Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Bakalářská práce

Choroby vázané na chromozom X se zaměřením na Duchenneovu muskulární dystrofii

2007

Vypracovala: Alena Loudová
Vedoucí práce: MUDr. Miloslav Kuklík, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a pod vedením jmenovaného školitele.

V Kolíně, dne 22. 8. 2007 Alena Loudová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce **MUDr. Miloslavu Kuklíkovi, Csc.** za jeho pomoc, rady a vstřícnost.

Abstrakt

Duchenneova muskulární dystrofie patří mezi velice závažná a rozšířená genetická onemocnění. Tato choroba je vázána na chromozom X, na největší gen v lidském genomu – gen pro protein dystrofin. Mutace v tomto genu způsobuje produkci poškozeného proteinu. Protein dystrofin hraje za normálních okolností důležitou roli ve stabilitě svalových vláken. Při jeho absenci dochází k rozpadu svalových vláken a jejich nahrazování vazivovou nebo tukovou tkání. Mezi nejdůležitější klinické příznaky patří pseudohypertrofie svalů, hlavně lýtek, postupující svalová slabost a kardiorespirační potíže. Pacienti většinou umírají ve věku kolem 20 let, právě na kardiorespirační selhání. Bohužel účinná léčba nebyla doposavad objevena. Nicméně v posledních dvou desetiletích byl v poznávání této nemoci učiněn velký pokrok a je studováno několik možných terapií léčby, které dávají nemocným velkou naději do budoucna.

Klíčová slova:

Duchenneova muskulární dystrofie, DMD, BMD, choroby vázané na X chromozomu, X-recesivní geny, dystrofin, rodokmen

Abstract

Duchenne muscular dystrophy belongs to very severe and frequent genetics disorders. This disorder is linked on the X chromosome on the largest gene in the human genome – gene for protein dystrophin. Mutation of the gene leads to production of a damaged protein. Protein dystrophin naturally plays an important part in stability of a muscle fibers. When it is absent, muscle fibers start to disintegrate and they are substituted by tissue or adipose. The most important clinical symptoms are pseudohypertrophy of muscles, mainly calves, progressive muscle weakness and cardiorespiratory failure. The patients usually die at age about 20 due to cardiorespiratory failure. Unfortunately an effective cure was not discover yet. Nevertheless in last two decades a big progress was made in recognizing of the disorder and now a few possible therapies is studied. This gives to illness patients hope to the future.

Keywords:
Duchenne muscular dystrophy, DMD, BMD, X-linked diseases, X-recessive genes, dystrophin, family tree

Obsah

1. Úvod……..4

2. Dědičnost genů vázaných na chromozom X……..5
2.1. X chromozom a jeho struktura……. 5
2.2. Dědičnost X-recesivních genů……..6
2.3. Dědičnost X-dominantních genů…….. 7

3. Molekulární podstata DMD……8
3.1. Struktura a lokalizace genu pro dystrofin…….8
3.2. Proteinový produkt genu a jeho funkce……8
3.3. Mutace v genu pro dystrofin……10
3.4. Protein kreatinkináza a jeho souvislost s DMD……11

4. Klinický obraz DMD……... 13
4.1. Srovnání Duchenneovy a Beckerovy muskulární dystrofie……. 13
4.2. Symptomatologie DMD……14
4.2.1. Změny ve svalové tkáni…… 14
4.2.2. Vnější projevy související s postupující svalovou slabostí……...15
4.2.3. Mentální funkce u pacientů s DMD……..15
4.2.4. Progresivita onemocnění……...16
4.3. Vyšetření a testy na nositelích DMD……16
4.3.1. Molekulární diagnostika ……17
4.3.2. Elektromyografie a srdeční tkáň…… 18
4.3.3. Biopsie a imunohistochemická vyšetření……18

5. Historie DMD……... 19

6. Možnosti léčby pacientů s DMD…….20
6.1. Současné možnosti……20
6.2. Testované možnosti léčby a vyhlídky do budoucna……21

7. Rodokmeny a vyšetření rodin s DMD v příbuzenstvu……. 23

8. Závěr……26

1. Úvod

V této bakalářské práci se zabývám problematikou Duchenneovy muskulární dystrofie, která patří do skupiny X-recesivních onemocnění. Jedná se o velice závažné dědičné onemocnění postihující zpravidla pouze chlapce. Jeho závažnost ještě umocňuje fakt, že jde o onemocnění velice rozšířené, jeho frekvence v populaci je přibližně 1: 3500 narozených chlapců, přičemž asi 30% onemocnění tvoří spontánní de novo mutace.

Tato práce je rozdělena do osmi kapitol. Po této úvodní kapitole následuje kapitola věnovaná struktuře X chromozomu a dědičnosti na něm lokalizovaných genů. Ve třetí kapitole je popsána molekulární podstata Duchenneovy muskulární dystrofie se zaměřením na gen a protein dystrofin. Následující kapitola poskytuje rozsáhlý přehled o klinickém obrazu této nemoci a to hlavně o jejích symptomech a vyšetřeních na nositelích onemocnění. Pátá kapitola je věnována historii Duchenneovy muskulární dystrofie. Šestá kapitola potom pojednává o současných možnostech léčby pro pacienty a nastiňuje možnosti léčby budoucí. Sedmá kapitola se zabývá rodokmeny rodin s výskytem Duchenneovy muskulární dystrofie v příbuzenstvu, které jsem zhodnocovala v Genetické ambulanci – Ambulantním centru pro vady pohybového aparátu.

2. Dědičnost genů vázaných na chromozom X

2.1. X chromozom a jeho struktura

X chromozom a na něm ležící geny patří mezi nejlépe prostudované objekty v lidské genetice. Způsob, jakým se tyto geny dědí z generace na generaci je naprosto odlišný od dědičnosti genů ležících na ostatních 22 párech autozomů. X chromozom patří mezi gonozomy, tedy pár chromozomů pohlavních. Zatímco ženy mají dva chromozomy X, muži mají pouze jeden a jeden chromozom Y, který je erodovanou podobou právě chromozomu X a obsahuje pouze několik genů. Toto má ovšem dramatické důsledky, protože jakýkoliv genový defekt na chromozomu X se u mužů projeví z důvodu absence odpovídajícího genu na párovém chromozomu. Proto mutace na chromozomu X se nejčastěji projevuje jako nemoc mužů.

Další zvláštností tohoto chromozomu je, že přestože ženy mají dvě kopie, jeden chromozom X je v jádře buněk vždy inaktivován, čímž dochází i k umlčení genů na něm lokalizovaných. Nicméně je možné, že některé geny inaktivaci uniknou a dochází potom k jejich expresi z obou chromozomů – aktivovaného i inaktivovaného. To, který ze dvou chromozomů v buňce bude inaktivován je víceméně náhodné. Pokud ale jeden z chromozomů nese nějakou mutaci, dochází k jeho inaktivaci častěji.

Chromozom X v lidském karyotypu náleží do skupiny C, je to tedy střední submetacentrický chromozom. Jeho celková velikost je přibližně 155 000 000 bp, přičemž délka krátkého raménka je 58 500 000 bp, délka dlouhého raménka 93 300 000 a délka centromery 3 000 000 bp. Na tomto chromozomu leží 1098 genů, z nichž nejdelší je gen pro protein dystrofin o délce 2 220 223 bp. Naopak nejkratší gen má 114 bp. Dále na tomto chromozomu leží 173 genů, které nekódují RNA (www.sanger.ac.uk/Info/Press/2005/050316-numbers.shtml).

