

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE**



**lek. Filip Fliciński**

**Analiza wpływu dziedzicznych mutacji genów *COL1A*, *COL5A1*,  
*COL11A*, *COMP*, *GSTM1* na zachorowanie na zespół kanału nadgarstka**

*Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu*

*Dyscyplina nauki medyczne*

*Promotor: prof. dr hab. med. Andrzej Żyłuk*

**Szczecin 2023 r.**

# SPIS TREŚCI

1	WSTĘP .....	1
1.1	Wiadomości ogólne.....	1
1.2	Genetyczne predyspozycje do zespołu kanału nadgarstka.....	20
1.3	Terminy używane w badaniach genetycznych.....	30
1.4	Uzasadnienie wyboru tematu badawczego .....	32
2	CEL PRACY.....	33
3	MATERIAŁ I METODYKA.....	34
3.1	Materiał kliniczny .....	34
3.2	Metodyka.....	38
4	WYNIKI .....	41
4.1	Wyniki fazy detekcji .....	41
4.2	Wyniki badania „in silico” potencjalnej patogenności wykrytych mutacji .....	42
4.3	Wyniki badania asocjacyjnego.....	44
4.4	Obustronne występowanie zespołu kanału nadgarstka u pacjentów.....	45
4.5	Podsumowanie wyników badań.....	45
5	DYSKUSJA .....	47
5.1	Znaczenie mutacji genów kodujących syntezę kolagenu.....	48
5.2	Wpływ mutacji w genach kodujących syntezę metaloproteinaz matrix komórkowego. ....	51
5.3	Związek między mutacjami w genie <i>COMP</i> (ang. cartilage oligomeric matrix protein) i ZKN.....	54
5.4	Wpływ mutacji w genach kodujących syntezę wariantów S-transferazy glutationowej (GST).....	55
5.5	Rodzinne występowanie zespołu kanału nadgarstka .....	56
5.6	Jednoczesne występowanie zespołu kanału nadgarstka w obu rękach.....	59
5.7	Genetyczne czynniki charakteryzujące współwystępowanie ZKN i zatraskującego palca... ..	60
5.8	Podsumowanie wyników badań.....	62
6	WNIOSKI .....	64
7	WYKAZ RYCIN .....	65
8	PIŚMIENNICTWO.....	66
9	STRESZCZENIE .....	73
10	ABSTRACT .....	75

# 1 WSTĘP

## 1.1 WIADOMOŚCI OGÓLNE.

### 1.1.1. Co to jest zespół kanału nadgarstka?

Zespół kanału nadgarstka (w skrócie ZKN) należy do tzw. neuropatii uciskowych. Są to częste schorzenia nerwów, znacząco wpływające na jakość życia i zdolność do pracy. Polegają one na ucisku nerwów obwodowych w miejscach anatomicznych przewężeń na drodze ich przebiegu. Najbardziej powszechną z nich jest zespół kanału nadgarstka. Jest to, jak wskazuje definicja, objawowa neuropatia uciskowa nerwu pośrodkowego na poziomie nadgarstka, charakteryzująca się wzrostem ciśnienia w kanale nadgarstka i zaburzeniami funkcji nerwu na tym poziomie. Częstość występowania wynosi ok. 2% w całej populacji i 6% wśród kobiet pow. 40 roku życia. Pomimo swojej powszechności patofizjologia tej choroby nie jest do końca poznana. Od dekady następują próby udowodnienia związku występowania zespołu nadgarstka z czynnikami genetycznymi, zwłaszcza w rodzinie występujących przypadkach choroby [1-4].

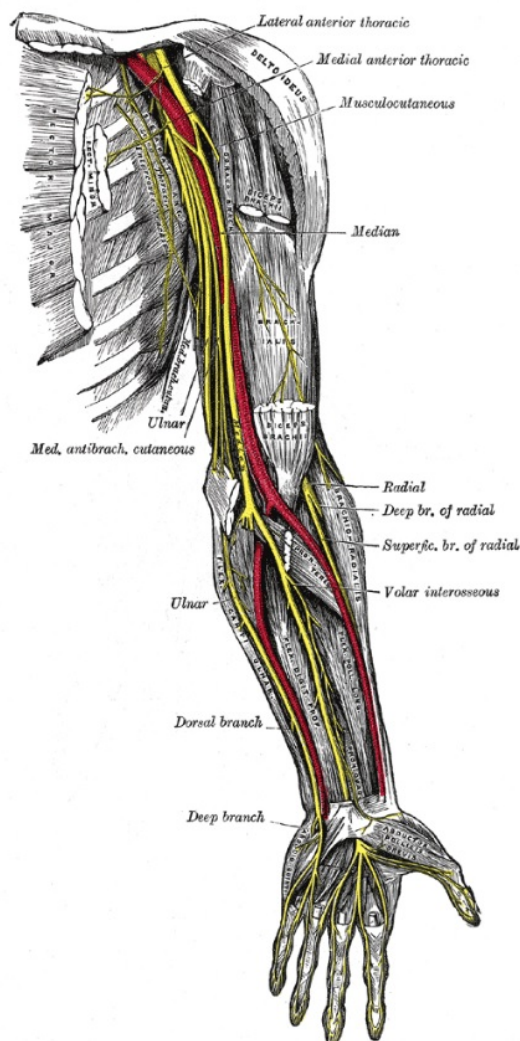
### 1.1.2. Anatomia nerwu pośrodkowego i kanału nadgarstka.

#### a. Nerw pośrodkowy (ryc. 1.1)

Nerw pośrodkowy jest nerwem mieszanym (czuciowo-ruchowym), utworzonym z połączenia dwóch korzeni splotu ramiennego: bocznego (C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>) i przyśrodkowego (C<sub>8</sub>-Th<sub>1</sub>). Na ramieniu biegnie w obrębie pęczka naczyniowo-nerwowego po stronie przyśrodkowej i przechodzi na przedramię między dwiema głowami mięśnia nawrotnego obłego, gdzie może dochodzić do ucisku nerwu. Na przedramieniu przechodzi między mięśniami zginaczami powierzchownymi i głębokimi palców, docierając do nadgarstka. Tutaj położony jest podpowięziowo, między ścięgnem m. dłoniowego długiego, a promieniowym zginaczem nadgarstka. Po wyjściu z kanału nadgarstka, na wysokości jego brzegu dalszego nerw rozgałęzia się na:

- Nerwy palcowe wspólne dla palców I-III i promieniowej połowy palca IV.
- Nerwy palcowe właściwe dla poszczególnych palców powstają na wysokości głów kości śródreżca z podziału nerwów palcowych wspólnych. Unerwiają one skórę dłoniowej strony palców I-III oraz promieniowej połowy palca IV.

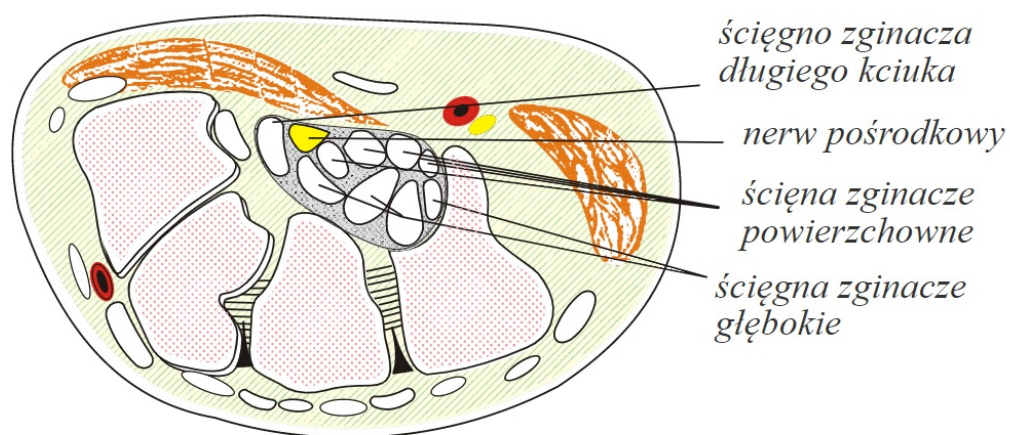
Istotne znaczenie ma przebieg dwóch gałęzi nerwu pośrodkowego: gałęzi ruchowej do mięśni kłędu kciuka i gałęzi czuciowej dłoniowej. Gałązka ruchowa do mięśni kłędu kciuka w połowie przypadków odchodzi od nerwu wspólnego palców I-II za troczkiem zginaczy, w 30% oddziela się od promieniowej strony pnia nerwu w kanale nadgarstka i biegnie dalej pod troczkiem zginaczy, zawraca na troczek dochodząc do mięśni kłędu kciuka, a u 20% pacjentów, po oddzieleniu się w kanale nadgarstka przebija troczek zginaczy i zmierza do kłędu. Gałązka skórna dłoniowa, natomiast, odchodzi od pnia nerwu w dalszej części przedramienia, ok. 5 cm od kresy nadgarstkowej bliższej, przebija powięź i schodzi dystalnie nad więzadłem poprzecznym, dzieląc się na dwie gałęzi: zewnętrzną, która zaopatruje opuszkę kciuka i wewnętrzną, która unerwia powierzchnię dłoniową ręki, łącząc się z gałęzią skórną nerwu łokciowego. Obie te gałęzi są potencjalnie narażone na uszkodzenie przy operacji kanału nadgarstka.



Ryc. 1.1 Przebieg nerwu pośrodkowego.

### **b. Kanał nadgarstka (ryc. 1.2)**

Kanał nadgarstka jest tunelem ograniczonym z trzech stron przez kości nadgarstka, a z jednej przez więzadło poprzeczne nadgarstka. Kostnymi ograniczeniami są kość łódeczkowata i grochowata w części bliższej, oraz kość haczykowata i czworoboczna w części dalszej. Więzadło poprzeczne rozpięte jest między wyniosłościami wcześniej wymienionych kości: haczykiem kości haczykowatej i kością grochowatą po stronie łokciowej, a guzkiem kości czworobocznej i guzkiem kości łódeczkowatej po stronie promieniowej. Więzadło jest bezpośrednim przedłużeniem powięzi przedramienia, a w części dalszej przechodzi w rozciągno między dwoma grupami mięśni: kłębu kciuka i kłębika palca małego. Ściany kanału nadgarstka, z uwagi na ich kostno-włóknistą strukturę, charakteryzują się bardzo małą podatnością na rozciąganie. Gdy ciśnienie w kanale nadgarstka rośnie, jego ściany nie są w stanie rozciągnąć się i zwiększyć pola przekroju kanału w celu zmniejszenia panującego w nim ciśnienia. Dotyczy to zmian ostrych, ale i przewlekłych. W kanale nadgarstka nerw jest jedną z 10 struktur, towarzysząc czterem ścięgnom zginaczom palców powierzchownym, czterem ścięgnom zginaczom palców głębokim i ścięgnu mięśnia zginacza długiego kciuka. Wolne przestrzenie między nimi wypełnione są przez błonę maziową.



Ryc. 1.2 Przekrój poprzeczny przez kanał nadgarstka.

### 1.1.3. Budowa nerwu obwodowego (ryc. 1.3)

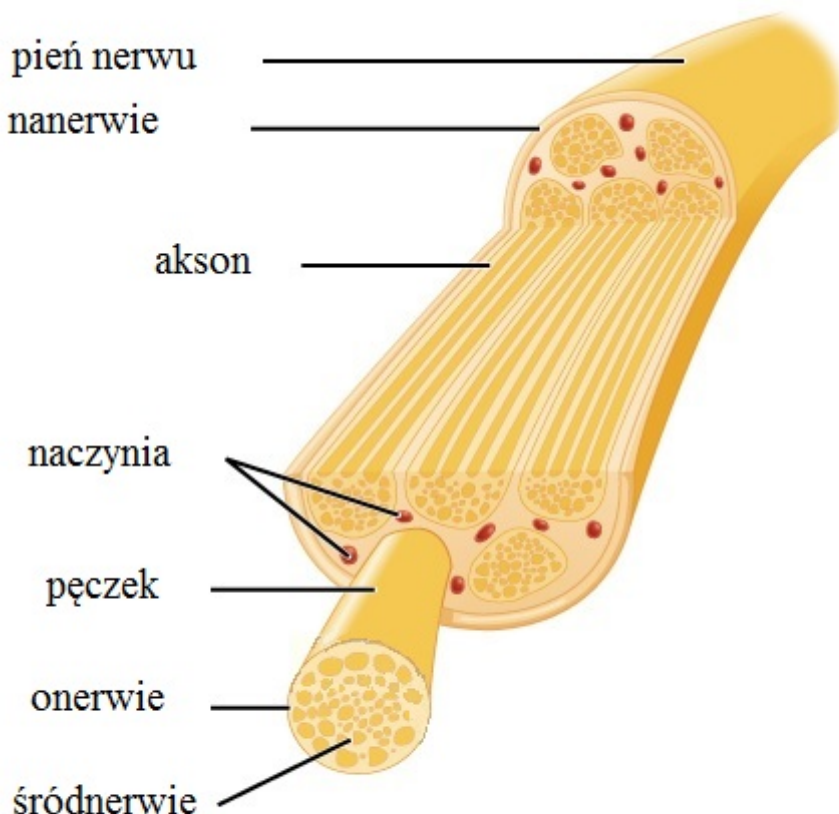
Nerw jest pęczkiem aksonów otoczonych zrębem. Anatomia nerwów jest dobrze poznana. Już wczesne badania nad nerwami stworzyły klasyfikację poszczególnych ich komponentów. Najmniejszym elementem nerwu jest akson (włókno nerwowe, wypustka pojedynczej komórki nerwowej). Poszczególne aksony mogą być okryte osłonką mielinową lub nie. Włókna zebrane razem tworzą większą podjednostkę - pęczek. Różnią się one od siebie wielkością i zawartością włókien w zależności od rodzaju nerwu. Pęczki zmieniają się także wzdłuż przebiegu nerwu obwodowego. Architektura pęczków jest bardziej złożona w części proksymalnej nerwu, posiadając w tej części więcej połączeń między pęczkami. W części dalszej topografia wewnętrzna staje się bardziej uporządkowana.

Pęczki składają się na pień nerwu. Anatomia pęczkowa pnia może być różna i może składać się z wielu pęczków (polifascicular), kilku pęczków (oligofascicular), bądź posiadać jedynie pojedynczy pęczek (monofascicular). Równie ważnym komponentem nerwów obwodowych jest ich zrąb - tkanka łączna stanowiąca rusztowanie dla aksonów. Wyszczególniamy następujące elementy zrębu, które zostaną omówione od najbardziej wewnętrznych, najmniejszych:

- Śródnerwie (endoneurium, osłonka Keya-Retziusa) - otacza pojedyncze włókna nerwowe. Jest to luźna macierz zawierająca kolagen, mająca funkcję głównie ochronną. Nie posiada istotnej odporności mechanicznej.
- Onerwie (perineurium) - otacza pojedyncze pęczki. Ma budowę blaszkową, posiadając od jednej do kilku warstw. Składa się z licznych włókien kolagenowych i komórek mioepitelialnych. Tworzy ważną barierę krew-nerw nieprzepuszczalną dla większości cząstek. Jest to bariera analogiczna do bardziej znanej bariery krew-mózg, nie jest jednak tak restrykcyjna. Makroskopowo onerwie jest tkanką dość miękką, nieodporną mechanicznie i łatwo oddzielającą się od włókien przez nią otaczanych.
- Nanerwie (epineurium) - Otacza cały nerw. Stosunkowo odporna, wytrzymała mechanicznie warstwa. Składa się z licznych włókien kolagenowych i elastynowych.
- Przynerwie (paraneurium/mesoneurium) - wypełnia okolice nerwu stabilizując jego położenie i umożliwia ruch nerwu względem okolicznych tkanek. Możliwość ruchu jest dla nerwów obwodowych ważna. Nerw pośrodkowy podczas ruchów zgięcia dłoniowego i grzbietowego nadgarstka „ślizga” się o około 10 mm. Ograniczenie

ruchu ślizgowego, np. w przebiegu zrostów pourazowych czy pooperacyjnych, może powodować dyskomfort i dolegliwości.

Stosunek zrębu do tkanki nerwowej różni się w zależności od nerwu. Nerwy obwodowe zmieniają także ten stosunek wzdłuż swojego przebiegu. Typowo wzdłuż przebiegu nerwu rośnie ilość zrębu względem włókien.



Ryc. 1.3 Budowa nerwu obwodowego.

#### 1.1.4. Patofizjologia zespołu kanału nadgarstka

Zespół kanału nadgarstka nie jest ograniczony wiekiem, płcią, pochodzeniem etnicznym ani wykonywanym zawodem. Jego występowanie może być związane z wieloma czynnikami ogólnoustrojowymi lub aktywnymi miejscowo. Bezpośrednią przyczyną tego zespołu jest wzrost ciśnienia panującego w kanale nadgarstka. W większości przypadków przyczyna wzrostu ciśnienia pozostaje idiopatyczna, rzadko udaje się wskazać konkretną przyczynę.

Znane są czynniki sprzyjające wystąpieniu tego zespołu, lecz nie można tu powiedzieć o przyczynowości. Czynniki sprzyjające ZKN zostaną omówione w osobnym podrozdziale [1, 6].

#### **a. Zwiększone ciśnienie w kanale nadgarstka**

Istotą ZKN jest przewlekłe występujące w nim zbyt wysokie ciśnienie. Jest ono fizjologicznie zmienne przy różnym ułożeniu ręki. W spoczynku u osoby zdrowej w pozycji neutralnej nadgarstka opisywane jest ono na około 2,5-15 mmHg. Pozycje maksymalnego zgięcia grzbietowego i dłoniowego nadgarstka charakteryzują się ciśnieniem wyższym, sięgającym 30 mmHg. W osób chorych ciśnienia są znamienne wyższe. W pozycji neutralnej można spodziewać się wartości około 12-43 mmHg. Pozycja zgięcia grzbietowego o 90° zwiększa ciśnienie do 33-110 mm Hg, a zgięcia dłoniowego o 90° zwiększa ciśnienie do 27-94 mmHg. Wartości ciśnień opisywane przez autorów eksperymentów różnią się. Różnice mogą pojawiać się w związku z niejednorodnym ciśnieniem w kanale, zmiennym w różnych jego miejscach, osiągającym maksymalne w części centralnej, na wysokości haczyka kości haczykowatej. Udział w różnicach pomiaru może mieć także brak standaryzacji urządzeń pomiarowych użytych podczas eksperymentów. Wszystkie prace są jednak zgodne, że osoby z rozpoznanyim zespołem kanału nadgarstka charakteryzują się wyższymi wartościami ciśnienia w nim panującego. U wszystkich pacjentów poddanych pomiarom podczas zabiegu odbarczenia kanału nadgarstka znamieny był spadek ciśnienia do wartości fizjologicznych mierzony śródoperacyjnie.

#### **b. Konsekwencje ucisku na nerw pośrodkowy**

Przewlekły ucisk nerwu powoduje w pierwszym okresie zaburzenie odpływu żylnego z tego obszaru, segmentalne przekrwienie, upośledzenie dopływu tlenu i substratów odżywczych i obrzęk, czego skutkiem jest niedotlenienie segmentalne komórek tworzących nerw. Niedotlenienie jest początkiem całego łańcucha niekorzystnych zjawisk:

- Zaburzenia aktywnego transportu błonowego
- Upośledzenia tworzenia mediatorów błonowych
- Utrudnienie wyzwolenia potencjału czynnościowego
- Regeneracji fragmentu błony komórkowej po wyładowaniu.



W dalszym przebiegu dochodzi do zwiększenia przepuszczalności naczyń włosowatych, przesięku płynu z naczyń do tkanki śródnervowej, obrzęku śródnervowego i zmniejszenia napływu tętniczego do naczyń odżywiających nerw. We wczesnych stadiach zespołu uszkodzenie nerwu ma charakter czynnościowy (przemijający) i objawia się tylko powstawaniem typowych dolegliwości i zwolnieniem przewodzenia impulsów, natomiast długo trwający ucisk powoduje zmiany struktury nerwu przez zanik włókien zmielinizowanych i rozplem tkanki włóknistej. Dekompresja nerwu wykonana odpowiednio wcześnie powoduje przerwanie łańcucha patologicznych zjawisk i szybką poprawę kliniczną. Długo trwający ucisk daje w konsekwencji rozwijanie się włóknienia międzypęczkowego w niedotlenionym nerwie. W takich przypadkach, mimo zewnętrznej dekompresji nerw pozostaje nadal uciśnięty od środka.

Fizjologiczna odpowiedź nerwu na ucisk może przybierać różne formy. Należy do nich:

- Zwolnienie przewodzenia bodźców, aż do całkowitego jego zablokowania.
- Powstawanie impulsacji ektopowej we włóknach efferentnych (ruchowych), co objawia się m.in. drżeniem drobnofalistym, lub skurczami mimowolnymi.
- Powstawanie impulsacji ektopowej we włóknach (czuciowych) afferentnych, co wywołuje ból i odczucie spalonego czucia (parestezje).

