

**INSTYTUT MATKI I DZIECKA  
ZAKŁAD GENETYKI MEDYCZNEJ**

Kierownik: prof. dr hab. med. Tadeusz Mazurczak  
Ul. Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa  
Tel. (022) 632-96-57, Tel/fax : (022) 632 62 24  
e-mail: genetyka@imid.med.pl

---

TADEUSZ MAZURCZAK, IRENA HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ,  
JACEK ZAREMBA, MARIA JĘDRZEJOWSKA,  
WOJCIECH WISZNIEWSKI, JANUSZ ZIMOWSKI,  
ELŻBIETA FIDZIAŃSKA, JERZY BAL

**ZASTOSOWANIE TECHNIK BIOLOGII  
MOLEKULARNEJ W DIAGNOSTYCE RDZENIOWEGO  
ZANIKU MIĘŚNI  
(SMA)**

EKSPERTYZA NAUKOWA  
WYKONANA NA ZLECENIE MINISTERSTWA ZDROWIA

---

**Warszawa 2003**

## *SPIS TREŚCI*

1. WSTĘP .....	3
2. KLASYFIKACJA .....	3
3. OBRAZ KLINICZNY .....	5
4. BADANIA DIAGNOSTYCZNE, LECZENIE I REHABILITACJA .....	8
5. PODSTAWY MOLEKULARNE SMA .....	9
5.1. Gen <i>SMN1</i> .....	11
5.2. Inne geny regionu SMA .....	11
6. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA .....	12
6.1. Identyfikacja delecji eksonu 7 .....	12
6.2. Identyfikacja mutacji punktowych .....	13
6.3. Badanie nosicielstwa delecji eksonu 7 genu <i>SMN1</i> .....	14
7. CHARAKTERYSTYKA POLSKIEJ POPULACJI SMA .....	15
8. PATOLOGIA MOLEKULARNA .....	18
9. ZAKOŃCZENIE .....	19
10. SCHEMAT POSTĘPOWANIA W DIAGNOSTYCE MOLEKULARNEJ SMA.....	21
11. UZUPEŁNIENIA .....	22
11.1. Pozostałe postaci rdzeniowego zaniku mięśni .....	23
11.2. Wybrane pozycje piśmiennictwa IMDiK PAN, IPiN oraz IMiD z zakresu SMA .....	24
11.3. Pobieranie i przesłanie materiału na badanie genetyczne .....	25
11.4. Ośrodki wykonujące diagnostykę w kierunku SMA .....	25
11.5. Sekwencjonowanie genu <i>SMN1</i> .....	25-26
11.6. Warunki identyfikacji delecji eksonu 7 genu <i>SMN1</i> .....	26

## 1. WSTĘP

Rdzeniowy zanik mięśniowy (ang. spinal muscular atrophy, SMA) jest heterogenną grupą dziedzicznych chorób nerwowo-mięśniowych, w których dochodzi do utraty neuronów ruchowych rdzenia kręgowego. Najczęstszą postacią w tej grupie chorób jest dziecięcy ksobny rdzeniowy zanik mięśniowy, dziedziczony jako cecha autosomalna recesywna. Częstość występowania choroby szacuje się na 1 na 7-10 tysięcy urodzeń, co odpowiada częstości nosicielstwa mutacji genowych 1 na 42 do 1 na 50 osób. Po mukowiscydozie stanowi najczęstszą przyczynę zgonów dzieci z powodów chorób uwarunkowanych autosomalnie recesywnie. Utrata motoneuronów rdzenia kręgowego prowadzi w konsekwencji do postępującego niedowładu i zaniku mięśni. W ostatnich latach wykazano, że w około 95% przypadków za wystąpienie choroby odpowiedzialne są mutacje genu *SMN* (ang. survival of motoneuron), a ściślej kopii telomerowej tego genu, określanej jako *SMN1* lub *SMN<sup>tel</sup>*. Gen ten zlokalizowany jest w tak zwanym *locus* SMA umiejscowionym na długim ramieniu chromosomu 5 (5q13). Mimo wielu wątpliwości w odniesieniu do patomechanizmu choroby analiza DNA stwarza możliwość weryfikacji rozpoznania klinicznego SMA, a także diagnostyki prenatalnej.

## 2. KLASYFIKACJA

Poszczególne postacie SMA manifestują się podobnymi objawami klinicznymi, ale o różnym stopniu nasilenia, rozkładzie zaników mięśni, sposobie dziedziczenia oraz podłożu molekularnym. Najczęstszy w tej grupie chorób, jest ksobny dziecięcy rdzeniowy zanik mięśni. Pozostałe postacie występują rzadko.

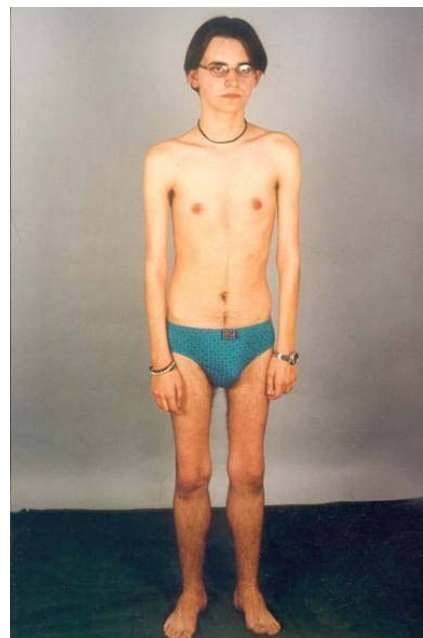
Rycina 1  
SMA 1 (choroba Werdniga-Hoffmanna) - początek 0-6 miesiąc życia



Obraz kliniczny ksobnego dziecięcego i młodzieńczego rdzeniowego zaniku mięśni charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem początku i nasilenia objawów. Zgodnie z ustaleniami Międzynarodowego Konsorcjum SMA (1991) przyjmuje się podział choroby na trzy podstawowe formy kliniczne (Tab. 1, Ryc. 1-3)



Rycina 2  
SMA 2 (postać pośrednia) - początek 6-18  
miesiąc życia



Rycina 3  
SMA 3 (choroba Kugelberga  
-Welander) - początek  
powyżej 18 miesiąca życia

Dość powszechnie stosuje się również klasyfikację wg Zerres'a, w której formę łagodną (SMA 3) dzieli się na dwie podgrupy: z zachorowaniem poniżej 3 rż (SMA3a) i zachorowaniem powyżej 3 rż (SMA 3b). Podział ten wiąże się z obserwacją, że w grupie dzieci, u których objawy kliniczne występują poniżej 3 roku życia, zdecydowanie wcześniej dochodzi do unieruchomienia.

Część autorów wyróżnia także formę ostrą i przewlekłą choroby Werdniga-Hoffmanna (1a i 1b). W postaci przewlekłej (1b) dzieci przeżywają powyżej pięciu lat.

Dość trudna jest do ustalenia górna granica wieku zachorowania w formie łagodnej. Według jednych autorów jest to 20 rok życia, według innych - 30. Należy podkreślić, że przypadki zachorowania powyżej 20 roku życia należą do rzadkości.

Jak wspomniano powyżej, oprócz najczęstszej dziecięcej i młodzieńczej formy dosiebnej SMA występują inne postacie rdzeniowego zaniku mięśni (tabela 5).

W praktyce pediatrycznej warty zapamiętania jest odsiebny rdzeniowy zanik mięśni. W przeciwieństwie do dziecięcej formy dosiebnej osłabienie i zanik dotyczą głównie mięśni odsiebnych. Molekularnie jest to heterogenna grupa chorób, z reguły o dość łagodnym przebiegu. Wyjątek stanowi postać przeponowa, manifestująca się niewydolnością oddechową w okresie noworodkowym.

Wśród postaci, w których objawy kliniczne pojawiają się w wieku dojrzałym na uwagę zasługuje rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (choroba Kennedy'ego, ang. SBMA – spino-bulbar muscular atrophy). Poza klasycznymi objawami dosiebnego osłabienia siły mięśniowej w SBMA mogą wystąpić objawy opuszkowe oraz szereg objawów związanych z dysfunkcją receptora androgenowego (ginekomastia, niepłodność). Postać ta bywa błędnie rozpoznawana jako stwardnienie zanikowe boczne (SLA).

Pozostałe postacie występują bardzo rzadko, często są to pojedyncze opisy w literaturze (Uzupełnienie 11.1).

