

UNIVERSITATEA DE STAT „DIMITRIE CANTEMIR”

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 577.2:611.73 (478)

SACARĂ VICTORIA

**PARTICULARITĂȚILE MOLECULAR-GENETICE ALE
PATOLOGIILOR NEUROMUSCULARE FRECVENT ÎNTÂLNITE
ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

162.02 - GENETICA OMULUI ȘI ANIMALELOR

Autoreferatul tezei de doctor habilitat în științe biologice

CHIȘINĂU, 2019

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară Umană (LGMU) a Instituției Medico-Sanitară Publică Institutul Mamei și Copilului (IMSP IMC) din Republica Moldova.

Consultanți științifici:

DUCA Maria - doctor habilitat în științe biologice, academician al AȘM

GROPPA Stanislav - doctor habilitat în științe medicale, academician al AȘM

Referenți oficiali:

LUPAȘCU Galina - doctor habilitat în științe biologice, profesor cercetător

PALII Ina - doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

RUSU Cristina - doctor în științe medicale, profesor universitar

Componența Consiliului Științific Specializat:

PALII Andrei - Președinte, doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar, m.c. AȘM

PORT Angela - Secretar științific, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

CUROCICHIN Ghenadie - doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

HADJIU Svetlana - doctor habilitat în științe medicale, conferențiar universitar

TAGADIUC Olga - doctor habilitat în științe medicale, profesor universitar

STRATAN Valentina - doctor în științe biologice, conferențiar cercetător

GORDUZA Eusebiu Vlad - doctor în științe medicale, profesor universitar

CRIVOI Aurelia - doctor habilitat în științe biologice, profesor universitar

Susținerea va avea loc la 18.10.2019, ora 14.00 la ședința Consiliului Științific Specializat DH 162.02-03 din cadrul Universității de Stat „Dimitrie Cantemir” (str. Academiei 3/2, MD-2028 Chișinău, Republica Moldova)

Teza de doctor habilitat și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca Universității de Stat „Dimitrie Cantemir” și pe pagina web a ANACEC (www.cnaa.md).

Autoreferatul a fost expediat la 16.09.2019

Secretar științific al Consiliului Științific Specializat

PORT Angela, doctor în științe biologice, conferențiar universitar

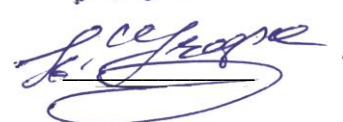


Consultanți științifici

DUCA Maria, doctor habilitat în științe biologice, academician



GROPPA St., doctor habilitat în științe medicale, academician



Autor

SACARĂ Victoria, doctor în științe medicale, conferențiar cercetător



REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța problemei abordate

Conform datelor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), numărul total de pacienți cu patologii ereditare constituie 2,5-4% din populația totală. În aproximativ jumătate din cazuri, mortalitatea infantilă precoce și dizabilitatea se întâmplă datorită diferitor cauze genetice. Subgrupa bolilor ereditare ale sistemului nervos (BESN) include peste 2.400 maladii diferite, cu frecvența 1:2000 [1]. Bolile neuromusculare ereditare (BNME) sunt boli degenerative-ereditare progresive genetice ale sistemului nervos, care se bazează pe o leziune a unei anumite structuri a unității motorii determinată genetic. BESN sunt caracterizate prin polimorfism clinic, ceea ce duce la dificultăți în diagnosticare. Cel mai des, aceste boli afectează tinerii și, în cele mai multe cazuri, se caracterizează printr-o dinamică constant regresivă și un handicap sever, ceea ce determină exclusiv importanța medicală și social-economică a acestei probleme. Cea mai eficientă metodă de tratare a acestor boli este consilierea genetică medicală și prevenirea cazurilor repetate de boală în familiile cu risc genetic înalt (Raportul unui grup științific al OMS, 1997). Trebuie de menționat faptul că, în prezent, consilierea medico-genetică pentru patologia ereditară se bazează în mare măsură pe utilizarea tehnologiilor molecular-genetice. Astfel, prin metodele moderne de analiză a ADN-ului devine posibilă stabilirea structurii genetice exactă a bolilor ereditare în populațiile studiate, ceea ce are o importanță deosebită pentru organizarea asistenței medicale și planificarea volumului de asistență medico-genetică pentru populația din anumite regiuni ale Republicii Moldova.

Lucrarea abordează o temă din domeniul modern al științei, la intersecția a două discipline – medicină (neurologia și genetica medicală) și biologie (genetica umană și biologia moleculară). Studiarea caracteristicilor genetico-epidemiologice și molecular-genetice ale bolilor neuromusculare frecvent întâlnite la populația Republicii Moldova este primul studiu de acest gen. Pe parcursul lucrării au fost dezvoltate principii generale de consiliere medico-genetică în familiile cu risc genetic sporit, folosind metodele moderne de analiză a ADN-ului. De asemenea, a fost evidențiat rolul genelor modificatoare asupra progresiei procesului miopatic, având la bază exemplul pacienților cu DMD/B, ne oferă posibilitatea de corecție simptomatică, pe cale medicamentoasă, a stării pacienților cu această maladie.

Descrierea situației în domeniul de investigare și identificarea problemelor de cercetare

Una dintre sarcinile principale ale geneticii medicale moderne este elaborarea metodei de profilaxie, care reduce morbiditatea, invaliditatea și mortalitatea, pe baza cercetărilor genetice și epidemiologice. Printre modalitățile de control al morbidității și de profilaxie a maladiilor condiționate genetic este crearea și utilizarea registrului acestor boli, care permite actualizarea și reînnoirea continuă a datelor obținute recent atât din studiarea familiilor cu risc sporit de patologii genetice, cât și din cele noi. Multe țări economice avansate au registre naționale a bolilor înnăscute și ereditare, inclusiv pentru patologii neuromusculare (RARECARE, EUROCAT ș.a.). Baza de date UMD-DMD este un exemplu elocvent de registru național în cazul bolnavilor DMD/B din Franța [2].

Un progres în diagnosticarea maladiilor ereditare monogenice s-a produs datorită introducerii în medicină a metodelor molecular-genetice, bazate pe strategia identificării locilor genetice [3].

Colaboratorii din rețeaua globală de cercetare a patologiilor neuromusculare TREAT-NMD, unde participă și Republica Moldova, au elaborat standarde pentru diagnosticarea genetică, depistarea biomarkerilor și pentru îngrijirea pacienților cu BESN. Astfel, în cadrul Proiectului „Human Variom Project” a fost discutată importanța utilizării bazelor de date genetice pentru cercetări științifice și aplicarea lor în practică.

După circa 25 de ani, în Republica Moldova au fost create registrul și biobanca familiilor cu patologii neuromusculare frecvent întâlnite (DMD/B, SMA, NSME 1A), ce permite realizarea monitoringului familiilor cu risc sporit de patologie ereditară neuromusculară și identificarea necesității de efectuare a diagnosticului prenatal [4]. Efectuarea analizei molecular-genetice permite evidențierea caracteristicilor patologiilor neuromusculare ereditare, elaborarea unui algoritm de diagnostic molecular-genetic la pacienții din Republica Moldova și desfășurarea analizei comparative cu alte țări privind prevalența bolii și frecvența mutațiilor.

Observarea și monitorizarea pe termen lung a pacienților cu DMD/B ne-a permis să formulăm ipoteză științifică: prezența unor mutații compuse specifice în genele modificatoare (cicluului folat, metioninic și funcției endoteliale) afectează rata progresiei procesului miopatic.

Scopul studiului a constat în analiza particularităților genetice ale maladiilor neuromusculare frecvent întâlnite în Republica Moldova și elaborarea unei strategii de diagnostic molecular-genetic individualizat pentru monitorizarea pacienților cu DMD/B.

Obiectivele studiului:

1. Stabilirea spectrului și frecvențelor relative ale celor mai răspândite forme de boli neuromusculare într-un eșantion de pacienți din Republica Moldova.
2. Identificarea particularităților genetice ale „nucleului” bolilor neuromusculare (miodistrofia Duchenne/Becker – DMD/B, amiotrofia spinală – SMA, neuropatia motosenzorială ereditară tip 1A – NSME 1A) și elaborarea unor algoritme de diagnostic molecular.
3. Elucidarea particularităților populațional-genetice ale distribuției frecvențelor alelelor polimorfe ale genelor *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G), *eNOS* (4a/4b) în grupul de cercetare și în cel de control.
4. Stabilirea contribuției variantelor polimorfe ale genelor cercetate în determinarea riscului genetic de evoluție rapidă a procesului miopatic la pacienții cu DMD/B.
5. Determinarea tipului și forței de interacțiune intergenice a polimorfismelor genelor studiate la pacienții cu ratele diferite de progresie a DMD/B.
6. Elaborarea strategiei de diagnostic molecular, luând în considerare caracteristicile individuale ale pacienților cu DMD/B pentru predicția evoluției și personalizarea tratamentului.

Metodologia cercetării științifice

Cercetările au fost efectuate în cadrul IMSP Institutului Mamei și Copilului (IMC), Laboratorului de Genetică Moleculară Umană (LGMU), Centrul de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală (CSRGM).

Pentru soluționarea sarcinilor propuse au fost utilizate următoarele metode: clinico-genealogice, biochimice, electrofiziologice, analiza spectrului nosologic (prevalența/ frecvențele relative ale bolilor sunt prezentate în conformitate cu standardele internaționale la 100.000 de populație [www.orpha.net] și molecular-genetice (metodele de bază în identificarea mutațiilor: reacția de polimerizare în lanț (PCR), PCR multiplex (MPCR) și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (RFLP), MLPA au fost efectuate în

LGMU ale IMSP IMC în Republica Moldova), NGS a fost efectuat în cadrul laboratoarelor Centogen (Germania), Genomed (Rusia), Centrul de Diagnosticare Moleculară (Rusia).

A fost efectuat un studiu retrospectiv epidemiologic de cohortă și de tipul caz-control [5]. Pentru prelucrarea statistică a datelor au fost folosite programele Microsoft Excel 2010 și MDR (3.02) [6,7] și resurse web: www.gen-exp.ru, www.r-project.org.

Design-ul studiului științific este prezentat în Figura 1.

Noutatea și originalitatea științifică

Pentru prima dată în Republica Moldova a fost realizată cercetarea clinico-epiemiologică și a fost stabilit spectrul, răspândirea și frecvența BNME la nivel de populație. A fost folosit conceptul de „nucleu” al patologiei neuromusculare, în calitate de caracteristică medical-genetică importantă pentru analiza comparativă a populațiilor. A fost identificată o asocierie medie semnificativă între numărul de cazuri de DMD/B, SMA și NMSN de tip 1A cu mărimea și compoziția națională a populației din raioane.

Au fost obținute date noi despre particularitățile molecular-genetice ale DMD/B, SMA și NSME 1A, pe un eșantion de pacienți din Republica Moldova. Baza de date a mutațiilor DMD-LOVD versiunea v3.0 [www.dmd.nl] a fost completată cu variante de mutații detectate la pacienții din Moldova.

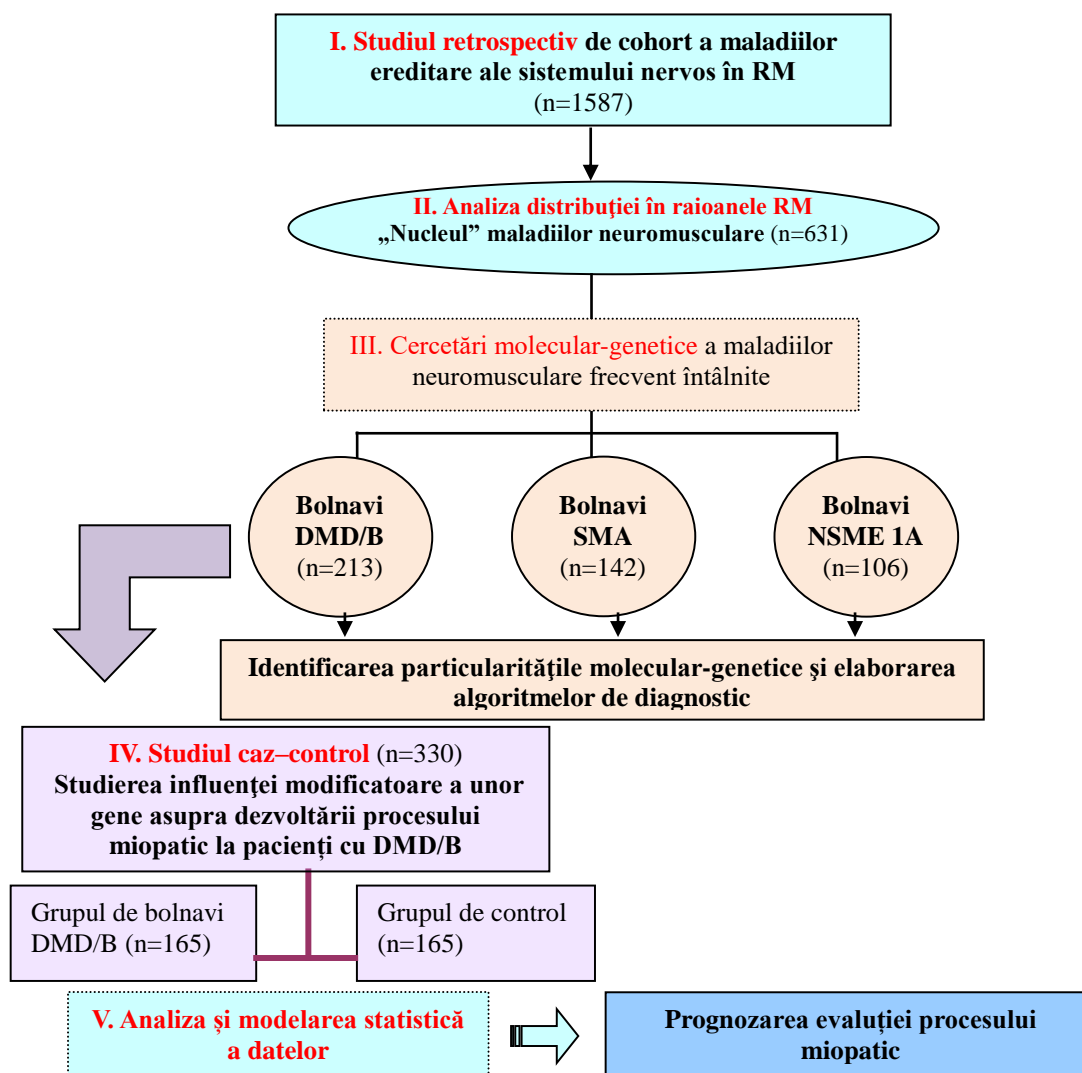


Fig. 1. Design-ul studiului științific.

Prin metoda regresiei logice multinominale, a fost apreciată contribuția polimorfismelor genelor-modificatoare studiate și au fost depistate tendințele specifice care au un impact major asupra timpului de progresare a procesului miopatic.

A fost elaborată strategia pentru diagnosticarea moleculară, bazată pe caracteristicile individuale ale pacienților.

Problema științifică importantă soluționată

A fost argumentat sistemul de prognozare a gravității decurgerii bolii la copiii cu DMD/B/B, bazat pe analiza impactului delețiilor din gena *DMD*, a variantelor polimorfe a genelor ciclului folat-metioninic (CFM) și a sintazei oxidului nitric în dezvoltarea bolii. Au fost stabilite tipurile și puterea de interacțiune a patternului genelor polimorfe ale ciclurilor folat (*MTHFR*) și metioninic (*MTR*, *MTRR*) și a genei *eNOS* în DMD/B, precum și rolul lor în formarea componentelor genetice (modificatoare), concomitent cu mutațiile din gena distrofinei în progresarea procesului patologic, acestea fiind un criteriu de gravitatea procesului miopatic.

Importanța teoretică a cercetării este determinarea rolului genelor modificatoare (în cazul DMD/B), care permite completarea șirurilor noi de legături patogenetice existente în procesul patologic; introducerea în circuitul științific a datelor privind spectrul BENM, particularităților molecular-genetice a patologiilor neuromusculare frecvent întâlnite, frecvențelor alelelor polimorfice a genelor *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *eNOS* în grupul control și la bolnavii cu DMD/B din Republica Moldova.

Valoarea aplicativă a lucrării. Datele obținute privind impactul maladiilor neuromusculare ereditare și structura lor sunt utile pentru perfecționarea sistemului de asistență medicală, socială și de reabilitare a bolnavilor cu maladii ereditare ale sistemului nervos și a familiilor lor. Registrul patologiilor neuromusculare frecvent întâlnite, creat în cadrul studiului, conține date necesare pentru eficientizarea consultului medico-genetic.

A fost elaborat un algoritm de cercetare clinico-genetică complexă, care include o serie de tehnici clinice, biochimice, electrofiziologice și molecular-genetice, pentru eficientizarea diagnosticului clinic și riscului sporit al bolilor din „nucleul” maladiilor neuro-musculare în familie.

A fost propusă o strategie molecular-genetică de diagnostic la pacienții cu DMD/B, care este direcționată spre identificarea particularităților individuale ale bolnavilor. Aplicarea datelor și cunoștințelor privind starea ciclurilor metabolice, cu corecția ulterioară individualizată, conform principiilor „medicinii 4P”.

Această cercetare a permis lărgirea cooperării cu diferite instituții de peste hotare și afilierea la societăți științifice (InNerMeD, TREAT-NMD). Rezultatele obținute se folosesc în procesul de predare al cursului de Genetica Umană studenților, masteranzilor și elevilor liceeni, în același timp, fiind diseminate prin intermediul mass-media – televiziune și presa specializată în scopul popularizării cunoștințelor științifice.