Na chromozomu X bylo zmapováno více než 300 onemocnění, což je zdaleka největší množství v porovnání s ostatními chromozomy. Tento chromozom také hraje důležitou roli v rozvoji genetických a molekulárních metod. Jeden z prvních genů, který byl klonován za použití moderních metod, byl právě ten, který je asociován s Duchenneovou muskulární dystrofií (www.sanger.ac.uk/Info/Press/2005/050316.shtml).

Nejkompletnější sekvence tohoto chromozomu byla publikována v březnu 2005 mezinárodním týmem pod záštitou Sanger Institute, Cambridge, UK v časopise Nature a byl to první zmapovaný chromozom vůbec (www.sanger.ac.uk/Info/Press/2005/050316.shtml).

2.2. Dědičnost X-recesivních genů

V případě dědičnosti genů recesivně vázaných na chromozomu X dochází k typickému přenosu onemocnění z matky na syna. Toto je dáno právě faktem, že ženy mají dva X chromozomy, zatímco muži pouze jeden a jeden chromozom Y. Pokud tedy žena ve svém genomu nese mutovaný X chromozom, jeho párový chromozom je schopen kompenzovat tuto mutaci a žena většinou nejeví známky onemocnění nebo má pouze lehké příznaky v závislosti na inaktivaci poškozeného či normálního chromozomu. Taková žena se potom nazývá přenašečkou, protože ač sama fenotyp onemocnění prokazovat nemusí, ve svém genomu tuto informaci přenáší do dalších generací. Všichni potomci takové ženy mají 50% pravděpodobnost zdědění mutovaného chromozomu a tedy i onemocnění. Projevy se ale opět liší v závislosti na pohlaví dítěte. Dcery přenašečky mají 50% pravděpodobnost, že budou také přenašečkami onemocnění, zatímco její synové mají 50% pravděpodobnost, že zdědí poškozený X chromozom, čímž se u nich dané onemocnění projeví.

Zajímavá je též dědičnost z nemocného otce na jeho potomky. Tato onemocnění jsou většinou velmi závažná až letální, proto je snížená pravděpodobnost, že nemocný muž bude mít potomky. Pokud k tomu ovšem dojde, 100% jeho dcer budou přenašečky onemocnění, protože mohou zdědit pouze poškozený X chromozom, zatímco všichni jeho synové budou zdraví, protože obdrží od otce chromozom Y.

Zvláštním případem též může být, pokud by potomky měli žena přenašečka a nemocný muž. V takovém případě se mohou narodit i dcery, které budou mít dva poškozené X chromozomy a dojde tedy k tomu, že se u nich onemocnění projeví v plné míře.

Z výše uvedeného vyplývá, že žena může být přenašečkou onemocnění nebo může být sama onemocněním postižena, zatímco muž je vždy nemocný. V žádném případě není možné, aby byl muž přenašečem onemocnění.

Onemocnění recesivně vázaná na chromozom X jsou většinou velmi závažná, život omezující či zkracující. Patří mezi ně hlavně Duchenneova muskulární dystrofie,

kterou bych se chtěla dále zabývat v této bakalářské práci. Dále potom například hemofilie, způsobená poruchou koagulačních faktorů nebo syndrom fragilního X chromozomu.

2.3. Dědičnost X-dominantních genů

Tento typ dědičnosti je v zásadě podobný dědičnosti recesivní s tím rozdílem, že i žena heterozygotka, tedy nositelka jednoho zdravého a jednoho mutovaného X chromozomu, je běžně postižena onemocněním. Toto je dáno právě dominancí genu, který nese dané onemocnění. V tomto případě mají tedy potomci nemocné ženy 50% pravděpodobnost, že zdědí onemocnění a to bez ohledu na pohlaví. Zatímco nemocný muž předá svým dcerám vždy jen mutovaný chromozom a ty jsou tedy potom 100% nemocné, jeho synové jsou všichni zdraví.

X-dominantní dědičnost je mnohem méně obvyklá než dědičnost X-recesivní. Mezi taková onemocnění patří například vitamin D-rezistentní křivice.

3. Molekulární podstata Duchenneovy muskulární dystrofie

3.1. Struktura a lokalizace genu pro dystrofin

Gen pro Duchenneovu muskulární dystrofii byl již poměrně dobře popsán a zmapován. Představuje největší a jeden z nejkomplexnějších genů lidského genomu vůbec a je lokalizován na krátkém raménku chromozomu X, konkrétně Xp213 – p211. Produkuje protein dystrofin, který za normálních okolností stabilizuje strukturu příčně pruhovaného svalu. Tento gen je dlouhý 2 220 223 bp. Původně se předpokládalo, že obsahuje 60 exonů a 60 nekódujících intronů, ale dnes je již známo téměř 80 exonů. Mezi krajními body dystrofinového genu by měla nastávat rekombinace ve 2%, ale prakticky k ní dochází v 5%. Zřejmě je v rámci tohoto genu několik míst, kde rekombinace nastává častěji (8. Kuklík M. 2005).

Tato obrovská velikost genu pro dystrofin s sebou přináší hned několik komplikací. V první řadě takto poskytuje velkou oblast, ve které může docházet k náhodným, převážně delečním mutacím, čímž se vysvětluje právě vysoký výskyt Duchenneovy muskulární dystrofie v populaci a také její značná genetická rozmanitost. Odhaduje se, že asi 30 – 50% případů tvoří mutace de novo a byly charakterizovány stovky různých defektů. Tento gen je velice atraktivním cílem pro studium genové terapie. Jeho značná velikost je také problematická z důvodu, že některé virové vektory, které se používají ke vkládání genů, nejsou schopny pojmout plnou délku dystrofinového genu. Aby se tento přenos usnadnil, je nyní studováno vkládání minidystrofinů, které obsahují všechny potřebné vazebné motivy, ale mají odstraněny některé z STR regionů, do těchto virových vektorů (9. Menhart N, 2006).

V historii poznání genu se nejprve nalezla vazba genu s X chromozomálními polymorfismy restrikčních fragmentů vzdálených více než 20 cM, což znamená 20% vzniku rekombinací. Tím se gen lokalizoval do cytogeneticky patrného pruhu Xp21. Poté se nacházely stále těsněji vázané polymorfismy, až se nakonec našly vnitrogenové polymorfismy (8. Kuklík M. 2005).

3.2. Proteinový produkt genu a jeho funkce

Expresí výše popsaného genu vzniká protein dystrofin, jehož defekt podmiňuje Duchenneovu muskulární dystrofii. Tento protein je lokalizován pod plazmatickou membránou svalových buněk, která se též nazývá sarcolema, kde slouží k její

stabilizaci. Mnoho studií ukazuje, že absence dystrofinu při onemocnění Duchenneovou muskulární dystrofií narušuje stabilitu plazmatické membrány, což vede k velkému snížení odolnosti vůči mechanickým stresům a též se zvyšuje propustnost membrány pro vápenaté ionty. Předpokládá se, že změna koncentrace vápenatých iontů může být zodpovědná za svalovou degeneraci, která nastává ve svalových vláknech takto nemocných pacientů (1. Basset O. et al. 2006).

S tímto proteinem jsou ve svalových vláknech asociovány i další různé svalové glykoproteiny. Jsou to transmembránové dystroglykany (α a β, přičemž α vyčnívá do extracelulárního prostoru), sarcoglykany (α, β, γ a δ) a sarcospan a dále intracelulární proteiny syntrophiny (α, β1 a β2), dystobrevin a utrofin. Dystrofin tedy zajišťuje spojení mezi aktinovým cytoskeletem svalu a dystroglykany vedoucími do extracelulárního prostoru. Sarcospan a sarcoglykany stabilizují tento membránový komplex. Intracelulární komplex zahrnuje syntropiny a dystobrevin, které spolu s dystrofinem stabilizují nitric oxide syntázu, sloužící k signalizaci, v subsarcolemální pozici. Proto se předpokládá, že dystrofin a s ním asociované proteiny mají ve svalovém vlákně jak strukturní a stabilizační, tak i signalizační funkci (2. Brown R.H. 1997). Kromě toho bylo prokázáno, že dystrofin-glykoproteinový komplex interaguje i s dalšími signálními molekulami jako je kalmodulin, Grb2 nebo extracelulární kináza (14. Odom G.L et al. 2007).