Tabela 1

Dosiebny dziecięcy i młodzieńczy rdzeniowy zanik mięśni - klasyfikacja kliniczna

Typ SMA	Początek	Rozwój ruchowy dziecka	Okres przeżycia
SMA 1 (postać ostra, choroba Werdniga-Hoffmanna)	0-6 mż	Nigdy nie siada samodzielnie	2-4 lata, w około 10% kilkunastoletni
SMA 2 (postać pośrednia)	<18mż	Siada samodzielnie, nie chodzi	zależny od powikłań, często wieloletni
SMA 3 (postać łagodna, choroba Kugelberga-Welander)	>18mż	Chodzi bez pomocy	zależny od powikłań, często przeciętny jak w populacji ogólnej

### 3. OBRAZ KLINICZNY

Obraz kliniczny rdzeniowego zaniku mięśni jest bardzo zróżnicowany pod względem początku i stopnia nasilenia objawów. Pewne objawy występują jednak we wszystkich formach SMA, niezależnie od wieku i zaawansowania choroby (Tabela 2). Nigdy natomiast nie stwierdza się zaburzeń czucia, objawów piramidowych i mózdkowych.

Tabela 2.

Objawy kliniczne SMA

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Postępujące, symetryczne osłabienie mięśni, bardziej nasilone dosiebnie; kończyny dolne są bardziej zajęte niż kończyny górne</li><li>• Zaoszczędzenie mięśni przepony oraz mięśni zewnętrznych gałki ocznej</li><li>• Wiotkie napięcie mięśniowe</li><li>• Osłabienie lub brak odruchów głębokich</li><li>• Drżenie palców</li><li>• Prawidłowy rozwój umysłowy</li></ul> |
|--|

W najcięższej postaci SMA (choroba Werdniga-Hoffmanna) objawy kliniczne występują już w okresie życia płodowego (osłabienie ruchów płodu). Po urodzeniu noworodki otrzymują zwykle niską punktację w skali Apgar, często wykazując ciężką niewydolność oddechową. W badaniu stwierdza się uogólnioną wiotkość, porażenie czterokończynowe, brak odruchów fizjologicznych. Kończyny dolne odwiedzone są w stawach biodrowych, zgięte w stawach kolanowych - leżą w "pozycji żaby", nie stawiają oporu przy prostowaniu. Ruchy dowolne bywają ograniczone do ruchów dłoni i stóp. Brzuch jest wzdęty, przepona uniesiona wysoko, porażone mięśnie międzyżebrowe są nieefektywne. Dzieci te płaczą cicho, zwykle mają trudności w ssaniu i połykaniu. Zalegająca wydzielina oraz porażenie mięśni międzyżebrowych usposabiają do ciężkich infekcji dolnych dróg oddechowych. Rokowanie w tej grupie chorych jest złe.

W nieco łagodniejszym wariantcie tej postaci początek bywa trudny do uchwycenia. Po 2-3 miesiącach pozornego zdrowia, rodziców i otoczenie zaczyna niepokoić brak postępu w rozwoju ruchowym dziecka. Znaczne osłabienie mięśni osiowych powoduje, że niemowlę nie może unieść głowy znad podłoża, nie może przekręcać się z pleców na brzuch, nie siada. Przy podciąganiu za ręce do pozycji siedzącej głowa opada do tyłu. Dziecko posadzone przyjmuje tzw. „pozycję scyzoryka”, położone na plecach – „pozycję żaby”.

Czasem początek choroby jest ostry. Zdarza się, że rozwijające się zupełnie prawidłowo niemowlę z dnia na dzień traci aktywność ruchową, staje się wiotkie. Zwykle ma to związek czasowy z infekcją dróg oddechowych bądź przebytym szczepieniem.

Duża skłonność do nawracających infekcji dróg oddechowych, a zwłaszcza zapaleń płuc powoduje, że dzieci z SMA 1 giną z reguły w pierwszych 2-4 latach życia. Dzieci, u których objawy stwierdzane są od urodzenia, umierają zwykle wcześniej. Część pacjentów (około 10%), u których objawy choroby występują około 3-6 mż, przeżywa kilka, a nawet

kilkanaście lat. Sprawność ruchowa nie ulega poprawie, z czasem dochodzi do znacznego zaniku mięśni. Szybko rozwijają się przykurcze stawowe i skrzywienie kręgosłupa, stąd konieczność wczesnego zaopatrzenia ortopedycznego i rehabilitacji.

Rozwój ruchowy dzieci z SMA 2 w pierwszym półroczu życia z reguły nie odbiega od normy. Wkrótce okazuje się, że nie mogą one samodzielnie stanąć i unieść ciężaru ciała, nie potrafią chodzić. Z czasem zaznacza się zanik mięśni. Wcześnie i szybko rozwijają się przykurcze stawowe : w stawach biodrowych, kolanowych oraz przykurcz ścięgien Achillesa. Najgroźniejszym powikłaniem, niejednokrotnie decydującym o życiu, jest skrzywienie kręgosłupa. Osłabienie mięśni osiowych i unieruchomienie w pozycji siedzącej na wiele godzin doprowadzają do szybko postępującej skoliozy i deformacji klatki piersiowej. Powikłania oddechowe, związane z osłabieniem mięśni międzyżebrowych i zaburzeniem stosunków anatomicznych narządów klatki piersiowej, są główną przyczyną zgonów w tej grupie chorych. Z tego względu tak istotna jest rehabilitacja i wczesne wkroczenie z zaopatrzeniem ortopedycznym. Długość przeżycia chorych z SMA 2 wynosi zwykle kilkanaście lat i wydłuża się wraz z rozwojem możliwości zapobiegania i leczenia powikłań.

Łagodna postać rdzeniowego zaniku mięśni- SMA 3 (choroba Kugelberga-Welander) jest najbardziej zróżnicowaną pod względem wieku wystąpienia objawów klinicznych. Zaliczane są tu dzieci i młodzież, których rozwój ruchowy w pierwszym roku życia nie odbiega od normy, o czasie zaczynają siadać i chodzić. W pewnym wieku (od 18 mż do 20-30 rż) pojawia się osłabienie, dotyczące przede wszystkim mięśni obręczy biodrowej. Pierwsze dostrzegane trudności dotyczą zwykle wchodzenia po schodach, wspinania się na stopień autobusu, wstawania z podłogi czy fotela.

W grupie tej wyróżnia się dwie formy: ostrzejszą 3a i łagodniejszą 3b. W grupie 3a objawy można wychwycić bardzo wcześnie. Dzieci te często od początku chodzą źle (chód kaczkowaty), przewracają się, wstają z pomocą opierając się o przedmioty. Wcześnie w porównaniu z grupą 3b tracą zdolność samodzielnego chodzenia. W grupie 3b pierwsze objawy mogą być bardzo dyskretne i długo nie zauważane przez chorego i otoczenie. Dopiero wyraźne osłabienie przy wykonywaniu codziennych czynności skłania ich do szukania pomocy.

U chorych obserwuje się drżenie palców, fibrylacje na języku, fascykulacje mięśni. Z czasem pojawia się zanik, dotyczący przede wszystkim mięśni dosiebnych. Może występować przerost łydek, podobnie jak w dystrofii Duchenne'a i Becker'a. Przebieg choroby jest powoli postępujący, czasem przez wiele lat stacjonarny. Pogorszenie sprawności zwykle wiąże się z unieruchomieniem (złamanie kończyny) lub infekcją, często dochodzi do niego w okresie dojrzewania, związanego z intensywnym wzrostem i zmianą masy ciała. W

grupie 3a chorzy zwykle przestają chodzić po kilku-kilkunastu latach, w grupie 3b zdolność chodzenia mogą zachować przez wiele lat. Rokowanie co do życia w obu grupach jest dobre. Jednak im wcześniej dochodzi do unieruchomienia, tym większe ryzyko skrzywień kręgosłupa i łączących się z tym powikłań oddechowych.

#### 4. BADANIA DIAGNOSTYCZNE, LECZENIE I REHABILITACJA

Podstawę rozpoznania rdzeniowego zaniku mięśni stanowią wyniki badań: elektromiograficznego, histopatologicznego mięśnia i molekularnego. Wyniki pozostałych badań są nieswoiste dla SMA i mogą być istotne jedynie w rozpoznaniu różnicowym.

Obraz elektrofizjologiczny wskazuje na uszkodzenie neuronu obwodowego na poziomie rogów przednich rdzenia kręgowego. Potencjały jednostki ruchowej są długie i wysokie. Zapis wysiłkowy jest zubożony. W postaci wczesnodziecięcej stwierdza się czynność spoczynkową pod postacią rytmicznych, spontanicznych wyładowań jednostki ruchowej o częstotliwości 5-15 Hz. W formach przewlekłych obserwuje się głównie facykulacje i długie potencjały odnerwienia. Szybkość przewodzenia ruchowego w postaciach przewlekłych jest prawidłowa bądź tylko bardzo nieznacznie zwolniona. Natomiast w ciężkiej wczesnodziecięcej formie szybkość przewodzenia bywa zwolniona.