Principale rezultate științifice înaintate spre susținere

1. Pe parcursul cercetărilor și observărilor de lungă durată (1991-2018), s-a constatat că „nucleul” patologiei neuromusculare în eșantionul studiat de pacienți (n=1587) este reprezentat de: neuropatia motosenzorială ereditară (17,39%), distrofia musculară Duchenne/Becker (15%) și amiotrofia spinală (12,98%).
2. Prevalența bolilor neuromusculare în Republica Moldova, determinate în acest studiu este de 23,5 la 100.000 de locuitori. Dintre acestea, ponderea DMD/B este de 9,13

cazuri la 100.000 de locuitori; amiotrofie spinală (SMA) - 8,43 la 100.000 și neuropatii senzorial motorice ereditare (NSME) – 7,2 la 100.000. A fost identificată o asociere medie semnificativă ($p=0,48$) între numărul de cazuri de DMD/B, SMA și NMSN de tip 1A cu mărimea și compoziția națională a populației din raioane.

3. În grupul de control a fost determinat nivelul de heterozigozitate reală în locusurile *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTRR* A66G, *MTR* A2756G și *eNOS* 4a/4b. Analiza comparativă a frecvențelor alelelor polimorfice în grupul de control cu populațiile studiate anterior din alte țări a evidențiat o creștere semnificativă a frecvenței heterozigoților genei *MTRR* pentru locusul A66G (63,03%).
4. A fost stabilită asocierea statistic semnificativă a genotipurilor în variantele polimorfe ale genelor *CFM* și *eNOS* și riscul de agravare a procesului miopatic în cazul alelelor homozigote G66G ale genei *MTRR* (OR=7,20, 95%CI:1,84-61,81, $p=0,039$), heterozigozității după polimorfismul A2756G a genei *MTR* (OR=0,63, 95%CI:0,4-0,99, $p=0,045$) și polimorfismul A1298C a genei *MTHFR* (OR=1,7, 95%CI:1,06-2,72, $p=0,03$) și a prezenței alelei 4b a genei *eNOS* (OR=1,58, 95%CI:1,05-2,37, $p=0,027$).
5. A fost identificată sinergia pronunțată a interacțiunii dintre genele *MTHFR*, *MTR* și *eNOS*, care determină contribuția acestor gene la progresia procesului miopatic și a dizabilității timpurii (până la 9 ani).
6. Variantele polimorfe ale genelor *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTRR* A66G, *MTR* A2756G și *eNOS* 4a/4b sunt predictorii importanți pentru severitatea procesului miopatic și acționează ca modificatori ai manifestărilor clinice și a evoluției maladiei.
7. Strategia de diagnostic molecular elaborată în lucrare permite o evaluare individuală a riscurilor de dezvoltare rapidă a DMD.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetării sunt puse în aplicare în activitatea practică a secțiilor de neurologie și în LGMU ale IMSP Institutul Mamei și Copilului, dar și în cabinetele de consultanță genetică ale CSRGM în formă de protocoale clinice și de laborator (20 de acte de implementare în LGMU).

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetării au fost prezentate la conferințe ESHG în anii 2004-2010, 2013-2016 și ASHG în 2005, la Congresele EFNS – 2001-2010, 2014, și la Conferința Clinică a Asociației Americane pentru Miodistrofii în 2012. Informații privind rezultatele cercetării au fost prezentate sub formă de raport în străinătate: la sesiunile plenare a ședinței liderilor EUROCAT (Finlanda, 2008); la EPNS (România, 2014); la SEIMNM (Croatia, 2015), la Congresul al XVIII-lea al SNPAC (România, 2017), la V-lea CGM (Romania, 2018), cât și în R. Moldova: Conferința Geneticienilor și Amelioratorilor (Chișinău, 2010); Conferințele „Rare Disease in Moldovan Children Toward EU Standards of Care” (Chișinău, 2015-2019) și „Life sciences in the dialogue of generations: connections between universities, academia and business community” (Chișinău, 2016).

Publicații la tema tezei. Rezultatele cercetării au fost expuse în 76 de lucrări științifice, 2 monografii, 2 ghiduri practice, 2 lucrări științifico-metodice și didactice, 2 articole în reviste științifice internaționale, 4 – în reviste recunoscute în străinătate, 34 – în reviste naționale (9 – monoautor), materiale prezentate la forurile științifice internaționale (teze) – 32.

Volumul și structura tezei. Teza include introducere, 5 capitole, în care este prezentată sinteza rezultatelor obținute, concluzii generale, recomandări practice,

bibliografia – 306 surse. Lucrarea este expusă pe 188 pagini text de bază, conține 40 figuri, 24 tabele, 4 algoritme, 16 anexe.

Cuvinte-cheie: genetică moleculară, genetică medicală, distrofia musculară Duchenne, amiotrofia spinală, polimorfism genetic, rețele genetice, modelare matematică.

CONȚINUTUL TEZEI

1. GENETICA MALADIILOR NEUROMUSCULARE. GENE-CANDIDATE CU ROLUL MODIFICATOR AL PROCESULUI MIOPATIC

În literatura de specialitate se analizează starea actuală a BESN în lume, fiind prezentată o listă actualizată a bolilor neuromusculare ereditare și a genelor implicate în procesul patologic. Sunt abordate etapele principale ale dezvoltării neurogeneticii în Republica Moldova. Au fost descrise idei moderne despre caracteristicile clinice și genetice ale patologiilor neuromusculare frecvente (DMD/B, SMA, NSME tip 1A). Au fost prezentate posibilitățile de tratament a DMD/B cu scopul încetării progresiei distrofiei musculare Duchenne (DMD) folosind metoda de exon-skipping și supresia stop-codonului mutant [8], înlocuirea distrofinei cu utrofină [9]. Sunt prezentate preparate medicamentoase pentru tratamentul atrofiei musculare spinale (SMA) [10]. S-au analizat tendințe promițătoare precum utilizarea „moleculor mici”, care corectează splicingul pre-ARNm a genei *SMN2* [11]. Au fost caracterizate variantele polimorfe ale genelor, care codifică componentele sistemului metabolic al metioninei [12], homocisteinei [13] și oxidului de azot [14].

Motivația studiului nostru este de a identifica caracteristicile genetice unice ale genelor metabolismului sintezei metioninei/homocisteinei și a oxidului de azot la pacienții diagnosticați cu DMD/B pentru a prezice severitatea procesului patologic și argumentarea corecției medicale individuale.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Studiul dat a fost realizat în Republica Moldova, acoperind populația care trăiește în toate cele 39 de raioane ale țării pe parcursul a 27 de ani (1991 – 2018).

Subiecții principali ai cercetării au fost copiii/adulții cu boli neuromusculare ereditare.

Formarea grupurilor de copii bolnavi și de copii sănătoși incluși în studiu s-a efectuat printr-o metodă continuă. Examenului clinic complex au fost supuși 274 de bolnavi cu miodistrofie Duchenne/Becker (DMD/B), 252 bolnavi cu amiotrofie spinală și 276 cu neuropatie senzorial-motorie, tip 1A (NSME, 1A), care au fost selectați din cei 1587 de pacienți cu patologii ereditare ale sistemului nervos, internați în departamentul de neurologie al IMSP IMC și care au beneficiat de consiliere genetică în cadrul CSRGM. Pacienții au fost incluși în grupul de cercetare cu DMD/B, SMA, NSME 1A după stabilirea diagnosticului în conformitate cu criteriile de diagnostic [15, 16, 17].

Registrul național al patologiilor neuromusculare ereditare frecvent întâlnite și banca de ADN al familiilor cu risc înalt au fost organizate în cadrul LGMU, IMSP IMC, fiind un element funcțional de importanță națională.

În calitate de material pentru screening-ul molecular-genetic, s-au utilizat preparate ADN genomic din biobanca LGMU. Pentru a evalua rolul variantelor polimorfe *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTRR* A66G, *MTR* A2756G și *eNOS*

4a/4b în procesul miopatic, a fost efectuat un studiu de caz-control. Grupul de control a inclus un eșantion din 165 indivizi sănătoși, copii cu vârsta cuprinsă între 6 și 16 ani.

Metode molecular-genetice de cercetare. Pentru determinarea particularităților molecular-genetice în genele *DMD*, *SMN1*, *PMP22* și genotiparea variantelor polimorfe ale genelor candidate s-au utilizat preparate ADN obținute din 2,5 ml de sânge venos colectate într-o eprubetă cu citrat sau K3 EDTA. Studiile genetice moleculare au fost efectuate în cadrul LGMU. Extragerea ADN-ului din sângele periferic a fost efectuată prin metoda standard în două etape de extracție cu fenol-cloroform, metoda SALT-OUT și/sau utilizarea kitului Qiagen Genta Puregene conform instrucțiunilor producătorului.

Determinarea delețiilor în gena *DMD* a fost efectuată prin metoda multiplex PCR cu electroforeza ulterioară a produselor amplificării (32 exoni) [4, 18]. Determinarea delețiilor exonilor 7/8 în gena *SMN1* a fost efectuată prin analiza PCR-RFLP [3]. În grupul de bolnavi cu NSME 1A, a fost efectuată depistarea mutațiilor în 3 locusuri și a inclus analiza numărului de copii a markerilor polimorfi din domeniul duplicațiilor în gena *PMP22* [19]. Determinarea variantelor polimorfe ale genelor candidate (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTRR* A66G, *MTR* A2756G) a fost efectuată prin metoda PCR-RFLP [20] și *eNOS* 4a/4b prin metoda PCR [21].

Analiza statistică a materialului acumulat a fost efectuat aplicându-se programul Excel al pachetului Microsoft Office 2017, programele de prelucrare statistică a datelor cu metode standard pentru cercetarea biomedicală MDR 3.02, utilizând resursele www.gen-exp.ru și www.r-project.org.

3. ASPECTE CLINICO-EPIDEMIOLOGICE ȘI MOLECULAR-GENETICE ALE CERCETĂRII MALADIILOR EREDITARE NEUROMUSCULARE

3.1. Spectrul nosologic al bolilor ereditare ale sistemului nervos

În cele 39 de raioane ale Republicii Moldova, incluse în studiul epidemiologic, bolile ereditare ale sistemului nervos sunt reprezentate de o gamă largă de patologii, care includ 18 forme nosologice. Majoritatea maladiilor studiate se caracterizează printr-un polimorfism clinic pronunțat, care reflectă atât heterogenitatea genetică (neuropatii motosensorii ereditare, distrofii musculare progresive, paraplegie spastică și spinocerebelară), cât și variabilitatea manifestărilor clinice într-o formă unificată genetic (degenerarea hepatolenticulară, fenilcetonuria, distrofia miotonică) [4].

Partea de bază a spectrului nosologic BESN în Republicii Moldova este reprezentată de cinci grupuri de boli: două sunt boli cu tipul moștenirii autozomal-dominant (AD) – neuropatia senzorial-motorie ereditară (NSME), ataxia spinocerebelară (SCA), două sunt boli moștenite autozomal-recesiv (AR) – amiotrofia spinală de tipurile I-III și miopatiile progresive ale centurilor și un grup de boli are moștenirea recesivă X-linkată – Distrofia Musculară Progresivă, forma Duchenne-Becker. Ponderea acestor boli constituie 67% din totalul BESN [4].

Trei patologii: neuropatia senzorial-motorie ereditară (NSME) (n=276 – 17,39%), miodistrofia Duchenne/Becker (n=274 – 15%) și amiotrofia spinală (n=252 – 12,98%) reprezintă cele mai frecvente boli neuromusculare și sunt incluse în structura „nucleului” bolilor neuromusculare ereditare din R. Moldova.

Este important de menționat că au mai fost identificate și alte șase forme rare:

mioplegii paroxistice, miotonia Thomsen, miotonia Becker, NSME AR, NSME X-linkate și amiotrofia spinal-bulbară Kennedy [4]. Ponderea formelor rare a reprezentat 12,5% din eșantionul analizat.

În ultimul deceniu, numărul de miopatii mitocondriale și metabolice diagnosticate clinic a crescut, ceea ce creează noi oportunități pentru continuarea cercetării. În prezent, în laborator sunt în proces de elaborare metodele de analiză și diagnosticare molecular-genetică pentru Distrofie Musculară Progresivă, AR; maladiile metabolice cu dereglarea sistemului nervos (acidurie metilmalonică); bolile mitocondriale (s. MELAS, s. Leigh). Totodată este necesară crearea unui registru de Boli Rare cu posibilitatea introducerii metodelor noi de diagnostic molecular-genetic în Republica Moldova.

3.2. Prevalența bolilor neuromusculare ereditare frecvent întâlnite în Republica Moldova

Frecvența BENM în lume variază între 2,4-33,8 cazuri la 100.000 populație. Frecvența medie a BENM constituie 27,2:100.000. Analiza efectuată arată că frecvența totală a BENM în Republica Moldova constituie 23,5:100000 de locuitori, ceea ce corespunde cu datele din alte țări [4].

La 457 de pacienți s-au înregistrat distrofiile musculare progresive, cu frecvența de $15,2 \pm 0,18$:100.000 de persoane. Maladiile ereditare neuromusculare din această categorie reprezintă 48% și includ pseudohipertrofiile X-linkate, miopatiile formelor: centurii, umăr-scapulo-faciale și oftalmoplegice [22]. În subgrupa miodistrofiilor X-linkate mai des se întâlnește forma pseudohipertrofică a distrofiei musculare Duchenne/Becker (274 bolnavi) cu frecvența $9,13 \pm 0,27$ la 100.000 persoane care corespunde datelor Orphanet (4.78-15.1) (Orphanet Report Series, Jan, 2019), în Rusia – 1,35-11,23 la 100.000 persoane [23].

Miopatiile, forma centurilor sunt cel mai frecvent întâlnite la adolescenții cu moștenire autozomal-recesivă a miodistrofiei Erb. Acest diagnostic a fost stabilit la 160 de pacienți cu vârsta cuprinsă între 6-35 de ani, are o prevalență de $5,3 \pm 0,61$ per 100.000, care depășește datele Orphanet (2,85) și corespunde cu datele din Rusia (1,15-5,79) [23].

Forma *umăr-scapulo-facială* (FSHMD, FSHD, FSH sau sindrom Landouzy-Dejerine) a fost observată la 23 de pacienți. Această formă prezintă o frecvență de $0,76 \pm 0,18$ la 100 000 și se încadrează în intervalul datelor din Rusia (0,48-4,53), dar sunt mai mici conform datelor Orphanet (7).

Amiotrofia spinală (SMA) s-a înregistrat la 252 de pacienți. Prevalența în Republica Moldova constituie $8,43 \pm 0,15$:100.000 populație, care este semnificativ mai mare decât datele din Orphanet (2,93) și din Rusia (0,31-3,91). Acest indicator confirmă vigilența medicilor și o diagnosticare performantă a acestei patologii în Republica Moldova.

Neuropatiile periferice ereditare au fost detectate la 260 de pacienți din 140 familii, distribuția în Republica Moldova fiind de $7,2 \pm 0,39$ la 100 000 locuitori, care este semnificativ mai mică decât datele Orphanet (22,0), dar se încadrează și în intervalul datelor din Rusia (3,25-15,8). Acest indicator demonstrează insuficiența diagnosticării cazurilor în Moldova.

Pentru 3 forme nozologice DMD/B, SMA și NSME tip 1A a fost realizată asocierea frecvenței maladii în cadrul mai multor raioane ale țării în scopul depistării celor mai răspândite forme a maladiilor neuromusculare.

Numărul maxim de cazuri de DMD/B a fost constatat în mun. Chișinău,

Transnistria și r. Hîncești; un număr minim de cazuri a fost înregistrat în municipiul Bălți, în raioanele: Leova, Strășeni, Orhei, Rîșcani, UTA Găgăuzia. Luând în considerare transmiterea X-linkată, consultul femeilor în localitățile respective trebuie să fie realizat cu colectarea sistematică a informațiilor în aspectul genealogic și, după necesitate, se impune efectuarea diagnosticării molecular genetice cu referire la prezența purtătoarelor a genei mutante [22].

Cel mai mare număr de cazuri SMA a fost înregistrat în municipiul Chișinău, Transnistria, r. Soroca, r. Taraclia, UTA Găgăuzia. Faptul că SMA se întâlnește mult mai frecvent în aceste raioane, ca maladie cu transmitere autozomal-recesivă, poate fi explicat prin teritoriile populate preponderent de bulgari și găgăuzi, la care se poate observa fenomenul căsătoriilor dintre membrii aceleiași etnii (căsătorie asortativă etnică) [22].

Numărul maxim de cazuri de neuropatie motorie-senzorială ereditară cu predominanța moștenirii autozomal-dominante în eșantion a fost înregistrat în mun. Chișinău, Transnistria, Bălți și r. Ungheni.

Pe durata studiului, nu au fost depistate cazuri de DMD, SMA sau CMT în raioanele Basarabeasca, Vulcănești și Drochia, ceea ce indică un diagnostic clinic insuficient al acestor boli în zonele menționate.

Prin analiza corelației numărului de pacienți cu mărimea și compoziția națională a populației din raioanele Moldovei, a fost determinat, că valorile medii asociate pentru fiecare patologie exprimată prin coeficientul Spearman ρ sunt cuprinse între 0,46-0,5, $p=0,0018-0,0047$ [22].

Astfel, rezumarea rezultatelor studiului epidemiologic a evidențiat prezența încărcării ereditare pentru patologii neuromusculare X-linkate, autozomal-dominante și autozomal-recesive, în funcție de regiunile Republicii. Analiza prevalenței bolilor neuromusculare frecvente va permite planificarea activității profilactice în raioanele țării.

3.3. Caracteristica molecular-genetică a bolilor neuromusculare frecvent întâlnite

A. Particularități molecular-genetice a miodistrofiei Duchenne/Becker (DMD/B)

În prezenta cercetare, cota depistării delețiilor la bolnavii DMD/B în Republica Moldova este destul de ridicată și constituie 85%, ceea ce corespunde datelor cercetărilor în populațiile europene, în special celor din Italia 78%, Ungaria 73%, Belgia 81,8%, Canada 73% [4].