Dystrofinová mRNA je translatována ze 7 různých promotorů, čímž vzniká velký transkript obsahující 79 exonů o délce přibližně 14 kb (16. Sadoulet-Puccio H.M., Kunkel L.M. 1996). Ukázalo se, že tento rozsáhlý genový produkt je častým subjektem pro rozsáhlý alternativní RNA processing, čímž potenciálně produkuje široké množství dystrofinových variant (18. Sironi M. et al. 2002). Existují 3 dystrofinové isoformy o plné délce - isoforma exprimovaná v mozku, svalech a mozečkových Purkyňových neuronech a dále další 4 zkrácené isoformy (Dp260, Dp140, Dp116 a Dp71), produkované ze samostatných promotorů uvnitř genu (14. Odom G.L et al. 2007).

Protein dystrofin náleží do spektrinové rodiny protenů, pro něž je charakteristické, že jsou dominantně tvořeny množstvím tandemových repetic STR motivů. Je to relativně rozměrný protein o velikosti přibližně 427 kDa, která ho řadí mezi 0,5% největších lidských proteinů. V proteinu dystrofinu je 24 kopií STR motivu, které jsou přímo zodpovědné za tuto impozantní velikost. Tyto STR jsou rozeznávány jako unikátní domény o velikosti přibližně 110 aminokyselinových motivů, a přestože neznáme přesnou atomární strukturu dystrofinových STR, je dostupné množství těchto

struktur od ostatních členů spektrinové rodiny. Ve všech případech, které známe pomocí studií založených na X-paprscích a nukleární magnetické rezonanci, mají strukturu trojitého α-helixového svazku s prvním a třetím helixem palalelně a mezi nimi ležícím druhým antiparalelním, čímž se formují do přibližně cylindrické struktury o délce asi 5 nm a průměru přibližně 2 nm. Tyto motivy jsou vždy nalézány ve vícenásobných tandemových repeticích, čímž poskytují protáhlé „rod shaped“ motivy. Mezi sousedními STR motivy byly v některých případech prokázány termodynamické interakce, které poskytují danému regionu rigiditu (9. Menhart N. 2006).

Kompletní sekvence lidské dystrofinové cDNA byla určena v roce 1988. Gen kóduje 3685 aminokyselin proteinového produktu, které jsou rozděleny na 4 hlavní strukturní domény. N-koncová doména obsahuje 240 aminokyselin, které jsou velice konzervativní a shodné s aktin-vazebnou doménou alfa-actininu. Tato doména se váže k F-aktinovým filamentům subsarcolemálního cytoskeletonu. Rozsáhlá centrální doména je, jak již bylo popsáno výše, tvořena 24 trojhelikálními segmenty, které jsou shodné s repetitivními doménami proteinu spektrinu. Tato sekvence je dále následována oblastí bohatou na cystein a zakončena unikátním 420 aminokyselinovým C-koncem, sloužícím jako kotva k plazmatické membráně přes dystrofin-glykoproteinový komplex (7. Koenig M. et al. 1988, 14. Odom G.L et al. 2007).

3.3. Mutace v genu pro dystrofin

Duchenneova muskulární dystrofie je způsobena mutací uvnitř genu pro protein dystrofin. Téměř 30% všech mutací vzniká u nemocných de novo, spontánními mutacemi. Zbytek tvoří mutace zděděné.

Bylo zjištěno, že největší procento těchto mutací, tedy asi 65 % čítají rozsáhlé delece v dystrofinovém genu, které většinou zasahují jeden i více exonů (14. Odom G.L. et. al. 2007). Tyto delece jsou rozmístěny nenáhodně a nejčastěji se objevují ve střední části genu (80%), méně častěji potom blízko 5´ konce genu (20%). Takováto distribuce delecí byla pozorována u mnoha různých populací a etnických skupin. Mezi velikostí a lokalizací delece v genu a závažností onemocnění však nebyla prokázána žádná korelace (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005). Spíše lze říci, že stupeň choroby není vázán na velikost delece, ale na kvantitu transkripce (8. Kuklík M. 2005).

Dále byly u pacientů s Duchenneovou muskulární dystrofií pozorovány také duplikační mutace. Ty činí asi 5 – 10% případů onemocnění. Na rozdíl od delečních

mutací však bylo nalezeno 80% duplikací na 5´ konci genu a pouze zbylých 20% v centrální části genu. Stejně jako u delecí, i tato distribuce duplikací byla pozorována u různých populací a etnických skupin (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005).

Nejmenší procento případů tvoří mutace malého rozsahu, jako jsou například bodové mutace nebo malé delece či duplikace, které byly též objeveny u nemocných s Duchenneovou muskulární dystrofií. Většina těchto mutací je unikátní pro jednoho nebo několik pacientů a vede ke vzniku zkráceného proteinu dystrofinu, který postrádá část nebo celý C-konec jako důsledek nonsense nebo posunové mutace (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005).

Tyto mutace způsobují změnu čtecího rámce, což má velice závažné důsledky. Může dojít k nestabilitě vznikající mRNA a/nebo předčasné terminaci translace a tím vzniku nekompletního, nefunkčního proteinu. Ten je potom rychle rozeznán opravným buněčným systémem a degradován v proteasomech. Z toho vyplývá, že v takové buňce je produkováno žádné nebo velice malé množství poškozeného dystrofinu.

Nicméně toto onemocnění může být způsobováno poškozením většího komplexu něž je pouze protein dystrofin. Studie ukazují, že několik glykoproteinů, které interagují s dystrofinem, při tomto onemocnění také schází. Tyto s dystrofinem asociované proteiny mohou být přímo zapojeny do toku vápníku v dystrofických vláknech. Proto ztráta dystrofinu může být první z mnoha kroků, které nakonec vedou k propuknutí muskulární dystrofie (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005).

Identifikace a studium mutací, které nezpůsobují zkrácení proteinu umožňuje poskytnout bližší pohled na funkci dystrofinu, stejně tak, jako určit regiony a konformace nutné pro stabilitu tohoto proteinu (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005).

3.4. Protein kreatinkináza a jeho souvislost s DMD

Kreatinkináza katalyzuje reverzibilní fosforylaci kreatinu pomocí adenosintrifosfátu (ATP). Při nedostatku ATP kreatinkináza naopak štěpí kreatinfosfát a doplňuje svalový ATP. Celková zásoba kreatinfosfátu v kosterních svalech je však tak malá (cca 25 μmol/g), že vystačí pouze na několik desítek sekund svalové práce. Je však dostatečná pro klidovou metabolickou spotřebu svalů. Defosforylací kreatinfosfátu a ireverzibilní dehydratací kreatinu vzniká kreatinin, který se z buněk vyplavuje do cirkulace. Z organismu se kreatinin vylučuje zejména močí, ale z menší části i potem a žlučí (17. Schneiderka P. 2006).