Cechą charakterystyczną w obrazie histopatologicznym rdzeniowego zaniku mięśni jest obecność włókien małych, układających się w pęczki obok włókien o prawidłowej średnicy i włókien przerosłych. W postaci ostrej dominują włókna małe, okrągłe, z centralnym jądrem, dobrze zachowaną strukturą oraz włókna miotubopodobne. W postaci łagodnej częściej obserwuje się włókna przerosłe, z tendencją do fragmentacji oraz włókna zanikłe, o nieregularnych kształtach.

Inne badania dodatkowe obejmują ocenę aktywności kinazy kreatynowej, badanie elektroencefalograficzne (EEG) i tomografię komputerową. Poziom kinazy kreatynowej przeważnie jest prawidłowy, chociaż w formie łagodnej obserwuje się czasem wzrost aktywności. W postaciach wczesnodziecięcych badanie EEG wykazuje cechy opóźnionego dojrzewania.

Do chwili obecnej nie udało się opracować skutecznego leczenia przyczynowego SMA. Leczenie objawowe i zapobiegawcze pozostaje wciąż jedyną dostępną formą działania.

Głównym celem fizykoterapii jest zapobieganie powstawaniu przykurczy i skrzywień kręgosłupa, a w łagodniejszych formach – wydłużenie czasu samodzielnego chodzenia i samoobsługi.

Podstawowym problemem ortopedycznym pacjentów z SMA jest niemożność utrzymania pozycji siedzącej, skrzywienie kręgosłupa oraz przykurcze w stawach kończyn dolnych. W formach wczesnodziecięcych często obserwuje się zwichnięcie stawu biodrowego, jedno- lub obustronne. Leczenie ortopedyczne obejmuje zarówno metody zachowawcze (aparaty, gorsety ortopedyczne) jak i zabiegowe. Wskazane jest wczesne wdrażanie leczenia ortopedycznego, pozwalające na uniknięcie powikłań.

Najczęstszą przyczyną niewydolności oddechowej w SMA są infekcje układu oddechowego. Wymagają one intensywnej antybiotykoterapii i fizykoterapii. We wszystkich postaciach choroby od najmłodszych lat należy wprowadzać ćwiczenia oddechowe. W okresie ostrego pogorszenia wydolności oddechowej niejednokrotnie istnieją wskazania do intubacji pacjenta i prowadzenia oddechu wspomaganego.

W chwili obecnej nie ma skutecznego leczenia farmakologicznego. Duże nadzieje wiąże się z substancjami zwiększającymi ekspresję kopii centromerowej genu *SMN*. Prowadzone wcześniej liczne próby leczenia farmakologicznego (czynniki troficzne, leki przeciwpadaczkowe) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów.

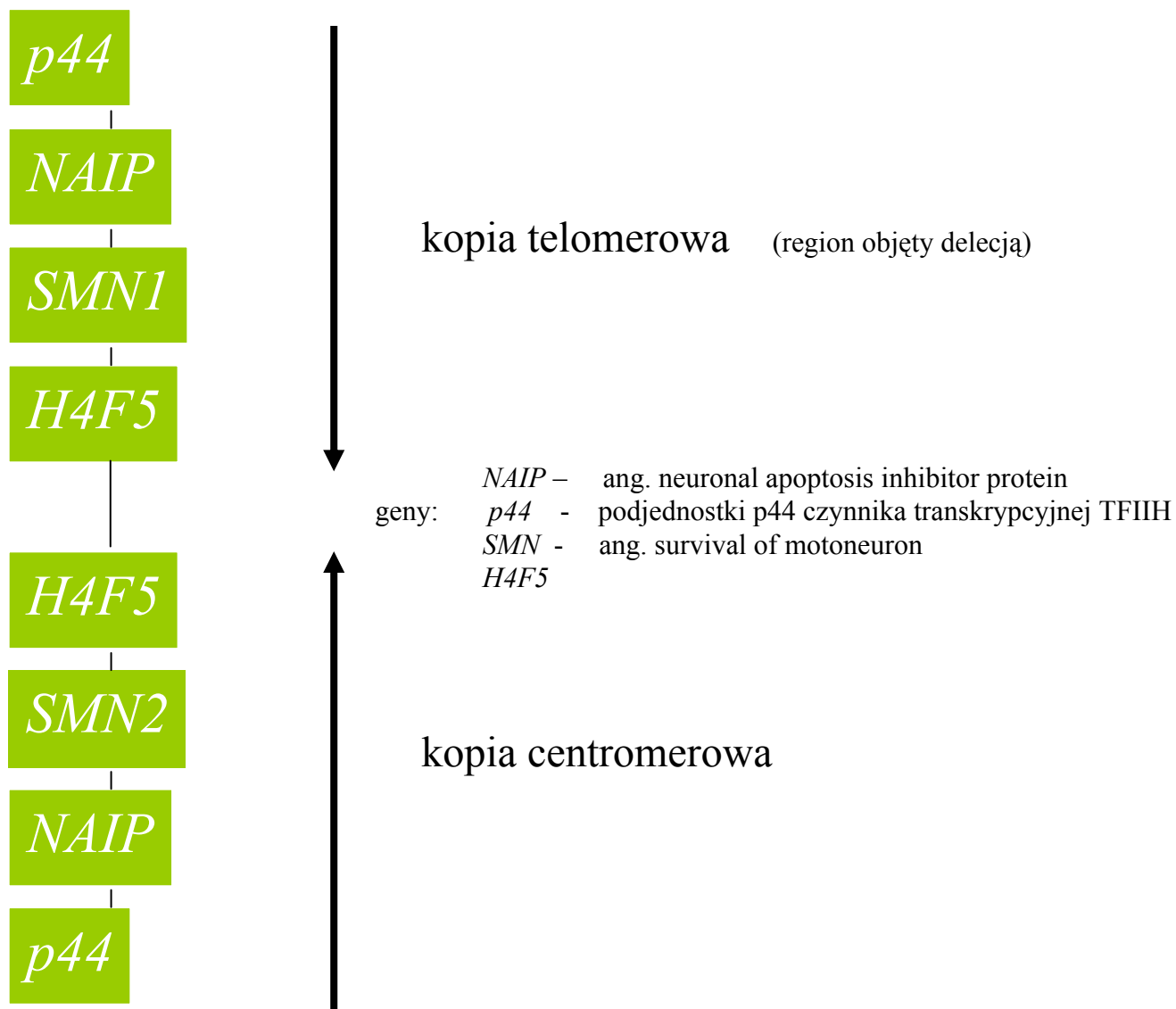
Dość powszechnie stosuje się średnie dawki kreatyny (3-5g) oraz L-karnityny, substancji istotnych w procesach energetycznych komórki mięśniowej. Istotną częścią opieki nad pacjentami z SMA jest właściwa dieta, dostosowana do potrzeb i wydatku energetycznego. Należy unikać nadwagi, dodatkowo obciążającej osłabiony aparat mięśniowy.

## 5. PODSTAWY MOLEKULARNE SMA

Opracowanie jednolitych kryteriów oceny klinicznej pacjentów dotkniętych SMA oraz rozwój technik genetycznych umożliwiły rozpoczęcie poszukiwania podłoża molekularnego odpowiedzialnego za wystąpienie choroby. W 1990 roku przy użyciu analizy sprzężeń markerów chromosomowych wszystkie trzy typy SMA zostały zmapowane na chromosomie 5q11.2-q13.2 co wskazywało, że są one chorobami allelicznymi. Dalsze badania oparte na mapowaniu fizycznym oraz na analizie wysoce polimorficznych markerów mikrosatelitarnych umożliwiły zawężenie badanego fragmentu do tzw. regionu SMA o wielkości około 1Mb. W późniejszych pracach wykazano u części pacjentów obecność delecji w tym regionie chromosomu dziedziczonych lub powstałych *de novo*. Region SMA charakteryzuje się występowaniem dwóch odwróconych względem siebie kopii tzw. elementów centromerowego ( $E^{cen}$ ) i telomerowego ( $E^{tel}$ ), każdy po około 500 kb (Ryc. 4). Każdy z tych elementów zawiera odpowiednio kopie genów: *SMN* (ang. survival of

motoneuron), *NAIP* (ang. neuronal apoptosis inhibitory protein) i *p44* (gen podjednostki p44 czynnika transkrypcyjnego TFIIH).

