

ARTYKUŁ POGLĄDOWY / REVIEW PAPER

Rola biopsji mięśnia szkieletowego w diagnostyce chorób nerwowo-mięśniowych

The role of skeletal muscle biopsy in the diagnosis of neuromuscular disorders

Aleksandra Nadaj-Pakleza¹, Biruta Kierdaszuk², Anna Kamińska²¹Institut de Myologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France²Katedra i Klinika Neurologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Neurologia i Neurochirurgia Polska 2010; 44, 5: 481–491

Streszczenie

Biopsja mięśnia szkieletowego wykonywana w celach diagnostycznych w chorobach nerwowo-mięśniowych umożliwia ocenę rodzaju procesu chorobowego (pierwotnie mięśniowy czy neurogeny), dostarcza informacji o przebiegu (ostry czy przewlekły) oraz stopniu zaawansowania choroby. W wielu przypadkach zastosowanie dodatkowych technik histochemicznych i immunohistochemicznych pozwala na jednoznaczne rozpoznanie takich schorzeń, jak niektóre dystrofie mięśniowe, glikogenozy, miopatie zapalne oraz miopatie wrodzone. Ocena wycinka mięśniowego w mikroskopie elektronowym umożliwia pewne rozpoznanie dystrofii oczno-gardłowej, miopatii mitochondrialnej i wtętego zapalenia mięśni.

W niniejszym artykule omówiono objawy kliniczne sugerujące konieczność pobrania wycinka, technikę wykonywania biopsji, zasady wyboru mięśnia do badania, a także praktyczne wskazówki dotyczące przesyłania pobranego wycinka i przygotowania preparatów do oceny w mikroskopie. Przedstawiono ponadto podstawowe zasady dotyczące interpretacji wyniku biopsji mięśnia oraz przydatność kliniczną biopsji mięśnia w dobie zaawansowanej diagnostyki molekularnej.

Słowa kluczowe: biopsja mięśnia, metody diagnostyczne, zmiany patologiczne w mięśniu, miopatia, dystrofia mięśniowa.

Abstract

Muscle biopsy is required to provide a definitive diagnosis in many neuromuscular disorders. Biopsy findings may indicate whether the pathological process is of neurogenic or myopathic origin. The muscle biopsy may give important information on the course of the disease (acute or chronic) and on the disease stage and progression. The interpretation of muscle biopsy, including histochemical and ultrastructural analysis, is a key factor in the diagnosis of muscular dystrophies, glycogenoses, inflammatory myopathies and congenital myopathies. An assessment of muscle biopsy on electron microscopy enables a definite diagnosis of oculopharyngeal muscular dystrophy, mitochondrial myopathy or inclusion body myositis.

This paper presents an overview of general indications for muscle biopsy, biopsy procedures, as well as transportation and preparation of muscle tissue for final microscopic analysis. The interpretation of specific microscopic findings and a brief discussion on the clinical usefulness of muscle biopsy in the era of molecular diagnosis are also presented.

Key words: muscle biopsy, diagnostic methods, pathological changes in muscle, myopathy, muscular dystrophy.

Adres do korespondencji: Biruta Kierdaszuk, Katedra i Klinika Neurologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa, e-mail: bkierdaszuk@gmail.com

Pracę otrzymano: 4.01.2010; przyjęto do druku: 13.07.2010

Wprowadzenie

Biopsja mięśnia szkieletowego to jedna z ważniejszych metod diagnostycznych w chorobach nerwowo-mięśniowych. Umożliwia ocenę rodzaju procesu chorobowego (pierwotnie mięśniowy czy neurogeny), dostarcza informacji o przebiegu (ostry czy przewlekły) oraz stopniu zaawansowania choroby [1]. Porównanie wyników badań elektrofizjologicznych i histopatologicznych pozwala w większości przypadków na ustalenie rozpoznania, a zastosowanie dodatkowych technik – histochemicznych i immunohistochemicznych – na bliższe scharakteryzowanie wielu schorzeń, takich jak niektóre dystrofie, glikogenozy, miopatie wrodzone czy zapalne. Ocena wycinka mięśniowego w mikroskopie elektronowym umożliwia pewne rozpoznanie dystrofii oczno-gardłowej, miopatii mitochondrialnej czy wrętowego zapalenia mięśni. Ważnym elementem jest ustalenie wskazań do biopsji i wybór mięśnia, a także poinformowanie laboratorium o wstępnym rozpoznaniu, co umożliwi użycie odpowiednich technik barwienia. Biopsja mięśnia powinna być wykonywana w specjalistycznych ośrodkach mających możliwość zastosowania różnorodnych technik diagnostycznych oraz mających doświadczenie w ocenie tkanki mięśnia szkieletowego.

Wskazania do wykonania biopsji mięśnia

Do wskazań tych należą:

1. Osłabienie mięśni – biopsja mięśnia jest szczególnie przydatna w diagnostyce przewlekłego osłabienia i zaniku głównie mięśni ksoalnych (podejrzenie miopatii lub dystrofii) oraz w przypadkach opadania mięśni powiek i osłabienia mięśni gałkoruchowych (sugeruje to miopatię mitochondrialną).
2. Nietolerancja wysiłku – nawet niewielki powtarzalny wysiłek w warunkach pracy beztlenowej mięśnia prowadzi do zmęczenia u chorych z glikogenozą, której podejrzenie stanowi wskazanie do wykonania biopsji. Stwierdzenie tego objawu wymaga przede wszystkim wykluczenia miastenii.
3. Ból mięśni – w czasie spoczynku jest charakterystyczny dla miopatii zapalnych. Ból mięśni, który pojawia się w czasie i po wysiłku, oznacza niedobór energii w komórce mięśniowej, co nasuwa podejrzenie miopatii metabolicznej (np. glikogenozy).
4. Mioglobulinuria – świadczy o gwałtownym uszkodzeniu włókna mięśniowego, czyli rhabdomyolizie. Przebiega zwykle z bólami i osłabieniem mięśni, może być

pierwszym objawem wielu chorób, m.in. niedoboru miofosforylasy (choroby McArdle'a), niedoboru fosfofruktokinazy (choroby Taruiego) czy hipertermii złośliwej. Biopsję wykonuje się po ustąpieniu ostrych objawów.

5. Zwiększona aktywność kinazy kreatynowej (*creatine kinase* – CK) – zależy od nasilenia zmian martwiczych w mięśniu. Największą aktywność CK obserwuje się w chorobach z ostrym uszkodzeniem włókien mięśniowych, w miopatiach zapalnych i polekowych, w dystrofinopatiach i w miopatiach metabolicznych. Wskazaniem do wykonania biopsji mięśnia jest sytuacja, w której na podstawie wywiadu rodzinnego i objawów choroby nie można ustalić prawdopodobnej przyczyny zwiększenia aktywności CK.