Typowa dla mechanicznego uszkodzenia nerwów klasyfikacja, dzieląca je na uszkodzenie typu neuropraksji, aksonotmezy i neurotmezy nie jest pomocna w tłumaczeniu zjawisk zachodzących w zespole kanału nadgarstka. Badanie USG nerwu pośrodkowego i obserwacje śródoperacyjne w zaawansowanych i długo trwających zespołach wskazują na ścięczenie nerwu w miejscu jego ucisku w kanale nadgarstka oraz jego poszerzenie przed wejściem do kanału. W badaniu mikroskopowym, w obszarze ucisku obserwuje się znaczny ubytek grubych, zmielinizowanych aksonów, natomiast proksymalnie do niego, w pogrubiałej części - obrzęk, lokalne nagromadzenie aksoplazmy i zwłóknienie w konsekwencji przewlekłego stanu zapalnego. Choć w większości prac zwraca się uwagę na uszkodzenie grubych, zmielinizowanych włókien w przebiegu zespołu kanału nadgarstka, to rola cienkich, słabo, lub niezmielinizowanych aksonów jest prawdopodobnie, co najmniej tak samo ważna [1, 5].

### 1.1.5. Czynniki sprzyjające powstawaniu zespołu kanału nadgarstka

Przyczyną zespołu kanału nadgarstka jest mechaniczny ucisk na nerw pośrodkowy w kanale nadgarstka, który ma sztywne ściany i każdy stan chorobowy związany z powiększeniem objętości tkanek w jego obrębie pociąga za sobą ucisk na wszystkie struktury, z których najbardziej wrażliwy jest nerw. Natomiast czynników, które doprowadzają do takiego ucisku nerwu pośrodkowego jest wiele i można je podzielić na cztery zasadnicze grupy:

- Zależnych od zmian budowy anatomicznej kanału nadgarstka.
- Zależnych od czynników konstytucjonalnych i rasowych.
- Zależnych od chorób systemowych i lokalnych zmieniających warunki w kanale nadgarstka.
  - Zależnych od czynników zewnętrznych, np. obciążania ręki, które powoduje systematyczne podrażnienie nerwu pośrodkowego.

Należy podkreślić, że największą grupę (ok. 80%) stanowią pacjenci, u których nie można zidentyfikować określonego czynnika będącego przyczyną zespołu kanału nadgarstka - tzw. zespół idiopatyczny.

W praktyce klinicznej najczęściej zespół kanału nadgarstka kojarzy się z płcią, wiekiem i czynnikami konstytucjonalnymi (ogólna budowa ciała): pacjentkami są w 70-80% kobiety, w wieku 40-80 lat i z wyraźną nadwagą. Kobiety zdecydowanie przeważają w statystykach dotyczących zachorowalności na ZKN. Przyczyny tego zjawiska nie są znane. Wiek zachorowania jest różny; w piśmiennictwie przedstawiane są zarówno przypadki zespołu u dzieci, młodzieży, jak i u osób w wieku podeszłym. W rejestrze zespołu kanału nadgarstka w klinice w której pracuje autor, zawierającym dane ponad 1000 leczonych (operowanych) osób, średni wiek pacjentów wynosił 57 lat (zakres 20-92). Dlatego, chociaż powszechnie uważa się, choroba zaczyna się najczęściej w wieku 40 lat, to jednak faktycznie jest to o ok. 10-15 lat później. W piśmiennictwie wykazano statystycznie istotny związek wagi ciała i wskaźnika masy ciała (ang. body mass index, BMI) z zachorowalnością na zespół kanału nadgarstka. Stwierdzono także, że cechy anatomiczne (wielkość ręki i nadgarstka) są inne u chorych z ZKN, niż u osób zdrowych, co może wskazywać, że określona budowa ręki i nadgarstka może sprzyjać powstawaniu zespołu [7, 8]. U pozostałych 20-30% chorych można zidentyfikować któryś z wymienionych niżej czynników:

### **a. Czynniki anatomiczne sprzyjające powstawaniu zkn.**

Do tych czynników należą:

- Wrodzona mała objętość kanału nadgarstka.
- Obecność dodatkowych struktur anatomicznych (mięśnie glistowate, tętnica pośrodkowa, dodatkowe ścięgna).
- Zmiany konfiguracji płaszczyzn kostnych nadgarstka (najczęściej po złamaniach kości nadgarstka lub podstaw kości śródreżca).
- Choroby wrodzone tkanki kostnej, dające przebudowę rusztowania kostnego kanału.

Przebyte urazy dalszego końca przedramienia i nadgarstka, przede wszystkim złamania dalszego końca kości promieniowej (DKKP), rzadziej zwichnięcia i złamania kości nadgarstka mogą także stanowić czynniki sprzyjające powstaniu zespołu. W praktyce spotyka się pacjentki, u których w krótkim czasie po złamaniu DKKP pojawiają się typowe objawy choroby, co zwykle kojarzy się ze zmianą warunków anatomicznych w kanale nadgarstka spowodowaną przemieszczonymi odłamami, krwiakiem lub przerośniętą kostniną. Należy jednak pamiętać, że dalszy koniec kości promieniowej znajduje się przed wejściem do kanału nadgarstka co sprawia, że tylko znaczne przemieszczenie odłamów może spowodować rzeczywisty ucisk na nerw pośrodkowy, co w praktyce zdarza się rzadko. Bardziej prawdopodobne jest, że uraz stanowi czynnik „spustowy”, który wywołuje wcześniejsze wystąpienie objawów choroby, która i tak pojawiłaby się, tylko później (np. po kilku miesiącach lub nawet latach).

### **b. Czynniki konstytucjonalne sprzyjające powstawaniu ZKN.**

Wpływ czynników konstytucjonalnych, anatomicznych i antropometrycznych, związanych z ogólną budową ciała, ręki i nadgarstka na częstość występowania zespołu kanału nadgarstka był stosunkowo często analizowany. Najczęstszymi badanymi parametrami były: waga ciała, wzrost, współczynnik masy ciała (ang. body mass index, BMI) i wymiary ręki lub nadgarstka. W jednej z prac na ten temat badano stosunek grubości (przekrój strzałkowy) do szerokości (przekrój czołowy) nadgarstka (tzw. współczynnik nadgarstkowy - ang. wrist ratio) i stosunek grubości nadgarstka do długości śródreżca (tzw. współczynnik nadgarstek-śródreżce - ang. wrist-palm ratio). Autorzy stwierdzili, że współczynnik nadgarstkowy był statystycznie istotnie wyższy (o 8%) wśród chorych z ZKN (0,75 vs 0,69), podobnie jak współczynnik nadgarstek-śródreżce (o 13%, 0,39 vs 0,34). Oznaczało to, że osoby z ZKN miały względnie grubsze

nadgarstki (w płaszczyźnie strzałkowej) i krótsze śródrezcza, co uznano za cechy predysponujące do rozwinięcia się zespołu [8].

W klinice, w której pracuje doktorant przeprowadzono badanie związku czynników konstytucjonalnych i anatomicznych cech budowy ręki z występowaniem ZKN. W grupie 105 chorych, 84 kobiet (80%) i 21 mężczyzn (20%), w wieku śr. 59 lat z idiopatycznym zespołem kanału nadgarstka, wykonano pomiary ciężaru ciała, wzrostu, obwodu nadgarstka, długości oraz objętości ręki. Takie same pomiary wykonano u osób z grupy kontrolnej, którą stanowiło 105 zdrowych ochotników o podobnej strukturze wieku i proporcjach płci. Statystycznie istotne różnice zanotowano w zakresie wszystkich mierzonych parametrów. W porównaniu do grupy kontrolnej, pacjenci z zespołem kanału nadgarstka byli ciężsi (śr. o 6%), niżsi (śr. o 1,5%), mieli śr. o 9% większy BMI (indeks masy ciała), śr. o 13% większą objętość rąk, śr. o 2% większa długość rąk, a także większy o śr. o 5% obwód nadgarstków. Choć różnice wszystkich tych zmiennych były statystycznie istotne, to z klinicznego punktu widzenia znaczenie miały różnice objętości ręki, obwodu nadgarstka, ciężaru ciała i indeksu masy ciała [9].

Warto zauważyć, że czynniki konstytucjonalne, anatomiczne i antropometryczne związane z większą podatnością do zachorowania na ZKN mogą być uwarunkowane genetycznie i podlegać dziedziczeniu. Dlatego są one uwzględniane w poszukiwaniu mutacji genów mogących wpływać na większe ryzyko zachorowania na ZKN.

### **c. Choroby współistniejące**

Wykazano, że ZKN występuje istotnie częściej w osób z niektórymi schorzeniami, które wymieniono poniżej. W praktyce klinicznej najczęściej trzy pierwsze choroby wiążą się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na ZKN [1, 5, 10].

- Cukrzyca
- Niedoczynność tarczycy (także u pacjentów będących w stanie eutyreozy)
- Reumatoidalne zapalenie stawów
- Choroba zwyrodnieniowa kręgosłupa szyjnego
- Niewydolność nerek (obrzęki)

Inne, rzadsze choroby sprzyjające to: szpiczak mnogi i amyloidoza (złogi amyloidu zwężające zamknięte przestrzenie), hemofilia (jako następstwo wylewu do stawu i postępującej artropatii),

dna moczanowa (powstawanie złogów moczanowych w kanale) i następstwa zakażeń i choroby zakaźne (ropowica głęboka ręki, gruźlica).

### **1.1.6. Epidemiologia**

Zespół kanału nadgarstka jest zdecydowanie najczęstszą neuropatią uciskową występującą w kończynach. Zapadalność wynosi około 90-100 na 100 000 osób, najczęściej powyżej 40 roku życia. Chorobowość to około 5000 osób na 100 000. Szacuje się, że około 1% mężczyzn i 4% kobiet zachoruje na zespół kanału nadgarstka w ciągu swojego życia. Statystyka ta jest podobna dla większości krajów rozwiniętych [1-4].

### **1.1.7. Objawy kliniczne i przebieg choroby (Tabela 1.1)**

Rozpoznanie zespołu kanału nadgarstka opiera się zasadniczo na podstawie objawów klinicznych, zidentyfikowanych na podstawie wywiadu. Badanie przedmiotowe ma mniejsze znaczenie [1-5].

Najczęściej występującymi dolegliwościami w zespole kanału nadgarstka są: uczucie mrowienia drętwienia palców, parestezje i ból ręki w obszarze unerwienia przez nerw pośrodkowy. Terminem „parestezje” określa się nim takie objawy jak: uczucie mrowienia, drętwienia i fenomen „igły i szpilki” - odczucie tysięcy drobnych ukłuc na obszarze kończyny unerwionym przez określony nerw. Miejscem powstawania parestezji jest sam nerw, bez udziału receptorów. Charakterystycznym objawem jest ból i parestezje występujące w nocy, co jest związane z zastojem żylnym, a także z uciskiem na nerw pod wpływem zgięcia nadgarstka bądź leżenia na chorej kończynie.

Ból i drętwienie budzą ze snu, a pacjenci zwykle starają się uzyskać ulgę potrząsając ręką, wkładając ją pod strumień wody lub zwieszając ramie z łóżka. W większości przypadków dolegliwości ustępują po ok. 20-30 minutach, ale mogą powrócić tej samej nocy. Stosunkowo często pacjenci podają, że zdrętwienie palców ręki występuje rano, po nocnym spoczynku i ustępuje po „rozćwiczeniu” ręki w czasie porannych czynności domowych. Typowe jest także pojawianie się drętwienia i bólu przy dłuższym utrzymywaniu nadgarstka w krańcowych pozycjach (maksymalnym zgięciu i wyproście). Mniej często, ból pojawia się po obciążeniu kończyny i ustępuje po zaprzestaniu pracy. Ból i drętwienie mogą promieniować wzdłuż ramienia aż do barku lub szyi. Pacjent może mieć wrażenie, że palce ręki są obrzęknięte, a całe ramię ciężkie. Ponieważ między nerwami pośrodkowym i łokciowym istnieją gałęzie łączące,

objawy mogą również dotyczyć palca serdecznego i małego. Nierzadko, w czasie rozmowy pacjenci pokazują, że objawy (drętwienie, mrowienie i ból) dotyczą końców palców po stronie grzbietowej i dopiero dopytani wskazują, że dotyczą one także strony dłoniowej. To zjawisko wynika z unerwienia dalszej połowy grzbietowych stron palców przez nerw pośrodkowy.

W miarę trwania choroby postępuje także uszkodzenie włókien ruchowych nerwu. Prowadzi do osłabienia ruchomości kciuka – słabsze stają się przeciwstawianie i opozycja, ruchy potrzebne do chwytania przedmiotów. Z uwagi na powolną progresję jest to początkowo niezauważane. Skargi pojawiają się późno, gdy kłopotliwe stają się wypadanie trzymanyh w ręce przedmiotów, odkręcanie słoików czy czynności wymagające precyzji. W ostatniej fazie schorzenia dolegliwości bólowe zanikają i utrwała się brak czucia w zakresie unerwienia nerwu pośrodkowego. Na tym etapie widoczne są zaniki mięśni kłębu kciuka świadczące o przewlekłym deficycie unerwienia ruchowego. Stopień zniszczenia nerwu jest wtedy znaczny, najczęściej nieodwracalny. W tej fazie manifestuje się to utratą pewnego chwytu (wypadanie przedmiotów z ręki), szybszym męczeniem się ręki i kłopotami z wykonywaniem precyzyjnych czynności, np. zapinaniem guzików, szyciem ręcznym, wyciąganiu bilonu z portmonetki itp.

**Tabela 1.1. Typowe objawy zespołu kanału nadgarstka**

Objaw	Częstość występowania
Ból ręki w zakresie unerwienia przez nerw pośrodkowy lub w całej ręce	95%
Drętwienie i mrowienie w zakresie unerwienia przez nerw pośrodkowy lub w całej ręce	95%
Budzenie się w nocy lub nad ranem z powodu ww. objawów	95%
Szybsze ustępowanie ww. objawów po potrząsaniu opuszczoną ręką	90%
Występowanie ww. objawów przy dłuższym zgięciu nadgarstka np. trzymaniu kierownicy, czytaniu gazety lub pisaniu	85%

Taka manifestacja kliniczna może trwać nawet wiele lat i wielu chorych toleruje niezbyt nasilone dolegliwości, nie zgłaszając się do lekarza. W dużej części przypadków choroba jednak postępuje i zmusza pacjenta do szukania pomocy. W bardziej zaawansowanym stadium

ból i parestezje na obszarze unerwianym przez nerw pośrodkowy mogą występować również w ciągu dnia. Czynnikiem nasilającymi te dolegliwości są długotrwałe utrzymywanie ręki w jednej pozycji oraz monotonne powtarzanie np. związanych z pracą zawodową ruchów ręki i nadgarstka. W długo trwających zespołach dochodzi do osłabienia czucia w palcach i zaniku mięśni kłębu kciuka (Ryc. 1.4).

Należy pamiętać, że typowy, „klasyczny” obraz kliniczny, ze wszystkimi wymienionymi objawami występuje u ok. 50-60% pacjentów. U pozostałych choroba może manifestować się nieco inaczej, jednak w większości przypadków (ok. 90%) rozpoznanie kliniczne nie budzi wątpliwości. Jedynie ok. 10% chorych prezentuje tak nietypowe objawy, że wymagają oni uzupełnienia diagnostyki o testy elektrofizjologiczne (badanie przewodnictwa nerwowego i/lub EMG) albo badania obrazowe (np. USG).



Ryc. 1.4 Zaniki mięśni kłębu kciuka w przebiegu zespołu kanału nadgarstka.

### **1.1.8. Diagnostyka zespołu kanału nadgarstka [1-5].**

W diagnostyce ZKN wykorzystuje się badanie kliniczne, testy elektrofizjologiczne i USG.

#### **a. Badanie kliniczne (wywiad, badanie przedmiotowe, testy kliniczne)**

Obecnie większość przypadków podlega rozpoznaniu klinicznemu, postawionemu wyłącznie na podstawie wywiadu i badania przedmiotowego, bez posiłkowania się dodatkową diagnostyką. Zbierany wywiad kierkuje lekarza na rozpoznanie zespołu uciskowego. Pomocne przy stawianiu rozpoznania mogą być test prowokacyjne. Polegają one najczęściej na odtworzeniu podawanych przez pacjenta objawów. Najszerzej rozpowszechnionymi są następujące testy i objawy:

- Test Phalena,
- Odwrócony test Phalena,
- Test Durkana
- Objaw Tinela-Hoffmana,
- Test „scratch collapse”.

W teście Phalena pacjent wykonuje maksymalne dłoniowe zgięcie nadgarstka (lub maksymalne zgięcie grzbietowe w teście odwróconym). Wystąpienie dolegliwości poniżej 60 sekund od rozpoczęcia testu oznacza wynik dodatni.

Test Durkana opiera się na uciśnięciu kanału nadgarstka przez badającego i tym samym zwiększenie ciśnienia tam panującego. Reprodukacja objawów w ciągu 60 sekund potwierdza dodatni wynik testu. Objaw Tinela-Hoffmana polega na opukiwaniu dalszej części przedramienia i nadgarstka w rzucie nerwu pośrodkowego. Wystąpienie parestezji promieniujących wzdłuż przebiegu nerwu pośrodkowego nakazuje uznać objaw za dodatni. Objaw ten wywołuje dość nieprzyjemne, czasem nawet bolesne doznania u pacjenta.

Test „scratch collapse” jest najnowszym z wymienionych testów i jest opisywany jako najdokładniejszy [11]. Podczas testu pacjent ustawia się naprzeciwko badającego ze stawami łokciowymi zgiętymi do 90 stopni trzymanymi bezpośrednio przy ciele. Badający wywiera następnie nacisk na grzbietową stronę przedramion prosząc pacjenta o stawienie oporu - czyli wywołanie rotacji zewnętrznej w stawie ramiennym. W celu zbadania miejsca podejrzanego o miejsce ucisku na nerw należy to miejsce podrapać niewielką siłą, a następnie natychmiast wywołać nacisk na grzbietową stronę przedramienia. Przy dodatnim wyniku testu wystąpi spadek siły kończyny badanej. Pacjent nie jest wtedy w stanie skutecznie przeciwstawić się



naciskowi badającego i dochodzi do „collapse”, czyli rotacji wewnętrznej w stawie ramiennym. Dodatni wynik testu prezentuje się dość spektakularnie dla badanego pacjenta.

### **b. Badania elektrofizjologiczne**

Badania te to tzw. testy elektrofizjologiczne - elektroneurografia (ENG) i elektromiografia (EMG). Badanie parametrów przewodnictwa nerwowego wykonuje się w pracowniach neurofizjologii, które mogą być samodzielnymi jednostkami, lub wchodzi w skład oddziału neurologicznego. Badanie to wykonuje się specjalnym aparatem, w standardowych warunkach, w wyciszonym pomieszczeniu o stałej temperaturze. Pacjent jest badany w pozycji leżącej. Przewodnictwo czuciowe ocenia się po stymulacji antydromowej elektrodą stymulującą umieszczoną na wysokości bliższej części nadgarstka. Elektrody odbiorcze obrączkowe są umieszczane na palcach wskazującym i środkowym, a ich zapisy są rejestrowane oddzielnie. Badanie przewodnictwa ruchowego wykonuje się po stymulacji ortodromowej z 2 miejsc: w okolicy dołu łokciowego i na wysokości bliższej części nadgarstka. Powierzchniowa, dwubiegunowa elektroda odbiorcza jest umieszczona nad mięśniem odwodzicielem krótkim kciuka (łac. abductor pollicis brevis, APB). Współczesne aparaty do badania przewodnictwa nerwowego rejestrują i obliczają następujące parametry zapisu, które są brane pod uwagę przy jego interpretacji:

- Szybkość przewodzenia czuciowego, parametr wyrażany w metrach na sekundę (m/s).
- SNAP (ang. Sensory Nerve Action Potential) - odpowiedź nerwu na obwodową antydromową stymulację elektryczną włókien czuciowych. Parametr jest wyrażany w  $\mu\text{V}$ .
- Latencja końcowa we włóknach ruchowych (DML- Distal Motor Latency). Parametr wyrażany w milisekundach na centymetr (ms/cm).
- CMAP (ang. Compound Muscle Action Potential) - odpowiedź mięśnia na stymulację elektryczną włókien ruchowych nerwu. Parametr jest wyrażany w  $\mu\text{V}$
- Charakterystyka zapisu EMG z mięśnia odwodziciela krótkiego kciuka - gęstość zapisu wysiłkowego, obecność neurogenie zmienionych potencjałów jednostek ruchowych

Badanie elektrofizjologiczne uważane jest za tzw. „złoty standard” w diagnostyce zespołu kanału nadgarstka, jednak wielu autorów uważa je za niepotrzebne, ponieważ wywiad i badanie przedmiotowe dostarczają wystarczająco dokładnych przesłanek do ustalenia rozpoznania i podjęcia decyzji o leczeniu [12, 13].