Cały region zawiera również wiele sekwencji powtórzonych, pseudogenów, retrotranspozonów, których obecność czyni go niestabilnym i uniemożliwia utworzenie zgodnej wersji mapy całego regionu.



Ryc.4 Schemat budowy regionu SMA

### 5.1.Gen *SMN1*

Z wymienionych genów szczególną rolę odgrywa gen *SMN1*, którego mutacje powszechnie uznawane są za czynnik odpowiedzialny za wystąpienie choroby.

W regionie SMA gen *SMN* reprezentowany przez dwie kopie: telomerową – *SMN1* (*SMN<sup>tel</sup>*) (uważaną za właściwy gen) oraz centromerową – *SMN2* (*SMN<sup>cen</sup>*) będącą niepełnowartościowym genem. Sekwencja obu genów jest jednak wysoce homologiczna. Na odcinku genu o długości 20 kb stwierdzono różnice w 5 pozycjach mające charakter substytucji. Każda z kopii zbudowana jest z 9 eksonów i ulega transkrypcji. Białkowy produkt genu centromerowego jest jednak niepełnowartościowy i ma obniżoną swoistą aktywność.

We wszystkich typach SMA (1-3) defekt molekularny polega na delecji eksonu 7 kopii telomerowej i jest odpowiedzialny za około 95% przypadków SMA. W pozostałych 5% przypadków wykazano występowanie mutacji o charakterze substytucji lub małych delecji, położonych w różnych częściach genu, zaburzających prawidłową ekspresję genu.

Delecje w obrębie kopii centromerowej nie wywołują objawów klinicznych i występują u około 5% zdrowej populacji.

Rola mutacji w genie *SMN1* w patogenezie choroby nie jest podważana, lecz mimo postępu osiągniętego w wyjaśnieniu podłoża molekularnego SMA nadal pozostaje wiele wątpliwości i niewiadomych, np. sporadyczne występowanie delecji obu kopii *SMN1* u haploidentycznego, ale asymptotycznego rodzeństwa (podważa to rolę *SMN1* w patogenezie choroby), częsty brak w SMA korelacji genotyp - fenotyp.

## 5.2. Inne geny regionu SMA

Pozostałym genom regionu SMA przypisuje się co najwyżej rolę w modulowaniu nasilenia objawów choroby. Przyjmuje się przy tym, że izolowane mutacje genów *NAIP* i *p44* nie są w stanie samodzielnie wywołać objawów. *NAIP* w regionie SMA występuje w dwóch kopiach, jednak kopia centromerowa, będąc pseudogenem, nie wykazuje aktywności. U 45% pacjentów z chorobą Werdniga-Hoffmanna wykazano brak kopii telomerowej (*NAIP<sup>tel</sup>*), zaś w postaciach łagodniejszych SMA delecje tego genu stwierdzono jedynie u 5-10% badanych. Produkt ekspresji *NAIP* wykazuje częściową homologię z białkami baculowirusów. Białka te są inhibitorami apoptozy i posiadają zdolność supresji tego procesu w komórkach ssaków w warunkach *in vitro*. Doniesienia na ten temat uczyniły *NAIP* atrakcyjnym kandydatem na gen, którego defekt determinowałby SMA. Częste występowanie uszkodzenia obu kopii *NAIP<sup>tel</sup>* w zdrowej populacji oraz współwystępowanie delecji genu *NAIP<sup>tel</sup>* z *SMN1* sugeruje jednak udział tego pierwszego jedynie w modulowaniu ostrości choroby. Niektórzy autorzy przypisują podobną rolę genowi kodującemu *p44*, podjednostkę czynnika transkrypcyjnego TFIIH. Udział genu *p44* w kształtowaniu fenotypu SMA nie został udowodniony i podobnie

jak w przypadku genu *NAIP*, obecność delecji jednej z kopii może wynikać jedynie z fizycznej bliskości z genem *SMN1*.

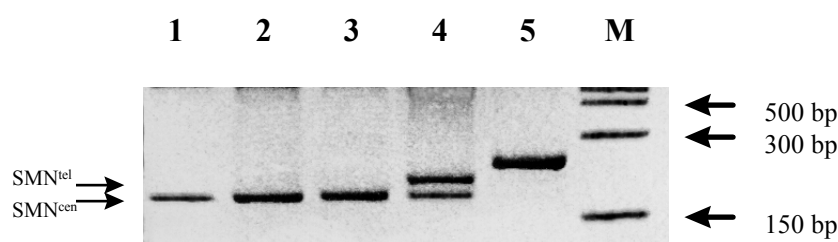
## 6. DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

Do badania wykorzystywany jest DNA otrzymywany z leukocytów krwi obwodowej osoby chorej. Alternatywnym materiałem używanym do izolacji DNA mogą być plamy krwi na bibułach używanych do noworodkowych testów przesiewowych, hodowle tkankowe, materiał użyty do badań histopatologicznych np. biopłaty mięśni.

Identyfikacja mutacji u pacjentów z SMA umożliwia weryfikację rozpoznania klinicznego jak też daje możliwość oferowania rodzinom diagnostyki prenatalnej w przypadku planowania ciąży, a w przyszłości może mieć znaczenie w przypadku podejmowania terapii genowej.

### 6.1 Identyfikacja delecji eksonu 7

Ponieważ u około 95% pacjentów z SMA wykazano brak eksonu 7 w obu allelach genu *SMN<sup>tel</sup>*, rutynowa diagnostyka molekularna SMA opiera się na sprawdzeniu u badanej osoby obecności tego eksonu. Pierwszym etapem analizy jest wielokrotne powielenie przy użyciu techniki PCR (ang. polymerase chain reaction) fragmentu genu *SMN*, w którym występuje ekson 7. Dzięki specjalnie zaprojektowanym starterom oraz różnicy w sekwencji między kopią centromerową, a telomerową genu, możliwe jest rozróżnienie produktów obu kopii (Ryc. 5).



Ryc. 5

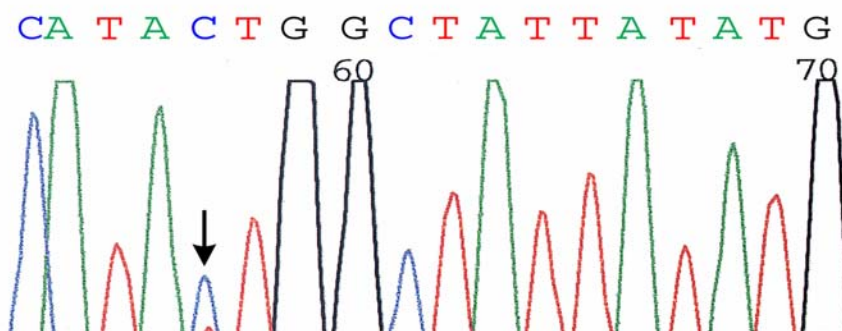
Wynik rozdziału w elektroforezie na żelu agarozowym produktów powielenia i trawienia enzymem restrykcyjnym Dra I eksonu 7 genu *SMN1*: 1-3 pacjenci SMA (widoczny jest jedynie fragment odpowiadający kopii centromerowej genu), 4 - osoba zdrowa (obecne są obie kopie genu), 5 - fragment nietrawiony, M - marker wielkości. (U nosiciela defektywnego allelu podobnie jak u osoby zdrowej widoczne są 2 prążki odpowiadające kopii telomerowej i centromerowej genu SMA). Porównaj Uzupełnienia 12.5

Tok analizy polegający na identyfikacji delecji eksonu 7 w kopii telomerowej *SMN1* stosowany jest również w diagnostyce prenatalnej. W takim przypadku często wykonywana jest dodatkowo analiza sekwencji mikrosatelitarnych, celem której jest wyłączenie ewentualnego zanieczyszczenia materiału badanego (trofoblastu) tkankami matki, co w efekcie mogłoby dać wynik fałszywie negatywny.

Badania prenatalne wykonuje się w rodzinach, w których potwierdzono rozpoznanie SMA na poziomie molekularnym możliwe jest wykonanie badań prenatalnych. Materiał pochodzi z komórek trofoblastu płodu pobranych przez ginekologa pod kontrolą USG. Biopsję wykonuje się w 10 – 12 tygodniu ciąży. Pobranie trofoblastu jest związane z 0,5-1% ryzykiem poronienia. Wynik badania molekularnego jest wydawany w kilka dni po wykonaniu biopsji. Do końca 2002 r wykonano w Polsce 15 molekularnych badań prenatalnych w rodzinach wysokiego ryzyka wystąpienia rdzeniowego zaniku mięśni.