Technika wykonywania biopsji mięśnia

Mięsień wybrany do biopsji powinien wykazywać kliniczne objawy choroby. Należy jednak unikać mięśni, które uległy znacznemu zanikowi, ponieważ można trafić na fragment przerośnięty tkanką łączną, co uniemożliwi ustalenie rozpoznania. Z kolei wycinek pobrany z mięśnia niewykazującego osłabienia może nie uwidocznić zmian patologicznych. W przypadku procesu przewlekłego wybiera się mięsień ze średnio zaawansowanym uszkodzeniem, a w przypadku procesu ostrego – mięsień z uszkodzeniem ciężkim lub średnio zaawansowanym. Bada się proksymalny mięsień kończyn górnych lub dolnych, najczęściej mięsień dwugłowy ramienia, mięsień naramienny lub głowę boczną mięśnia czworogłowego uda. W przypadku zajęcia przez proces chorobowy mięśni dystalnych, badaniu można poddać mięsień brzuchaty łydki, piszczelowy przedni lub strzałkowy krótki. Analiza takiej biopsji może być jednak trudna z powodu braku opracowanych norm składu procentowego włókien i średnicy dla tych grup mięśni i dlatego nie jest polecana w diagnostyce miopatii. Mięsień, z którego pobiera się wycinek, nie powinien być wcześniej poddany badaniu EMG, powinien też być omijany przy wykonywaniu wstrzyknięć domięśniowych.

Przy pobieraniu biopsji stosuje się znieczulenie miejscowe 1-procentowym roztworem lidokainy. Aby uniknąć artefaktów, nie należy bezpośrednio nastrzykiwać wybranego miejsca środkiem znieczulającym oraz pamiętać o możliwości zmiażdżenia mięśnia poprzez manipulowanie pęsetą. Gwarancję pobrania odpowiedniej tkanki do badania daje wykonanie biopsji przez

chirurga lub neurologa dobrze znającego anatomie układu mięśniowego. Istnieją dwa sposoby pobierania wycinka mięśniowego – biopsja otwarta i biopsja igłowa. W większości ośrodków stosuje się metodę otwartą. Przemawia za tym zdecydowanie większa czułość tej metody w wykrywaniu drobnych zmian wieloogniskowych oraz fakt, że można ją wykonać u wszystkich pacjentów, bez względu na wiek. Niesie ze sobą niewielkie ryzyko poważnych powikłań, a szcicie powięzi szwem rozpuszczalnym nie zawsze bywa konieczne. Zwykle po równoległym do przebiegu włókien nacięciu powięzi brzegi schodzą się samoistnie. Zalecane jest zdjęcie szwów skórnych w 7.–8. dobie. Rana goi się zwykle dobrze i pozostawia jedynie prawie niewidoczną, jednocentymetrową bliznę [1].

Wycinek mięśniowy należy jak najszybciej przenieść do specjalistycznego laboratorium histopatologicznego. Nie powinno umieszczać się pobranego wycinka w soli fizjologicznej ani w innych płynach. Tuż po pobraniu należy włożyć tkankę do zamkniętego suchego pojemnika i umieścić w termosie z lodem. Nie wolno umieszczać pobranej tkanki w suchym lodzie, ponieważ stwarza to możliwość zamrożenia wycinka i w konsekwencji powstania artefaktów.

W celu oceny morfologicznej wykorzystuje się metody histologiczne, histochemiczne, immunohistochemiczne i ultrastrukturalne [2,3]. Wycinek mięśnia przygotowywany jest do obejrzenia w mikroskopie świetlnym i elektronowym. Pobrany wycinek dzieli się na cztery części – jedną z nich zamraża się w temperaturze -160° , pozostałe zastają odpowiednio utrwalone lub zamrożone w celu dalszego przechowywania. Do oceny biopsji w mikroskopie świetlnym zamrożone skrawki barwi się przy użyciu następujących metod rutynowych:

- 1) hematoksylina i eozyna (HE),
- 2) trichrom Gomoriego,
- 3) barwienie na aktywność enzymów utleniających:
 - dehydrogenaza bursztynianowa (*succinate dehydrogenase* – SDH),
 - dehydrogenaza zredukowanego dinukleotydu pirydynowego (*nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase* – NADH),
 - dehydrogenaza mleczanowa (*lactate dehydrogenase* – LDH),
- 4) metoda na aktywność ATPaz – ATPazy miozynowej w pH 9,4 oraz po preinkubacji ATPazy kwaśnej (pH 4,35 i pH 4,3).

Rutynowe badania histochemiczne umożliwiają rozróżnienie włókien oksydacyjnych (typ I) i glikolitycznych (typ II), zmiany o charakterze *central core* oraz

cechy neurogenne (grupowanie włókien jednego typu i zanik grupowy). Za pomocą dodatkowych metod można wykazać obecność tłuszczu we włóknach mięśniowych. W przypadku podejrzenia glikogenez wykonywane jest barwienie kwaśnym odczynnikiem Schiffa (*periodic acid-Schiff* – PAS), barwienie z użyciem PAS i diastazy, a także barwienia na aktywność fosforylaz. Do dokładnego wyjaśnienia podłoża miopatii metabolicznych konieczne jest wykonanie badań biochemicznych.

W miopatiach zapalnych często obserwuje się nacieki limfocytarne w tkance łącznej okołopęczkowej lub rozproszone w obrębie pęczków. Metody histochemiczne uwidoczniają zmiany w strukturze mitochondriów (włókna „szmatowate”; *ragged-red fibers* – RRF), niedobory enzymatyczne, obecność wodniczek czy charakterystycznych struktur, takich jak zmiany typu *central core* i struktury nitkowate.

W celu wykrycia i lokalizacji odpowiednich białek w strukturach włókien mięśniowych stosuje się metody immunohistochemiczne. Obecnie najczęściej wykorzystuje się pośrednią metodę barwienia. Jest to reakcja dwuetapowa polegająca na:

- inkubacji skrawków mięśniowych ze swoistym, nieznakowanym przeciwciałem (tzw. przeciwciałem pierwotnym),
- następnie poddaniu preparatów, w których doszło już do związania pierwotnego przeciwciała z antygenem tkankowym, działaniu znakowanego (tzn. wtórnego) przeciwciała skierowanego przeciwko immunoglobulinom zwierzęcia, od którego uzyskano przeciwciała pierwotne.

Używa się różnorodnych przeciwciał pierwotnych przeciwko poszczególnym białkom komórki w zależności od rozpoznania. W ten sposób można wykazać całkowity brak dystrofiny w dystrofii mięśniowej Duchenne’a lub częściowy brak dystrofiny w dystrofii Beckera oraz mozaikowy układ u nosicieli mutacji. Metody immunohistochemiczne pozwalają ponadto na uwidocznienie braku dysferliny, kalpainy 3, sarkoglikanów, emeryny, laminy A/C, jak również złogów desminy, β -amyloidu czy innych białek.