Astfel, la eșantionul pacienților cu DMD din R. Moldova, s-a remarcat prevalența implicării părților centrale și distale ale genei *DMD* în procesul de deleție (Tabelul 3.1). S-au identificat trei picuri în partea centrală a genei *DMD* – exonii 45, 47 și 48 (6,11%, 8,55% și 10,08%), respectiv, și picuri în regiunea distală a genei – exonii 50, 51, 52, 53 (7,02%, 4,27%, 3,97%, 2,29%).

Analiza a demonstrat că partea proximală are un procent mic de implicare a exonilor 3, 6 și 8 din gena *DMD* în procesul deleției (respectiv 2,7%, 2,3%, 2,6%). Rezultatele analizei efectuate au permis identificarea lor cu implicarea unui singur exon la 81 pacienți (44,75%). Alți pacienți (46,95%) aveau deleții extinse de la 2 la 45 exoni. Cu toate acestea, trebuie remarcată prezența a șase variante rare de deleție în gena *DMD* (2,8%) și 3 deleții noi, care lipseau în baza de mutații a patologiilor neuromusculare DMD/B-LOVD v2.0. În baza de date LOVD3 de la 8 decembrie 2018 n-au fost

înregistrate 4 deleții: de la exonul 1 până la 45, de la exonul 1 până la 19, de la exonul 13 până la 19 și de la exonul 43 până la 44 și 16 deleții duble (Tabelul 3.1).

Tabel 3.1. Analiza consolidată a tuturor delețiilor din gena *DMD* în acest studiu.

Dimensiunea deleției	Caz independent (N=181)	Exonul deletat	Fragmentul deletat (HGVS nomenclature)
1 exon (n= 81)	1	DEL EX 1	c.(?_244)_31+?del
	4	DEL EX 3	c94-?_186+?del
	3	DEL EX 6	c.358-?_530+?del
	2	DEL EX 8	c.650-?_831+?del
	3	DEL EX 13	c.1483-?_1602+?del
	2	DEL EX 19	c.2293-?_2380+?del
	3	DEL EX 43	c.6118-?_6290+?del
	10	DEL EX 44	c.6291-?_6438+?del
	5	DEL EX 45	c.6439-?_6614+?del
	16	DEL EX 47	c.6763-?_6912+?del
	19	DEL EX 48	c.6913-?_7098+?del
	5	DEL EX 50	c.7201-?_7309+?del
	2	DEL EX 52	c.7543-?_7660+?del
5	DEL EX 53	c.7661-?_7872+?del	
1	DEL EX 62	c.9164-?_9224+?del	
2 exoni (n=17)	1	DEL EX 3-4	c.94-?_264+?del
	2**	DEL EX 43-44**	c.6188-?_6438+?del**
	8	DEL EX 47-48	c.6763-?_7098+?del
	2	DEL EX 49-50	c.7099-?_7309+?del
	1	DEL EX 50-51	c.7201-?_7542+?del
3 exoni (n=23)	3	DEL EX 52-53	c.7543-?_7872+?del
	2	DEL EX 6-8	c.358-?_831+?del
	8	DEL EX 43-45	c.6118-?_6614+?del
	6	DEL EX 45-47	c.6439-?_6912+?del
	2	DEL EX 48-50	c.6913-?_7309+?del
4 exoni (n=12)	4	DEL EX 50-52	c.7201-?_7660+?del
	1	DEL EX 51-53	c.7310-?_7542+?del
	1	DEL EX 3-6	c.94-?_530+?del
	3	DEL EX 48-51	c.6913-?_7542+?del
	4	DEL EX 47-50	c.6763-?_7309+?del
5 exoni (n=6)	4	DEL EX 45-48	c.6439-?_7098+?del
	1	DEL EX 45-49	c.6439-?_7200+?del
	3	DEL EX 47-51	c.6763-?_7542+?del
6 exoni (n=11)	2	DEL EX 48-52	c.6913-?_7660+?del
	2	DEL EX 3-8	c.94-?_831+?del
	1	DEL EX 8-13	c.650-?_1602+?del
	3	DEL EX 45-50	c.6439-?_7309+?del
	4	DEL EX 47-52	c.6763-?_7660+?del
7 exoni (n=4)	1	DEL EX 48-53	c.6913-?_7872+?del
	1**	DEL EX 13-19**	c.1483-?_2380+?del**
	2	DEL EX 45-51	c.6439-?_7542+?del
9 exoni (n=1) *	1	DEL EX 03-09	c.94-?_960+?del
	1	DEL EX 44-52	c.6291-?_7660+?del
10 exoni (n=2) *	2	DEL EX 44-53	c.6291-?_7872+?del
13 exoni (n=2) *	2	DEL EX 31-43	c.4234-?_6290+?del
16 exoni (n=1) *	1	DEL EX 45-60	c.6439-?_9084+?del
17 exoni (n=1) *	1	DEL EX 3-19	c.94-?_2380+?del
14 exoni (n=1) *	1	DEL EX 8-21	c.650-?_2803+?del
20 exoni (n=1) **	1**	DEL EX 1-19**	c.-244-?_2380+?del**
42 exoni (n=1) *	1	DEL EX 3-44	c.94-?_c.6291-?
46 exoni (n=1) **	1**	DEL EX 1-45**	c.-244-?_6614+?del**
Deleție Dublă (n=16)**			
2 exoni (n=8)	1	DEL EX 44& DEL EX 53	c.6291-?_6438+?del& c.7661-?_7872+?del
	2	DEL EX 45 & DEL EX 48	c.6439-?_6614+?del & c.6913-?_7098+?del
	1	DEL EX 8 & DEL EX 45	c.650-?_831+?del & c.6439-?_6614+?del
	1	DEL EX 19& DEL EX 43	c.2293-?_2380+?del & c.6118-?_6290+?del
	1	DEL EX 8 & DEL EX 48	c.650-?_831+?del & c.6913-?_7098+?del
	1	DEL EX 6&DEL EX 13	c.358-?_530+?del&- c.1483-?_1602+?del
	1	DEL EX 50 &DEL EX 52	c.7201-?_7309+?del & c.7543-?_7660+?del
3 exoni (n=3)	1	DEL EX 43-44 & DEL EX 51	c.6188-?_6438+?del& c.7310-?_7659+?del
	2	DEL EX 48&DEL EX 50&DEL EX 52	c.6913-?_7872+?del&c.7201-?_7309+?del&c.7543-?_7660+?de
4 exoni (n=2)	1	DEL EX 3& DEL EX 50-52	c94-?_186+?del& c.7201-?_7660+?del
	1	DEL EX 43-45 & 50	c.6118-?_6614+?del& c.7201-?_7309+?del
8 exoni (n=1)	1	DEL EX 03-08&DEL EX 45	c.94-?_831+?del & c.6439-?_6614+?de
38 exoni (n=1)	1	DEL EX 3& DEL EX 8-44	c94-?_186+?del& c.650-?_c.6291-?
11 exoni (n=1)	1	DEL EX 1& DEL EX 45-54	c.-244- 31+?del & c.6439-?_8027+?del

*- variante rare, **- variante noi

Datorită cooperării internaționale, pacienților la care nu au fost găsite deleții prin metoda MPCR, a fost realizată secvențierea genei *DMD*. Ca urmare, s-au detectat duplicații la exonii 6 și 36 (c.408dup (p.Glu137*), c.5147dup (p.Leu1717Alafs*2) la trei pacienți; la alți patru pacienți a fost găsită o mutație nonsens în exonul 18 (c.2227C>T, p.Gln743*), în exonul 59 (c.8713C>T, p.Arg2905*), în exonul 64 (c.9337C>T, p.Arg3113*) și în exonul 40 (c.5697 del, p.Lys1899Asnfs*2). Într-un caz, s-a găsit o microdelecție în exonul 15 (c.1716_1738del (p.Ser572Argfs * 12)). A fost găsită și o duplicație lungă de la exonul 8 până la exonul 17.

Astfel, datorită implementării și perfecționării metodelor existente de determinare a delețiilor, s-a mărit spectrul exonilor cercetați de la 13 (A. Beggs) și 17 (S. Abbs) până la 23 exoni (modificarea proprie), apoi până la 36 (E.J. Ashton), sporind astfel rata de identificare a delețiilor de la 78,4% până la 85%, și am obținut o gamă extinsă de deleții identificate. De asemenea, a fost completată baza de date cu mutații ale versiunii DMD-LOVDv3.0 [www.dmd.nl] cu variantele identificate (20 variante) la pacienții din Moldova.

B. Particularitățile molecular-genetice în cazul amiotrofiei spinale (SMA)

În conformitate cu schema de determinare a naturii genetice a bolii într-o anumită familie, și având în vedere frecvența înaltă a delețiilor în exonii 7 și/sau 8 ai genei *SMN1* la pacienții cu SMA I-III, a fost efectuată analiza acestor mutații frecvent întâlnite la pacienții cu forme tipice și atipice de SMA.

Deleția exonului 7 a fost detectată la 60% de pacienți. Deleția exonului 8 a fost detectată la 52%. Deleția a doi exoni a fost găsită la 40 de pacienți (28%). Procentul de detectare a delețiilor exonilor 7 și 8 ai genei *SMN1* la pacienți cu SMA tip I-III din Republica Moldova este de 85,0%.

Pentru aprecierea posibilității de analiză a linkajului genetic (diagnostic indirect), a fost cercetată frecvența alelelor întâlnite în cadrul a doi loci polimorfi D5S557 și D5S435, limitând sfera localizării în gena *SMN1* în regiunea cu dimensiunea de 0,7 cM la populația sănătoasă și în grupul de pacienți. Frecvența teoretică a heterozigozității locusului polimorfic D5S435 este 0,75 și pentru locusul D5S557 este 0,59 în populație, ceea ce arată informativitatea sporită a locusului dat în populația din Republica Moldova [24].

Astfel, procentul de depistare a delețiilor exonilor 7/8 ale genei *SMN1* la pacienții moldoveni cu SMA este de 85% și locusurile D5S557 și D5S435 sunt informative în populația Republicii Moldova. Actualmente sunt în proces de elaborare metode noi pentru determinarea delețiilor exonilor 7/8 exoni ai genei *SMN1* prin metoda qPCR pentru screening-ul neonatal.

C. Particularitățile molecular-genetice ale neuropatiilor senzitiv-motorii ereditare, tip IA (Boala Charcot-Marie-Tooth)

Cercetarea a fost efectuată pe 106 mostre de ADN ale bolnavilor cu NSME din 79 de familii din Republica Moldova. În grupul de studiu, maladia s-a manifestat în medie la vârstele de 12,2±6,3 ani. Analiza eredocolaterală în selectarea dată a evidențiat în 56% cazuri modul autozomal-dominant de moștenire.

Pentru analiza molecular-genetică a NSME tip 1A (Boala Charcot-Marie-Tooth) au fost cercetați 3 markeri microsateliți (D17S921, D17S839, D17S122) înalt polimorfi, localizați pe 17p11.2-p12. În 23,88% cazuri au fost evidențiate duplicații

pentru locusul D17S921, 32,83% pentru locusul D17S122 și 24,62% pentru locusul D17S839. De asemenea, s-a constatat că unul și același individ poate avea duplicații în doi loci. Incidența duplicațiilor în gena *PMP22* (17p11.2-p12) la bolnavii cu NSME IA din Moldova constituie 69%. Potrivit diferitor autori, acest indicator variază de la 34,3% (Spania, Barcelona) până la 85% (Israel) [21].

Luând în considerare cele menționate, analizarea recomandărilor pentru diagnosticarea și supravegherea pacienților cu DMD de către Centrele pentru Controlul și Prevenirea Bolilor din SUA și pe baza rezultatelor obținute, au fost elaborate algoritme de diagnostic clinico-genetic complex, care include o serie de parametri clinici, biochimici, electrofiziologici și molecular-genetic, pentru a îmbunătăți eficiența diagnosticului clinic și identificarea locilor genetici ai bolii în familiile cu risc sporit de maladii neuromusculare ereditare din Republica Moldova.

În cadrul acestui studiu, a fost elaborat și aplicat un algoritm de diagnostic prenatal (DP), conform celor două abordări existente: diagnostic direct și indirect. Astfel, în perioada 1996-2017 au fost realizate 74 de diagnostici prenatale molecular-genetice a două boli monogenice: X-linkate – miodistrofia Duchenne (37 DP) și autozomal-recesive – amiotrofia musculară spinală (37 DP). O analiză a strategiilor de diagnosticare în diferite țări și o evaluare a disponibilității echipamentului a făcut posibilă propunerea de îmbunătățire a calității DP și de creștere a amplitudinii serviciului de diagnostic din Moldova.

4. ANALIZA FRECVENȚEI DE RĂSPÂNDIRE A VARIANTELOR POLIMORFE ALE GENELOR-CANDIDATE ȘI ASOCIEREA LOR CU REALIZAREA PROCESULUI MIOPATIC

4.1. Analiza variantelor polimorfe C677T și A1298C a genei *MTHFR* în grupul de control și la bolnavii cu DMD/B.

Enzima metilentetrahidrofolatreductaza este codificată de gena *MTHFR*, care are rolul principal în metabolismul acidului folic. Varianta polimorfă C677T (A223V) este legată cu schimbarea nucleotidei citozină (C) pe timină (T) în poziția 677, ceea ce duce la schimbarea restului de aminoacid alanină cu valină în domeniul catalitic a proteinei, care se leagă cu molecula de acid folic. La indivizii homozigoți pentru această variantă (genotipul T/T), enzima *MTHFR* pierde activitatea cu aproximativ 65% [13]

Pentru a determina eficacitatea utilizării analizei variantelor polimorfe C677T și A1298C ale genei *MTHFR*, a fost efectuată analiza frecvenței alelelor 677C și 677T; 1298A și 1298C și a fost determinată frecvența genotipurilor în grupul de studiu și în grupul de control. Prin legea Hardy-Weinberg (LHW) au fost identificate următoarele trei clase genotipice ale polimorfismului *MTHFR* C677T în grupul de control: 677C-0,68; 677T-0,32; (CC=0,47; CT=0,43; TT=0,1). În grupul de pacienți cu DMD/B, frecvența alelelor 677C și 677T (0,68; 0,37) ale genei *MTHFR* coincide cu frecvențele din grupul de control. Nu au fost detectate devieri de la LHW ($p=0,52$) în ambele grupe. O analiză asociativă a ratei șanselor (OR – odd ratio) nu a evidențiat diferențe statistice semnificative ($p=0,25$) (Tabelul 4.1).

Polimorfismul A1298C se află în exonul 8 și duce la substituția acidului

glutaminic cu alanina în domeniul regulator al enzimei (p.Glu429.Ala). Conform datelor din literatură, această mutație reduce activitatea enzimei, dar nu atât de semnificativ ca alela 677T.

Frecvența alelelor din grupa de control a fost: 1298A-0,65; 1298C-0,35; (AA=0,45; AC=0,43; CC=0,12) [25].

Frecvențele alelei din grupul de pacienți cu DMD/B au fost: 1298A=0,60, 1298C=0,40, frecvența genotipurilor AA=0,35, AC=0,48, CC=0,17. Distribuția frecvenței genotipurilor în grupul de control și cercetare corespunde echilibrului Hardy-Weinberg (EHW). Estimarea asociativă prin raportul șanselor a identificat că frecvența genotipului heterozigot *MTHFR A1298C* în grupul de pacienți cu DMD a constituit 55,76%, indice care diferă statistic semnificativ de frecvența acestui genotip în grupul de control - 44,85% (OR=1,70, 95% CI:1,06-2,72, $\chi^2=4,89$, p=0,03) (Tabelul 4.1). S-a constatat, că frecvența genotipului heterozigot *MTHFR A1298C* în grupul de pacienți cu DMD/B este de 1,7 ori mai mare comparativ cu grupul de control, ce poate avea un efect asupra procesului miopatic.

Tabelul 4.1. Distribuția frecvenței genotipurilor și alelelor genelor-candidate

Locusuri, genotipuri și alele	Grupul bolnavilor n, (%)	Frecvența după LHW	Grupul de control, n, (%)	Frecvența după LHW	Rata șanselor (OR)	95% interval de confidență (95%CI)	χ^2	p
<i>MTFHRC677T</i>	165		165					
CC	70 (42,4)	0,41	82 (49,7)	0,47	1,00	Ref		
CT	72 (43,6)	0,46	62 (37,6)	0,43	1,36	0,85-2,17	1,68	0,19
TT	23 (13,9)	0,13	21 (12,7)	0,1	1,28	0,66-2,51	0,53	0,47
C	212 (64,2)	0,63	226 (68,5)	0,68	1,00	Ref		0,25
T	118 (35,7)	0,37	104 (31,5)	0,32	1,21	0,88-1,67	1,33	
<i>MTFHRA1298C</i>	165		165					
AA	52 (31,5)	0,35	71 (43)	0,45	1,00	Ref		
AC	92 (55,7)	0,48	74 (44,9)	0,43	1,70*	1,06-2,72	4,88	0,03
CC	21 (12,7)	0,17	20 (12,2)	0,12	1,43	0,71-2,91	0,99	0,32
A	196 (59,4)	0,60	216 (65,5)	0,65	1,00	Ref		
C	134 (40,6)	0,40	114 (34,5)	0,35	1,30	0,94-1,78	2,58	0,11
<i>MTRA2756G</i>	165		165					
AA	102 (61,8)	0,60	87 (52,7)	0,55	1,00	Ref		
AG	51 (30,9)	0,35	70 (42,4)	0,38	0,62*	1,39-1,98	5,12	0,04
GG	12 (7,3)	0,05	8 (4,9)	0,07	1,28	0,5-3,27	0,26	0,61
A	255 (77,3)	0,78	244 (73,9)	0,74	1,00	Ref		
G	75 (22,7)	0,22	86 (26,1)	0,26	0,83	0,58-1,19	0,99	0,319
<i>MTRRA66G</i>	165		165					
AA	50 (30,3)	0,39	60 (36,4)	0,46	1,00	Ref		
AG	109 (60)	0,47	104 (63)	0,43	1,26	0,79-2	0,95	
GG	6 (3,7)	0,14	1 (0,6)	0,11	7,20*	1,84-61,81	5,02	0,04
A	209 (63,3)	0,62	224 (67,9)	0,68	1,00	Ref		
G	121 (36,7)	0,38	106 (32,1)	0,32	1,22	0,89-1,69	1,51	0,22
<i>eNOS 4a/4b</i>	148		128					
4b/4b	87 (58,8)	0,54	88 (68,8)	0,66	1,00	Ref		
4a/4b	43 (29)	0,39	32 (25)	0,31	1,36	0,79-2,34	1,22	0,27
4a/4a	18 (12,2)	0,07	8 (6,2)	0,03	2,28	0,94-5,51	3,45	0,06
4b	217 (73,3)	0,73	208 (82,2)	0,81	1,00	Ref		
4a	79 (26,7)	0,27	48 (18,8)	0,19	1,58*	1,05-2,37	4,88	0,03

Conform datelor din literatură, frecvența heterozigozității polimorfismului C677T (rs1801133) al genei *MTHFR* este de aproximativ 40% în rasa europeană. Există diferențe inter-etnice semnificative (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4524>). Frecvența heterozigozității polimorfismului *MTHFR* C677T la populația moldovenească este de 37,6% (Figura 4.1), nu diferă de cea din țările europene și este semnificativ diferită statistic în raport cu țările din Est [27-29].