### c. Badanie USG

USG w diagnostyce zespołu kanału nadgarstka zastosowano po raz pierwszy przed ponad 25 laty, jednak ta metoda zdobyła znaczną popularność dopiero w końcu pierwszej dekady nowego stulecia. Wiązało się to przede wszystkim z dostępnością głowic wysokiej częstotliwości, które pozwalały na dokładne obrazowanie nerwu pośrodkowego w kanale nadgarstka, a także z doskonalszymi programami obróbki komputerowej obrazów sonograficznych. Obecnie standardowym parametrem wskazującym na ucisk nerwu pośrodkowego jest jego pogrubienie przed wejściem do kanału nadgarstka. Elementem usprawniającym interpretację obrazowania USG jest możliwość pomiaru nie tylko szerokości nerwu, ale obliczania pola jego przekroju na różnych poziomach kanału nadgarstka. Pole przekroju nerwu jest obliczane automatycznie przez komputer aparatu, po zaznaczeniu obrysu nerwu na ekranie. Powiększenie pola powierzchni przekroju nerwu (ang. cross-sectional area, CSA) u wejścia do kanału nadgarstka wykazało najlepszą korelację z obrazem klinicznym ucisku na nerw pośrodkowy. Dlatego obecnie ten parametr stanowi wskaźnik ucisku lub braku ucisku na nerw i potwierdzenie (lub nie) zespołu kanału nadgarstka. Zakres prawidłowych wartości pola powierzchni przekroju nerwu pośrodkowego wynosi 8-12 mm<sup>2</sup>, a wartości wyższe wskazują na jego poszerzenie. USG szczególnie przydatne jest, gdy podejrzewane są guzy okolicy nadgarstka lub nerwu pośrodkowego, a także w przypadku braku poprawy lub nawrotu po leczeniu operacyjnym [14, 15, 16].

#### 1.1.9. Leczenie zespołu kanału nadgarstka

Postępowanie z pacjentem z rozpoznaniem zespołu kanału nadgarstka zależy od nasilenia objawów i wyboru pacjenta. Terapię można rozpocząć od leczenia zachowawczego: farmakoterapii doustnej i stosowanej miejscowo, ortezy utrzymującej nadgarstek w wyproście. Poprawę może również przynieść fizykoterapia. Często stosowane są także iniekcje leków steroidowych podawanych do kanału nadgarstka. Przynoszą one najczęściej czasową, kilkumiesięczną poprawę, ale zdążają się także kilkuletnie ustąpienia dolegliwości. Złotym standardem postępowania pozostaje leczenie operacyjne – przecięcie troczka zginaczy. Jest to najczęściej wykonywany zabieg planowy w obrębie kończyny górnej. Typowo wykonywany jest metodą otwartą, z 2-5 cm cięcia w rzucie kanału nadgarstka (**ryc. 1.5 a-d**). Historycznie cięcie było znacznie większe, sięgające przedramienia. Obecnie rozwijają się metody mniej inwazyjnego odbarczenia kanału nadgarstka. Jedną z nich jest metoda endoskopowa, w której

do kanału wprowadzany jest tor wizyjny i nóż wstecznie tnący. Inna opiera się na wykorzystaniu noża wstecznie tnącego wprowadzanego z małego cięcia na przedramieniu, a doszczętność przecięcia troczka i pozycjonowanie noża potwierdzana jest za pomocą śródoperacyjnej ultrasonografii. Pomimo rozwoju technik małoinwazyjnych wciąż nie wyparły one sprawdzonej i porównywalnej w wynikach techniki otwartej [1-4, 17-20].



Ryc. 1.5a. Operacja dekompresji kanału nadgarstka: cięcie w dalszej części śródrečza



Ryc. 1.5b. Operacja dekompresji kanału nadgarstka: przecinanie troczka zginaczy



Ryc. 1.5c. Operacja dekompresji kanału nadgarstka: troczek zginaczy całkowicie przecięty, nożyczki swobodnie otwarte w kanale nadgarstka



Ryc. 1.5d. Operacja dekompresji kanału nadgarstka: zszyta rana operacyjna.

## 1.2 GENETYCZNE PREDYSPOZYCJE DO ZESPOŁU KANAŁU NADGARSTKA

### 1.2.1. Przegląd genów podejrzewanych o związek zachorowaniem na ZKN

Wśród wielu koncepcji na temat patogenezы tego procesu uwagę zwracają potencjalne czynniki genetyczne wpływające na charakterystykę strukturalnych komponentów włókienek kolagenu, stanowiącego podstawowy składnik tkanki łącznej, w tym ścięgien zginaczy i troczka zginaczy. Podejrzuwa się, że degradacja kolagenu i ochrona przez stresem oksydacyjnym w tkance łącznej. Kilka grup genów jest zaangażowanych w regulację tych procesów. Należą do nich geny z grupy *COL*, gen *COMP* i gen *GSTP1* [21-23].

#### a. Geny kodujące syntezę kolagenu (rodzina *COL*)

Biorąc pod uwagę fakt, że nerw pośrodkowy w kanale nadgarstka jest ściśle otoczony 9 ścięgnami zginaczami i stosunkowo grubym troczkiem zginaczy, można założyć, że zaburzenia morfologii tych zbudowanych z kolagenu struktur mogą wpływać na powstanie ucisku na nerw. Dotyczy to szczególnie mutacji (wariantów) genów kodujących syntezę różnych podtypów kolagenu takich, jak: *COL1A*, *COL5A*, *COL11*. Geny te mają wpływ na charakterystykę i morfologię włókienek kolagenu tworzących różne struktury, w tym ścięgna, więzadła i powięzie. Kolagen nie jest substancją jednorodną. Zidentyfikowano kilka różnych podtypów tego białka, z których najczęściej spotykany we wszystkich strukturach tkanki łącznej jest typ I. Chociaż włókna kolagenu tworzy przede wszystkim typ I tego białka, to kilka innych, rzadszych podtypów takich jak V, XI i XII zostały także znalezione w strukturze jego włókien. Podejrzuwa się, że te podtypy mogą odgrywać istotną rolę w regulowaniu tworzenia i utrzymywania integralności strukturalnej włókien kolagenowych i otaczającej je macierzy pozakomórkowej [21]. Podejrzuwa się także, że rzadkie warianty V i XII mogą mieć wpływ na wielkość i kształt włókienek kolagenu w trakcie jego dojrzewania [22]. Takie cechy charakterystyczne kolagenu jak elastyczność i wytrzymałość mogą zależeć od proporcji udziału rzadszych wariantów białka tworzących włókna wchodzące w skład ścięgien i więzadeł. Zmiana tych właściwości może wpływać na zmiany ciśnienia wewnątrz kanału nadgarstka i do powstania ucisku na nerw pośrodkowy. Niektóre wcześniejsze badania wykazały związek między mutacjami genów kodujących syntezę i degradację kolagenu i niektórymi schorzeniami zapalnymi i przeciążeniowymi tkanki łącznej, a także z zwiększoną podatnością na uszkodzenie urazowe ścięgien i więzadeł [24, 25, 26]. Wyniki tych badań zachęciły do dalszych poszukiwań

związków między mutacjami wybranych genów, a ryzykiem powstania zespołu kanału nadgarstka.

**b. Gen *COMP*** (ang. cartilage oligomeric matrix protein).

Jednym z genów, którego mutacje mogą być związane z rodzinnym występowaniem ZKN jest gen *COMP* (ang. cartilage oligomeric matrix protein). Mutacje tego genu wykryto w rodzinach, których prawie wszyscy członkowie chorowali na ZKN. Podejrzewa się, że mutacja białka *COMP* zaburza proces jego oligomeryzacji, co powoduje stan zapalny, postępujące włóknienie i zmianę struktury komórkowej ścięgien i więzadeł. U pacjentów z rodzin, w których stwierdzono mutacje genu *COMP*, w trakcie operacji ZKN stwierdzono znaczne pogrubienie troczka zginaczy i ścięgien zginaczy przechodzących przez kanał nadgarstka, co było bezpośrednim powodem ucisku na nerw pośrodkowy [27].

**c. Gen kodujący syntezę transferazy S-glutationowej (*GSTP1*)**

Innym genem podejrzewany o związek z rodzinnym występowaniem ZKN jest gen kodujący syntezę transferazy S-glutationowej (*GSTP1*), enzymu biorącego udział w dezaktywacji wolnych rodników tlenowych (O $\cdot$ ) i hydroksylowych (OH $\cdot$ ). Transferazy S-glutationowe są dużą rodziną izoenzymów zaangażowanych w ochronę tkanek przed cytotoksycznym działaniem wonnych rodników przez inaktywację ich pośrednich metabolitów. Uszkodzenia sekwencji genu *GSTP1* powodują wzrost stężenia produktów stresu oksydacyjnego i uszkodzenie kolagenu ścięgien i więzadeł. Jest prawdopodobne, że u osób - nosicieli zmutowanych genów - choroba występuje rodzinnie, ujawnia się w młodym wieku, zajmuje obie ręce, ma ciężki kliniczny przebieg i częściej nawraca po leczeniu operacyjnym [28, 29].

**1.2.2. Metody badania materiału genetycznego w kierunku identyfikacji mutacji genów odpowiedzialnych za wysoką genetyczną predyspozycję do niektórych chorób, szczególnie nowotworowych.**

Informacje o tych technikach pochodzą z Internetu, monografii pod redakcją prof. Jana Lubińskiego (2018) [30] i pozycji piśmiennictwa [31, 32, 33].

Genomy są strukturami zmiennymi, które zmieniają się w czasie na skutek mutacji. Mutacje to zmiany w sekwencji nukleotydów na krótkim odcinku genomu. Od czasu wynalezienia reakcji PCR (ang. polymerase chain reaction) nastąpił dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej, a szczególnie metod wykrywania mutacji konstytucyjnych i somatycznych. Mutacje somatyczne powstają spontanicznie w życiu pacjenta, obecne są jedynie w niektórych komórkach ciała - wyłącznie w komórkach tkanki nowotworowej. Nie są one dziedziczne. Konstytucyjne, inaczej: germinalne, obecne są w każdej komórce ciała i podlegają dziedziczeniu. Metody badania materiału genetycznego dzielą się na używane do wykrywania mutacji nieznanymi i mutacji znanych. Techniki te różnią się od siebie, a w poniższym podrozdziale zostaną one zwięźle scharakteryzowane.

### **1.2.3. Wybrane techniki używane od wykrywania mutacji nieznanymi**

Takie badania są wykorzystywane do wykrywania potencjalnie patogennych mutacji w przypadkach odpowiednio dobranych pod względem cech rodowodowo-klinicznych. Poszukiwana mutacja i jej pozycja są w takim przypadku nieznanymi. Poniżej przedstawiona jest krótka charakterystyka rodzajów analiz materiału genetycznego do wykrywania mutacji nieznanymi.

#### **1.2.3.1 Techniki bezpośredniego wykrywania mutacji**

##### **a. Analiza DNA**

Analiza materiału genetycznego (DNA) składa się z kilku etapów: izolacji DNA, amplifikacji fragmentów genów i wstępnego wykrywania zaburzeń w produktach amplifikacji technikami przesiewowymi.

##### **Izolacja DNA.**

Materiałem do izolacji DNA są najczęściej leukocyty krwi obwodowej lub materiał pobierany techniką biopsji, zwykle z tkanek chorych (np. guza nowotworowego). Izolowanie DNA polega na usunięciu białek z lizatu komórkowego. Jedną z najstarszych i najskuteczniejszych metod ekstrakcji jest metoda fenolowo-chloroformowa. W metodzie tej uzyskuje się izolację przez trawienie proteinazą i ekstrakcję w mieszaninie fenolu i chloroformu. Z odbiałczanych próbek kwasy nukleinowe wytrąca się alkoholem etylowym lub izopropylowym. Metoda ta pozwala na otrzymanie czystego i niezdegradowanego materiału genetycznego. Jest jednak bardzo



pracochłonna i toksyczna, przez co w obecnych czasach mało używana. Obecnie używa się raczej metod mniej pracochłonnych, łatwiej poddających się automatyzacji. Ta technika jest obecnie używana praktycznie tylko do izolacji DNA z bloczków parafinowych, a do izolacji DNA ze świeżych tkanek używa się technik zautomatyzowanych.

### **Amplifikacja fragmentów genów.**

W tej części analizy fragmenty wyizolowanego DNA są powielane za pomocą reakcji PCR. W skład roztworu, w którym zachodzi ta reakcja wchodzi: matryca DNA, polimeraza DNA, para swoistych dla analizowanego rejonu genu starterów, fosforany dezoksyrybonukleotydów i bufor reakcyjny. Każdy cykl powielania składa się z 3 etapów: denaturacji, przyłączenia starterów i syntezy. Po ok 22 cyklach liczba kopii powielanego fragmentu DNA zwiększa się milion razy.

### **Wstępne wykrywanie zaburzeń w produktach amplifikacji technikami przesiewowymi.**

Większość technik przesiewowych wykorzystuje unikalny charakter struktury DNA zawierającego mutację. Denaturacja produktów amplifikacji w obecności mutacji powoduje powstawanie odmiennych struktur, a cząsteczka ulega topnieniu znacznie łatwiej niż kiedy nici DNA są w pełni komplementarne. Większość technik poszukiwania mutacji bazuje na analizie powstawania heterodupleksów między pojedynczą nicią DNA i nicią do niej komplementarną, kontrolną, o sekwencji niezmutowanej. Jeżeli mutacji nie ma, po produktem połączenia dwóch nici jest homodupleks, gdzie każda para zasad jest komplementarna.

### **b. Badanie zmian konformacji jednoniciowego DNA (ang. single stranded conformational polymorphism, SSCP).**

Technika ta bazuje na wykazywaniu przez jednoniciowe DNA struktury drugorzędowej, gdy zawieszono je w roztworze. Rodzaj struktury jest inny dla poszczególnych fragmentów i zależy od tworzących je zasad i ich kolejności. Mutacje będą powodować zmiany w strukturze drugorzędowej, co przekłada się na szybkość poruszania się nici w trakcie elektroforezy żelowej. Ograniczeniem tej metody jest konieczność badania fragmentów krótszych niż 200-300 par zasad.

**c. Analiza heterodupleksów** (ang. heteroduplex analysis, HET)

Jest to metoda podobna do SSCP, ale w tym przypadku analizowane są dwuniciowe fragmenty DNA. Materiał genetyczny badanej próbki poddawany jest amplifikacji PCR. Jeżeli w badanej próbce znajdują się nie tylko fragmenty normalne (dzikie) ale i zawierające mutacje, to powstaną cztery fragmenty dwuniciowego DNA, z którego dwa to homodupleksy, a dwa to heterodupleksy. Różnią się one ruchliwością elektroforezy na zwykłym poliakrylamidowym żelu. Wielu jest zwolenników wykonywania SSCP i HET jako uzupełniających się, gdyż amplifikacja materiału następuje jednakowo, co pozwala na zwiększenie czułości wykrywania mutacji stosunkowo niewielkim kosztem.

**d. Chemiczne rozszczepianie niesparowań heterodupleksów** (ang. chemical mismatch cleavage, CMC).

Jest to technika bazująca na heterodupleksach powstających w wyniku reakcji PCR przeprowadzonym na materiale genetycznym zawierającym mutację. Heterodupleksy posiadają niesparowane wiązanie wodorowe. Niesparowane zasady C i T ulegają chemicznej modyfikacji. C modyfikowane jest z hydroksylaminą, a T z czterotlenkiem osmu. Miejsca przyłączenia tych związków cięte są przy użyciu piperidyny. Pocięte fragmenty genomu rozdzielane są przy użyciu elektroforezy. Metoda ta jest bardzo czuła (prawie 100%), ale bardziej złożona i bardziej toksyczna niż HET czy SSCP.

**e. Wysokosprawna, denaturująca chromatografia cieczowa** (ang. denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)

Jest to skuteczna i często używana technika wstępnego wykrywania zmian w DNA, a zwłaszcza substytucji, delecji i insercji. Jest także szczególnie przydatna do identyfikacji polimorfizmów. DHPLC jest odmianą chromatografii wykorzystującą nowoczesne kolumny chromatograficzne o wysokiej rozdzielczości. W kolumnach tych dochodzi do rozdziału analizowanych fragmentów DNA pod wpływem czynnika denaturującego. Technika ta różni się od zwykłej chromatografii cieczowej (czyli takiej, w której eluentem jest rozpuszczalnik ciekły) ciśnieniem podawania eluentu na kolumny. Po rozdzieleniu mogą podlegać analizie. Każdy fragment DNA wykazuje specyficzny profil absorbancji przy 260nm. Jeżeli profil absorbancji różni się od kontrolnego (homodupleksu, złożonego z dwóch w pełni komplementarnych nici), to możemy stwierdzić powstanie heterodupleksu (nici nie są w pełni komplementarne). Znaczy to, że w

badanym fragmencie występuje mutacja. Nie jest wiadome umiejscowienie mutacji.

DHPLC stała się obecnie obowiązującym standardem we wstępnym wykrywaniu mutacji, wypierając takie metody jak DGGE czy SSCP.

#### **f. Elektroforeza na żelach z gradientem czynnika denaturującego (DGGE)**

Technika DGGE posiada wysoką czułość wykrywania mutacji. Wadą jest generująca koszty konieczność syntetyzowania bogatych w sekwencję CG starterów oraz konieczność używania specjalnego aparatu do elektroforezy. Technika polega na poddaniu dwuniciowego segmentu DNA elektroforezie. Medium stanowi żel o wzrastającym stężeniu denaturującej substancji (mocznik, formamid). Różne fragmenty DNA podlegają rozdzieleniu na pojedyncze nici w odmiennym stężeniu środka denaturującego. Gdy rozejście (denaturacja) zostanie osiągnięta to znacznie spada prędkość elektroforetyczna, co znamienne jest przy analizie próbki.

#### **g. Metoda Southerna (ang. Southern blotting)**

Metoda Southerna to technika wykorzystywana do identyfikacji określonych fragmentów DNA. Aby przeprowadzić badanie tą metodą należy poddać DNA działaniu enzymów restrykcyjnych, które dzielą je na fragmenty. Mieszaninę fragmentów denaturuje się w alkalicznym buforze, a następnie przenosi na nylonową błonę. Powstałe DNA jednoniciowe związane z filtrem hybryduje się z sondą (odpowiednio przygotowanym fragmentem DNA, komplementarnym do fragmentu poddawanego analizie). Wytwarzany na tej podstawie autoradiogram poddawany jest analizie. Mutacje zmieniają pozycje i intensywność prążków autoradiogramu. Wadą metody jest konieczność wykorzystania dużej ilości DNA o dobrej jakości, a także wymagany duży nakład pracy. Jej wady prawie całkowicie wykluczyły ją z użytku.

#### **h. Zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond (ang. multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA).**

Prawie całkowicie wyparła metodę Southerna. Jest odmianą PCR. W metodzie tej denaturuje się mieszaninę sond z badanym DNA, a następnie renaturuje uzyskując hybrydyzację sond z badanym DNA. W kolejnym etapie sondy ulegają selektywnej ligacji, i przygotowane są do amplifikacji. Amplifikacja PCR powiela sondy (a nie genomowe DNA), które analizowane są po sekwenatorze kapilarnym. MLPA w porównaniu do innych metod pozwala na dokładne i w

nieskomplikowany sposób wykazanie dużych zmian w badanym genie. Nie jest pracochłonna, wykonywania jest stosunkowo szybko.

#### **i. Denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością** (ang. high resolution melting, HRM)

Metoda bazuje na identyfikacji różnic w zdenaturowanych produktach amplifikacji PCR w obecności barwników fluorescencyjnych. Barwniki osiągają większy poziom fluorescencji w stanie związanym z dwuniciowym DNA. Kiedy dsDNA ulega denaturacji barwnik uwalnia się co wpływa na poziom fluorescencji próbki. W wyniku tego powstaje krzywa denaturacji (topnienia) dsDNA.

Pomimo trudności wykazywanej przez tą metodą w rozróżnianiu homozygot jest ona wartościowa dzięki jej wysokiej czułości, specyficzności i niskim kosztom eksploatacji. Wymaga niewielkiej ilości materiału genetycznego. Jest uznawana za metodę mogącą konkurować ze standardowo używaną DHPLC.

#### **j. Sekwencjonowanie i pirosekwencjonowanie.**

Sekwencjonowaniem DNA można zidentyfikować dowolną mutację. Jest najbardziej czuła i umożliwia pełną charakterystykę mutacji. Nadal pozostaje złotym standardem wykrywania mutacji. Postęp w tej metodzie w ostatnich latach dotyczył głównie wprowadzenia automatycznych aparatów do sekwencjonowania, których funkcjonowanie bazuje na wzbudzanej laserem fluorescencji. Poszczególne nukleotydy (A, C, G, T) znakowane są innym kolorem - fluorochromem. Najbardziej optymalną metodą sekwencjonowania jest sekwencjonowanie metodą cykliczną. W trakcie badania oceniane są produkty reakcji PCR obu nici DNA. Procedura ma kilka etapów. Pierwszym jest namnożenie wybranego fragmentu genomu przy użyciu dedykowanych starterów (preparatywne PCR). Następnie przeprowadzona jest amplifikacja każdej próbki osobno ze znakowaniem barwnikami fluorescencyjnymi (asymetryczne PCR). Produkty podlegają elektroforezie w denaturującym żelu poliakrylamidowym, a przepływając przez żel są wykrywane i rejestrowane. Powstający chromatogram porównywany jest z wzorcem prawidłowym. Pozwala to na dokładne określenie mutacji.

**Pirosekwencjonowanie** różni się od sekwencjonowania. Korzysta z jednoniciowego fragmentu DNA, na którym przeprowadzana jest synteza zasad komplementarnych do

istniejących poprzez dołączanie różnych pirofosforanów, innych dla każdego rodzaju zasady. Każda reakcja podłączenia przebiega z wydzieleniem pirofosforanu, przekształconego następnie w ATP, który następnie używany jest do przekształcenia będącej w mieszaninie lucyferyny w oksylucyferynę. Przebiega to z wydzieleniem światła, w ilości odpowiadającej uwolnionemu wcześniej ATP. Światło jest rejestrowane przez kamerę i przekształcane na wykres. Jeżeli dodawany nukleotyd nie jest komplementarny do matrycy to nie jest włączany do nici i ATP nie powstaje.