W niektórych przypadkach konieczna jest ocena biopsji w mikroskopie elektronowym. Półcienkie skrawki, służące do oceny wstępnej preparatu w mikroskopie świetlnym, barwi się błękitem toluidyny. Skrawki ultracienkie, do oceny w mikroskopie elektronowym, podlegają barwieniu octanem uranylu i dobarwieniu – cytrynianem ołowiu. Skrawki utrwala się aldehydem glutarowym i zatapia w żywicach epoksydowych (m.in. Spurr, Araldite, Epon). Metoda ta umożliwia wykrycie

wielu charakterystycznych zmian ultrastrukturalnych, takich jak obłoniony glikogen w chorobie Pompego, wtręty we wtrętowym zapaleniu mięśni czy dystrofii oczno-gardłowej oraz mitochondria z parakrystalicznymi wtrętami opisywane w miopatiach mitochondrialnych.

Pozostała tkanka mięśniowa pobrana w czasie biopsji jest przechowywana w temperaturze -70°C i później wykorzystywana m.in. do badań biochemicznych i genetycznych.

Interpretacja wyniku biopsji mięśnia

Klasyczne metody histologiczne umożliwiają ocenę morfologiczną tkanki mięśniowej. W mikroskopii świetlnej określane są m.in.: kształt i wielkość włókien mięśniowych, lokalizacja jąder, obecność włókien ulegających martwicy lub regeneracji, włókien szklawiczących, rozszczepionych lub włókien okrężnych, jak również występowanie zlogów i wodniczek. Można również stwierdzić przerost tkanki łącznej i nacieki zapalne. Rutynowe metody histologiczne pozwalają określić

grupowy zanik włókien w zmianach neurogennych lub typowe cechy uszkodzenia miopatycznego, takie jak martwica włókien, włókna regenerujące lub centralnie położone jądra. Wszystkie te zmiany zalicza się do nieswoistych, czyli mogących wystąpić w wielu różnych chorobach nerwowo-mięśniowych. Zmiany w strukturze włókna mogą być także swoiste, czyli charakterystyczne dla danego schorzenia (tab. 1.) [4]. Należy podkreślić, że pojawienie się pojedynczych zmian swoistych w wycinku nie upoważnia do rozpoznania danej jednostki chorobowej. Niewiele zmian uznaje się za patognomoniczne dla określonego schorzenia. Do tej grupy należą jedynie wtręty wewnątrzjądrowe w dystrofii oczno-gardłowej i obłoniony glikogen w chorobie Pompego. Zastosowanie metod immunohistochemicznych daje szansę na rozpoznanie miopatii przebiegających z gromadzeniem desminy oraz może wykazać brak dystrofiny lub laminy w grupie postępujących dystrofii mięśniowych. Rozpoznanie może z kolei zostać potwierdzone poprzez ocenę biopsji w mikroskopie elektronowym. Zmiany w ultrastrukturze sarkomerów w miopatiach nemalinowych oraz obecność wtrętów parakrystalicznych w mitochondriach w miopatiach

Tabela 1. Najczęściej spotykane patologiczne zmiany swoiste w biopsji mięśnia (zaadaptowano z [4])
Table 1. The most frequent specific pathological changes in the muscle biopsy (adapted from [4])

Zmiany swoiste	Rozpoznanie
<i>central core</i>	miopatia typu <i>central core</i>
<i>multiminicores</i>	miopatia typu <i>multiminicore</i>
struktury nitkowate	miopatia nemalinowa
agregaty tubularne	miopatia z tubularnymi agregatami
włókna „szmatowate”	miopatie i encefalomiopatie mitochondrialne
gromadzenie glikogenu	glikogenozy
obłoniony glikogen	choroba Pompego
gromadzenie tłuszczu	miopatie tłuszczowe
gromadzenie desminy	miopatie z gromadzeniem desminy
małe włókna z pojedynczymi i ośrodkowo położonymi jądrami	miopatia miotubularna
układ aktywności enzymów utleniających w kształcie „szprych” i zanik włókien typu 1	miopatia centronuklearna
„czapeczki”	miopatia typu „czapeczek”
ciałka cytoplazmatyczne	miopatia z ciałkami cytoplazmatycznymi
ciałka redukujące	miopatia z ciałkami redukującymi
wodniczki zawierające zasadochłonne ziarnistości (<i>rimmed vacuoles</i>), tubulofilamentarne wtręty w cytoplazmie i/lub w jądrach	wtrętowe zapalenie mięśni, miopatia dystalna
tubulofilamentarne wtręty typu IBM w cytoplazmie i/lub w jądrach	wtrętowe zapalenie mięśni
palisadowate wtręty wewnątrzjądrowe, <i>rimmed vacuoles</i>	dystrofia oczno-gardłowa

IBM - wtrętowe zapalenie mięśni (*inclusion body myositis*)

mitochondrialnych to tylko niektóre ze zmian charakterystycznych dla określonej choroby nerwowo-mięśniowej, widocznych w mikroskopie elektronowym. W tym miejscu warto wspomnieć, że wiele miopatii i dystrofii ma podobny przebieg i obraz kliniczny. Również badanie EMG i aktywność CK rzadko umożliwiają jednoznaczne rozpoznanie. Często dopiero obecność charakterystycznych zmian w biopsji mięśnia pozwala na sprecyzowanie ostatecznej diagnozy. Dzięki temu możliwe staje się wdrożenie odpowiedniego leczenia (niestety, dotychczas tylko w nielicznych schorzeniach, np. w miopatiach zapalnych i tłuszczowych), ustalenie rokowania oraz poradnictwo genetyczne.