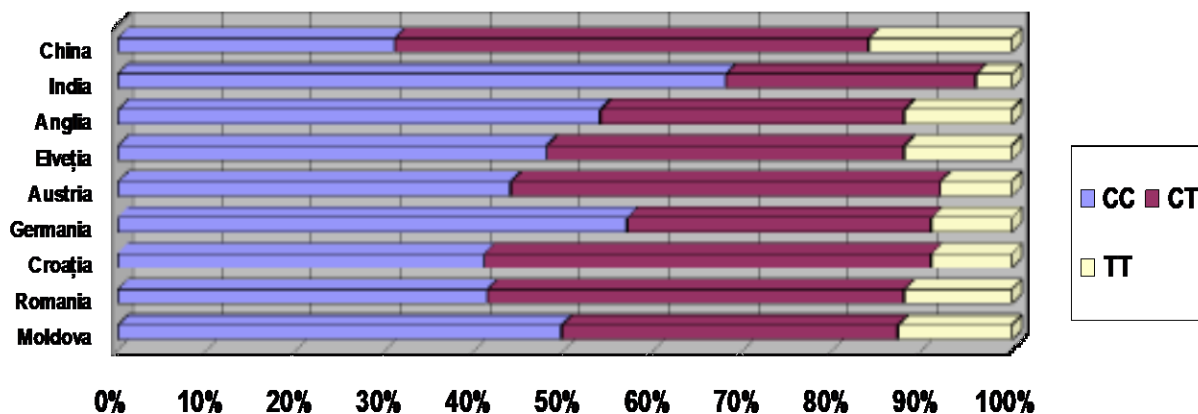


Fig. 4.1. Frecvența genotipică a polimorfismului *MTHFR* C677T (rs1801133) în R. Moldova și în diferite populații.

S-a constatat că frecvența genotipică a polimorfismului A1298C (rs1801131) al genei *MTHFR* în populația Republicii Moldova este: AA-71 (43,03%); AC-74 (44,85%); CC-20 (12,12%) (Tabelul 4.1). Nu au fost depistate diferențe statistice semnificative cu populațiile europene, însă diferențe semnificative au fost observate la compararea genotipului AA la populația Moldovei cu populația Indiei și Japoniei (Figura 4.2).

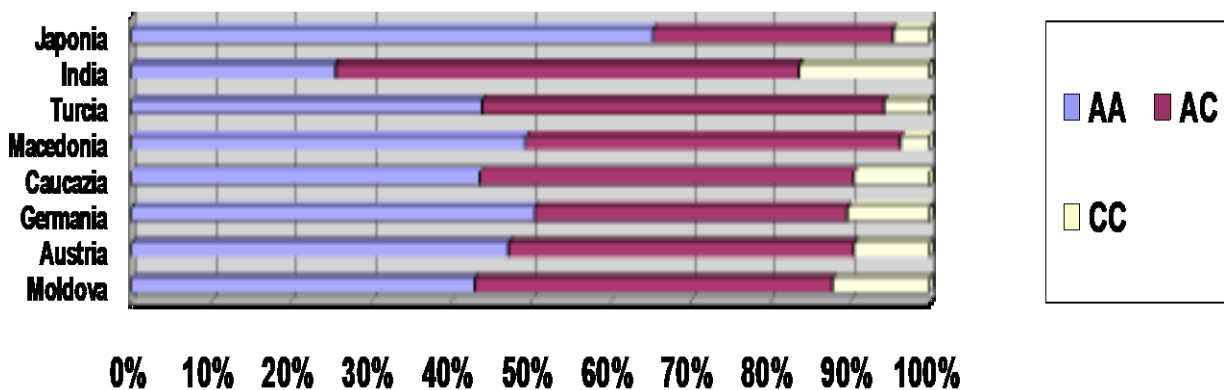


Fig. 4.2. Frecvența genotipică a polimorfismului *MTHFR* A1298C (rs1801131) în R. Moldova și în diferite populații.

Astfel, populația Republicii Moldova se caracterizează printr-un nivel sporit al heterozigozității după polimorfismele 677CT ($H_o=0,43$) și 1298 AC ($H_o=0,45$), fapt ce denotă un grad înalt de informativitate a acestor loci polimorfi și oferă posibilitatea de utilizare a acestor date în practica de rutină.

4.2. Analiza variantelor polimorfe a genelor *MTR* A2756G (rs1805087) și *MTRR* A66G (rs1801394) în grupul de control și la bolnavii cu DMD/B.

Gena metionin sintazei (*MTR*) codifică o enzimă implicată în conversia homocisteinei în metionină. Varianta polimorfă A2756G (rs1805087) reduce activitatea acestei enzime, urmată de o creștere a nivelului de homocisteină din sânge.

Conform datelor proprii, frecvența alelei dominante 2756A a genei *MTR* în grupul de control a fost 0,74, dar alelei recesive 2756G a fost 0,26. Distribuția genotipurilor pentru acest polimorfism a fost AA=0,55, AG=0,38, GG=0,07. În grupul de pacienți cu DMD/B, frecvența alelei 2756A a fost de 0,78, iar alela 2756G=0,22, iar frecvența genotipurilor observate a constituit: AA=0,60, AG=0,35, GG=0,05. Nu au fost detectate deviații statistic semnificative după LHW în ambele grupe [25].

O analiză a asociațiilor unui anumit genotip cu miopatie a evidențiat o scădere statistic semnificativă a frecvenței genotipului A2756G la grupul de pacienți comparativ cu grupul de control (Tabelul 4.1), posibil că acest genotip poate avea un efect protector la pacienții cu DMD (OR=0,63, 95%CI:1,4-1,99, $\chi^2=5,02$, p=0,04).

Polimorfismul rs1801394, cunoscut ca mutația A66G sau Ile22Met, reprezintă o substituție mononucleotidică (SNP) în gena metionin-sintaza-reductaza *MTRR*. Această genă codifică una din cele două enzime ce participă la sinteza metioninei.

În grupul de control, frecvența alelei dominante a fost: 66A=0,68, iar a alelei recesive 66G=0,32; frecvența genotipică: AA=0,46, AG=0,43, GG=0,11. În grupul de studiu, frecvențele alelelor au fost: 66A=0,62, 66G=0,38; frecvențele genotipurilor observate: AA=0,39, AG=0,47, GG=0,14. S-a constatat, că distribuția frecvenței genotipurilor polimorfismului rs1801394 are diferențe semnificative față de legea Hardy-Weinberg în ambele grupe de studiu [20]. Analiza asocierii variantei polimorfe în studiul caz-control a permis identificarea unui indice statistic semnificativ (p<0.05) de risc relativ (de 7,2 ori) al agravării stării la bolnavii purtători ai genotipului homozigot G66G al genei *MTRR* (Tabel 4.1).

Astfel, a fost găsită o asociere statistic semnificativă a dereglării ciclului de metionină (genele *MTR* și *MTRR*) la pacienții cu DMD/B și, în consecință, formarea unei predispoziții la progresia procesului miopatic și a riscului de invalidizare timpurie.

Drept urmare a studiului molecular-genetic al grupului de control, au fost determinate frecvențele genotipurilor și alelelor în populațiile variantelor polimorfe rs1805087 și rs1801394. A fost stabilită frecvența genotipurilor variantei polimorfe *MTR* A2756G la populația Moldovei: A2756A-52,73%, A2756G-42,42% și G2756G-4,85% (Figura 4.3).

Analiza comparativă a rezultatelor frecvenței genotipice a polimorfismului A2756G al genei *MTR* în populația țării noastre a evidențiat o frecvență sporită a genotipului homozigot GG (4,85%) în comparație cu datele americanilor (2,5%), europenilor (2,6%), africanilor (2,7%) și asiaticilor (1,36%), nu diferă semnificativ de populația germană (4%). Frecvența genotipului AG (42,42%) în populația moldovenească este mai mare decât în alte populații (europeană (35%), africană (30,9%), germană (31%), SUA (26,5%). Populația din Republica Moldova se caracterizează printr-un nivel mediu al heterozigoției observate ($H_o = 0,38$) [25].

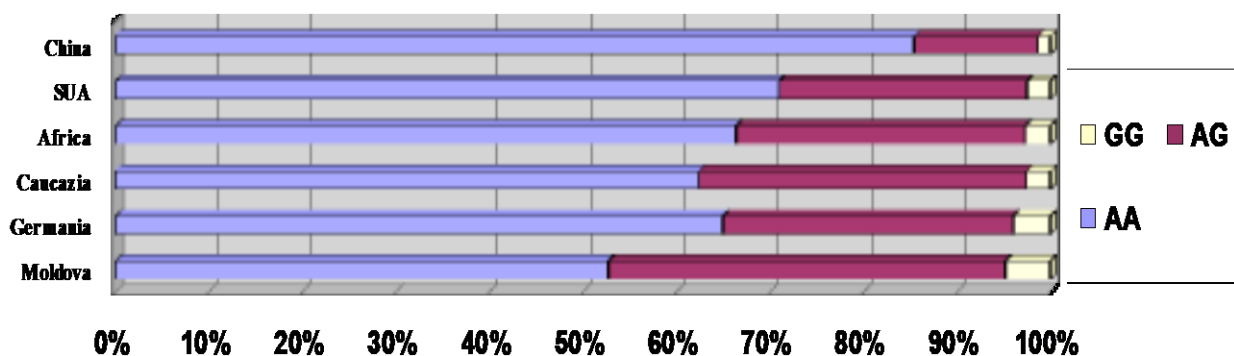


Fig. 4.3. Repartiția frecvenței genotipice după polimorfismul *MTR* A2756G în R. Moldova și în diferite populații.

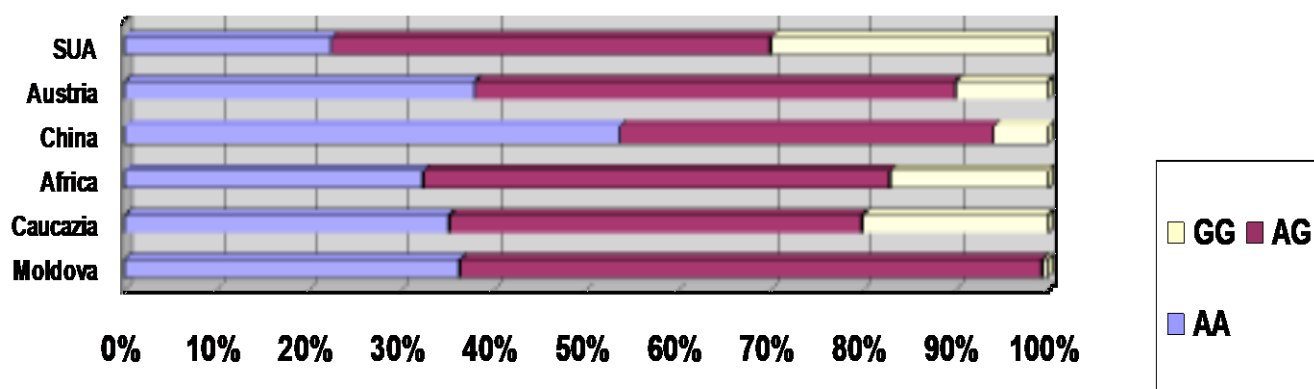


Fig. 4.4. Repartiția frecvenței genotipice după polimorfismul *MTRR* A66G în R. Moldova și în diferite populații.

În cadrul cercetării s-a identificat o creștere statistic semnificativă a frecvenței genotipului *MTRR* A66G (63,03%) în populația Republicii Moldova, în comparație cu alte populații, fapt ce reprezintă un indice înalt de heterogenitate. De asemenea, populația țării noastre se caracterizează printr-un nivel sporit de heterozigozitate după polimorfismul rs1801394 ($H_o=0,44$) [25].

4.3. Analiza variantei polimorfe 4a/4b a genei *eNOS* în grupul de control și la bolnavii cu DMD/B.

Polimorfismul genei *eNOS* 4b/4a, caracterizat prin numărul de repetiții a unei secvențe, formată din 27 perechi de baze în intronul 4, este asociat cu o scădere a nivelului de NO în plasma sangvină, regulând procese de constricție-dilatate a vaselor sanguine [14]. Studiul polimorfismului genei *eNOS* a demonstrat că la persoanele homozigote după alela 4a este sporită concentrația nitriților și al nitraților în sânge, el fiind direct asociată cu viteza de producere a oxidului nitric de către endoteliul vaselor.

În urma studiului genetic molecular, au fost determinate frecvențele genotipurilor și alelele genei *eNOS* pentru polimorfismul 4a/4b. Conform legii Hardy-Weinberg,

frecvența alelică în grupul de control a fost următoarea: 4b-0,81, 4a-0,19, iar frecvența genotipică observată: 4b/4b=0,66, 4a/4b=0,31, 4a/4a=0,03 (Tabelul 4.1).

A fost stabilit, că frecvența alelei 4a în grupul pacienților cu DMD/B este 0,27, depășind statistic semnificativ cea din grupul control ($\chi^2=7,9$, $p=0,005$), frecvența observată a genotipurilor *eNOS* este 4a/4b=0,39, 4b/4b=0,54, 4a/4a=0,07. Se observă o deviere statistic semnificativă ($\chi^2=9,8$) de la EHW în ambele grupe [25]. Astfel, analizând frecvențele genotipului în aceste două grupe, s-a observat o creștere statistic semnificativă a frecvenței genotipului 4a/4a la pacienții cu DMD comparativ cu grupul de control (OR=2,28, 95%CI:1,05-5,51, $\chi^2=3,45$, $p=0,06$).

Au fost comparate datele frecvenței alelice a *eNOS* 4a/4b la populația din Republica Moldova cu datele din populațiile Indiei, Japoniei, Braziliei, Poloniei și Iranului. S-a constatat, că fracvența alelei 4a nu diferă semnificativ de frecvenele ei în populațiile poloneză, braziliană și indiană. Diferențe semnificative au fost constatate față de populațiile japoneză și irakiană (Figura 4.5).

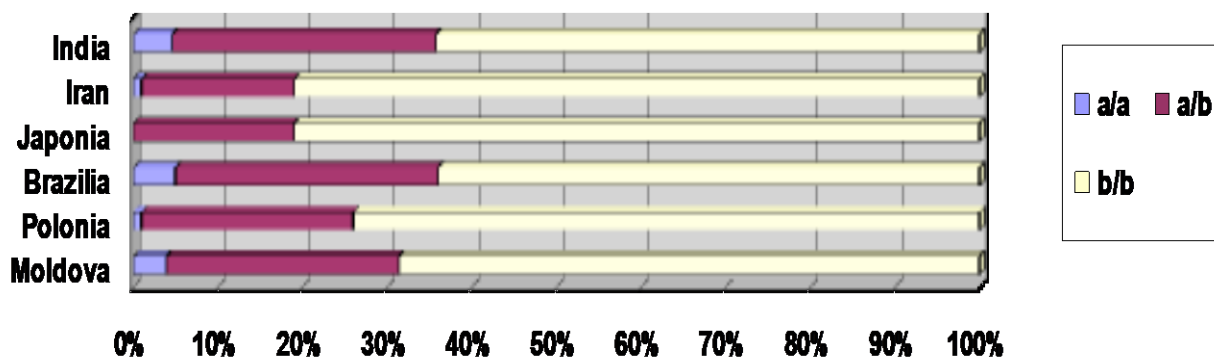


Fig. 4.5. Frecvențele genotipice ale polimorfismului 4a/4b al genei *eNOS* în R. Moldova și în diferite populații.

Evaluarea asocierii variantelor polimorfe ale genelor metioninei, ciclului folat și *eNOS* cu riscul de agravare a procesului miopatic a evidențiat o creștere semnificativă statistică a homozigoților alelei G66G a genei *MTRR* (rs1801394) (OR=7,20, 95%CI:1,84-61,81, $p=0,04$) și prezența mutației heterozigotă A2756G a genei *MTR* (rs1805087) (OR=0,63, 95%CI:1,4-1,99, $p=0,04$) și purtarea alelei 4b a genei *eNOS* (OR=1,58, 95 %CI:1,05-2,37, $p=0,027$).

A fost identificată o deviație statistic semnificativă a frecvențelor observabile și teoretice în grupul de pacienți și cel de control pentru cele două polimorfisme *MTRR* (rs1801394) și *eNOS* 4a/4b, ceea ce indică o dereglare a EHW care pare să fie legată de procesele stochastice din populație.

5. MODELAREA INTERACȚIUNII GENOTIP–FENOTIP ȘI PROGNOSTICUL SEVERITĂȚII PROCESULUI PATOLOGIC LA PACIENȚII CU DMD/B

În prezent, o atenție deosebită se acordă studiilor privind procesele genetice și biochimice care apar în țesutul muscular în cazul DMD/B. Se cercetează rolurile diferitor gene care pot influența severitatea DMD. În studiu s-a făcut o încercare de a explica existența a două variante de evoluție clinică a miopatiei: forma malignă Duchenne și forma benignă Becker.