#### **1.2.4. Techniki używane od wykrywania mutacji znanych.**

Techniki używane od wykrywania mutacji znanych są inne od używanych do wykrywania mutacji nieznanymi. Obecnie najczęściej używana jest metoda PCR w czasie rzeczywistym, ale warto też przedstawić inne, także jeszcze stosowane sposoby wykrywania mutacji znanych.

##### **a. Wykrywanie mutacji za pomocą enzymów restrykcyjnych w produktach PCR (ang. restriction fragment-length polymorphism PCR, RFLP/PCR)**

Polega trawieniu amplifikowanego w reakcji PCR DNA przez odpowiednią transkryptazę, czyli enzym zdolny do rozcięcia dsDNA w określonym, specyficznym dla siebie miejscu. Produkt rozdziela się przy użyciu elektroforezy na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Układ prążków identyfikuje znaną już mutację.

##### **b. Allelo-specyficzna amplifikacja (ang. allele specific amplification, ASA)**

Polega na wykrywaniu mutacji przy użyciu specyficznych dla nich oligonukleotydów. Stosowane są startery flankujące oraz starter komplementarny do allela z mutacją a drugi do allela pozbawionego mutacji. Lokalizacja starterów powoduje, że w wyniku reakcji PCR zamplifikowane produkty reakcji są różnej długości. Ich elektroforeza na żelu agarozowym pozwala na identyfikację. Metoda ta w nowoczesnym wydaniu korzysta z sond fluorescencyjnych i aparatów real time-PCR, co pozwala na szybkie badanie dużej ilości próbek DNA. Zaletą tej metody jest znaczna automatyzacja i możliwość jednoczesowego badania znacznej ilości próbek. Technologia jest jednak droga, co ogranicza jej zasięg.

### **c. PCR w czasie rzeczywistym (ang. real time PCR).**

Jedna z nowocześniejszych i coraz powszechniej stosowanych metod. Pozwala na ocenę ilościową produktu po każdym cyklu reakcji PCR. Technika umożliwia identyfikację zmian genetycznych dzięki możliwości połączeniu z fluorescencyjnymi sondami, komplementarnymi do sekwencji fragmentu DNA [31, 32]. Do zalet tych technik należy zaliczyć wysoką czułość, krótki czas analizy, wysoką automatyzację, a także ograniczenie ryzyka kontaminacji poprzez przeprowadzanie procesu w izolowanych dołkach płytki. Poniżej scharakteryzowane są różne systemy bazujące na tej technice, różniące się rodzajem zastosowanej sondy.

### **d. Sonda TaqMan.**

Sonda TaqMan jest to narzędzie zaprojektowane w celu zwiększenia specyficzności ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy. Zasada sondy TaqMan opiera się na aktywności egzonukleazy 5'-3' polimerazy (Taq) w celu rozszczepienia podwójnie znakowanej sondy podczas hybrydyzacji do komplementarnej sekwencji poszukiwanej [33]. Detekcja opiera się na użyciu fluoroforu. Analogicznie do innych ilościowych metodach PCR, sygnał fluorescencji pozwala na ilościowe pomiary akumulacji produktu podczas wykładniczych etapów PCR. Zaletą sondy TaqMan jest znacznie większa swoistość. Sondy TaqMan składają się z fluoroforu kowalencyjnie przyłączonego do końca 5' sondy oligonukleotydowej i wygaszacza na końcu. Dostępnych jest kilka różnych fluoroforów, np. 6-karboksyfluoresceina (FAM) lub tetrachlorofluoresceina (TET) i wygaszaczy np. tetrametylorodamina (TAMRA). Cząsteczka wygaszacza gasi fluorescencję emitowaną przez fluorofor, gdy jest wzbudzana przez źródło światła cyklera poprzez transfer energii rezonansowej Förstera (FRET). Dopóki fluorofor i wygaszcz są w pobliżu, wygaszanie hamuje wszelkie sygnały fluorescencji. Sondy TaqMan są zaprojektowane w taki sposób, że hybrydują w rejonie DNA amplifikowanym przez określony zestaw starterów. Sonda wiąże się z jednoniciowym DNA.

Sondy TaqMan mogą być sprzężone z ugrupowaniem mniejszego rowka wiążącego (MGB), tripeptydem dihydrocyklopiroloindolowym (DPI3), w celu zwiększenia jego powinowactwa wiązania do szukanej sekwencji. Sondy sprzężone z MGB mają wyższą temperaturę topnienia z powodu zwiększonej stabilizacji sił van der Waalsa. Ponieważ polimeraza Taq rozszerza starter i syntetyzuje powstającą nić (na matrycy jednoniciowej), aktywność egzonukleazy polimerazy Taq degraduje sondę, która odłączyła się do matrycy. Degradacja sondy uwalnia z

niej fluorofor i przerywa bliskość wygaszacza, zmniejszając w ten sposób efekt wygaszania i umożliwiając fluorescencję fluoroforu. Zatem fluorescencja wykryta w ilościowym termocyklerze PCR jest wprost proporcjonalna do uwolnionego fluoroforu i ilości matrycy DNA obecnej w PCR. Testy oparte na sondach TaqMan są szeroko stosowane w ilościowej PCR w laboratoriach badawczych i medycznych. Można tu wymienić testy ekspresji genów, farmakogenomikę, genotypowanie ludzkiego antygenu leukocytarnego (HLA), określanie ładunku wirusa w próbkach klinicznych (HIV, wirusowe zapalenie wątroby), testy identyfikacji bakterii, oznaczanie ilościowe DNA, genotypowanie SNP i weryfikację wyników mikromacierzy [33].

#### **1.2.5. Inne techniki używane od wykrywania mutacji genowych.**

Poniżej wymieniono inne techniki stosowane do wykrywania mutacji w genach podejrzewanych o potencjalne znaczenie dla rozwoju chorób.

- a. Sondy SimpleProbes (ang. guanine clenching probes)
- b. Sondy iFRET-HRMA
- c. Spektrometria mas z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. matrix assisted laser desorption/ionization time of flight, MALDI-TOF)
- d. SNaPshot
- e. Test paskowy (ang. strip assay)
- f. COLD-PCR

## 1.3 TERMINY UŻYWANE W BADANIACH GENETYCZNYCH.

### 1.3.1. Introny i eksony

**Intron**, sekwencja niekodująca, przerywnikowa, jest to część sekwencji zasad genu, która nie koduje sekwencji aminokwasów polipeptydu, a jedynie rozdziela kodujące eksony. Introny występują w większości komórek zawierających jądra komórkowe).

**Ekson** jest to odcinek genu kodujący sekwencję aminokwasów w cząsteczce białka. Poszczególne eksony oddzielone są od siebie intronami (sekwencjami niekodującymi) i występują wyłącznie w komórkach zawierających jądra (eukariotycznych).

Całość genu jest przepisywana w procesie transkrypcji na pre-mRNA, w którym występują zarówno introny, jak i eksony (odcinki kodujące). W tym procesie następuje wycinanie intronów i składanie eksonów. Introny odgrywają rolę w regulacji ekspresji genów, jak również umożliwiają tzw. alternatywne składanie eksonów.

### 1.3.2. Mutacja miejsca splotu (ang. splice-site variant/mutation).

Jest to zmiana genetyczna w sekwencji DNA znajdująca się na granicy między eksonem a intronem (ang. splice site - miejsce splotu). Ta zmiana może przerwać splot RNA czego konsekwencją może być utrata eksonów lub włączenie do RNA intronów, co powoduje powstanie zmienionej sekwencji kodującej i wytwarzanie na tej podstawie zmienionego białka.

### 1.3.3. Mutacja nonsensowna (ang. nonsense mutation).

Jest to mutacja punktowa w sekwencji DNA, tworzy kodon nonsensowny w transkrybowanym mRNA, tłumaczonym w efekcie na krótsze białko, którego funkcja może być zmieniona (zaburzona).

### 1.3.4. Mutacje o nieznanym znaczeniu (ang. variants of unknown significance, VUS).

Są to zmiany w badaniu genetycznym, które nie zostały wcześniej powiązane z rozwojem konkretnej choroby.

### 1.3.5. Mutacja przesuwająca ramkę odczytu (ang. frameshift mutation).

Jest to mutacja genowa wywołana przez dodanie lub wycięcie (delecję) jednego lub większej, niepodzielnej przez 3, liczby nukleotydów w kwasie nukleinowym. Ponieważ aminokwasy



kodowane są przez tryplety nukleotydów insercja lub delecja prowadzi do przesunięcia się ramki odczytu. Mutacja przesuująca ramkę odczytu nie zmienia sekwencji kodującej, więc nie powoduje produkcji zmienionego białka.

#### **1.4. UZASADNIENIE WYBORU TEMATU BADAWCZEGO**

Przyczyna powstawania zespołu kanału nadgarstka nie całkowicie poznana. Badania predyspozycji genetycznych do powstawania ZKN są prowadzone od ok. 20 lat, ale dotychczas nie zidentyfikowano genów, które w istotny sposób byłyby związane z większym ryzykiem zachorowania. Z drugiej strony, rodzinne występowanie ZKN u ok. 10-15% pacjentów oraz istnienie rodzin, w których większość członków cierpi z powodu tego zespołu, potwierdza prawdopodobieństwo genetycznej predyspozycji do ZKN. Dlatego wydaje się uzasadnione prowadzenie dalszych badań w tym kierunku i testowanie nowych (poza już zbadanymi) genów, których mutacje mogą zwiększać ryzyko zachorowania lub mieć wpływ na wystąpienie choroby w młodym wieku, jej ciężki przebieg i większą tendencję do nawrotów po leczeniu operacyjnym. Innym argumentem dla prowadzenia takich badań w Polsce jest fakt, że większość dotychczasowych studiów genetycznych w ZKN było prowadzonych na bazie populacji nieeuropejskich (afrykańskich, tureckiej i brazylijskiej). Wiadomo, że częstość swoistych mutacji może różnić się w zależności od rasy i dlatego przeprowadzenie badań wśród przedstawicieli rasy kaukaskiej wydawało się być uzasadnione.

## **2 CEL PRACY**

1. Podstawowym celem pracy było zbadanie wpływu dziedzicznych mutacji genów *COL11A*, *COL1A*, *COL5A1*, *COMP* i *GSTM1* na ryzyko zachorowania na zespół kanału nadgarstka.
2. Drugim, dodatkowym, celem było zbadanie, czy obustronny zespół kanału nadgarstka występuje z podobną częstością wśród pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym jak wśród wszystkich chorych.

### 3 MATERIAŁ I METODYKA

#### 3.1 MATERIAŁ KLINICZNY

Badanie przeprowadzono w okresie od listopada 2020 do marca 2022 roku w Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Ręki Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego. Badania genetyczne próbek pobranej krwi były prowadzone w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego.

##### a. Grupa badana

**Grupa badana składała się z 345 pacjentów**, 262 kobiet (75%) i 83 mężczyzn (25%), w wieku śr. 62 lat (zakres 22-96), którzy byli przyjęci do Kliniki do leczenia operacyjnego zespołu kanału nadgarstka.

Rozpoznanie zespołu kanału nadgarstka było dokonywane na podstawie typowych objawów klinicznych przedstawionych w **tabeli 3.1**.

**Tabela 3.1. Typowe dla zespołu kanału nadgarstka objawy kliniczne**

Ból, drętwienie i uczucie mrowienia w ręce, które występowały w nocy i budziły ze snu
Występowanie tych objawów w części ręki unerwionej przez nerw pośrodkowy lub rzadziej, w całej ręce
Objawy trwają około 30 minut, po czym ustępują, a potrząsanie ręką przynosi szybszą ulgę
Ból i drętwienie ręki pojawiające się w ciągu dnia, przy pracy lub dłuższym utrzymywaniu nadgarstka w zgięciu, np. prowadzeniu samochodu, czytaniu gazety lub pisaniu
Oslabienie siły chwytu, uczucia, pogorszenie sprawności ręki

U chorych, u których stwierdzano powyższe objawy rozpoznawano zespół kanału nadgarstka. W przypadku wątpliwości (nietypowe objawy, nietypowy przebieg choroby), do potwierdzenia lub wykluczenia rozpoznania ZKN posługiwano się badaniem przewodnictwa nerwowego. Wielu pacjentów miało także wykonane badanie przewodnictwa nerwowego przed zgłoszeniem się do Poradni lub Kliniki Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Ręki, na zlecenie lekarza kierującego. We wszystkich przypadkach potwierdzało ono rozpoznanie choroby. W **tabeli 3.2** przedstawiono demograficzną i kliniczną charakterystykę grupy badanej.

**Tabela 3.2. Kliniczna i demograficzna charakterystyka 345 pacjentów z grupy badanej**

<b>Parametr</b>	<b>Wartość</b>	
Płeć	Kobiety	Mężczyźni
	262 (75%)	83 (25%)
Zajęcie jednej lub obu rąk	Choroba obustronna	Choroba jednostronna
	314 (91%)	31 (9%)
Wiek (lata)	śr. 62 lata (zakres 22 - 96)	
Czas trwania objawów	śr. 3,4 lat (zakres 0,5 - 23)	
Nasilenie bólu (skala numeryczna, zakres 0-10)	śr. 4,3 (zakres 1-9)	

Wszyscy pacjenci, oprócz przedoperacyjnego badania klinicznego składającego się z wywiadu i badania przedmiotowego mieli także wypełnianą ankietę, w której zaznaczano występowanie zespołu kanału nadgarstka wśród bliskich krewnych (**ryc. 3.1**). Dla celów pracy, z całej grupy 345 chorych wydzielono osobną podgrupę 96 pacjentów, którzy mieli dodatni wywiad rodzinny.

Imię i nazwisko		
Adres i telefon		
Data badania		
Choroba dotyczy ręki	obu	jednej
Czas trwania choroby	miesiące	lat
Nasilenie bólu w skali VAS		
Czy ktoś z rodziny ma lub miał ZKN	tak	nie
Kto	matka ojciec siostra brat córka	
Ile lat chorował	miesiące	lat
Czy był operowany		

**Rycina. 3.1. Kwestionariusz, który wypełniano przy przyjmowaniu chorego do kliniki, do operacji ZKN.**

**b. Grupa 96 chorych z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku ZKN.**

Z całej grupy 345 osób z ZKN, wyodrębniono podgrupę pacjentów, u których choroba występowała u co najmniej jednego bliskiego krewnego (dodatni wywiad rodzinny w kierunku ZKN). Grupa z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku zkn liczyła 96 pacjentów, 68 kobiet (71%) i 28 mężczyzn (29%), w wieku śr. 61 lat (zakres 27-88), a jej charakterystykę kliniczną i demograficzną przedstawiono w **tabeli 3.3**.

**Tabela 3.3. Kliniczna i demograficzna charakterystyka 96 pacjentów z grupy z rodzinną agregacją ZKN.**

<b>Parametr</b>	<b>Wartość</b>	
Płeć	Kobiety	Mężczyźni
	68 (71%)	28 (29%)
Zajęcie jednej lub obu rąk	Choroba obustronna	Choroba jednostronna
	89 (93%)	7 (7%)
Wiek (lata)	śr. 61 lata (zakres 27 - 88)	
Czas trwania objawów	śr. 2,8 lat (zakres 1 - 12)	
Nasilenie bólu (skala numeryczna, zakres 0-10)	śr. 4,8 (zakres 2-9)	

#### **c. Grupa kontrolna (osoby bez objawów ZKN)**

Grupa kontrolna składała się z 1035 zdrowych osób dorosłych, 786 kobiet (76%) i 249 mężczyzn (24%), którzy zostali wybrani do tego badania z większej grupy osób, których materiał genetyczny pobrano w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2016-2020 w celu badania występowania nowotworów dziedzicznych wśród 1,5 mln populacji osób dorosłych mieszkających w Województwie Zachodniopomorskim. Grupa kontrolna została dobrana tak, żeby proporcje płci (kobiety/mężczyźni 4:1) i wieku ( $\pm 2$  lata) były podobne, jak w grupie badanej. Wszystkie osoby z grupy badanej i kontrolnej były etnicznie Polakami.

#### **d. Badanie kliniczne i pobieranie materiału genetycznego**

Każdy pacjent po przyjęciu do Kliniki Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Ręki miał przeprowadzone badanie kliniczne takie jak przed operacją. Pacjent był proszony o wyrażenie zgody na udział w badaniu predyspozycji genetycznych do zespołu kanału nadgarstka i na pobranie próbki krwi do analiz genetycznych, a zgodę potwierdzał podpisem na stosownym formularzu. Pacjentowi wyjaśniano cel badań i ich charakter. Następnie badający lekarz wypełniał ankietę opisującą charakterystykę kliniczną przypadku oraz wywiad w kierunku rodzinnego występowania choroby (ryc. 3.1). Krew do badań (10 ml) była pobierana przez pielęgniarkę i wstrzykiwana do specjalnych, szczelnych próbek, które następnie dostarczano do Zakładu Genetyki i

Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie była przechowywana w odpowiednich warunkach do czasu przeprowadzenia badań genetycznych DNA.

Badanie było prowadzone zgodnie z regulacjami i przepisami Deklaracji Helsińskiej. Uzyskano także zgodę Komisji bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego na prowadzenie badań

## **3.2 METODYKA**

Na podstawie analizy piśmiennictwa i wyników wcześniej prowadzonych badań, wybrano 5 genów: *COL11A*, *COL1A*, *COL5A1*, *COMP*, *GSTM1*, których mutacje mogłyby mieć potencjalny związek z rozwojem zespołu kanału nadgarstka. Po wykonaniu ekstrakcji materiału genetycznego z pobranych próbek krwi (ekstrakcja DNA), właściwe genotypowanie przeprowadzono w 2 etapach: detekcji i walidacji.

### **3.2.1. EKSTRAKCJA DNA**

Analizy genetyczne były przeprowadzane standardowymi, wcześniej opisanymi metodami na bazie DNA krwi pobranej od pacjentów z grupy badanej i kontrolnej [34].

### **3.2.2. FAZA DETEKCJI (ang. discovery phase)**

W pierwszym etapie (faza detekcji) przeprowadzono genotypowanie 96 pacjentów, u których stwierdzono dodatni wywiad rodzinny w kierunku ZKN. Genotypowanie wykonano z użyciem panelu NGS (Next Generation Sequencing) w celu wykrycia wszystkich możliwych mutacji w wybranych wcześniej genach.

#### **a. Genotypowanie z użyciem panelu Next Generation Sequencing (NGS)**

Genotypowanie 96 pacjentów, u których stwierdzono dodatni wywiad rodzinny w kierunku ZKN zostało przeprowadzone z wykorzystaniem standardowego panelu NGS. AmpliSeq z zestawu Illumina (the Illumina Design Studio) został użyty do genotypowania tylko tych regionów chromosomów, gdzie znajdowały się wybrane geny *COL11A*, *COL1A*, *COL5A1*, *COMP* i *GSTM1*. Opis techniki wykonywania badania. Najpierw utworzono bibliotekę DNA NGS zgodnie z wytycznymi producenta zestawu AmpliSeq dla Illumina (On-Demand, Custom and Community Panels Reference Guide Protocol), wykorzystując reagenty AmpliSeq™ Library PLUS dla Illumina. Stężenie wyjściowe DNA (ang. input DNA concentration)



mierzone przy pomocy panelu Qubit dsDNA BR Assay, a stężenie wytworzonych bibliotek DNA oceniano przy pomocy zestawu Qubit dsDNA HS Assay (the Qubit Fluorometer, Thermo Fisher Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Biblioteki były następnie denaturowane i rozcieńczane zgodnie z zaleceniami MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide Protocol, z wykorzystaniem biblioteki PhiX do kontroli sekwencjonowania. Sekwencjonowanie wykonano na platformie MiniSeq (Illumina) używając zestawu MiniSeq Mid Output,  $2 \times 150$  cykli, żeby uzyskać odczyty z obu nici DNA.

Jakość surowych danych panelu NGS była oceniana przy pomocy oprogramowania FastQC z zestawu Illumina BaseSpace Sequence Hub. Dane z sekwencjonowania były analizowane z wykorzystaniem aplikacji porównawczych (ang. sequence alignment i variant calling) (the Illumina BaseSpace Sequence Hub the DNA Amplicon app). Ta aplikacja jest przeznaczona do wykrywania małych mutacji w genach. Analiza wykorzystywała porównanie surowego odczytu danych uzyskanych z NGS z danymi z ludzkiego genomu referencyjnego (Genome Reference Consortium GRCh37). Zestaw DNA Amplicon generował dokładny raport zawierający informacje na temat jakości badanej próbki, wyjściowego poziomu statystycznego danych i pokrycia przez region amplifikowany. Wykryte mutacje były następnie interpretowane przy pomocy innej aplikacji zestawu Illumina BaseSpace Sequence Hub. Porównywane odczyty dla wszystkich próbek były dodatkowo sprawdzane ręcznie za pomocą specjalnego oprogramowania (Integrative Genomics Viewer, Broad Institute), żeby upewnić się, że były w nich obecne przefiltrowane mutacje.