Enzym kreatinkináza je obsažen především v cytosolu a v mitochondriích buněk kosterního svalstva, méně též v myokardu, CNS a v hladké svalovině. Aktivita celkové kreatinkinázy vztažená na 1 g svalové hmoty je u kosterního svalstva téměř 5x vyšší než u srdečního svalu. Je to dimer o molekulové hmotnosti 40 000, složený z polypeptidových jednotek M (muscle) a B (brain), které jsou podkladem pro existenci tří cytosolových isoenzymů BB, MB a MM. Kromě toho existuje také mitochondriální isoenzym. Isoenzym BB lze detekovat pouze v likvoru. V krvi se dále vyskytují isoformy isoenzymů MM a MB vznikající odštěpením C-terminálního lyzinového zbytku z polypeptidových řetězců M působením sérových karboxypeptidáz. Mohou vznikat také dvě makroformy kreatinkinázy, přičemž jedna vzniká vazbou enzymu na imunoglobulin G a druhá je monomerní makroforma mitochondriálního enzymu (17. Schneiderka P. 2006).

Fyziologické hodnoty katalytických koncentrací celkové kreatinkinázy v séru závisí na rase, pohlaví, věku, hmotnosti svalů a fyzické aktivitě. Dolní hranice aktivity celkové kreatinkinázy v séru při 37°C je u zdravé dospělé populace kolem 0,4 μkat/l. Horní hranice referenčního rozmezí je 3,2 μkat/l u mužů a 2,8 μkat/l u žen. Hned po narození může být aktivita kreatinkinázy běžně až 10x zvýšena, ale pak rychle klesá a po prvním roce života dosahuje hodnot jen o málo vyšších než u mužů. Fyziologické hodnoty katalytické koncentrace isoenzymu MB v séru dospělých osob jsou do 0,4 μkat/l. U novorozenců jsou také několikanásobně vyšší (17. Schneiderka P. 2006).

Celková kreatinkináza se významně zvyšuje u onemocnění kosterních svalů jako jsou svalové dystrofie, a to zejména Duchenneova muskulární dystrofie, a u všech typů poškození svalů nadměrným zatížením, ischémií, úrazem, operačním výkonem apod. Při toxickém poškození kosterního svalstva nebo při progresivní svalové dystrofii se může hodnota kreatinkinázy v séru zvýšit až 1000x. Celková kreatinkináza v séru se zvyšuje při akutním infarktu myokardu, ale také při zánětech myokardu a perikardu, operačních výkonech na srdci nebo při plicní embolii (17. Schneiderka P. 2006).

Měření hodnoty kreatinkinázy v séru v rámci biochemického vyšetření u pacientů či přenašečů Duchenneovy muskulární dystrofie tedy výrazně pomáhá při stanovení diagnózy.

4. Klinický obraz DMD

Duchenneova muskulární dystrofie je závažné, smrtelné dědičné onemocnění, které se vyskytuje zpravidla jen u chlapců. Ženy mohou být přenašečky onemocnění, přičemž mohou manifestovat i určitými klinickými příznaky. Toto onemocnění se v populaci vyskytuje s frekvencí průměrně 1 : 3500 porodů chlapců (8. Kuklík M. 2005).

4.1. Srovnání Duchenneovy a Beckerovy muskulární dystrofie

Duchenneova i její lehčí varianta Beckerova muskulární dystrofie jsou obě podmíněny mutací dystrofinového genu lokalizovaného na krátkém raménku X-chromozomu. Některé z těchto mutací však způsobují Duchenneovu, jiné vyvolávají Beckerovu muskulární dystrofii (8. Kuklík M. 2005). Od objevení dystrofinového genu a proteinu před více než 18 lety bylo molekulárně identifikováno více než 30 různých forem muskulárních dystrofií (14. Odom G.L. et. al. 2007).

Duchenneova muskulární dystrofie byla prvně popsána francouzským neurologem Guillaume Benjamin Amand Duchenne v roce 1860. Beckerova muskulární dystrofie je pojmenována po německém lékaři Peter Emil Becker, který poprvé popsal tuto variantu v roce 1950 (www.parentproject.cz/description/description.htm).

Pacienti trpící vážnější Duchenneovou muskulární dystrofií mají pouze velice malé množství nebo dokonce žádný protein dystrofin ve svých buňkách, zatímco pacienti s Beckerovou muskulární dystrofií mají ve svých buňkách obsažen dystrofin o velikosti odlišné od normálního a/nebo v menším množství. Toto je dáno odlišností vzniklých mutací. Zatímco u Duchenneovy muskulární dystrofie dojde deleční či duplikační mutací ke změně čtecího rámce a je tak syntetizován zkrácený nefunkční protein, u méně závažné Beckerovy muskulární dystrofie nedojde delecí či duplikací ke změně čtecího rámce a je tak produkován semifunkční protein. Degenerace svalů je proto pomalejší. Hypotézu, že rozsah mutace není v přímé korelaci se závažností onemocnění potvrzuje i to, že jedna z největších delecí (35 exonů) byla identifikována u pacientů s mírným typem Beckerovy muskulární dystrofie (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005).

Stejně jako u Duchenneovy muskulární dystrofie, i u Beckerovy formy myodystrofie vzniká přibližně 30% mutací de novo. Progresivita onemocnění je však mnohem pomalejší a i přesto, že jsou si obě onemocnění v příznacích velmi podobné,

prognóza pro pacienty s Beckerovou muskulární dystrofií je mnohem příznivější. Také její frekvence v populaci je značně nižší. Zatímco frekvence Duchenneovy muskulární dystrofie je asi 1 : 3500 narozených chlapců, u Beckerovy muskulární dystrofie je to asi jen 1 : 20 000 narozených chlapců. Většina z nich se dožije 4. – 5. dekády života.

4.2. Symptomatologie DMD

4.2.1. Změny ve svalové tkáni

Absence dystrofinu ve svalové tkáni je doprovázena ztrátou dystrofin-glykoproteinového komplexu v sarcolemální membráně, což vede k její nestabilitě. Ta je důvodem progresivní degenerace svalové a srdeční tkáně, která je potom nahrazována vazivovou a tukovou tkání a logicky tak dochází k narušení její funkce. U srdeční svaloviny dochází k nahrazování vazivovou a tukovou tkání převážně v oblasti posterobazální stěny levé komory srdeční. Dochází zde k atrofickým změnám v myokardu spojených s vakuolací, fragmentací nebo degenerací jádra. Toto progresivní zasažení levé komory vede k abnormálním pohybům její stěny a způsobuje rozšířenou kardiomyopatii (21. Yugeta N. et. al. 2006).

Z důvodu poškození sarcolemy svalového vlákna dochází též ke změně homeostázy vápníku. Za normálních okolností je vápník aktivně udržován v buňce ve velice nízké koncentraci, protože zvýšení jeho koncentrace vede k buněčné signalizaci. Pokud ale dojde k poškození membrány, není buňka schopna tuto koncentraci udržet a dochází proto ke zvyšování hladiny vápníku uvnitř buňky, což je zodpovědné za degeneraci svalových buněk u pacientů s Duchenneovou muskulární dystrofií. Dlouhodobé zvýšení koncentrace vápníku uvnitř buněk nakonec vede k apoptóze takových buněk, protože dochází k aktivaci kaskády proteolytických enzymů. Zůstává ovšem otázkou, zda apoptóza způsobuje svalovou degradaci nebo je sekundárním projevem u Duchenneovy muskulární dystrofie (1. Basset O. et. al. 2006).

Obecně se tedy sval, který obsahuje málo dystrofinu stává insuficientní při kontrakci a snáze se poškodí. Je zvýšena fragilita buněčných membrán myocytů a nastává i série dalších změn, jako například odchylná vaskulární perfúze, ztráta nitric oxide reduktázy či výše zmíněné porušení kalciové homeostázy a menší odolnost proti proteázám a inzultům myofibril (8. Kuklík M. 2005).