## 6.2. Identyfikacja mutacji punktowych

Badanie molekularne wykrywające obecność delecji eksonu 7 genu *SMN1* traktowane jest obecnie jako badanie przesiewowe w kierunku SMA. Dzięki takiemu postępowaniu można uzyskać molekularną weryfikację rozpoznania u około 95% chorych, u których delecja eksonu 7 występuje w obu allelach genu *SMN1*. Jednak brak tej delecji nie wyklucza rozpoznania klinicznego choroby. Należy bowiem pamiętać, że około 5% chorych z SMA jest nosicielami mutacji punktowej, nie wykrywanej w rutynowym badaniu przesiewowym. W przypadkach spełniających kryteria Międzynarodowego Konsorcjum SMA, a nie wykazujących delecji eksonu 7 genu *SMN1*, istnieją wskazania do rozszerzenia diagnostyki molekularnej. Pierwszym etapem jest amplifikacja sekwencji kodujących genu *SMN1* (eksony 1, 2A, 2B, 3, 4, 5, 6, 7), następnie analiza SSCP i analiza sekwencyjna (Ryc. 6) (Uzupełnienia 11.5)



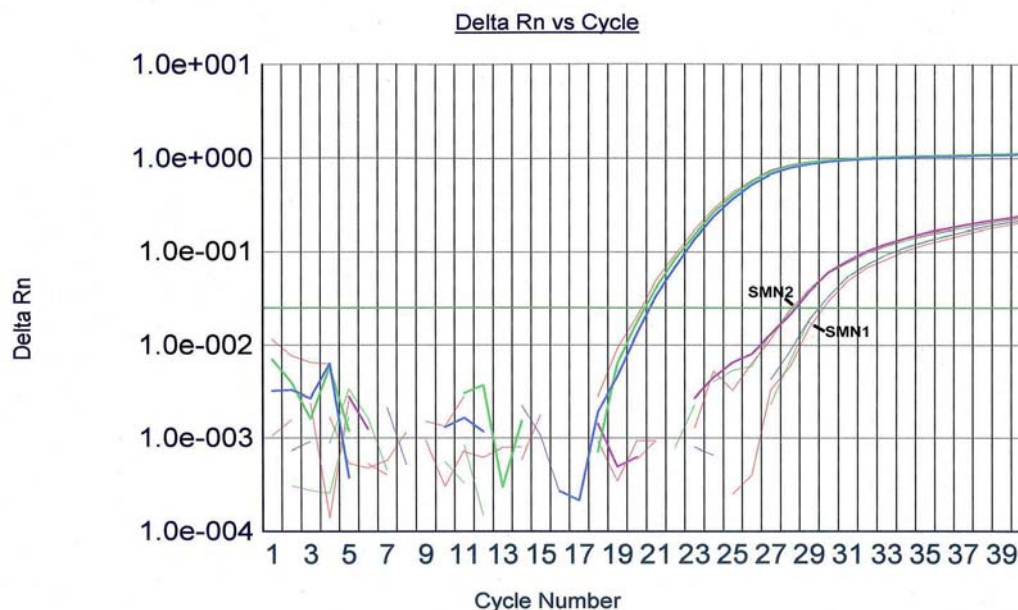
Ryc. 6

Wynik sekwencjonowania fragmentu eksonu 6 genu *SMN1*. Widoczna (strzałka) mutacja punktowa zmiany sensu T274I (kodon 274:ATT).

Warto dodać, że mutacje punktowe genu *SMN1* identyfikowane są bardzo rzadko. Do chwili obecnej opisano w literaturze 25 tego typu mutacji u 56 pacjentów. Wśród opisanych dominują mutacje w obrębie eksonu 6 i 7, kodujących ważną funkcjonalnie domenę białka SMN, odpowiedzialną za jego oligomeryzację i wiązanie z substratami kompleksu SMN.

### 6.3. Badanie nosicielstwa delecji eksonu 7 genu *SMN1*

W związku ze skomplikowaną budową regionu chromosomu, w którym jest zlokalizowany gen *SMN1* ustalania nosicielstwa delecji eksonu 7 w rodzinach ryzyka SMA jest praktycznie możliwe jedynie z zastosowaniem metody ilościowego PCR (ang. real time PCR). Stosując metodę ilościowego fluorescencyjnego PCR porównuje się ilość produktu PCR genu *SMN1* (jednego lub dwóch alleli) z ilością produktu amplifikacji wzorcowego genu *SMN1*, nie ulegającego delecji (obraz amplifikacji dwóch alleli). Zastosowanie tej techniki daje możliwość porównania obrazu amplifikacji badanego i wzorcowego genu *SMN1*, a przez to porównanie liczby alleli (Ryc.7). Ta metoda analizy DNA wykorzystywana jest przede wszystkim w badaniach naukowych, a jej wdrożenie do badań rutynowych jest jeszcze sprawą przyszłości.



Ryc.7

Wynik badania nosicielstwa SMA metodą RT-PCR. Badano liczbę kopii genu *SMN1* u matki dziecka, u którego w analizie DNA wykazano obecność delekcji eksonu 7 w obu allelach genu *SMN1*. Widoczne przesunięcie w liczbie cykli oznacza obecność zarówno kopii prawidłowej jak i z delecją eksonu 7 (układ heterozygotyczny). Badanie wykonane na amplifikatorze ABI PRISM 7000 (Applied Biosystem).

## 7. CHARAKTERYSTYKA POLSKIEJ POPULACJI SMA

W 1998 roku wprowadzono w Polsce badania molekularne do rutynowej diagnostyki rdzeniowego zaniku mięśni<sup>1</sup>. Do chwili obecnej weryfikację molekularną choroby przeprowadzono w grupie 460 pacjentów z podejrzeniem rdzeniowego zaniku mięśni. Delekcję eksonu 7 genu *SMN1* zidentyfikowano u 368 pacjentów czyli u 80% badanych. Prezentowana grupa obejmowała wszystkich pacjentów skierowanych na badanie molekularne w kierunku SMA. Badanie to wykonywano zatem nie tylko u chorych spełniających kryteria diagnostyczne wg Międzynarodowego SMA Konsorcjum, ale również w ramach diagnostyki różnicowej tzw. dziecka wiotkiego, zespołu dwuobrczowego, czy w wielu innych przypadkach wątpliwych i trudnych diagnostycznie. Po klinicznej weryfikacji rozpoznania delekcję eksonu 7 kopii telomerowej genu *SMN1* wykryto u około 96% chorych.

<sup>1</sup> Wynik realizacji grantu KBN nr 4 PO5E 001 12 (kierownik prof. I. Hausmanowa-Petrusewicz)

W badanym materiale najczęstszą postacią okazała się forma łagodna, stanowiąc blisko 43% (152/357) ogółu przypadków (Tab. 3). Wynik ten wydaje się być o tyle interesujący, że formę tę uważa się w literaturze za występującą najrzadziej (1: 83 tys.). Wysoki odsetek SMA3 wydaje się być jednak związany przede wszystkim z niedostateczną rozpoznawalnością choroby w okresie niemowlęcym oraz ze specyfiką ośrodka (Zespołu Badawczo-Leczniczego Chorób Nerwowo-Mięśniowych), zajmującego się głównie diagnostyką osób dorosłych. Nie można jednocześnie zupełnie odrzucić tezy odmienności fenotypowej naszej populacji. Pozostałe formy choroby występowały odpowiednio z częstością: SMA1- 36,7% (131 pacjentów), SMA2- 20,7% (74 pacjentów)

Tabela 3

Rozkład zachorowań w poszczególnych grupach z uwzględnieniem płci

Populacja	SMA1	SMA2	SMA3a	SMA3b	Razem
kobiety	58	29	44	23	154
mężczyźni	73	45	42	43	203
razem	131	74	86	66	357

W analizowanym materiale zwraca również uwagę przewaga płci męskiej, dotycząca wszystkich (poza SMA3a) grup. W grupie 3b dwukrotnie rzadziej chorowały kobiety. Zjawisko to obserwowano od dość dawna, dopatrując się ewentualnego ochronnego wpływu estrogenów. Interesujące wydaje się spostrzeżenie, że podobna zależność dotyczy również postaci ostrej – (M:K 5:4) i pośredniej (M:K 3:2), choć przewaga płci męskiej nie jest w tych grupach tak zdecydowana.

Najczęstszą mutacją (61%) w polskiej populacji chorych była delecja obejmująca eksony 7 i 8 kopii telomerowej genu *SMN*. U 19% chorych, a zatem rzadziej w porównaniu z piśmiennictwem, występowały duże delecje obejmujące swym zasięgiem gen *SMN1* i *NAIP*. Częściej natomiast - u 20% chorych (w literaturze- ok. 4,5%) stwierdzano delecje dotyczące tylko eksonu 7 genu *SMN1*. Może to dowodzić odmienności genetycznej naszej populacji w porównaniu z innymi populacjami kaukaskimi.