5.1. Evaluarea impactului polimorfismelor genelor *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* și *eNOS* asupra evoluției proceselor miopatie

Folosind metoda regresiei logistice multinominale, a fost creat un număr de modele de interconexiune și au fost selectate cele mai bune modele, bazat pe intensitatea relației dintre parametrii genetici și datele clinice, ținându-se cont de rata progresiei a DMD/B.

În acest sens, au fost analizate două valori variabile dependente: timpul de începere a stadiului 4 al MDD/B (timpul de plasare în scaunul cu roțile) până la 9 sau până la 12 ani, precum și câțiva factori în calitate de variabile independente: *puterea musculară la prima examinare*, *tipul delețiilor din gena distrofinei*, *genotipul genelor MTHFR, MTR, MTRR și eNOS* [30].

Au fost analizate cele 171 de cazuri, dintre care au fost valide numai 148 cazuri – cu timpul de plasare în scaunul cu roțile până la 9 ani. În studiu au fost cercetați 23 (15,5%) bolnavi cu DMB și 125 bolnavi cu DMD, dintre care 65 (38%) bolnavi au ajuns la incapacitatea de a se deplasa până la 9 ani, iar 106 (62,0%) se puteau deplasa de sine stătător în perioada realizării studiului. Din 148 de cazuri valide, 35,1% de bolnavi prezentau deleții fără devierea cadrului de citire (*in-frame*), 45,0% aveau deleții cu devierea cadrului de citire (*out of frame*), iar la 34 (19,9%) nu au fost depistate deleții. Pentru grupa cu timpul de plasare în scaunul cu roțile până la 12 ani au fost examinați 166 pacienți, dintre care 117 pacienți cu DMD/B au fost plasați în scaun până la 12 ani, iar 49 se deplasau de sine stătător.

Prin **Modelul A** a fost verificată ipoteza Monaco – dacă tipul deleției (*in-frame* sau *out-of-frame*) influențează timpul de plasare în scaunul cu roțile a pacienților cu DMD/B din Moldova. Analizând două modele: (*modelul A1* – stadiul 4 al bolii începe până la vârsta de 9 ani și *modelul A2* – până la 12 ani) s-au obținut o diferențe statistic nesemnificative ($p=0,48$, $p=0,156$), dar asocierea lor cu plasare în scaunul cu roțile la vârsta de 12 ani a fost mai puternică decât la vârsta de 9 ani. Analizând contribuția tipului de deleție la timpul de dizabilitare, s-a constatat tendința clară de asociere cu deleția *out-of-frame* $p=0,061$ [31]. Datele obținute în eșantionul nostru de pacienți nu confirmă în mod evident ipoteza „cadrului de citire”.

Modelul B. Cu ajutorul acestui model a fost analizat rolul aprecierii *puterii musculare la prima examinare*.

Modelul B-1 a explorat dependența „*plasării în scaunul cu roțile la 9 ani*” de *tipul deleției și puterea mușchilor*. Acest model a demonstrat asocieri statistic semnificative: $\chi^2=46,62$, $df=5$, $p=0,00$. Contribuția parametrului „*puterea mușchilor*” a fost statistic semnificativă ($p=0,023$). Totuși, acest parametru este parțial subiectiv,

dependent de sensibilitatea individuală a medicului, în cazul în care acest parametru nu se estimează instrumental [31].

Modelul C a permis analiza rolului polimorfismelor genelor ciclurilor folat și cel metioninic asupra timpului de instalare a stadiului 4 al bolii. Modelul C-1 cu variabila dependentă „*plasarea în scaunul cu rotile până la 9 ani*”. Modelul s-a dovedit a fi statistic nesemnificativ în general ($p=0,114$), însă analiza de regresie a evidențiat efectele statistic semnificative ale genotipurilor *MTHFR* C677T ($\beta=1,10$, $\chi^2=0,004$, 95%CI:1,42-6,35, $p<0,05$) și *MTHFR* C1298C ($\beta=1,18$, $\chi^2=0,04$, 95%CI:1,06-10,00, $p<0,05$). Valoarea parametrului dependent (*plasarea în scaunul cu rotile până la 9 ani*) în analiza de regresie pentru heterozigoții compuși *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTRA*2756G ($\beta=33,7$) și *MTHFR* C677T, *MTRR* A66G, *MTRA*2756G ($\beta=34,7$) a evidențiat influențe semnificative în sens statistic ($p=0,001$ pentru ambele) [31]. Prin urmare, profilurile heterozigote compuse au influențat semnificativ vârstele de instalare a disabilității la pacienții cu DMD. Modelul C-2 cu variabilă dependentă „*instalarea stadiului 4 al maladiei la 12 ani*”, cu variabilele independente identice cu cele din modelul C1. Analiza apropierei stadiului de instalare a disabilității, asigurată de model, a demonstrat că modelul este statistic semnificativ în general ($p=0,017$).

Apresiasi parametrilor regresiei logistice – **Modelului E**. În acest model, „*puterea musculară*” a fost analizată în calitate de parametru dependent. Analiza a identificat patru factori statistic semnificativi ce acționează evident asupra variabilei dependente: 1) starea homozigotă G66G a genei *MTRR* ($\beta=20,98$, $p=0,0000$); 2) starea heterozigotă A66G a genei *MTRR* ($\beta=1,4$, $p=0,03$); 3) starea heterozigotă A2756G a genei *MTR* ($\beta=1,5$, $p=0,02$) și 4) starea heterozigotă C677T a genei *MTHFR* ($\beta=1,5$, $p=0,02$). Astfel, prin construirea și testarea acestui model, au fost identificate tendințele specifice unui anumit proces patologic, fapt ce ajută la înțelegerea modalităților de interacțiune în cadrul patologiei studiate. De exemplu, s-a demonstrat faptul că mutațiile în genele ciclului metioninic au o influență majoră asupra forței musculare.

Modelul F include în sine variabila dependentă – plasarea în scaunul cu rotile până la vârsta de 9 ani și alți cinci factori: *variantele polimorfe cercetate în genele MTHFR 677,1298; MTRR 66, MTR 2756, eNOS 4a/4b*. Informațiile privind apropierea plasării, furnizate de model, prezintă semnificație statistică ($\chi^2=101,89$, $df=67$, $p=0,004$) [30].

Modelul G include în sine variabila dependentă: plasarea în scaunul cu rotile până la vârsta de 9 ani și alți 6 factori: *tipul deleției; toate polimorfismele genelor MTHFR677, MTHFR1298, MTRR2756, MTR66, eNOS4a/4b*. Informațiile privind apropierea plasării, furnizate de model, prezintă semnificație statistică ($\chi^2=126,37$, $df=95$, $p=0,017$).

Așadar, după toate modelele statistic semnificative, putem determina probabilitatea de plasare în scaunul cu rotile a pacienților cu DMD/B până la vârsta de 9 sau de 12 ani (după tabelele de probabilitate), ceea ce justifică necesitatea utilizării modelelor statistic regresive dezvoltate în practica clinică a neuropatologilor și geneticienilor în scopul formării grupurilor de risc pentru progresia miopatiei și inițierea terapiei individuale.

Astfel, rezultatele analizei logistice regresionale au arătat că variantele polimorfice a genelor ciclului folat, metioninic și a genei *eNOS* sunt importante pentru calcularea probabilității apariției celui de-al patrulea stadiu al procesului miopatic și sunt modificatoare pentru evoluția clinică a maladiei.

5.2. Evaluarea interacțiunii intergenice ale genelor *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* și *eNOS* la bolnavii cu DMD/B

Luând în considerare datele obținute în acest studiu: analiza asocierii variantelor polimorfe studiate cu MDD/B și cele ale analizei influenței genelor ciclului folat, ciclului metioninic și *eNOS* asupra procesului miopatic prin metoda regresiei logistice multinominale, etapa următoare a cercetării a constat în identificarea interacțiunii genelor cercetate, cu scopul de a determina combinațiile specifice, care ar putea avea o importanță patogenetică mai mare în evoluția procesului miopatic. Pentru soluționarea acestui obiectiv, a fost utilizată metoda MDR (multifactor dimensionality reduction), ce a permis reprezentarea grafică a structurii ierarhice și a naturii interacțiunilor diferitor gene. Baza matematică a MDR (metoda neparametrică de modelare statistică) este o alternativă pentru regresia logistică, folosită pentru a identifica și a descrie tipul interacțiunilor neliniare dintre atributele genetice discrete și factorii de mediu, reprezentate sub formă de analiză de cluster.

În cadrul cercetărilor realizate a fost analizat tipul și forța de interacțiune a genelor la pacienții cu DMD/B, în stadiul 4 de boală (plasați în scaun cu rotile), în perioade diferite de vârstă – până la 9 sau 12 ani [32]. În rezultatul analizei tipului și puterii de interacțiune intergenice între polimorfismele GCFM și a genei *eNOS* la pacienții cu dezvoltare a stadiului 4 de boală până la 9 ani, au fost identificate modelele care descriu cele mai relevante interrelații a 5 locusuri cercetate în 4 gene: *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* și *eNOS* în dezvoltarea stadiului invalidizant al procesului miopatic în DMD/B.

Au fost analizate modelele de interacțiune genică între 1, 2, 3 și 4 loci, identificate prin algoritmul MDR, în grupuri cu un clasificator binar – stadiul 4 de boală survenit până la 9 ani (0) și stadiul 4 survenit până la 12 ani (1) în eșantionul de studiu al pacienților cu DMD/B. Analiza de cluster a permis evidențierea interacțiunii dintre variantele polimorfe cercetate, care pot influența agravarea procesului miopatic în cazul DMD.

Cel mai bun model pentru prognozarea instalării stadiului 4 de boală până la 9 ani la pacienții cu DMD/B a fost combinația de 3 alele ale variantelor polimorfe *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G, *eNOS* 4a/4b, cu cea mai mică eroare de precizie (0,68) cu reproductibilitatea CVC=8/10 și $\chi^2=18,34$ ($p<0.00$). Riscul relativ a constituit 4,04 (95%CI:2,10-7,76) [31].

Pentru descrierea tipului și puterii interacțiunii stabilite la bolnavii DMD în stadiul 4 de boală până la 9 ani, a fost creat un grafic al entropiei care reflectă interacțiunile intergenice din modelul obținut și care constă din două cluster interconectate (Figura 5.1). Primul cluster include modulul cu sinergism exprimat (dublare pozitivă) în raport cu impactul asupra fenotipului – interacțiunea a doi loci, rs1801133 și rs1801131, din gena *MTHFR* (roșu), și activitatea genei este influențată anume de acești doi loci. Al doilea cluster include modulul interacțiunii a două gene –

MTR și *eNOS*, cu un synergism la fel de exprimat în raport cu impactul asupra fenotipului, în care activitatea unei gene se află sub influența unei alte gene nealelice ei. La rândul lor, primul și al doilea cluster au demonstrat synergism moderat al interacțiunii genelor (culoarea portocalie). Structura ierarhică și caracterul interacțiunilor dintre toate genele studiate și tipul de deleții din gena distrofinei (Figura 5.1) la vârsta de 9 ani a arătat că tipul de deleție în gena *DMD*, mutații în gena reductazei metionin sintazei (*MTRR*) sunt factori independenți care afectează în paralel timpul de plasare în scaun cu roțile.

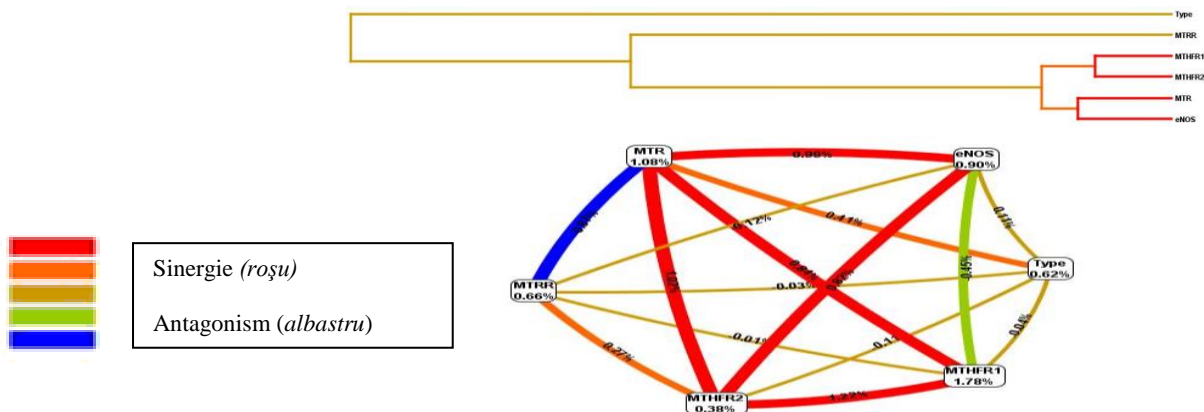


Fig. 5.1. Structura interacțiilor genice ale variantelor polimorfe ale genelor modificatoare și tipul deleției în gena distrofina la bolnavii cu DMD/B sub 9 ani. Sus – analiză de cluster, jos – grafic ce reprezintă puterea de interacțiune între loci (Type – tipul deleției; *MTHFR1* – locusul *MTHFR* 677; *MTHFR2* – locusul *MTHFR* 1298; *eNOS* – locusul *eNOS4a/4b*, % – % de entropie)

Graficul circular (Figura 5.1) reflectă contribuția procentuală de entropie a fiecărui component. S-a identificat că influența locusului *MTHFR677* asupra plasării în scaunul cu roțile până la 9 ani constituie 1,78%, iar a locusului *MTR A2756G* – 1,08%. Prin urmare, mutațiile în acești loci condiționează riscul sporit de agravare a procesului miopatic. Contribuția perechii *MTHFR677-MTHFR1298* constituie 1,22%, iar a perechii *MTR A2756G-MTHFR1298* – 1,02% [33].

De asemenea, a fost identificată o influență dublă negativă pronunțată a locilor polimorfi *MTRR A66G* și *MTR A2756G* asupra fenotipului. În ceea ce privește tipul deleției, s-a identificat o synergie moderată între locusul polimorf al genei *MTR A2756G* și tipul deleției, iar efectul contribuției perechii constituie 0.41%. Relația dintre tipul deleției cu locii polimorfi ale genelor *MTHFR* 677 și 1298, *MTRR* și *eNOS* denotă o interacțiune aditivă a acestora.

Cel mai bun model de prognozare a dizabilității până la 12 ani la pacienții cu DMD/B este modelul ce combină 4 alele ale *MTHFR C677T*, *A1298C*; *MTR A66G* și *eNOS4a/4b*. Nivelul de reproductibilitate a modelului CVC=9/10, precizia 0,67 și $\chi^2=54,22$ ($p<0,0001$). Raportul șanselor pentru modelul în cauză a fost de 14,67 (95%CI:6,7-32,15), demonstrând că odată cu creșterea cu o unitate a caracterului complex, șansele de agravare a miopatiei cresc cu mai mult de 14 ori.

Analiza a demonstrat că influența locusului *MTHFR677* asupra procesului miopatic cu invalidizarea la vârsta de 12 ani scade (0,16%) în comparație cu influența acestuia în

cazul cu vârsta de invalidizare 9 ani (1,78%). De asemenea, se observă scăderea influenței locusului *MTRA* 66G (0,48) în comparație cu influența acestuia la plasarea în scaun cu roțile la vârsta până la 9 ani (1,08%). În schimb, la vârsta de 12 ani a crescut influența locusului *MTHFR*1298 (1,96%). În mod similar, s-au schimbat legăturile dintre perechi: efectul contribuției perechii *MTHFR*677-*MTRA*2756G constituie 1,04%, iar al perechii *MTRA*2756G-*eNOS*4a/4b – 0,59%. La pacienții cu vârsta de invalidizare de 12 ani, efectul perechii *MTHFR*677-*MTHFR*1298 s-a redus semnificativ, alcătuind doar 0,40% în comparație cu modelul plasării în scaunul cu roțile până la 9 ani. În cadrul perechii *MTHFR*1298-*eNOS*4a/4b s-a constatat o influență dublă negativă pronunțată asupra fenotipului la pacienții invalidizați de DMD/B până la 12 ani. Efectul contribuției acestei perechi constituie (-1,64%), deci se observă un efect protector [33].

Analizând structura ierarhică a tuturor componentelor genice și tipul deleției la copiii care s-au plasat în scaunul cu roțile până la 12 ani (Figura 5.2), au fost identificate două clusteruri independente. Primul cluster independent a unit locii *MTHFR*1298 și *eNOS* 4a/4b interconectați prin influența efectului dublu pronunțat (culoarea albastră). În cel de-al doilea cluster, între locusul *MTHFR*677; tipul deleției în gena *DMD* și locusul *MTRA*2756G s-a stabilit o interdependență puternică sinergică (liniile roșii scurte), în care activitatea tipului deleției în gena *DMD* se află sub influența locusului *MTR* A2756G.

Astfel, în această lucrare s-a demonstrat implicarea genelor diferitor căi metabolice în patogeneza DMD/B și rolul interacțiunilor în cadrul rețelelor genice în procesul patologic. În lucrare s-a întreprins tentativa de modelare a trei căi metabolice (ciclul acidului folic, ciclul metioninei – metabolismul homocisteinei, și *eNOS*4a/4b – creșterea producției NO, care este toxic în concentrații mari) și de evaluare a rolului a două substanțe toxice – homocisteina și oxidul nitric – la persoanele ce suferă de patologia monogenă: miodistrofia Duchenne/Becker.