4.2.2. Vnější projevy související s postupující svalovou slabostí

Průběh onemocnění u pacientů s Duchenneovou muskulární dystrofií je celkem dobře předvídatelný. Klinický obraz je charakterizován postupným rozvojem poruch chůze, které se začínají objevovat již v batolecím věku. Děti většinou začínají později chodit, dochází k zakopávání batolat a poruchám vstávání s typickým šplháním po vlastním těle. Později dochází též k rozvoji svalových pseudohypertrofií, kdy dochází k nahrazování svalové tkáně vazivem. Toto je patrné převážně v oblasti lýtek, ale i v jiných oblastech příčně pruhovaného svalstva (8. Kuklík M. 2005).

Děti v předškolním věku působí nemotorně a často padají. Objevují se též potíže s chůzí do schodů, vstáváním ze židle a během. Ve školním věku je běžná kolébavá chůze po špičkách, snižuje se stabilita a tím se mění i držení těla. Záda se prohýbají dozadu (zvětšená lumbální lordóza) a břicho dopředu. Postupně dochází i k potížím se zdvižením ruky nad hlavu. Děti úplně ztrácejí schopnost chůze mezi 7 – 12 rokem a všechny aktivity, při nichž musí být zapojeny svaly na rukou, nohou a trupu poté vyžadují pomoc (www.parentproject.cz/description/description.htm, 8. Kuklík M. 2005).

Kardiorespirační insuficience, tedy nedostatečnost dýchacích svalů a myokardu se rozvíjí zpravidla až od 10 let věku (8. Kuklík M. 2005). Toto se většinou stává i příčinou úmrtí u pacientů s tímto onemocněním.

4.2.3. Mentální funkce u pacientů s DMD

Mentální funkce u chlapců nemocných s Duchenneovou muskulární dystrofií jsou velmi zajímavé. Přestože toto onemocnění bylo poprvé charakterizováno neurologem Duchennem jako choroba spojená s nízkým intelektem a potížemi s řečí, převážná většina pacientů nemá žádné takovéto signifikantní mentální problémy (6. Hinton V.J. et. al. 2007). Přesto přibližně 20% nemocných je mentálně handicapováno (ve srovnání s 2 - 3% ostatní populace) s průměrnou hodnotou IQ 85. Narušení mentálních funkcí se však mezi jednotlivými případy onemocnění liší, není progresivní, není v přímé závislosti na závažnost onemocnění a poznamenává více verbální schopnosti než výkonnost (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005, 6. Hinton V.J. et. al. 2007).

Duchenneova muskulární dystrofie je primárně onemocnění postihující svalstvo, ale poznamenává též centrální nervovou soustavu. Isoformy proteinu dystrofinu se totiž prokazatelně vyskytují i v mozku, a to v mozkové kůře a mozečku a

specifických buněčných typech jako jsou pyramidové a Purkyňovy buňky (6. Hinton V.J. et. al. 2007).

Ve srovnání se zdravými členy rodiny prokazují chlapci nemocní Duchenneovou muskulární dystrofií slabší schopnost čtení a aritmetických schopností. Takové děti také mají potíže s učením a často i s chováním, přestože nejsou mentálně zaostalé. Problémy se týkají schopnosti udržet pozornost, slovního učení, paměti a emocí. Časté jsou i problémy s řečí a komunikací. Nicméně většina mentálních schopností, jako je základní chápání slovní zásoby se jeví normální a často jsou také znamenité manuální a vizuální dovednosti (6. Hinton V.J. et. al. 2007).

4.2.4. Progresivita onemocnění

První příznaky onemocnění se u chlapců s Duchenneovou muskulární dystrofií začínají objevovat již v batolecím věku, tedy mezi 2 – 3 rokem života. Projevují se retardací motorického vývoje a častým padáním při chůzi již kolem 18 měsíců věku. Nemoc postupně způsobuje ochabování kosterního svalstva končetin a trupu, které je progresivní a symetrické. Nejprve poznamenává dolní končetiny a až poté končetiny horní a proximální svaly končetin dříve než distální. Důležitým klinickým příznakem jsou také kontraktury kloubů, které se často objevují již ve věku kolem 6 let. Přibližně ve věku mezi 10 – 13 rokem dospěje již poškození svalstva do takového stádia, že je většina nemocných chlapců upoutána na kolečkové křeslo. V raném věku dospívání mezi 13 – 19 rokem, často i dříve, jsou zasaženy i svaly dýchací a srdeční. V posledním stádiu nemoci nejsou takto postižené děti schopné dýchat bez pomoci přístrojů. Většina pacientů umírá kolem 20 let na plicní nebo srdeční selhání (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005, www.parentproject.cz/description/description.htm).

4.3. Vyšetření a testy na nositelích DMD

Při určení diagnózy nemoci se většinou začíná rodinnou anamnézou a lékařskou prohlídkou. Přestože přibližně jedna třetina onemocnění Duchenneovou muskulární dystrofií vzniká spontánními mutacemi, pokud se v rodokmenu již tato nemoc objevuje, je dobré se na tuto skutečnost zaměřit. Dále se obvykle provádějí genetické testy a svalová biopsie. Je také nutné určit, zda ochablost svalstva má svou příčinu přímo ve svalech nebo v nervech, které je ovládají. Proto je možné podstoupit další testy jako elektromyografii (EMG), která právě tuto informaci pomůže zjistit. Poté se také provádí

speciální krevní vyšetření na hodnotu kreatinkinázy, jejíž množství se v krvi zvyšuje při poškození svalu. K určení přesné příčiny se může provést i svalová biopsie, kde se lékaři přímo dozvědí, co se ve svalu děje, tedy zda je přítomen neadekvátní dystrofin (v případě Beckerovy muskulární dystrofie) či žádný dystrofin (v případě Duchenneovy muskulární dystrofie). Dále může být provedena též magnetická rezonance, která prokazuje u nemocných i dalších žen přenašeček změny v biochemickém složení svalů, tedy fosfátového spektra. U potenciálních přenašeček se provádí ultrasonografické vyšetření (UZ) čtyřhlavého svalu stehenního
(www.parentproject.cz/description/description.htm, 8. Kuklík M. 2005).

4.3.1. Molekulární diagnostika

Molekulární diagnostika s analýzou genových mutací vysoce zlepšila diagnostikování onemocnění, odhalování přenašeček a genetické poradenství, protože umožňuje identifikovat delece či duplikace zodpovědné za danou chorobu. Při tomto postupu se využívají klony dystrofinové cDNA jako sondy pro Southern blotting, díky nimž jsme schopni přesně rozeznat vzniklé mutace. Extrahovaná DNA je následně hybridizována se sedmi až devíti cDNA sondami, které pokryjí kompletní 14 kb dlouhý transkript. Nicméně delece jsou nejčastěji lokalizovány ve dvou rizikových oblastech, takže k jejich identifikaci stačí čtyři hybridizační sondy. Duplikace jsou identifikovány zvýšením intenzity hybridizace. Nicméně technika Southern blotting vyžaduje izotop, vysokomolekulární DNA a je náročná na čas. Alternativní rychlou a výkonnou metodou k rozpoznávání delecí v genu je multiplex PCR. Tato technika umožňuje amplifikovat specifické deleční sondy pro exony uvnitř dystrofinového genu. Exonové produkty potom mohou být jeden od druhého rozděleny podle velikosti pomocí gelové elektroforézy. Poté se produkty v gelu vizualizují pomocí ethidium bromidu. Pokud u pacienta nějaká kódující sekvence chybí, bude chybět i ve výsledném gelu. Výhoda tohoto postupu je, že je velice rychlý a může být dokončen i během jednoho dne. To jej činí důležitým při prenatální diagnostice, kdy čas hraje klíčovou roli (15. Prior T.W., Bridgeman S.J. 2005).