Biopsja mięśnia może okazać się mało przydatna w diagnostyce niektórych schorzeń nerwowo-mięśniowych, ma również często ograniczone zastosowanie w przypadku dzieci [5]. Do tej grupy należy miastenia, której wstępne rozpoznanie jest oparte na obrazie klinicznym. Potwierdzenie diagnozy przynosi w tym przypadku badanie elektrofizjologiczne (elektrostymulacyjna próba nużliwości i EMG pojedynczego włókna mięśniowego) oraz oznaczenie w surowicy przeciwciał skierowanych przeciw receptorowi dla acetylocholino. Również w dystrofii miotonicznej obserwuje się zwykle typowy obraz kliniczny, a w EMG – charakterystyczne wyładowania miotoniczne. Także w diagnostyce porażenia okresowego (hiperkalemicznego, hipokalemicznego lub normokaliemicznego) biopsja mięśnia odgrywa drugorzędą rolę, a najczęstszą zmianą występującą w tym schorzeniu jest zwyrodnienie wodniczkowe. Podstawę rozpoznania w tym przypadku stanowi wywiad rodzinny, obraz kliniczny, EMG, seryjne pomiary stężenia potasu i ewentualnie próby prowokacyjne. Wykonanie biopsji mięśnia jest również mało przydatne w diagnostyce miopatii endokrynnych, w których jedynie wykrycie zaburzeń hormonalnych potwierdza rozpoznanie. O rozpoznaniu dystrofii twarzowo-łopatkowo-ramieniowej przesądza z reguły obraz kliniczny. Zapis EMG potwierdza obecność zmian pierwotnie mięśniowych. Podsumowanie wyników z biopsji mięśnia u pacjentów z mialgią pokazało również, że jedynie u 20% można ustalić rozpoznanie, a wykonanie badania histopatologicznego powinno być poprzedzone wnikliwą analizą objawów klinicznych i badań elektrofizjologicznych [6].

Powyższe przykłady można podsumować stwierdzeniem, że w przypadku obrazu klinicznego jednoznacznie wskazującego na daną chorobę nerwowo-mięśniową w połączeniu z wywiadem rodzinnym w pierwszej kolejności w celu ostatecznego ustalenia roz-

poznania powinno się wykonać inne badania dodatkowe i badania genetyczne [7].

Biopsja mięśnia w dobie badań molekularnych

Badanie biopsyjne mięśnia stanowi ważny punkt odniesienia dla innych metod diagnostycznych, jednak często nie jest w stanie rozstrzygnąć, czy proces jest uogólniony czy zlokalizowany oraz jaka jest jego dynamika. Problemy te wynikają z niemożności powtórzenia biopsji w tym samym miejscu oraz pobrania wycinka z kilku mięśni jednocześnie lub z kilku miejsc danego mięśnia. Zdarza się także, że mimo obecności objawów klinicznych obraz biopsji jest prawidłowy. Taki wynik nie rozstrzyga o rozpoznaniu i może być spowodowany niewłaściwym wyborem mięśnia do wycinka.

O trudnościach diagnostycznych w chorobach nerwowo-mięśniowych świadczą wyniki badań, w których wstępna diagnoza po wykonaniu biopsji mięśnia została zmieniona w 47% przypadków [8]. Najczęściej stwierdzano zmiany o charakterze pierwotnie mięśniowym, ale 20% pacjentów miało zmiany niespecyficzne, a 14% biopsji opisano jako wycinki prawidłowe. Biopsję mięśnia w cytowanym badaniu określono jako istotną w procesie diagnostycznym w 74% przypadków [8]. Jej wynik nie tylko umożliwił ustalenie rozpoznania, ale również zmienił dotychczas stosowane leczenie. Tym samym biopsja mięśnia często stanowi swoisty wyznacznik dalszego postępowania lekarza i decyduje o wyborze badań dodatkowych, w tym badań molekularnych.

Symptomatologia chorób mięśni obejmuje w większości przypadków takie objawy, jak osłabienie o nasileniu stałym lub zmiennym, niedowład i zanik mięśni oraz odchylenia w badaniach laboratoryjnych i elektromiograficznych. Badania ostatnich dekad umożliwiają coraz głębsze poznanie poszczególnych jednostek chorobowych i wprowadzają klasyfikację głównie na podstawie zmian molekularnych (tab. 2.–6.) [9–11]. W procesie diagnostycznym u wielu pacjentów trudno jest bliżej określić przypuszczalny defekt genetyczny jedynie na podstawie objawów klinicznych i wywiadu rodzinnego, dlatego istotna jest rola badań dodatkowych, w tym szczególnie oceny histopatologicznej i immunohistochemicznej biopsji mięśnia. Przykładem może tu być stwierdzenie w biopsji zmian o charakterze dystrofii (tab. 2.) [9,11]. Aktualnie uważa się, że w diagnostyce dystrofii mięśniowych typu Duchenne’a lub Beckera biopsja nadal odgrywa istotną

Tabela 2. Przykłady korelacji kliniczno-genetycznych w dystrofinopatiach i laminopatiach**Table 2.** Examples of phenotype-genotype correlations in dystrophinopathies and laminopathies

	Immunohistochemia	Gen/białko/dziedziczenie*
Dystrofinopatie		
dystrofia mięśniowa Duchenne'a	całkowity brak dystrofiny	<i>DMD</i> /dystrofina/XR
dystrofia mięśniowa Beckera	częściowy brak dystrofiny	<i>DMD</i> /dystrofina/XR
nosicielki mutacji dystrofii mięśniowej Duchenne'a lub Beckera	mozaikowy brak dystrofiny	<i>DMD</i> /dystrofina/XR
Laminopatie		
dystrofia Emery'ego-Dreifussa	brak laminy A/C w błonie jądrowej brak emeryny w błonie jądrowej	<i>LMNA</i> /lamina A/C/AD lub AR <i>EMD</i> /emeryna/XR <i>FHL1</i> /białko FHL1/XR <i>SYNE1</i> /nespryna 1/AD <i>SYNE2</i> /nespryna 2/AD

*Dane zaadaptowane z [9,11]

XR – dziedziczenie sprzężone z chromosomem X, recesywne; AD – dziedziczenie autosomalne dominujące; AR – dziedziczenie autosomalne recesywne

Tabela 3. Przykłady korelacji kliniczno-genetycznych w dystrofiach obręczowo-kończynowych**Table 3.** Examples of phenotype-genotype correlations in limb-girdle muscular dystrophies

Dystrofie obręczowo-kończynowe (limb-girdle muscular dystrophies – LGMD)	Charakterystyczne cechy morfologiczne	Gen/białko/dziedziczenie*
LGMD 1A	cechy dystroficzne	<i>MYOT</i> /miotylina/AD
LGMD 1B	brak laminy A/C	<i>LMNA</i> /lamina A/C/AD
LGMD 1C	brak kaweoliny-3	<i>CAV3</i> /kaweolina-3/AD
LGMD 1D	cechy dystroficzne	?/AD
LGMD 1E	cechy dystroficzne	?/AD
LGMD 1F	cechy dystroficzne	<i>LGMD 1F</i> ?/AD
LGMD 1G	cechy dystroficzne	<i>LGMD 1G</i> ?/AD
LGMD 2A	<i>lobulated fibers</i>	<i>CANP3</i> /kalpaina 3/AR
LGMD 2B	brak dysferliny	<i>DYSF</i> /dysferlina/AR
LGMD 2C	brak sarkoglikanów	<i>SGCG</i> /γ-sarkoglikan/AR
LGMD 2D	brak sarkoglikanów	<i>SGCA</i> /α-sarkoglikan/AR
LGMD 2E	brak sarkoglikanów	<i>SGCB</i> /β-sarkoglikan/AR
LGMD 2F	brak sarkoglikanów	<i>SGCD</i> /δ-sarkoglikan/AR
LGMD 2G	cechy dystroficzne	<i>TCAP</i> /teletonina/AR
LGMD 2H	cechy dystroficzne	<i>TRIM32</i> /TRIM32/AR
LGMD 2I	cechy dystroficzne	<i>FKRP</i> /białko związane z fukutiną/AR
LGMD 2J	cechy dystroficzne	<i>TTN</i> /titina/AR
LGMD 2K	cechy dystroficzne	<i>POMT1</i> /mannozylotransferaza 1 białka O/AR
LGMD 2L	cechy dystroficzne	<i>ANO5</i> /anoktamina5/AR
LGMD 2M	cechy dystroficzne	<i>FKTN</i> /fukutina/AR
LGMD 2N	cechy dystroficzne	<i>POMT2</i> /mannozylotransferaza 2 białka O/AR
LGMD 2O	cechy dystroficzne	<i>POMGNT1</i> /acetylglikozaminotransferaza/AR