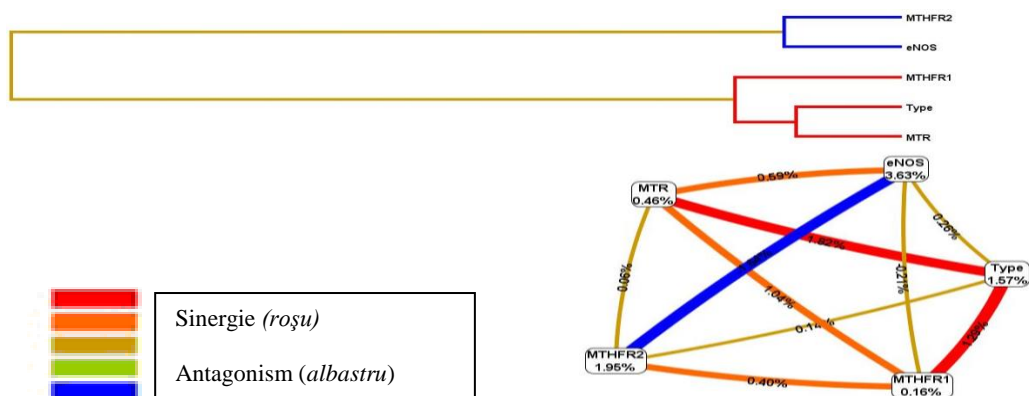


Fig. 5.2. Structura interacțiunilor genice ale variantelor polimorfe ale genelor modificatoare și tipul deleției în gena distrofina la bolnavii cu DMD/B sub 9 ani. Sus – analiză de cluster, jos – grafic ce reprezintă puterea de interacțiune între loci (Type – tipul deleției; *MTHFR*1 – locusul *MTHFR* 677; *MTHFR*2 – locusul *MTHFR* 1298; *eNOS* – locusul *eNOS*4a/4b, % – % de entropie)

Înțelegerea interacțiunilor intergenice în anumite perioade de evoluție ale bolii, care ia în calcul dereglările în procesele biochimice, fundamentează posibilitatea corecției metabolice individuale la pacienții cu MDD/B.

5.3. Rolul genelor modificatoare investigate în patogenia miodistrofiei Duchenne

Gena *DMD* este situată în mijlocul brațului scurt al cromozomului X. A fost constatat că la 65% din pacienți se atestă deleții în cadrul genei, iar la 6% – duplicații de diferită lungime și localizare. Frecvența delețiilor în genă nu este egală pe întreg traectul ei: ele apar cel mai des în mijlocul genei. Al doilea „punct fierbinte” al delețiilor se află între exonii 7 și 8.

În anul 1988, Monaco A. a formulat ipoteza „cadrului de citire”, care explică diferența dintre cele două tipuri de miodistrofii – Duchenne și Becker. S-a constatat că, în cazul în care delețiile sau duplicațiile nu încalcă cadrul de citire, se sintetizează o proteină scurtată. În acest caz, tabloul clinic corespunde distrofiei musculare Becker. Dacă totuși se dereglează cadrul de citire, se sintetizează o proteină instabilă și nefuncțională, iar tabloul clinic corespunde formei Duchenne a bolii. Ulterior s-a stabilit că la aproximativ 92% din pacienți prin această ipoteză se poate explica diferența în evoluția clinică a miodistrofiei, dar în caz de deleție a exonilor 3-7 și în cazul devierii cadrului de citire se dezvoltă tabloul clinic al miodistrofiei Becker. Totodată, s-a demonstrat că fără modificarea cadrului de citire, dar în prezența delețiilor extinse (până la 30 de exoni), se dezvoltă forma Duchenne; absența exonului 50 este adesea asociată cu retardul mintal, iar lipsa exonului 49 – cu cardiomiopatia.

Astfel, cercetările asupra modificării structurii genei categoric nu permit asocierea tabloului clinic al distrofiei musculare cu dereglările specifice ale acesteia. În legătură cu acest fapt, a fost formulată ipoteza prin care unii factori influențează asupra manifestării și dezvoltării procesului miodistrofic.

Pentru a explica procesul miodistrofic, Hoffman E. a propus schema procesului miopatic, unde o influență majoră a fost atribuită ionilor de calciu. Profesorul Grinio L. (1998), pe baza propriilor rezultate ale cercetării DMD și a analizei datelor din literatura de specialitate, a propus o nouă schemă de dezvoltare a procesului miodistrofic, diferită de schema lui Hoffman E. care este construită pe baza datelor cercetării etapelor clinice ale maladiei. Etapa clinică este asociată cu modificări metabolice semnificative și este precedată de schimbări majore în structura și funcția musculaturii scheletice. Conform acestei viziuni, procesul miodistrofic se asociază cu începutul mersului și munca intensivă a membranei musculare, acestea fiind afectate de absența distrofinei [34]. Inițial, procesul puternic de regenerare reține dezvoltarea rapidă a miodistrofiei, dar începe distrugerea membranelor organelor (mitocondriilor, reticulului sarcoplasmatic, reticulului endoplasmatic, aparatului Golgi). În acest caz, organismul suferă de intoxicarea cu produse de descompunere, crește hipoxia, se implică procesul degenerativ al tuturor tipurilor de metabolism [34]. Mecanismul de apărare nespecifică și cel de adaptare rețin pentru scurt timp procesul de miodistrofie, iar prezența în organism a produselor de peroxidare a lipidelor (PPL) completează procesul degenerativ, conducându-l spre etapa terminală, în care țesutul

muscular practic dispare, fapt demonstrat atât pe persoane bolnave, cât și de experimentele pe animale, fiind înlocuit cu țesut conjunctiv și adipos. Pentru suprimarea modificărilor degenerative ale mușchilor, se efectuează experimente pe modele animale (dystrophin-deficient mdx murine model) și utilizarea de leupeptin (tripeptide calpain inhibitor), cercetarea căilor de semnalizare ale oxidului nitric – guanosin monofosfat ciclic (NO-cGMP) și folosirea inhibitorului fosfodiesteraza-5 (PDE5), în scopul încetinirii procesului patologic.

Cercetările lui Mukund K. din anul 2015, au identificat diferențele globale dintre expresia genelor în mușchii normali și în mușchii bolnavilor cu DMD la etapa incipientă a maladiei, aplicând metodele statistice cu utilizarea analizei rețelelor ponderale privind co-expresia genelor (*WGCNA*). Mai multe blocuri de gene pot fi asociate cu progresia maladiei și conform ipotezei, pot avea valoare statistic semnificativă în patogeneza DMD [35].

Cercetarea proprie a permis perceperea și desăvârșirea mecanismelor patogenetice existente, datorită identificării particularităților genetice unice ale interacțiunii genelor metabolismului acidului folic și vitaminei B12 (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*) și oxidului nitric (*eNOS*) la bolnavii cu DMD/B, care determină baza ereditară a individualității biochimice, amprenta ereditară unică. Fenotipul fiecărui pacient este reflectarea particularităților individuale ale genotipului său, realizat în componența rețelelor genice [36].

Particularitatea viziunii noastre asupra patogenezei constă în considerarea maladiei tipice monogenice DMD/B drept un rezultat integral al afectării genei principale (distrofina) și al defecțiunii expresiei variantelor funcțional slăbite ale multor grupe de gene, fiecare dintre acestea putând constitui o rețea genică independentă.

În prezenta cercetare, ne-am propus să modelăm efectul celor trei căi metabolice: ciclul acidului folic, ciclul metioninei și *eNOS* în diferite etape ale maladiei, precum și să apreciem rolul acestor gene, unite într-o rețea genică la bolnavii cu patologia monogenică miodistrofia Duchenne/Becker, pentru a înțelege interacțiunea genelor.

Prin utilizarea a trei metode statistice (determinarea raportului șanselor, metoda regresiei logistice multinominale și reducerea multifactorială dimensională), a fost identificat rolul genelor cercetate în progresarea rapidă a procesului patologic. Conform postulatului clasic (formal) al geneticii: „un anume semn fenotipic este rezultatul expresiei tuturor genelor, chiar dacă impactul acestora este extrem de redus”. Respectiv, este corectă și teza inversă: „fiecare genă acționează asupra unui semn anume al organismului, chiar dacă efectul ei fenotipic este extrem de redus”. Prin recunoașterea veridicității acestei poziții în planul conceptului filosofic, s-ar putea de remarcat neconstructivitatea ei în practică [36].

Lucrarea noastră demonstrează abordarea constructivă „fiecare genă acționează asupra unui semn anume al organismului, chiar dacă efectul ei fenotipic este extrem de redus” în practică, fapt care ne-a permis să abordăm descrierea patogenezei din punctul de vedere al geneticii integrative. În 2006, Lehner și alții au propus o nouă paradigmă a bolilor genetice la om. Conform acestei paradigme, există două clase de gene care cauzează boli la oameni: prima clasă conține gene „specificatoare”, care

determină caracteristicile bolii și a doua clasă include gene „modificatoare”, sau „hub” care „servesc creșterii puterii bolii, ca urmare a mutațiilor din genele specificatoare”.

Cercetarea noastră a permis confirmarea paradigmei și dezvoltarea unor mecanisme patogenetice existente, datorită identificării particularităților genetice unice ale interacțiunii genelor metabolismului acidului folic și vitaminei B12 (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*) și oxidului nitric (*eNOS*) la bolnavii cu DMD/B cu diferit grad de severitate a procesului clinic, prin analiza timpului de plasare în scaunul cu roțile.

Analizând datele cercetătorilor străini și cele obținute în cadrul acestei cercetări, înaintăm o viziune proprie asupra patogenezei maladiei DMD/B din punctul de vedere al abordării individuale, contemporane și complexe (Figura 5.3). Conform acestei scheme, patologia distrofinei și complexului distrofina-glicoproteina afectează, în primul rând, procesul distrofic în DMD/B. În afara acestei modificări au influență și procesele epigenetice, afectarea *splicing*-ului ARN și genele modificatoare: genele ciclului folat, metioninic și *eNOS*, a căror rol este dovedit în acest studiu; modificatori de gene ale procesului catabolic (Fibronectin, Lumican etc.); genele implicate în procesul catabolic dependent de ubiquitin (proteazom, enzime conjugate ubiquitante, ligase ubiquitin, peptidaze ubiquitin); genele responsabile de leziuni și inflamații (catepsinele și moleculele de clasa II ale complexului major de histocompatibilitate), genele precursorilor metabolizilor și proceselor energetice și multe alte sisteme.

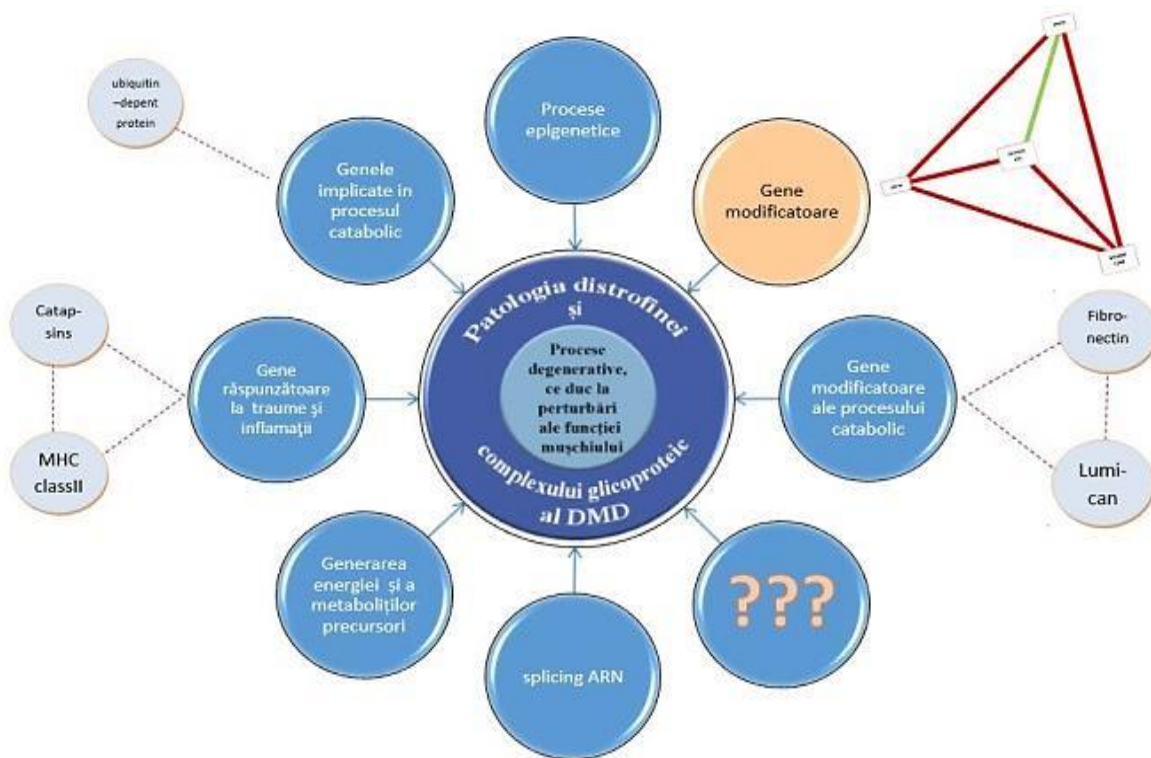


Fig.5.3. Schema patogenezei DMD/B (proprie)

Procesele date trebuie luate în calcul în cadrul ingineriei genice și la elaborarea metodelor de tratament al MDD, pentru că subestimarea modificărilor biochimice poate zădărnici aceste încercări de tratament.

Astfel, această lucrare este relevantă prin descifrarea și analiza aspectului teoretic. Evaluarea efectului modificador al sistemului genetic asupra manifestării fenotipice a patologiei monogene are o importanță fundamentală în înțelegerea patogenezei procesului patologic. Modelarea matematică a permis evaluarea rolului și a importanței factorilor genetici în evoluția și prognozarea procesului patologic.

5.4. Strategia de diagnostic molecular prin personalizarea monitorizării pacienților cu DMD/B

Medicina contemporană este numită „medicina pastilei și a bisturiului”. Actualmente, asemenea abordare nu mai este valabilă în totalitate. Descifrarea genomului uman, finalizată în aprilie 2003 în urma realizării cu succes a unui program științific internațional, a pus începutul unei noi ere – era medicinei individualizate (moleculare) și direcției sale profilactice – medicina predictivă. Deosebit de importantă este ideea pașaportului genetic, implementarea căruia necesită o analiză și din perspectivă juridică. Menționăm că succesul medicinei predictive depinde în totalitate de implementarea pe larg a realizărilor științei genetice în domeniul ocrotirii sănătății și de conlucrarea strânsă a geneticienilor și a medicilor de alte specialități [36]. Se conturează tot mai clar viitorul medicinei sintetice, bazate pe cunoașterea genomului uman individual și pe înțelegerea particularităților reacțiilor sale la diverse acțiuni, inclusiv dăunătoare, a factorilor de mediu. Specialiștii de valoare din occident, consideră că medicina secolului XXI va fi predictivă, preventivă, personalizată și participativă – „Medicina 4P” [36].

În țările economic dezvoltate se acordă o mare atenție medicinei personalizate, esența căreia constă în dirijarea individuală a stării de sănătate și a rezervelor organismului. În ultimii ani se observă o adevărată revoluție în domeniul geneticii umane, care are un impact semnificativ asupra majorității domeniilor medicale. Progresele din domeniul cercetărilor genetice, relevate în această lucrare, permit nu doar elucidarea etapei latente a bolii, înțelegerea anumitor mecanisme patogenice, dar și avertizează cu privire la însăși posibilitatea de agravare a procesului miopatic.

În medicina contemporană, măsurile terapeutice și profilactice nu sunt individualizate, adică nu sunt direcționate spre corecția modificărilor molecular-celulare concrete la persoana respectivă, ele se bazează mai mult pe principii generale de ameliorare și/sau corecție a sănătății și a stării generale a omului. Efectul acestui mod de tratare a bolnavilor cu MDD a determinat autorul spre cercetarea respectivă – una și aceeași listă de medicamente (metionina), prescrise în scop de rehabilitare, a avut un efect diferit asupra evoluției maladiei la pacienți.

La etapa actuală de dezvoltare a geneticii medicale sunt necesare cercetări clinico-genetice complexe pentru soluționarea problemelor legate de diagnostic, pronosticul adecvat al evoluției maladiei, consultarea medico-genetică efectivă și

căutarea căilor de corecție terapeutică pentru patologia dată. Rezultatele cercetării de față deschid posibilități de pronosticare a procesului miopatic la un anumit pacient, urmate de stabilirea particularităților de care se va ține cont la aplicarea măsurilor de corecție metabolică individuală.

Strategia de diagnostic molecular elaborată de noi urmărește implementarea evaluării individuale a riscurilor pe baza testării genetice (Figura 5.3). Strategia constă în testarea genei distrofinei și a locilor polimorfi ai genelor modificatoare și prognozarea evoluției bolii. În viitor, ținând cont de schema propusă a patogenezei, se va impune necesitatea cercetării altor gene modificatoare (altor rețele genice locale).