#### **b. Sekwencjonowanie Sangera (ang. Sanger sequencing)**

Wszystkie mutacje wykryte w procesie NGS były następnie sprawdzane przy pomocy standardowego sekwencjonowania Sangera, przy użyciu zestawu BigDye (terminator sequencing kit v3.1, Life Technologies) zawartego w zestawie analizatora genetycznego ABI Prism 3130 (Life Technologies), zgodnie z zaleceniami producenta.

#### **3.2.3. FAZA WALIDACJI (ang. association phase)**

W drugim etapie (faza walidacji wykrytych zmian) przeprowadzono identyfikację potencjalnej patogenności wykrytych wariantów z użyciem algorytmów „*in silico*” i sondy **TaqMan**. Warianty z pewnością niepatogenne (intronowe i synonimiczne) odrzucono, a do drugiego etapu walidacji - badań asocjacyjnych pozostawiono tylko 35 wariantów o nieznanym

znaczeniu klinicznym (ang. variants of unknown significance VUS). W badaniach asocjacyjnych przeprowadzono genotypowanie wszystkich 345 pacjentów z badanej grupy z ZKN i 1035 osób zdrowych (grupa kontrolna).

#### **a. Badanie “in silico” potencjalnej patogenności wykrytych mutacji (ang. in silico software prediction)**

Znaczenie biologiczne (potencjalną patogenność) wykrytych mutacji badano „in silico”, przy pomocy predyktorów z kilku dostępnych baz danych: ClinVar, VarSome, dbNSF i dbSNP [35, 36, 37]. Dziedziczne mutacje były klasyfikowane w odniesieniu do standardów i rekomendacji ACMG (ang. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants) [38, 39]. Baza danych dbNSFP jest wszechstronną bazą danych opisującą potencjalnie znaczenie kliniczne wszystkich małych mutacji (np. polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, SNP i SNV) genomu ludzkiego. To narzędzie zawiera dane z wielu wcześniej wytworzonych algorytmów predykcyjnych takich, jak BLOSUM, DANN, DEOGEN2, EIGEN, EIGEN PC, FATHMM, FATHMM-MKL, FATHMM-XF, LIST-S2, LRT, M-CAP, Mutation assessor, Mutation tester, MPV, PrimateAI, Provean, SIFT and SIFT4G) [40-54].

#### **b. Genotypowanie przy użyciu sondy TaqMan**

W badaniach asocjacyjnych przeprowadzono genotypowanie wszystkich 345 pacjentów z badanej grupy z ZKN i 1035 osób zdrowych (grupa kontrolna). Zastosowano metodę PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sondy TaqMan (Applied Biosystems/Life Technologies) [38]. Analizę wykonywano zestawu LightCycler Real-Time PCR 480 (Roche Life Science), zgodnie z zaleceniami producenta. Ogólny wskaźnik dokładności genotypowanie wynosił 99,3%.

### **3.2.4. ANALIZY STATYSTYCZNE**

Porównanie istotności częstości występowania zmian wykrytych w genotypach w grupach badanych i kontrolnych przeprowadzono przy użyciu testu Fischera, dla którego oznaczono dwustronne wartości poziomu ufności P (ang. two-tailed P values). Dla każdego porównania obliczano wartości ilorazu szans (ang. odds ratio, OR) łącznie z 95% zakresami ufności (ang. 95%CI).

## 4 WYNIKI

### 4.1 Wyniki fazy detekcji

W pierwszej fazie badania (detekcji) wykonano pełne sekwencjonowanie NGS genów *COL11A*, *COL1A*, *COL5A1*, *COMP*, *GSTM1* u 96 pacjentów, u których stwierdzono rodzinne występowanie zespołu kanału nadgarstka.

Wszystkie mutacje (warianty) zostały przefiltrowane w celu wyeliminowania zmian intronowych i synonimicznych, które nie mogły mieć żadnego znaczenia klinicznego. Po przefiltrowaniu pozostało 35 zmian potencjalnie patogennych - 24 mutacje zmiany sensu (ang. missense) i 11 mutacji miejsca splotu (ang. splice site). W próbce przeznaczonyj do dalszych badań nie zanotowano obecności żadnych mutacji przesuwająca ramkę odczytu (ang. frameshift mutation) ani nonsensownych (ang. nonsense mutations). W **tabeli 4.1** wymieniono wszystkie wykryte warianty (mutacje).

**Tabela 4.1. Mutacje wykryte w badaniu New Generation Sequencing u 96 pacjentów z rodzinnym występowaniem zespołu kanału nadgarstka.**

Gen	Transcript	HGVS cDNA	HGVS protein	Typ mutacji	db SNP
COL11A1	NM_080629.2	c.5395G>A	p.(Asp1799Asn)	Missense	rs144510951
COL11A1	NM_080629.2	c.2840C>A	p.(Pro947His)	Missense	rs368422725
COL11A1	NM_080629.2	c.4642C>G	p.(Pro1548Ala)	Missense	rs139064549
COL11A1	NM_080629.2	c.2957C>A	p.(Pro986Gln)	Missense	rs78046647
COL11A1	NM_080629.2	c.4639T>C	p.(Ser1547Pro)	Missense	rs1676486
COL11A1	NM_080629.2	c.138T>G	p.(Asp46Glu)	Missense	rs11164663
COL11A1	NM_080629.2	c.4004C>T	p.(Pro1335Leu)	Missense	rs3753841
COL11A1	NM_080629.2	c.828A>C	p.(Lys276Asn)	Missense	rs12731843
COL11A1	NM_080629.2	c.652-6del		Splice region	rs36076089

COL11A1	NM_080629.2	c.2034+4T>A		Splice region	rs12136577
COL11A1	NM_080629.2	c.275-7T>C		Splice region	rs12136865
COL11A1	NM_080629.2	c.2079+8G>A		Splice region	rs2622875
COL1A1	NM_000088.3	c.3099+7T>C		Splice region	rs201682029
COL1A1	NM_000088.3	c.1354-8del		Splice region	rs765450816
COL1A1	NM_000088.3	c.1984-5C>A		Splice region	rs66592376
<b>COL5A1</b>	<b>NM_000093.4</b>	<b>c.1595C&gt;T</b>	<b>p.(Ala532Val)</b>	<b>Missense</b>	<b>rs369000939</b>
COL5A1	NM_000093.4	c.574G>A	p.(Asp192Asn)	Missense	rs138579182
COL5A1	NM_000093.4	c.341C>A	p.(Ala114Asp)	Missense	rs147589613
COL5A1	NM_000093.4	c.1588G>A	p.(Gly530Ser)	Missense	rs61735045
COL5A1	NM_000093.4	c.2852A>G	p.(Asn951Ser)	Missense	rs61736966
COL5A1	NM_000093.4	c.278C>T	p.(Ala93Val)	Missense	rs41306397
COL5A1	NM_000093.4	c.193C>T	p.(Arg65Trp)	Missense	rs139468527
COL5A1	NM_000093.4	c.4135C>T	p.(Pro1379Ser)	Missense	rs61739195
COL5A1	NM_000093.4	c.514G>T	p.(Val172Phe)	Missense	rs150147262
COL5A1	NM_000093.4	c.4230+5C>T		Splice region	rs142248898
COL5A1	NM_000093.4	c.4230+6G>A		Splice region	rs77176843
COL5A1	NM_000093.4	c.1432-5T>C		Splice region	rs3128612
COL5A1	NM_000093.4	c.4122G>A	p.(Thr1374=)	Splice region	rs3827848
<b>COMP</b>	<b>NM_000095.2</b>	<b>c.1590C&gt;A</b>	<b>p.(Asp530Glu)</b>	<b>Missense</b>	<b>rs759687021</b>
<b>COMP</b>	<b>NM_000095.2</b>	<b>c.1331C&gt;G</b>	<b>p.(Ser444Cys)</b>	<b>Missense</b>	<b>rs747106682</b>
COMP	NM_000095.2	c.1156A>G	p.(Asn386Asp)	Missense	rs61739916
GSTM1	NM_000561.3	c.433C>T	p.(Arg145Trp)	Missense	rs142484086
GSTM1	NM_000561.3	c.254A>G	p.(Asn85Ser)	Missense	rs147668562
GSTM1	NM_000561.3	c.287G>T	p.(Arg96Leu)	Missense	rs199816990
GSTM1	NM_000561.3	c.519G>C	p.(Lys173Asn)	Missense	rs1065411

#### 4.2 Wyniki badania „in silico” potencjalnej patogenności wykrytych mutacji badano przy pomocy algorytmów z wybranych baz danych.

Potencjalną patogenność wszystkich 35 mutacji wykrytych w sekwencjonowaniu NGS badano za pomocą algorytmów “in silico”. Nie stwierdzono żadnej, jednoznacznie patogennej mutacji

w zakresie 5 badanych genów. Trzydzieści mutacji (86%) było zidentyfikowanych jako łagodne (niepatogenne) lub prawdopodobnie łagodne. Pięć mutacji (14%) zmiany sensu (ang. missense) zostało zakwalifikowanych jako mutacje o nieznanym znaczeniu (VUS) i wybranych do badań asocjacyjnych (**Tabela 4.2**).

#### **4.2.1. Mutacje o nieznanym znaczeniu wykryte w genie *COMP*.**

Dwie z 5 zmian o nieznanym znaczeniu (VUS): c.1331C>G (p.Ser444Cys) i c.1590C>A (p.Asp530Glu) zostały wykryte w genie *COMP*.

a. Wariant **c.1331C>G (p.Ser444Cys)** znajdujący się w **eksonie 13** genu *COMP* powodował zamianę nukleotydu cytozyny (C) na guaninę (G) w pozycji 1331, co skutkowało zamianą aminokwasu seryny na cysteinę w pozycji 444 białka kodowanego przez zmutowany gen. Badanie potencjalnej patogenności tej zmiany sensu za pomocą algorytmów “in silico” dało niejednoznaczne wyniki: 4 algorytmy oceniły tę zamianę jako patogenną, 12 jako VUS a dwa jako zmianę łagodną.

b. Drugi wariant **c.1590C>A (p.Asp530Glu)** znajdujący się w **eksonie 14** genu *COMP* powodował zamianę nukleotydu cytozyny (C) na adeninę (A) w pozycji 1590, co skutkowało zamianą kwasu asparaginowego na kwas glutaminowy w pozycji 530 białka kodowanego przez zmutowany gen. Badanie potencjalnej patogenności tej zmiany sensu za pomocą algorytmów “in silico” dało niejednoznaczne wyniki: 5 algorytmów oceniło tę zamianę jako patogenną, 11 jako VUS a dwa jako zmianę łagodną.

#### **4.2.1. Mutacje o nieznanym znaczeniu wykryte w genie *COL11A1***

Dwie z 5 zmian o nieznanym znaczeniu (VUS): c.2804 C>A (p.Pro935His), rs368422725 i c.5395G>A (p.Asp1799Asn) zostały wykryte w genie *COL11A1*.

c. Wariant **c.2804 C>A (p.Pro935His), rs368422725** znajdujący się w **eksonie 37** genu *COL11A1* powodował zamianę nukleotydu cytozyny (C) na adeninę (A) w pozycji 2804, co skutkowało zamianą aminokwasu proliny na cysteinę w pozycji 935 białka kodowanego przez zmutowany gen. Komputerowe przewidywanie potencjalnej patogenności tej zmiany za pomocą algorytmów “in silico” zasugerowało jej możliwy wpływ na zmianę struktury i funkcji

zmienionego białka, chociaż wyniki były także niejednoznaczne: 4 algorytmy oceniły tę zamianę jako patogenną, 10 jako VUS a 6 jako zmianę łagodną.

**d.** Wariant **c.5395G>A (p.Asp1799Asn)** jest zmianą missensową znajdującą się w **eksonie 67** genu *COL11A1*. Ta zmiana powodowała zamianę nukleotydu guaniny (G) na adeninę (A) w pozycji 5395, co skutkowało zamianą aminokwasu kwasu asparaginowego na asparaginę w pozycji 444 białka kodowanego przez zmutowany gen. Komputerowe przewidywanie potencjalnej patogenności tej zmiany za pomocą algorytmów “in silico” zasugerowało jej możliwy szkodliwy wpływ na zmianę struktury i funkcji zmienionego białka. Wyniki nie były jednoznaczne: 10 algorytmy oceniły tę zamianę jako patogenną, a 9 jako VUS, ale prawdopodobieństwo patogenności tego wariantu było większe, niż wcześniej badanych.

#### **4.2.1. Mutacja o nieznanym znaczeniu wykryta w genie *COL5A1***

Jedna z 5 zmian o nieznanym znaczeniu (VUS): p.A532V (także opisywany jako c.1595C>T) została wykryta w genie *COL5A*.

**e.** Wariant **p.A532V (c.1595C>T)** znajdujący się w **eksonie 13** genu *COL5A1* powodował zamianę nukleotydu cytozyny (C) na tyminę (A) w pozycji 1595, co skutkowało zamianą aminokwasu alaniny na walinę w pozycji 532 białka kodowanego przez zmutowany gen. Oba te aminokwasy mają bardzo podobne właściwości dla produkowanego białka. Badanie potencjalnej patogenności tej zmiany sensu za pomocą algorytmów “in silico” dało niejednoznaczne wyniki: 5 algorytmów oceniło tę zamianę jako VUS a 13 jako zmianę łagodną. Prawdopodobieństwo patogenności tego wariantu było zatem znacznie mniejsze, niż wcześniej badanych.

### **4.3 Wyniki badania asocjacyjnego.**

Badania asocjacyjne (badania częstości występowania mutacji wykrytych w badaniach detekcyjnych) wykazały, że wariant c.1595C>T (p.Ala532Val) genu *COL5A1* został wykryty tylko w jednym z 345 przypadków (0,3%) z grupy badanej i w 3 z 1035 (0,3%) przypadków z grupy kontrolnej (p=1, OR=1).

Żaden z 4 pozostałych wariantów: c.2840C>A, c.5395G>A, c.1331C>G, c.1590C>A nie został wykryty wśród 345 pacjentów z grupy badanej i wśród 1035 osób z grupy kontrolnej.

#### **4.4 Obustronne występowanie zespołu kanału nadgarstka u pacjentów**

Wyniki przedstawione w **tabelach 1 i 2** wykazały, że obustronny zespół występował z podobną częstością w grupie 96 pacjentów z rodzinnym występowaniem choroby (93%, jak w całej badanej grupie (91%) (test Fishera,  $p=0,67$ ).

#### **4.5 Podsumowanie wyników badań**

Uzyskane wyniki badań potencjalnego związku mutacji 5 wybranych genów: *COL11A*, *COL1A*, *COL5A1*, *COMP* and *GSTM1* z zespołem kanału nadgarstka wykazały brak ich jednoznacznej patogenności. Wykryto jedynie 5 mutacji o niepewnym znaczeniu: (rs144510951, rs368422725, rs747106682, rs759687021, rs36900093), które jednak występują bardzo rzadko w Polskiej populacji. Zatem można stwierdzić brak silnego związku między mutacjami wybranych genów a ryzykiem zachorowania na zespół kanału nadgarstka wśród polskich pacjentów.

**Tabela 4.1. Przewidywana patogenność wariantów genów *COL11A1*, *COL5A1* i *COMP*.**

GEN	TRANSCRIPT	HGVS CDNA	HGVS PROTEIN	Type	db SNP	CLINVAR	VARSome	BLOSUM	DANN	DEOGEN2	EIGEN	EIGEN PC	FATHMM	FATHMM-MKL	FATHM-XF	LIST-S2	LRT	M-CAP	Mutation assessor	Mutation tester	MPV	Primate AI	Provean	SIFT	SIFT4G
<i>COMP</i>	NM_00009 5.2	c.1590C>A	p.(Asp530Glu)	Missense	rs75968 7021	VUS	LB	B	VUS	VUS	VUS	B	VUS	VUS	VUS	P	P	P	P	VUS	VUS	VUS	VUS	P	VUS
<i>COMP</i>	NM_00009 5.2	c.1331C>G	p.(Ser444Cys)	Missense	rs74710 6682	VUS	VUS	VUS	VUS	P	VUS	VUS	P	VUS	VUS	VUS	VUS	P	B	VUS	VUS	VUS	P	VUS	B
<i>COL11A1</i>	NM_08062 9.2	c.2840C>A	p.(Pro947His)	Missense	rs36842 2725	VUS	VUS	VUS	VUS	VUS	P	P	B	P	VUS	VUS	VUS	B	B	VUS	B	VUS	P	VUS	B
<i>COL11A1</i>	NM_08062 9.2	c.5395G>A	p.(Asp1799Asn)	Missense	rs14451 0951	VUS	VUS	VUS	VUS	VUS	P	P	VUS	P	P	P	P	VUS	P	VUS	VUS	P	VUS	P	P
<i>COL5A1</i>	NM_00009 3.4	c.1595C>T	p.(Ala532Val)	Missense	rs36900 0939	VUS	B	VUS	VUS	B	B	B	VUS	B	B	VUS	B	B	B	B	B	VUS	B	B	B

Oznaczenia: B - łagodny, LB - prawdopodobnie łagodny; P- patogenny, VUS – wariant o niepewnym znaczeniu



## 5 DYSKUSJA

Przyczyna powstawania zespołu kanału nadgarstka nie całkowicie poznana. Wśród wielu koncepcji na temat patogenezy tego procesu uwagę zwracają potencjalne czynniki genetyczne wpływające na charakterystykę strukturalnych komponentów włókienek kolagenu, stanowiącego podstawowy składnik tkanki łącznej, w tym ścięgien zginaczy i troczka zginaczy. Podejrzewa się, że trzy różne mechanizmy mogą być powiązane z genetyczną predyspozycją do ZKN: synteza kolagenu, degradacja kolagenu i ochrona przez stresem oksydacyjnym w tkance łącznej. Kilka grup genów jest zaangażowanych w regulację tych procesów. Geny kodujące syntezę rzadszych form kolagenu mogą zmieniać morfologię i strukturę ścięgien i troczka zginaczy, a także właściwości mechaniczne tych struktur. Kolagen tkanki łącznej jest rozkładany przez metaloproteinazy matrix komórkowego (MMP) i zmiany w tych genach mogą mieć wpływ na właściwości struktur kolagenowych, a przez to na powstawanie ZKN. Także polimorfizmy genu kodującego syntezę transferazy S-glutationowej, enzymu biorącego udział w dezaktywacji wolnych rodników są podejrzewane o związek z zespołem kanału nadgarstka. Jest kilka aspektów choroby, które mogą wskazywać na potencjalną rolę czynników genetycznych w jej powstawaniu. Należą do nich: pojawienie się choroby w młodym wieku, rodzinne występowanie ZKN wśród bliskich krewnych, w tych rodzinach częstsze niż w całej populacji, występowanie ZKN wśród większości członów danej rodziny i choroba zajmująca obie ręce. Jest prawdopodobne, że u osób - nosicieli zmutowanych genów choroba ujawnia się w młodym wieku, zajmuje obie ręce, występuje wśród innych członków rodziny; nie ma natomiast wystarczających dowodów na to, czy ma cięższy kliniczny przebieg i częściej nawraca po leczeniu operacyjnym. Jak dotychczas nie opublikowano prac, które podejmowałyby te właśnie aspekty schorzenia i dlatego badania prowadzone w tym kierunku należy uznać za obiecujące. Takie były przesłanki motywujące autora do zajęcia się tym tematem.

Inaczej niż we wcześniejszych badaniach publikowanych w piśmiennictwie, wyniki mojej pracy nie potwierdziły jednoznacznego związku między znalezionymi mutacjami 5 badanych genów, a większym ryzykiem zachorowania na ZKN. Może być kilka powodów takiego wyniku badania, z których najważniejszy wydaje się być związany z doбором grup badanej i kontrolnej. W mojej pracy grupy te składały się z osób będących etnicznie Polakami (rasa biała, kaukaska), podczas gdy w większości dotychczas opublikowanych badań na temat

genetycznych predyspozycji do zespołu kanału nadgarstka, grupy badane były złożone z osób niebędących Europejczykami (czarnoskórzy pacjenci z Republiki Południowej Afryki, Turcy i Brazylijczycy). We wszystkich tych pracach genotypowano grupy niehomogenne rasowo. Jest dobrze znane, że częstość występowania określonych mutacji genów może być różna u osób z różnych ras i dlatego wyniki takich badań wśród polskich pacjentów mogły dać inne wyniki, niż w badaniach pacjentów należących do innych grup etnicznych i odmiennych rasowo.

Wyniki moich badań wykazały także, że częstość występowania obustronnego ZKN jest podobna wśród pacjentów z rodzinnym występowaniem choroby i wśród osób, które nie miały przypadków choroby wśród bliskich krewnych. Ten wynik nie potwierdza wcześniejszych przypuszczeń, że występowanie zespołu uciskowego na nerw pośrodkowy w obu nadgarstkach u jednego pacjenta ma związek z predyspozycjami genetycznymi.

W dalszej części dyskusji chciałbym się skupić na omówieniu aktualnego piśmiennictwa, w którym badano wpływ czynników genetycznych na powstawanie ZKN.