*Dane zaadaptowane z [9-11]

AD – dziedziczenie autosomalne dominujące; AR – dziedziczenie autosomalne recesywne

rolę. Wykonanie testów genetycznych u chłopców z podejrzeniem jednej z tych dystrofii umożliwia ustalenie pewnego rozpoznania u 60% chorych. W przy-

padkach, gdy nie stwierdza się delecji ani duplikacji w Xp21, a niemożliwe jest sekwencjonowanie genu dla dystrofiny w poszukiwaniu mutacji punktowych,

Tabela 4. Przykłady korelacji kliniczno-histopatologicznych w miopatiach zapalnych (zaadaptowano z [15,16])
Table 4. Examples of phenotype-histopathological correlations in inflammatory myopathies (adapted from [15,16])

Miopatie zapalne	Charakterystyka histopatologiczna
zapalenie skórno-mięśniowe	zanik włókien mięśniowych zlokalizowany głównie na obwodzie pęczków (<i>perifascicular atrophy</i>) nacieki zapalne wokół naczyń i w omięsnej, złożone w większości z limfocytów B oraz z mniej licznych limfocytów T CD4+ złogi immunoglobulin i dopełniacza w ścianie naczyń mogące prowadzić do ich zamknięcia
zapalenie wielomięśniowe	nacieki zapalne złożone z limfocytów T CD8+, położone wokół niezmiennych włókien mięśniowych i prowadzące do ich zniszczenia
wtrętowe zapalenie mięśni	nacieki zapalne wokół włókien mięśniowych <i>rimmed vacuoles</i> tubulofilamentarne wtręty w cytoplazmie i/lub w jądrze

Tabela 5. Przykłady korelacji kliniczno-genetycznych w miopatiach wrodzonych
Table 5. Examples of phenotype-genotype correlations in congenital myopathies

Miopatie wrodzone	Gen/białko/dziedziczenie*
miopatia nemalinowa	<i>TPM3</i> /tropomiozyna 3/AD <i>NEB</i> /nebulina/AR <i>ACTA1</i> /α-aktyna/AD <i>TPM2</i> /tropomiozyna 2/AD <i>TNNT1</i> /troponina T typ 1/AR <i>CFL2</i> /kofilina 2/AR
miopatia wrodzona z dysproporcją włókien	<i>ACTA1</i> /α-aktyna/AD <i>SEPN1</i> /selenoproteina N1/AR
miopatia typu <i>multiminicore</i> z oftalmoplegią zewnętrzną, miopatia typu <i>multiminicore</i> , forma klasyczna	<i>RYR1</i> /receptor rianodynowy 1/AR <i>SEPN1</i> /selenoproteina N1/AR
miopatia centronuklearna	<i>DNM2</i> /dynamina 2/AD <i>BIN1</i> /amfifizyna/AR
miopatia <i>central core</i>	<i>RYR1</i> /receptor rianodynowy 1/AR

*Dane zaadaptowane z [9,11]

AD – dziedziczenie autosomalne dominujące; AR – dziedziczenie autosomalne recesywne

konieczne jest przeprowadzenie biopsji mięśnia w celu wykonania badania immunohistochemicznego z użyciem przeciwciał przeciwko dystrofynie. W niektórych przypadkach konieczne jest również wykonanie immunoblottingu w celu określenia ciężaru molekularnego dystrofiny.

Badanie immunohistochemiczne umożliwia także ustalenie rozpoznania w przypadku dystrofii mięśniowej Emery'ego-Dreifussa. Mutacja może dotyczyć genu na chromosomie X kodującego emerynę. W dziedziczonej autosomalnie dominująco dystrofii Emery'ego-Dreifussa defekt genetyczny dotyczy genu kodującego laminę A/C (tab. 2.) [9,11]. W takich sytuacjach badanie immunofluorescencyjne wykazuje brak prawidłowej

Tabela 6. Przykłady korelacji kliniczno-genetycznych w miopatiach miofibrylarnych

Table 6. Examples of phenotype-genotype correlations in myofibrillar myopathies

Miopatie miofibrylarne	Immuno-histochemia	Gen/białko/dziedziczenie*
miopatia miofibrylarna (<i>myofibrillar myopathy</i>)	nagromadzenie αB-kryształiny, nagromadzenie desminy	<i>CRYAB</i> /αB-kryształina/AD <i>DES</i> /desmina/AD
	–	<i>MYOT</i> /miotylina/AD <i>FLNC</i> /filamina C/AD

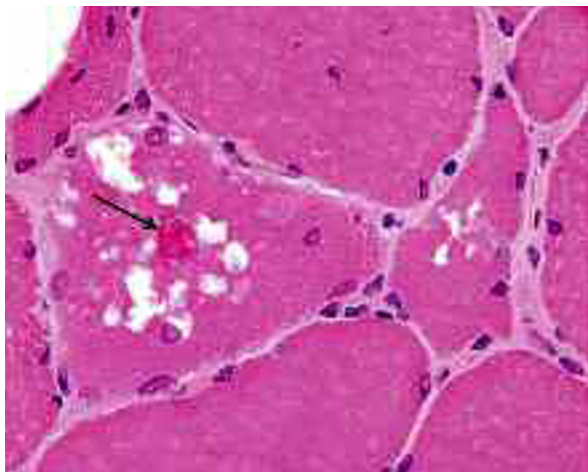
*Dane zaadaptowane z [9,11]

AD – dziedziczenie autosomalne dominujące

emeryny lub lamininy w błonach jądrowych włókien mięśniowych.