Nevýhody molekulární diagnostiky spočívají někdy ve zdlouhavosti vyšetření, výhodou je naopak velká přesnost. Komplexní molekulárně-genetické vyšetření spočívající v úplné sekvenaci genu a určování i vzácnějších mutací nelze zatím považovat v našich podmínkách za rutinní a rentabilní, cenově dostupnou metodu. Představa, že by v našich podmínkách bylo možné provádět kompletní screeningové

vyšetření u všech rodin s výskytem Duchenneovy muskulární dystrofie se ukázala nereálná. Nesporné však je, že v konkrétních rodinách představuje význačnou pomoc v sekundární prevenci prenatální diagnostika i diagnóza přenašečství u žen a tím i určování genetického rizika. Molekulární diagnostika je i přes své zjevné limity nejpřesnější metodou ve zjišťování choroby i prokazování jejího přenašečství (8. Kuklík M. 2005).

4.3.2. Elektrokardiografie a srdeční tkáň

Elektrokardiografické vyšetření slouží k prokázání poškození srdečního svalu. U pacientů s Duchenneovou muskulární dystrofií dochází též v různé míře k jeho poškození, což závisí na stupni onemocnění a typu mutace. Stejně jako u kosterního svalstva, dochází i u myokardu k nahrazování jeho tkáně tukovou tkání nebo vazivem. Nejvíce postiženou srdeční tkání je posterobazální a laterální stěna levé komory. Typickými počátečními příznaky poškození srdce je sinusová tachykardie a autonomní dysfunkce. Zpočátku je elektrokardiografie normální nebo ukazuje abnormální pohyby stěny v oblastech nahrazených vazivem. S rozšiřováním fibrózní tkáně se objevuje dysfunkce a arytmie levé komory, stejně tak jako rozšiřování myokardu a hlavně levé komory, čímž dochází ke zmenšování vnitřního prostoru komor. V posledním stádiu nemoci může dojít k selhání srdce a náhlé smrti. Přestože poškození srdce se objevuje u přibližně 90% pacientů s Duchenneovou muskulární dystrofií, přímou příčinou úmrtí je jen u asi 20% (5. Finsterer J, Stöllberger C. 2003).

4.3.3. Biopsie a imunohistochemická vyšetření

Při biopsii svalů dochází k chirurgickému odebrání malého vzorku svalové tkáně. Pomocí dalších testů lze potom přímo na této tkáni pozorovat, jaké bílkoviny jsou ve svalech přítomny, v jakém množství a kvalitě. To slouží k přímému odhalení chybějícího proteinu dystrofinu u Duchenneovy muskulární dystrofie pomocí protilátek proti tomuto proteinu. Dále lze na takové tkáni pozorovat, zda a v jaké míře dochází k nahrazování svalové tkáně vazivovou a tukovou tkání či hypotrofii nebo hypertrofii svalových vláken (10. Muntoni F. et. al. 1997).

5. Historie DMD

Duchenneova muskulární dystrofie byla popsána v lékařské literatuře již kolem roku 1850, ale molekulární základ tohoto onemocnění nebyl objeven dříve něž v 80. letech 20. století. Klonování dystrofinu vedlo též k identifikaci velkého komlexu proteinů, které hrají důležitou roli v biologii svalového vlákna a pomohlo lépe porozumět procesu onemocnění (13. O´Brien K.F., Kunkel L.M. 2001). Významné byly také první roky 80. let 20. století, kdy byla vyvinuta prenatální diagnostika pro tuto nemoc (3. Davies K.E. 1997).

S rostoucími znalostmi o Duchenneově muskulární dystrofii a rapidně se zdokonalující lékařskou péčí se zlepšuje i prognóza pro takto nemocné chlapce. Průměrný věk úmrtí v 60. letech 20. století byl 14,4 roků. Používání dýchacích přístrojů pro umožnění plicní ventilace prodloužilo tento věk od 90. let 20. století na 25,3 let. Kardiomyopatie prokazatelně tento věk úmrtí snižuje. Zlepšování zdravotní péče však v průběhu let zvyšuje šance na přežití pacienta do věku 25 let z 0% v 60. letech, 4% v 70. letech, 12% v 80. letech až k 53% v letech 90 (4. Eagle M. et. al. 2002).

V současné době se všechny snahy upínají k objevení účinné léčby pro toto onemocnění.

6. Možnosti léčby pacientů s DMD

6.1. Současné možnosti

V současné době není ještě možné Duchenneovu muskulární dystrofii plně vyléčit, avšak existuje mnoho možností, jak nemocným zkvalitnit či prodloužit život.

V posledních 15 – 20 letech hraje významnou roli sledování „rizikových“ rodin a prenatální diagnostika. Pomocí kombinace molekulárně genetických a genealogických metod je možno určit riziko přenašečství nemoci matkou a v případě pozitivního výsledku vyšetřit i nenarozený plod. Nejčastěji se při prenatální diagnostice využívá biopsie choria či amniocentéza. To dává potom rodičům možnost rozhodnout, zda si chtějí případné nemocné dítě ponechat či nikoliv (8. Kuklík M. 2005).

Léčba pro pacienty s Duchenneovou muskulární dystrofií představuje dlouhodobou kortikosteroidovou terapii, která zpomaluje postupující svalovou slabost. Přesto u mnoha nemocných chlapců může tato léčba vést k přibírání na váze, imunosupresi, intoleranci glukózy a dalším nežádoucím efektům (11. Nereo N.E. et. al. 2003).

Další velice prospěšnou možností terapie je denní cvičení a protahování svalů. Je třeba protahovat oblast Achillovy šlachy, podkolenní šlachy a svalstvo kyčlí. Achillova šlacha se téměř vždy zkracuje, čímž dochází k již zmíněné chůzi po špičkách. Jak degenerace postupuje, dítě častěji sedí, čímž se zkracuje podkolenní šlacha. Tuto oblast je též nutné protahovat, aby se prodloužila možnost chůze a tím se udržel lepší stav dítěte. Při sezení má dítě kolena pokrčená od sebe, což ukazuje na zkrácené svalstvo kyčlí, které také ovlivňuje chůzi. Je doporučováno použití dlah a ortéz. V dětství též může pomoci k prodloužení šlach i chirurgický zákrok.

Dobrou cestou jak udržet svaly pružné bez působení přímého tlaku je též cvičení ve vodě (balneoterapie) a plavecký výcvik. Vznášení těla ve vodě pomáhá předcházet svalovému napětí a možnému zranění. Stejně tak důležitý je i přínos pro dýchací funkci.

Dále může nemocným s Duchenneovou muskulární dystrofií pomoci i jízda na koni (hippoterapie), při níž dochází k zapojení těch svalů, které normálně na zemi nejsou chlapci schopni využívat (www.parentproject.cz/description/description.htm).

6.2. Testované možnosti léčby a vyhlídky do budoucna

Od roku 1988, kdy byl identifikován gen pro Duchenneovu muskulární dystrofii se výzkum molekulární podstaty tohoto onemocnění posunul rapidně dopředu. Jen objev proteinu dystrofinu, produktu výše zmíněného genu, vedl k určení dalších proteinů asociovaných s dystrofinem a postupně též k rozpoznání dalších typů muskulárních dystrofií způsobených defektem v některém ze sarcoglykanových genů. Od té doby se všechny snahy upínají k objevu účinné léčby (20. Takeda S., Miyagoe-Suzuki Y. 2001).

Při výzkumu efektní léčby napomáhá studium nemoci na zvířecích modelech. Pro tento účel se využívají *mdx* myši, které mají bodovou mutaci v genu vedoucí k předčasné terminaci translace a produkci nestabilního proteinu, zlatí retrievři a beaglové.