## **5.1 Znaczenie mutacji genów kodujących syntezę kolagenu**

Jak już wcześniej wspomniano we wstępie, wśród wielu koncepcji na temat patogenezy ZKN uwagę zwracają potencjalne czynniki genetyczne wpływające na charakterystykę strukturalnych komponentów włókienek kolagenu, stanowiącego podstawowy składnik tkanki łącznej, w tym ścięgien zginaczy i troczka zginaczy. Wyniki kilku publikacji wykazały, że mutacje genów regulujących syntezę podtypów kolagenu oznaczonych rzymskimi cyframi I, V, XI i XII mogą być odpowiedzialne za powstawanie niektórych schorzeń układu ruchu.

### **5.1.1. Wpływ syntezy niektórych podtypów kolagenu na powstawanie schorzeń układu ruchu.**

Wykazano na przykład, że wariant alfa ( $\alpha$ ) genu *COL1A1*, który odpowiada za wytwarzanie łańcucha  $\alpha 1$  kolagenu typu I jest zmianą funkcjonalną CPLA 1 kodującą receptor dla czynnika Sp1 polimorfizmu (rs1800012, G/T). Wykazano, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) TT był związany z mechanicznymi właściwościami ścięgien i więzadeł, szczególnie za większą wytrzymałość więzadła krzyżowego przedniego (ACL) w stawie kolanowym [55]. Podobnie, mutacje (SNP) genów *COL5A1* (rs71746744) i *COL11A1* (rs3753841, T/C i

rs1676486, C/T) regulujących syntezę podtypów kolagenu V i X wpływają na zwiększone ryzyko tendinopatii ścięgna Achillesa [56, 57]. Wyniki tych badań zachęciły do poszukiwań potencjalnych związków między mutacjami genów regulujących wytwarzanie rzadszych podtypów kolagenu i ryzyka zachorowania na ZKN.

### 5.1.2. Związek syntezy niektórych podtypów kolagenu z zachorowaniem na ZKN

Efekty działania mutacji w genach rodziny *COL* zestawiono w Tabeli 5.1.

**Tabela 5.1** Efekt działania poszczególnych genów rodziny *COL*, kodujących syntezę różnych podtypów kolagenu, mających potencjalny związek z zachorowaniem na ZKN.

Badany gen	Efekt działania poszczególnych mutacji badanego genu na syntezę różnych typów kolagenu i ich potencjalny związek z zachorowaniem na ZKN
<i>COL11A1</i>	Obecność nukleotydu tyminy (T) w wariacie genu <i>COL11A1</i> rs1676486 wpływała na zmniejszenie wytwarzania łańcucha $\alpha 1$ podtypu kolagenu XI, a to mogłoby mieć wpływa na zwiększenie ryzyka zachorowania na ZKN.
<i>COL5A1</i> i <i>COL11A1</i>	Obecność nukleotydów T-C wariantów (rs3753841, rs1676486 and rs1746744) genów <i>COL5A1</i> i <i>COL11A1</i> ma wpływ na zmienioną stabilność mRNA, to skutkuje zmianami wytwarzania podtypów kolagenu V i IX. Oba podtypy kolagenu regulują rozkład i rozmiar włókienek kolagenowych w tkance łącznej, a przez to mogą zmieniać właściwości mechaniczne ścięgien i innych struktur łącznotkankowych w kanale nadgarstka, co może pośrednio wpływać na zwiększone ryzyko zachorowania na ZKN [58, 59].
<i>COL11A1</i>	Wykazano istotny związek między SNP TT genu <i>COL11A1</i> (wariant rs3753841, T/C) i zwiększonym ryzykiem zachorowania na ZKN. Ten umiejscowiony w eksonie 52 wariant wpływa na zamianę aminokwasu leucyny na prolinę w pozycji 1323 łańcucha podtypu kolagenu $\alpha$ XI),

	<p>natomiast wariant rs1676486 umiejscowiony w eksonie 62 powoduje zamianę aminokwasu proliny na seryna w pozycji 1535 łańcucha kolagenu. Taka kombinacja alleli może potencjalnie wywoływać zmiany konstrukcji przestrzennej ułożenia włókien kolagenu podtypu IX, a to może mieć wpływ na jego strukturalne i czynnościowe właściwości. Takie zmiany, przez ich potencjalny wpływ na budowę ścięgien i innych struktur łącznotkankowych w kanale nadgarstka mogłyby mieć związek z powstawaniem ZKN [25, 60].</p>
<i>COL11A1</i>	<p>Wykazano, że wspomniany wcześniej rzadki allel T wariantu rs1800012, G/T genu <i>COL1A1</i> kodującego wytwarzanie łańcucha <math>\alpha 1</math> kolagenu typu I ma związek z podwyższonym ryzykiem zachorowania na ZKN wśród kobiet. Wykazano także, że zastąpienie aminokwasu nukleotydu tyrozyny przez guaninę w miejscu wiązania Sp1 intronu 1 genu <i>COL1A1</i> skutkuje podwyższoną skłonnością do wiązania przez czynnik transkrypcyjny Sp1. Taka sytuacja ma wpływ na ekspresję genu <i>COL1A1</i>, zwiększając wytwarzanie homotrymeru kolagenu typu I, składającego się z 3 łańcuchów <math>\alpha 1(I)</math>. Zwiększona zawartość homotrymerów kolagenu I w ścięgnach i więzadłach i innych strukturach łącznotkankowych może zmieniać ich właściwości i odporność na urazy. Takie zmiany mogą mieć także potencjalny związek z ryzykiem zachorowania na ZKN [22, 61].</p>

Dada i wsp. (2016) przedstawili wyniki badań genetycznych wśród czarnoskórych mieszkańców Republiki Południowej Afryki. Do badań włączono 103 pacjentów z ZKN i 150 osób takich samych etnicznie dobranych jako grupa kontrolna, którzy nie mieli objawów choroby. Wszystkie te osoby genotypowano, poszukując jaki jest rozkład wariantów genów *COL1A1* rs1800012 (G/T), *COL11A1* rs3753841 (T/C), *COL11A1* rs1676486(C/T), *COL11A2* rs1799907 (T/A) i *COL12A1* rs970547 (A/G) w obu grupach. Wyniki badań wykazały, że wariant TT genu *COL11A1* rs3753841 był statystycznie istotnie częstszy wśród osób z ZKN, w porównaniu z grupą kontrolną (21.4% vs 7.9%; p=0,004). Zaobserwowano także statystycznie istotną tendencję do nadreprezentacji rzadkiego allelu T wśród pacjentów-kobiet z ZKN (p=0,036). Autorzy tych badań uważają, że te warianty, łącznie z wcześniej

opisanym wariantem rs71746744 (AGGG) genu *COL5A1* sugerują interakcję między genami *COL5A1* i *COL11A1*, co może mieć związek z podwyższonym ryzykiem zachorowania na ZKN [24].

Wyniki omawianych prac dostarczają informacji o potencjalnym wpływie czynników genetycznych na ryzyko zachorowania na ZKN i na możliwą rolę zaburzeń morfologii i kompozycji włókien kolagenowych w etiologii tego zespołu. Jednak te podejrzenia nie potwierdziły się w mojej pracy, ponieważ żaden z wariantów badanych genów (*COL1A*, *COL5A1*, *COL11A*) regulujących syntezę kolagenu nie okazał się patogenny i nie występował częściej wśród chorych, w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki badań mutacji 3 wybranych genów z rodziny *COL* wykazały brak ich jednoznacznej patogenności. Wykryto jedynie 5 mutacji o niepewnym znaczeniu, które jednak występują bardzo rzadko w Polskiej populacji. Taki wynik nie może jednoznacznie zaprzeczać ewentualnym związkom mutacji w genach *COL* z zespołem kanału nadgarstka, jednak wymagałoby to dalszych badań na większych grupach pacjentów.

## **5.2 Wpływ mutacji w genach kodujących syntezę metaloproteinaz matrix komórkowego, umiejscowionych w chromosomie 11q22.**

W poprzednim paragrafie omówiono związki między niektórymi genami regulującymi wytwarzanie różnych podtypów (frakcji) kolagenu a ryzykiem zachorowania na ZKN. Każdy z tych podtypów charakteryzuje się nieco odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi, a wchodząc w skład różnych struktur łącznotkankowych, ma wpływ na ich właściwości mechaniczne. Jednak ostateczne właściwości kolagenu zależą także od innych czynników. Włókienka kolagenowe wchodzące w skład struktur łącznotkankowych są modelowane nie tylko przez omówione wcześniej czynniki, ale także przez rodzinę genów syntezujących enzymy (endopeptydazy) nazywane metaloproteinazami matrix komórkowego (*MMP-y*) [62, 63]. W odróżnieniu od rodziny genów *COL* regulujących syntezę kolagenu, metaloproteinazy wpływają na jego rozpad (degradację). Degradacja kolagenu znajdującego się w różnych strukturach łącznotkankowych takich jak ścięgna i więzadła, wiąże się z ich osłabieniem i większą podatnością na urazy. Jednak proces ten może mieć także wpływ na struktury wewnątrz kanału nadgarstka, na zmiany ciśnienia wewnątrzkanałowego, a przez to na

powstawanie zespołu kanału nadgarstka. W tabeli 5.2. opisano wpływ różnych metaloproteinaz na procesy degradacji różnych frakcji kolagenu [62, 63, 64, 65].

**Tabela 5.2 Efekt działania różnych metaloproteinaz na degradację kolagenu**

<b>Badana MMP</b>	<b>Efekt działania różnych metaloproteinaz na degradację kolagenu</b>
<i>MMP3</i> , <i>MMP10</i>	Te MMP-y biorą udział w degradacji kilku podtypów kolagenu, m.in. typu V, proteoglikanów i innych białek matrix zewnątrzkomórkowego. Te MMP-y mają także zdolność do aktywacji kilku pre-metaloproteinaz.
<i>MMP1</i>	Ta MMP jest odpowiedzialna za degradację regionu trójłańcuchowego w większości podtypów kolagenu.
<i>MMP12</i>	Ta MMP jest odpowiedzialna za degradację elastyny i innych białek matrix zewnątrzkomórkowego.

Wyniki kilku prac wykazały statystycznie istotny związek następujących mutacji genu *MMP*: AA *MMP3* rs679620 (A/G, E45 K); CC *MMP3* rs591058 (T/C) i AA *MMP3* rs650108 (G/A) i przewlekłej tendinopatii ścięgna Achillesa [62, 65]. Jest to schorzenie, które często dotyka osoby uprawiające sporty skocznościowe i bieganie, znacznie zaburzając wyniki sportowe. Tendinopatia ścięgna Achillesa rozwija się na tle sumujących się mikrourazów i przeciążeń, które zaburzają strukturę ścięgna i w konsekwencji powodują dolegliwości bólowe, obrzęk i zaburzenie funkcji ścięgna. Pacjenci, którzy noszą zmutowany gen *MMP3* mają istotnie częściej problemy ze ścięgnem Achillesa w porównaniu do osób bez tej mutacji [65].

Haplotyp złożony z wariantów genu *MMP*: *MMP10* rs486055 (C/T, R53); *MMP1* rs1799750 (G/GG); *MMP3* rs679620 (A/G) i *MMP12* rs2276109 (A/G), które są umiejscowione wspólnie w chromosomie 11q22 jest podejrzewany o wpływ na zwiększone ryzyko uszkodzenia więzadła krzyżowego przedniego w stawie kolanowym [66, 67]. Biorąc pod uwagę potencjalny wpływ niektórych mutacji genów metaloproteinaz na homeostazę tkanki łącznej i jej struktur takich jak ścięgna i więzadła, można podejrzewać, że mogą mieć one także wpływ na te struktury wewnątrz kanału nadgarstka, a przez to także na ryzyko powstania zwiększonego ciśnienia wewnątrzkanałowego i w konsekwencji na rozwinięcie się ZKN.

Cztery mutacje metaloproteinaz były najbardziej podejrzewane o związek z ZKN, ponieważ wcześniejsze badania wykazały ich wpływ na powstawanie innych schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego. Mutacja *MMP1* rs1799750 (G/GG) polega na obecności pary nukleotydów guaniny (GG), na braku nukleotydu guaniny (G) w pozycji 1607 bp łańcucha DNA. Wariant (GG) tworzy miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego Ets które wywołuje zwiększenie właściwości transkrypcyjnych genu *MMP1*, w porównaniu z allelem bez dodatkowego nukleotydu G [62, 63]. Mutacja (wariant) *MMP12* rs2276109 (A/G) reguluje wiązanie aktywatora czynnika transkrypcyjnego białka AP-1, które wpływa na ekspresję genu *MMP12*. Warianty *MMP3* rs679620 i *MMP10* rs486055 powodują zastąpienie pojedynczego nukleotydu innym nukleotydem, co skutkuje zmianą sekwencji aminokwasów w strukturze białek – produktów tych genów [62, 63]. Dokładne skutki tej substytucji nie są znane, ale wyniki wcześniejszych prac sugerują ich potencjalne związki chorobami ścięgien i więzadeł, podatności na urazy a także na ryzyko rozwinięcia się ZKN.

Burger i wsp. (2016) przedstawili wyniki badań genetycznych przeprowadzonych na kolorowej populacji południowoafrykańskiej: 97 kobiet z klinicznie i elektrofizjologicznie potwierdzonym ZKN i 131 zdrowych ochotników bez historii objawów ZKN (grupa kontrolna) zostało genotypowanych dla czterech wariantów genu *MMP*: *MMP10* rs486055 (C/T), *MMP1* rs1799750 (G/GG), *MMP3* rs679620 (A/G) i *MMP12* rs2276109 (A/G). Wyniki tego genotypowania nie wykazały niezależnego związku między tymi wariantami genów a zespołem kanału nadgarstka (wynik negatywny). Podobnie nie stwierdzono istotnego związku między którymkolwiek z wywnioskowanych haplotypów skonstruowanych z tych wariantów a zespołem [25]. Odkrycie to nie wyklucza jednak innych wariantów w obrębie tych samych lub innych genów *MMP* w tym miejscu z ryzykiem ZKN. Kilka innych genów *MMP*, w tym *MMP7*, *MMP8*, *MMP13* i *MMP20*, jest zlokalizowanych na długim ramieniu chromosomu 11, w pobliżu genów wcześniej badanych. Wariant *MMP3* 5A/6A był związany z kilkoma wieloczynnikowymi schorzeniami tkanki łącznej i wykazano, że bierze udział w regulacji ekspresji genu *MMP* [66]. Autorzy sugerują, że te warianty genów mogą być rozsądnymi kandydatami do przyszłych badań nad wpływem mutacji w genach *MMP* na ryzyko zespołu kanału nadgarstka. Pozytywne wyniki może przynieść również zastosowanie technologii

sekwencjonowania nowej generacji, tj. sekwencjonowania celowanego, w celu identyfikacji dodatkowych potencjalnie powiązanych wariantów w klastrze *MMP*.

Należy zauważyć, że wyżej wymienione badanie opierało się na specyficznej kolorowej populacji południowoafrykańskiej, a liczba uczestników była stosunkowo niewielka. W związku z tym uzasadnione wydają się dalsze badania roli innych wariantów genów *MMP* w modulowaniu ryzyka rozwoju ZKN, oparte na populacji europejskiej i obejmujące większą grupę pacjentów. W mojej pracy nie badałem potencjalnego wpływu genów metaloproteinaz na ryzyko powstawania ZKN, ale wydaje się, że takie badania warto przeprowadzić.

### **5.3 Związek między mutacjami w genie *COMP* (ang. cartilage oligomeric matrix protein) i ZKN.**

Jednym z genów, którego mutacje mogą być związane z rodzinnym występowaniem ZKN jest gen *COMP*. Mutacje tego genu wykryto w rodzinach, których prawie wszyscy członkowie chorowali na ZKN. Li i wsp. wykryli dwie mutacje w genie *COMP* w 2 dużych rodzinach, które były związane z zespołem kanału nadgarstka i mnogą dysplazją nasadową [27]. *COMP* jest niekolagenowym białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej, które odgrywa rolę w morfologii i organizacji macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez interakcje z innymi białkami, takimi jak kolageny I, III, IX i matrilina. Liczne mutacje w *COMP* zidentyfikowano u pacjentów z mnogą dysplazją nasadową i pseudocondroplazją. Obie mutacje odkryte przez Li i ao., upośledzają wydzielanie *COMP* przez tenocyty, ale mutacja związana z mnogą dysplazją nasadową zaburza również wydzielanie białek w chondrocytach. *COMP* wykazuje ekspresję głównie w chrząstce, ścięgnach i więzadłach, wspierając patogenną rolę zmutowanego *COMP* w innych zaburzeniach tkanki łącznej. Wyniki tego badania wykazały, że wydzielane przez zmutowanego gen białko powoduje określone skutki, które wpływają na różne domeny. Substytucja substancji V66E upośledza zmianę patogenną poprzez zakłócenie pentameryzacji *COMP*. Zmutowane kompleksy *COMP* są słabo wydzielane przez komórki ścięgien i więzadeł, podczas gdy sekcja chondrocytów pozostaje niezmienną. Mechanizm regulujący specyficzne dla komórki wydzielanie substancji V66E-COMP nie jest znany. Wyniki tych badań ujawniły patogenny mechanizm prowadzący do rozwoju zespołu kanału nadgarstka: zmutowany gen *COMP* zakłóca czynność macierzy zewnątrzkomórkowej w ścięgnach i więzadłach, co



zmniejsza ich zdolność do naprawy. Bez wystarczającej aktywności naprawczej i przy ciągłym zapaleniu fibroblasty i inne typy komórek gromadzą się, a skład macierzy zewnątrzkomórkowej zmienia się, powodując obrzęk i pogrubienie tkanek zbudowanych z kolagenu. To z kolei powoduje ucisk na sąsiednie struktury, takie jak nerw pośrodkowy w kanale nadgarstka [27]. Wyniki moich badań nie potwierdziły jednak (podobnie jak w przypadku genów rodziny *COL*) tych podejrzeń, ponieważ żaden z wariantów badanych genu *COMP* nie okazał się patogenny i nie występował częściej wśród chorych, w porównaniu z grupą kontrolną.

#### **5.4 Wpływ mutacji w genach kodujących syntezę wariantów S-transferazy glutationowej (GST).**

Innym mechanizmem, co do którego podejrzewa się, że jest zaangażowany w rozwój idiopatycznego zespołu kanału nadgarstka, jest stres oksydacyjny w wyniku nadprodukcji wolnego tlenu ( $O^{\cdot}$ ) i rodników hydroksylowych ( $OH^{\cdot}$ ) w tkankach miękkich ścięgien i więzadeł [28, 29]. Zwiększona synteza lub niedostateczna eliminacja reaktywnych form tlenu może powodować uszkodzenie struktur tkanek miękkich i może być mechanizmem leżącym u podstaw rozwoju ogólnoustrojowych chorób zapalnych i nowotworów złośliwych. Istnieje kilka substancji znanych jako przeciwutleniacze lub wymiatacze rodników, które wykazują właściwości eliminujące wolne rodniki, w tym witaminy (C, D, E), aminokwasy (N-acetylcysteina), hormony (steroidy) i mannitol. Istnieje również kilka enzymów, które mają ten potencjał, takich jak peroksydaza, katalaza i S-transferazy glutationowe (co ciekawe, rodniki hydroksylowe  $OH^{\cdot}$  nie mają własnych naturalnych mechanizmów detoksykacyjnych). S-transferazy glutationowe (GST) to duża rodzina izoenzymów biorących udział w mechanizmie obronnym przed cytotoksycznym działaniem reaktywnych form tlenu, poprzez inaktywację ich metabolitów wtórnych. Najlepiej zbadanymi izoenzymami z tej rodziny są GST-mu1 (*GSTM1*), GST-theta1 (*GSTT1*) i GST-pi1 (*GSTP1*). Podejrzewa się, że pełnią one rolę ochronną przed rozwojem ogólnoustrojowych chorób zapalnych i nowotworów złośliwych związanych ze stresem oksydacyjnym [28]. Najczęstszymi polimorfizmami *GSTM1* i *GSTT1* są delecje w tych genach, powodujące brak funkcji enzymu. Innym częstym polimorfizmem w tej grupie jest *GSTP1* Ile105Val, którego warianty Ile105Val/Val (AG) i Ile105Val/Val (GG) powodują zmniejszoną aktywność enzymatyczną w porównaniu z wariantem Ile105Val/Val (AA) [29]. Wyniki kilku badań wykazały związek między niektórymi wariantami izoenzymów z rodziny

*GST* a chorobami reumatoidalnymi, cukrzycą i nowotworami złośliwymi, w których patogenezie biorą udział reaktywne formy tlenu [68, 69]. Wyniki tych badań skłoniły badaczy do poszukiwania potencjalnych powiązań między wariantami genów *GST* a ryzykiem rozwoju zespołu kanału nadgarstka.