W grupie dystrofii obręczowo-kończynowych szczegółowe badania immunohistochemiczne ujawniają natomiast zaburzenia w obrębie różnych białek, m.in. w sarkoglikanach, kaweolinie i dysferlinie. Poszczególne postaci tych dystrofii są podobne do siebie pod względem fenotypu, osłabienie dotyczy głównie obręczy barkowej i biodrowej, aktywność CK jest z reguły średnio zwiększona, a badanie elektromiograficzne wykazuje uszkodzenie miogenne. Ukierunkowana na podstawie barwień immunohistochemicznych diagnostyka molekularna pomaga określić typ dziedziczenia i bliżej scharakteryzować prawdopodobny przebieg kliniczny choroby (tab. 3.) [9-11].

Istnieje grupa dystrofii, w których typowy obraz kliniczny przesądza o rozpoznaniu i w których wykonuje się analizę genetyczną z pominięciem biopsji mięśnia. Mowa tu o wspomnianej wcześniej dystrofii miotonicznej oraz o dystrofii twarzowo-łopatkowo-ramiennej. Stwierdzenie obecności w biopsji mięśnia *rimmed vacuoles* i palisadowanych wtrętów wewnątrz-



Ryc. 1. Wtrętowe zapalenie mięśni: włókno zawierające wodniczki i kwasochłonny wtręt (strzałka), HE \times 400

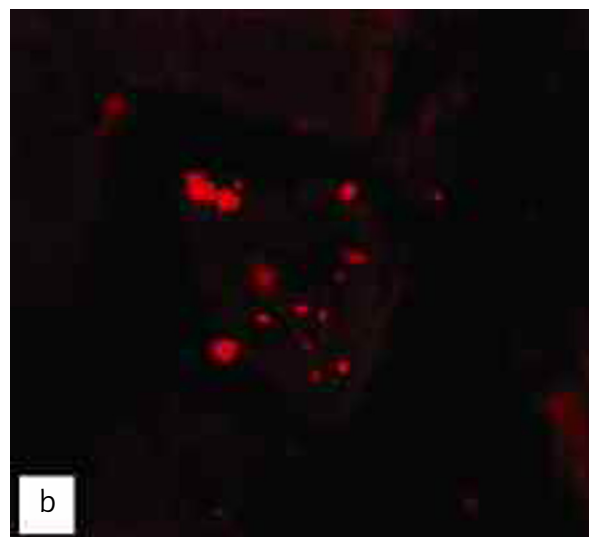
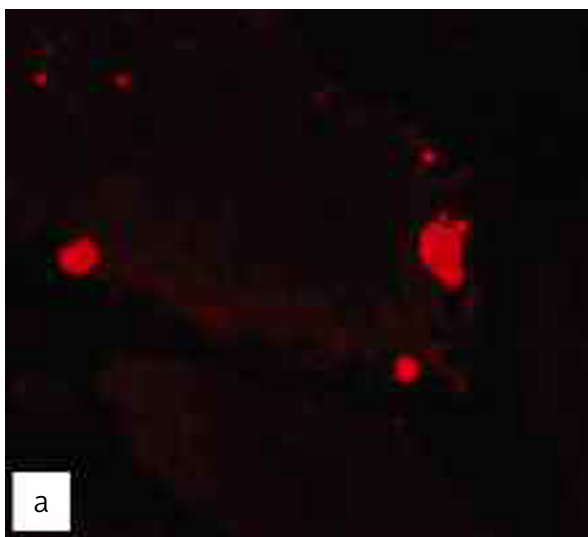
Fig. 1. Inclusion body myositis (IBM): vacuoles and IBM type inclusion (arrow), HE \times 400

jądrowych upoważnia, bez konieczności wykonywania dalszych badań, do rozpoznania dystrofii oczno-gardłowej. Zmiany histopatologiczne nie zawsze są jednak obecne, toteż przy podejrzeniu tej choroby istotne jest wykonanie badań genetycznych [12].

Jedno z częstszych wskazań do wykonania biopsji mięśnia to podejrzenie występowania miopatii zapalnej [13,14]. Biopsja jest szczególnie przydatna w różnicowaniu pomiędzy zapaleniem wielomięśniowym a wtrętowym zapaleniem mięśni. Do cech charakterystycznych w obrazie morfologicznym wtrętowego zapalenia mięśni

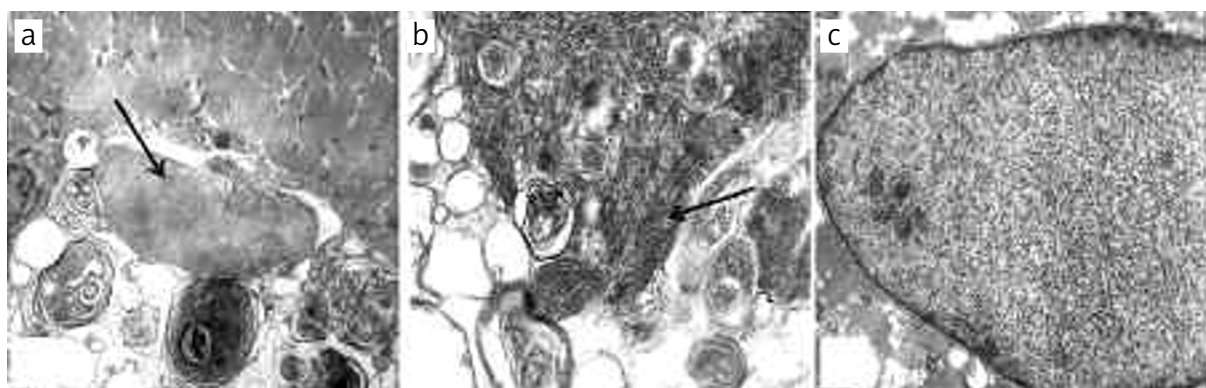
zalicza się nacieki z komórek jednojądrzastych oraz obecność wodniczek z zasadochłonnymi wtrętami i wtrętów cytoplazmatycznych (tab. 4., ryc. 1.) [15,16]. Barwienia immunohistochemiczne wykazują we wtrętach obecność takich białek, jak amyloid- β , fosforylowane białko tau, α -synukleina, apolipoproteina E i TDP-43 (ryc. 2.) [17–19]. W mikroskopie elektronowym obserwuje się wtręty tubulofilamentarne o charakterystycznej budowie i średnicy, położone zarówno w cytoplazmie, jak i wewnątrzjądrowo (ryc. 3.). W przypadkach rodzinnych IBM stwierdza się mutacje w genie kodującym białko zawierające walozynę (VCP) lub w genie GNE.

