 r.** Kierownik Pracowni EMG i Potencjałów Wywołanych, Kliniki Neurologii, CSK, MSWiA, Warszawa

- **2009 – 07.2017 r.** Zastępca Kierownika Kliniki Neurologii, CSK, MSWiA, Warszawa

- **od 08.2017 r.** p.o. Kierownik Kliniki Neurologii, CSK, MSWiA, Warszawa



M. Dorobeli
03.10.2017