Duże delecje obejmujące gen *SMN1* i *NAIP* występowały głównie w SMA1 (85%, 35/41), małe – częściej w SMA3 (55%, 25/45). W badanym materiale duże delecje (geny *SMN1*, *NAIP* i ew. *p44*) występowały u 36% (35/98) chorych z SMA 1. Natomiast utrata

eksonu 7 z zaoszczędzeniem eksonu 8 występowała zdecydowanie rzadziej w SMA1 (9%) niż w SMA3 (31%). Można zatem wnioskować, że duże delecje warunkują ciężki fenotyp, natomiast małe wpływają na złagodzenie fenotypu choroby.

Tabela 4

Wielkość delecji w regionie SMA w poszczególnych grupach pacjentów.

Typ SMA	delecja genów <i>NAIP</i> i <i>SMN1</i>	delecja genu <i>SMN1</i>		Razem
		ekson 7 i 8	tylko ekson7	
SMA1	35	54	9	98
SMA2	4	26	11	41
SMA3	2	53	25	80
razem	41	133	45	219

Rdzeniowy zanik mięśni charakteryzuje duża rozpiętość wieku zachorowania. W badanym materiale u 1/4 chorych objawy kliniczne występowały od urodzenia. W kilkunastu przypadkach SMA 1 matki chorych odczuwały osłabienie ruchów płodu. Najstarsza badana osoba, ze zweryfikowanym molekularnie rozpoznaniem, zachorowała w wieku 34 lat.

Na wiele lat przed okresem rozwoju biologii molekularnej dokonano obserwacji, że w 1/3 rodzeństwa (dwoje lub więcej chorych) dzieci chorowały na różny typ SMA. Fakt ten nie znalazł do tej pory wytłumaczenia. Niewątpliwie duży wpływ na przebieg choroby mają czynniki zewnętrzne (uraz, gwałtowny przyrost masy ciała). Ich wpływ nie tłumaczy jednak występowania przypadków o skrajnie różnym przebiegu (np. SMA 1 i 3) w jednym rodzeństwie. W badanym materiale kliniczną zmienność wewnątrzrodzinną obserwowano w 1/3 rodzeństw (głównie SMA postaci 2 i 3). W pozostałych rodzeństwach dzieci chorowały na ten sam typ SMA.

## 8. PATOLOGIA MOLEKULARNA

Mimo poznania budowy fizycznej regionu SMA i określenia, w wielu rodzinach, zmian na poziomie DNA nadal niejasne są mechanizmy odpowiedzialne za powstanie poszczególnych postaci SMA. Wystąpienie choroby, z nielicznymi wyjątkami koreluje jedynie z brakiem eksonu 7 w genie *SMN1*. Na obecnym poziomie wiedzy znamy kilka

czynników modyfikujących fenotyp. Należą do nich: 1) wielkość delekcji w regionie SMA, 2) liczba kopii centromerowych genu *SMN*, 3) konwersja czyli częściowe zastąpienie kopii telomerowej kopią centromerową genu *SMN*, 4) poziom białka SMN w komórce.

Wyniki badań nie wykazały istnienia bezpośredniej korelacji między wielkością delekcji w regionie SMA a nasileniem objawów choroby. Jednak delekcje większe niż 70 kb, obejmujące oprócz genu *SMN1* również *NAIP* i *p44*, obserwowane są częściej w ostrej formie choroby.

Kopia centromerowa różni się od kopii telomerowej jedynie 5 nukleotydami (w tym dwoma w części kodującej). Jej nierównocенność wynika z faktu, że na skutek alternatywnego składania powstaje transkrypt pozbawiony eksonu 5, 7, bądź 5 i 7 oraz tylko niewielka ilość mRNA pełnej długości, analogicznego do transkryptu kopii telomerowej. Teoretycznie zatem zwiększenie liczby kopii centromerowych mogłoby powodować zmniejszenie lub nawet brak objawów chorobowych.

W regionie SMA, oprócz wymienionych wyżej genów, występuje szereg sekwencji powtórzonych, pseudogenów, retrotranspozonów. Wskutek tego obszar ten jest niestabilny genetycznie. Dochodzić może w nim do częściowego zastępowania kopii telomerowej kopią centromerową (tzw. konwersji genu). W zależności od wielkości składowych powstaje więc gen hybrydowy przypominający bardziej kopię centromerową bądź telomerową. Uważa się, że ciężka postać - SMA 1, warunkowana jest rzeczywistą delecją, natomiast formy łagodniejsze konwersją sekwencji kopii telomerowej z centromerową.

Wydaje się, że nasilenie objawów klinicznych bezpośrednio zależy od poziomu białka SMN w komórce. U pacjentów z rdzeniowym zanikiem mięśni, a zwłaszcza z SMA 1, poziom białka SMN jest znacznie obniżony. W komórkach rdzenia kręgowego pacjentów z najcięższą formą choroby stwierdzono 100-krotne obniżenie poziomu tego białka. Łagodniejszego przebiegu choroby można oczekiwać u pacjentów, u których obserwuje się większą liczbę kopii genu *SMN2*.

Analiza molekularna genu *SMN1* u pacjentów z rozpoznaniem klinicznym SMA nie rozwiązuje wszystkich problemów diagnostycznych. Istnieje bowiem grupa pacjentów z SMA, w której wystąpienie choroby nie jest związane z uszkodzeniem genu *SMN1*. Tym niemniej analiza genu *SMN1* jest obecnie trwałym elementem nowoczesnej diagnostyki klinicznej tej choroby.

## 9. ZAKOŃCZENIE

Źródłem informacji o chorobie dziecka są dla rodziców lekarze pediatrizy, neurologicy oraz dostępne opracowania. Dostępne publikacje, a także przekazywane informacje, często nie odzwierciedlają całej prawdy o chorobie i jej konsekwencjach dla rodziny. Dlatego też tak istotne jest skierowanie rodziców z dzieckiem chorym na SMA do genetyka klinicznego i objęcie rodziny systemem poradnictwa genetycznego. Celem tego poradnictwa jest przekazanie informacji dotyczących wielu problemów związanych z ryzykiem wystąpienia choroby uwarunkowanej genetycznie w rodzinie. Po poradę mogą zgłaszać się nie tylko rodzice dziecka chorego ale też ich krewni, którzy pragną poznać ryzyko wystąpienia choroby u ich przyszłego potomstwa.

Proponowane przez nas postępowanie diagnostyczne opiera się na analizie molekularnej z możliwością wykazania delecji eksonu 7 w genie *SMN1* (Ryc. 8). Ten tok postępowania umożliwia weryfikację rozpoznania u około 95% chorych. Wykrycie mutacji w obu allelach genu *SMN1* nie tylko potwierdza rozpoznanie kliniczne choroby u badanego dziecka, ale też daje możliwość oszacowania prawdopodobieństwa wystąpienia SMA u kolejnego dziecka. Jest ono takie same jak w każdym innym przypadku choroby o autosomalnym recesywnym sposobie dziedziczenia i wynosi 25% (1:4). Prawdopodobieństwo urodzenia zdrowego dziecka wynosi 75%.

Diagnostyka molekularna SMA umożliwia również identyfikację mutacji w genie *SMN1* u pozostałych 5% pacjentów, u których nie wykrywa się delecji eksonu 7 genu *SMN1*, a defekt spowodowany jest występowaniem mutacji punktowych. Wykrycie tych mutacji wymaga jednak zastosowania sekwencjonowania wszystkich eksonów genu *SMN1*. Badania tego typu trudne są do przeprowadzenia na zasadach diagnostyki rutynowej SMA, nawet w krajach Europy Zachodniej i USA.

Niewątpliwie najistotniejszym zadaniem badawczym pozostaje nadal problem ustalania nosicielstwa delecji eksonu 7 w rodzinach ryzyka SMA. Określenie nosicielstwa ma szczególne znaczenie w przypadkach występowania delecji *de novo* (dotyczy 2% chorych na SMA) tzn. powstałych w czasie gametogenezy i nie odziedziczonych od rodziców. Stwierdzenie delecji *de novo* ma ważne implikacje dla rodziny bowiem ryzyko urodzenia kolejnego dziecka z SMA jest w takim przypadku znacznie niższe (< 1%). Określenie nosicielstwa delecji eksonu 7 jest ważne również w rodzinach, które straciły dziecko podejrzane o SMA, a u którego nie wykonano za życia badania molekularnego i brak jest tkanek mogących być źródłem DNA. Proponowanie diagnostyki prenatalnej w tych rodzinach jest kontrowersyjne. Brak możliwości ustalenia nosicielstwa, w tym u krewnych chorego, powoduje że poradnictwo genetyczne w rodzinach SMA jest trudniejsze i nie daje pełnego zakresu informacji jak ma to miejsce w innych chorobach o tym samym typie dziedziczenia.