Przykładem chorób mięśni, w których zmiany dotyczą ponadto wielu innych układów i narządów, są cytopatie mitochondrialne. Do najczęściej objętych procesem chorobowym należą tkanka mięśniowa i nerwowa. W biopsji mięśnia w większości przypadków obserwuje się włókna „szmatowate” oraz włókna o podwyższonej aktywności w enzymach utleniających i braku aktywności oksydazy cytochromu C [11]. Ze względu na bardzo różnorodny przebieg kliniczny tych chorób i pozostawanie enzymów łańcucha oddechowego pod podwójną kontrolą genomu mitochondrialnego i jądrowego w części przypadków biopsja wykazuje jednak zmiany niespecyficzne. Cennym badaniem uzupełniającym jest niejednokrotnie ocena w mikroskopie elektronowym. Nagromadzenie mitochondriów o nieprawidłowej budowie i układzie grzebieni oraz obecność wewnątrzmitochondrialnych wtrętów parakrystalicznych



Ryc. 2. Wtrętowe zapalenie mięśni: (a) złogi β -amyloidu, ICC \times 400; (b) złogi białka tau, ICC \times 400

Fig. 2. Inclusion body myositis: (a) β -amyloid deposits, ICC \times 400; (b) tau protein deposits, ICC \times 400



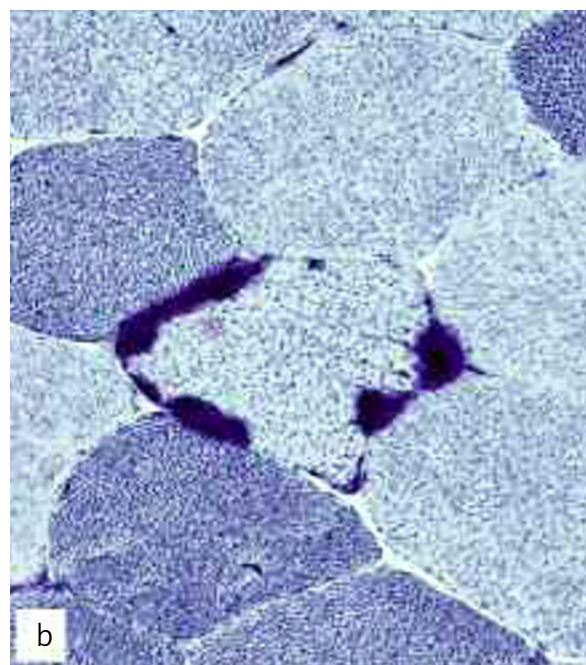
Ryc. 3. Wtrętowe zapalenie mięśni: (a) wtręt w świetle wodniczki (strzałka), EM \times 7000; (b) wtręt w świetle wodniczki złożony z tubulofilamentów (strzałka), EM \times 40 000; (c) jądro zawierające tubulofilamenty, EM \times 20 000

Fig. 3. Inclusion body myositis (IBM): (a) IBM type inclusion (arrow), EM \times 7000; (b) IBM type inclusion containing tubulofilaments (arrow), EM \times 40 000; (c) nucleus containing tubulofilamentous structures, EM \times 20 000

może pomóc w ustaleniu rozpoznania. Tkanka mięśniowa może ponadto służyć do badania spektrofotometrycznej aktywności poszczególnych kompleksów łańcucha oddechowego. Diagnostyka molekularna cytopatii mitochondrialnych, oprócz analizy mitochondrialnego DNA uzyskanego z leukocytów krwi obwodowej, wykorzystuje często mięsień pobrany w czasie biopsji. Ze względu na unikalne cechy genetyki mitochondrialnej, takie jak efekt progowy, heteroplazmia, segregacja mito-

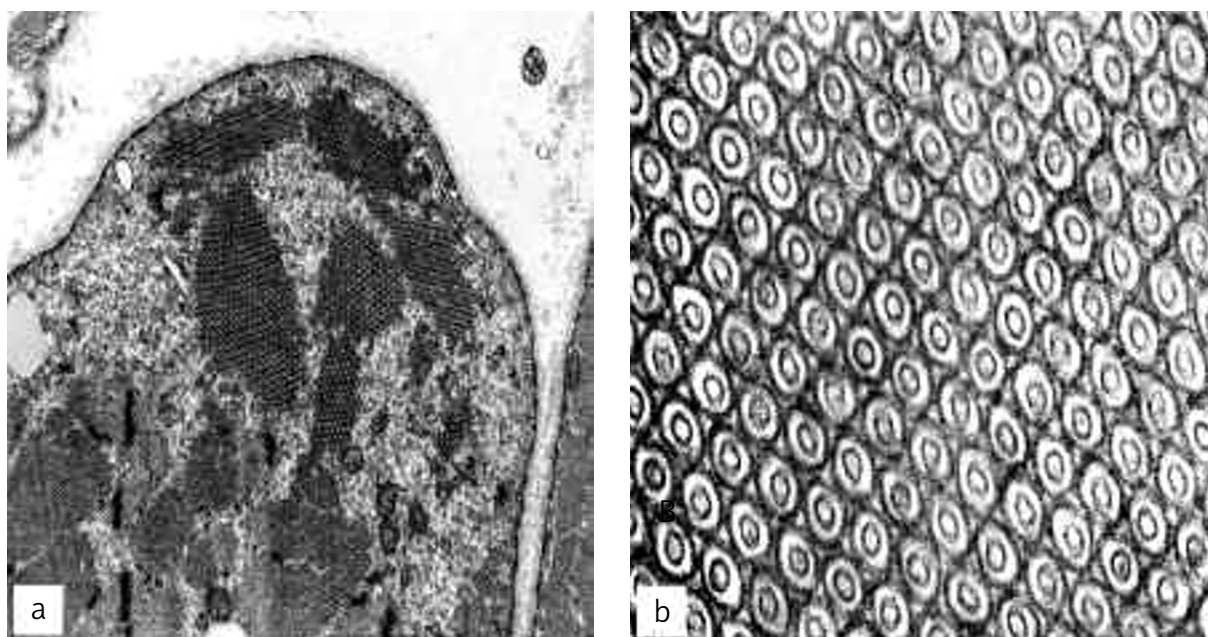
tyczna i dziedziczenie matczyne, wielokrotnie wykrycie mutacji następuje dopiero po badaniu mitochondrialnego DNA uzyskanego z mięśnia szkieletowego.

Na podstawie specyficznych zmian w morfologii włókien mięśniowych wyodrębniono poszczególne typy miopatii wrodzonych i miopatii miofibrilarnych. Początkowy podział w oparciu o zmiany strukturalne i histochemiczne został uzupełniony o informacje na temat konkretnych defektów genetycznych (tab. 5. i 6.) [9,11].