Eroglu i wsp. (2016) przedstawili wyniki badania oceniającego częstość występowania trzech wariantów S-transferazy glutationowej *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* Ile105Val w tureckiej populacji pacjentów z ZKN i grupy kontrolnej (odpowiednio n=140 i n=97). Częstość występowania wariantów *GSTT1* i *GSTM1* określono metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), natomiast do wykrycia wariantu *GSTP1* Ile105Val wykorzystano polimorfizm długości fragmentu restrykcyjnego PCR. Wyniki wykazały statystycznie istotnie (p=0,01) większą częstość występowania wariantu *GSTM1-0* u pacjentów z zespołem kanału nadgarstka w porównaniu ze zdrowymi osobami z grupy kontrolnej. Co więcej, wariant zerowy *GSTM1* wiązał się z około dwukrotnym wzrostem ryzyka zachorowania na neuropatie uciskowe, w tym na zespół kanału nadgarstka. Kombinacja wariantów *GSTM1-0* i *GSTT1* była również częściej prezentowana u pacjentów z ZKN, ale jej istotność statystyczna była graniczna (p=0,045) i nie zwiększała ryzyka rozwoju choroby. Wyniki tego badania wykazały również istotny statystycznie związek między większym nasileniem klinicznym zespołu kanału nadgarstka (pod względem wyższych wyników w kwestionariuszu Levine'a) u pacjentów z wariantami *GSTP1* Ile/Val i Val/Val w porównaniu z *GSTP1* Ile/Ile, który występował częściej u pacjentów z klinicznie łagodniejszą chorobą [29]. Autorzy sugerują, że przyszłe badania nad potencjalną rolą wariantów S-transferazy glutationowej w rozwoju zespołu kanału nadgarstka są uzasadnione.

Wyniki moich badań wykazały brak jednoznacznej patogenności mutacji genu *GSTM1* i nie potwierdziły ich wpływu na ryzyko powstania zespołu kanału nadgarstka w populacji polskich pacjentów.

## **5.5 Rodzinne występowanie zespołu kanału nadgarstka**

Rodzinne występowanie zespołu kanału nadgarstka nie było przedmiotem wielu badań, a wyniki opublikowanych nie dostarczają przekonujących danych. Występowanie choroby wśród prawie wszystkich członków jednej rodziny zostało po raz pierwszy opisane w 1959 roku [70]. Znacznie później zauważono, że część pacjentów z zespołem kanału nadgarstka

deklarowało występowanie podobnych objawów u członków ich rodzin, co mogło wskazywać na rodzinną predyspozycję [71, 72]. Badanie przeprowadzone na większej grupie chorych przez kolejnego badacza wykazało, że 39% (165 z 421) pacjentów, którzy operowanych z powodu zespołu kanału nadgarstka deklarowało występowanie podobnych objawów wśród członków ich rodzin. W grupie kontrolnej (bez objawów choroby), takie objawy wśród członków rodzin zgłaszało tylko 13% osób [73]. Z drugiej strony inni autorzy, na podstawie przeglądu piśmiennictwa stwierdzili, że rodzinne występowanie zespołu o prawdopodobnie genetycznym podłożu, zdarza się bardzo rzadko [74].

W mojej pracy występowanie schorzenia wśród przynajmniej jednego członka bliskiej rodziny stwierdziłem u 96 pacjentów (22% całej grupy). W innym badaniu z mojego ośrodka analizowano dane demograficzne pacjentów, i wywiad w kierunku rodzinnego występowania choroby u 120 pacjentów, 92 kobiet (77%) i 28 mężczyzn (23%) w wieku śr. 56 lat [75]. Rodzinne występowanie zespołu kanału nadgarstka stwierdzono u 21 osób (17%), 16 kobiet i 5 mężczyzn. U 18 z tych osób choroba występowała w obu rękach jednocześnie, a u 3 dotyczyła jednej ręki. U 3 pacjentów zanotowano zachorowanie 3 członków rodziny, u 8 dwóch członków rodziny, a u 10 jednego, co daje łącznie 35 chorych krewnych. Najczęściej chorowały siostry pacjentów (16 przypadków), matki (12 przypadków), córki (2 przypadki), bracia (2 przypadki), babcie (2 przypadki) i ciotka (1 przypadek). U 31 z 35 z tych osób (88%) choroba dotyczyła obu rąk. Zachorowania członków rodziny wystąpiły w okresie od 2 do 30 lat wcześniej. Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują na umiarkowanie częste (17%) występowanie zespołu kanału nadgarstka wśród krewnych osób z tym schorzeniem [75].

Zachorowania wśród członków rodzin są znacznie częstsze niż w całej populacji (1%) i niż w grupie kobiet po 40 roku życia (5%). Jednak ten wynik nie oznacza automatycznie potwierdzenia hipotezy o rodzinnej skłonności do ZKN lub jego genetycznym podłożu. Trzeba wziąć pod uwagę, że do wystąpienia choroby predysponuje wiele czynników, np. płeć żeńska, towarzyszące choroby, cechy konstytucjonalne (niski wzrost, krępa budowa ciała, szerokie i grube nadgarstki) czy charakter wykonywanej pracy [7, 8, 9]. Tylko część z tych czynników można podejrzewać o podłoże genetyczne. Występowanie choroby u krewnych płci żeńskiej może wynikać z np. rodzinnej tendencji do niskiego wzrostu, krępej budowy ciała, otyłości lub częstszym występowaniu w rodzinie chorób układowych - cukrzycy czy RZS. W takiej sytuacji

pierwotnymi cechami o predyspozycjach rodzinnych będą te wymienione, a pojawienie się ZKN będzie do nich wtórne. Ponieważ nie wykryto dotychczas żadnych mutacji prowadzących wprost do zachorowania na ZKN, dlatego można przypuszczać, że to rodzinne występowanie czynników predysponujących (np. typ konstytucjonalny, budowa nadgarstków, niektóre choroby) odpowiada za częstsze występowanie ZKN w tych rodzinach.

Do genetycznie uwarunkowanych zaburzeń biochemicznych, których skutkiem jest częstsze występowanie ZKN w rodzinach nimi dotkniętych zalicza się dziedziczną amyloidozę, wrodzone miopatie i rodzinną hipercholesterolemię [76, 77, 78]. Opisywane było także rodzinne występowanie anomalii anatomicznych budowy kanału nadgarstka, które skutkowały powstaniem choroby (tabela 5.3) [79]:

**Tabela 5.3. Anomalie anatomiczne budowy i zawartości kanału nadgarstka stwierdzone u chorych z rodzinnym występowaniem ZKN**

<b>Anomalia anatomiczna</b>
Zwężenie przekroju kostnego w porównaniu z przeciętnymi wymiarami
Ponadprzeciętne pogrubienie troczka zginaczy
Obecność brzuśców mięśni zginaczy palców w kanale nadgarstka
Obecność tętnicy pośrodkowej
Odmienności anatomiczne nerwu pośrodkowego (nerw dwudzielny)

W tych bardzo rzadkich zespołach ZKN występuje u większości członków jednej rodziny. Mahjenh i wsp. (2001) opisują rodzinę narodowości fińskiej, której 4 z 7 dzieci (57%), dwie córki i dwóch synów, zachorowało na ZKN w wieku poniżej 20 lat. U wszystkich tych osób objawy występowały w obu rękach. Ojciec tych dzieci także miał obustronny ZKN, ale nikt z jego rodzeństwa ani rodzice nie chorowali. Badania wykluczyły obecność schorzeń predysponujących (cukrzyca, niedoczynność tarczycy, RZS), natomiast zdjęcia RTG nadgarstków ujawniły u wszystkich tych osób zniekształcone i stosunkowo wąskie kanały nadgarstka. Badanie elektrofizjologiczne wykazało typowe dla ZKN zaburzenia przewodnictwa w nerwie pośrodkowym. Wszyscy zostali zoperowani, a śródoperacyjnie u wszystkich odnotowano bardzo pogrubiały troczek zginaczy. Operacja była skuteczna i

skutkowała ustąpieniem dolegliwości. Autorzy uważają, że w opisywanej rodzinie występuje dziedziczna skłonność do specyficznej budowy kanału nadgarstka, zarówno rusztowania kostnego jak i znacznego pogrubienia troczka zginaczy, powodująca powstawanie ucisku na nerw pośrodkowy i wywołująca objawy ZKN [80].

### **5.6 Jednoczesne występowanie zespołu kanału nadgarstka w obu rękach (obustronny ZKN).**

Znamiennie częstsze występowanie rodzinne obustronnego niż jednostronnego ZKN nasuwa pytanie czy u podłoża tego schorzenia nie leżą dziedziczne mechanizmy genetyczne. Najczęściej analiza drzew genealogicznych wskazuje na proces autosomalny dominujący transmisji zespołu obustronnego, o zmiennej ekspresji i ograniczonej penetracji. Charakterystyczny dla rodzinnego występowania obustronnego ZKN jest wczesny początek objawów oraz brak różnic w dystrybucji względem płci. Nie udało się dotąd ustalić żadnego genu mogącego bezpośrednio odpowiadać za to zjawisko. Pomimo wstępnego entuzjazmu wobec badań molekularnych nie udowodniono istotnego znaczenia genetycznego typowania żadnego z wariantów polimorfizmu kolagenu, metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej, interleukin (IL 1beta, IL-2, IL-6 oraz receptora dla IL-6 ani czynników wzrostu w tym naczyniopochodnego czynnika wzrostu śródbłonna – VEGF), mogących teoretycznie opowiadać za zaburzenie architektury tkanki łącznej w obrębie kanału nadgarstka [81, 82, 83]. Nie obserwuje się również związku ZKN z polimorfizmem czynników zgodności tkankowej [84]. Analiza osoczowych stężeń cytokiny TNF alfa, interleukin 1, 2 i 6 oraz pochodnych szlaku arachidonowego, w tym prostaglandyny PGE<sub>2</sub> wskazuje raczej na lokalny proces niedokrwienno-reperfuzyjny, niż proces zapalny w patofizjologii ZKN [64].

Kilka badań dotyczyło wyjaśnienia zjawiska znacznie częstszego występowania obustronnego ZKN wśród pacjentów ze skłonnością do rodzinnych predyspozycji do ZKN. Ta cecha była analizowana w pracy Alford i wsp., którzy stwierdzili, że 27% osób z jednostronnym ZKN i aż 45% z obustronnym ZKN podawało występowanie podobnych objawów wśród członków ich rodzin. Autorzy uważają, że tak wysoki odsetek rodzinnego występowania schorzenia wśród osób z obustronnym zespołem może wskazywać na istnienie dziedzicznych zaburzeń biochemicznych lub specyfiki budowy anatomicznej kanału nadgarstka, predysponujących do

występowania schorzenia, ale na tyle subtelnym, że nie dają się one rozpoznać przy użyciu standardowych badań [85].

Wyniki moich obecnych badań wykazały, że częstość występowania obustronnego ZKN jest podobna wśród pacjentów z rodzinnym występowaniem choroby (u 89 z 96 - 93%) i wśród osób, które nie miały przypadków choroby wśród bliskich krewnych (u 314 z 345 - 91%) (różnica nieistotna statystycznie,  $p=0,67$ ). Zatem ten wynik nie potwierdza wcześniejszych przypuszczeń, że występowanie zespołu uciskowego na nerw pośrodkowy w obu nadgarstkach u jednego pacjenta ma związek z predyspozycjami genetycznymi, choć oczywiście nie wyklucza jednoznacznie takiej zależności.

### **5.7 Genetyczne czynniki charakteryzujące współwystępowanie ZKN i zatraskującego palca.**

Chociaż nie było to badane w mojej pracy, ale wydaje się interesujące przytoczenie wyników badania predyspozycji genetycznych u pacjentów, którzy cierpią jednocześnie na zespół kanału nadgarstka i inne, częste schorzenie jakim jest zatraskujący palec (palce). Zatraskujący palec (ang. trigger finger), nazywany jest także „zwężającym zapaleniem pochewki ścięgna zginacza”. Zmiany patologiczne dotyczą zarówno początkowego fragmentu pochewki A<sub>1</sub>, ścięgna zginacza, jak i samego ścięgna i polegają na metaplastji chrzęstnej komórek wewnętrznej warstwy pochewki. Zatraskujący palec jest bardzo częstą przypadłością, zdarzającą się prawie tak samo często jak zespół kanału nadgarstka, a współwystępowanie obu tych chorób jest oceniane na ok 30% przypadków. Obie częściej występują u chorych na cukrzycę i reumatoidalne zapalenie stawów. Podstawowym objawem jest ograniczenie zginanie i prostowanie palca, spowodowane utrudnionym przesuwaniem się ścięgna zginacza przez początkowy fragment jego pochewki włóknistej (część A1). Pogrubiały fragment ścięgna zahacza o brzeg zwężonej pochewki, która blokuje jego dalszy, płynny przesuw. Pokonanie przeszkody jest możliwe przy wysiłku lub pomocy drugiej ręki, ale prowadzi do zablokowania się palca w zgięciu i niemożności jego swobodnego odprostowania.

Patel i wsp. przedstawili wynik badań genetycznych nad wpływem czynników genetycznych na współwystępowanie dwóch schorzeń: zespołu kanału nadgarstka i zatraskującego palca, w

populacji pacjentów w Wielkiej Brytanii [86]. Autorzy założyli, że współwystępowanie tych schorzeń można wyjaśnić wspólnymi predyspozycjami do linii zarodkowej i podjęli próbę zidentyfikowania specyficznego locus chromosomalnego związanego z obiema chorobami. Wykonali badanie asocjacyjne całego genomu (GWAS) w grupie 2908 pacjentów z palcem zatrzaskującym i w grupie 436 579 osób z grupy kontrolnej, bez objawów schorzenia, z zasobów UK Biobank. Wykonali także badanie kliniczno-kontrolne GWAS dla palca zatrzaskującego, a następnie analizy kolokalizacji ze statystykami zbiorczymi zespołu kanału nadgarstka. Aby zidentyfikować domniemane warianty przyczynowe i ustalić ich znaczenie biologiczne, przeprowadzono analizy precyzyjnego mapowania i analizy miejsc cech ilościowych ekspresji (eQTL), używając fibroblastów od zdrowych dawców i próbek błony maziowej ścięgien od pacjentów z ZKN. Wyniki tej pracy potwierdziły wyraźny związek między ZKN i palcem zatrzaskującym. W badaniu asocjacyjnym całego genomu zidentyfikowano pięć niezależnych miejsc genów dla palca zatrzaskującego, w tym jeden locus, *DIRC3*, który znajdował się we wspólnej lokalizacji z ZKN i mógł być precyzyjnie zmapowany jako rs62175241 (0.76, 0.68-0.84;  $p=5.03 \times 10^{-13}$ ). Analizy eQTL wykazały specyficzny dla fibroblastów związek między ochronnym allelem T rs62175241, a zwiększoną ekspresją genów *DIRC3* i *IGFBP5*. Zwiększone stężenie IGF-1 w osoczu było związane zarówno z zespołem kanału nadgarstka, jak i palcem zatrzaskującym (OR >1.04,  $p<0.02$ ). W tym GWAS miejsce *DIRC3* na chromosomie 2 było istotnie związane zarówno z ZKN jak i palcem zatrzaskującym, co potwierdza współwystępowanie tych schorzeń. Chroniący przed chorobą allel rs62175241 był związany ze zwiększoną ekspresją długiego niekodującego RNA *DIRC3* i jego obiektu transkrypcyjnego *IGFBP5*, antagonisty sygnalizacji IGF-1. Odkrycia te wskazują na model, w którym IGF-1 jest czynnikiem zwiększającym ryzyko zachorowania na ZKN jak i na palec zatrzaskujący, i w którym oś *DIRC3-IGFBP5* bezpośrednio antagonizuje fibroblastyczną sygnalizację IGF-1 [86].

## 5.8 Podsumowanie wyników badań

Przyczyna powstawania zespołu kanału nadgarstka nie całkowicie poznana. Wśród wielu koncepcji tego zespołu, sprawdzano znaczenie czynników genetycznych, związanych z dziedziczeniem niektórych cech, które miałyby sprzyjać powstawaniu zespołu. W piśmiennictwie wytypowano i zbadano kilka grup genów, które potencjalnie mogłyby wpływać na predyspozycje do powstania zespołu. Były to geny z rodziny *COL* kodujące syntezę rzadszych form kolagenu i przez to mogące zmieniać morfologię i właściwości mechaniczne ścian i struktur znajdujących się w kanale nadgarstka, gen *COMP* który odgrywa rolę w morfologii i organizacji macierzy zewnątrzkomórkowej tkanki łącznej, a także gen *GSTM1* kodujący syntezę transferazy S-glutationowej, enzymu biorącego udział w dezaktywacji wolnych rodników. Te właśnie geny wytypowałem do swoich badań, ponieważ w piśmiennictwie opisywano ich dosyć jednoznaczny związek z ZKN, a jednocześnie te badania były oparte na grupach pacjentów z innych, nie-kaukaskich grup rasowych i ze społeczności odmiennych etnicznie niż europejskie.

Rekrutacja pacjentów była prowadzona w okresie od listopada 2020 do marca 2022 roku w Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Ręki Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, a badania genetyczne próbek pobranej krwi w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego.

Grupa badana składała się z 345 pacjentów, 262 kobiet (75%) i 83 mężczyzn (25%), w wieku śr. 62 lat, u których rozpoznano zespół kanału nadgarstka. Grupa kontrolna składała się z 1035 zdrowych osób dorosłych, 786 kobiet (76%) i 249 mężczyzn (24%), którzy zostali wybrani do tego badania z większej grupy osób, których materiał genetyczny pobrano w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii PUM.

Z całej grupy 345 osób z ZKN, wyodrębniono podgrupę 96 pacjentów, 68 kobiet (71%) i 28 mężczyzn (29%), u których choroba występowała u co najmniej jednego bliskiego krewnego, czyli tych, którzy mieli dodatni wywiad rodzinny.

Po wykonaniu ekstrakcji materiału genetycznego z pobranych próbek krwi, właściwe genotypowanie przeprowadzono w 2 etapach: detekcji i walidacji. W fazie detekcji przeprowadzono genotypowanie z użyciem panelu NGS 96 pacjentów, u których stwierdzono dodatni wywiad rodzinny w kierunku ZKN. Genotypowanie wykonano w celu wykrycia



wszystkich możliwych mutacji w wybranych wcześniej genach. Wszystkie mutacje wykryte w procesie NGS były następnie sprawdzane przy pomocy standardowego sekwencjonowania Sangera, przy użyciu zestawu BigDye.

W drugim etapie (faza walidacji wykrytych zmian) przeprowadzono identyfikację potencjalnej patogenności wykrytych wariantów z użyciem algorytmów „in silico” i sondy TaqMan. Warianty z pewnością niepatogenne odrzucono, a do drugiego etapu walidacji - badań asocjacyjnych pozostawiono tylko 35 wariantów o nieznanym znaczeniu klinicznym (VUS). W badaniach asocjacyjnych przeprowadzono genotypowanie wszystkich 345 pacjentów z grupy badanej i 1035 osób zdrowych (grupa kontrolna).

Uzyskane wyniki badań wykazały brak jednoznacznej patogenności mutacji 5 wybranych genów: *COL11A*, *COL1A*, *COL5A1*, *COMP* and *GSTMI* i przez to brak związku z większym ryzykiem zachorowania na ZKN wśród polskich pacjentów. Wykryto jedynie 5 mutacji o niepewnym znaczeniu (VUS), które jednak występują bardzo rzadko w Polskiej populacji. Wyniki badań klinicznych wykazały, że obustronny zespół występował z podobną częstością w grupie 96 pacjentów z rodzinnym występowaniem choroby, jak w całej badanej grupie.

Może być kilka powodów takiego wyniku badania, z których najważniejszy wydaje się być związany z doбором grup badanej i kontrolnej, które w mojej pracy grupy te składały się tylko z etnicznych Polaków (rasa biała, kaukaska), podczas gdy w większości dotychczas opublikowanych badań, grupy badane były niehomogenne rasowo i złożone z osób niebędących Europejczykami. Częstość występowania określonych mutacji genów może być różna u osób z różnych ras i dlatego wyniki takich badań wśród polskich pacjentów mogły dać inne wyniki, niż w badaniach pacjentów należących do innych grup etnicznych i odmiennych rasowo.

Wydaje się, że wyniki mojej pracy, choć mający wydźwięk negatywny (brak potwierdzenia założonej hipotezy badawczej), mają wartość naukową, ponieważ wskazują, że predyspozycje genetyczne do zespołu kanału nadgarstka nie są jednoznaczne i że badania w tej dziedzinie wymagają jeszcze uzupełnienia.

## 6 WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki badań związku mutacji 5 wybranych genów: *COL11A*, *COL1A*, *COL5A1*, *COMP* i *GSTMI* z zespołem kanału nadgarstka wykazały brak ich jednoznacznej patogenności. Wykryto jedynie 5 mutacji o niepewnym znaczeniu, które jednak występują bardzo rzadko w Polskiej populacji. Zatem można stwierdzić brak silnego związku między mutacjami wybranych genów a ryzykiem zachorowania na zespół kanału nadgarstka wśród polskich pacjentów.
2. Wyniki badań klinicznych wykazały, że obustronny zespół kanału nadgarstka występował z podobną częstością wśród pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym i w całej badanej grupie.

## 7 WYKAZ RYCIN

Ryc. 1.1. Przebieg nerwu pośrodkowego na kończynie górnej.

Henry Vandyke Carter and one more author - Henry Gray (1918) Anatomy of the Human Body  
Gray's Anatomy, Plate 816

Ryc. 1.2. Przekrój przez kanał nadgarstka z zaznaczonymi strukturami

Licencja creative commons

Ryc. 1.3. Budowa nerwu obwodowego

Licencja creative commons

Ryc. 1.4 Zaniki mięśni kłębku kciuka w przebiegu zespołu kanału nadgarstka.

Kolekcja własna autora.

Ryc. 1.5a. Operacja dekompresji kanału nadgarstka: cięcie w dalszej części śródrezcza

Kolekcja własna autora.