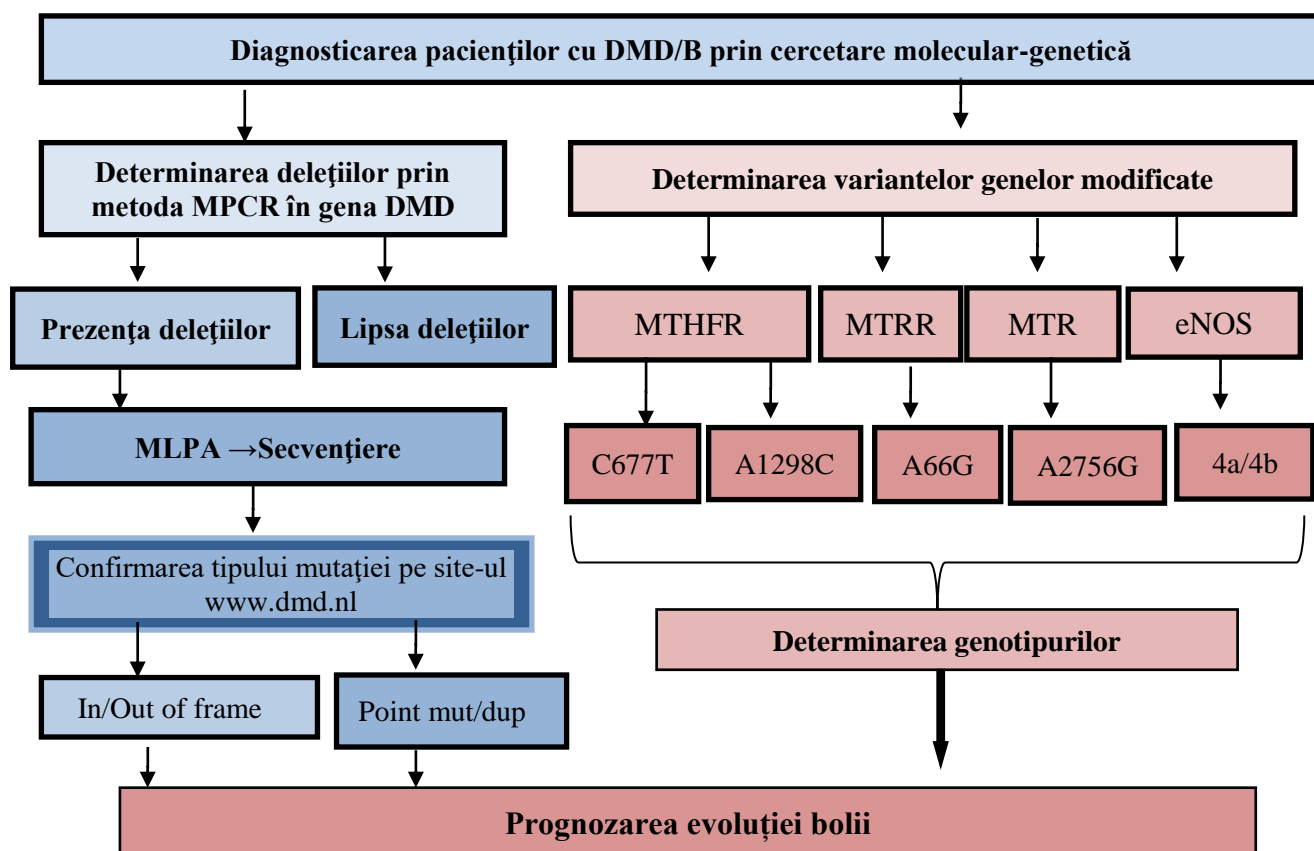


Fig.5.4. Strategia de diagnostic molecular pentru personalizarea monitoringului bolnavilor cu DMD/B

Această lucrare facilitează elaborarea strategiei de diagnostic molecular care este direcționat spre identificarea particularităților individuale ale bolnavilor și personalizare monitoringului miopatiei:

1. Aprecierea individuală a riscurilor modificărilor patologice pe baza testării genetice.
2. Formarea grupurilor în funcție de nivelul riscului.
3. Verificarea cu regularitate a indicatorilor stării actuale a organelor.

4. Elaborarea unor măsuri specifice, predominant cu caracter medicamentos, care permit alegerea individuală a măsurilor profilactice și servesc pentru prevenirea dezvoltării situațiilor critice pentru sănătate.

Astfel, în cadrul acestei lucrări au fost efectuate cercetări direcționate spre extinderea orizontului de cunoaștere cu privire la procesele ce decurg în organism în caz de miopatie și asigurarea utilizării eficiente a datelor genetice obținute pentru sănătatea bolnavilor cu miopatie.

Prezenta lucrare este actuală datorită abordării a două aspecte importante în medicină – aspectul teoretic și aspectul practic. Evaluarea efectului modificador al sistemelor genetice asupra expresiei fenotipice a patologiei monogenice are o importanță fundamentală pentru înțelegerea patogeniei procesului miopatic. Modelarea matematică a permis aprecierea rolului și a importanței factorilor genetici în raport cu timpul progresării și efectuarea prognosticului privind decurgerea procesului patologic.

Aspectul practic al lucrării constă în modificarea substanțială a principiului consultării genético-medicale – identificarea formelor clinice potențial severe de DMD/B. Neurologii vor avea posibilitatea de a selecta un tratament timpuriu individualizat, iar în unele cazuri, va deveni posibilă efectuarea terapiei de prevenire la etapa presimptomatică a bolii.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Concluzii generale

1. Pe baza cercetărilor clinico-genealogice și populational-genetice a fost creat registrul patologiilor neuromusculare frecvent întâlnite în Republica Moldova. Frecvența acestor maladii constituie 23,5 la 100.000 de locuitori. Dintre formele nosologice, frecvența miodistrofiei Duchenne/Becker a constituit 9,13; miodistrofiei centurilor – 5,3; distrofia musculară umar-scapulo-facială – 0,76; amiotrofiei neurale – 7,2; amiotrofiei spinale 8,43 la 100.000 de locuitori. A fost stabilită asocierea medie ($p=0,48$) între numărul de cazuri de miodistrofie Duchenne/Becker, amiotrofie spinală și neuropatie motosensorială tip 1A cu mărimea și compoziția națională a populației din raioane.
2. Analizele molecular-genetice, efectuate în cadrul studiului demonstrează, că pacienții cu distrofia musculară Duchenne/Becker în Republica Moldova se caracterizează prin prezența delețiilor a unui sau mai mulți exoni (84,98%) cu prevalența delețiilor out-of-frame (61,7%); deleții mai mari de un exon au fost găsite în 46,95% de cazuri, mutații punctiforme (2,4%), deleții rare (2,8%). Pentru prima dată au fost identificate 20 de deleții, care nu au fost descrise anterior în baza de date internaționale DMD LOVD v. 3.0.
3. La 85% de pacienți cu amiotrofie spinală din Republica Moldova au fost identificate delețiile exonilor 7 și/sau 8 ai genei *SMN1*, ceea ce corespunde cu datele internaționale. La 28% de pacienți din Republica Moldova a fost identificată deleția concomitentă a exonilor 7 și 8 în gena *SMN1*, ceea ce este mai frecvent decât în alte populații.
4. Populația Republicii Moldova poate fi caracterizată printr-un nivel sporit de heterozigozitate observată după polimorfismele rs1801133 ($H_o=0,43$), rs1801131 ($H_o=0,45$), rs1801394 ($H_o=0,44$), și printr-un nivel mediu de heterozigoție pentru rs1805087 ($H_o=0,38$) și *eNOS 4a/4b* ($H_o=0,40$), ceea ce indică posibilitatea aplicării acestor polimorfisme în practica cotidiană.
5. Aprecierea asocierii genotipurilor și a riscului agravării procesului miopatic a relevat o valoare statistic semnificativă pentru purtătorii homozigoți ai variantei polimorfe G66G a genei *MTRR* ($OR=7,20$, 95% CI:1,84-61,81, $p=0,039$), pentru purtătorii heterozigoți ai alelelor A2756G a genei *MTR* ($OR=0,63$, 95% CI:0,4-0,99, $p=0,045$) și A1298C a genei *MTHFR* ($OR=1,7$, 95% CI:1,06-2,72, $p=0,03$), și purtătorii alelei 4b a genei *eNOS* ($OR=1,58$, 95% CI:1,05-2,37, $p=0,027$).
6. Baza genetică a predispoziției pentru progresarea procesului miopatic și invalidizare timpurie (pina la 9 ani) este definită prin sinergie pronunțată a interacțiunii între genele *MTHFR*, *MTR* și *eNOS*.
7. Variantele polimorfe ale genelor *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* și *eNOS* care contribuie la formarea predispoziției și la progresia procesului miopatic la nivel molecular, sunt predictorii importanți ai vârstei de debut în stadiul 4 al bolii (gradul de severitatea) procesului miopatic și acționează ca modificatori ai manifestărilor clinice a DMD/B.

Recomandări practice

I. La nivel național:

1. Completarea standardelor de pregătire a medicilor de diferite specialități (medici de familie, pediatri, neurologiși geneticieni) în instituțiile de învățământ superior medical cu informația privind metodele diagnosticului predictiv și personalizat.
2. Elaborarea unui Protocol Național Clinic, de diagnostic și de tratament a Distrofiei Musculare Duchenne/Becker cu utilizarea datelor obținute în cercetarea dată.
3. Elaborarea Protoocoalelor Naționale Clinice și de diagnostic în domeniul neurogeneticii (amiotrofie spinală, miopatiilor progresive și congenitale, metabolice, mitocondriale etc.).

II. Pentru dezvoltarea geneticii umane în Republica Moldova:

4. Elaborarea unui Protocol Standardizat de diagnostic și de tratament a Distrofiei Musculare Duchenne/Becker cu utilizarea datelor obținute în prezenta cercetare la nivelul secundar a asistenței medicale.
5. Formarea grupurilor bolnavilor cu DMD/B în funcție de nivelul riscului agravării bolii prin identificarea formelor clinice potențial severe de DMD/B după tabelului de predicției la nivelul secundar a asistenței medicale.
6. Aplicarea algoritmilor și strategiei molecular-genetice elaborată în cadrul prezentei cercetări și dezvoltarea unor noi tehnologii molecular-genetice în scopul sporirii eficienței diagnosticării bolnavilor cu patologii genetice la nivelul terțiar a asistenței medicale.

PERSPECTIVE DE DEZVOLTARE ULTERIOARĂ A SUBIECTULUI

Datele cu privire la structura bolilor ereditare condiționate de patologia neuromusculară în Moldova, obținute în cadrul cercetării, pot fi utilizate în procesul de studiere a patogenezei unui mare grup de boli eterogene (miopatii mitocondriale, polineuropatie demielinizantă, miopatie congenitală), dar mai important, în dezvoltarea sistemelor de testare molecular-genetică a acestor maladii.

Frecvența sporită a apariției amiotrofiei spinale în Republica Moldova, impune necesitatea continuării activității de dezvoltare a metodelor molecular-genetice pentru determinarea purtătorilor mutațiilor de risc sporit al patologiei în cauză în cupluri, ceea ce va reduce probabilitatea nașterii copiilor bolnavi. Totodată, pentru posibilitatea inițierii în timp util a tratamentului, este necesară dezvoltarea și implementarea screeningului neonatal de determinare a amiotrofiei spinale.

Continuarea studiului genelor modificatoare în miodistrofia Duchenne și utilizarea abordări științifice odată inițiate și în studierea altor patologii monogene pentru clarificarea patogenezei acestor boli.

BIBLIOGRAFIE

1. Köhler S. ş.a. Ontological phenotype standards for neurogenetics. În: *Hum. Mutat.*, 2012, vol. 33, nr. 9, p. 1333–1339.
2. Tuffery-Giraud S. ş.a. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: A model of nation wide knowledge base. În: *Hum. Mutat.*, 2009, vol. 30, nr. 6, p. 934–945.
3. Поляков А. В. Стратегия идентификации генетических локусов при гетерогенных менделирующих наследственных заболеваниях. Диссер. д. б. н.: 03.00.26. - Москва, 2002. 236 с.
4. Sacara V. Clinical and molecular-genetic features of the neuromuscular pathologies in Republic of Moldova. In: *Romanian Journal of child and adolescent neurology and psychiatry*, 2017, vol. 23, nr. 3, p.68-73.
5. Clarke G. M. ş.a. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. În: *Nat. Protoc.*, 2011, vol. 6, nr. 2, p. 121–133.
6. Field A., Miles J., Field Z. *Discovering Statistics Using SPSS*. Pub. Ltd, 2012. 992 p.
7. Gola D. ş.a. A roadmap to multifactor dimensionality reduction methods. În: *Brief. Bioinform.*, 2016, vol. 17, nr. 2, p. 293–308.
8. Bushby K. Neuromuscular diseases: Milestones in development of treatments. În: *The Lancet Neurology*, 2011, vol. 10, nr. 1. p. 11–13.
9. Aartsma-Rus A., Straub V., Hemmings R., ş.a. Development of Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: A Critical Review and a Perspective on the Outstanding Issues. În: *Nucleic Acid Ther.* 2017, nr. 27, vol. 5, p. 251–259.
10. Kuntz N., Farwell W., Zhong Z. J .ş.a. Nusinersen in Infants Diagnosed with Spinal Muscular Atrophy (SMA): Study Design and Initial Interim Efficacy and Safety Findings from the Phase 3 International ENDEAR Study (CCI.002). În: *Neurology*, 2017, vol. 88, nr. 16 Supplement, p.1526–632X.
11. Calder A. N., Androphy E. J., Hodgetts K. J. Small Molecules in Development for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. În: *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 59, nr. 22, p. 10067–10083.
12. García-Minguillán C. J. ş.a. Riboflavin status modifies the effects of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) polymorphisms on homocysteine. În: *Genes Nutr.*, 2014, vol. 9, nr. 6, p. 435.
13. Li W. X. ş.a. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency. În: *Nutrients*, 2015, vol. 7, nr. 8, p. 6670–6687.
14. Dabiré H. ş.a. Vascular endothelial dysfunction in Duchenne muscular dystrophy is restored by bradykinin through upregulation of eNOS and nNOS. În: *Basic Res. Cardiol.*, 2012, vol. 107, nr. 1, p. 240-246.
15. Bushby K. ş.a. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. În: *Lancet Neurol.* , 2010, vol. 9, nr. 2, p. 177–189.
16. Fardeau M., Desguerre I. Diagnostic workup for neuromuscular diseases. În:

- Handb. Clin. Neurol., 2013, vol. 113, p. 1291–1297.
17. Emery A. Diagnostic criteria for neuromuscular disorders. Royal Society of Medicine Pr Ltd; 2 edition (January 1, 1997), 104 p.
 18. Ashton E. J., Yau C Shu., Deans Z. C. Simultaneous mutation scanning for gross deletions, duplications and point mutations in the DMD gene. În: Eur. J. Hum. Genet., 2008, vol. 16, p. 53–61.
 19. Мерсиянова И. В. Картирование и идентификация нового локуса аксональной формы наследственной мото-сенсорной нейропатии: Болезни Шарко-Мари-Тута II типа. Автореферат дис. кандидата биологических наук, Москва, 2001, 21 с.
 20. Hlistun V., Sacară V., ș.a. Dereglări la nivelul genelor ciclului folat și metioninic la femei cu pierderi reproductive. În: Bul. Perinatol., 2014, vol. 63, p. 39–43.
 21. Sacară V. Aspecte clinico-genetice ale neuropatiilor senzitivo-motorii ereditare în Republica Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale, 2008, nr. 5. p. 255-259.
 22. Sacară V. ș.a. Spectrul nozologic al bolilor ereditare ale sistemului nervos și particularitățile răspândirii patologiilor neuromusculare în Republica Moldova. În: Buletin de Perinatologie, 2012, vol. 55, nr. 3, p. 36-44.
 23. Ахмедова П. Г. Эпидемиология наследственных нервно-мышечных заболеваний в Республике Дагестан. Разработка основ нейрорегистра. Автореферат дис. кандидата медицинских наук, Москва, 2015, 25 с.
 24. Sirocova N., Sacară V. Studiarea locusurilor polimorfe D5S557, D5S435, care flanchează gena SMN (survival motor neuron) în familii cu atrofia musculară spinală Werdnig-Hoffmann. În: Bul. Perinatol., 2003, nr. 2, p. 16–21.
 25. Sacară V., ș.a. Analiza de asociere a genelor ciclurilor folat, metioninic și genei sintazei NO-endoteliale la bolnavii de miodistrofie Duchenne și la populația sănătoasă din Republica Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale, 2014, vol. 42, nr. 1, p. 210-213.
 26. Nefic H., Mackic-Djurovic M., Eminovic I. The Frequency of the 677C>T and 1298A>C Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in the Population. În: Med Arch., 2018, vol. 72, nr. 3, p. 164–169.
 27. Neagoș D., Cretu R., Sfetea R., Mierla D., Laurentiu B. Investigation of the relationship between the risk of spontaneous abortion and C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene. În: Rev. română Med. Lab., 2012, vol. 20, nr. 4/4, p. 335–343.
 28. Herak D., Antolic M., Krleza J., ș.a. Inherited prothrombotic risk factors in children with stroke, transient ischemic attack, or migraine. În: Pediatrics, 2009, vol. 123, p. e653–e660.
 29. Tamás Rösze. Nitric oxide signaling and nitrosative stress in the musculoskeletal system. În: Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants, 2014, p. 2895-2926.
 30. Sacara V., Mocan E., Scurtu V. Modelling and severity prediction in Moldavian DMD/DMB patients (Control No. 2013-A-1244-ESHG). In:

- European Journal of Human Genetics, 2013, vol. 21. p. 205-206.
31. Sacară V. ș.a. Estimarea influenței genelor modificatoare a metabolismului asupra manifestărilor proceselor miopatie (pe exemplul Distrofiei Musculare Duchenne/Becker). În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale, 2014, vol. 42, nr.1, p. 199-205.
 32. Sacara V., ș.a. Interaction among folat/homocysteine metabolism genes and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms predicts the severity of Duchenne muscular dystrophy in Moldavian patients. In: European Journal of Human Genetics, 2014, vol. 1(22). p. 199-200.
 33. Sacara V. Multifactor dimensionality reduction: detection gene-gene interactions in DMD studies. În: European Journal of Human Genetics, 2016. p. 300.
 34. Гринио Л. П. Дюшенновская миодистрофия. Ниж. Новгород: НГМА, 1998. 192 с.
 35. Mukund K., Subramaniam S. Dysregulated mechanisms underlying Duchenne muscular dystrophy from co-expression network preservation analysis. În: BMC Res. Notes, 2015, vol. 8, nr. 182, p.1-10.
 36. Баранов В. С. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины. Санкт-Петербург: Издательство Н-Л, 2009. 527с.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE LA TEMA TEZEI

Monografii monoautor.