Nie jesteśmy w stanie określić nosicielstwa u rodziców i rodzeństwa chorego na SMA dziecka. Badanie nosicielstwa delecji eksonu 7 możliwe jest jedynie przy zastosowaniu metody ilościowego PCR. W chwili obecnej, ze względu na wymagania sprzętowe i koszty odczynników nie jest możliwe do wykonania w analizie rutynowej.

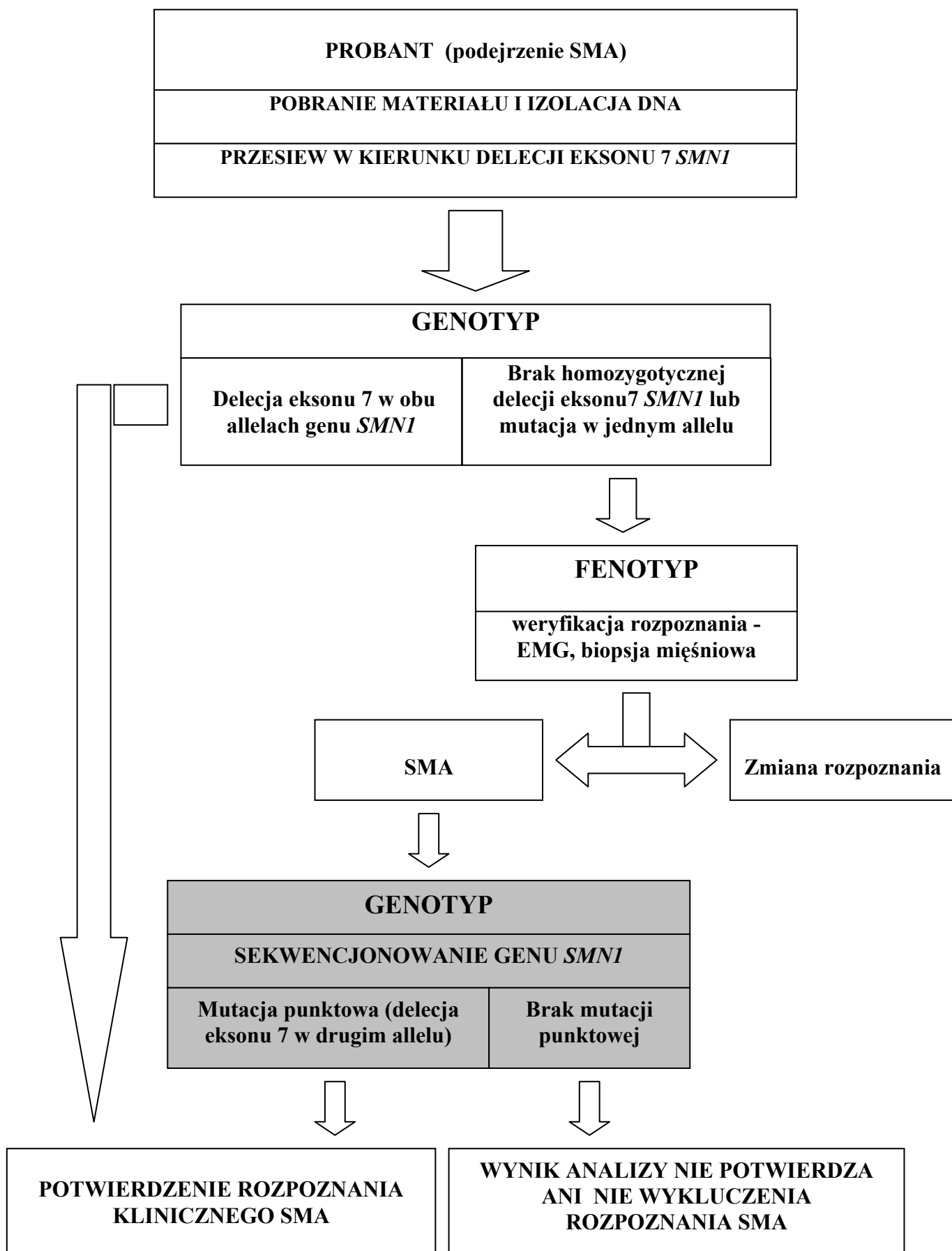
W chwili obecnej wyniki badania molekularnego nie dają możliwości prognozowania przebiegu choroby.

\* \* \*

Mimo ogromnego postępu medycyny i pojawienia się nowych perspektyw związanych z rozwojem biologii molekularnej, postępowanie terapeutyczne w SMA nie uległo zmianie. Duże nadzieje wiąże się z próbami zwiększenia ekspresji kopii centromerowej genu *SMN*. Wzmocnienie transkrypcji genu *SMN2* lub zmiana procesu składania mRNA tak, by eksony 5 i 7 nie były wycinane zaowocowałyby prawdopodobnie zwiększeniem poziomu pełnowartościowego białka SMN w tkankach i złagodzeniem przebiegu choroby. Jedną z obiecujących substancji wpływających na ekspresję *SMN2* na poziomie molekularnym jest maślan sodowy. Zwiększa on poziom pełnowartościowego białka SMN w liniach komórkowych limfocytów poprzez zmianę alternatywnego składania *SMN2*. W próbach na modelu zwierzęcym substancja ta wydaje się łagodzić objawy chorobowe i wydłużać okres przeżycia chorych myszy. Niedaleka przyszłość pokaże, czy stanie się ona skutecznym i bezpiecznym lekiem w terapii rdzeniowego zaniku mięśni u człowieka. Jednak do czasu opracowania skutecznej terapii przyczynowej leczenie objawowe wciąż pozostaje jedyną dostępną formą działania terapeutycznego.

Ryc. 8

Schemat postępowania w diagnostyce molekularnej SMA. Części zaciemnione – etapy trudne do wykonania w badaniu rutynowym.



## 11. UZUPEŁNIENIA

### 11.1. Pozostałe postaci rdzeniowego zaniku mięśni

#### Tabela 5

Pozostałe, poza dosiebnym dziecięcym i młodzieńczym SMA, postaci rdzeniowego zaniku mięśni

Typ kliniczny	Rozkład zaników	Początek i przebieg kliniczny	Dziedziczenie	Gen i (lub) jego lokalizacja
<p>Dystalny rdzeniowy zanik mięśni (rdzeniowa forma choroby Charcot-Marie-Tooth, ang. HMN – hereditary motor neuropathy):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• HMN 1</li> <li>• HMN 2</li> <li>• HMN 5 (głównie mięśni kończyn górnych)</li> <li>• HMN 7 (z zajęciem strun głosowych)</li> <li>• HMN J (ang. Jerash type)</li> <li>• Rdzeniowy zanik mięśniowy związany z pierwotną niewydolnością oddechową (przeponowy rdzeniowy zanik mięśniowy, ang. SMARD 1)</li> </ul>	Odsiebny	<p>3-4 dekada, osłabione odruchy, antycypacja</p> <p>2-4 dekada, dość łagodny, kkd&gt;kkg</p> <p>2 dekada, łagodny, kkg&gt;&gt;kkd</p> <p>1-2 dekada, niedowład strun głosowych, kkg&gt;kkd, czasem głuchota typu odbiorczego</p> <p>1 dekada, kkd&gt;kkg, po kilku latach objawy piramidowe</p> <p>1-2mż, kkg&gt;kkd, ciężka niewydolność oddechowa związana z porażeniem przepony, często ubytkiem i przemieszczeniem trzewi do klatki piersiowej</p>	<p>AD</p> <p>AD</p> <p>AD</p> <p>AD</p> <p>AR</p> <p>AR</p>	<p>?</p> <p>12q23-24</p> <p>7p</p> <p>2q14</p> <p>9p21</p> <p>gen IGHMBP2 (ang. immunoglobulin u-binding protein 2), h11q13.213.4</p>
Rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni (choroba Kennedy’ego, ang. SBMA – spino-bulbar muscular atrophy)	Dosiebny	30-50rż, objawy opuszkowe, ginekomastia (50%), zaburzenia hormonalne –impotencja, bezpłodność, zaburzenia metaboliczne-cukrzyca, hiperlipidemia, przebieg powoli postępujący	XR	Mutacja dynamiczna- (CAG) <sup>n</sup> >38 w genie AR (ang. androgen receptor, gen receptora androgenowego), Xq12
<p>Formy dorosłe rdzeniowego zaniku mięśni:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SMA 4</li> <li>• SMA 5</li> </ul>	Dosiebny	<p>wiek dorosły, powoli postępujący</p> <p>wiek dorosły, czasem wysokie CK</p>	<p>AR</p> <p>AD</p>	W niektórych przypadkach gen SMN1
Tylko kończyn dolnych	Dosiebny	wrodzone, nie postępujące, czasem przykurcze stawów skokowych i kolanowych	AD	12q23-24
Łopatkowo-strzałkowy	Dosiebno-odsiebny	30-50 rż, powoli postępujący	<p>AD</p> <p>AR</p>	<p>?</p> <p>?</p>
Rdzeniowy zanik mięśni kończyn dolnych	Dosiebny	wrodzony, nie postępujący, czasem przykurcze stawów skokowych i kolanowych	AD	12q23-24
Rdzeniowy zanik mięśni z artrogrypozą i złamaniami kości	Dosiebny	wrodzony, przebieg kliniczny jak w SMA I, artrogrypoza i złamanie kości	XR	Xp11.3-q11.2