Ryc. 4. Miopatia z tubularnymi agregatami: (a) agregaty tubularne, trichrom Gomoriego \times 100; (b) duża aktywność w barwieniu na dehydrogenazę mleczanową, LDH \times 100

Fig. 4. Myopathy with tubular aggregates: (a) tubular aggregates, Gomori trichrome \times 100; (b) tubular aggregates display high activity with lactic dehydrogenase, LDH \times 100



Ryc. 5. Miopatia z tubularnymi agregatami: (a) wtręty złożone z agregatów tubularnych, EM $\times 10\ 000$; (b) agregaty tubularne, EM $\times 100\ 000$

Fig. 5. Myopathy with tubular aggregates: (a) tubular aggregates, EM $\times 10\ 000$; (b) tubular aggregates, EM $\times 100\ 000$

Niecharakterystyczny obraz kliniczny zespołu wiotkiego dziecka lub osłabienia mięśni w połączeniu z obecnością wad kostnych często utrudniał rozpoznanie. Wykonanie badań immunohistochemicznych i molekularnych uznaje się obecnie za kryteria umożliwiające rozróżnienie miopatii nitkowatych, miopatii z tubularnymi agregatami (ryc. 4. i 5.) czy miopatii typu *central core*.

W dobie ożywionej dyskusji o potrzebie wykonywania biopsji mięśnia warto podkreślić, że wielokrotnie za podobny obraz morfologiczny odpowiadają różne defekty genetyczne. W związku z tym istotne wydaje się wstępne wytyczenie kierunku diagnostyki molekularnej przez biopsję mięśnia. Przykładowo, za obraz miopatii nemalinowej odpowiadają mutacje w różnych genach, dodatkowo o odmiennym sposobie dziedziczenia (tab. 5.) [9,11]. Dlatego też obecnie tak ważną rolę odgrywa precyzyjne określanie korelacji pomiędzy obrazem kliniczno-morfologicznym i zmianami molekularnymi.

Podsumowanie

Informacje, jakie można uzyskać z oceny biopsji mięśnia, zależą przede wszystkim od prawidłowego wyboru mięśnia, zastosowania odpowiednich metod dia-

gnostycznych oraz doświadczenia osób wykonujących to badanie. Biopsja mięśnia szkieletowego wykonywana w celach diagnostycznych w chorobach nerwowo-mięśniowych umożliwia ocenę rodzaju procesu chorobowego (pierwotnie mięśniowy czy neurogenny), dostarcza informacji o przebiegu (ostry czy przewlekły) oraz stopniu zaawansowania choroby. W wielu przypadkach zastosowanie dodatkowych technik – histochemicznych i immunohistochemicznych – pozwala na jednoznaczne rozpoznanie wielu schorzeń, takich jak niektóre dystrofie i miopatie wrodzone. W dobie szybkiego rozwoju zaawansowanych metod molekularnych biopsja mięśnia wciąż stanowi ważne badanie diagnostyczne. Analiza wyników badania elektromiograficznego i wyników biopsji mięśnia wykazuje daleko idące korelacje [20]. Uważa się, że do potwierdzenia obserwowanego w badaniach EMG odnerwienia nie jest konieczna biopsja mięśnia, natomiast w przypadku zapisu miogennej diagnostyczna biopsja mięśnia jest często wskazana [21]. Badania histopatologiczne mogą być ponadto szczególnie przydatne w diagnostyce tzw. trudnych przypadków, gdzie obraz kliniczny oraz wyniki badań elektrofizjologicznych i laboratoryjnych nie są w stanie rozstrzygnąć o ostatecznym rozpoznaniu.

Oświadczenie

Autorzy zgłaszają brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

1. Brink J. Open muscle biopsy. *Oper Tech Gen Surg* 2002; 4: 235-238.
2. Hausmanowa-Petrusewicz I. [red.]. Choroby nerwowo-mięśniowe. *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa 1999.
3. Dubowitz V., Sewry C.A. The procedure of muscle biopsy. W: Dubowitz V., Sewry C.A. *Muscle biopsy: a practical approach*. Wyd. 3. *Saunders Elsevier*, Philadelphia 2007, ss. 3-39.
4. Kamińska A. Histopatologia i histochemia mięśnia szkieletowego w normie i uszkodzeniach pierwotnie mięśniowych. W: Drozdowski W. [red.]. *Postępy w diagnostyce i leczeniu chorób mięśni*. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2004, ss. 11-12.
5. Jamshidi R., Harrison M.R., Lee H. i wsp. Indication for pediatric muscle biopsy determines usefulness. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 2199-2201.
6. Filosto M., Tonin P., Vattermi G. i wsp. The role of muscle biopsy in investigating isolated muscle pain. *Neurology* 2007; 68: 181-186.
7. Anderson J.R. Recommendations for the biopsy procedure and assessment of skeletal muscle biopsies. *Virchows Arch* 1997; 431: 227-233.
8. Lai C.H., Melli G., Chang Y.J. i wsp. Open muscle biopsy in suspected myopathy: diagnostic yield and clinical utility. *Eur J Neurol* 2010; 17: 136-142.
9. Gene Table of Neuromuscular Disorders; dostępne na: <http://www.musclegenetable.org>.
10. Rowland L.P. *Merritt's Neurology*. 11th ed. *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia 2005, ss. 893-895.
11. O'Ferrall E.K., Sinnreich M. The role of muscle biopsy in the age of genetic testing. *Curr Opin Neurol* 2009; 22: 543-553.
12. Nadaj-Pakleza A., Richard P., Lusakowska A. i wsp. Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic characteristics of 9 Polish patients. *Neurol Neurochir Pol* 2009; 43: 113-120.
13. Laguno M., Miró O., Perea M. i wsp. Muscle diseases in elders: a 10-year retrospective study. *J Gerontol Med Sci* 2002; 57: M378-M384.
14. Lacomis D. The utility of muscle biopsy. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2004; 4: 81-86.
15. Dalakas M.C., Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 2003; 362: 971-982.
16. Karpati G., Hilton-Jones D., Griggs R.C. *Disorders of Voluntary Muscle*. 7th ed. *Cambridge University Press*, Cambridge 2001, ss. 636-659.
17. Dalakas M.C. Sporadic inclusion body myositis – diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2: 437-447.
18. Engel W.K., Askanas V. Inclusion-body myositis. Clinical, diagnostic, and pathologic aspects. *Neurology* 2006; 66 (2 suppl 1): S20-S29.
19. Askanas V., Engel W.K., Nogalska A. Inclusion body myositis: a degenerative muscle disease associated with intra-muscle fiber multi-protein aggregates, proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress and decreased lysosomal degradation. *Brain Pathol* 2009; 19: 493-506.
20. Buchthal F., Kamieniecka Z. The diagnostic yield of quantified electromyography and quantified muscle biopsy in neuromuscular disorders. *Muscle Nerve* 1982; 5: 265-280.
21. Al Saleh A., Oware A., Kane N. The correlation between EMG and muscle biopsy. *Clin Neurophysiol* 2007; 118: e145-e147.