1. Sacară V. Genetica umană. Chișinău: Biotehdesign, 2016. 181p. ISBN 978-9975-933-91-9.
2. Sacară V. Abordarea clinico-genetică contemporană a Distrofiei Musculare Duchenne. Chișinău: Art Poligraf, 2017. 157 p. ISBN 978-9972-108-26-3.

monografii colective:

1. Groppa S., Eremei Z., **Sacără V.** Distrofiile musculare progresive. Chișinău: Î.S.FEP „Tipografia Centrală”, 2005. 111 p. ISBN 9975-78-361-9, 616,74-007.23.
2. Puiu M., **Sacără V.** ș. a. Abordarea bolilor genetice prin screening și diagnostic pre- și postnatal. Timișoara: Editura „Victor Babeș”, 2019. 203 p. ISBN 978-606-786-109-9.

Articole în diferite reviste științifice:

în reviste internaționale cotate ISI și SCOPUS

1. **Сакарэ В.** Молекулярно-генетические особенности миодистрофии Дюшенна/Беккера в Республике Молдова. В: Генетика, 2008, том. 44(10). с1404-1409. ISSN ONLINE: 1608-3369.

în reviste din străinătate recunoscute

1. **Sacara V.** ș.a. Exon Deletion Pattern in Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/B) in Republic of Moldova. În: Proceeding of 5th medical genetics congress with international participation, 2018, p.281-290.
2. Coliban I., Balan V., Țurcan D.,**Sacără V.** Detection of Mutations in the Moldovan Patients With Duchenne/Becker Muscular Dystrophy and the Efficiency of MLPA over Multiplex PCR. În: Proceeding of 5th medical genetics congress with international participation, 2018, p.109-117.
3. **Sacara V.** Clinical and molecular-genetic features of the neuromuscular pathologies in Republic of Moldova. In: Romanian Journal of child and adolescent neurology and psychiatry, 2017, vol. 23, nr. 3, p.68-73.
4. Scurtu V., Stratilă, M., **Sacără V.** Diagnosticul prenatal al patologiilor neuromusculare frecvent întâlnite în Republica Moldova. În: Patologia malformativă neonatală. Iași: Technopress, 2013, p. 72-81.

în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei

Categoria B

1. Sacara V., ș.a. Medico-genetic assistance in the Republic of Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științele Vieții, 2010, vol. 311, nr. 2, p.84-89.
2. Sacără V., ș.a. Spectrul nozologic al bolilor ereditare ale sistemului nervos și particularitățile răspândirii patologiilor neuromusculare în Republica Moldova. În: Buletin de Perinatologie, 2012, vol. 55, nr. 3, p. 36-44.
3. Sacara V. Genetic analysis of dystrophin gene in affected males and females carriers with Duchenne/Becker muscular dystrophy in Republic of Moldova between 1992 and 2012. În: Buletin de Perinatologie, 2012, vol. 55, nr. 3, p. 29-36.
4. Grosu I., Scurtu V., Strătilă R., **Sacără V.** Diagnosticul prenatal al Distrofiei Musculare Duchenne și Atrofiei Musculare Spinale pe parcursul 4 ani și eficacitatea metodologiilor de diagnostic existente în Republica Moldova. În: Bul. de Perinatologie, 2014, vol. 64, nr. 3, p. 8-13.
5. Sacără V., ș.a. Analiza de asociere a genelor ciclurilor folat, metioninic și genei sintazei NO-endoteliale la bolnavii de miodistrofie Duchenne și la populația sănătoasă din Republica Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale, 2014, vol. 42, nr. 1, p. 210-213.
6. Sacără V., ș.a. Estimarea influenței genelor modificatoare a metabolismului asupra manifestărilor proceselor miopatie (pe exemplul Distrofiei Musculare Duchenne/Becker). În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale, 2014, vol. 42, nr.1, p. 199-205.
7. Sacără V., Levițchi A., Groppa S. Diagnosticul molecular-genetic în Republica Moldova: Istoria și Perspective. În: Buletin de Perinatologie, 2016, vol. 69, nr.1, p. 20-26.

Categoria C

1. Sacară V. Analiza molecular-genetică a unor boli monogenice ale sistemului nervos în Republica Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale, 2007, nr. 2(11). p. 150-154.
2. Sacară V. Aspecte clinico-genetice ale neuropatiilor senzitivo-motorii ereditare în Republica Moldova. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale, 2008, nr. 5. p. 255-259.
3. **Sacără V.**, Scvorțova E., Florea V. Analiza efectului modificador al factorilor genetici (genelor ciclului folat) asupra manifestărilor fenotipice în distrofia musculară Duchenne / Becker. În: Buletin de perinatologie, 2009, nr. 2(42). p. 45-51.
4. **Sacără V.**, Egorov V., Ușurelu N., Scvorțova E., Rusu L., Groppa S., Duca M., Moșin V. Optimizarea măsurilor de profilaxie primară a anomaliilor de dezvoltare folatdependente în Republica Moldova. În: Buletin de Perinatologie, 2010, nr. 1(45). p. 9-18.
5. **Sacără V.**, Spătaru A., Burgoci V., Groppa S., Duca M., Moșin V. Analiza efectului modificador a genei nitric oxide syntase în procesele miopatie. În: Buletin de Perinatologie, 2010, nr. 3(47). p. 61-66.

Recomandări practice

1. Sacară V., Ușurelu N., Puiu M. Metode de diagnostic clinic și laborator în genetica medicală (ghid practic). Chișinău: Baster Media SRL, 2019, 74 p. ISBN 978-9975-3296-0-6.

ADNOTARE

Victoria Sacară. „Particularitățile molecular-genetice ale patologiilor neuromusculare frecvent întâlnite în Republica Moldova”

Teză de doctor habilitat în științe biologice. Chișinău, 2019

Structura tezei: Teza include introducere, 5 capitole, sinteza rezultatelor obținute, concluzii generale, recomandări practice, bibliografia din 306 surse. Lucrarea este expusă pe 188 pagini text de bază, conține 40 figuri, 24 tabele, 4 algoritme, 16 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 76 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: genetică moleculară, genetică medicală, polimorfism genetic, modelare, prognozare, predicție, personalizare.

Domeniul de studiu: genetică umană, biologie moleculară și genetică medicală.

Scopul studiului a constat în analiza particularităților genetice ale maladiilor neuromusculare frecvent întâlnite în Republica Moldova și elaborarea unei strategii de diagnostic molecular-genetic individualizat pentru monitorizarea pacienților cu DMD/B.

Obiectivele studiului: 1. Stabilirea spectrului și frecvențelor relative ale celor mai răspândite forme de boli neuromusculare într-un eșantion de pacienți din Republica Moldova. 2. Identificarea particularităților genetice ale „nucleului” bolilor neuromusculare (miodistrofia Duchenne/Becker – DMD/B, amiotrofia spinală – SMA, neuropatia motosenzorială ereditară tip 1A – NSME 1A) și elaborarea unor algoritme de diagnostic molecular. 3. Elucidarea particularităților populațional-genetice ale distribuției frecvențelor alelelor polimorfe ale genelor *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G), *eNOS* (4a/4b) în grupul de cercetare și în cel de control. 4. Stabilirea contribuției variantelor polimorfe ale genelor cercetate în determinarea riscului genetic de evoluție rapidă a procesului miopatic la pacienții cu DMD. 5. Determinarea tipului și forței de interacțiune intergenice a polimorfismelor genelor studiate la pacienții cu ratele diferite de progresie a DMD. 6. Elaborarea strategiei de diagnostic molecular, luând în considerare caracteristicile individuale ale pacienților cu DMD pentru predicția evoluției și personalizarea tratamentului.

Metodologia: două tipuri de studiu – studiul retrospectiv de cohortă și studiul caz-control.

Noutatea și originalitatea științifică a lucrării constă în aprecierea frecvenței relative a patologiilor neuromusculare în cadrul populației Republicii Moldova (23,5:100000). În premieră a fost stabilită frecvența alelelor polimorfice a genelor *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *eNOS* în cadrul grupului de bolnavi cu DMD și de control. Pentru prima dată a fost determinată influența genelor modificatoare asupra patogenezei MDD/B. A fost argumentat sistemul de prognozare a gravității decurgerii bolii la copiii cu DMD/B, bazat pe analiza impactului delețiilor în gena *DMD* și a datelor privind genotiparea polimorfismelor genelor *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* și *eNOS*.

Rezultatele principale noi pentru știință și practică. Au fost studiate tipurile și puterea de interacțiune a patternului genelor *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* și *eNOS* în DMD/B, a fost determinat rolul lor în patogeneza, concomitent cu mutațiile din gena *DMD* în cazul progresării procesului patologic la diferite vârste (9 și 12 ani), ca un criteriu gravității procesului miopatic.

Importanța teoretică a lucrării constă în propunerea unei scheme noi de dezvoltare a procesului miopatic, ce va permite elaborarea metodelor de tratament individualizat. Pentru 3 forme nozologice este demonstrată prezența mutațiilor majore în genele corespunzătoare și frecvențele lor la bolnavi.

Valoarea aplicativă a lucrării. Au fost introduse algoritme clinico-diagnostice și molecular-genetice de diagnosticare a maladiilor neuromusculare ereditare frecvent întâlnite în Republica Moldova. A fost elaborată o strategie de diagnostic molecular pentru un monitoring personalizat al pacienților cu DMD/B.

Implementarea rezultatelor obținute. Rezultatele cercetării sunt aplicate în lucrul practic al Laboratorului de Genetică Moleculară Umană și al secțiilor neurologice ale IMSP IMC.

РЕЗЮМЕ

Сакарэ Виктория. «Молекулярно-генетические особенности частых нервно-мышечных патологий в Республике Молдова».

Диссертация доктора хабилитат биологических наук, г.Кишинэу, 2019 г.

Структура диссертации: введение, 5 глав, синтез полученных результатов, общие выводы и практические рекомендации, список литературы, включающий 306 источников, 188 основных страниц текста, 40 рисунков, 24 таблиц, дизайн исследования, 4 алгоритма, 16 приложений. Результаты исследования опубликованы в 76 научных работах.

Ключевые слова: молекулярная и медицинская генетика, генетический полиморфизм, моделирование, прогнозирование, предсказательность, персонификация.

Область исследования: генетика человека, молекулярная биология и медицинская генетика.

Цель: оценить генетические особенности нервно-мышечных заболеваний, часто встречающихся в Республике Молдова, разработать эффективной стратегии молекулярно-генетической диагностики для персонализированного мониторинга пациентов и МДД/Б.

Задачи исследования: 1.Оценить спектр и распространённость наиболее частых форм наследственных нервно-мышечных заболеваний в выборке пациентов в Республике Молдова; 2.Установить генетические особенности "ядра" нервно-мышечных патологий (миодистрофия Дюшенна-Беккера, спинальная амиотрофия, наследственная мотосенсорная нейропатия типа 1А) и разработать молекулярно-диагностические алгоритмы; 3.Выявить популяционно-генетические особенности распределения полиморфных аллелей генов *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G), *eNOS* (4a/4b) в исследовательской (пациенты МДД/Б) и контрольной группах; 4.Изучить вклад исследуемых полиморфных вариантов генов в определении генетического риска быстрого развития миопатического процесса на примере МДД; 5.Определить тип и силу межгенного взаимодействия у пациентов с МДД/Б при разной степени прогрессирования заболевания; 6.Разработать стратегию молекулярной диагностики, учитывающую индивидуальные особенности пациентов в свете прогноза и персонализированного лечения.

Методология: два типа исследования - ретроспективное когортное исследование и случай-контроль.

Научной новизной и оригинальностью работы является оценка относительной частоты нервно-мышечных патологий в популяции Республики Молдова (23,5: 100000). Впервые была определена частота полиморфных аллелей генов *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*, *eNOS* в группе больных МДД/Б и контрольной группе. Впервые установлено влияние геномодификаторов на патогенез МДД/Б. Предложена система прогнозирования течения заболевания у детей с МДД/Б, основанная на анализе влияния делеции в гене *DMD* и данных генотипирования для полиморфизмов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* и *eNOS*.

Основные результаты для науки и практики. При установлении роли геномодификаторов в патогенезе были изучены типы и сила взаимодействия паттернов генов *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* и *eNOS* при МДД/Б, определена их роль в патогенезе наряду с мутациями в гене *DMD* в случае прогрессирования патологии в разных возрастах (9 и 12 лет) как критерий тяжести заболевания.

Теоретическая значимость работы состоит в предложении нового взгляда на патогенез миопатии, позволяющего разработать индивидуальные методы коррекции. Для трёх нозологических форм определены частые мутации в соответствующих генах и их частоты у пациентов.

Практическая значимость работы. Внедрены клинико-диагностические и молекулярно-генетические алгоритмы диагностики наследственных нервно-мышечных заболеваний, часто встречающихся в Республике Молдова, и разработана стратегия молекулярной диагностики и персонализированного мониторинга пациентов с МДД/Б.

Реализация результатов. Результаты исследования применяются в практической работе лаборатории молекулярной генетики человека и неврологических отделений IMSP IMC.

SUMMARY

Sacara Victoria. „The molecular-genetic features of the neuro-muscular pathologies frequently encountered in the Republic of Moldova”.

Thesis of doctor of science in biology. Chisinau, 2019.

Thesis structure: introduction, 5 chapters, obtained results synthesis, general conclusions, practical recommendations, bibliography of 306 titles, 188 pages basic text, 40 images, 24 tables, 4 algorithms, 16 annexes. Study results were published in 76 scientific papers.

Keywords: molecular genetics, medical genetics, genetic polymorphism, modeling, prognosis, prediction, personification.

The field of study: human genetics, molecular biology and medical genetics.

Goal: Genetic features appreciation of neuromuscular diseases in the Republic of Moldova and an efficient molecular-genetic diagnostic strategy elaboration for personalized patients monitoring.

Study objectives: 1. Spectrum and relative frequencies appreciation of the most frequent hereditary neuromuscular diseases forms in a group of patients in Republic of Moldova. 2. Genetic features evaluation of neuromuscular pathologies "nucleus" (Duchenne/Becker's myodystrophy, spinal amyotrophy, type 1A hereditary motosensory neuropathy) and molecular diagnostic algorithms elaboration. 3. To study the population-genetic features of polymorphic allele distribution of *MTHFR* (C677T, A1298C), *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G) and *eNOS* (4a/4b) genes in the research (D/BMD patients) and control groups. 4. Investigated genes polymorphic variants contribution study for the genetic risk determination of myopathic process rapid evolution. 5. Studied genes polymorphisms interactions type and power determination in D/BMD patients at the different stage of disease. 6. Develop a molecular diagnosis strategy that would include patients individual characteristics for predictive and personalized medicine.

Methodology: Two types of study - retrospective cohort and case-control studies.

Thesis scientific novelty and originality consists of relative frequency of neuromuscular pathologies assessment in the Republic of Moldova population (23,5: 100000). For the first time polymorphic allele frequencies of *MTHFR*, *MTRR*, *MTR* and *eNOS* genes in the D/BMD and control group were determined. For the first time modifying genes influence on the pathogenesis of D/BMD was determined. The disease prognosis system in children with D/BMD was argued based on *DMD* deletion gene type impact analysis and genotyping data for *MTHFR*, *MTR*, *MTRR* and *eNOS* gene polymorphisms.

The main new results for science and practice. The types and the interaction power of the *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, and *eNOS* gene patterns in D/BMD were studied and their role in pathogenesis was determined along with mutations in the *DMD* gene in case of pathologic progression at different ages (9 and 12 years) as a criterion for the gravity of the myopathic process.

Thesis theoretical value consists of a new proposed scheme for myopathic process development, allowing individualized treatment. Major mutations in the corresponding genes and their frequencies in a group of patients were determined for 3 nozological forms.

Research applicative value: Clinical-diagnostic and molecular-genetic algorithms for the diagnosis of frequently encountered hereditary neuromuscular diseases in Republic of Moldova have been implemented. A molecular-diagnostic strategy for personalized D/BMD patients monitoring has been developed.

Results implementation. Research results were applied in the practice of the Laboratory of Human Molecular Genetics and neurology departments of IMSP IMC.

LISTA ABREVIERILOR

ADN – acid dezoxiribonucleic	MDR – Multifactor dimensionality reduction
BESN – boală ereditară a sistemului nervos	MESN – maladii ereditare ale sistemului nervos
CFM – ciclul folat metioninic	MLPA – Multiple Ligation Probe Amplification
CMG – consiliere medico-genetică	MPCR – reacția multiplex de polimerizare în lanț
CMT – boala Charcot-Marie-Tooth	MTHFR – metilentetrahidrofolatreductază
CSRGM – Centrul de Sănătate a Reproduserii și Genetică Medicală	MTR – metionin-sintază
DMB – distrofie musculară Becker	MTRR – metionin-sintază-reductază
DMD – distrofie musculară Duchenne	NGS –secvențierea de nouă generație
DMD/B – distrofie musculară Duchenne/Becker	NSME – neuropatie senzitivo-motorie ereditară
DP – diagnostic prenatal	PCR – reacție de polimerizare în lanț
EHW –echilibru Hardy-Weinberg	PMP 22 – peripheral myelin protein 22
eNOS – gena sintetazei endoteliale de oxid nitric	RLFP – polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție
GCFM – genele ciclului folat și celui metioninic	SMA – distrofie musculară spinală
IMSP IM și C- Institutul Mamei și Copilului	SMN – (gena) Survival Motor Neuron
LGMU -laborator de Genetică Moleculară Umană	SNP – Single Nucleotid Polymorphism
LOVD – Leiden open variation database	WGCNA – Weighted correlation network analysis
LHW –legea Hardy-Weinberg	

SACARĂ VICTORIA

**PARTICULARITĂȚILE MOLECULAR-GENETICE ALE
PATOLOGIILOR NEUROMUSCULARE FRECVENT ÎNTÂLNITE
ÎN REPUBLICA MOLDOVA**

162.02 – GENETICA OMULUI ȘI ANIMALELOR

Autoreferatul tezei de doctor habilitat în științe biologice

Aprobat spre tipar: 09.09.2019

Formatul hârtiei A4

Hârtie ofset. Tipar digital

Tiraj 50 ex.

Coli de tipar: 2,0

Comanda nr. 58

Tipografia PRINT-CARO

str. Columna, 170

tel.: 022-85-33-86