Nadějnou se jeví býti terapie pomocí virových vektorů, jako jsou adeno-asociované virové vektory nebo lentivirové vektory, které by do buňky přenesly nepoškozený gen pro protein dystrofin. Nicméně, dystrofinová cDNA je příliš velká na to, aby mohla být do těchto vektorů vložena (její velikost je 14 kb, přičemž velikost kódujícího regionu je 11,2 kb). Řešením se zdá být rozdělení této cDNA na malé dystrofinové cDNA o velikosti kolem 5kb, což je přibližně maximální množství cizorodé DNA, kterou je vektor schopen pojmout, aby zůstal plně funkční (20. Takeda S. Miyagoe-Suzuki Y. 2001, 14. Odom G.L. et. al. 2007). Dalším problémem je imunitní odpověď organismu proti těmto vektorům. Když byl rekombinantní adenovirus injektován *mdx* myši během neonatální periody, imunitní reakce proti němu neproběhla. Ovšem během dospělého stádia vyvolal silnou imunitní reakci (19. Takeda S. 1997). Nicméně pokrok v tomto způsobu léčby stále pokračuje.

Další studovanou možností léčby Duchenneovy muskulární dystrofie je oprava poškozeného genu. Ta se může provádět pomocí krátkých fragmentů nebo chiméraplastů (dvojřetězcových RNA – DNA oligonukleotidů), které jsou navrženy tak, aby obsahovaly správný nukleotid a pomocí homologní rekombinace opravovaly mutace. Úspěšná léčba všech potřebných svalů je však zatím otázkou budoucnosti. Podobnou metodou je i „přeskakování“ exonů, které obsahují stop kodóny. Tento postup potom vede k produkci sice kratšího, ale částečně funkčního proteinu dystrofinu, jako je tomu v případě Beckerovy muskulární dystrofie. Dociluje se tím tedy konverze

velice závažné Duchenneovy formy dystrofie na její méně závažnou Beckerovu formu (12. Nowak K.J., Davies K.E. 2004).

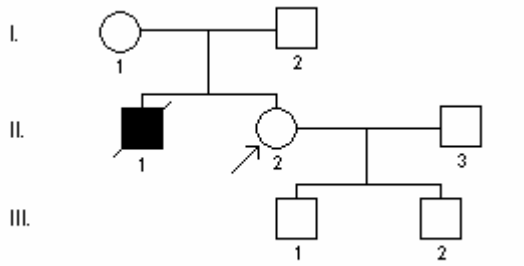
Spektrinová rodina proteinů zahrnuje dystrofin, utrofin, DRP2 a dystrobrevin. Mezi proteinem dystrofinem a utrofinem existuje velký stupeň podobnosti nejen na úrovni proteinů, ale i na úrovni genů. Stejně jako dystrofin, i utrofin je kódován velkým množstvím malých exonů pokrývajících asi 1 Mb genomu. Transkripce též probíhá z několika různých promotorů a vzniká zde několik izoforem. V kosterním svalstvu je utrofin detekovatelný v časném fetálním stádiu pod sarcolemální membránou, kde je během vývoje postupně nahrazován dystrofinem. Toto vede k názoru, že utrofin by mohl být neonatální formou dystrofinu. Proto existuje možnost, že ve svalových vláknech, které z důvodu onemocnění Duchenneovou muskulární dystrofií neobsahují žádný dystrofin, by mohl převzít jeho funkci (14. Odom G.L. et. al. 2007)

Během počátečních stádií Duchenneovy muskulární dystrofie je regenerační schopnost svalů poměrně normální a fúze myoblastů nebo satelitních buněk vede k formování nových svalových vláken. Jak ale nemoc postupuje, dochází k vyčerpání satelitních buněk a svalová vlákna jsou nahrazována vazivovou tkání. Proto se uvažuje o možnosti, že transplantace normálních nebo geneticky upravených myogenních a satelitních buněk nebo kmenových buněk, by mohla být použita jako účinná terapie (12. Nowak K.J., Davies K.E. 2004).

7. Rodokmeny a vyšetření rodin s DMD v příbuzenstvu

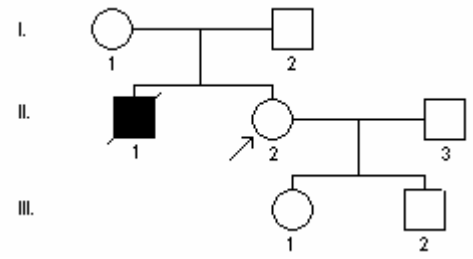
V rámci své bakalářské práce jsem se zabývala rodokmeny třech rodin, v jejichž příbuzenstvu byl zaznamenán výskyt Duchenneovy muskulární dystrofie.

Rodokmen č.1:



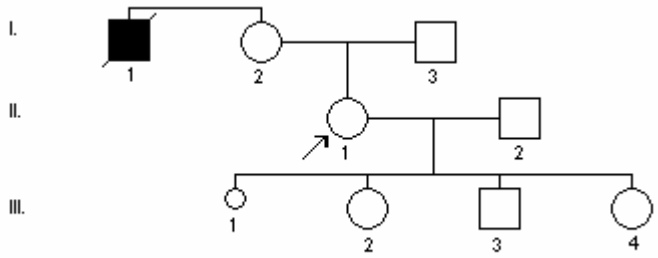
Bratr probandky (II:1) zemřel s diagnózou kardiomyopatie při onemocnění Duchenneovou muskulární dystrofií a ona je proto suspektní přenašečkou tohoto onemocnění stejně tak, jako její matka (I:1). Další výskyt myopatií nebyl v rodině zaznamenán. Sama probandka (II:2) je sledována v genetické ambulanci od roku 1995. Podstoupila EKG a echokardiografii s negativními nálezy a přenašečtství tedy nebylo prokázáno. Při prvním plánovaném těhotenství pacientka též podstoupila odběr k sekvenaci nukleových kyselin, který z komparativních důvodů podstoupila i její matka, otec a manžel. Výsledek byl opět negativní, nicméně zůstává zbytkové riziko pro možnost přenašečství. Probandce bylo dále doporučeno podstoupit prenatální diagnostiku s určením pohlaví a v případě zjištění rizikového pohlaví, tedy mužského, i následnou molekulární diagnostiku. Pacientka porodila dva syny (III:1 a III:2). První se narodil v roce 2000 a bylo u něho vyšetřeno 18 exonů, přičemž delece nebyla prokázána. Druhý syn se narodil v roce 2005 a pomocí haplotypové analýzy u něho byla zjištěna část rizikového haplotypu.

Rodokmen č. 2:



Stejně jako v předchozím případě, i v tomto rodokmenu zemřel bratr probandky (II:1) na kardiorespirační selhání ve věku 16 let při onemocnění Duchenneovou muskulární dystrofií. Ta u něho byla ověřena pomocí molekulárně-genetických metod a histologickým vyšetřením, které prokázalo fibrózní tkáň a tukovou atrofii. Další výskyt tohoto onemocnění v rodině nebyl prokázán. Probandka (II:2) byla též vyšetřena molekulárně-genetickými metodami – nepřímou diagnostikou pomocí markerových genů, přenašečství se však neprokázalo. Nicméně zůstává dále zbytkové riziko a předpoklad, že by pacientka mohla být gonadální mozaikou pro Duchenneovu muskulární dystrofii. Později pacientka podstoupila též ultrasonografické vyšetření čtyřhlavého svalu stehenního opět s negativním výsledkem. Probandka prodělala dvě těhotenství zakončená porodem dcery a syna. Při prvním těhotenství v roce 1990 podstoupila amniocentézu a porodila zdravou dceru (III:1), která byla též vyšetřena na přenašečství Ducheneovy muskulární dystrofie s negativním výsledkem. Při druhém těhotenství v roce 2005 byla též provedena amniocentéza a to nejen z důvodu rizika přenašečství, ale též kvůli hraničnímu věku 35 – 36 let v době tohoto těhotenství. Výsledky plodu mužského pohlaví (III:2) byly bez známek aberace.