## 11.2 Wybrane pozycje piśmiennictwa ICMDiK PAN, IPIŃ oraz IMID z zakresu SMA

1. Hausmanowa-Petrusewicz I (1978) Spinal muscular atrophy – Infantile and Juvenile Type, Springfield, Virginia
2. Hausmanowa-Petrusewicz I, Zaremba J, Borkowska J. et al. (1984) Chronic proximal spinal muscular atrophy of childhood and adolescence: Sex influence. *J Med. Genet* 21, 477
3. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Lutzenrath S, Borkowska J et al. (1998) A collaborative study on the natural history of childhood and juvenile onset proximal spinal muscular atrophy (type II and III SMA): 569 patients. *J Neurol Science* 146, 67
4. Zimowski JG, Mierzewska H (1998) Rdzeniowy zanik mięśni – obraz kliniczny, aspekty genetyczne oraz próba molekularnego wyjaśnienia powstawania choroby. *Klinika Pediatryczna* 6, 444
5. Hausmanowa-Petrusewicz I (1999) Choroby Nerwowo-Mięśniowe. PWN, Warszawa
6. Hausmanowa-Petrusewicz I, Jędrzejowska M.: Spinal muscular atrophy of childhood at the edge of the centuries. *Functional Neurol.* 2001, 16 (suppl.): 247
7. Wiszniewski W (1999) Podłoże molekularne w rdzeniowym zaniku mięśni. *Ped Pol* 74, 149
8. Zimowski JG (1999) Rdzeniowy zanik mięśni – podłoże molekularne. *Post Biol Kom* 26, 311
9. Hausmanowa-Petrusewicz I, Zaremba J (2000) Proximal Spinal Muscular Atrophy. w *Neuromuscular Diseases: From Basic Mechanisms to Clinical Management*. Red.Deymeer F, Karger, Basel,163
10. Jędrzejowska M, Wiszniewski W, Zimowski J, Hausmanowa-Petrusewicz I (2000) Rdzeniowy zanik mięśni – korelacje kliniczno-genetyczne. *Neurologia Dziec* 9(18), 11
11. Rudnik-Schonborn S, Hausmanowa-Petrusewicz I, Borkowska J (2001) The predictive value of achieved motor milestones assessed in 441 patients with infantile spinal muscular atrophy types II and III. *Europ Neurol* 41,174
12. Jędrzejowska M (2001) Rdzeniowy zanik mięśni - deficyt białka SMN. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* 35(2), 289
13. Jędrzejowska M, Wiszniewski W, Ryniewicz B, Hausmanowa-Petrusewicz I (2002) Identyfikacja mutacji punktowych w genie SMN1 u chorych z rdzeniowym zanikiem mięśni. *Medycyna Wieku Rozwojowego*
14. Jędrzejowska M, Wiszniewski W (2002) Rdzeniowy zanik mięśni. Instytut Matki i Dziecka. Warszawa

### 11.3. Pobieranie i przesłanie materiału na badanie genetyczne

DNA jest otrzymywany standardowo z leukocytów krwi obwodowej. W tym celu należy pobrać kilka mililitrów (5-10ml) krwi do probówki zawierającej 0,2 ml 0,5 M EDTA (wersenian sodowy) o pH 8,0 i po szczelnym zamknięciu dobrze zamieszać. Następnie należy odwirować leukocyty. Osad, będący podstawą preparatyki DNA, po zamrożeniu w  $-70^{\circ}\text{C}$  można przechowywać przez wiele miesięcy.

W przypadku gdy izolacja DNA jest wykonywana w innym laboratorium niż to, w którym pobrano materiał do badań, krew powinna być przesłana w ciągu 48 godzin od momentu pobrania. Przed wysłaniem należy ją przechowywać w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ .

Ponieważ diagnostyka molekularna opiera się na badaniu produktów PCR do analizy wystarczająco ilości DNA otrzymywane np. z plam krwi. Preparatyka DNA z takich plam jest stosunkowo prosta, a pobranie kilku kropli krwi jest mniej obciążające dla badanego. Taki tryb postępowania znacznie upraszcza również ewentualne przesyłanie materiału do badań.

### 11.4. Ośrodki wykonujące diagnostykę w kierunku SMA

- Ośrodek referencyjny diagnostyki klinicznej
- \* Zespół Badawczo-Leczniczy Chorób Nerwowo-Mięśniowych IMDiK PAN (02-097 Warszawa ul. Banacha 1 a,
- Ośrodki wykonujące diagnostykę molekularną SMA
- \* Zakład Genetyki Instytutu Matki i Dziecka (01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17),
- \* Zakład Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii (02-957 Warszawa, Al. Sobieskiego 1/9)

### 11.5. Sekwencjonowanie genu *SMN1*.

Reakcje sekwencjonowania przeprowadzono metodą cykliczną z czterema dideoksynukleotydtrifosforanami wyznakowanymi fluorochromami, przy użyciu zestawu do sekwencjonowania DNA Sequencing Kit (Applied Biosystems) zgodnie z zaleceniami producenta. Jako starterów użyto oligonukleotydów używanych w reakcji PCR. Analizę sekwencyjną przeprowadzoną w automatycznym sekwenatorze ABI 310 (Applied Biosystems). Listę stosowanych starterów podano w Tabeli 6.

Tabela 6

Lista starterów stosowanych w sekwencjonowaniu genu *SMN1*

Ekson	Sekwencja nukleotydów
1	F 5'-GCCGGAAGTCGTCACTCTT-3'
	R 5'-GGGTGCTGAGAGCGCTAATA -3'
2A	F 5'-CTGATTAACCTATCTGAACATG-3'
	R 5'-CGTATGTTATCAATTCCTTTCCA-3'
2B	F 5'-CTGTGCACCACCCTGTAACATG-3'
	R 5'-AAGGACTAATGAGACATCC-3'
3	F 5'-CGAGATGATAGTTTGCCCTC-3'
	R 5'-CTCATCTAGTCTCTGCTTCC-3'
4	F 5'-CACCCCTTATAACAAAACCTGC -3'
	R 5'-GAGAGGTTAAATGTCCCGA-3'
5	F 5'-TGAGTCTGTTTGACTTCAGG-3'
	R 5'-TATCAAATTGTATGTGAAAGCA-3'
6	F 5'-CTCCCATATGTCCAGATTCTCTT-3'
	R 5'-AAGAGTAATTTAAGCCTCAGACAG-3'
7	F 5'-AGACTATCAACTTAATTTCTGATC-3'
	R 5'-GTAAGATTCACCTTTCATAATGCTG-3'

11.6 Warunki identyfikacji delekcji eksonu 7 w genie *SMN1*

Otrzymane DNA używano do powielenia sekwencji kodujących – eksonu 7 genu *SMN* z zastosowaniem następującej pary starterów (11):

(R111) 5'-AGACTATCAACTTAATTTCTGATCA -3'

(X7-Dra) 5'-CCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTTT -3'.

Reakcję PCR w objętości 25 µl wykonywano w amplifikatorze MJ Research 200 według schematu: wstępna denaturacja 95°C - 5 min, powielanie (35 cykli) w tym denaturacja 94°C - 1 min, przyłączanie starterów 55°C - 1 min., synteza 72°C - 1 min, synteza uzupełniająca 72° C - 8 min. Produkty PCR trawiono enzymem restrykcyjnym Dra I w temperaturze 37°C przez 2 godziny. Produkty trawienia rozdzielano w 2% żelu agarozowym. Wyniki dokumentowano w systemie Gel Doc (BioRad)