Ryc. 1.5b. Operacja dekompresji kanału nadgarstka: przecinanie troczka zginaczy

Kolekcja własna autora.

Ryc. 1.5c. Operacja dekompresji kanału nadgarstka: troczek zginaczy całkowicie przecięty,  
nożyczki swobodnie otwarte w kanale nadgarstka

Kolekcja własna autora.

Ryc. 1.5d. Operacja dekompresji kanału nadgarstka: zszyta rana operacyjna.

Kolekcja własna autora.

## 8 PIŚMIENICTWO

1. Żyłuk A. zespół kanału nadgarstka. W: Żyłuk A (red.): Chirurgia ręki. Medipage. Warszawa 2017; str: 66-122.
2. Ceruso M, Angeloni R, Lauri G, Checcucci G. Clinical diagnosis of the carpal tunnel syndrome. W: Luchetti R, Amadio P. (red.). Carpal tunnel syndrome. Springer-Verlag, Berlin 2007; str. 63-8.
3. Bland JD. Carpal tunnel syndrome. *BMJ* 2007; 335: 343–6.
4. Padua L, et al. Carpal tunnel syndrome: clinical features, diagnosis, and management. *Lancet Neurol* 2016; 15: 1273-84.
5. Puchalski P, Żyłuk P, Szlosser Z, Żyłuk A. Factors involving the clinical profile of carpal tunnel syndrome. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2018; 50: 8-13.
6. Malakootian M, Soveizi M, Gholipour A, Oveisee M. Pathophysiology, diagnosis, treatment and genetics of carpal tunnel syndrome: a review. *Cell Mol Neurobiol* 2023; 43: 1817-31.
7. Yang C, Chen HH, Lee MC, et al. Risk factors of carpal tunnel syndrome in Taiwan: a population-based study. *Ann Plast Surg* 2022; 88: 74-8.
8. Thiese MS, Merryweather A, Koric A, et al. Wistah Study Team. Association between wrist ratio and carpal tunnel syndrome: effect of modification by body mass index. *Muscle Nerve*. 2017; 56: 1047-53.
9. Żyłuk A, Dąbal L, Szlosser Z. Constitutional factors and predisposition to carpal tunnel syndrome. *Pol Orthop Traumatol* 2011; 76: 127–132.
10. Żyłuk A, Wojciechowski P, Szlosser Z. Outcomes of carpal tunnel surgery in patients with and without medical comorbidities with special attention to quality of life. *Acta Orthop Belg* 2020; 86 e- supplement 1: 197-202.
11. García-Medrano B, Simón Pérez CL, Corella Montoya MA et al. Objective evaluation of the scratch collapse test for diagnosis of carpal tunnel syndrome. *Injury* 2021; 52 Suppl 4: S145-S150.
12. You H, Simmons Z, Freivalds A, et al. Relationships between clinical symptom severity scales and nerve conduction measures in carpal tunnel syndrome. *Muscle Nerve* 1999; 22: 497-501

13. Zyluk A, Szlosser Z. The results of carpal tunnel release for carpal tunnel syndrome diagnosed on clinical grounds, with or without electrophysiological investigations: A randomized study. *J Hand Surg Eur* 2012; 38: 44-9.
14. Moran L, Perez M, Esteban A, et al. Sonographic measurement of cross-sectional area of the median nerve in the diagnosis of carpal tunnel syndrome: correlation with nerve conduction studies. *J Clin Ultrasound* 2009; 37: 125-131.
15. Pastare D, Therimadasamy AK, Lee E, et al. Sonography versus nerve conduction studies in patients referred with clinical diagnosis of carpal tunnel syndrome. *J Clin Ultrasound* 2009; 37: 389-93.
16. Pinilla I, Martin-Hervas C, Sordo G, et al. The usefulness of ultrasonography in the diagnosis of carpal tunnel syndrome. *J Hand Surg Eur* 2008, 33: 435-9.
17. Katz JN, Losina E, Amick BC, Fossel AH, Bessette L, Keller RB. Predictors of outcomes of carpal tunnel release. *Arthritis Rheumatism* 2001; 44: 1184-93.
18. Levine DW, Simmons BP, Koris MJ, Daltroy LH, Hohl GG, Fossel AH, Katz JN. A self-administered questionnaire for the assessment of severity of symptoms and functional status in carpal tunnel syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75: 1585-92.
19. Zyluk A, Zyluk-Gadowska P. Factors affecting the outcomes of carpal-tunnel surgery: a review. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2016; 48: 260-265.
20. Zyluk A, Zyluk-Gadowska P, Kolodziej Ł, Szlosser Z. An analysis of patient's and disease related factors predictive of the outcomes of surgery for carpal tunnel syndrome *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2020; 52: 11-17.
21. Żyluk A. The role of genetic factors in the carpal tunnel syndrome aetiology: a review. *Adv Clin Exp Med* 2020; 29(5).doi.10.17219/acem/118846.
22. Żyluk A. The effect of genetical factors on the risk of carpal tunnel syndrome occurrence: a review. *Pom J Med Sci* 2023; 69: 13-5.
23. Wiberg A, Ng M, Schmid AB, Smillie RW, Baskozos G, Holmes MV, et al. A genome-wide association analysis identifies 16 novel susceptibility loci for carpal tunnel syndrome. *Nat Commun* 2019; 10:1030.doi.org/10.1038/s41467-019-08993-6.
24. Dada S, Burger MC, Massij F, de Wet H, Collins M. Carpal tunnel syndrome: The role of collagen gene variants. *Gene* 2016; 587: 53-58. doi: 10.1016/j.gene.2016.04.030.
25. Burger M, de Wet H, Collins M. The COL5A1 gene is associated with increased risk of carpal tunnel syndrome. *Clin Rheumatol* 2014; 34: 767-74.

26. Wenstrup RJ, Smith SM, Florer JB, et al. Regulation of collagen fibril nucleation and initial fibril assembly involves coordinate interactions with collagens V and XI in developing tendon. *J Biol Chem* 2011; 286: 20455-65.
27. Li C, Wang N, Schäffer AA, et al. Mutations in COMP cause familial carpal tunnel syndrome. *Nat Commun.* 2020; 11: 3642. DOI: 10.1038/s41467-020-17378-z.
28. Kim JK, Koh YD, Hann HJ, Kim MJ. Oxidative stress in sub-synovial connective tissue of idiopathic carpal tunnel syndrome. *J Orthop Res* 2010; 28: 1463-8.
29. Eroğlu P, Erkol İnal E, Sağ ŞÖ, et al. Associations analysis of GSTM1, T1 and P1 Ile105Val polymorphisms with carpal tunnel syndrome. *Clin Rheumatol* 2016; 35: 1245-51.
30. Lubiński J (red.). *Genetyka kliniczna nowotworów. Monografia.* Print Group Sp z oo. Szczecin 2018.
31. Studzińska A, Tyburski J, Dąca P, Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 2008; 80: 71-85.
32. Romanek J. REAL-TIME PCR – nowoczesna technika analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu. *Wiad Zootech* 2011; 49: 125-9.
33. Hui L, DelMonte T, Ranade K. Genotyping using TaqMan assay. *Curr Protoc Hum Genet* 2008. Chapter 2: Unit 2.10. doi: 10.1002/0471142905.hg0210s56.
34. Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl<sub>2</sub>, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet* 1993; 31: 321-328. DOI: 10.1007/BF02401826.
35. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(Database issue): D980-5. DOI: 10.1093/nar/gkt1113.
36. Kopanos C, Tsiolkas C, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2019; 35: 1978-1980. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty897.
37. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 308-11. DOI: 10.1093/nar/29.1.308.
38. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17: 405-24. DOI: 10.1038/gim.2015.30.

39. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. DbNSFP: A lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Human Mutation* 2011; 32, 894-9. DOI: 10.1002/humu.21517.
40. Eddy SR. Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1035-6. DOI: 10.1038/nbt0804-1035.
41. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics* 2015; 31: 761-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu703.
42. Raimondi D, Tanyalcin I, Ferte J, et al. DEOGEN2: prediction and interactive visualization of single amino acid variant deleteriousness in human proteins. *Nucleic Acids Res* 2017; 45: W201-W206. DOI: 10.1093/nar/gkx390.
43. Ionita-Laza I, McCallum K, Xu B, et al. A spectral approach integrating functional genomic annotations for coding and noncoding variants *Nat Genet* 2016; 48: 214-220. DOI: 10.1038/ng.3477.
44. Shihab HA, J. Gough DN Cooper IN, et al. Predicting the functional consequences of cancer-associated amino acid substitutions *Bioinformatics* 2013; 29: 1504-10. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt182.
45. Shihab HA, Rogers MF, Gough M, et al. An integrative approach to predicting the functional effects of non-coding and coding sequence variation *Bioinformatics* 2015; 31: 1536-43. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv009.
46. Rogers MF, Shihab HA, Mort M, et al. FATHMM-XF: accurate prediction of pathogenic point mutations via extended features. *Bioinformatics* 2018; 34: 511-3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx536.
47. Malhis N, Jacobson M, Jones SJ, Gsponer J. LIST-S2: taxonomy based sorting of deleterious missense mutations across species. *Nucleic Acids Res* 2020; 48: W154-W161. DOI: 10.1093/nar/gkaa288.
48. Chun S, J.C. Fay Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res* 2009; 19: 1553-61. DOI: 10.1101/gr.092619.109.
49. Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, et al. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity *Nat Genet* 2016; 48: 1581-6. DOI: 10.1038/ng.3703.

50. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 345-8. DOI: 10.1093/nar/gkr407.
51. Schwarz J, Cooper D, Schuelke M, et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014; 11: 361-2. DOI: 10.1038/nmeth.2890.
52. Qi H, Zhang H, Zhao Y, et al. MVP predicts the pathogenicity of missense variants by deep learning. *Nat Commun* 2021; 12: 510. DOI: 10.1038/s41467-020-20847-0.
53. Choi Y, Sims GE, Murphy S, et al. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels *PLoS One* 2012; 7: e466. DOI: 10.1371/journal.pone.0046688
54. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, et al. SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protocols* 2016; 11: 1-9. DOI: 10.1038/nprot.2015.123
55. Ficek K, Cieszyk O, Kaczmarczyk M, et al. Gene variants within the COL1A1 gene are associated with reduced ACL injury in professional soccer players. *J Sci Med Sport* 2013; 16: 396-400.
56. Raleigh SM, van der Merwe L, Ribbans WJ, et al. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. *Sport Med* 2009; 43: 514-20.
57. Hay M, Patricos J, Collins R, et al. Association of type XI collagen genes with chronic Achilles tendinopathy in independent populations from South Africa and Australia. *Br J Sports Med* 2013; 47: 569-74.
58. Burger M, de Wet H, Collins M. The COL5A1 gene is associated with increased risk of carpal tunnel syndrome. *Clin Rheumatol* 2014; 34: 767-74.
59. Mio F, Chiba K, Hirose Y, et al. A functional polymorphism in COL11A1, which encodes the alpha 1 chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 1271-7.
60. Burger M, de Wet H, Collins M. The COL5A1 gene is associated with increased risk of carpal tunnel syndrome. *Clin Rheumatol* 2014; 34: 767-74.
61. Hakim AJ, Cherkas L, El Zayat S, MacGregor A, Spector TD. The genetic contribution to carpal tunnel syndrome in women: a twin study. *Arthritis Rheumatol* 2002; 47: 275-9.
62. Pasternak B, Aspenberg P. Metalloproteinases and their inhibitors - diagnostic and therapeutic opportunities in orthopaedics. *Acta Orthop* 2009; 80: 693-703.



63. Somerville RP, Oblader SA, Aptek SS. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003; 4: 216. doi:10.1186/gb-2003-4-6-216.
64. Burger MC, De Wet H, Collins M. Matrix metalloproteinase genes on chromosome 11q22 and risk of carpal tunnel syndrome. *Rheumatol Int* 2016; 36: 413-419. doi: 10.1007/s00296-015-3385-z.
65. Raleigh SM, van der Merwe L, Ribbans WJ, et al. Variants within the MMP3 gene are associated with Achilles tendinopathy: possible interaction with the COL5A1 gene. *Sport Med* 2009; 43: 514-520.
66. Malila S, Yuktanandana P, Saowaprut S, et al. Association between matrix metalloproteinase-3 polymorphism and ACL ruptures. *Genet Mol Res* 2011; 10: 4158-65.
67. Posthumus, Collins M, van der Merwe L, et al. Matrix metalloproteinase genes on chromosome 11q22 and the risk of ACL rupture. *Scand J Med Sci Sport* 2012; 22: 523-533.
68. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulator of cellular metabolism and physiology. *Biochem Biophys Acta* 2013; 1830: 3267-3288.
69. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, et al. Molecular cloning, characterization and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human GSTP1 variants. Evidence of catalytic activity of encoded proteins. *J Biol Chem* 1007; 272: 10004-12.
70. Tanzer RC. The carpal tunnel syndrome. A clinical and anatomical study. *J Bone Joint Surg Am* 1959; 41: 626-34.
71. Phalen G. Reflections on 21 years' experience with the carpal-tunnel syndrome. *JAMA*. 1970; 212: 1365-7.
72. Danta G. Familial carpal tunnel syndrome with onset in childhood. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1975; 38: 350-5.
73. Radecki P. The familial occurrence of carpal tunnel syndrome. *Muscle Nerve* 1994; 17: 325-30.
74. Gossett JG, Chance PF. Is there a familial carpal tunnel syndrome? An evaluation and literature review. *Muscle Nerve* 1998; 21: 1533-6.
75. Puchalski P, Szlosser Z, Żyluk A. Familial occurrence of carpal tunnel syndrome. *Neurol Neurochir Pol* 2019; 53: 43-6.

76. Leifer D, Cros D, Halperin, et al. Familial bilateral carpal tunnel syndrome: report of two families. *Arch Phys Med Rehabil* 1992; 73: 393–7.
77. Murakami T, Tachibana S, Endo Y, et al. Familial carpal tunnel syndrome due to amyloidogenic transthyretin His 114 variant. *Neurology* 1994; 44: 315-8.
78. Ihara Y, Nobukuni K, Namba R, et al. A family of familial hypercholesterolemia with cerebral infarction and without coronary heart disease: an unusual case with corneal opacity, polyneuropathy and carpal tunnel syndrome in the family - therapy with probucol and tocopherol nicotinate. *J Neurol Sci* 1991; 106: 10-8.
79. Michaud LJ, Hays RM, Dudgeon BJ, Kropp RJ. Congenital carpal tunnel syndrome: case report of autosomal dominant inheritance and review of the literature. *Arch Phys Med Rehabil* 1990; 71: 430-2.
80. Mahjneh I, Saarinen A, Siivola J. Familial carpal tunnel syndrome: a report of a Finnish family. *Acta Neurol Scand* 2001; 104: 377–9.
81. Fedorczyk JM, Barr AE, Rani S, et al. Exposure-dependent increases in IL-1beta, substance P, CTGF, and tendinosis in flexor digitorum tendons with upper extremity repetitive strain injury. *J Orthop Res* 2010; 28: 298-307.
82. Burger MC, de Wet H, Collins M. Interleukin and growth factor gene variants and risk of carpal tunnel syndrome. *Gene* 2015; 564: 67-72.
83. Bland JD, Rudolfer SM. Clinical surveillance of carpal tunnel syndrome in two areas of the United Kingdom, 1991-2001. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:1674-9.
84. Vanwijck R, Bouillenne C. HL-A and carpal tunnel syndrome. *Clin Rheumatol* 1986; 5:379-81.
85. Alford JW, Weiss AP, Akelman E. The familial incidence of carpal tunnel syndrome in patients with unilateral and bilateral disease. *Am J Orthop* 2004; 397-400.
86. Patel B, O’Kleeman S, Neavin D, et al. Shared genetic susceptibility between trigger finger and carpal tunnel syndrome: a genome-wide association study. *Lancet Rheumatol* 2022; 8: e556-e565.

## 9 Streszczenie

### Wstęp

Zespół kanału nadgarstka jest najczęstszą neuropatią uciskową kończyny górnej dotykając nawet 2% populacji. Pomimo swojej powszechności patofizjologia tej choroby nie jest do końca poznana. Od dekady następują próby udowodnienia związku występowania zespołu kanału nadgarstka z czynnikami genetycznymi, zwłaszcza w rodzinie występujących przypadkach choroby.

### Cel

Celem pracy było zbadanie wpływu dziedzicznych mutacji genów *COL11A*, *COL1A*, *COL5A1*, *COMP* i *GSTM1* na ryzyko zachorowania na zespół kanału nadgarstka, a także zbadanie, czy obustronny zespół kanału nadgarstka występuje z podobną częstością wśród pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym jak wśród wszystkich chorych.

### Materiały i metodyka

Grupa badania składała się z 345 pacjentów z rozpoznanym zespołem kanału nadgarstka leczonych operacyjnie w Klinice Chirurgii Ogólnej i Chirurgii Ręki w Szczecinie. Grupę kontrolną stanowiło 1035 osób zdrowych których materiał genetyczny pobrano w Zakładzie Genetyki i Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w latach 2016-2020 w celu badania występowania nowotworów dziedzicznych wśród 1,5 mln populacji osób dorosłych mieszkających w Województwie Zachodniopomorskim. Analizy genetyczne były przeprowadzane na bazie DNA krwi pobranej od pacjentów z grupy badanej i kontrolnej. Genotypowanie wykonano z użyciem panelu NGS (Next Generation Sequencing) w celu wykrycia wszystkich możliwych mutacji w wybranych wcześniej genach. W drugim etapie (faza walidacji wykrytych zmian) przeprowadzono identyfikację potencjalnej patogenności wykrytych wariantów z użyciem algorytmów „in silico” i sondy TaqMan. Porównanie istotności częstości występowania zmian wykrytych w genotypach w grupach badanych i kontrolnych przeprowadzono przy użyciu testu Fischera, dla którego oznaczono dwustronne wartości poziomu ufności P (ang. two-tailed P values). Dla każdego porównania obliczano wartości ilorazu szans (ang. odds ratio, OR) łącznie z 95% zakresami ufności (ang. 95%CI).

## **Wyniki**

Uzyskane wyniki badań potencjalnego związku mutacji 5 wybranych genów: COL11A, COL1A, COL5A1, COMP i GSTM1 z zespołem kanału nadgarstka wykazały brak ich jednoznacznej patogenności. Wykryto jedynie 5 mutacji o niepewnym znaczeniu: (rs144510951, rs368422725, rs747106682, rs759687021, rs36900093), które jednak występują bardzo rzadko w Polskiej populacji.

## **Wnioski**

Należy stwierdzić, iż brak silnego związku między mutacjami wybranych genów COL11A, COL1A, COL5A1, COMP i GSTM1 a ryzykiem zachorowania na zespół kanału nadgarstka wśród polskich pacjentów. Dodatkowo badania wykazały, że obustronny zespół kanału nadgarstka występował z podobną częstością wśród pacjentów z dodatnim wywiadem rodzinnym i w całej badanej grupie

## 10 Abstract

### Introduction

Carpal tunnel syndrome is the most common compression neuropathy of the upper limb, affecting up to 2% of the population. Despite its prevalence, the pathophysiology of this disease is not fully understood. For a decade, there have been attempts to prove the link between carpal tunnel syndrome and genetic factors, especially in familial cases of the disease.

### Objective

The aim of the study was to investigate the effect of hereditary mutations of the COL11A, COL1A, COL5A1, COMP and GSTM1 genes on the risk of developing carpal tunnel syndrome, as well as to investigate whether bilateral carpal tunnel syndrome occurs with a similar frequency among patients with a positive family history as among all patients.

### Materials and methods

The study group consisted of 345 patients diagnosed with carpal tunnel syndrome who underwent surgical treatment at the Department of General Surgery and Hand Surgery in Szczecin. The control group consisted of 1035 healthy people, whose genetic material was collected at the Department of Genetics and Pathomorphology of the Pomeranian Medical University in the years 2016-2020 in order to study the occurrence of hereditary neoplasms among 1.5 million adult population living in the West Pomeranian Voivodeship. Genetic analyses were carried out on the basis of DNA from blood collected from patients in the study and control groups. Genotyping was performed using the Next Generation Sequencing (NGS) panel to detect all possible mutations in pre-selected genes. In the second stage (validation phase of the detected changes), the identification of the potential pathogenicity of the detected variants was carried out using "in silico" algorithms and the TaqMan probe. A comparison of the significance of the incidence of changes detected in genotypes in the study and control groups was carried out using the Fischer test, for which two-tailed P values (P) were determined. For each comparison, odds ratios (OR) values were calculated together with 95% confidence intervals (95%CI).

## **Results**

Study results on the potential association of mutations of 5 selected genes: COL11A, COL1A, COL5A1, COMP and GSTM1 with carpal tunnel syndrome showed that they are not unambiguously pathogenic. Only 5 mutations of uncertain significance were detected: (rs144510951, rs368422725, rs747106682, rs759687021, rs36900093), which, however, occur very rarely in the Polish population.

## **Conclusions**

It should be stated that there is no strong association between mutations of selected COL11A, COL1A, COL5A1, COMP and GSTM1 genes and the risk of developing carpal tunnel syndrome among Polish patients. In addition, the study showed that bilateral carpal tunnel syndrome occurred with a similar frequency among patients with a positive family history as in the entire study group.