Rodokmen č. 3:



V rodokmenu číslo 3 došlo k úmrtí strýce probandky (I:1), tedy bratra její matky na Duchenneovu muskulární dystrofii. Probandka (II:1) je tedy suspektní přenašečkou tohoto onemocnění. Přenašečství však nebylo stávajícími molekulárně-genetickými metodami potvrzeno. Pacientka prodělala čtyři těhotenství. Při prvním těhotenství v roce 1990 byla provedena biopsie choria s výsledkem 46,XX, v 17. týdnu těhotenství však došlo ke spontánnímu abortu plodu ženského pohlaví (III:1), pravděpodobně z důvodu placentární insuficience. Z druhého těhotenství v roce 1992 se narodila zdravá dcera(III:2), která nese zbytkové riziko přenašečství dle genealogické logiky. Přenašečství však ani u ní nebylo prokázáno. Při dalším těhotenství v roce 2000 byla opět provedena prenatální diagnostika pomocí biopsie choria a byl zjištěn plod

mužského pohlaví (III:3). Dále bylo provedeno molekulárně-genetické vyšetření. Haplotypová analýza se pro danou rodinu ukázala býti neinformativní. Dále bylo uskutečněno PCR vyšetření kultivovaných buněk plodu v 18 exonech. Přímá diagnostika však neprokázala žádnou mutaci delečního charakteru související s Duchenneovou muskulární dystrofií. U čtvrtého těhotenství v roce 2006 byla opět provedena biopsie choria a pomocí molekulárně-genetického vyšetření byla zjišťována přítomnost chromozomu Y. Ta se ukázala býti negativní a jedná se tedy o plod ženského pohlaví (III:4). Následné cytogenetické vyšetření prokázalo normální ženský karyotyp 46,XX.

8. Závěr

Touto prací jsem chtěla upozornit na závažnost geneticky podmíněných onemocnění a to hlavně Duchenneovy muskulární dystrofie a zároveň poukázat na to, jak velký pokrok byl v poznávání tohoto onemocnění doposavad učiněn.

Od roku 1988 kdy byl objeven gen podmiňující toto onemocnění a následně i jeho proteinový produkt, se naše znalosti o Duchenneově muskulární dystrofii posunuly rapidně kupředu. Přestože onemocnění samotné bylo popsáno již kolem roku 1850, bez znalosti jeho molekulárního pozadí nebylo snadné určit adekvátní léčbu. Nyní je již navrženo několik možných terapií, které se jeví býti nadějí do budoucna pro pacienty s touto nemocí.

Věk, jehož se tito pacienti dožívají se stále zvyšuje a díky zlepšující se lékařské péči se zvyšuje i kvalita jejich života. Výrazně tomu pomohlo i využívání dýchacích přístrojů. Nicméně, i přes veškeré snahy stále nebyla objevena účinná léčba pro toto onemocnění. Duchenneova muskulární dystrofie tedy stále zůstává velice závažným smrtelným onemocněním s velice rychlým postupem.

Seznam použité literatury:

1. BASSET, O., BOITTIN, F.X., COGNARD, CH., CONSTANTIN, B., RUEGG, T., Bcl-2 overexpression prevents calcium overload and subsequent apoptosis in dystrophic myotubes. *Biochem J.* 2006, April 15, no. 395(Pt 2): 267–276.

2. BROWN, R.H. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. *Annu Rev Med.* 1997, no. 48: 457-466.

3. DAVIES, K.E. Challenges in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 1997, no. 7(8): 482-486.

4. EAGLE, M., BAUDOUIN, S.V., CHANDLER, C., GIDDINGS, D.R., BULLOCK, R., BUSHBY, K. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home noctural ventilation. *Neuromuscul Disord.* 2002, no. 12(10): 926-929.

5. FINSTERER, J., STÖLLBERGER, C. The heart in human dystrophinopathies. *Cardiology.* 2003, no. 99(1): 1-19.

6. HINTON, V.J., FEE, R.J., GOLDSTEIN, E.M., DE VIVO, D.C. Verbal and memory skills in males with Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* 2007, no. 49(2): 123-128.

7. KOENIG, M., MONACO, A.P., KUNKEL, L.M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 1988, Apr 22, no. 53(2): 219-228.

8. KUKLÍK, M. Duchenneova myopatie a její prenatální diagnostika. *Pohybové ústrojí : Pokroky ve výzkumu, diagnostice a terapii*. 2005, roč. 12, č. 1-2 Supplementum. s. 30-33.

9. MENHART, N. Hybrid spectrin type repeats produced by exon-skipping in dystrophin. *Biochim Biophys Acta*. 2006, no. 1764(6): 993–999.

10. MUNTONI, F., DI LENARDA, A., PORCU, M., SINAGRA, G., MATEDDU, A., MARROSU, G., FERLINI, A., CAU, M., MILASIN, J., MELIS, M.A., MARROSU, M.G., CIANCHETTI, C., SANNA, A., FALASCHI, A., CAMERINI, F., GIACCA, M., MESTONI, L. Dystrophin gene abnormalities in two pacients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Heart.* 1997, no. 78: 608-612.

11. NEREO, N.E., FEE, R.J., HINTON, V.J. Parental stress in mothers of boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Psychol.* 2003, no. 28(7): 473-484.

12. NOWAK, K.J., DAVIES, K.E. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.* 2004, no. 5(9): 872-876.

13. O´BRIEN, K.F., KUNKEL, L.M. Dystrophin and muscular dystrophy: past, present and future. *Mol Genet Metab.* 2001, no. 74(1-2): 75-88.

14. ODOM, G.L., GREGOREVIC, P., CHAMBERLAIN, J.S. Viral-mediated gene therapy for the muscular dystrophies: Successes, limitation and recent advances. *Biochim Biophys Acta.* 2007, no. 1772(2): 243-262.

15. PRIOR, T.W., BRIDGEMAN, S.J. Experience and strategy for the molecular testing of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Diagn.* 2005, no. 7(3): 317-326.

16. SADOULET-PUCCIO, H.M., KUNKEL, L.M. Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.* 1996, vol. 6, s. 25-35.

17. SCHNEIDERKA, P., Laboratorní markery srdečních chorob. *Klin. Biochem. Metab.* 2006, roč. 14 (35), č. 3. s. 161-167.

18. SIRONI, M., CAGLIANI, R., POZZOLI, U., BARDONI, A., COMI, G.P., GIORDA, R., BRESOLIN, N. The dystrophin gene as alternatively spliced throughout its coding sequence. *FEBS Lett*. 2002, vol. 517, s. 163-166.

19. TAKEDA, S. Gene therapy to muscle diseases: perspective and issues on basic research. *Nippon Rinsho.* 1997, no. 55(12): 3114-3119.

20. TAKEDA, S., MIYAGOE-SUZUKI, Y. Gene therapy for muscular dystrophies: current status and future prospects. *BioDrugs.* 2001, no. 15(10): 635-644.

21. YUGETA, N., URASAWA, N., FUJII, Y., YOSHIMURA, M., YUASA, K., WADA, M.R., NAKURA, M., SHIMATSU, Y., TOMOHIRO, M., TAKAHASHI, A., MACHIDA, N., WAKAO, Y., NAKAMURA, A., TAKEDA, S. Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan ($CXMD_J$): electrocardiographic, echocardiographic and morphologic studies. *BMC Cardiovasc Disord.* 2006, no. 6: 47.

Internetové zdroje:

www.sanger.ac.uk/Info/Press/2005/050316-numbers.shtml

www.sanger.ac.uk/Info/Press/2005/050316.shtml

www.parentproject.cz/description/description.htm